



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Identificación y caracterización de nuevos defectos del metabolismo energético mitocondrial asociados a aciduria 3-metilglutacónica y a deficiencia del complejo I

Olatz Ugarteburu López

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA

**Identificación y caracterización de nuevos defectos
del metabolismo energético mitocondrial
asociados a aciduria 3-metilglutacónica y a
deficiencia del complejo I**

Olatz Ugarteburu López

Barcelona, 2021

Identificación y caracterización de nuevos defectos del metabolismo energético mitocondrial asociados a aciduria 3-metilglutacónica y a deficiencia del complejo I

Memoria presentada por
Olatz Ugarteburu López

Para optar al título de
Doctor por la Universidad de Barcelona
Programa de Biomedicina

Tesis realizada bajo la dirección de la Dra. Antonia Ribes Rubió y el Dr. Frederic Tort Escalé en la Sección de Errores Congénitos del Metabolismo del Servicio de Bioquímica y Genética Molecular del Hospital Clínico de Barcelona

Los directores,

Dra. Antonia Ribes Rubió

Dr. Frederic Tort Escalé

El tutor,

Dr. Ramón Gomis de Barbarà

Olatz Ugarteburu López

Barcelona, 2021

ÍNDICE

ABREVIACIONES	9
RESUMEN	13
INTRODUCCIÓN GENERAL	17
1. ENFERMEDADES METABÓLICAS HEREDITARIAS	19
2. MITOCONDRIA	20
2.1. Morfología y dinámica mitocondrial	21
2.2. DNA mitocondrial.....	24
2.3. Importe de proteínas mitocondriales	25
2.4. Cadena respiratoria mitocondrial: complejos y supercomplejos	28
2.5. Metabolismo energético mitocondrial.....	32
2.5.1 Oxidación de sustratos energéticos	32
2.5.2. Ciclo de Krebs	33
2.5.3. Fosforilación oxidativa	33
2.6. Sistemas de control de calidad, mantenimiento y renovación mitocondrial	35
2.6.1. Mecanismos de respuesta al estrés oxidativo	35
2.6.2. Autofagia y mitofagia	37
3. ENFERMEDADES DEL METABOLISMO ENERGÉTICO MITOCONDRIAL.....	40
3.1. Bases genéticas	43
3.2. Características clínicas.....	43
3.3. Características bioquímicas y biomarcadores.....	45
3.3.1. Metabolitos del metabolismo intermediario.....	45
3.3.2. Actividad de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM) y de la piruvato deshidrogenasa (PDH).....	46
3.3.3. Oxidación de sustratos	47
3.3.4. Factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) y factor de crecimiento y diferenciación 15 (GDF15).....	47
3.3.5. Estudios histológicos y de microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	48
3.3.6. Estudios de neuroimagen mediante resonancia magnética (MRI)	48
3.4. Diagnóstico.....	48
4. ENFERMEDADES OBJETO DE ESTE ESTUDIO	50
4.1. Acidurias 3- metilglutacónicas	50
4.1.1. Síndrome de Barth o deficiencia de TAZ	52
4.1.2. Síndrome de Costeff o deficiencia de OPA3.....	52
4.1.3. Deficiencia de complejo V de la cadena respiratoria mitocondrial.	52
4.1.4. Deficiencia de MIC13.....	54

4.1.5. Síndrome DCMA o deficiencia de DNAJC19	54
4.1.6. Síndrome de MEGDEL o deficiencia de SERAC1.....	55
4.1.7. Síndrome MEGCANN o deficiencia de CLPB.....	55
4.1.8. Deficiencia de HTRA2	55
4.1.9. Deficiencia de TIMM50	56
4.1.10. Otros trastornos mitocondriales con aciduria 3-MG.	56
4.2. Deficiencias del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial	56
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	61
RESULTADOS	65
INFORME SOBRE LA CONTRIBUCIÓN DE LA DOCTORANDA A LAS PUBLICACIONES COMPRENDIDAS EN ESTA TESIS DOCTORAL	67
ARTÍCULO 1: Mutations in TIMM50 cause severe mitochondrial dysfunction by targeting key aspects of mitochondrial physiology.....	73
ARTÍCULO 2: Physiopathological Bases of the Disease Caused by HACE1 Mutations: Alterations in Autophagy, Mitophagy and Oxidative Stress Response.....	97
ARTÍCULO 3: Complex I deficiency, due to NDUFAF4 mutations, causes severe mitochondrial dysfunction and is associated to early death and dysmorphia.....	119
ARTÍCULO 4: Biallelic mutations in NDUFA8 cause complex I deficiency in two siblings with favorable clinical evolution.	133
DISCUSIÓN CONJUNTA	149
1. Estudio de la fisiopatología de la enfermedad causada por mutaciones en <i>TIMM50</i> ..	153
2. Identificación de mutaciones en <i>HACE1</i> asociadas a un paciente con aciduria 3-MG .	157
3. Caracterización de las bases moleculares de las deficiencias de complejo I causadas por mutaciones en <i>NDUFAF4</i> y <i>NDUFA8</i>	162
CONCLUSIONES	169
BIBLIOGRAFÍA	173
ANEXO	205

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Estructura mitocondrial	20
Figura 2. Estructura y dinámica mitocondrial	23
Figura 3. Estructura del DNA mitocondrial	25
Figura 4: Esquema representativo de las 5 vías principales del importe de proteínas	27
Figura 5. Esquema representativo de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial	30
Figura 6. Esquema representativo de la disposición de los supercomplejos en las crestas mitocondriales	32
Figura 7. Esquema representativo de los principales procesos del metabolismo energético mitocondrial	34
Figura 8. Esquema representativo del proceso de macroautofagia y mitofagia mediada por PINK1-PRKN	40
Figura 9. Genes asociados a patología mitocondrial	42
Figura 10. Imagen representativa indicando los principales síntomas, órganos y sistemas afectados en las enfermedades mitocondriales	44
Figura 11. Esquema del catabolismo de la leucina	51
Figura 12. Esquema de los pacientes y genes estudiados en el marco de esta tesis doctoral	71
Figura 13. Esquema sobre el el proceso de autofagia y su estudio	159
Figura 14. Esquema representativo de las alteraciones celulares causadas por la deficiencia de HACE1	162
Figura 15. Modelo de ensamblaje del complejo I	168
Tabla 1: Acidurias 3-metilglutacónicas	59

ABREVIACIONES

3-MGA	Ácido 3-metilglutacónico
acidurias 3-MG	Acidurias 3-metilglutacónicas
ACMG	American College of Medical Genetics
AGK	Acilglicerol quinasa
AMP	Adenosín monofosfato
AR	Aspect ratio
AR	Receptor de andrógenos
ATP	Adenosina trifosfato
ATP5F1A	Subunidad alfa de la ATP sintasa F1
ATP5F1D	Subunidad delta de la ATP sintasa F1
ATP5F1E	Subunidad épsilon de la ATP sintasa F1
ATPAF2	Subunidad alfa de la ATP sintasa F2
AUH	3-metilglutaconil-CoA-hidratasa
BN	Blue Native
Cas9	Proteína 9 asociada a CRISPR
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CFS	Líquido cefaloraquídeo
C	Complejo de la cadena respiratoria mitocondrial
CL	Cardiolipina
CLPB	Homólogo de la proteína caseinolítica peptidasa B
CMA	Autofagia mediada por chaperonas
CO ₂	Dióxido de carbono
CoQ	Coenzima Q
COX	Citocromo c oxidasa
CPEO:	Oftalmoplejía crónica progresiva externa
CPS1	Carbamoil fosfato sintasa 1
CRISPR	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas
CRM	Cadena respiratoria mitocondrial
CYC1	Citocromo c1
DCMA	Cardiomiopatía dilatada con ataxia
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAJC19	Miembro C19 de la familia de proteínas de choque térmico Dnaj
Dnm2	Dinamina 2

DRP1	Proteína relacionada con las dinaminas 1
ECHS1	Cadena corta 1 de la enoil-CoA hidratasa
EMH	Enfermedades metabólicas hereditarias
EP	E64D + pepstatina A
ER	Retículo endoplasmático
FADH	Flavín adenín dinucleótido
FF	Form factor
FGF21	Factor de crecimiento de fibroblastos 21
GDF15	Factor de crecimiento y diferenciación 15
GTP	Guanosín trifosfato
GTPasas	Guanosina trifosfatasa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HACE1	E3 ubiquitin protein ligasa 1 que contiene dominios HECT y repeticiones de ankirina
<i>Hmox1</i>	Hemo oxigenasa 1
HTRA2	Receptor 2A de la 5-hidroxitriptamina
LC3	Cadena ligera 3B de la proteína asociada a los microtúbulos 1A/1B.
LHON	Neuropatía óptica de Leber
LIR	Dominio de reconocimiento a la proteína LC3-II
MAM	Membrana del retículo endoplasmático asociado a mitocondrias
MEGCANN	Aciduria 3-metilglutacónica con cataratas, implicación neurológica y neutropenia.
MEGDEL	Aciduria 3-metilglutacónica con sordera, encefalopatía y síndrome de Leigh.
MELAS	Encefalopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios similares a un accidente cerebrovascular
MFN1	Mitofusina 1
MFN2	Mitofusina 2
MIA	Espacio intermembrana
MIC13	Subunidad 13 del sistema de organización del lugar de contacto y crestas mitocondriales
MICOS	Organización del lugar de contacto y de las crestas mitocondriales
MIDD	Diabetes y sordera de herencia materna
MME	Membrana mitocondrial externa
MMI	Membrana mitocondrial interna
MPP	Peptidasa de procesamiento mitocondrial

MRI	Imagen por resonancia magnética
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MT-CYB	Citocromo b
mtDNA	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
mTORC1	Complejo I de diana de rapamicina en células de mamífero
mtUPR	Respuesta mitocondrial a proteínas mal plegadas
NADH	Nicotiamida adenina dinucleótido
nDNA	Ácido desoxirribonucleico nuclear
<i>NDUFA8</i>	Subunidad alfa 8 del complejo NADH:ubiquinona oxidoreductasa
<i>NDUFA4</i>	Factor de ensamblaje 4 del complejo NADH:ubiquinona oxidoreductasa.
NGS	“next generation sequencing”. Secuenciación masiva de nueva generación.
<i>NQO1</i>	Deshidrogenasa quinona NAD(P)H
NRF2	Factor 2 relacionado al factor eritroide 2
OH	Radical hidroxilo
OMIM	Herencia mendeliana en el hombre online
OPA3	Proteína de atrofia óptica 3
OXPHOS	Fosforilación oxidativa
PAM	Translocasa de presecuencia
PDH	Piruvato deshidrogenasa
PHB	Prohibitinas
PINK1	Proteína quinasa inducida por PTEN
PRKN	Parkina
qPCR	PCR cuantitativa
RAC	GTPasa 1 de la familia Rac
RNA	Ácido ribonucleico
RNAseq	Secuenciación de RNA
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
SAM	Maquinaria de clasificación y ensamblaje
SC	Supercomplejo
SDHA	Subunidad A de flavoproteína del complejo succinato deshidrogenasa
SERAC1	Proteína 1 que contiene el sitio activo de serina
SLO	Smith-Lemli-Opitz
SOD	Superoxido dismutasa
TAZ	Tafazzina

TEM	Microscopio electrónico de transmisión
TFEB	Factor de transcripción EB
TIM	Translocasa de la membrana mitocondrial interna
TIMM50	Translocasa de membrana mitocondrial interna 50
TMEM70	Proteína de transmembrana 70
TOM	Traslocasa de la membrana mitocondrial externa
tRNA	Ácido ribonucleico de tranferencia
UBA	Dominio de reconocimiento a ubiquitina
VDAC	Canales dependientes de voltaje
VUS	Variante de significado incierto
WES	Secuenciación del exoma completo
WGS	Secuenciación del genoma completo

RESUMEN

Las enfermedades del metabolismo energético mitocondrial son un grupo de patologías con una gran heterogeneidad clínica, bioquímica y genética. Aunque en la última década la implementación de las técnicas de “next generation sequencing” (NGS) ha permitido la identificación de un importante número de genes asociados a estas enfermedades, el diagnóstico de estos pacientes sigue siendo muy complejo. Por ello, la identificación y el estudio de biomarcadores para estas enfermedades es fundamental, ya que permite dirigir la interpretación de los datos genéticos y el diagnóstico hacia vías metabólicas o funciones celulares concretas. Un biomarcador ampliamente aceptado como indicador de alteración mitocondrial es la elevación de ácido 3-metilglutacónico (3-MGA) en orina, que es el hilo conductor de esta tesis doctoral. Los niveles elevados y persistentes de este metabolito se asocian a defectos en proteínas asociadas a la membrana mitocondrial entre las que se encuentran ciertas deficiencias del complejo V de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM). Por otro lado, la alteración más frecuente entre las patologías mitocondriales es la deficiencia del complejo I.

En base a los conocimientos previos sobre la afectación mitocondrial en estos trastornos, la hipótesis de esta tesis es que la implementación de herramientas de caracterización mitocondrial facilitará la priorización e identificación de las variantes genéticas causantes de la enfermedad. Nuestros estudios se han centrado en la caracterización de la morfología mitocondrial, el ensamblaje de los complejos y supercomplejos de la CRM y la respiración celular. Además, en cada uno de los casos incluidos en este trabajo, se han realizado estudios más específicos relacionados con el gen alterado, dando en su conjunto una amplia visión de las bases moleculares subyacentes en cada patología.

En esta tesis se han estudiado un total de 36 pacientes con sospecha de enfermedad mitocondrial en los que se han realizado análisis genéticos y estudios funcionales en células de los pacientes o en modelos celulares. En 14 pacientes se observó aciduria 3-metilglutacónica (aciduria 3-MG), habiéndose conseguido un diagnóstico genético definitivo en 11 de ellos. En 17 de los 22 pacientes restantes, los estudios funcionales realizados han permitido confirmar la causalidad de las variantes identificadas. Asimismo, estos estudios han descartado la patogenidad de las variantes candidatas en 5 casos. El estudio de las bases moleculares de las enfermedades causadas por mutaciones en *TIMM50*, *HACE1*, *NDUFA4* y *NDUFA8* ha dado lugar a las 4 publicaciones que conforman el grueso de esta tesis doctoral.

En el primer artículo, presentamos un paciente con síndrome de Leigh, atrofia óptica, neutropenia, cardiomiopatía y aciduria 3-MG en el que se identificaron dos mutaciones en heterocigosis compuesta en el gen *TIMM50* (c.341G>A; p.Arg114Gln y c.805G>A; p.Gly269Ser).

Este gen codifica para una proteína implicada en el transporte de proteínas desde el citosol hacia el interior de la mitocondria. Los estudios realizados en fibroblastos del paciente y en un modelo celular generado mediante CRISPR/Cas9 han demostrado que la deficiencia de TIMM50 da lugar a una disfunción mitocondrial severa que afecta al mantenimiento de la morfología mitocondrial, al ensamblaje del sistema OXPHOS y a la capacidad respiratoria mitocondrial.

En el segundo trabajo se ha estudiado un paciente con sospecha de enfermedad mitocondrial que presentaba atrofia cerebral, retraso psicomotor y aciduria 3-MG. Sin embargo, mediante NGS se identificó una mutación en homocigosis en el gen *HACE1* (c.240C>A; p.Cys80Ter), que codifica una proteína citoplasmática con actividad ubiquitin-ligasa. Los estudios funcionales realizados han demostrado que la deficiencia de HACE1 da lugar a alteraciones en las vías de respuesta a estrés oxidativo mediadas por NRF2 y defectos en los procesos de autofagia y mitofagia. Además, nuestros resultados han asociado por primera vez, la deficiencia de HACE1 a alteraciones de la función mitocondrial y a aciduria 3-MG.

En los dos últimos artículos de la tesis se caracterizan 2 familias con deficiencia del complejo I de la CRM. En la primera, los dos hermanos afectados presentaron encefalopatía, dismorfia, acidosis láctica y aciduria 3-MG desde el nacimiento. Fueron *exitus* a los pocos meses de vida. Mediante los estudios genéticos, se identificaron mutaciones en homocigosis en el gen *NDUFA4* (c.478G>T; p.Glu160Ter), que codifica un factor de ensamblaje del complejo I de la CRM. Los estudios funcionales demostraron una reducción drástica del ensamblaje del complejo I y de los supercomplejos de alto peso molecular, alteraciones en la morfología mitocondrial y deficiencia de la respiración mitocondrial. En la segunda familia, se identificaron mutaciones en homocigosis en el gen *NDUFA8* (c.293G>T; p.Arg98Leu), que codifica una subunidad del complejo I. La particularidad de estos pacientes reside en la progresión sorprendentemente favorable de la enfermedad, siendo prácticamente asintomáticos a la edad de 6 y 9 años. Este fenotipo es atípico tratándose de una deficiencia del complejo I de la CRM. Sin embargo, los estudios funcionales mostraron una importante deficiencia en el ensamblaje del complejo I y de los supercomplejos. La patogenicidad de la mutación fue demostrada mediante estudios de complementación funcional en fibroblastos de los pacientes. En resumen, los estudios funcionales realizados han permitido confirmar que las variantes identificadas son la causa de la enfermedad y profundizar en el conocimiento de las bases moleculares de estas enfermedades.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. ENFERMEDADES METABÓLICAS HEREDITARIAS

El concepto de “errores congénitos del metabolismo”, hoy en día “enfermedades metabólicas hereditarias” (EMH), fue introducido por Sir Archibald Garrod, profesor de Medicina en la Universidad de Oxford en 1909. Describió cuatro entidades paradigmáticas: albinismo, alcaptonuria, cistinuria y pentosuria. Observó que los pacientes presentaban anomalías químicas que se transmitían familiarmente siguiendo las leyes de Mendel. A partir de estas valiosas observaciones, hoy en día sabemos que las EMH son debidas a mutaciones en genes que codifican proteínas involucradas en funciones muy diversas: enzimáticas, de transporte, de ensamblaje, de comunicación entre orgánulos celulares y un largo etc. Al alterarse el gen que las codifica, estas proteínas perderán su función y a su vez darán lugar a desequilibrios químicos en el organismo (metabolismo) induciendo las manifestaciones clínicas y el fenotipo (Garrod, 1909; La Du et al., 1958; Weatherall, 2008).

En general, una característica diferencial de las EMH respecto otras enfermedades genéticas hereditarias, es que las primeras tienen un fenotipo metabólico, es decir un perfil alterado de metabolitos en fluidos biológicos o bien alteraciones funcionales a nivel celular, que nos ayudarán a establecer la orientación diagnóstica. Sin embargo, cada vez es más difícil distinguir entre EMH y otras enfermedades genéticas hereditarias. De hecho, en los últimos años, la implementación de las herramientas de “next generation sequencing” (NGS) ha permitido identificar un gran número de enfermedades genéticas hereditarias, algunas sin biomarcadores detectables por los métodos habituales de laboratorio. No obstante, la evolución de las tecnologías ómicas ha permitido, de forma retrospectiva, identificar en algunos casos biomarcadores de sumo interés. Así pues, resulta difícil determinar si una enfermedad que no dispone actualmente de un fenotipo bioquímico asociado, es o no es una EMH (Morava et al., 2015). En cualquier caso, las EMH representan un grupo muy heterogéneo de patologías monogénicas que se heredan mayoritariamente de forma autosómica recesiva, o bien ligadas al cromosoma X y en muy pocos casos de forma dominantes. Aquellas producidas por defectos en el DNA mitocondrial (mtDNA) tienen herencia materna. Clínicamente estas enfermedades pueden presentarse desde edades muy tempranas hasta en la edad adulta. Sin embargo, en la gran mayoría de los casos, los primeros síntomas aparecen en edad pediátrica.

El metabolismo celular involucra un gran número de proteínas con funciones muy diversas cuyos defectos pueden dar lugar a una EMH. Las más comunes son los trastornos del metabolismo de aminoácidos, ácidos orgánicos, ácidos grasos, colesterol, purinas y pirimidinas, alteraciones de la glicosilación de proteínas, defectos en neurotransmisores o

alteraciones en el funcionamiento de orgánulos celulares como la mitocondria, el peroxisoma o el lisosoma. En esta tesis doctoral nos hemos centrado específicamente en las enfermedades del metabolismo energético mitocondrial.

2. MITOCONDRIA

La mitocondria es un orgánulo esencial presente en las células de casi todos los organismos eucariotas (Burki, 2016; Karnkowska et al., 2016). Según la teoría endosimbiótica, pronunciada por Lynn Margulis en 1967 (Sagan, 1967), evolutivamente la mitocondria tiene su origen en un protobacterio engullido mediante endocitosis. Como resultado, se generó un orgánulo altamente especializado, envuelto de una doble membrana lipídica, enucleado y con material genético propio (**Figura 1**) (Craven et al., 2017).

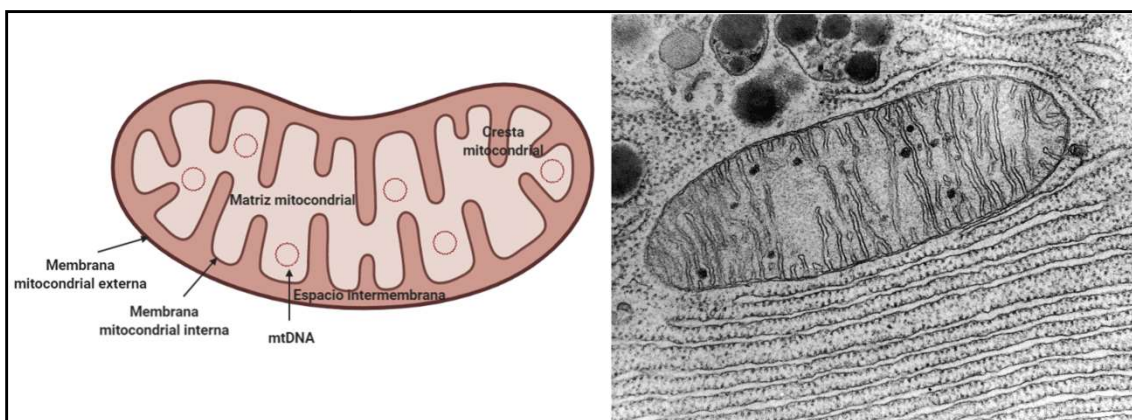


Figura 1. Estructura mitocondrial. En el panel izquierdo se observa la imagen de una mitocondria indicando las partes más relevantes de la misma. Imagen realizada mediante BioRender. En el panel derecho se observa la imagen real de una mitocondria obtenida a través de microscopía electrónica de transmisión. Imagen extraída de <https://www.sciencesource.com/archive/Mitochondrion--TEM-SS2185655.html>

La mitocondria está implicada en numerosas funciones esenciales para la fisiología celular. Su principal función, y la más conocida, es la producción de energía celular en forma de adenosina trifosfato (ATP). Este proceso se realiza mediante las reacciones del metabolismo energético mitocondrial y la fosforilación oxidativa (OXPHOS), generando aproximadamente el 90% de la energía celular que necesita el cuerpo humano (Harris & Das, 1991). Además, la mitocondria contiene proteínas implicadas en diversas vías metabólicas que tienen lugar total o parcialmente en el interior de este orgánulo, como el ciclo de la urea, la gluconeogénesis y la cetogénesis (Duchen, 2004; Rustin et al., 1997). Este orgánulo tiene además otras funciones importantes, entre las que destacamos la termogénesis, biosíntesis de clusters de Fe-S y del grupo hemo, regulación de la apoptosis, metabolismo de lípidos, la esteroidogénesis y la homeóstasis del calcio (Chipuk et al., 2006; Hooper et al., 2006; Hughes et al., 2009; Rawat & Stemmler, 2011).

Desde el punto de vista estructural, la mitocondria está formada por dos membranas lipídicas de distinta composición: La membrana mitocondrial externa (MME) y la membrana mitocondrial interna (MMI). Estas delimitan los distintos compartimentos del orgánulo: El espacio intermembrana, situado entre ambas membranas, y la matriz mitocondrial, el espacio rodeado por la MMI, donde se alberga el DNA mitocondrial (mtDNA). Además, en la matriz mitocondrial se encuentra la mayor parte de la maquinaria molecular del orgánulo, incluyendo los enzimas responsables de las reacciones centrales del metabolismo oxidativo y de otros procesos bioquímicos esenciales para la función mitocondrial y celular (Cooper, 2000; Lodish et al., 2000). Dada la importancia fisiológica de la mitocondria, las alteraciones en el mantenimiento y función de este orgánulo tienen consecuencias nocivas para la célula y el organismo en general, y se han asociado a un número importante patologías.

2.1. Morfología y dinámica mitocondrial

La membrana mitocondrial externa (MME) es una bicapa lipídica con una composición similar a la del resto de membranas de las células eucariotas. Es relativamente permeable a pequeñas moléculas, hasta 10kDa, que cruzan hacia el interior de la mitocondria a través de los canales dependientes de voltaje (VDAC), también llamados porinas (Colombini et al., 1996). La MME contiene además numerosas proteínas transportadoras especializadas que regulan el transporte de proteínas y otros metabolitos (Pfanner et al., 2019). Se conocen al menos dos zonas especializadas en la interacción de la mitocondria con otras mitocondrias o con otros orgánulos celulares. Las uniones intermitocondriales permiten interacciones mitocondria-mitocondria que son importantes para la regulación de la morfología y de la dinámica mitocondrial (Picard et al., 2015). Por otro lado, las regiones conocidas como MAM (membrana del retículo endoplasmático asociado a mitocondrias) permiten la interacción de la mitocondria con el retículo endoplasmático (ER). Estas regiones están involucradas en la importación de ciertos lípidos del ER hacia las mitocondrias, en la regulación de la homeostasis del calcio, la dinámica mitocondrial, la autofagia y la apoptosis (Krols et al., 2016).

La membrana mitocondrial interna (MMI) contiene un ratio proteína/lípidos elevado, muy distinto al de otras membranas eucariotas y similar al de las células procariotas. Es más selectiva al paso de iones y proteínas que la MME, para lo que dispone de translocasas especializadas. Aproximadamente el 20% del total de los lípidos que constituyen la MMI son cardiolipinas, un fosfolípido de carga negativa, muy común en membranas bacterianas. Además, las cardiolipinas son cruciales para el correcto funcionamiento de diversas enzimas mitocondriales así como para el mantenimiento de la morfología y la función mitocondrial (Scorrano, 2013). Anclados en la MMI, se encuentran los complejos de la cadena respiratoria

mitocondrial (CRM), que junto con las dos moléculas transportadoras de electrones (Coenzima Q y citocromo c) constituyen el denominado sistema OXPHOS, responsable de la fosforilación oxidativa y de la síntesis de ATP, esta última reacción catalizada por la ATP sintasa. En el apartado 2.4 se describe en detalle la organización y función de los complejos que conforman este sistema multienzimático.

El área de la superficie de la MMI es muy extensa ya que forma unas estructuras peculiares en forma de invaginaciones denominadas crestas mitocondriales. Aunque el proceso de formación y mantenimiento de dichas estructuras no está definido, a día de hoy, se han identificado diversos elementos implicados en estos procesos (Cogliati et al., 2016). Uno de los elementos estructurales principales es el sistema de organización del lugar de contacto y crestas mitocondriales (MICOS), un gran complejo proteico situado en los pliegues de las crestas que permite la interacción entre la MME y la MMI (Pfanner et al., 2014). En este sentido, diversos estudios han demostrado que alteraciones en el complejo MICOS dan lugar a defectos de la morfología y de la ultraestructura mitocondrial (Friedman et al., 2015). Por otro lado, las proteínas de la familia de las prohibitinas (PHB) forman complejos junto con las cardiolipinas, favoreciendo el mantenimiento de la estructura de la MMI. Defectos en dicha estructura dan lugar a alteraciones de la morfología mitocondrial (Merkwirth et al., 2008; Signorile et al., 2019). El sistema OXPHOS también se encuentra localizado en las crestas mitocondriales. En particular, la ATP sintasa se sitúa en el eje de las crestas y se ha postulado que la dimerización de este complejo juega un papel importante en la formación de las mismas (Davies et al., 2011). Sin embargo, existe controversia respecto a este proceso y respecto a la interdependencia entre la formación de las crestas y el ensamblaje de los complejos de la CRM (Jiko et al., 2015; Khalifat et al., 2008; Rieger et al., 2014). En cualquier caso, es evidente que ambos procesos están estrechamente relacionados y que las crestas mitocondriales se podrían considerar compartimentos altamente especializados y dinámicos que se remodelan en respuesta las necesidades energéticas de la célula (Cogliati et al., 2016).

En las células eucariotas, las mitocondrias forman una red tubular en el citoplasma celular coordinando los procesos de fusión y fisión mitocondrial. El balance entre estos dos mecanismos opuestos se denomina dinámica mitocondrial. Dicho proceso es el responsable de regular el número de mitocondrias presentes en la célula y el tamaño del orgánulo, además de su localización en el interior del citoplasma (Berein-Hahn & Vöth, 1994; Tilokani et al., 2018; Wai & Langer, 2016). Por ello, no es de extrañar que los mecanismos que regulan la dinámica mitocondrial y la morfología y estructura del orgánulo estén estrechamente relacionados (**Figura 2**). Asimismo, la alteración de los eventos de fusión y fisión mitocondrial puede resultar

en una red mitocondrial fragmentada (caracterizada por mitocondrias pequeñas y redondeas) o por el contrario, en una red tubular hiperfusionada (con mitocondrias alargadas y muy conectadas entre sí) (Tilokani et al., 2018).

Las principales proteínas implicadas en estos procesos son GTPasas de la familia de las dinaminas (Liesa et al., 2009; Tilokani et al., 2018; Wai & Langer, 2016). La fusión mitocondrial se realiza principalmente mediante la acción de las proteínas Mitofusina 1 (MFN1) y Mitofusina 2 (MFN2), que median la fusión de la MME (Eura et al., 2003; Koshiba et al., 2004) y OPA1, encargada de regular la fusión de la MMI. Esta última además ayuda al mantenimiento de las crestas mitocondriales a través de su interacción con las PHB (Hakjoo Lee & Yoon, 2018; Merkwirth et al., 2008). En el proceso de fusión de la MMI intervienen también algunos componentes lipídicos de dicha membrana, concretamente las cardiolipinas (Ban et al., 2017; Cogliati et al., 2016). Por otro lado, la fisión mitocondrial es un proceso que consta de varias etapas y está regulado primordialmente por la proteína DRP1. Esta proteína se localiza en el citoplasma celular y es reclutada hacia la MME donde oligomeriza y realiza la constricción de la membrana (Ishihara et al., 2003). El proceso de escisión sin embargo, no está completamente caracterizado aunque parece que la proteína Dinamina 2 (Dnm2) podría jugar un papel crucial (Lee et al., 2016). Cabe destacar, que las proteínas de la maquinaria implicada tanto en la fusión como en la fisión mitocondrial pueden sufrir modificaciones post-traduccionales que permiten modular su actividad y por tanto todo el proceso (Tilokani et al., 2018).

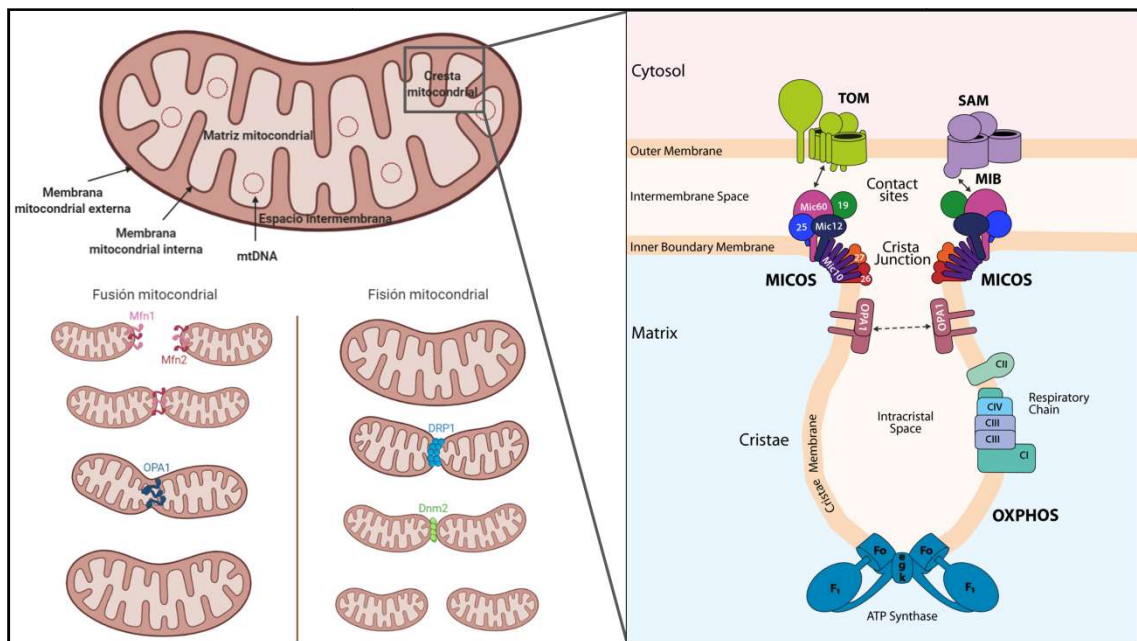


Figura 2. Estructura y dinámica mitocondrial. En el panel derecho se observa la estructura mitocondrial y los principales componentes que participan en la fusión y fisión mitocondrial. Imagen realizada mediante BioRender. En el panel derecho se observa en detalle las proteínas que se encuentran en la cresta mitocondrial. Imagen extraída de (Colina-Tenorio et al., 2020)

2.2. DNA mitocondrial

Rodeada por la MMI se encuentra la matriz mitocondrial. Este compartimento alberga el DNA mitocondrial (mtDNA) y toda la maquinaria necesaria para su mantenimiento, transcripción y traducción. Existen múltiples copias de mtDNA en una misma célula, y su cantidad puede variar desde unos pocos centenares hasta miles de copias, dependiendo del tipo celular (Gorman et al., 2016).

El mtDNA consta de una molécula de DNA circular de doble cadena de 16.569 pares de bases (Anderson et al., 1981; Turnbull et al., 1999). Las dos cadenas muestran distinta composición, de manera que la hebra pesada (H, heavy) tiene un mayor contenido en guaninas que la hebra ligera (L, light) (**Figura 3**)(Bogehagen, 1978). El mtDNA contiene únicamente 37 genes, 28 en la cadena pesada y 9 en la cadena ligera. 13 de ellos codifican subunidades estructurales de los complejos I, III, IV y V de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM), 22 RNA de transferencia (tRNA) y 2 RNA ribosomales (rRNA) necesarios para la traducción y síntesis intramitocondrial de proteínas (Anderson et al., 1981). A diferencia del DNA nuclear (nDNA), los genes del mtDNA no están estructurados en intrones y exones. La replicación y transcripción del mtDNA están controladas por una región no-codificante denominada “displacement loop” (bucle de desplazamiento). Para regular la expresión de estos genes y para el correcto funcionamiento de la fisiología mitocondrial, también se requiere la participación de un número importante de proteínas codificadas por el nDNA. Dichas proteínas están implicadas en el mantenimiento del mtDNA, la transcripción, procesamiento y maduración del RNA. Además, son necesarias para la traducción y su posterior inserción en los complejos de la CRM, situados en la MMI (Thompson et al., 2020).

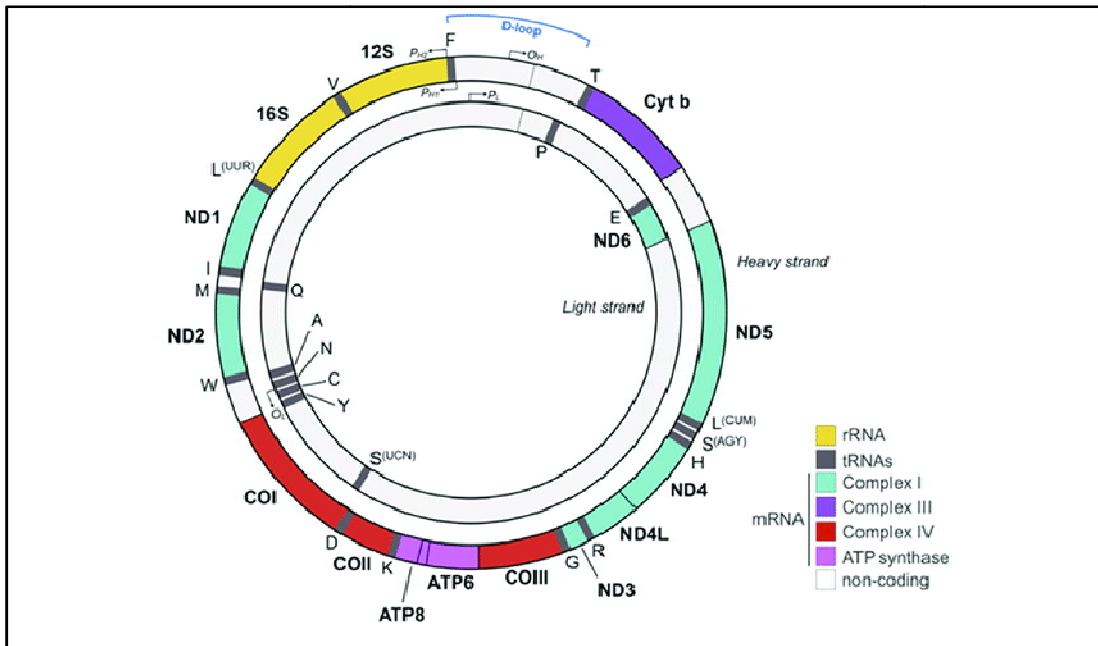


Figura 3. Estructura del DNA mitocondrial. Extraído de: (Hoffmann & Spengler, 2018)

2.3. Importe de proteínas mitocondriales

La mitocondria necesita cerca de 1200 proteínas para su correcto funcionamiento y a pesar de disponer de un sistema genético propio, el 99% de ellas son de codificación nuclear (Rath et al., 2021). Por lo tanto, excepto los 13 polipéptidos codificados por el mtDNA, el resto de proteínas mitocondriales se sintetizan en el citoplasma y posteriormente son transportadas específicamente hacia el interior de la mitocondria. Para ello, la célula dispone de un sistema de translocasas muy complejo que constituyen diversas rutas de importación. Además del importe proteico, esta maquinaria molecular participa también en la regulación de la biogénesis, la dinámica y la función mitocondrial, tanto en condiciones fisiológicas como bajo estímulos patogénicos (Wiedemann & Pfanner, 2017).

Aunque es un campo en constante evolución los estudios actuales indican que existen 5 vías principales de importe de proteínas desde el citoplasma hacia el interior de la mitocondria (**Figura 4**) (Pfanner et al., 2019; Priesnitz et al., 2020; Wiedemann & Pfanner, 2017): Cuatro de estas vías utilizan la traslocasa de la membrana mitocondrial externa (TOM). Este complejo multiproteico, conjuntamente con otros componentes, reconoce y guía las proteínas desde la MME hacia su compartimento mitocondrial de destino. La quinta vía es la utilizada específicamente por proteínas que contienen hélices alfa transmembrana, cuyo destino final es la MME. En este caso, son importadas por el complejo MIM, también localizado en la MME (Becker et al., 2008; Popov-Celeketić et al., 2008).

A continuación, describimos los 4 mecanismos de importe de proteínas que necesitan la participación del sistema TOM.

1. La mayoría de las proteínas que se localizan en la matriz mitocondrial y muchas de las proteínas de la membrana mitocondrial interna se sintetizan en el citoplasma con una pre-secuencia en su región N- terminal, que actúa de señal de reconocimiento para dirigir las proteínas hacia el interior de la mitocondria. Estas señales corresponden a péptidos cortos, de unos 15-70 aminoácidos, que presentan un patrón alternante de residuos hidrofóbicos y de carga positiva que forman una hélice anfipática (Bolender et al., 2008; Brix et al., 1997). Tras ser reconocidas, estas proteínas se importan hacia el espacio intermembrana mediante el complejo TOM, donde son reconocidas por el complejo translocasa de la membrana mitocondrial interna (TIM23) (Chacinska et al., 2005; Kiebler et al., 1990; Mokranjac & Neupert, 2015). Concretamente, el reconocimiento del péptido señal se realiza a través de la proteína TIMM50, una subunidad del complejo TIM23 que ha sido estudiada en esta tesis. En el caso de las proteínas hidrofílicas, el complejo motor asociado a la translocasa de presecuencia (PAM) dirige los polipéptidos importados hacia la matriz mitocondrial. Una vez allí, el complejo peptidasa de procesamiento mitocondrial (MPP) elimina las pre-secuencias dando lugar a la conformación madura de las proteínas importadas (Hawlitshchek et al., 1988; Horst et al., 1997; Kang et al., 1990). Por otro lado, aquellas proteínas hidrofóbicas que deben incorporarse a la MMI se liberan del complejo TIM23 y se insertan en la MMI mediante la acción de Mgr2 (Ieva et al., 2014). En otros casos, una vez llegadas a la matriz mitocondrial, las proteínas son incorporadas en la MMI mediante la insertasa OXA1 (Hildenbeutel et al., 2012).

2. Las proteínas hidrofóbicas destinadas a la MMI también se importan a través de la MME mediante el complejo TOM. Una vez se encuentran en el espacio intermembrana, en lugar de circular a través del complejo TIM23, estas proteínas son estabilizadas por un sistema de chaperonas (Tim9 y Tim10) que evitan la formación de agregados proteicos y las guían hacia la translocasa de la membrana mitocondrial interna 22 (TIM22), permitiendo su inserción final en la MMI (Curran et al., 2002; Sirrenberg et al., 1996). Este sistema es el utilizado para el importe de proteínas con funciones asociadas al transporte específico de metabolitos a través de la membrana interna de la mitocondria.

3. La tercera vía de importe es la que permite la incorporación de proteínas con estructuras β -barril a la MME. Estas proteínas constituyen los canales de transporte de moléculas de la MME como por ejemplo, las porinas. Igual que en los casos anteriores, su péptido señal es reconocido por el complejo TOM. En este caso, las proteínas se insertan y ensamblan en la

MME con la ayuda de pequeñas chaperonas situadas en el espacio intermembrana y de la maquinaria de clasificación y ensamblaje (SAM) (Klein et al., 2012; Wiedemann et al., 2003).

4. Muchas de las proteínas localizadas en el espacio intermembrana contienen unos motivos característicos que consisten en regiones ricas en cisteínas. Estas proteínas son importadas mediante el complejo TOM con la participación de un particular sistema de importe y ensamblaje situado en el espacio intermembrana (MIA) (Chacinska et al., 2004; Naoé et al., 2004).

Finalmente, cabe destacar que estudios recientes revelan que la complejidad de las vías de importe de proteínas mitocondriales podría ser aún mayor. En este sentido, se están identificando rutas que combinan elementos de las diferentes vías descritas (Pfanner et al., 2019; Priesnitz et al., 2020; Wiedemann & Pfanner, 2017). Además, todavía no se conocen los mecanismos de importación y ensamblaje de todas las proteínas localizadas en la mitocondria, siendo probable que se descubran vías adicionales en un futuro.

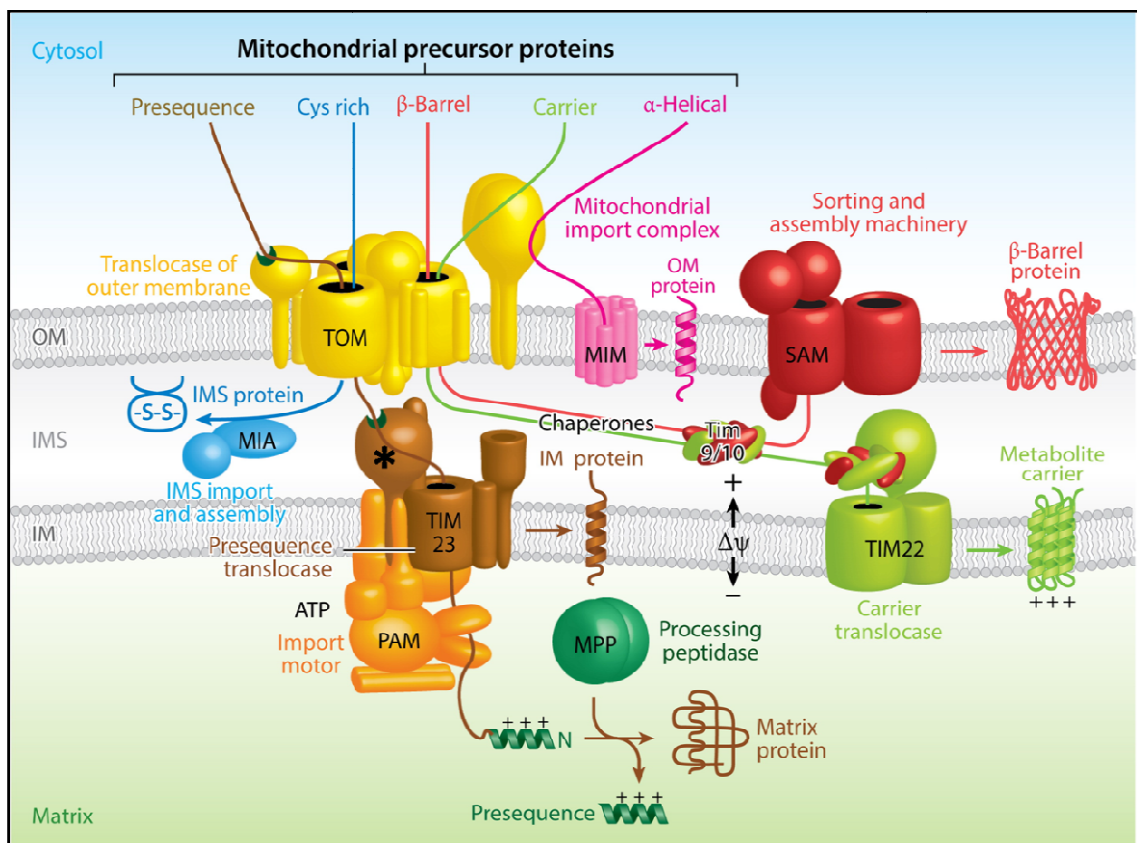


Figura 4: Esquema representativo de las 5 vías principales del importe de proteínas. La proteína TIMM50 se indica con el signo (*). Extraído de (Wiedemann & Pfanner, 2017)

2.4. Cadena respiratoria mitocondrial: complejos y supercomplejos

El principal y más conocido componente de la mitocondria es el sistema de fosforilación oxidativa o sistema OXPHOS, encargado de generar la energía celular en forma de ATP. El sistema OXPHOS se encuentra anclado a la MMI, concretamente en las crestas mitocondriales. Está formado por 5 complejos multienzimáticos (complejos I-V) y 2 moléculas transportadoras de electrones (Coenzima Q y citocromo c). El DNA mitocondrial (mtDNA) codifica para 13 de las proteínas que forman parte de la estructura de estos complejos, mientras que el resto de componentes del sistema OXPHOS están codificadas por el DNA nuclear (nDNA), por lo que se traducen en el citoplasma y son transportadas a posteriori al interior de la mitocondria (Frazier et al., 2020; Signes & Fernandez-Vizarra, 2018; Wasilewski et al., 2017). Además, los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM) requieren factores de ensamblaje para su correcta formación. Todos estos factores también están codificados por el nDNA (**Figura 5**). En el presente apartado describimos la composición y estructura de cada uno de los cinco complejos de la cadena respiratoria sin entrar en detalles sobre la función de los mismos, que se expone en el apartado 2.5.3.

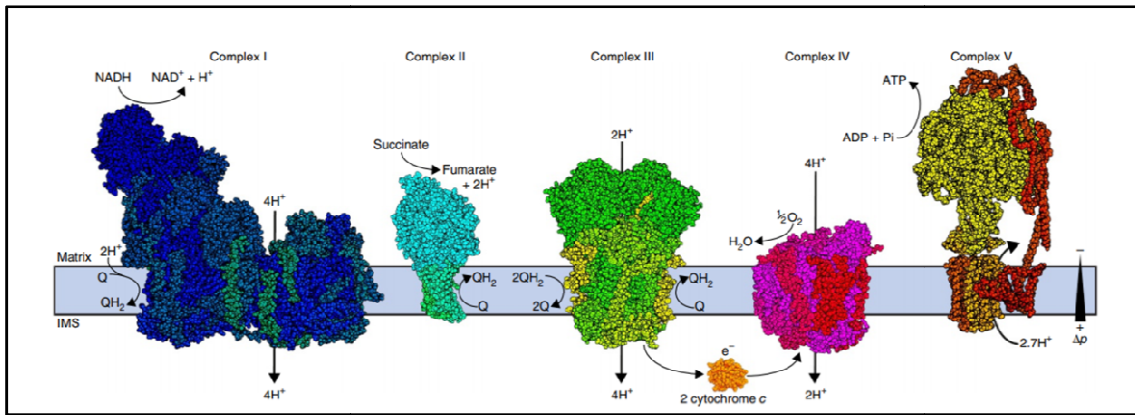
Complejo I (CI) o NADH deshidrogenasa: ubiquinona oxidoreductasa es el complejo de mayor peso molecular y está formado por un total de 45 subunidades (7 codificadas por el mtDNA y 38 por el nDNA) (Brandt, 2006; Zhu et al., 2016). Necesita al menos 15 proteínas adicionales para su correcto ensamblaje (Formosa & Ryan, 2018). El complejo I tiene forma de “L”, compuesto por un brazo hidrofílico que sobresale hacia la matriz mitocondrial y un brazo hidrofóbico anclado a la MMI (Vinothkumar et al., 2014). A su vez, se puede dividir en 3 módulos funcionales que se ensamblan de forma independiente. En el brazo de la matriz se pueden diferenciar el módulo N (con actividad NADH deshidrogenasa) y el módulo Q (que permite la reducción del coenzima Q). En el brazo anclado en la membrana se encuentra el módulo P, que cambia de conformación para permitir la translocación de protones hacia el espacio intermembrana (Guerrero-Castillo et al., 2017). Algunos autores dividen el módulo P en 4 módulos diferenciados: ND1, ND2, ND4 y ND5 (Formosa & Ryan, 2018; Signes & Fernandez-Vizarra, 2018; Zhu et al., 2016).

Complejo II (CII) o succinato: ubiquinona oxidoreductasa consta de 4 subunidades, todas ellas codificadas por el nDNA, siendo el único complejo que no tiene ninguna subunidad codificada por el mtDNA. Para su correcta formación son necesarios 4 factores de ensamblaje. Este complejo también forma parte del ciclo de Krebs, ya que permite la conversión de succinato a fumarato y a diferencia de los complejos I, III y IV no tiene actividad de bombeo de protones hacia el espacio intermembrana (Signes & Fernandez-Vizarra, 2018; Sun et al., 2005).

Complejo III (CIII) o ubiquinol: citocromocoxido reductasa está formado por 11 proteínas (1 de codificación mitocondrial y 10 de codificación nuclear) que se ensamblan con la ayuda de al menos 5 factores de ensamblaje (Feichtinger et al., 2017). Estas 11 subunidades constituyen un módulo que forma un dímero simétrico (CIII₂), que es la forma activa del enzima. Sólo tres de las 11 subunidades tienen capacidad de transportar electrones: el citocromo b (MT-CYB), que contiene dos grupos hemo tipo β y dos zonas de unión a CoQ; el citocromo c1 (CYC1) que se une a un grupo hemo tipo c y la proteína UQCRC1 que contiene un clúster de hierro azufre (Fernandez-Vizarra & Zeviani, 2018; Fernández-Vizarra & Zeviani, 2015).

Complejo IV (CIV) o citocromo c oxidasa (COX) está formado por (Kadenbach, 2017; Signes & Fernandez-Vizarra, 2018; Yoshikawa et al., 1998), 11 proteínas de codificación nuclear y 3 de codificación mitocondrial, ensambladas con la participación de más de 30 factores de ensamblaje (Signes & Fernandez-Vizarra, 2018; Timón-Gómez et al., 2018; Vidoni et al., 2017). Las 3 proteínas con actividad catalítica del enzima están codificadas por el mtDNA: COX1 (*MT-CO1*) y COX2 (*MT-CO2*) y COX3 (*MT-CO3*). Las dos primeras contienen grupos hemo y cofactores de cobre y a diferencia de COX3, tienen una función directa en el transporte de electrones (Ogunjimi et al., 2000; Tsukihara et al., 1996). El resto de subunidades del CIV se sospecha que son importantes para la estabilización del complejo y la regulación de su actividad (Signes & Fernandez-Vizarra, 2018). Cabe destacar que es el único complejo de la CRM que posee isoformas específicas de tejido, las cuales son reguladas durante las diferentes fases del desarrollo o en respuesta a condiciones fisiológicas concretas como la hipoxia (Sinkler et al., 2017).

Complejo V (CV) o ATP sintasa está formado por 18 subunidades (incluyendo la proteína reguladora IF1), 2 de ellas codificados por el mtDNA (Pedersen & Amzel, 1993). Consta de dos módulos: El dominio globular F₁, que contiene la región catalítica y el dominio F₀, que se encuentra anclado a la membrana y contiene un motor rotatorio. Ambos dominios quedan unidos mediante un tallo central y otro periférico (Walker, 2013). La conformación final de la enzima es en forma de dímero (CV₂) y se localiza en los ejes de las crestas mitocondriales. Este complejo no posee actividad de bombeo de protones hacia el espacio intermembrana. Hasta el momento solo se conocen 3 proteínas implicadas en el ensamblaje de la ATP sintasa (Čížková et al., 2008; Pícková et al., 2003; Sánchez-Caballero et al., 2020).



	SUBUNIDADES TOTALES	SUBUNIDADES mtDNA	SUBUNIDADES DNA nuclear	FACTORES DE ENSAMBLAJE
COMPLEJO I	45	7	37	15
COMPLEJO II	4	0	4	4
COMPLEJO III	11	1	10	~5
COMPLEJO IV	13-14*	3	11	>30
COMPLEJO V	18	2	16	~3

Figura 5. Esquema representativo de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial. Extraído de (Letts & Sazanov, 2017). Se incluye también una tabla resumen indicando el número de subunidades y factores de ensamblaje de cada complejo de la cadena respiratoria mitocondrial. * Existe confusión respecto a si NDUFA4 se trata de la subunidad número 14 del complejo IV, o si por el contrario se trata de un factor de ensamblaje de los supercomplejos de la cadena respiratoria mitocondrial (Kadenbach, 2017).

Los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial no se encuentran aislados en la MMI sino que se organizan en estructuras superiores denominados supercomplejos (**Figura 6**) (Letts & Sazanov, 2017). Estudios del sistema OXPHOS en condiciones nativas revelaron hace años la existencia de este grado superior de organización (Enríquez, 2016; Schägger & Pfeiffer, 2000). Trabajos más recientes realizados mediante microscopía electrónica, han aportado conocimientos estructurales y han definido la arquitectura de los supercomplejos (Fiedorczuk et al., 2016; Gu et al., 2016). Las interacciones entre los complejos OXPHOS para formar los supercomplejos no se realizan de manera aleatoria, sino que se producen de una forma estequiométricamente definida. Así, la mayoría del complejo I se encuentra unido a dímeros del complejo III y al complejo IV ($SCI/III_2/IV_n$), también denominado respirosoma (Gu et al., 2016). En una proporción menor, el CI se encuentra unido al $CIII_2$ (SCI/III_2) (Schägger & Pfeiffer,

2001). Por otro lado, el CIII₂ puede asociarse únicamente con el CIV formando el SCIII₂/IV (Schägger & Pfeiffer, 2000).

Aunque la existencia de estos supercomplejos está muy bien establecida, su función específica y los mecanismos de ensamblaje no se conocen en detalle. Existen dos visiones sobre el proceso de formación de estos supercomplejos. Algunos autores sugieren que los complejos de la cadena respiratoria se ensamblarían completamente de forma individual antes de organizarse en estructuras superiores. Esta teoría, también denominada “modelo plástico”, permitiría una asociación-disociación dinámica de los complejos que favorecería la adaptación a las demandas energéticas celulares (Acín-Pérez et al., 2008; Guerrero-Castillo et al., 2017). Por el contrario, hay evidencias que apuntan a un modelo de co-ensamblaje en el que por ejemplo, el CI necesitaría de la unión al CIII y al CIV para su completa maduración (Moreno-Lastres et al., 2012). Ciertamente, estudios en cultivos celulares y tejidos de pacientes con mutaciones en diferentes subunidades estructurales o factores de ensamblaje del sistema OXPPOS, han mostrado complejos parcialmente ensamblados asociados entre ellos (Fernández-Vizarra et al., 2009).

La gran cantidad de supercomplejos OXPPOS en la MMI sugiere que este grado de organización debe jugar algún papel relevante para la fisiología mitocondrial. Aunque la funcionalidad de estos supercomplejos todavía es incierta, diversos estudios apuntan a que estas estructuras favorecerían la estabilidad de los complejos individuales, especialmente la del complejo I (Acín-Pérez et al., 2004; Diaz et al., 2012; Diaz et al., 2006; Moreno-Lastres et al., 2012); mejorarían el transporte de electrones y por tanto proporcionarían una mayor eficiencia en la producción de energía (Greggio et al., 2017); prevendrían la agregación aberrante de proteínas en la MMI (Pérez-Pérez et al., 2016) y disminuirían los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Maranzana et al., 2013). Sin embargo, todavía existe controversia en algunos de estos aspectos y otros autores cuestionan que la formación de los supercomplejos proporcione una ventaja catalítica a la CRM, ya que la distancia entre los diferentes centros catalíticos es lo suficientemente grande como para permitir la libre difusión de los portadores de electrones móviles (Hirst, 2018).

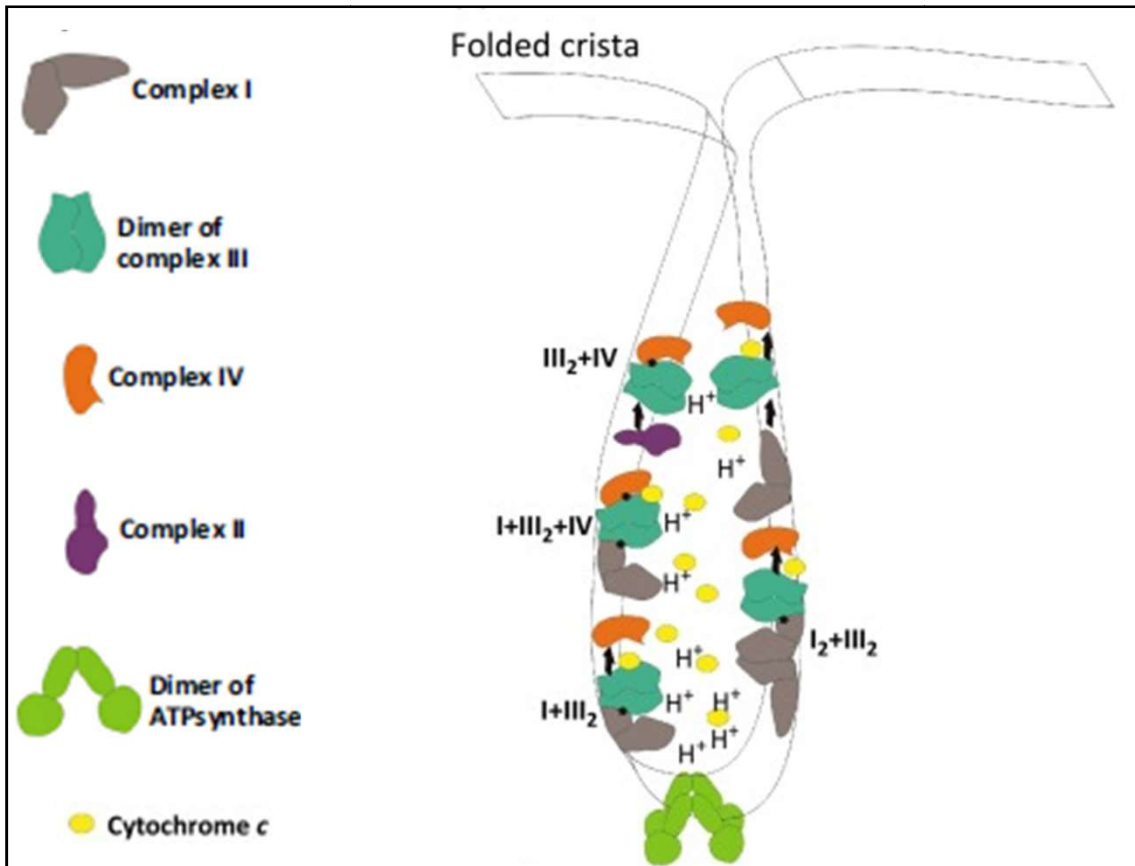


Figura 6. Esquema representativo de la disposición de los supercomplejos en las crestas mitocondriales. Extraído de (Cogliati et al., 2016)

2.5. Metabolismo energético mitocondrial

2.5.1 Oxidación de sustratos energéticos

Los organismos aeróbicos obtienen energía a partir del metabolismo oxidativo de glúcidos, lípidos y proteínas (**Figura 7**). En primer lugar, mediante diferentes vías catabólicas, estas macromoléculas se convierten en moléculas más simples hasta generar finalmente acetil-CoA. La oxidación de la glucosa tiene lugar en el citosol y produce dos moléculas de piruvato, que es importado específicamente a la matriz mitocondrial y convertido en acetil-CoA mediante la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH). Los ácidos grasos son activados y transportados al interior de la mitocondria mediante la participación de un sistema molecular complejo que utiliza carnitina, una molécula que facilita el transporte de los ácidos grasos a través de la membrana mitocondrial. Los ácidos grasos son modificados y degradados a acetil-CoA mediante 4 reacciones cíclicas en el proceso denominado beta-oxidación. Por otro lado, los amino ácidos se catabolizan en dos etapas: la transaminación y la desaminación oxidativa, dando lugar a una molécula de glucosa o de acetil-CoA en función de si se trata de un

aminoácido glucogénico o cetogénico (Alberts et al., 2016; Cooper, 2000). Una parte del acetil-CoA se destina a la formación de cuerpos cetónicos, un proceso que tiene lugar en las mitocondrias hepáticas para ser exportados y utilizados, en caso de necesidad energética, por el sistema nervioso central.

2.5.2. Ciclo de Krebs

La mayoría del acetil-CoA generado entra en el ciclo de Krebs, una de las vías centrales del metabolismo energético mitocondrial. El ciclo de Krebs consta de una sucesión de ocho reacciones químicas que generan dos moléculas de CO₂, tres de NADH, una de FADH₂ y una GTP o ATP (**Figura 7**) (Alberts et al., 2016; Krebs, 1954).

1. En primer lugar, el acetil-CoA transfiere el grupo acetil al oxalacetato mediante la enzima citrato sintasa, dando lugar a una molécula de citrato.
2. El citrato se convierte en cis-aconitato por acción de la aconitasa, el mismo enzima que en un segundo paso formará isocitrato.
3. El isocitrato se oxida mediante la isocitrato deshidrogenasa, liberando una molécula de CO₂ y dando lugar a alfa-cetoglutarato. Durante este paso se forma una molécula de NADH.
4. La enzima alfa-cetoglutarato deshidrogenasa oxida la molécula de alfa-cetoglutarato liberando una molécula adicional de CO₂. De esta forma se genera succinil-CoA y una segunda molécula de NADH.
5. En el quinto paso, el succinil-CoA es hidrolizado por la succinil-CoA sintetasa, perdiendo su enlace con la coenzima-A y dando lugar a una molécula de succinato. Durante este proceso se genera una molécula de GTP o ATP, en función del tipo celular.
6. Seguidamente, el succinato se oxida a fumarato mediante el enzima succinato deshidrogenasa, generando una molécula de FADH₂.
7. El fumarato se convierte en L-malato mediante la fumarasa.
8. Finalmente, el malato se oxida mediante el enzima malato deshidrogenasa regenerando así el oxalacetato de la reacción inicial. Durante este proceso se genera la tercera y última molécula de NADH del ciclo de Krebs.

2.5.3. Fosforilación oxidativa

Las moléculas de NADH y FADH₂ generadas en el ciclo de Krebs, y en menor medida en el proceso de oxidación de la glucosa y los ácidos grasos, son transferidas a la cadena respiratoria mitocondrial dónde en última instancia se producirá energía celular en forma de ATP mediante la fosforilación oxidativa (Alberts et al., 2016; Slater, 1953). En este proceso el NADH y FADH₂ son oxidados, de forma que actúan como moléculas donadoras de electrones que son

trasferidos sucesivamente a través de los complejos I-IV de la CRM. Los complejos de la CRM utilizan la energía generada durante este proceso para bombear protones de la matriz mitocondrial hacia al espacio intermembrana y generar un gradiente electroquímico que permitirá activar la síntesis de ATP (**Figura 7**). A continuación, describimos brevemente el papel de cada complejo de la cadena respiratoria mitocondrial durante este proceso.

El complejo I oxida el NADH transfiriendo sus electrones a la coenzima Q₁₀ (CoQ₁₀). Paralelamente, bombea protones a través de la MMI hacia el espacio intermembrana. El complejo II también transfiere los electrones a la CoQ₁₀, en este caso generados a partir de la oxidación del FADH₂. Sin embargo, este complejo no bombea protones hacia el espacio intermembrana. El complejo III capta los electrones del CoQ₁₀, acoplado su oxidación a reducción del citocromo c. De esta forma, al igual que el complejo I, el complejo III libera protones hacia el espacio intermembrana. El complejo IV cataliza la reacción final de la cadena de transporte de electrones, en la que los electrones son transferidos al oxígeno molecular. En esta reacción se producen moléculas de H₂O al mismo tiempo que se translocan protones hacia el espacio intermembrana. El gradiente de protones que se genera gracias a la actividad de los complejos I-IV, crea una fuerza motriz que es utilizada por el complejo V para fosforilar una molécula de ADP y convertirla en ATP, la mayor fuente de energía celular (Alberts et al., 2016; Mitchell, 1961; Vafai & Mootha, 2012).

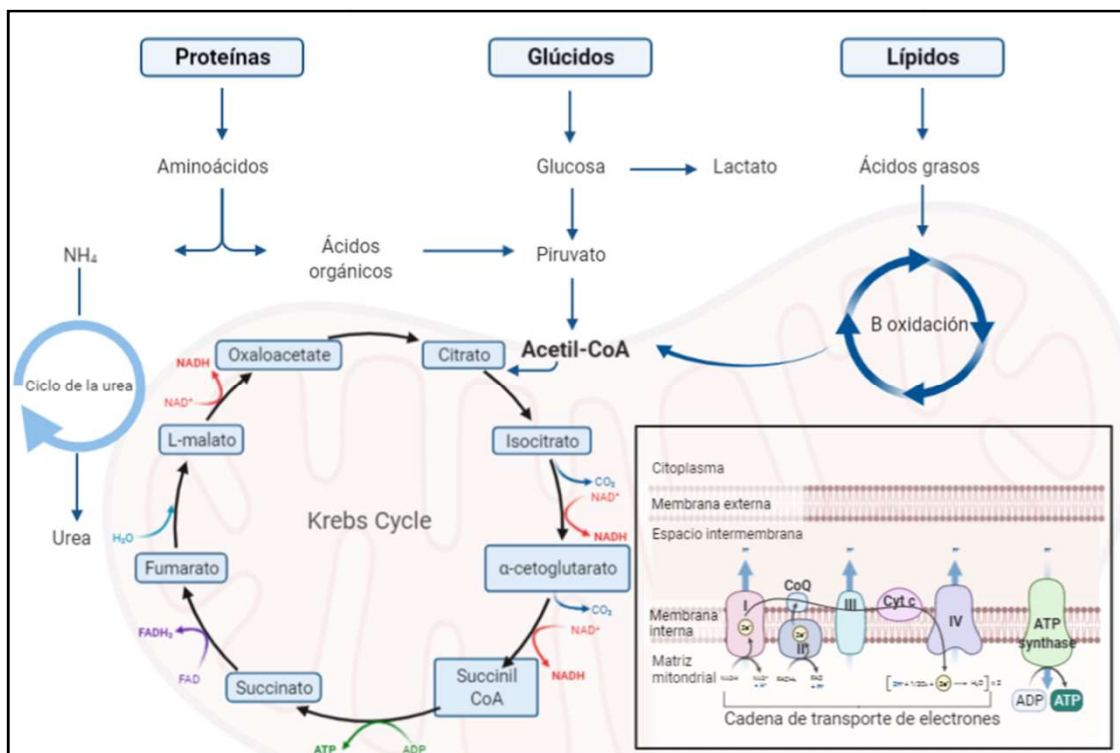


Figura 7. Esquema representativo de los principales procesos del metabolismo energético mitocondrial. Imagen creada mediante BioRender

2.6. Sistemas de control de calidad, mantenimiento y renovación mitocondrial

El mantenimiento de una red mitocondrial sana y funcional es esencial para la fisiología celular. Por ello, el organismo ha desarrollado un conjunto de sistemas de control de calidad y renovación mitocondrial que pueden actuar a nivel de proteína, orgánulo e incluso a nivel celular (Dikic, 2017; Dikic & Elazar, 2018; Pickles et al., 2018; Sedlackova & Korolchuk, 2019; Wang et al., 2021). Los mecanismos de control de calidad mitocondrial se pueden activar en respuesta a distintas necesidades energéticas, estímulos externos o como consecuencia de estrés celular, incluyendo el inducido por una condición patológica. A priori, son procesos citoprotectores que tienen como objetivo final mantener la homeostasis de la célula, permitiendo que ésta se adapte a situaciones adversas. Por ello, son mecanismos altamente regulados y en muchas ocasiones interrelacionados. Cuando estos procesos se ven sobrepasados o se encuentran alterados, pueden dar lugar a disfunciones celulares e incluso asociarse a patología (Dikic & Elazar, 2018; Olsen et al., 2015; Wang et al., 2021).

Dos de los principales mecanismos de control de calidad mitocondrial son las vías de respuesta al estrés oxidativo y la autofagia/mitofagia. Dado que estos procesos se encuentran directamente relacionados con el contenido de esta tesis, serán comentados de manera más extensa en otros apartados. Sin embargo, estas vías no son las únicas implicadas en estos mecanismos de control. Por ejemplo, existen procesos que implican la respuesta mitocondrial a proteínas mal plegadas (mtUPR), la degradación proteica vía proteosoma, e incluso la apoptosis o muerte celular programada cuando la célula no es capaz de reparar los daños (Ciechanover et al., 1980; Elmore, 2007; Finley, 2012; Fiorese et al., 2016; Hershko et al., 1980; Julien & Wells, 2017; Li et al., 1997; Quirós et al., 2017). Existen diversas señales que regulan los procesos de control de calidad. Cabe destacar la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), alteraciones en el flujo del calcio a través de la membrana mitocondrial, la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, la acumulación de metabolitos del ciclo de Krebs, la hipoxia, el desbalance del ratio AMP/ATP o NAD⁺/NADH (indicativos del estado energético de la célula), entre otros (Cantó et al., 2009; Chandel, 2014; Frezza, 2017; Palikaras & Tavernarakis, 2014; Quirós et al., 2016; Suomalainen & Battersby, 2018).

2.6.1. Mecanismos de respuesta al estrés oxidativo

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son productos químicos generados por el metabolismo aeróbico. El principal productor de ROS es la mitocondria a través de la reducción incompleta del oxígeno molecular que se produce durante la fosforilación oxidativa (Murphy, 2009). Se calcula que entre el 1-3% del O₂ que consume la célula se metaboliza generando distintos tipos

de ROS, entre los cuales están los superóxidos (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los radicales hidroxilo (OH) (Brand, 2010; Murphy, 2009). Por tanto, los niveles de ROS aumentan cuando mayor es la actividad metabólica, aunque también se producen incrementos en situaciones de estrés metabólico como la hipoxia (Bell & Chandel, 2007; Wellen & Thompson, 2011). Los ROS derivados de la actividad mitocondrial también actúan como moléculas señalizadoras y juegan un papel importante en la regulación fisiológica de la proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Diebold & Chandel, 2016; Gough & Cotter, 2011; Hamanaka & Chandel, 2010; Reczek & Chandel, 2015).

Con el fin de regular los niveles de ROS la célula ha desarrollado diversos mecanismos antioxidantes (Diebold & Chandel, 2016). La superóxido dismutasa (SOD) es uno de los enzimas centrales de la respuesta al estrés oxidativo, convirtiendo los radicales de superóxido (O_2^-) en H_2O_2 , una forma más estable y menos reactiva. Existen 3 isoformas de esta enzima en función de su localización: SOD1 cataliza la conversión de superóxido en el citoplasma, SOD2 en la mitocondria y SOD3 en el espacio extracelular (Weisinger & Fridovich, 1973). Sin embargo, la acumulación de H_2O_2 en grandes cantidades también puede ser perjudicial para la célula, ya que se podría reducir convirtiéndose en radicales OH, que son altamente reactivos. Para eliminar el exceso de H_2O_2 la célula dispone de las peroxiredoxinas, la glutatión peroxidasa y la catalasa, enzimas que reducen el H_2O_2 a H_2O (Sena & Chandel, 2012). La regulación de estas vías es muy compleja y existen mecanismos de “feedback” mediante los cuales los propios niveles de ROS regulan la expresión y actividad de estas enzimas (Bolisetty & Jaimes, 2013).

Por otro lado, el estrés oxidativo es capaz de activar otros mecanismos de control de calidad a través de diversas vías de señalización como los mediados por los factores HIF-1, p53, FOX3 o NRF2. Este último es de especial interés para la presente tesis, ya que está implicado en los mecanismos fisiopatológicos de una de las enfermedades que se describen. En situación basal, NRF2 se localiza en el citosol, pero bajo condiciones de estrés oxidativo se transloca al núcleo e induce la expresión de un gran número de genes que participan en la respuesta al estrés oxidativo. Entre estos, se incluyen los que codifican para las enzimas ya mencionadas SOD, así como la catalasa, proteínas del proteosoma etc. Asimismo, NRF2 puede activar otras vías de control de calidad como el UPR, la mitofagia o la biogénesis mitocondrial (Dikic, 2017; Itoh et al., 1997; Ivankovic et al., 2016; Kensler et al., 2007; L. Li et al., 2015; Motohashi & Yamamoto, 2004; Wild et al., 1999)

2.6.2. Autofagia y mitofagia

La autofagia es un proceso fisiológico a través del cual la célula degrada y recicla sus componentes obsoletos o dañados. El material celular para desechar, denominado cargo, es reconocido y envuelto por una doble membrana lipídica, generando una estructura denominada autofagosoma. A continuación, el autofagosoma se fusiona con un lisosoma, cuyas hidrolasas serán las responsables de la degradación del cargo. Finalmente, el producto degradado se exocita, permitiendo reciclar los componentes resultantes (**Figura 8**) (Dikic, 2017; Dikic & Elazar, 2018; Ichimiya et al., 2020; Levine & Kroemer, 2008; Youle, 2019; Youle & Narendra, 2011).

A rasgos generales existen 3 tipos de autofagia: (1) la macroautofagia, en la que se degradan componentes citoplasmáticos, por ejemplo en situación de falta de nutrientes; (2) la autofagia mediada por chaperonas (CMA), a través de la cual se degradan proteínas localizadas en el citoplasma (Kaushik & Cuervo, 2012) y (3) la microautofagia o autofagia selectiva, encargada de la degradación componentes celulares o orgánulos concretos, como es el caso de la agregofagia (degradación de agregados de proteínas); la pexofagia (degradación de peroxisomas) o la mitofagia (degradación de mitocondrias), entre otros (Dikic, 2017; Dikic & Elazar, 2018; Kaushik & Cuervo, 2012; Pickles et al., 2018; Sedlackova & Korolchuk, 2019).

Los mecanismos implicados en la activación y regulación de la autofagia son extremadamente complejos, cuentan con la participación de un número muy elevado de proteínas y están sujetos al control de diversas vías de señalización. La macroautofagia es el tipo de autofagia más común y ampliamente estudiado. Se activa en situaciones de privación de nutrientes o en respuesta a factores de crecimiento. En este proceso la célula degrada de forma no selectiva proteínas y macromoléculas citosólicas con el fin de conseguir nutrientes esenciales. Uno de los principales y más estudiado regulador de la autofagia es mTORC1 (Bar-Peled & Sabatini, 2014). En estado basal, esta proteína mantiene inactivos en el citoplasma celular diversos activadores de la autofagia. En respuesta a señales indicativas de falta de nutrientes mTORC1 es inhibido, de forma que libera los factores retenidos y permite la activación de una cascada de señalización que dará lugar al inicio de la autofagia (Hosokawa et al., 2009; Jung et al., 2009). Entre estos factores se encuentra el factor de transcripción EB (TFEB), que en estado basal se localiza en el citosol. En respuesta a señales de privación de nutrientes es liberado y se transloca al núcleo, activando la expresión de un gran número de genes relacionados con la biogénesis lisosomal, el catabolismo de los lípidos y la propia autofagia (Di Malta et al., 2017; Settembre et al., 2013). Sin embargo, aunque la vía regulada por mTORC1 y TFEB es una de las

más conocidas, este no es un mecanismo universal, ya que existen también otras vías que participan en la activación de la autofagia (Gurumurthy et al., 2010; Tripathi et al., 2013).

Una vez se ha activado el inicio de la autofagia se forma una estructura membranosa denominada fagóforo, que se elonga hasta formar un autofagosoma, una vesícula de doble membrana que contiene los componentes a degradar. Una de las proteínas más abundantes en este autofagosoma es el LC3-II. Esta proteína en estado basal se encuentra en el citoplasma y se denomina LC3-I. Cuando se activa para formar parte de estas vesículas, se conjuga con una molécula de fosfatidiletanolamina dando lugar al LC3-II (Tanida et al., 2008).

En los procesos de autofagia selectiva los receptores tienen un papel esencial. Estas proteínas identifican las estructuras celulares a degradar y las guían y unen al autofagosoma en formación. Para ello, disponen de dominios de reconocimiento a la proteína LC3-II (LIR) así como de regiones de reconocimiento del cargo (Stolz et al., 2014). En mamíferos, el sistema más habitual de reconocimiento es el dependiente de ubiquitina, de forma que las proteínas dañadas son ubiquitinizadas y reconocidas por los receptores a través de dominios de reconocimiento a ubiquitina (UBA) (Khaminets et al., 2016). Este proceso se encuentra altamente regulado y la afinidad de los receptores por el cargo puede ser modificada mediante la fosforilación de los dominios LIR y UBA (Herhaus & Dikic, 2015). Una vez formado el autofagosoma, se recluta la maquinaria molecular que permite el acercamiento entre el autofagosoma y el lisosoma para producir finalmente la fusión entre ambas vesículas, dando lugar al autolisosoma. Así, las hidrolasas que se encuentran dentro del lisosoma degradan el cargo. En última instancia, los restos degradados son exocitados para ser reutilizados por la célula (Dikic, 2017; Dikic & Elazar, 2018).

La mitofagia es el proceso de autofagia selectiva que degrada las mitocondrias dañadas (Dikic & Elazar, 2018; Pickles et al., 2018; Swerdlow & Wilkins, 2020; Youle, 2019). Es importante destacar que a excepción de ciertos procesos que ocurren durante el desarrollo, una célula nunca elimina completamente su red mitocondrial (Costello et al., 2013). Los mecanismos de degradación y biogénesis mitocondrial se encuentran en equilibrio constituyendo el denominado "turnover" o renovación mitocondrial. De esta forma, en condiciones fisiológicas la célula mantiene una masa mitocondrial mínima funcional. Sin embargo, en situaciones de estrés o como consecuencia de determinadas patologías este balance puede verse perturbado (Pickles et al., 2018).

La vía mitofágica más conocida es la dependiente de las proteínas quinasa inducida por PTEN (PINK1) y Parkina (PRKN). En una mitocondria sana, PINK1 se importa hacia el interior de la

mitocondria a través de los complejos TOM/TIM, donde es degradada por la acción de diversas proteasas. Sin embargo, en condiciones de estrés mitocondrial PINK1 se estabiliza y autofosforila, reclutando PRKN. Ésta última tiene actividad ubiquitin ligasa, de manera que ubiquitina proteínas de la MME. Este proceso tiene varias consecuencias. Por un lado provoca la degradación de ciertas proteínas vía proteosoma, como la MFN1/2, implicadas en morfología mitocondrial (Tanaka et al., 2010). Por otro lado, la ubiquitinización de otras proteínas de la MME como VDAC1, BCL-2 y DRP1, permite el reconocimiento de las mitocondrias dañadas por parte de los receptores autofágicos (Hamacher-Brady et al., 2007; Sarraf et al., 2013). Entre estos receptores se encuentran las proteínas p62, NBR1, NDP52, OPTN y TAX1BP1. Su papel y la especificidad no está totalmente clarificado pero algunos estudios han demostrado que NDP52 y OPTN están concretamente implicadas en mitofagia (Lazarou et al., 2015; Narendra et al., 2010; Okatsu et al., 2010). Por otro lado, aunque en general están menos estudiadas, es importante remarcar que además de la regulada por PINK1-PRKN también existen otras vía mitofágicas (Dikic & Elazar, 2018; Sedlackova & Korolchuk, 2019; Wang et al., 2021). En este sentido, se ha descrito que la externalización de las cardiolipinas de la MMI hacia la MME es una señal activadora de mitofagia, ya que estos fosfolípidos contienen dominios LIR que permiten su unión directa a la proteína LC3, reclutando así la maquinaria de autofagia (Chu et al., 2013).

Alteraciones en los procesos de autofagia han sido asociadas a diversas enfermedades como algunos tipos de cáncer, patología de acúmulo lisosomal y enfermedades neurológicas (Zatyka et al., 2020; Yang & Klionsky., 2020; Saha et al., 2018). En esta tesis estudiamos las bases fisiopatológicas de la enfermedad causada por la deficiencia de HACE1, una proteína con actividad ubiquitin ligasa, y demostramos su papel en la regulación de la autofagia, la mitofagia y las vías de respuesta al estrés oxidativo.

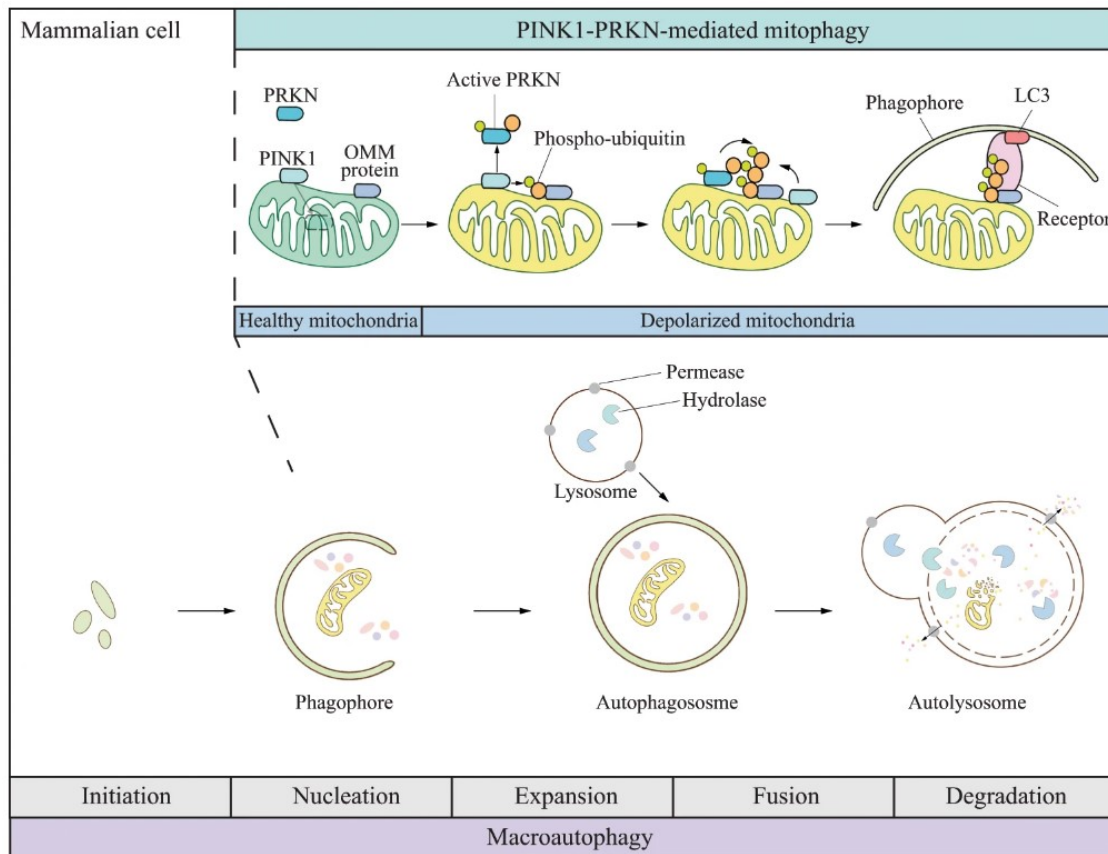


Figura 8. Esquema representativo del proceso de macroautofagia y mitofagia mediada por PINK1-PRKN. Extraído de (Yang & Klionsky, 2020).

3. ENFERMEDADES DEL METABOLISMO ENERGÉTICO MITOCONDRIAL

Las enfermedades del metabolismo energético mitocondrial son un grupo heterogéneo de patologías genéticas caracterizadas por alteraciones en la estructura o función mitocondrial. Su prevalencia estimada es de 1,6 en 5.000 individuos (Ferreira et al., 2019; Tan et al., 2020).

Tradicionalmente, las enfermedades mitocondriales se definen como aquellas que presentan un defecto en el sistema OXPHOS y en consecuencia, en la producción de energía en forma de ATP (DiMauro & Garone, 2010). Sin embargo, dado que además del sistema OXPHOS, existen otras enfermedades que directamente interfieren en la correcta producción de ATP, actualmente existe una mayor tendencia a la extensión del término hacia “enfermedades del metabolismo energético mitocondrial”.

La sospecha se establece a partir de la sintomatología clínica seguida del estudio de marcadores bioquímicos que indican la presencia de defectos en las vías metabólicas mitocondriales (Dimauro, 2011; Koenig, 2008). No obstante, la ausencia de dichos marcadores no descarta una posible disfunción de este orgánulo. Asimismo, cabe recordar, que la mitocondria está implicada en numerosas funciones además de la producción de energía y que

necesita de gran variedad de proteínas para su funcionamiento. Por ello, alteraciones en vías del metabolismo intermediario, de la síntesis de cofactores, del transporte de proteínas hacia el interior de la mitocondria o del mantenimiento y regulación de la expresión del mtDNA también pueden dar lugar a defectos mitocondriales (Frazier et al., 2019; Gorman et al., 2016; Rahman & Rahman, 2018; Russell et al., 2020).

En 1988 se descubrió por primera vez la causa genética de una enfermedad mitocondrial. Concretamente se identificaron alteraciones en el mtDNA en pacientes con neuropatía óptica hereditaria de Leber (o síndrome de LHON) y síndrome Kearns-Sayre (Holt et al., 1988; Wallace et al., 1988; Zeviani et al., 1988). Un año más tarde, en 1989 se descubrieron mutaciones en *PDHA1*, que codifica una subunidad del complejo piruvato deshidrogenasa (PDH), siendo este el primer gen de codificación nuclear asociado a una enfermedad mitocondrial (Endo et al., 1989). A partir de entonces, se comenzaron a identificar un número creciente de genes implicados en patologías mitocondriales. A día de hoy se han descrito más de 400 genes cuyas alteraciones se han asociado a este tipo de enfermedades (**Figura 9**) (Schlieben & Prokisch, 2020).

A pesar de la identificación de la causa genética de un gran número de patologías mitocondriales, la fisiopatología y las bases moleculares de la mayoría de ellas todavía no se conocen en detalle (Frazier et al., 2020; Nunnari & Suomalainen, 2012). Por eso, determinar y caracterizar estos mecanismos es de vital importancia para comprender las enfermedades mitocondriales, mejorar las herramientas diagnósticas y poder desarrollar terapias efectivas para los pacientes que las padecen. En esta tesis doctoral aportaremos nuevos conocimientos sobre las bases fisiopatológicas de cuatro enfermedades mitocondriales, concretamente las causadas por mutaciones en *TIMM50*, *HACE1*, *NDUFA4* y *NDUFA8*.

1. OXPHOS subunits, assembly factors, and electron carriers			2. mtDNA replication and expression			3. Mitochondrial dynamics, homeostasis, and quality control			4. Metabolism of substrates			5. Metabolism of cofactors		
CI subunit	CII subunit	CIV subunit	tRNAs	tRNA synthetases	RNA processing	Morphology	Quality control	Fission	Mitochondrial carriers	Fatty acid oxidation	Redox carriers	Haem biosynthesis	Iron-sulphur cluster biosynthesis	Lipoic acid biosynthesis
MT-ND1 MT-ND2 MT-ND3 MT-ND4 MT-ND4L MT-ND5 MT-ND6 NDUFA1 NDUFA10 NDUFA12 NDUFA13 NDUFA2 NDUFA6 NDUFA8 NDUFA9 NDUFB10 NDUFB11 NDUFB3 NDUFB8 NDUFB9 NDUFS1 NDUFS2 NDUFS3 NDUFS4 NDUFS6 NDUFS7 NDUFS8 NDUFV1 NDUFV2	SDHA SDHB SDHC SDHD CII assembly factors SDHAF1 SDHAF2 CIII subunit CYC1 MT-CYB UQCRC UQCRC2 UQCRC3 UQCRC4 CIII assembly factors COA7 COX10* COX14 COX15* COX20 FASTKD2 OXA1L* PET100 PET117 SCO1* SCO2* SURF1 TACO1 Coenzyme Q10 COQ2 COQ4 COQ5 COQ6 COQ7 COQ8A COQ8B COQ9 PDSS1 PDSS2 CI assembly factors ACAD9 ECSIT FOXRED1 NDUFA11 NDUFAF1 NDUFAF2 NDUFAF3 NDUFA4 NDUFA5 NDUFA6 NDUFA7 NDUFA8 NUPBL* TIMMDC1 TMEM126A TMEM126B	COX4I1 COX4I2 COX5A COX6A1 COX6A2 COX6B1 COX7B COX8A MT-CO1 MT-CO2 MT-CO3 NDUFA4 CIV assembly factors CEP89 UQCRC2 COA3 COA5 COA6* COA7 COX10* COX14 COX15* COX20 FASTKD2 OXA1L* ATP5F1A ATP5F1D ATP5F1E MT-ATP6 MT-ATP8 CV subunit ATP5F1A ATP5F1D ATP5F1E MT-ATP6 MT-ATP8 CV assembly factors ATP5MD ATPAF2 OXA1L* TMEM70	MT-TA MT-TC MT-TD MT-TE MT-TF MT-TG MT-TH MT-TI MT-TK MT-TL1 MT-TL2 MT-TM MT-TN MT-TP MT-TQ MT-TR MT-TS1 MT-TS2 MT-TT MT-TV MT-TW MT-TY	AARS2 CARS2 DARS2 EARS2 FARS2 GARS GATB GATC HARS2 IARS2 KARS LARS2 MARS2 MTFM NARS2 PARS2 QRS1 RARS2 SARS2 TARS2 VARS2 WARS2 YARS2	ELAC2 ERAL1 GTPBP3 HSD17B10 LRPPRC MRM2 MTO1 MTPAP NSUN3 PDE12 PNPT1 PUS1 THG1L TRIT1 TRMT10C TRMT5 TRMU TRNT1 Translation regulation C12orf65 C1QBP GFM1 GFM2 Nucleotide pool maintenance DGUOK RRM2B SAMHD1 TK2 TYMP	MIEF2 MSTO1 OPA1 YME1L1 Phospholipid and import machinery AGK AIFM1 CHKB DNAJC19 GFER OPA3 PAM16 PMPCA PNPLA8 SERAC1 TAZ TIMM22 TIMM50 TIMM8A TOMM70 XPNPEP3	AFG3L2 ATAD3A CLPB CLPP CLPX HSPA9 HSPD1 HSPE1 HTRA2 LONP1 MIPEP PINK1 PITRM1 PMPCB PRKN SACS SPG7 TRAP1 Apoptosis defect APOPT1 DIABLO PTRH2	DNM1L GDAP1 MFF SLC25A46* STAT2 Fusion MFN2 NME3 Ca²⁺ homeostasis C19orf70* CYP24A1 MICU2 MICOS complex C19orf70* CHCHD10 CHCHD2 SLC25A46*	MPC1 SLC25A4 SLC25A10 SLC25A11 SLC25A12 SLC25A15 SLC25A21 SLC25A22 SLC25A24 SLC25A26 SLC25A3 Pyruvate metabolism DLAT DLD* PDHA1 PDHB PDHX PDK3 PDP1 PDP2 PDP3	ACADM ACADS ACADSB ACADVL CPT1A CPT2 CRAT ETFA ETFB ETFDH FA2H HADH HADHA HADHB PYCR1 SLC22A5 SLC25A20 Ketone bodies ACAT1 HMGL HMGS2 OXCT1	GOT2 MDH1 SLC25A1 SLC25A13 Tricarboxylic acid cycle ACO2 ALDH18A1 DLST FH IDH3A IDH3B MDH2 OGDH PPA2 SUCLA2 SUCLG1 Anaplerosis CA5A PC*	ABC6 ALAS2 COX10* COX15* CYCS* HCSS* PPOX SFXN4 SLC25A38 CoA metabolism COASY PANK2 PPCS SLC25A42 SLC33A1 NADPH metabolism HAAO KYNU NADK2 NAXD NAXE NMNAT1 NNT	ABC7 BOLA3 FDX1L FDXR FXN GLRX5 IBA57 ISCA1 ISCA2 LYRM4 NFS1 NFU1 NUBPL* SECS1BP2 SEPSECS CCS COA6* SCO1* SCO2*	DLD* LIAS LIPT1 LIPT2 MCAT MECR Riboflavin metabolism FLAD1 SLC25A32 SLC52A1 SLC52A2 SLC52A3 Thiamine metabolism SLC19A2 SLC19A3 SLC25A19 TPK1 Biotin metabolism BTD HLCS PC*
						6. Metabolism of toxic compounds			7. Others / Unknown function					
						D2HGDH ECHS1 ETHE1 HIBCH HTT	IDH2 L2HGDH SQOR TXN2 TXNIP	ABAT ANO10 C19orf12 CISD2 CTBP1 DCC DIAPH1 EMC1 EXOS3 FBXL4 FGF12 KIF5A MPV17 PLA2G6 PNPLA4 POP1 ROBO3 SLC39A8 SPART SPATA5 STXB1 TANGO2 TMEM65 TRAK1 VPS13C WFS1						

Figura 9. Genes asociados a patología mitocondrial. Son un total de 413 genes agrupados en subcategorías según su función. Aquellos que tienen más de una función se han marcado con un asterisco. Los genes que no se incluyen en la Mitocarta 2.0 están subrayados. El patrón de herencia se indica en color. En esta tabla se han incorporado los genes asociados a patología mitocondrial nombrados en las revisiones más recientes: (Falk, 2020; Frazier et al., 2019; Rahman, 2020; Stenton & Prokisch, 2020a). Los que se han incluido por primera vez en el artículo original de esta tabla están indicados con un símbolo (⊗). Tabla obtenida de (Stenton & Prokisch, 2020a)

3.1. Bases genéticas

Las enfermedades mitocondriales presentan una amplia heterogeneidad genética. Este fenómeno se debe a que existe un gran número de genes implicados en la regulación de la función mitocondrial y a que ésta depende de la coordinación de dos genomas, el DNA nuclear (nDNA) y el DNA mitocondrial (mtDNA). La mayor parte de las proteínas mitocondriales están codificadas por el genoma nuclear, por lo que un gran número de enfermedades mitocondriales están causadas por mutaciones en genes codificados por este genoma. Son enfermedades genéticas hereditarias monogénicas y en su mayoría siguen un patrón de herencia autosómica recesiva. Sin embargo, también existen casos que presentan una herencia ligada al cromosoma X o herencia autosómica dominante (Chinnery, 2015; Koopman et al., 2012; Lightowlers et al., 2015). En cuanto a las alteraciones del mtDNA, las mutaciones puntuales tienen herencia exclusivamente materna. En el caso de los reordenamientos del mtDNA estos no suelen heredarse y en su mayoría son *de novo* (Craven et al., 2017). Además, la genética mitocondrial es compleja, ya que la célula tiene múltiples copias del mtDNA en cada mitocondria y a que están sujetas al fenómeno de la heteroplasmia. Así, las alteraciones en el mtDNA pueden ser homoplásmicas y por tanto todas las copias del mtDNA estarán mutadas, o heteroplásmicas, conviviendo copias mutadas y copias sanas conjuntamente en una misma célula (Chinnery, 2015; Gorman et al., 2016; Taylor & Turnbull, 2005; Thompson et al., 2020). Por este motivo, para que se manifieste el fenotipo clínico y bioquímico causado por alteraciones en el mtDNA, es necesaria la presencia de un número mínimo de copias de mtDNA mutadas por célula, denominado efecto umbral. Este umbral varía entre las diferentes patologías pero en cualquier caso, se considera que es necesario que al menos alrededor del 70% de las moléculas de mtDNA de una célula estén mutadas para provocar la aparición del fenotipo clínico (De Laat et al., 2012; Kemper et al., 2014; Sciacco et al., 1994). Además, durante la producción de los oocitos se produce el denominado efecto de “cuello de botella”, mediante el cual las copias de mtDNA materno se distribuyen de forma aleatoria en los óvulos. Este proceso hace que predecir el nivel de heteroplasmia que se hereda de madres a hijos sea prácticamente imposible, dificultando el asesoramiento genético (Craven et al., 2017; Taylor & Turnbull, 2005; White et al., 1999).

3.2. Características clínicas

Las enfermedades mitocondriales son clínicamente heterogéneas y pueden debutar a cualquier edad. En general, aquellas causadas por mutaciones en el mtDNA se manifiestan en la edad adulta, mostrando distintos grados de severidad en función del nivel de heteroplasmia.

Por otro lado, la mayoría de enfermedades provocadas por alteraciones en genes codificados en el nDNA debutan en la infancia e incluso en el periodo neonatal. De hecho, suelen ser más severas y tienen un peor pronóstico, presentando una tasa de mortalidad elevada (Keshavan& Rahman, 2018).

Debido a que la mitocondria es un orgánulo presente en todas las células humanas, excepto en los eritrocitos, las alteraciones que comprometan su función pueden perjudicar la fisiología de cualquier órgano o tejido, siendo frecuente la afectación multisistémica (**Figura 10**). La sintomatología es muy variada aunque suele afectar a los órganos con mayor demanda energética como por ejemplo el músculo esquelético, el cerebro o el corazón (Gorman et al., 2016; Keshavan & Rahman, 2018; Russell et al., 2020). Algunos de los síntomas más comúnmente asociados a las enfermedades mitocondriales son: hipotonía, debilidad muscular generalizada, fatiga, intolerancia al ejercicio, vómitos, retraso del desarrollo, atrofia óptica, pérdida de audición, convulsiones, encefalopatía y cardiopatía, entre otras. Además, es habitual detectar la presencia de alteraciones en la imagen por resonancia magnética nuclear (MRI) cerebral, en concreto hipomielinización y alteraciones en la sustancia blanca (Davison& Rahman, 2017; Gorman et al., 2016; Wortmann et al., 2015).

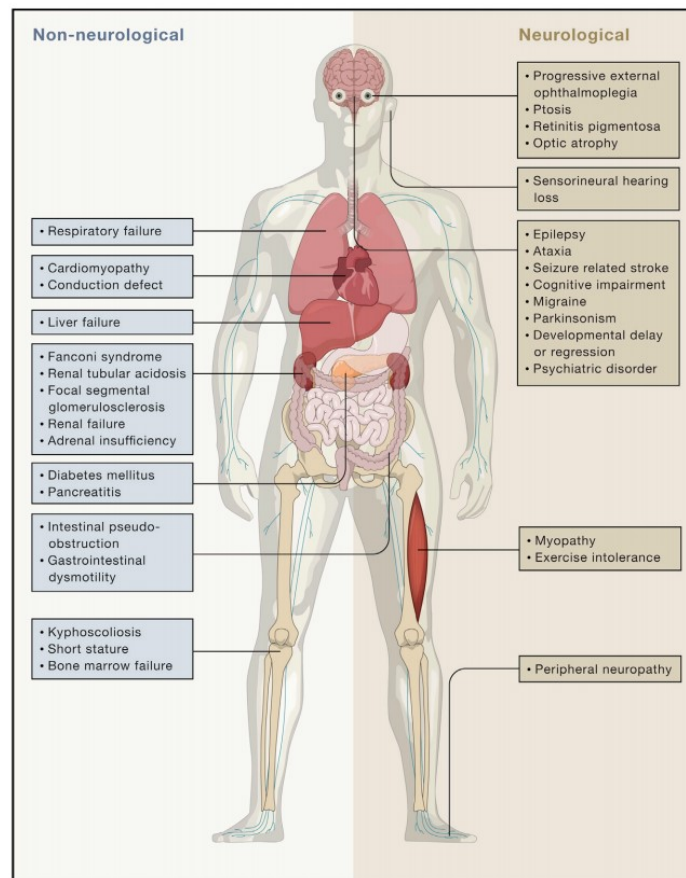


Figura 10. Imagen representativa indicando los principales síntomas, órganos y sistemas afectados en las enfermedades mitocondriales. Extraído de (Russell et al., 2020)

Es importante remarcar que en las enfermedades mitocondriales, en general, no existe una asociación estricta entre el genotipo y el fenotipo de los pacientes. Es decir, se ha observado que síntomas clínicos idénticos o similares pueden estar causados por mutaciones en distintos genes y viceversa, la misma mutación o la alteración de un mismo gen puede dar lugar a distintos fenotipos clínicos (Lake et al., 2016; S. Rahman & Copeland, 2019).

En algunos casos las enfermedades mitocondriales pueden presentarse en forma de cuadros sindrómicos con manifestaciones clínicas bien definidas. La presencia de estas características será muy útil para el diagnóstico clínico (Keshavan & Rahman, 2018; Thompson et al., 2020). Los ejemplos más conocidos son: epilepsia mioclónica con acidosis láctica y episodios “stroke like” (MELAS), oftalmoplejía externa crónica progresiva (CPEO), diabetes y sordera de herencia materna (MIDD) y la neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON).

3.3. Características bioquímicas y biomarcadores

Por definición un biomarcador es una característica que de forma objetiva se puede medir y evaluar, permitiendo conocer el estado en que se encuentra un proceso biológico. Las enfermedades mitocondriales afectan a la función de proteínas asociadas a diversas vías del metabolismo celular. Por consiguiente, éstas dan lugar a alteraciones bioquímicas cuya detección pueden ser de gran ayuda para caracterizar y dirigir el diagnóstico de pacientes con sospecha de patología mitocondrial. A continuación, se exponen algunos de los biomarcadores más informativos y frecuentemente utilizados para el estudio de estas enfermedades (Davison & Rahman, 2017; Gorman et al., 2016):

3.3.1. Metabolitos del metabolismo intermediario.

Para la detección de metabolitos, generalmente se emplean técnicas de espectrometría de masas. A través de estos estudios se cuantifican los niveles de diversos metabolitos que pueden estar anormalmente acumulados o disminuidos como consecuencia del mal funcionamiento en una proteína implicada en su síntesis o degradación. De hecho, estos productos acumulados suelen ser tóxicos para la célula y a menudo están directamente implicados en la fisiopatología de la enfermedad. Suelen estudiarse en orina, plasma o líquido cefalorraquídeo, siendo los dos primeros los más habituales por su fácil obtención (Shaham et al., 2010). A continuación se describen los metabolitos más informativos.

3.3.1.1 Lactato: El lactato se acumula como consecuencia de la activación del metabolismo anaeróbico. Este proceso se acelera cuando el metabolismo energético mitocondrial está alterado. Por lo tanto, la detección de niveles elevados de lactato en orina, plasma o líquido

cefalorraquídeo es uno de los principales marcadores de disfunción mitocondrial (Haas et al., 2007).

3.3.1.2 Ácidos orgánicos: Suelen estudiarse en orina y son productos del catabolismo de proteínas, carbohidratos y ácidos grasos. Concretamente, el incremento de intermediarios del ciclo de Krebs es un parámetro relevante característico de algunas patologías mitocondriales, ya que es la vía central en la que confluye el catabolismo de los sustratos energéticos. Se debe tener en cuenta que sus niveles pueden ser modificados por la dieta. De especial interés para esta tesis es el ácido 3-metilglutacónico (3-MGA), que se tratará más extensamente en el apartado 4 (Barshop, 2004; Wortmann, et al., 2013).

3.3.1.3 Aminoácidos: Los niveles alterados de aminoácidos son indicativos de afectaciones en distintas vías metabólicas. Cabe destacar el acúmulo de α -alanina, un parámetro asociado a defectos de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM) o de piruvato deshidrogenasa (PDH), que provocan la acumulación de piruvato y la ralentización del ciclo de Krebs-fosforilación oxidativa (Shoffner, 1999).

3.3.1.4 Acilcarnitinas: La carnitina es una amina cuaternaria que se une a los ácidos grasos y está implicada en el transporte de estos al interior de la mitocondria. Por lo tanto, el estudio de los niveles de carnitina total, carnitina libre y acil-carnitinas, permite detectar alteraciones en las vías de oxidación de ácidos grasos o beta-oxidación (Dernoncourt et al., 2019; García-Villoria et al., 2018).

3.3.1.5 Cofactores: Un gran número de las enzimas de diversas vías metabólicas necesitan cofactores para su correcta activación. Las deficiencias en su síntesis o transporte dan lugar a defectos en la función de estas proteínas y la consiguiente alteración de las vías metabólicas reguladas por las mismas. Algunos de los cofactores que se encuentran alterados en patologías mitocondriales son el ácido lipoico, la tiamina, el coenzima Q10, la riboflavina y los clusters de Fe-S (Barile et al., 2013; Buján et al., 2014; Marcé-Grau et al., 2019; Stehling et al., 2014; Tort et al., 2016; Yubero et al., 2018).

3.3.2. Actividad de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM) y de la piruvato deshidrogenasa (PDH).

Estos estudios suelen realizarse en cultivos de fibroblastos primarios derivados de piel de los pacientes, en tejido muscular obtenido a partir de una biopsia e incluso en necropsias musculares o hepáticas. Para la determinación de estas actividades enzimáticas se emplean técnicas de espectrofotometría o electroforesis en condiciones no desnaturizantes (Blue-Native)(Davison & Rahman, 2017).

Los defectos en la actividad y ensamblaje de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM) son especialmente indicativos de patología mitocondrial. Las alteraciones pueden presentarse de forma aislada (afectando específicamente a un único complejo) o de forma combinada (alterando varios complejos simultáneamente). Estas deficiencias pueden ser primarias o secundarias. Las primarias son causadas por mutaciones en genes que codifican para subunidades o factores de ensamblaje de algún complejo concreto. Por otro lado, se consideran secundarias cuando el defecto es producido por mutaciones en genes que codifican proteínas mitocondriales que no forman parte directamente del sistema OXPHOS (Frazier et al., 2020; Mayr et al., 2015). El estudio de las actividades de la CRM ha sido ampliamente utilizado para el diagnóstico de las enfermedades mitocondriales. Sin embargo, en los últimos años al disponer de otras tecnologías, estas técnicas de carácter invasivo tienen un uso limitado y se consideran como última opción.

La actividad PDH permite la transformación del piruvato en acetil-CoA y nutre el paso inicial del ciclo de Krebs. La alteración de dicha actividad indica defectos en las proteínas que componen el complejo PDH o en sus proteínas reguladoras. Asimismo, sus defectos podrían deberse a alteraciones en el metabolismo de los cofactores necesarios para su función, como el ácido lipoico y la tiamina (Brown et al., 1994; Sperl et al., 2015).

3.3.3. Oxidación de sustratos

La alteración de la tasa de oxidación de sustratos como el piruvato, palmitato, glutamato o leucina son indicativos de alteraciones en distintas vías metabólicas. Estos estudios se realizan en cultivos de fibroblastos derivados de biopsia de piel.

3.3.4. Factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) y factor de crecimiento y diferenciación 15 (GDF15)

Recientemente, se han descrito dos nuevos biomarcadores de patología mitocondrial: el factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21), especialmente informativo en mitocondriopatías musculares; y el factor de crecimiento y diferenciación 15 (GDF15). La presencia de niveles elevados de estos factores en suero de pacientes se estudia mediante ensayos de ELISA. Su sensibilidad y especificidad es mayor que el de la mayoría de biomarcadores utilizados hasta el momento. Sin embargo, se pueden encontrar elevados también en otras patologías (Suomalainen et al., 2011; Yatsuga et al., 2015).

3.3.5. Estudios histológicos y de microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Este tipo de estudios se realizan en tejido muscular de pacientes con sospecha de enfermedad mitocondrial. No obstante, en los últimos años, la mejora de las metodologías de análisis genético ha limitado la realización de estas aproximaciones debido a su carácter invasivo.

La tinción de Tricomo de Gomori en músculo permite la observación de fibras rojo-rasgadas, debido a una acumulación anómala de mitocondrias alteradas que se produce en las fibras musculares. Dichos agregados provocan que el contorno de la fibra se vuelva irregular causando esta apariencia de fibra rasgada (Davison & Rahman, 2017; Haas et al., 2007). Existen también otros parámetros informativos en tejido muscular que sugieren una posible enfermedad mitocondrial, como la presencia de fibras citocromo c oxidasa negativas, el acúmulo de lípidos o la presencia de alteraciones en la ultraestructura mitocondrial analizadas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) (Davison & Rahman, 2017; Franco-Iborra & Tanji, 2020).

3.3.6. Estudios de neuroimagen mediante resonancia magnética (MRI)

Las alteraciones del sistema nervioso central que se observan en las enfermedades mitocondriales son diversas. Una de las más típicas es el síndrome de Leigh, que se presenta como una anomalía de la señal simétrica bilateral en los ganglios basales y tronco cerebral en la neuroimagen (Bonfante et al., 2016). Por otro lado, es habitual observar alteraciones de la sustancia blanca en pacientes con alteraciones asociadas a deficiencias del sistema OXPHOS (Alston et al., 2012). Otros defectos relacionados con enfermedades mitocondriales son la atrofia cerebral y anomalías estructurales del cerebro (Brown et al., 1994). Aunque no son específicas, en ocasiones estas alteraciones ayudan a sembrar la sospecha de una patología mitocondrial (Davison & Rahman, 2017).

3.4. Diagnóstico

El diagnóstico de las enfermedades del metabolismo energético mitocondrial ha experimentado un gran cambio en muy poco tiempo. Como ya se ha mencionado anteriormente, la clínica de estas enfermedades es a menudo inespecífica y los biomarcadores, aunque ayudan a orientar el diagnóstico, no son específicos. Hasta hace poco, el diagnóstico de estas patologías se basaba en la caracterización clínica y en el estudio de metabolitos, para proceder posteriormente a los estudios enzimáticos de la CRM en biopsia de músculo y/o piel. Estas pruebas son invasivas y además, algunas veces, a pesar de observar alteraciones resultaba muy difícil extraer conclusiones definitivas (Parikh et al., 2019).

Actualmente, ante una clínica compatible, se apuesta por la realización de estudios genéticos amplios, principalmente la secuenciación del exoma (WES) y en ocasiones del genoma (WGS) (Boycott et al., 2019; Stenton & Prokisch, 2020a; Thompson et al., 2020; Wortmann et al., 2017). WES consiste en la secuenciación de todos los exones y de las zonas intrónicas flanqueantes. En la aproximación WGS se secuencia el genoma completo, aunque por el momento solo interpretamos la región del exoma que con esta metodología está mejor cubierta. Las mejoras tecnológicas y la reducción de costes han favorecido la progresiva implementación de estas metodologías, sobre todo WES, en la rutina diagnóstica, provocando un cambio de paradigma en el diagnóstico de estas patologías. Este cambio es fácil de entender si se tiene en cuenta que actualmente se conocen más de 1.200 genes nucleares implicados en la función mitocondrial y se han descrito más de 400 genes causantes de enfermedad mitocondrial (**Figura 9**); además, se prevé que este número siga creciendo en los próximos años (Rath et al., 2021; Schlieben & Prokisch, 2020).

Cuando se sospecha que la enfermedad se debe a mutaciones en el mtDNA, generalmente se procede a su secuenciación completa, ya sea mediante secuenciación Sanger en fragmentos solapados o más recientemente con metodologías NGS. Estas aproximaciones además permiten conocer el grado de heteroplasmia de forma veraz (Tang et al., 2013). Es relevante mencionar que en las últimas actualizaciones de los procesos de secuenciación WES, se incluyen metodologías que permiten el estudio simultáneo del exoma y del mtDNA (Stenton & Prokisch, 2020a; Thompson et al., 2020).

Así pues, la implementación de las herramientas de “next generation sequencing” (NGS) ha sido clave para la identificación de nuevos genes causantes de enfermedad y ha provocado un incremento sustancial del rendimiento diagnóstico de las enfermedades del metabolismo energético mitocondrial, que ha pasado de un 10-20% en la era pre-NGS hasta un 50-60%, dependiendo de las cohortes y de los criterios de selección de los pacientes. (Calvo et al., 2012; Falk, 2020; Frazier et al., 2019; Rahman & Rahman, 2018; Rahman, 2020; Stenton & Prokisch, 2020a; Wortmann et al., 2015). A pesar de estos avances, un gran número de pacientes todavía permanece sin diagnóstico genético definitivo. Este hecho se debe, en parte, a que las mutaciones en zonas intrónicas profundas, entre otras, no se pueden detectar mediante WES. A estas dificultades se añade la gran cantidad de variantes identificadas y la dificultad de interpretar el impacto funcional de las mismas.

Para ello, es necesario realizar estudios funcionales de acuerdo al tipo de variante y al gen candidato priorizado. En primer lugar, éstos incluirán análisis bioquímicos o de biología molecular en material biológico de los pacientes (fluidos biológicos, biopsias de tejido, cultivos

primarios de fibroblastos). Además, en algunos casos será necesario realizar estudios en modelos celulares y/o animales modificados con las mutaciones identificadas en los pacientes. Cabe mencionar, que en los últimos años se han empezado a desarrollar nuevas estrategias diagnósticas basadas en otras “ómicas”: Transcriptómica o RNAseq (estudio de la expresión y procesamiento del RNA mensajero), proteómica (estudio de la expresión proteica), metabolómica (análisis de metabolitos a gran escala), entre otras (Rodenburg, 2018; Stenton & Prokisch, 2020a; Wevers & Blau, 2018). Aunque es un campo incipiente, diversos estudios han demostrado que la combinación de WES/WGS y RNAseq es de gran utilidad para mejorar el diagnóstico de enfermedades mendelianas (Cummings et al., 2017; Gonorazky et al., 2019; Kremer et al., 2017; Lee et al., 2020; Lee et al., 2018; Stenton & Prokisch, 2020b).

4. ENFERMEDADES OBJETO DE ESTE ESTUDIO

En esta tesis doctoral nos hemos centrado en el estudio de las bases moleculares y la fisiopatología de dos tipos de enfermedades del metabolismo energético mitocondrial: las acidurias 3-metilglutacónicas (aciduria 3-MG) y las deficiencias del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial.

4.1. Acidurias 3- metilglutacónicas

A grandes rasgos se pueden diferenciar dos grupos de aciduria 3-MG: La aciduria 3-MG primaria, causada por mutaciones en el gen *AUH* que está implicado en el metabolismo de la leucina (**Figura 11**) (Ijlst et al., 2002) y las acidurias 3-MG secundarias. En esta tesis nos vamos a centrar en el estudio de las acidurias 3-MG secundarias (en adelante acidurias 3-MG).

Las acidurias 3-MG son un conjunto de patologías muy heterogéneas caracterizadas por el incremento de ácido 3-metil glutacónico (3-MGA) en orina, un metabolito que en la mayoría de casos es de origen desconocido. A pesar de que se han formulado diversas teorías sobre su procedencia, ninguna ha podido ser totalmente demostrada (Kelley & Kratz, 1995; Kelley et al., 1991; Ikon & Ryan, 2016; Jones et al., 2019; Su & Ryan, 2014; Vamecq et al., 2020). Aunque se puede encontrar de forma ocasional junto a otros biomarcadores más específicos, los niveles elevados de 3-MGA de forma persistente son indicativos de una alteración de la función mitocondrial (Wortmann, et al., 2013). No obstante, estos niveles no están relacionados con el curso clínico y la severidad de la patología (Cantlay et al., 1999; Christodoulou et al., 1994; Elpeleg et al., 1994; Schmidt et al., 2004; Wortmann et al., 2009).

En general los pacientes presentan afectación multiorgánica y en la mayor parte de los casos un importante deterioro neurológico progresivo (Wortmann et al., 2009; Wortmann, et al., 2013). Las acidurias 3-MG pueden estar causadas por mutaciones autosómicas recesivas o bien ligadas al cromosoma X en una gran variedad de genes (**Tabla 1**). Curiosamente, la mayoría de estos genes codifican para proteínas asociadas a la MMI (Wortmann, et al., 2013). De hecho, se han descrito alteraciones en el metabolismo de las cardiolipinas en varias de estas enfermedades, concretamente en el Síndrome de Barth, Síndrome de MEGDEL y Síndrome DCMA (Beyer & Klingenberg, 1985; Eble et al., 1990; Houtkooper & Vaz, 2008; Keenan et al., 1970; McGee et al., 1996; Yamaoka et al., 1990). Además, prácticamente en todos los casos con incremento de 3-MGA se han observado alteraciones asociadas a defectos en la producción de energía o estrés oxidativo (Vamecq et al., 2020; Wortmann, et al., 2012).

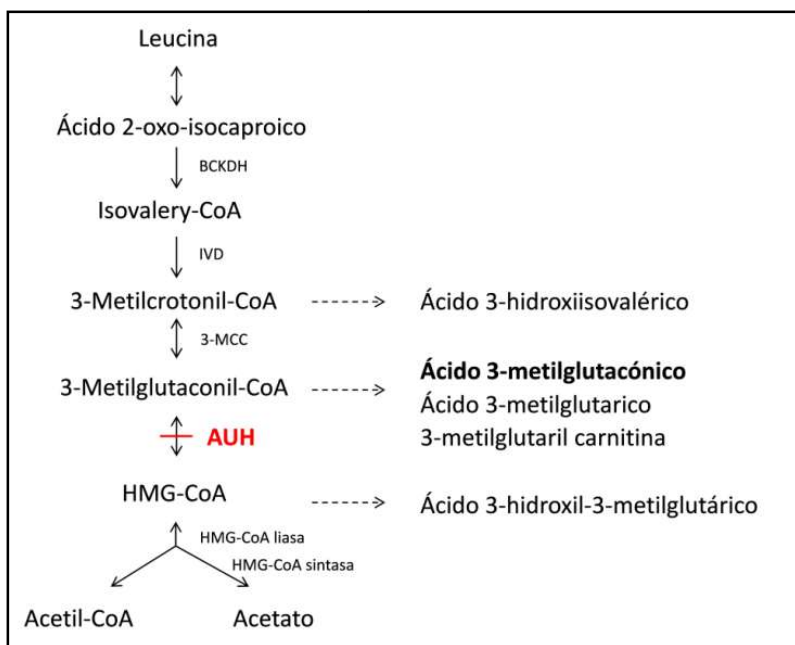


Figura 11. Esquema del catabolismo de la leucina. En rojo se indican las enzimas mutadas que están asociadas a la aciduria glutárica tipo I. Deshidrogenasa de los cetoácidos de cadena ramificada (BCKDH), isovaleril - CoA deshidrogenasa (IVD), 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa (3-MCC), 3-metilglutaconil-CoA - hidratasa (AUH), 3-hidroxi - 3 -metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) liasa (HMG-CoA liasa), HMG-CoA sintasa.

Hasta hace unos años, las acidurias 3-MG se denominaban siguiendo una nomenclatura basada en números romanos, siendo el tipo I la causa primaria, el tipo II causado por mutaciones en el gen *TAZ*, el tipo III por defectos en *OPA3*, el tipo V por mutaciones en *DNAJC19* y el tipo IV era un “cajón de sastre” en el que se iban incluyendo los nuevos hallazgos que no correspondían a ninguno de los tipos previamente descritos. Tal y como se ilustra en la **tabla 1**, aunque la base de datos OMIM ha continuado numerando las sucesivas causas de aciduria 3-MG, lo cierto es que actualmente se denominan y conocen con el nombre del gen alterado en cada caso (Wortmann, et al., 2013). Seguidamente presentamos las características clínicas y bioquímicas más relevantes de cada una de estas entidades patológicas.

4.1.1. Síndrome de Barth o deficiencia de TAZ (OMIM 302060). Esta patología se produce como consecuencia de mutaciones en el gen *TAZ* que codifica para la tafazzina, una proteína implicada en el remodelaje de las cardiolipinas (Houtkooper, et al., 2009; Schlame & Ren, 2006). Se trata de la única aciduria 3-MG descrita hasta la fecha con herencia ligada al cromosoma X. Los pacientes son varones que debutan en la infancia presentando cardiomiopatía dilatada. En muchas ocasiones suele ir acompañada de miopatía esquelética, neutropenia y retraso en el crecimiento (Aprikyan & Khuchua, 2013; Barth et al., 2004; Jefferies, 2013). Desde un punto de vista bioquímico, la deficiencia de este enzima produce un defecto en el remodelaje y maduración final de las cardiolipinas, dando lugar a una disminución exacerbada del contenido total de este fosfolípido y a un significativo aumento de monolisocardiolipinas (Chatzisprou et al., 2018; McKenzie et al., 2006). El análisis del perfil lipídico se utiliza como biomarcador específico para el diagnóstico fehaciente de esta patología (Bowron et al., 2013; Houtkooper, et al., 2009). Los pacientes con síndrome de Barth presentan alteraciones de los complejos de la cadena respiratoria y otras proteínas mitocondriales (Chatzisprou et al., 2018; McKenzie et al., 2006).

4.1.2. Síndrome de Costeff o deficiencia de OPA3 (OMIM 258501). Es una enfermedad causada por mutaciones en el gen *OPA3* (Anikster et al., 2001; Costeff et al., 1993; Ho et al., 2008). Los pacientes con síndrome de Costeff presentan los primeros síntomas en edad infantil, con una pérdida de la agudeza visual progresiva que más adelante se acompañará de otros síntomas como paraplejía espástica, disartria, nistagmus y movimientos coreoatetósicos. Aunque la función de la proteína codificada por *OPA3* no es del todo conocida, se ha postulado que podría estar implicada en la regulación de diversas funciones mitocondriales como el metabolismo energético y la apoptosis (Lenaers et al., 2012; Ranieri et al., 2013; Ryu et al., 2010). También se han descrito casos con mutaciones en este mismo gen que dan lugar a una atrofia óptica de herencia dominante, pero sin aciduria 3-MG (Lenaers et al., 2012).

4.1.3. Deficiencia de complejo V de la cadena respiratoria mitocondrial. En los últimos años se ha identificado un grupo de acidurias 3-MG que corresponden a enfermedades asociadas a defectos en el ensamblaje o actividad del complejo V o ATP sintasa. Se trata de patologías causadas por mutaciones en genes nucleares que codifican para subunidades de este complejo o factores implicados en su correcto ensamblaje. A rasgos generales los pacientes presentan encefalomiopatía y en algunos casos cardiomiopatía de inicio temprano. Bioquímicamente se caracterizan por elevación de los ácidos láctico y 3-MGA en orina y una deficiencia aislada de la actividad del complejo V de la cadena respiratoria mitocondrial (Hejzlarová et al., 2014). Hasta

el momento se conocen cuatro entidades causantes de deficiencia del complejo V con aciduria 3-MG:

4.1.3.1. Deficiencia de *ATPAF2* (OMIM 604273). Se trata de una enfermedad causada por mutaciones en el gen *ATPAF2*, que codifica para un factor de ensamblaje del complejo V de la CRM. El único paciente descrito hasta el momento presentaba rasgos dismórficos, hipertensión, hepatomegalia y riñones hipoplásicos. La resonancia magnética cerebral mostró atrofia cortical-subcortical, disgenesia del cuerpo calloso e hipoplasia de la sustancia blanca cerebral que evolucionó a una atrofia de los ganglios basales y tálamo. La paciente sufría un retraso importante del crecimiento y convulsiones, falleciendo a los pocos meses de vida. Bioquímicamente mostraba una importante acidosis láctica, niveles elevados de fumarato en orina y aciduria 3-MG (De Meirleir et al., 2004).

4.1.3.2. Deficiencia de *TMEM70* (OMIM 614052). Está causada por mutaciones en el gen *TMEM70*, que codifica para un factor de ensamblaje del complejo I y V de la cadena respiratoria mitocondrial (Sánchez-Caballero et al., 2020). La proteína *TMEM70* está implicada en la dimerización de la ATP sintasa y su deficiencia da lugar a importantes alteraciones de la morfología y de las crestas mitocondriales (Cameron et al., 2011). Actualmente, existen cerca de 80 pacientes reportados en las bases de datos bibliográficas, siendo la deficiencia de complejo V asociada a aciduria 3-MG más frecuente. Los pacientes presentan retraso psicomotor, hipotonía, alteraciones del crecimiento y cardiomiopatía hipertrófica. Sufren importantes crisis metabólicas, en muchas ocasiones desde el periodo neonatal, que se caracterizan por acidosis láctica acompañada de hiperalaninemia, hiperuricemia, hiperamonemia y aciduria 3-MG (Čížková et al., 2008; Honzík et al., 2010; Magner et al., 2015; Spiegel et al., 2011; Tort et al., 2011)

4.1.3.3. Deficiencia de *ATP5F1E* (OMIM 614053). Es una enfermedad que se produce como consecuencia de mutaciones en el gen *ATP5F1E*, que codifica una subunidad del módulo catalítico del complejo V. Hasta el momento sólo se ha descrito un paciente con esta patología, que presentó crisis metabólicas en el periodo neonatal, acidosis láctica y aciduria 3-MG. Posteriormente, el paciente presentó otros síntomas como neuropatía periférica con ataxia moderada, nistagmus horizontal, debilidad muscular con intolerancia al ejercicio y cardiomiopatía (Mayr et al., 2010).

4.1.3.4. Deficiencia de *ATP5F1D* (OMIM 618120). Está causada por mutaciones en el gen *ATP5F1D*, que codifica para una subunidad del módulo F1 de la ATP sintasa. Solamente se han descrito dos pacientes hasta la fecha (Oláhová et al., 2018). Ambos individuos presentaron

episodios de letargia, acidosis metabólica, aciduria 3-MG e hiperamonemia. El primer sujeto sufrió descompensaciones metabólicas recurrentes desde el periodo neonatal, mientras que el segundo debutó durante la infancia con encefalopatía aguda.

Cabe mencionar que se han descrito pacientes con alteraciones en *ATP5F1A* (OMIM 615228), que también codifica para una subunidad del complejo V, en los que no se ha descrito su asociación con 3-MGA (Jonckheere et al., 2013).

4.1.4. Deficiencia de MIC13 (OMIM 618329). Mutaciones en el gen *MIC13* (también denominado *Q1L*) se han asociado a aciduria 3-MG. Este gen codifica para una proteína del complejo MICOS, esencial para la estabilización y formación de las crestas mitocondriales (Guarani et al., 2015). Bioquímicamente, los pacientes con mutaciones en *MIC13* se caracterizan por presentar hipoglucemia, hiperlactacidemia y aciduria 3-MG. Además, dada la importancia de las crestas mitocondriales para el correcto funcionamiento del sistema OXPHOS, estos pacientes suelen presentar deficiencias múltiples de los complejos de la CRM y alteraciones de la morfología mitocondrial. La sintomatología clínica de los pacientes con deficiencia de MICOS se caracteriza por una encefalopatía fatal de debut temprano acompañada de alteraciones hepáticas. Además, suelen presentar atrofia cerebral, hipotonía, atrofia óptica, sordera neurosensorial, convulsiones y en algunos casos cardiomiopatía (Gödiker et al., 2018; Guarani et al., 2016; Zeharia et al., 2016).

4.1.5. Síndrome DCMA o deficiencia de DNAJC19 (OMIM 610198). Se trata de una aciduria 3-MG causada por mutaciones en el gen *DNAJC19*. Este gen codifica para una co-chaperona que forma parte de un complejo multiproteico con otras proteínas mitocondriales como las prohibitinas, indispensables para la correcta síntesis de cardiolipinas (Richter-Dennerlein et al., 2014). Por homología con proteínas de otros organismos también se ha postulado que *DNAJC19* podría estar implicado en el sistema de importación de proteínas hacia el interior de la mitocondria (D'Silva et al., 2003). Tal y cómo indican las siglas DCMA, del inglés "Dilated cardiomyopathy with ataxia", estos pacientes se caracterizan por un debut temprano con cardiomiopatía dilatada, ataxia no progresiva y problemas en el desarrollo. Además, pueden presentar alteraciones genitales, oculares o hepáticas, discapacidad intelectual leve, sordera o lesiones neuronales (Al Teneiji et al., 2016; Benson et al., 2017; Davey et al., 2006; Machiraju et al., 2019; Ojala et al., 2012; Suomalainen et al., 2011; Ucar et al., 2016). En algunos pacientes se han detectado alteraciones variables en los complejos de la CRM (Al Teneiji et al., 2016; Machiraju et al., 2019; Ojala et al., 2012; Ucar et al., 2016).

4.1.6. Síndrome de MEGDEL o deficiencia de SERAC1 (OMIM 614739). El fenotipo clínico característico de estos pacientes viene recogido en las siglas MEGDEL, del inglés “3-methylglutaconic aciduria with deafness, encephalopathy and Leigh-like syndrome”. Los pacientes presentan sordera, retinitis pigmentosa, retraso del crecimiento y alteraciones de neuroimagen compatibles con síndrome de Leigh. Otros síntomas incluyen encefalopatía, hipotonía, espasticidad y retraso en el neurodesarrollo (Finsterer et al., 2020; Philip L et al., 2012; Sarig et al., 2013; Tort et al., 2013; Wortmann et al., 2006; Wortmann et al., 2012). El síndrome de MEGDEL se produce por mutaciones en el gen *SERAC1*, que codifica una transacilasa implicada en el metabolismo del fosfatidilglicerol. La deficiencia de *SERAC1* provoca un desbalance entre algunas especies fosfatilglicerol, causando secundariamente alteraciones en los niveles de ciertas especies de cardiolipinas. A diferencia del Síndrome de Barth, los niveles totales de este fosfolípido no se ven alterados (Wortmann et al., 2012a). Bioquímicamente los pacientes *SERAC1* presentan acidosis láctica, hipoglicemia, niveles elevados de 3-MGA y alteraciones variables de la CRM.

4.1.7. Síndrome MEGCANN o deficiencia de CLPB (OMIM 616271). Mutaciones en el gen *CLPB* dan lugar a una aciduria 3-MG conocida como síndrome MEGCANN (del inglés “3-methylglutaconic aciduria with cataracts, neurologic involvement and neutropenia”). La mayoría de pacientes debutan en la infancia con encefalopatía progresiva, aunque también se ha descrito algún paciente sin afectación neurológica. Además, suelen presentar cataratas bilaterales, neutropenia congénita, alteraciones del movimiento y aciduria 3-MG (Capo-Chichi et al., 2015; Pronicka et al., 2017; Saunders et al., 2015; Wortmann, et al., 2015). La proteína codificada por *CLPB* es una peptidasa que se localiza en el espacio intermembrana (Haslberger et al., 2008; Wortmann, et al., 2015). Su función se ha podido relacionar con procesos apoptóticos, el mantenimiento de las crestas mitocondriales y la inmunidad innata mediada por la mitocondria (Chen et al., 2020; Mróz et al., 2020; Yoshinaka et al., 2019). Recientemente, se ha demostrado que la proteína *CLPB* interacciona con las prohibitinas (Yoshinaka et al., 2019).

4.1.8. Deficiencia de HTRA2 (OMIM 617248). Esta aciduria 3-MG está causada por mutaciones en el gen *HTRA2* que codifica una proteasa localizada en el espacio intermembrana implicada a la regulación de procesos apoptóticos (Kovacs-Nagy et al., 2018). Estos pacientes presentan alteraciones neurológicas de debut neonatal o en la infancia y fallecen a los pocos meses de vida. Clínicamente presentan hipotonía, movimientos anormales, insuficiencia respiratoria con episodios apneicos y convulsiones. Bioquímicamente se caracterizan por excretar niveles

elevados de 3-MGA y lactato (Kovacs-Nagy et al., 2018; Mandel et al., 2016; Oláhová et al., 2017)

4.1.9. Deficiencia de TIMM50 (OMIM 617698). Se produce como consecuencia de mutaciones en el gen *TIMM50*, que codifica una proteína de la membrana mitocondrial interna implicada en el transporte proteico hacia el interior de la matriz mitocondrial (Geissler et al., 2002; Mokranjac et al., 2003; Mokranjac et al., 2009; Tamura et al., 2009). Los pacientes se caracterizan por presentar convulsiones desde una edad temprana, retraso psicomotor, hipotonía, espasticidad y discapacidad intelectual. Los estudios bioquímicos indican alteraciones variables del sistema OXPHOS y niveles elevados de lactato y 3-MGA (Mir et al., 2020; Reyes et al., 2018; Shahrour et al., 2017). En esta tesis se reporta la tercera descripción de esta enfermedad contribuyendo a la caracterización de las bases moleculares y fisiopatológicas de la misma.

4.1.10. Otros trastornos mitocondriales con aciduria 3-MG. Además de las causas secundarias de aciduria 3-MG que se han nombrado en la sección anterior, existen otras patologías que presentan, al menos en algunas ocasiones, niveles elevados de 3-MGA. Entre ellas se encuentran el síndrome de Sengers, causado por mutaciones en el gen *AGK* (Haghighi et al., 2014; Mayr et al., 2012), la deficiencia de *CPS1* (Rokicki et al., 2017), deficiencia de *ECHS1* (Ferdinandusse et al., 2015; Fitzsimons et al., 2018), depleciones de mtDNA (Bekheirnia et al., 2012; Maas et al., 2015), síndrome de MELAS (Ciafaloni et al., 1992; Kirby et al., 2004; Liolitsa et al., 2003; Manwaring et al., 2007) y síndrome de Smith-Lemli-Opitz (SLO) (Kelley & Kratz, 1995; Rouillet et al., 2012). Incluso se han detectado excreciones aumentadas de 3-MGA en mujeres embarazadas o como consecuencia del tratamiento con estatinas.

4.2. Deficiencias del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial

Las alteraciones genéticas que afectan directamente a la cadena respiratoria mitocondrial son el grupo de enfermedades mitocondriales más frecuente. Entre ellas, la deficiencia del complejo I es el defecto del sistema OXPHOS más común (Fassone & Rahman, 2012; Kirby et al., 1999; Mimaki et al., 2012; Skladal et al., 2003; Triepels et al., 2001).

Los pacientes presentan una clínica muy heterogénea, que puede variar desde una acidosis láctica fatal en periodo neonatal hasta una miopatía aislada de presentación en la edad adulta (OMIM: 252010) (Bugiani et al., 2004; Kirby et al., 1999; Koene et al., 2012; Robinson et al., 1987; Skladal et al., 2003; Triepels et al., 2001). Como ocurre con otras enfermedades del metabolismo energético mitocondrial, los pacientes con deficiencia de complejo I suelen tener una afectación multisistémica y aunque la edad de presentación puede variar, la mayor parte

de los individuos debutan durante el primer año de vida (Fassone & Rahman, 2012; Koene et al., 2012). En general el pronóstico es pobre, ya que más de la mitad de los pacientes fallecen antes de los 2 años y el 75% antes de los 10 años. Sólo unos pocos recuperan ciertas habilidades y llegan a la edad adulta (Fassone & Rahman, 2012; Koene et al., 2012).

El fenotipo más comúnmente identificado en estos pacientes es el Síndrome de Leigh, que se caracteriza por alteraciones bilaterales simétricas que afectan principalmente al tronco encefálico y a los ganglios basales (Bugiani et al., 2004; Danhelovska et al., 2020; Fassone & Rahman, 2012; Koene et al., 2012). Dichas lesiones suelen ir acompañadas de otros síntomas, como alteraciones respiratorias, nistagmus, ataxia, distonía e hipotonía (Lake et al., 2015; Lebre et al., 2011). Otras características clínicas frecuentemente asociados a deficiencia de complejo I son leucoencefalopatía, cardiomiopatía, vómitos, epilepsia e intolerancia al ejercicio (Bénil et al., 2001; Bugiani et al., 2004; Fassone & Rahman, 2012; Hoefs et al., 2010; Koene et al., 2012; Loeffen et al., 2001; Nouws et al., 2010). En algunos casos también se ha asociado la deficiencia de este complejo a cuadros sindrómicos como MELAS o LHON ((Danhelovska et al., 2020; Howell et al., 1991; Kirby et al., 2004; Liolitsa et al., 2003; Wallace et al., 1988).

La característica bioquímica principal de estos pacientes es la presencia de niveles elevados de ácido láctico (en plasma, orina y CFS) y la disminución de la actividad del complejo I (Fassone & Rahman, 2012; Koene et al., 2012; Loeffen et al., 2000). El material idóneo para el análisis de la actividad del complejo I es el músculo, siendo menos resolutivo el análisis en fibroblastos (Danhelovska et al., 2020; Fassone & Rahman, 2012; Frazier et al., 2020). Existen otras aproximaciones complementarias como la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas (Blue-Native PAGE), que permite analizar el ensamblaje de los complejos y supercomplejos del sistema OXPHOS (Frazier et al., 2020; Lazarou et al., 2007) o la respirometría de alta resolución, a través de la cual se puede determinar la respiración mitocondrial en fibroblastos o músculo fresco del paciente (Invernizzi et al., 2012; McKenzie et al., 2007; Morán et al., 2010). Aunque en la mayoría de casos la deficiencia de complejo I se expresa de forma aislada, esta puede ir acompañada de alteraciones en otros complejos del sistema OXPHOS (Budde et al., 2000; Rötig et al., 2004; Van Den Heuvel et al., 1998). Además, la deficiencia del complejo I también puede estar causada secundariamente por otras alteraciones en la función mitocondrial (Fassone & Rahman, 2012; Rodenburg, 2016).

Desde un punto de vista genético, las deficiencias de complejo I se deben a mutaciones en los genes que codifican para las subunidades estructurales que lo conforman o para los factores de ensamblaje necesarios para su correcta formación. Hasta el momento se han descrito

mutaciones causantes de patología en 45 genes, codificados tanto por el DNA nuclear (nDNA) como por el DNA mitocondrial (mtDNA) (Schlieben & Prokisch, 2020). De hecho, las 7 subunidades catalíticas del complejo I codificadas por el mtDNA han sido asociadas a patología y se estima que corresponde aproximadamente a un 30% de los casos (Bugiani et al., 2004; Lebon et al., 2003; Ma et al., 2018; Swalwell et al., 2011). En el resto de los pacientes la deficiencia de complejo I se debe a mutaciones recesivas en genes nucleares (Fiedorczuk & Sazanov, 2018; Mimaki et al., 2012; Rodenburg, 2016). En general no se ha podido establecer una correlación genotipo-fenotipo en este grupo de enfermedades (Koene et al., 2012; Rodenburg, 2016; Tucker et al., 2011). Si bien, es cierto que la acidosis láctica fatal y los fenotipos clínicos más severos de debut en el periodo neonatal o en la infancia suelen asociarse a mutaciones en genes nucleares (Fassone & Rahman, 2012; Kirby et al., 2004; Spiegel et al., 2009).

	ENFERMEDAD	Nº OMIM	Clasificación clásica	Gen	Localización cromosómica	Proteína alterada	Función de la proteína afectada
PRIMARIA	Deficiencia de 3-metilglutaconil-CoA hidratasa	250950	Tipo I	<i>AUH</i>	9q22.31	3-metilglutaconil-CoA hidratasa	Oxidación de leucina.
	Síndrome Barth o deficiencia de TAZ	302060	Tipo II	<i>TAZ</i>	Xq28	Tafazzina	Remodelaje de cardiolipinas.
SECUNDARIA	Síndrome de Costeff o deficiencia de OPA3	258501	Tipo III	<i>OPA3</i>	19q13.2–13.3	Proteína de atrofia óptica 3	No se conoce en detalle. Participa en el metabolismo energético mitocondrial y apoptosis.
	Deficiencia de ATPAF2	604273	Tipo IV	<i>ATPAF2</i>	17p11.2	Factor de ensamblaje 2 del complejo F1 de la ATP sintasa	Factor de ensamblaje del complejo V.
	Deficiencia de TMEM70	614052	Tipo IV	<i>TMEM70</i>	8q21.11	Proteína de transmembrana 70	Factor de ensamblaje del complejo I y V.
	Deficiencia de ATP5F1E	614053	Tipo IV	<i>ATP5F1E</i>	20q13.32	Subunidad epsilon de la ATP sintasa mitocondrial	Subunidad del complejo V.
	Deficiencia de ATP5F1D	618120	Tipo IV	<i>ATP5F1D</i>	19p13.3	Subunidad delta de la ATP sintasa mitocondrial	Subunidad del complejo V.
	Deficiencia de MIC13	618329	Tipo IV	<i>MIC13/Q1L</i>	19p13.3	Subunidad MIC13 del complejo MICOS	Formación de crestas mitocondriales y mantenimiento de la morfología mitocondrial.

Síndrome DCMA o deficiencia de DNAJC19	610198	Tipo V	<i>DNAJC19</i>	3q26.33	Subunidad TIM14 de la translocasa de membrana mitocondrial interna	Co-chaperona que forma parte de un complejo con las prohibitinas. Implicado en el metabolismo de cardiolipinas.
Síndrome de MEGDEL o deficiencia de SERAC1	614739	Tipo VI	<i>SERAC1</i>	6q25.3	Proteína SERAC1	Metabolismo del fosfatidil glicerol y tráfico de colesterol intracelular.
Síndrome de MEGCANN o deficiencia de CLPB	616271	Tipo VII	<i>CLPB</i>	11q13.4	Peptidasa B caseinolítica	Peptidasa mitocondrial implicada en procesos apoptóticos, mantenimiento de las crestas e inmunidad innata mediada por la mitocondria.
Deficiencia de HTRA2	617248	Tipo VIII	<i>HTRA2</i>	2p13.1	Serina proteasa HTRA2 mitocondrial	Proteasa mitocondrial implicada en procesos de apoptosis
Deficiencia de TIMM50	617698	Tipo IX	<i>TIMM50</i>	19q13.2	Subunidad TIM50 de la translocasa de membrana mitocondrial interna	Transporte de proteínas del citosol hacia la matriz mitocondrial.

Tabla 1: Acidurias 3-metilglutacónicas.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las enfermedades del metabolismo energético mitocondrial son un grupo muy heterogéneo de patologías que presentan una gran variabilidad clínica, bioquímica y genética, por lo que su diagnóstico es complejo. Por este motivo, en los últimos años nuestro grupo ha desarrollado e implementado una estrategia basada en una minuciosa caracterización del fenotipo clínico y bioquímico de los pacientes, que nos ha permitido dirigir el diagnóstico hacia genes implicados en funciones celulares y vías metabólicas concretas.

Las acidurias 3-metilglutacónicas y las deficiencias del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial son dos grupos de enfermedades causadas por alteraciones en un gran número de genes. En base a los conocimientos previos sobre la afectación mitocondrial en estos trastornos, la **hipótesis** de esta tesis es que la implementación de herramientas de caracterización de la morfología y la función mitocondrial facilitará la priorización e identificación de las variantes genéticas causantes de la enfermedad. Además estos estudios contribuirán a aumentar el conocimiento sobre la fisiopatología y las bases moleculares de estas patologías, aportando así una información fundamental para el diseño de futuras opciones terapéuticas.

OBJETIVOS

1. Identificar pacientes con sospecha de enfermedad del metabolismo energético mitocondrial sin diagnóstico definitivo.
2. Determinar mediante aproximaciones de “next-generation sequencing” la causa genética de la enfermedad en los pacientes identificados.
3. Estudiar el impacto funcional de las variantes identificadas en fibroblastos derivados de pacientes y/o modelos celulares para confirmar su patogenicidad.
4. Caracterizar la función mitocondrial para comprender los mecanismos fisiopatológicos subyacentes de estas enfermedades.

RESULTADOS

INFORME SOBRE LA CONTRIBUCIÓN DE LA DOCTORANDA A LAS PUBLICACIONES COMPRENDIDAS EN ESTA TESIS DOCTORAL

Título de la tesis: Identificación y caracterización de nuevos defectos del metabolismo energético mitocondrial asociados a aciduria 3-metilglutacónica y a deficiencia del complejo I

Doctoranda: Olatz Ugarteburu López

Directores: Antonia Ribes Rubió y Frederic Tort Escalé

Tutor: Ramón Gomis de Barbarà

ARTÍCULO 1:

Título: Mutations in TIMM50 cause severe mitochondrial dysfunction by targeting key aspects of mitochondrial physiology

Autores: Tort F, Ugarteburu O, Texidó L, Gea-Sorlí S, García-Villoria J, Ferrer-Cortès X, Arias Á, Matalonga L, Gort L, Ferrer I, Guitart-Mampel M, Garrabou G, Vaz FM, Pristoupilova A, Rodríguez MIE, Beltran S, Cardellach F, Wanders RJ, Fillat C, García-Silva MT, Ribes A.

Revista: Hum Mutat. 2019 Oct; 40(10):1700-1712.

Factor de impacto: 4.124 (Q2: Genetics & Heredity)

Aportación de la doctoranda:

La doctoranda participó en el diseño del estudio y realizó gran parte del trabajo experimental presentado en este artículo. El estudio de microscopía electrónica de transmisión se realizó en colaboración con el grupo del Dr. Isidre Ferre, la respirometría de alta resolución se realizó en colaboración con el grupo del Dr. Cardellach y la creación del modelo celular en HEK293T deficiente para TIMM50 se llevó a cabo en el grupo de la Dra. Cristina Fillat. Además, la doctoranda elaboró el primer borrador del artículo y participó en la redacción final del manuscrito.

ARTÍCULO 2:

Título: Physiopathological Bases of the Disease Caused by *HACE1* Mutations: Alterations in Autophagy, Mitophagy and Oxidative Stress Response.

Autores: Ugarteburu O, Sánchez-Vilés M, Ramos J, Barcos-Rodríguez T, Garrabou G, García-Villoria J, Ribes A, Tort F.

Revista: J ClinMed. 2020 Mar;9(4):913.

Factor de impacto: 3.303 (Q1: Medicine, general & internal)

Aportación de la doctoranda: La doctoranda participó en el diseño del estudio y realizó la totalidad del trabajo experimental presentado en este artículo a excepción de los estudios de peroxidación lipídica realizados por el grupo del Dr. Cardellach. Además, la doctoranda elaboró el primer borrador del artículo y participó en la redacción final del manuscrito.

ARTÍCULO 3:

Título: Complex I deficiency, due to NDUFAF4 mutations, causes severe mitochondrial dysfunction and is associated to early death and dysmorphism.

Autores: Ugarteburu O, Teresa Garcia-Silva M, Aldamiz-Echevarria L, Gort L, Garcia-Villoria J, Tort F, Ribes A.

Revista: Mitochondrion. 2020 Nov; 55:78-84.

Factor de impacto: 3.992 (Q2: Genetics & Heredity)

Aportación de la doctoranda: La doctoranda participó en el diseño del estudio y realizó la totalidad del trabajo experimental presentado en este artículo. Además, la doctoranda elaboró el primer borrador del artículo y participó en la redacción final del manuscrito.

ARTÍCULO 4:

Título: Biallelic mutations in NDUFA8 cause complex I deficiency in two siblings with favorable clinical evolution.

Autores: Tort F, Barredo E, Parthasarathy R, Ugarteburu O, Ferrer-Cortès X, García-Villoria J, Gort L, González-Quintana A, Martín MA, Fernández-Vizarra E, Zeviani M, Ribes A.

Revista: Mol GenetMetab. 2020 Nov;131(3):349-357.

Factor de impacto: 4.170 (Q1: Genetics & Heredity)

Aportación de la doctoranda: La doctoranda participó en el diseño del estudio y realizó gran parte del trabajo experimental presentado en este artículo. No obstante, el estudio de complementación funcional fue realizado por el grupo del Dr. Zeviani. Además, la doctoranda elaboró el primer borrador del artículo y participó en la redacción final del manuscrito.

Barcelona, 16 de Junio del 2021

Conformidad de los directores y del tutor de la tesis:

Dra. Antonia Ribes Rubió

Dr. Frederic Tort Escalé

Dr. Ramón Gomis de Barbarà

Los resultados de esta tesis están recogidos en 4 publicaciones y en el ANEXO dónde se muestran resultados que no han sido objeto de publicación hasta la fecha. En total se han estudiado **36 pacientes** con sospecha de enfermedad mitocondrial en los que se han realizado análisis genéticos y funcionales en células de pacientes o en modelos celulares (**Figura 12**). En **14** de ellos se observaron niveles elevados de **3-MGA** en orina, un biomarcador ampliamente aceptado como indicador de alteración mitocondrial. En 3 de estos casos, tras el estudio del exoma o genoma completo, no se ha priorizado ningún gen y por tanto continúan en estudio. En los 11 restantes se han identificado variantes en los siguientes genes, que según las bases de datos serían potencialmente causantes de la enfermedad: *ECHS1* (2 pacientes no relacionados), *AR*, *DNAJC19*, *TMEM70*, *SERAC1*, *ATPAF2*, *TIMM50*, *HACE1* y *NDUFAF4* (2 hermanos). A excepción de los individuos con mutaciones en *AR* y *SERAC1* (en los que no disponíamos de células del paciente) en el resto de los casos los estudios funcionales realizados han permitido confirmar la causa genética de la patología. Además, las alteraciones en los genes *TIMM50*, *HACE1* y *NDUFAF4* han sido objeto de publicación, dando lugar a los artículos 1, 2 y 3 de la tesis.

En 17 de los **22 pacientes** restantes los estudios funcionales realizados permitieron confirmar que las variantes identificadas en los siguientes genes son la causa de la patología: *GEMIN4*, *PKLR*, *SARS2*, *FDXR*, *MTO1*, *NADK2*, *COX15*, *FLAD1*, *SUCLG1*, *COQ10A* (2 hermanos), *COX4i1*, *ND6*, *NDUFS2* (2 hermanos) y *NDUFA8* (2 hermanos). Los pacientes ND6, NDUFS2 y NDUFA8 presentaron como característica bioquímica principal una deficiencia aislada del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. El estudio de NDUFA8 ha dado lugar al artículo 4 de la tesis. Por otro lado, los estudios funcionales han podido descartar la patogenicidad en 5 casos que presentaban variantes en *ATP6*, *NAXD*, *FOXRED1*, *NDUFB11* y *COX10*, por lo que continúan en estudio para identificar otro gen que pudiera causar la enfermedad.

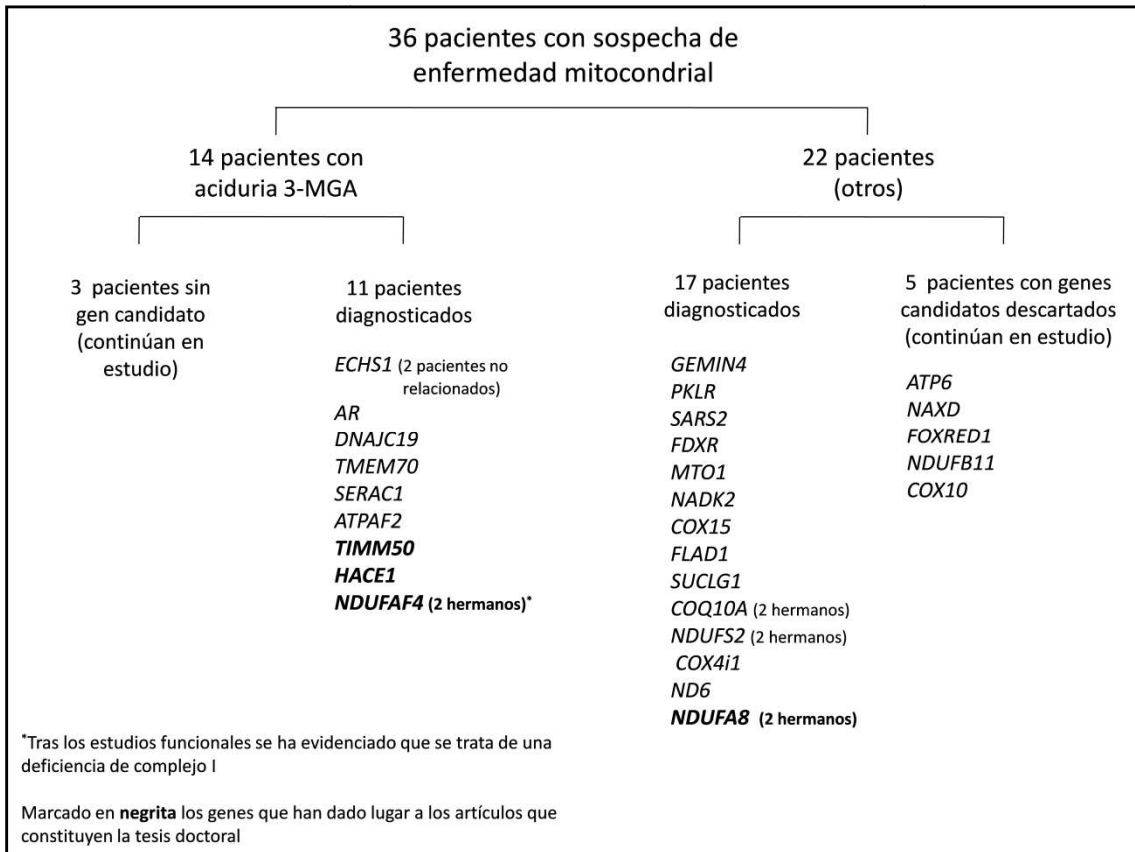


Figura 12. Esquema de los pacientes y genes estudiados en el marco de esta tesis doctoral.

ARTÍCULO 1

Título: Mutations in TIMM50 cause severe mitochondrial dysfunction by targeting key aspects of mitochondrial physiology



Autores: Tort F, Ugarteburu O, Texidó L, Gea-Sorlí S, García-Villoria J, Ferrer-Cortès X, Arias Á, Matalonga L, Gort L, Ferrer I, Guitart-Mampel M, Garrabou G, Vaz FM, Pristoupilova A, Rodríguez MIE, Beltran S, Cardellach F, Wanders RJ, Fillat C, García-Silva MT, Ribes A.

Revista: Hum Mutat. 2019 Oct; 40(10):1700-1712. **Factor de impacto:** 4.124 (Q2: Genetics & Heredity)

Las acidurias 3-metilglutacónicas (acidurias 3-MG) son un grupo heterogéneo de patologías asociado en su mayoría a defectos de la membrana mitocondrial. En este trabajo, gracias a la secuenciación del exoma, hemos identificado mutaciones en heterocigosis compuesta en el gen *TIMM50* (c. [341G>A];[805 G>A]) en un paciente con síndrome de West que evolucionó a síndrome de Leigh, atrofia óptica, neutropenia, cardiomiopatía y aciduria 3-MG persistente. Con el fin de comprender las bases moleculares de la patología, se realizó una caracterización exhaustiva de la función mitocondrial en fibroblastos del paciente. Se obtuvieron los siguientes resultados: los niveles de proteína TIMM50 mostraron una reducción importante, a pesar de que los niveles de mRNA no estaban alterados, sugiriendo que los residuos mutados podrían ser relevantes para la estabilidad de la proteína. Se detectaron defectos de la morfología y ultraestructura mitocondrial tanto en fibroblastos como en músculo. Los niveles de ensamblaje de los complejos y supercomplejos de la cadena respiratoria mitocondrial también se encontraron reducidos en fibroblastos. Además, la respirometría de alta resolución demostró una disminución en la capacidad respiratoria máxima de los fibroblastos. Finalmente, obtuvimos un modelo celular HEK293T deficiente para TIMM50 mediante CRISPR/Cas9, que mimetizó los defectos observados en la respirometría de alta resolución en material del paciente. Cuando se tranfectó un plásmido que codificaba para la proteína TIMM50 “wild-type” se pudo rescatar el fenotipo. En resumen, demostramos que la deficiencia de TIMM50 da lugar a una disfunción mitocondrial severa que afecta a aspectos claves de la fisiología mitocondrial, tales como la morfología mitocondrial, el ensamblaje del sistema OXPHOS y la capacidad respiratoria mitocondrial.

RESEARCH ARTICLE

Mutations in *TIMM50* cause severe mitochondrial dysfunction by targeting key aspects of mitochondrial physiology

Frederic Tort^{1*} | Olatz Ugarteburu^{1*} | Laura Texidó¹ | Sabrina Gea-Sorlí² |
 Judit García-Villoria¹ | Xènia Ferrer-Cortès¹ | Ángela Arias¹ | Leslie Matalonga¹ |
 Laura Gort¹ | Isidre Ferrer³ | Mariona Guitart-Mampel⁴ | Glòria Garrabou⁴ |
 Frederick M Vaz⁵ | Ana Pristoupilova^{6,7} | María Isabel Esteban Rodríguez⁸ |
 Sergi Beltran^{7,9}  | Francesc Cardellach⁴ | Ronald JA Wanders⁵ | Cristina Fillat² |
 María Teresa García-Silva¹⁰ | Antonia Ribes¹ 

¹Secció d'Errors Congènits del Metabolisme -IBC, Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, Hospital Clínic, IDIBAPS, CIBERER, Barcelona, Spain

²Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

³Department of Pathology and Experimental Therapeutics, University of Barcelona; Bellvitge University Hospital; IDIBELL; Network Biomedical Research Center of Neurodegenerative diseases (CIBERNED), Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

⁴Muscle Research and Mitochondrial Function Laboratory, Cellex-IDIBAPS, Faculty of Medicine and Health Science-University of Barcelona, Internal Medicine Service-Hospital Clínic of Barcelona, CIBERER, Barcelona, Spain

⁵Departments of Clinical Chemistry and Pediatrics, Laboratory Genetic Metabolic Diseases, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands

⁶Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, Research Unit for Rare Diseases, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

⁷Centre for Genomic Regulation (CRG), CNAG-CRG, Barcelona Institute of Science and Technology (BIST), Barcelona, Spain

⁸Servicio de Anatomía Patológica, Hospital la Paz, Madrid, Spain

⁹Universitat Pompeu Fabra (UPF), Barcelona, Spain

¹⁰Unidad de Enfermedades Mitocondriales- Enfermedades Metabólicas Hereditarias. Servicio de Pediatría. University Hospital 12 de Octubre, U723 CIBERER, Universidad Complutense, Madrid, Spain

Correspondence

Antonia Ribes, Secció d'Errors Congènits del Metabolisme-IBC, Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, Hospital Clínic, IDIBAPS, CIBERER, C/Mejía Lequerica s/n, Edifici Helios III, Planta Baixa, 08028 Barcelona, Spain. Email: aribes@clinic.cat

Funding information

Generalitat de Catalunya, Grant/Award Number: CERCA programme; Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca, Grant/Award Number: 2014: SGR 393; Instituto de Salud Carlos III, Grant/Award Numbers: PI12/O1138, PI16/O1048; European Regional Development Fund; Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), an initiative of the Instituto de Salud Carlos III

Abstract

3-Methylglutaconic aciduria (3-MGA-uria) syndromes comprise a heterogeneous group of diseases associated with mitochondrial membrane defects. Whole-exome sequencing identified compound heterozygous mutations in *TIMM50* (c.[341 G>A];[805 G>A]) in a boy with West syndrome, optic atrophy, neutropenia, cardiomyopathy, Leigh syndrome, and persistent 3-MGA-uria. A comprehensive analysis of the mitochondrial function was performed in fibroblasts of the patient to elucidate the molecular basis of the disease. *TIMM50* protein was severely reduced in the patient fibroblasts, regardless of the normal mRNA levels, suggesting that the mutated residues might be important for *TIMM50* protein stability. Severe morphological defects and ultrastructural abnormalities with aberrant mitochondrial cristae organization in muscle and fibroblasts were found. The levels of fully assembled OXPHOS complexes and supercomplexes were strongly reduced in fibroblasts from this patient. High-resolution respirometry demonstrated a significant

*Frederic Tort and Olatz Ugarteburu contributed equally to this work.

reduction of the maximum respiratory capacity. A TIMM50-deficient HEK293T cell line that we generated using CRISPR/Cas9 mimicked the respiratory defect observed in the patient fibroblasts; notably, this defect was rescued by transfection with a plasmid encoding the TIMM50 wild-type protein. In summary, we demonstrated that TIMM50 deficiency causes a severe mitochondrial dysfunction by targeting key aspects of mitochondrial physiology, such as the maintenance of proper mitochondrial morphology, OXPHOS assembly, and mitochondrial respiratory capacity.

KEYWORDS

3-methylglutaconic aciduria, mitochondrial disorder, mitochondrial function, mitochondrial morphology, TIMM50

1 | INTRODUCTION

Mitochondrial energy metabolism disorders are a large and heterogeneous group of diseases presenting with a wide variety of clinical symptoms (Gorman et al., 2016). Although the diagnosis of these diseases is still challenging, the implementation of next-generation sequencing approaches in the last decade has identified disease-causing mutations in an increasing number of genes involved in the mitochondrial function (Carroll, Brillhante, & Suomalainen, 2014). Nevertheless, the physiopathological basis underlying these disorders is still not well understood. Accurate characterization of these processes at the molecular, cellular, and biochemical levels will provide new insight into these diseases that will be essential for the future development of potential therapeutic strategies.

Deficient enzymatic activities or altered levels of metabolites in body fluids facilitate the interpretation of the genomic data. Of these, increased urinary excretion of 3-methylglutaconic acid (3-MGA) has become a well-established and informative biomarker for metabolic disorders, particularly for those involving mitochondrial dysfunction (Wortmann et al., 2013). The persistently high excretion of this metabolite has been linked to a group of disorders characterized by defects located at the mitochondrial membrane. An increasing number of disease-causing mutations in genes encoding for proteins related to the mitochondrial membrane have been reported in patients with 3-methylglutaconic aciduria (3-MGA-uria), including: *TAZ* (MIM# 300394; Barth et al., 1983; Bione et al., 1996), *OPA3* (MIM# 606580; Anikster, Kleta, Shaag, Gahl, & Elpeleg, 2001), *DNAJC19* (MIM# 608977; Davey et al., 2006), *ATPAF2* (MIM# 608918; De Meirleir et al., 2004), *TMEM70* (MIM# 612418; Cizková et al., 2008), *ATP5F1E* (MIM# 606153; Mayr et al., 2010), *SERAC1* (MIM# 614725; Wortmann et al., 2012), *AGK* (MIM# 610345; Aldahmesh, Khan, Mohamed, Alghamdi, & Alkuraya, 2012; Mayr et al., 2012), *CLPB* (MIM# 616254; Capo-Chichi et al., 2015; Kanabus et al., 2015; Saunders et al., 2015; Wortmann et al., 2015), *HTRA2* (MIM# 606441; Mandel et al., 2016), *QIL1* (MIM# 616658; Guarani et al., 2016; Zeharia et al., 2016), *TIMM50* (MIM# 607381; Shahrour et al., 2017), and *ATP5F1D* (MIM# 603150; Oláhová et al., 2018).

Disorders associated to 3-MGA-uria are usually linked to variable mitochondrial respiratory chain defects and abnormal mitochondrial morphology. In addition, alterations in the metabolism of cardiolipin (CL), a phospholipid that plays a crucial role in the maintenance of the inner mitochondrial membrane structure, have been reported in individuals carrying mutations in *TAZ* (Barth syndrome, BS); (Houtkooper et al., 2009; Schlame & Ren, 2009) and *SERAC1* (Wortmann et al., 2012).

Two recent studies reported *TIMM50* mutations in individuals with epileptic encephalopathy and 3-MGA-uria (Shahrour et al., 2017; Reyes et al., 2018). *TIMM50* is a subunit of the TIM23 complex, located in the inner mitochondrial membrane, that plays a major role in protein import into the mitochondria (Geissler et al., 2002; Mokranjac et al., 2003; Mokranjac et al., 2009; Tamura et al., 2009). Although the molecular function of *TIMM50* has been well studied in different organisms and cellular models, the pathophysiological mechanisms underlying *TIMM50* deficiency in human disease still remain incompletely understood (Reyes et al., 2018).

Here, we present a comprehensive study that provides further insight into elucidating the potential pathomechanisms underlying *TIMM50* deficiency. We found severe morphological defects and ultrastructural abnormalities with aberrant mitochondrial cristae organization in muscle and fibroblasts from a boy with 3-MGA-uria. Respiratory chain activities in muscle biopsy were normal. However, when normalized to citrate synthetase (CS) activity, indicative of the mitochondrial mass, a general decrease of the complexes I–IV activity was detected. In addition, the levels of fully assembled OXPHOS complexes and supercomplexes were strongly reduced, and high-resolution respirometry demonstrated a significant reduction in the maximum respiratory capacity. Using CRISPR/Cas9, we generated a HEK293T *TIMM50*-deficient cell line and found that it mimicked the respiratory defect observed in the patient fibroblasts; notably, transfection with a plasmid encoding for the *TIMM50* wild-type protein could rescue this defect. Our results demonstrated that *TIMM50* mutations lead to a generalized defect of the mitochondrial function by targeting several key aspects of its physiology, including maintenance of proper mitochondrial morphology, OXPHOS assembly, and mitochondrial respiratory capacity.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Case report

We report a case study of a 17-year-old boy who was the second son of non-consanguineous, healthy Spanish parents. At the age of 2.5 months, the patient presented with abnormal ocular movements. At 3.5 months, a diagnosis of West syndrome was made, and he showed a good response to ACTH and antiepileptic treatment. Nevertheless, neurological regression was detected, and brain MRI showed bilateral symmetric lesions in the globus pallidus and brain stem, suggesting Leigh syndrome. Visual evoked potential and electroretinogram were abnormal, and the patient developed optic atrophy and strabismus. After 6 months, antiepileptic drugs were stopped. Further, the patient presented with dilated cardiomyopathy, which evolved favorably under digoxin treatment.

During childhood, the boy showed spastic tetraparesia with dystonia and severe visual impairment. He presented two episodes of diarrhea associated with neutropenia. At the present time, he shows evidence of failure to thrive, severe encephalopathy, dystonia, and piramidism. In addition, he has scoliosis and osteoarticular problems and is wheelchair-dependent.

Biochemical investigations revealed elevated levels of blood lactate (3 mmol/L; control levels, 0.63–2.49 mmol/L) and CSF lactate (5 mmol/L; control levels, < 2.2 mmol/L). Levels of plasma amino acids and acyl carnitines were normal, and the most relevant biochemical finding in urine was a persistent increase of 3-MGA (range: 53–308 mmol/mol creatinine, control levels: < 20) and 3-methylglutaric acid (range: 20–220 mmol/mol creatinine, control levels: < 15), setting the suspicion of a mitochondrial disorder (Figure S1).

Pyruvate dehydrogenase activity, ¹⁴C-pyruvate oxidation rate, and levels of coenzyme Q₁₀ were measured in fibroblasts of the patient and found to be within the control range. Muscle biopsy investigations revealed normal activities of the mitochondrial respiratory chain enzymes with an elevated activity of CS. Thus, when normalized to CS, a generalized decrease of complexes I-IV activities was detected (Table 1).

Histopathology studies showed normal muscle architecture with no evidence of glycogen accumulation or ragged red fibers, as confirmed by negative PAS and Masson's trichrome staining. SDH and sequential COX-SDH staining showed no abnormalities (Figure 1a). However, oil-red staining showed an accumulation of lipids in muscle fibers. Ultrastructural analysis of muscle by electronic microscopy confirmed that aggregation of lipidic material was associated with the mitochondria (Figure 1a).

2.2 | Whole exome sequencing

Informed consent for exome sequencing was obtained from the parents. A Trio-exome analysis was performed in the Centre Nacional d'Anàlisi Genòmica (CNAG). Exome enrichment was performed using the Agilent SureSelect Human All Exon 50 Mb kit followed by sequencing using the Illumina HiSeq. 2000 genome

analyzer platform. The analysis of the primary data (FASTQ files) was done using the pipeline developed by CNAG. Base calling and quality control were performed on the Illumina RTA sequence analysis pipeline. Sequence reads were mapped to Human genome build hg19 (GRCh37) using GEM mapper (Marco-Sola, Sammeth, Guigó, & Ribeca, 2012) and BFAST (Homer, Merriman, & Nelson, 2009). SAM tools suite version 0.1.18 (Li et al., 2009) with default settings was used for calling single-nucleotide variants and short indels on uniquely-mapping, non-duplicate read pairs. Variants on regions with low mappability (Derrien et al., 2012); read depth < 10; strand-bias *p* value < 0.001; or tail distance-bias *p* value < 0.05 were filtered out. Annotation was performed with Annovar (Wang, Li, & Hakonarson, 2010) and snpEff (Cingolani et al., 2012), and population frequencies from the 1000 Genomes Project (1000 Genomes Project Consortium et al., 2010), NHLBI Exome Sequencing Project (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), and an internal database were included.

2.3 | Cell culture and generation of a TIMM50-deficient cell line

Human skin fibroblasts and HEK293T were maintained in DMEM (4.5 g/L glucose, 10% fetal calf serum, 1 mM glutamine, and 1% penicillin-streptomycin).

HEK293T TIMM50-deficient cells were generated by CRISPR/Cas9 genome-editing technologies. Briefly, three gRNAs sequences targeting the *TIMM50* exon 2 were designed using the CRISPR design tool from the Feng Zhang Lab (<http://crispr.mit.edu/>). Guide RNAs were synthesized (Table S1) and cloned into the plentiCRISPRv2 vector following the lentiviral CRISPR Toolbox instructions from Zhang Lab available from Addgene. HEK293T cells were cotransfected with plentiCRISPRv2 containing *TIMM50* sg1, sg2 and/or sg3 guide RNAs by CalPhos mammalian transfection kit. The cells were then exposed to

TABLE 1 Mitochondrial respiratory chain activities in muscle

Enzyme activities in muscle	Patient ¹	Control values ^{1,‡}	Patient ²	Control values ^{2, ‡}
CI (NADH-CoQ ₁ oxidoreductase)	26	24–49	9	15–30
CII (Succinate dehydrogenase)	12	10–29	4	6–17
CIII (Decyl-ubiquinol Cytochrome c oxidoreductase)	100	62–161	36	38–98
CIV (cytochrome c oxidase)	55	36–131	20	22–80
Citrate synthase (CS)	280	127–222	-	-

¹nmol min⁻¹ mg⁻¹ protein.

²nmol min⁻¹ mg⁻¹ protein enzyme activity expressed in percentage respect to the CS activity.

[‡]control range.

Altered values are indicated in bold.

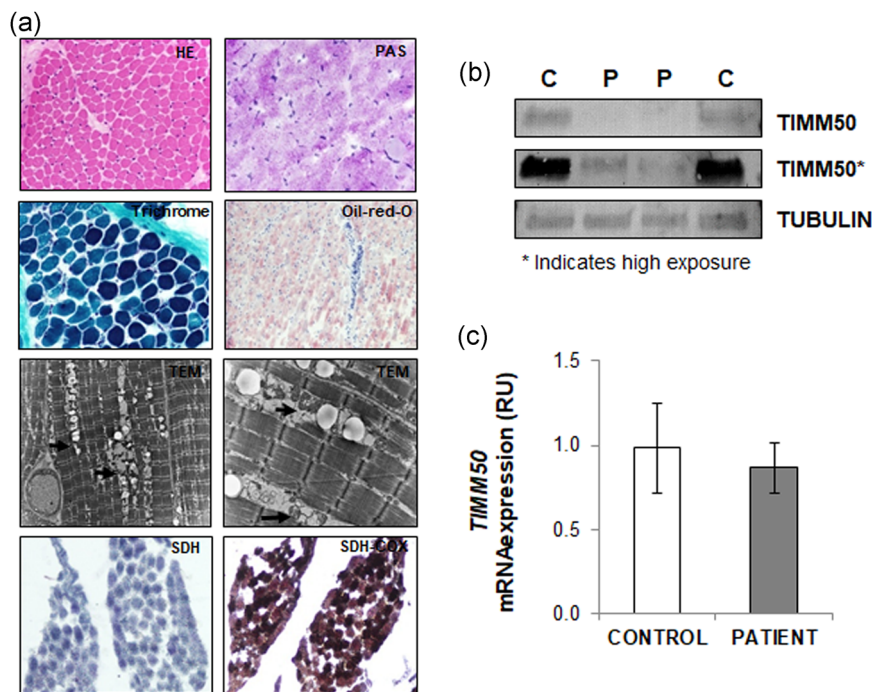


FIGURE 1 Histopathology studies and *TIMM50* expression. (a) Histopathology studies showed normal muscle architecture (HE, hematoxylin-eosin staining) with no evidence of glycogen accumulation (PAS, periodic acid schiff) or ragged red fibers (trichrome). Oil-red staining showed accumulation of lipids in muscle fibers. Electronic microscopy (TEM) showed aggregation of lipid material with mitochondria (indicated by arrows). SDH and sequential COX-SDH staining showed no abnormalities in muscle fibers. (b) Western blot showed strongly reduced levels of *TIMM50* protein in patient fibroblasts as compared with those from control individuals. Two different extracts of the patient fibroblasts and from two different controls are shown. Asterisk indicates higher exposure. GAPDH was used as a loading control. (c) RT-qPCR showed similar *TIMM50* mRNA expression in patient fibroblasts and control fibroblasts. RU: relative units

8 μ g/ml puromycin for 1 week. Limiting dilution assays were carried out to generate individual clones. After 3 weeks, several clones were analyzed for DNA mutation and *TIMM50* expression (Figure S2).

Wild type or *TIMM50*-deficient HEK293T cells were transfected using a pcDNA3.1 plasmid (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) containing either the *TIMM50* wild-type coding region or an empty vector. Transfection was performed using Lipofectamine 2000 Reagent (Thermo Fisher Scientific) following the manufacturer's protocol.

2.4 | mRNA expression analysis

Total RNA was extracted from patient and control fibroblasts using QIAshredder and RNeasy mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany). Single-strand cDNA was obtained using oligo-dT primers and M-MLV Reverse Transcriptase, RNase H Minus Point Mutant (Promega, Madison, WI), following the manufacturer's protocol.

TIMM50 mRNA expression was analyzed by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) using SYBR Select Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) in a Step One Plus Real-Time PCR thermocycler (Applied Biosystems). Specific oligonucleotides were used to detect mRNA expression from *TIMM50* or *GAPDH* (which was used as an internal control). Oligonucleotides are listed in Table S1.

2.5 | Protein expression analysis

Fibroblasts were homogenized in SETH buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.25 M sucrose, 2 mM EDTA, 5×10^4 U/I heparin). Muscle extracts were prepared in tissue extraction buffer (250 mM mannitol, 75 mM sucrose, 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA). Cleared lysates were subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and electroblotted, and proteins were visualized by immunostaining with specific antibodies followed by colorimetric detection (using the Opti-4CNTM Substrate Kit; Bio-Rad, Hercules, CA). The ImageJ software was used for the densitometry analysis of protein expression levels. For subcellular fractionation experiments, fibroblasts were permeabilized with 0.01% digitonin, and the cell lysate was centrifuged for 10 min at 15,000 \times g. Pellets (containing mitochondria), supernatant fractions (containing cytosol), and total fractions were analyzed by Western blot using the indicated antibodies (listed in Table S2; Navarro-Sastre et al., 2011).

2.6 | Blue native PAGE analysis of mitochondrial respiratory chain complexes and supercomplexes

Mitochondrial enriched pellets from fibroblasts and muscle tissue were obtained as described (Wittig, Braun, & Schägger, 2006). To analyze the mitochondrial respiratory chain complexes, the

mitochondrial pellets were solubilized in 1% n-dodecyl β -D-maltese. Supercomplexes extraction was performed using digitonin (1.2 g digitonin/g protein), a weaker detergent that maintains the interactions between complexes. Mitochondrial respiratory complexes and supercomplexes were analyzed by blue native PAGE (BN-PAGE) with 4–15% polyacrylamide gradient gels, followed by immunoblotting with specific antibodies. Colorimetric detection (Opti-4CN™ Substrate Kit, Bio-Rad) allowed visualization of complexes and supercomplexes. Antibodies are listed in Table S2.

2.7 | Mitochondrial network and mitochondria morphology analysis

Mitochondrial network and mitochondria morphology were analyzed by immunofluorescence using confocal microscopy. Briefly, the cells were grown on glass coverslips, rinsed in PBS, and fixed for 10 min with 4% paraformaldehyde. The reaction was stopped with NH_4Cl , and samples were permeabilized with 0.1% TritonX-100. The cells were stained with anti-TOMM20 (sc-11415) antibody, and coverslips were mounted with Mowiol 4–88 Mounting Medium (Sigma-Aldrich, Sant Luis, MI).

Images were obtained using a Leica TCS SL laser scanning confocal spectral microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) and analyzed using the ImageJ software. The ratios between mitochondria length and width (aspect ratio, AR) and the degree of mitochondrial network branching (form factor, FF) were calculated.

2.8 | Transmission electron microscopy

Fibroblasts were trypsinized and pelleted by centrifugation. Samples were fixed with 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde in PB (0.1 M phosphate buffer, pH 7.4). Pellets were washed five times with PB and post-fixed in 1% osmium tetroxide with 0.8% potassium hexacyanoferrate(III)-trihydrate in PB for 90 min. Samples were washed six times with milliQ water and dehydrated in ethanol with an increasing amount of acetone (from 50% to 100%). Samples were embedded in Spurr resin and polymerized at 60°C for 72 hr. Semithin sections were stained with toluidine blue, and selected ultrathin sections, with uranyl acetate and lead citrate. Sections were analyzed using a JEOL (JEM 2011) electron microscope.

2.9 | High-resolution respirometry

High-resolution respirometry was performed at 37°C using polarographic oxygen sensors in a two-chamber Oxygraph-2k system according to manufacturer's instructions (OROBOROS Instruments, Innsbruck, Austria). Manual titration of OXPHOS inhibitors (Oligomycin, Antimycin) and uncouplers (CCCP) was performed using Hamilton syringes (Hamilton Company, Reno, NV) as previously described (Pesta & Gnaiger, 2012). The data were recorded using the DatLab software v5.1.1.9 (Oroboros Instruments).

2.10 | Statistics

In all cases, statistical analyses were performed using the two-tailed Student's *t* test to compare the means of two independent groups of normally distributed data. The data were reported as the mean \pm S.E.M. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3 | RESULTS

3.1 | Identification of mutations in *TIMM50*

The clinical and biochemical phenotype of the patient reported here were suggestive of a mitochondrial energy metabolism disorder. Mutations in the mtDNA previously associated to Leigh disease and to the genes involved in 3-MGA-uria were ruled out. To determine the genetic cause of the disease, whole exome sequencing of the affected patient and his healthy parents was performed. Data interpretation and filtering steps for gene prioritization are summarized in Figure S3. Two heterozygous mutations in *TIMM50* (NM_001001563.5), which have not been previously reported, were identified. These mutations (c.341 G>A and c.805 G>A) are predicted to change arginine 114 to glutamine (p.Arg114Gln) and glycine 269 to serine (p.Gly269Ser), respectively. The mutations were confirmed by Sanger sequencing, and compound heterozygosity was corroborated by the carrier status of the mother (c.[341 G>A];[=]) and the father (c.[805 G>A];[=]) (Figure S4a). Both mutations were located in highly evolutionary conserved residues, and in silico analysis (PolyPhen-2 and SIFT) predicted a damaging effect on the protein (Figure S4b). The identified variants have been submitted to LOVD database (<http://www.lovd.nl/TIMM50>). *TIMM50* encodes for a translocase localized in the inner mitochondrial membrane and is a subunit of the TIM23 complex (Geissler et al., 2002; Mokranjac et al., 2003; Mokranjac et al., 2009; Tamura et al., 2009). This multiprotein complex is involved in the recognition and import of mitochondria-targeted proteins and in the maintenance of the mitochondrial membrane.

3.2 | Levels of *TIMM50* protein, but not of *TIMM50* mRNA, were strongly reduced in the patient fibroblasts

Notably, the *TIMM50* protein levels were strongly reduced (albeit not completely absent) in patient fibroblast cells, as shown by western blot analysis (Figure 1b). In stark contrast, mRNA expression levels were not significantly different than those in control fibroblasts (Figure 1c). Altogether, these results suggest that the *TIMM50* mutations reported here affect protein stability rather than the gene expression.

3.3 | Expression and sublocalization of mitochondria-targeted proteins are not affected in *TIMM50* patient fibroblasts

As *TIMM50* is a component of the TIM23 complex, we next studied the expression and sublocalization of a subset of

nuclear-encoded mitochondrial proteins. In particular, we analyzed the steady state levels of 10 subunits of the mitochondrial complexes I–V in fibroblasts. No significant differences of expression between TIMM50 and control fibroblasts for any of the mitochondrial proteins tested were observed by immunostaining followed by quantitative densitometry analysis (Figure 2a). To determine whether *TIMM50* mutations could compromise the subcellular localization of mitochondrial proteins, we analyzed several subunits of the complexes I–V that are in the inner mitochondrial membrane (NDUFS3, SDHA, SDHB, UQCRC1, COX5A, and ATP5A), as well as the mitochondrial matrix protein ECHS1. We used extracts from patient fibroblasts containing total, cytosolic, or mitochondria-enriched fractions. Western blot analysis of these extracts showed no differences between patient fibroblasts and fibroblasts from healthy controls. Therefore, we found no evidence for mislocalization because of the *TIMM50* mutations (Figure S5).

3.4 | Expression of mitochondria-targeted proteins is altered in TIMM50 patient muscle biopsy

The steady state levels of a subset of OXPHOS subunits were also analyzed in extracts from muscle biopsy (Figure 2b), but the analysis was restricted to one or two proteins of each complex because of the limited amount of available tissue. Similar to what was observed for the activities of the mitochondrial respiratory chain (Table 1), after normalization to the CS activity, results showed reduced protein levels of SDHA, COX4L, and MTCO1, whereas the levels of NDUFS3, UQCRC1, and ATP5A were similar to those seen in controls (Figure 2b).

3.5 | Mitochondrial network and mitochondria morphology are altered in TIMM50 fibroblasts

We next calculated the mitochondrial network parameters AR (indicative of morphology) and FF (indicative of network branching),

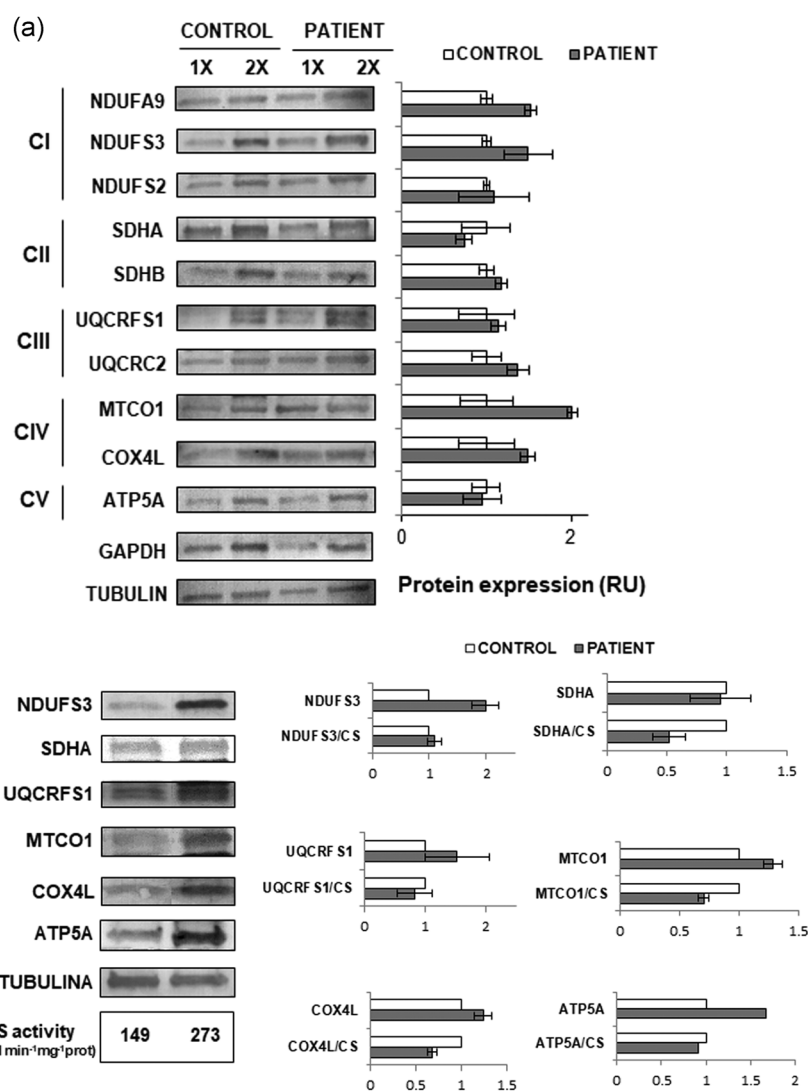


FIGURE 2 The expression of OXPHOS subunits in TIMM50 fibroblasts and muscle. (a) Immunostaining analysis showed no differences in the expression of the indicated proteins in TIMM50 patient fibroblasts as compared with control cells. 1× and 2× indicate 15 μg and 30 μg of loaded protein, respectively. Tubulin was used as a loading control. (b) Western blot and densitometry analysis showed reduced levels of SDHA, COX4L, and MTCO1 in patient muscle compared with control muscle after normalization for the citrate synthase activity. Tubulin was used as the loading control. C: control; P: patient; RU: relative units; CS: citrate synthase activity (nmol min⁻¹ mg⁻¹)

and the number of mitochondria per cell (Figure 3a). Inactivation of *TMEM70*, a mitochondrial membrane protein that also has been associated with 3-MGA-uria, has been shown to lead to fragmentation of the mitochondrial network and to an increased number of mitochondria per cell (Jonckheere et al., 2011). Therefore, fibroblasts from a patient with mutations in *TMEM70* were included in this study and used as a positive control. As expected, an important reduction of AR and FF, together with a high number of mitochondria per cell, were observed in *TMEM70*-mutated fibroblasts. Strikingly, *TIMM50*-mutated fibroblasts also showed a significant reduction of AR and FF as compared with control cells ($p < 0.001$). However, the decrease of the mitochondrial network parameters in *TIMM50* cells was less

prominent than that of *TMEM70* cells. On the other hand, the number of mitochondria per cell in *TIMM50* fibroblasts was similar to control individuals, in contrast to that observed in *TMEM70* fibroblasts, which were significantly higher ($p < 0.001$). Our results thus provide evidence of rounder and shorter mitochondria, as well as reduced mitochondrial network branching degree in the individual with *TIMM50* mutations, suggesting that *TIMM50* has a role in the maintenance of mitochondria architecture.

We next analyzed the protein expression levels of *DRP1* and *MFN2*, which are involved in mitochondrial fission and fusion, respectively. Results showed no significant alterations in the levels of these proteins or in their ratio (*DRP1*/*MFN2*; Figure S6).

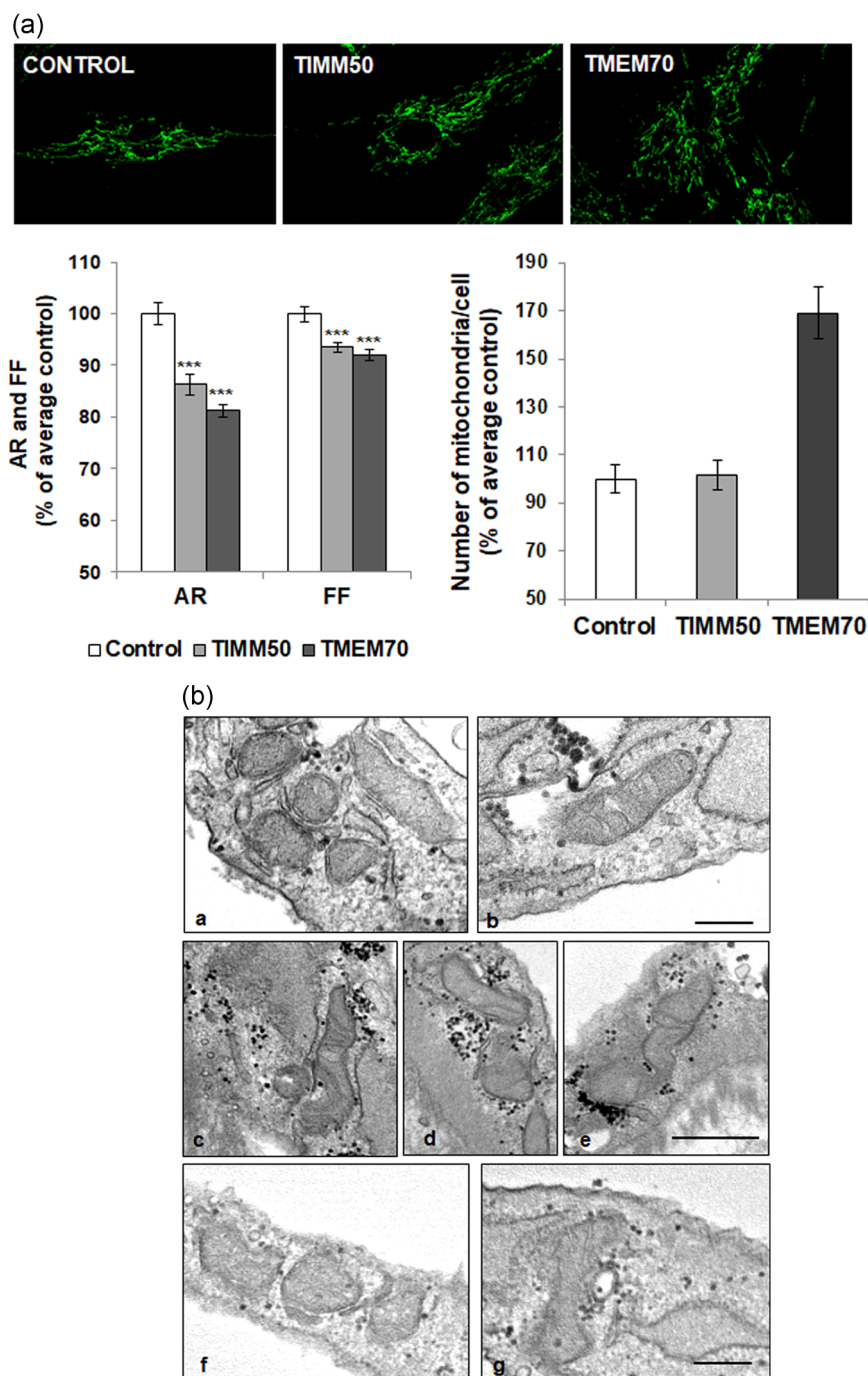


FIGURE 3 Mitochondria morphology and network are altered in *TIMM50* patient fibroblasts.

(a) Immunofluorescence analysis using TOMM20 as a mitochondrial marker showed a significant reduction in the aspect ratio (AR) and form factor (FF), indicating more rounded mitochondria and a reduced mitochondrial network branching degree in *TIMM50* patient. A *TMEM70* patient was used as a positive control for mitochondrial morphology abnormalities. *** $p < .001$. (b) Electron microscopy in fibroblasts of the patient carrying *TIMM50* mutations compared with *TMEM70* and control cells; a,b: control fibroblasts; c–e: fibroblasts from a patient with *TMEM70* mutations; f,g: fibroblasts from the patient with *TIMM50* mutations. Marked reduction in the number of mitochondrial cristae is seen in *TMEM70* and *TIMM50* fibroblasts. Scale bar = 0.2 μm

This suggests that the alterations of the mitochondria morphology were not caused by a general imbalance of mitochondrial dynamics.

3.6 | Aberrant mitochondrial ultrastructure in TIMM50 fibroblasts

To determine whether the *TIMM50* mutations affect the mitochondria ultrastructure, we studied *TIMM50* fibroblasts by Transmission electron microscopy (TEM). Fibroblasts from an individual with mutations in *TMEM70* were used as a positive control. As expected, a severe defect in mitochondria cristae characterized by a reduction in number was observed in the *TMEM70* patient compared with controls. Similarly, *TIMM50* fibroblasts revealed a marked reduction in the number of mitochondrial cristae. Other organelles were not altered (Figure 3b).

3.7 | The assembly of OXPHOS complexes and supercomplexes is altered in TIMM50 patient

The previous alterations seen in *TIMM50* fibroblasts raised the question whether the stability of OXPHOS complexes and supercomplexes could also be compromised as a consequence of *TIMM50* mutations. Therefore, we analyzed the mitochondrial respiratory chain complexes and supercomplexes from the patient fibroblasts by BN-PAGE followed by western blot, using specific antibodies against several subunits of the OXPHOS system (Figure 4). Interestingly, the levels of fully assembled respiratory chain complexes I, II, IV, and V were reduced (Figure 4a). In addition, when the analysis was performed using digitonin (which is a milder detergent that preserve the interactions with lipids and among complexes), we could observe that the levels of respiratory supercomplexes were also reduced (Figure 4b).

We next analyzed the assembly of OXPHOS complexes in muscle extracts. Although the results showed apparently normal levels of fully assembled complexes I, II, III, and V, a general reduction was observed upon normalization to the CS activity. The decrease was more prominent for complexes II, III, and V (Figure 4c). Unfortunately, because of the limited amounts of available tissue, the assembly of complex IV could not be evaluated.

3.8 | Altered respiratory capacity in TIMM50 fibroblasts

To determine whether the alterations observed in *TIMM50* patient fibroblasts could affect the mitochondrial respiratory capacity, we next analyzed the oxygen consumption rate (OCR) by high-resolution respirometry (Figure 4d). While the basal respiratory rate was similar for patient and control cells, a pronounced difference in OCR was detected when the cells were treated with a mitochondrial uncoupler (CCCP) showing a marked reduction of the maximal respiratory capacity of the *TIMM50* fibroblasts.

3.9 | A TIMM50-deficient cell line mimics the mitochondrial respiratory defect observed in patient fibroblasts

We generated a *TIMM50* knock-out cell line in HEK293T cells (*TIMM50*-KO) using CRISPR/Cas9 genome-editing technology. Immunostaining analysis showed no *TIMM50* protein expression in the *TIMM50*-KO cells (Figure 5a, upper panel). Similarly to the patient fibroblasts, CCCP treatment resulted in a marked reduction of the maximal respiratory capacity in *TIMM50*-KO cells (Figure 5a, lower panel). Importantly, *TIMM50*-KO cells showed a rescue of the maximal respiratory capacity following transient transfection with a plasmid encoding for *TIMM50* wild-type protein (Figure 5b).

4 | DISCUSSION

3-MGA-uria comprises a heterogeneous group of disorders of the mitochondrial energy metabolism, usually associated to mitochondrial membrane defects (Wortmann et al., 2013). Here, we report on the identification of a patient with 3-MGA-uria, lactic acidosis, Leigh syndrome and mutations in *TIMM50*, which encodes for an essential component of the TIM23 multiprotein complex, that is involved in the import of mitochondria-targeted polypeptides into the mitochondria (Geissler et al., 2002; Mokranjac et al., 2003; Mokranjac et al., 2009; Tamura et al., 2009).

The identified mutations (c.341 G>A and c.805 G>A) affect two amino acids that are evolutionarily highly conserved, suggesting that each substitution could have a strong impact on the protein. Notably, *TIMM50* protein levels were strongly reduced but not completely absent, regardless of the normal mRNA expression levels. These observations suggested that the mutated residues are important for *TIMM50* protein stability.

Mutations in *TIMM50* have been recently identified in three unrelated families (Reyes et al., 2018; Shahrour et al., 2017). The clinical and biochemical phenotypes of the previously described individuals were similar to those of the patient in this study, except that 3-MGA-uria was not observed in one of them (Reyes et al., 2018), and that cardiac involvement and neutropenia were not reported in any of the previous cases. However, cardiac involvement is a characteristic finding of BS (Barth et al., 1983; Bione et al., 1996) and of patients with mutations in *DNAJC19* (Davey et al., 2006). Several studies in animal models have proposed a role for *TIMM50* in the pathogenesis of heart dysfunction and have shown that *TIMM50*-deficient mice have cardiac hypertrophy (Tang et al., 2017). On the other hand, inactivation of the *TIMM50* protein ortholog in zebrafish results in brain malformations and heart abnormalities (Guo et al., 2004). Altogether, these observations are in agreement with the clinical symptoms observed in our patient and point to an important role of *TIMM50* in the brain and cardiac physiology. In addition, the patient in this study had two episodes of neutropenia, which is also a characteristic finding of BS (Aprikyan & Khuchua, 2013;

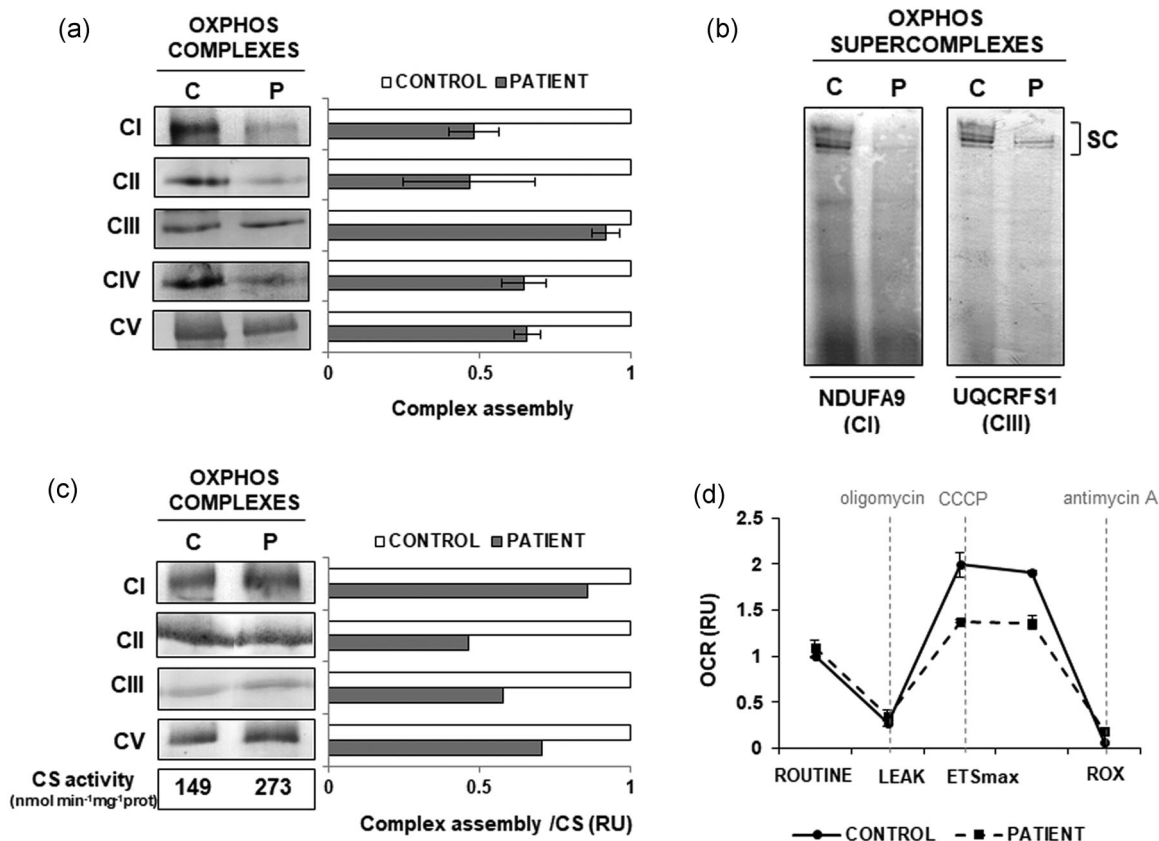


FIGURE 4 OXPHOS assembly and high-resolution respirometry. (a) BN-PAGE showed a reduction in the assembly of individual OXPHOS complexes I, II, IV, and V in TIMM50 patient cells. (b) BN-PAGE showed decreased amounts of high molecular weight OXPHOS supercomplexes in TIMM50 patient. (c) BN-PAGE showed reduced levels of assembled of complexes I, II, III, and V in patient's muscle upon normalization against citrate synthetase activity. (d) High-resolution respirometry analysis in TIMM50 patient cells and control individuals showed that the routinary oxygen consumption rate (OCR) was similar in both of them. After treatment with the mitochondrial uncoupler CCCP a reduction of Electron Transport System maximal respiratory capacity (ETSmax) was observed in patient cells compared with control. ETSmax is experimentally induced by titration with CCCP. ROUTINE, routinary oxygen consumption rate in untreated cells; LEAK, residual oxygen consumption after oligomycin treatment; ROX, residual oxygen consumption after treatment with antimycin A. OCR is expressed as relative units (RU) of control cells. C: control; P: patient; CS: citrate synthase activity (nmol min⁻¹ mg⁻¹)

Finsterer & Frank, 2013) and of patients with mutations in *CLPB* (Saunders et al., 2015; Wortmann et al., 2015) and *HTRA2* (Kovacs-Nagy et al., 2018; Mandel et al., 2016; Oláhová et al., 2017) who also present with 3-MGA-uria.

The function of TIMM50 has been studied in different organisms and cellular models (Geissler et al., 2002; Mokranjac et al., 2003; Mokranjac et al., 2009; Tamura et al., 2009), but the pathophysiological mechanisms underlying TIMM50 deficiency as a cause of human disease has not yet been completely understood. Interestingly, while preparing this manuscript, Reyes et al. (2018) provided the first mechanistic insight that delineates some of the pathophysiological consequences of TIMM50 impairment in human disease. Specifically, they demonstrated that *TIMM50* mutations impair mitochondrial protein import through the TIM23 complex, resulting in decreased levels of several components of the mitochondrial respiratory chain and in reduced mitochondrial respiration. Our results are complementary to these observations and provide new aspects underlying the mitochondrial dysfunction caused by *TIMM50* mutations.

As TIMM50 is a component of the inner mitochondrial membrane translocase, we wondered whether the sublocalization of mitochondria-targeted proteins could be affected in our patient. However, no mislocalization in any of the nuclear-encoded mitochondrial proteins, included in our study, was detected in the patient fibroblasts. Accordingly, a study performed in mitochondria from *Timm50*-deficient yeast cells demonstrated that inactivation of *TIMM50* had a variable effect on the import of different mitochondria-targeted proteins (Schendzielorz et al., 2017), which could explain the normal localization of the subset of proteins we observed in the patient fibroblasts.

On the other hand, Reyes et al. (2018) demonstrated that TIM23-dependent protein import was severely affected in mitochondria isolated from TIMM50 patient fibroblasts. In addition, these authors also showed that the steady state levels of particular components of complexes I, II, and IV were significantly reduced in these cells; in contrast, we did not observe any reduction in the steady state levels with the ten OXPHOS subunits tested, including those found to be reduced in the previously reported patient (Reyes et al., 2018).

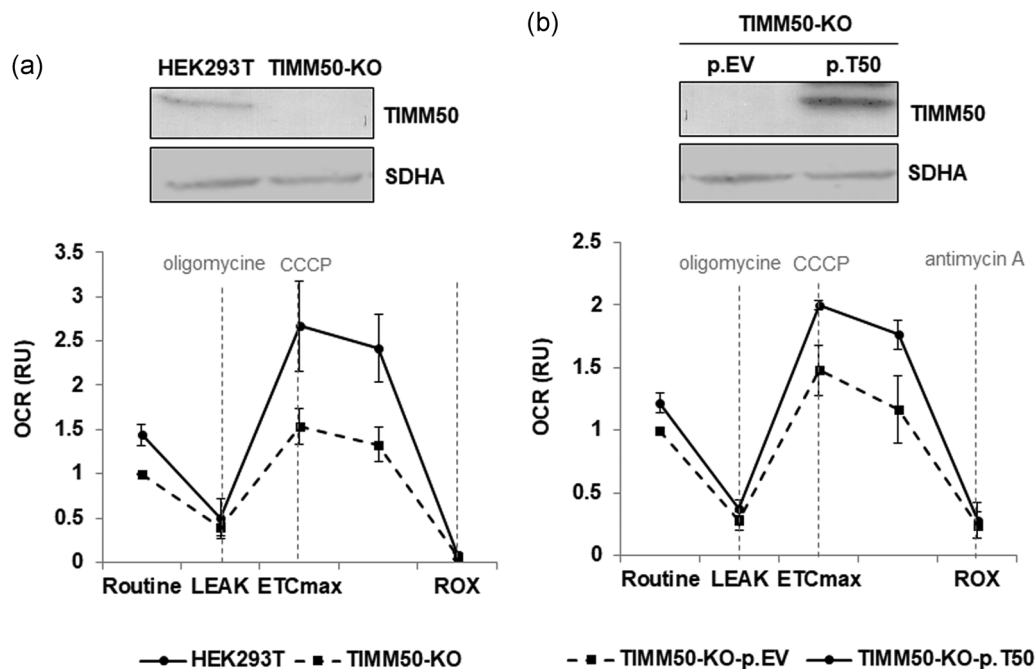


FIGURE 5 Functional complementation of the HEK293T TIMM50-deficient cells respiratory defect. (a) Western blot analysis demonstrated an absence of TIMM50 protein expression in a TIMM50 deficient cell line generated in HEK293T (TIMM50-KO; upper panel). High-resolution respirometry showed reduced Electron Transport System maximal respiratory capacity (ETSmax) after treatment with the mitochondrial uncoupler CCCP in HEK293T TIMM50-deficient cells (TIMM50-KO) compared with the parental cell line (HEK293T). (b) Western blot showed a complete absence of TIMM50 protein expression in HEK293T-KO cells transfected with empty vector (p.EV) and the recovery of protein expression upon transfection with a plasmid encoding for TIMM50 wild type protein (p.T50; upper panel). TIMM50-KO cells showed a recovery of the maximal respiratory capacity upon transient transfection with p.T50 compared with cells transfected with p.EV. ETSmax is experimentally induced by titration with CCCP. ROUTINE: basal oxygen consumption rate in untreated cells; LEAK: residual oxygen consumption after oligomycin treatment; ROX: residual oxygen consumption after treatment with antimycin A. Oxygen consumption rate (OCR) is expressed as relative units (RU) of control cells

Interestingly, the analysis of OXPHOS components in the muscle tissue from our patient showed reduced levels of SDHA (complex II), MTCO1, and COX4L (complex IV) when normalized to the CS activity. It is remarkable that these three proteins were also reduced in fibroblasts of the patient reported by Reyes et al. (2018) although they did not determine its expression in muscle. The differences observed between our patient and the patient reported by Reyes et al. (2018) could be because of the different *TIMM50* mutations identified. The patient reported here is compound heterozygous for two missense mutations affecting amino acids localized in the intermembrane domain of the protein (p.Arg114Gln and p.Gly269-Ser). In contrast, the patient reported by Reyes et al. (2018) harbors a nonsense mutation (p.Ser122Ter) in one allele, encoding for a potentially truncated protein that is likely not expressed under physiological conditions, together with a missense mutation (p.Gly190Ala) on the other allele that maps to the conserved transmembrane domain of the protein. The clinical progression of our patient was also different and was similar to the initially reported TIMM50 patients, who also had missense mutations affecting amino acids of the intermembrane portion of the protein (Shahrour et al., 2017). In contrast, the patient of Reyes et al. (2018) showed a severe and rapid progression of the disease, leading to death at 2 years of age. Therefore, we speculate that the *TIMM50* mutations

described herein may have a milder impact on the TIMM50 protein function.

A key aspect of the mitochondrial function is to maintain its morphology. This highly regulated process relies on the adequate structural organization of the inner mitochondrial membrane as well as regulation of fusion/fission cycles (Kasahara & Scorrano, 2014). In fact, mitochondria morphological abnormalities have been observed in patients with 3-MGA-uria mutations in *QIL1* (Guarani et al., 2016; Zeharia et al., 2016), *TMEM70* (Cameron et al., 2011; Jonckheere et al., 2011), and *OPA3* (Grau et al., 2013; Powell, Davies, Taylor, Wride, & Votruba, 2011). In addition, cells depleted for *DNAJC19* expression also shown aberrant cristae structure (Richter-Dennerlein et al., 2014). These findings prompted us to analyze mitochondrial network and morphology in the TIMM50 patient fibroblasts in comparison with fibroblasts from controls or to those from a patient with mutations in *TMEM70*. Interestingly, our results demonstrated that the TIMM50 fibroblasts had significantly shorter and rounder mitochondria, together with a reduction in the branching degree of the mitochondrial network. In addition, a detailed TEM analysis of mitochondria ultrastructure revealed abnormalities of cristae organization. These alterations were less pronounced than those seen in *TMEM70* fibroblasts, probably because of the fact that *TMEM70* is an assembly factor of complex V and is directly involved

in their dimerization, a process required for the proper maintenance of cristae shape (Cogliati, Enriquez, & Scorrano, 2016; Jonckheere, Smeitink, & Rodenburg, 2012). In a physiological context, the mitochondrial network maintenance is regulated by the balance between mitochondrial fusion and fission cycles (Sesaki & Jensen, 1999). However, the morphological defects observed in TIMM50 fibroblasts are not likely to rely on mitochondrial fusion/fission imbalances, as these events were unaltered in patient-derived fibroblasts, as seen by the normal ratio between the proteins DRP1 (involved in fission) and MFN2 (involved in fusion). We speculate that the alterations of mitochondrial morphology observed in TIMM50 patient cells could be linked to structural changes that affect the inner mitochondrial membrane because of the reduction of the TIMM50 protein. In fact, the mitochondrial import machinery has been reported to be linked to the mitochondrial inner membrane organizing system, which is necessary for maintaining mitochondrial cristae structure (Becker, Böttinger, & Pfanner, 2012). In addition, alterations in TIM17, another component of TIM23 complex, have been recently found to be associated with abnormal mitochondrial morphology (Matta, Pareek, Bankapalli, Oblesha, & D'Silva, 2017).

Variable defects in the OXPHOS system have been reported in patients with 3-MGA-uria (Wortmann et al., 2013). Several pieces of evidence reported a physical connection between the TIM23 complex and the mitochondrial respiratory chain complexes and supercomplexes (Becker, Böttinger, & Pfanner, 2012). Here, the analysis of the mitochondrial respiratory chain complexes in patient muscle biopsy showed a generalized reduction in the activities of complexes I–IV when normalized to the CS activity, while the previously reported patients showed variable mitochondrial respiratory chain defects, ranging from a normal activity detected in one patient to an isolated defect in the activities of complex V (Shahour et al., 2017) or complex II (Reyes et al., 2018). However, the impact of TIMM50 mutations in the assembly of the OXPHOS system and in supercomplexes formation has not been explored in any of the previously reported patients. We demonstrated for the first time a significant reduction in the levels of fully assembled OXPHOS complexes and supercomplexes in an individual with TIMM50 mutations. The effects of these alterations on the mitochondrial function were determined by high-resolution respirometry. We demonstrated that TIMM50-mutated fibroblasts had a significant reduction of the maximal respiratory capacity, suggesting that the optimal function of the electron transport chain might be compromised. These observations were further corroborated in a TIMM50-deficient model generated in HEK293T cells that mimicked the respiratory defect observed in the patient fibroblasts; in HEK293T cells, this defect could be rescued by transfection with a plasmid encoding for the TIMM50 wild-type protein.

In summary, our study provides new insight into the pathophysiological mechanisms underlying mitochondrial energy metabolism associated with 3-MGA-uria. In particular, this study together with the recently reported observations of Reyes et al. (2018) represents the first comprehensive characterization of the molecular

mechanisms underlying the pathogenesis of the mitochondrial disease caused by TIMM50 mutations. We demonstrated that TIMM50 deficiency leads to a severe mitochondrial dysfunction by targeting pivotal aspects of mitochondrial physiology, such as assembly of OXPHOS complexes and supercomplexes, and maintenance of mitochondria morphology. Moreover, we have demonstrated that these alterations have a remarkable impact on mitochondrial functionality, leading to a defect characterized by an important reduction of the maximal electron transport chain respiratory capacity.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the advanced optic microscopy and the electron microscopy facilities of the CCIT-UB. We also thank Dr Miguel Angel Martín from Hospital 12 de Octubre, Madrid for providing the muscle biopsy. We are grateful to the family involved in this study. This work was performed in the context of the Biomedicine PhD Program of the University of Barcelona (UB).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

ETHICS

All procedures were approved by the ethics committee of the Hospital Clínic, Barcelona.

ORCID

Sergi Beltran  <http://orcid.org/0000-0002-2810-3445>

Antonia Ribes  <http://orcid.org/0000-0002-2249-246X>

REFERENCES

- 1000 Genomes Project Consortium, Altshuler, G. R., Durbin, R. M., Abecasis, G. R., Bentley, D. R., Chakravarti, A., ... McVean, G. A. (2010). A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*, *467*, 1061–1073.
- Aldahmesh, M. A., Khan, A. O., Mohamed, J. Y., Alghamdi, M. H., & Alkuraya, F. S. (2012). Identification of a truncation mutation of acylglycerol kinase (AGK) gene in a novel autosomal recessive cataract locus. *Human Mutation*, *33*, 960–962.
- Anikster, Y., Kleta, R., Shaag, A., Gahl, W. A., & Elpeleg, O. (2001). Type III 3-methylglutaconic aciduria (optic atrophy plus syndrome, or Costeff optic atrophy syndrome): Identification of the OPA3 gene and its founder mutation in Iraqi Jews. *American Journal of Human Genetics*, *69*, 1218–1224.
- Aprikyan, A. A., & Khuchua, Z. (2013). Advances in the understanding of Barth syndrome. *British Journal of Haematology*, *161*, 330–338.
- Barth, P. G., Scholte, H. R., Berden, J. A., Van der Klei-Van Moorsel, J. M., Luyt-Houwen, I. E., Van't Veer-Korthof, E. T., ... Sobotka-Plojhar, M. A. (1983). An X-linked mitochondrial disease affecting cardiac muscle, skeletal muscle and neutrophil leucocytes. *Journal of the Neurological Sciences*, *62*, 327–355.

- Becker, T., Böttlinger, L., & Pfanner, N. (2012). Mitochondrial protein import: From transport pathways to an integrated network. *Trends in Biochemical Sciences*, 37, 85–91.
- Bione, S., D'Adamo, P., Maestrini, E., Gedeon, A. K., Bolhuis, P. A., & Toniolo, D. (1996). A novel X-linked gene, G4.5, is responsible for Barth syndrome. *Nature Genetics*, 12, 385–389.
- Cameron, J. M., Levandovskiy, V., Mackay, N., Ackerley, C., Chitayat, D., Raiman, J., ... Robinson, B. H. (2011). Complex V TMEM70 deficiency results in mitochondrial nucleoid disorganization. *Mitochondrion*, 11, 191–199.
- Capo-Chichi, J. M., Boissel, S., Brustein, E., Pickles, S., Fallet-Bianco, C., Nassif, C., ... Michaud, J. L. (2015). Disruption of CLPB is associated with congenital microcephaly, severe encephalopathy and 3-methylglutaconic aciduria. *Journal of Medical Genetics*, 52, 303–311.
- Carroll, C. J., Brillhante, V., & Suomalainen, A. (2014). Next-generation sequencing for mitochondrial disorders. *British Journal of Pharmacology*, 171, 1837–1853.
- Cingolani, P., Platts, A., Wang le, L., Coon, M., Nguyen, T., Wang, L., ... Ruden, D. M. (2012). A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)*, 6, 80–92.
- Cogliati, S., Enriquez, J. A., & Scorrano, L. (2016). Mitochondrial Cristae: Where beauty meets functionality. *Trends in Biochemical Sciences*, 41, 261–273.
- Cížková, A., Stránecký, V., Mayr, J. A., Tesarová, M., Havlíčková, V., Paul, J., ... Kmoch, S. (2008). TMEM70 mutations cause isolated ATP synthase deficiency and neonatal mitochondrial encephalomyopathy. *Nature Genetics*, 40, 1288–1290.
- Davey, K. M., Parboosingh, J. S., McLeod, D. R., Chan, A., Casey, R., Ferreira, P., ... Bernier, F. P. (2006). Mutation of DNAJC19, a human homologue of yeast inner mitochondrial membrane co-chaperones, causes DCMA syndrome, a novel autosomal recessive Barth syndrome-like condition. *Journal of Medical Genetics*, 43, 385–393.
- Derrien, T., Estellé, J., Marco Sola, S., Knowles, D. G., Raineri, E., Guigó, R., & Ribeca, P. (2012). Fast computation and applications of genome mappability. *PLoS One*, 7, e30377.
- Finsterer, J., & Frank, M. (2013). Haematological features in Barth syndrome. *Current Opinions in Hematology*, 20, 36–40.
- Geissler, A., Chacinska, A., Truscott, K. N., Wiedemann, N., Brandner, K., Sickmann, A., ... Rehling, P. (2002). The mitochondrial presequence translocase: An essential role of Tim50 in directing preproteins to the import channel. *Cell*, 111, 507–518.
- Gorman, G. S., Chinnery, P. F., DiMauro, S., Hirano, M., Koga, Y., McFarland, R., ... Turnbull, D. M. (2016). Mitochondrial diseases. *Nat Rev Dis Primers*, 2, 16080.
- Grau, T., Burbulla, L. F., Engl, G., Delettre, C., Delprat, B., Oexle, K., ... Schimpf-Linzenbold, S. (2013). A novel heterozygous OPA3 mutation located in the mitochondrial target sequence results in altered steady-state levels and fragmented mitochondrial network. *Journal of Medical Genetics*, 50, 848–858.
- Guarani, V., Jardel, C., Chrétien, D., Lombès, A., Bénit, P., Labasse, C., ... Schiff, M. (2016). QIL1 mutation causes MICOS disassembly and early onset fatal mitochondrial encephalopathy with liver disease. *eLife*, 13, 5.
- Guo, Y., Cheong, N., Zhang, Z., De Rose, R., Deng, Y., Farber, S. A., ... Alnemri, E. S. (2004). Tim50, a component of the mitochondrial translocator, regulates mitochondrial integrity and cell death. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 24813–24825.
- Homer, N., Merriman, B., & Nelson, S. F. (2009). BFAST: An alignment tool for large scale genome resequencing. *PLoS One*, 4, e7767.
- Houtkooper, R. H., Turkenburg, M., Poll-The, B. T., Karall, D., Pérez-Cerdá, C., Morrone, A., ... Vaz, F. M. (2009). The enigmatic role of tafazzin in cardiolipin metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta/General Subjects*, 1788, 2003–2014.
- Jonckheere, A. I., Huigsloot, M., Lammens, M., Jansen, J., van den Heuvel, L. P., Spiekerkoetter, U., ... Rodenburg, R. J. (2011). Restoration of complex V deficiency caused by a novel deletion in the human TMEM70 gene normalizes mitochondrial morphology. *Mitochondrion*, 11, 954–963.
- Jonckheere, A. I., Smeitink, J. A., & Rodenburg, R. J. (2012). Mitochondrial ATP synthase: Architecture, function and pathology. *Journal of Inherited Metabolic Disease (Dordrecht)*, 35, 211–225.
- Kanabus, M., Shahni, R., Saldanha, J. W., Murphy, E., Plagnol, V., Hoff, W. V., ... Rahman, S. (2015). Bi-allelic CLPB mutations cause cataract, renal cysts, nephrocalcinosis and 3-methylglutaconic aciduria, a novel disorder of mitochondrial protein disaggregation. *Journal of Inherited Metabolic Disease (Dordrecht)*, 38, 211–219.
- Kasahara, A., & Scorrano, L. (2014). Mitochondria: From cell death executioners to regulators of cell differentiation. *Trends in Cell Biology*, 24, 761–770.
- Kovacs-Nagy, R., Morin, G., Nouri, M. A., Brandau, O., Saadi, N. W., Nouri, M. A., ... Wortmann, S. B. (2018). HTRA2 defect: A recognizable inborn error of metabolism with 3-Methylglutaconic Aciduria as discriminating feature characterized by neonatal movement disorder and epilepsy-report of 11 patients. *Neuropediatrics. Published Online First*, 49, 373–378. 16 August 2018. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1667345>
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., ... Durbin, R., 1000 Genome Project Data Processing Subgroup (2009). The sequence alignment/map format and SAM tools. *Bioinformatics*, 25, 2078–2079.
- Mandel, H., Saita, S., Edvardson, S., Jalas, C., Shaag, A., Goldsher, D., ... Elpeleg, O. (2016). Deficiency of HTRA2/Omi is associated with infantile neurodegeneration and 3-methylglutaconic aciduria. *Journal of Medical Genetics*, 53, 690–696.
- Marco-Sola, S., Sammeth, M., Guigó, R., & Ribeca, P. (2012). The GEM mapper: Fast, accurate and versatile alignment by filtration. *Nature Methods*, 9, 1185–1188.
- Matta, S. K., Pareek, G., Bankapalli, K., Oblesha, A., & D'Silva, P. (2017). Role of Tim17 transmembrane regions in regulating the architecture of presequence translocase and mitochondrial DNA stability. *Molecular and Cellular Biology*, 37, e00491–e00516.
- Mayr, J. A., Haack, T. B., Graf, E., Zimmermann, F. A., Wieland, T., Haberberger, B., ... Prokisch, H. (2012). Lack of the mitochondrial protein acylglycerol kinase causes Sengers syndrome. *American Journal of Human Genetics*, 90, 314–320.
- Mayr, J. A., Havlíčková, V., Zimmermann, F., Magler, I., Kaplanová, V., Jesina, P., ... Houstek, J. (2010). Mitochondrial ATP synthase deficiency due to a mutation in the ATP5E gene for the F1 epsilon subunit. *Human Molecular Genetics*, 19, 3430–3439.
- De Meirleir, L., Seneca, S., Lissens, W., De Clercq, I., Eyskens, F., Gerlo, E., ... Van Coster, R. (2004). Respiratory chain complex V deficiency due to a mutation in the assembly gene ATP12. *Journal of Medical Genetics*, 41, 120–124.
- Mokranjac, D., Paschen, S. A., Kozany, C., Prokisch, H., Hoppins, S. C., Nargang, F. E., ... Hell, K. (2003). Tim50, a novel component of the TIM23 preprotein translocase of mitochondria. *EMBO Journal*, 22, 816–825.
- Mokranjac, D., Sighting, M., Popov-Celeketić, D., Mapa, K., Gevorkyan-Airapetov, L., Zohary, K., ... Neupert, W. (2009). Role of Tim50 in the transfer of precursor proteins from the outer to the inner membrane of mitochondria. *Molecular Biology of the Cell*, 20, 1400–1407.
- Navarro-Sastre, A., Tort, F., Stehling, O., Uzarska, M. A., Arranz, J. A., Del Toro, M., ... Lill, R. (2011). A fatal mitochondrial disease is associated with defective NDU1 function in the maturation of a subset of mitochondrial Fe-S proteins. *American Journal of Human Genetics*, 89(5), 656–667.
- Oláhová, M., Thompson, K., Hardy, S. A., Barbosa, I. A., Besse, A., Anagnostou, M. E., ... Taylor, R. W. (2017). Pathogenic variants in

- HTRA2 cause an early-onset mitochondrial syndrome associated with 3-methylglutaconic aciduria. *Journal of Inherited Metabolic Disease (Dordrecht)*, 40, 121–130.
- Oláhová, M., Yoon, W. H., Thompson, K., Jangam, S., Fernandez, L., Davidson, J. M., ... Wheeler, M. T. (2018). Biallelic mutations in ATP5F1D, which encodes a subunit of ATP synthase, cause a metabolic disorder. *American Journal of Human Genetics*, 102, 494–504.
- Pesta, D., & Gnaiger, E. (2012). High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. *Methods in Molecular Biology*, 810, 25–58.
- Powell, K. A., Davies, J. R., Taylor, E., Wride, M. A., & Votruba, M. (2011). Mitochondrial localization and ocular expression of mutant Opa3 in a mouse model of 3-methylglutaconicaciduria type III. *Investigative Ophthalmology and Visual Science (Philadelphia, PA)*, 52, 4369–4380.
- Reyes, A., Melchionda, L., Burlina, A., Robinson, A. J., Ghezzi, D., & Zeviani, M. (2018). Mutations in TIMM50 compromise cell survival in OxPhos-dependent metabolic conditions. *EMBO Molecular Medicine*, 10, e8698.
- Richter-Dennerlein, R., Korwitz, A., Haag, M., Tatsuta, T., Dargazanli, S., Baker, M., ... Langer, T. (2014). DNAJC19, a mitochondrial cochaperone associated with cardiomyopathy, forms a complex with prohibitins to regulate cardiolipin remodeling. *Cell Metabolism*, 20, 158–171.
- Saunders, C., Smith, L., Wibrand, F., Ravn, K., Bross, P., Thiffault, I., ... Ostergaard, E. (2015). CLPB variants associated with autosomal-recessive mitochondrial disorder with cataract, neutropenia, epilepsy, and methylglutaconic aciduria. *American Journal of Human Genetics*, 96, 258–265.
- Schendzielorz, A. B., Schulz, C., Lytovchenko, O., Clancy, A., Guiard, B., Ieva, R., ... Rehling, P. (2017). Two distinct membrane potential-dependent steps drive mitochondrial matrix protein translocation. *Journal of Cell Biology*, 216, 83–92.
- Schlame, M., & Ren, M. (2009). The role of cardiolipin in the structural organization of mitochondrial membranes. *Biochimica et Biophysica Acta/General Subjects*, 1788, 2080–2083.
- Sesaki, H., & Jensen, R. E. (1999). Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *Journal of Cell Biology*, 147, 699–706.
- Shahrouh, M. A., Staretz-Chacham, O., Dayan, D., Stephen, J., Weech, A., Damseh, N., ... Malicdan, M. C. (2017). Mitochondrial epileptic encephalopathy, 3-methylglutaconic aciduria and variable complex V deficiency associated with TIMM50 mutations. *Clinical Genetics*, 91, 690–696.
- Tamura, Y., Harada, Y., Shiota, T., Yamano, K., Watanabe, K., Yokota, M., ... Endo, T. (2009). Tim23-Tim50 pair coordinates functions of translocators and motor proteins in mitochondrial protein import. *Journal of Cell Biology*, 184, 129–141.
- Tang, K., Zhao, Y., Li, H., Zhu, M., Li, W., Liu, W., ... Xu, Y. W. (2017). Translocase of inner membrane 50 functions as a novel protective regulator of pathological cardiac hypertrophy. *Journal of the American Heart Association*, 6, 4.
- Wang, K., Li, M., & Hakonarson, H. (2010). ANNOVAR: Functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Research*, 38, e164–e164.
- Wittig, I., Braun, H. P., & Schägger, H. (2006). Blue native PAGE. *Nature Protocols*, 1, 418–422.
- Wortmann, S. B., Duran, M., Anikster, Y., Barth, P. G., Sperl, W., Zschocke, J., ... Wevers, R. A. (2013). Inborn errors of metabolism with 3-methylglutaconic aciduria as discriminative feature: Proper classification and nomenclature. *Journal of Inherited Metabolic Disease (Dordrecht)*, 36, 923–928.
- Wortmann, S. B., Vaz, F. M., Gardeitchik, T., Vissers, L. E., Renkema, G. H., Schuurs-Hoeijmakers, J. H., ... de Brouwer, A. P. (2012). Mutations in the phospholipid remodeling gene SERAC1 impair mitochondrial function and intracellular cholesterol trafficking and cause dystonia and deafness. *Nature Genetics*, 44, 797–802.
- Wortmann, S. B., Ziętkiewicz, S., Kousi, M., Szklarczyk, R., Haack, T. B., Gersting, S. W., ... Wevers, R. A. (2015). CLPB mutations cause 3-methylglutaconic aciduria, progressive brain atrophy, intellectual disability, congenital neutropenia, cataracts, movement disorder. *American Journal of Human Genetics*, 96, 245–257.
- Zeharia, A., Friedman, J. R., Tobar, A., Saada, A., Konen, O., Fellig, Y., ... Elpeleg, O. (2016). Mitochondrial hepato-encephalopathy due to deficiency of QIL1/MIC13 (C19orf70), a MICOS complex subunit. *European Journal of Human Genetics*, 24, 1778–1782.

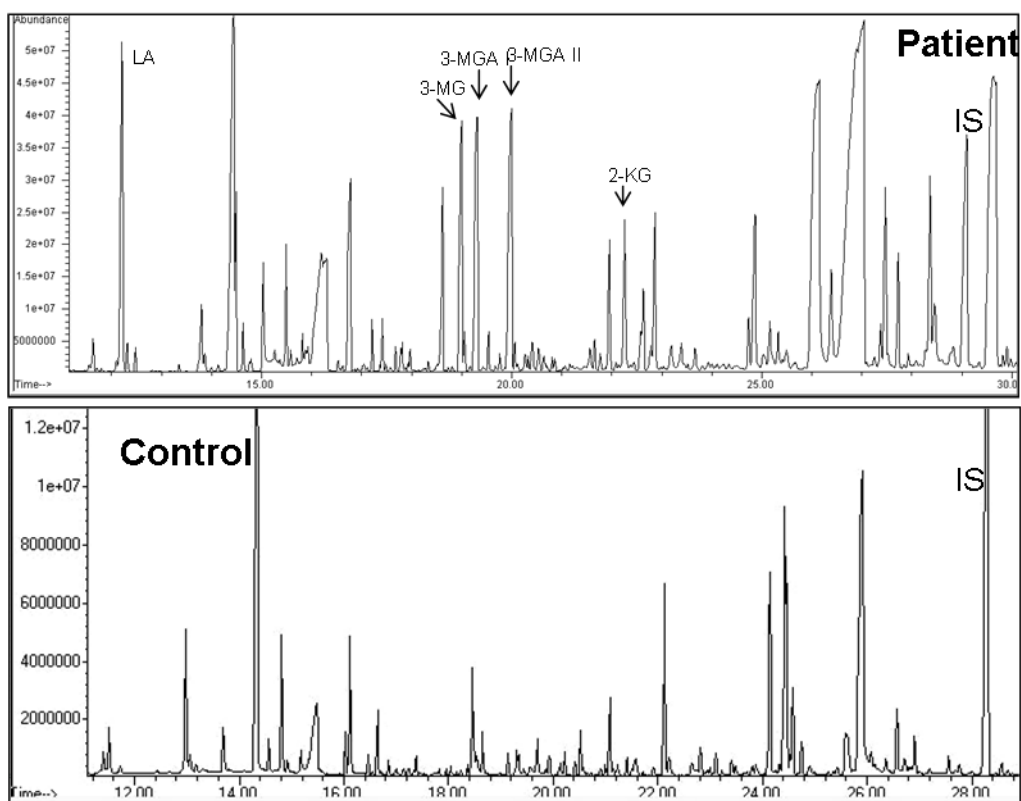
SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Tort F, Ugarteburu O, Texidó L, et al. Mutations in *TIMM50* cause severe mitochondrial dysfunction by targeting key aspects of mitochondrial physiology. *Human Mutation*. 2019;40:1700–1712. <https://doi.org/10.1002/humu.23779>

Supplementary Material

**Mutations in *TIMM50* causes severe mitochondrial dysfunction
by targeting key aspects of mitochondria physiology**



Supp. Figure S1. Urine organic acid profile. Urine organic acid profile of TIMM50 patient. Samples were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry, and peaks were identified as lactic acid (LA), 2-ketoglutaric acid (2-KG), 3-methylglutaconic acid (3-MGA I and 3-MGA II), 3-methylglutaric acid (3-MG), undecanodioate (IS, internal standard).

A

```

TIMM50          CCCTCCAGTCCTGTTGCCTTCAGGATCCTGTGCACCTGGCCTGTTAGCTTTTAAAACTCC
HEK-CRISPR/Cas9 CCCTCCAGTCCTGTTGCCTTCAGGATCCTGTGCACCTGGCCTGTTAGCTTTTAAAACTCC
*****

TIMM50          TGGCATCCTGGTGCGGGACAGTCTGGTTTTGACCCTCTGAGCAGCCCACATCCTGACTG
HEK-CRISPR/Cas9 TGGCATCCTGGTGCGGGACAGTCTGGTTTTGACCCTCTGAGCAGCCCACATCCTGACTG
*****

TIMM50          CTACTCCAGGGACACAGATGTCCAGGGCTCTGTGGGTGTCTGCCTCTTGGCTCCTGAACT
HEK-CRISPR/Cas9 CTACTCCAGGGACACAGATGTCCAGGGCTCTGTGGGTGTCTGCCTCTTGGCTCCTGAACT
*****

TIMM50          TGATTCTTCTTGGACTGGAGGTTGGGGACCATCCTGACCTCTCTTCTCTCTTGGCTGACC
HEK-CRISPR/Cas9 TGATTCTTCTTGGACTGGAGGTTGGGGACCATCCTGACCTCTCTTCTCTCTTGGCTGACC
*****

TIMM50          TCCCCTTTCTCAACCGCAGGCCGCGAGAGATCGGGAGCCGCGGGAGCACTAAGGCGCAAGG
HEK-CRISPR/Cas9 TCCCCTTTCTCAACCGCAGGCCGCGAGAGATCGAGAGCCGCGGGAGCACTATG--GCCTCC
*****

TIMM50          GCCACAGCAGCAGCCGGGCTCAGAGGGTCCCAGCTATGCCAAAAAGTTGCGCTCTGGCT
HEK-CRISPR/Cas9 AACACAGCAGCCGAGGCCGCGAGAGACCAGGAGC---CGCAAAAC-----GATCTGGCT
* ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

TIMM50          TGCTGGGCTGCTTGGAGCTGGTGGGA CTGTGA GCGTCGTCTATATCTT
HEK-CRISPR/Cas9 TGCTGGGCTGCTGG-AGCTGGTGGGAaCTGTGAaGCGTCGTCTATATCTT
*****

```

B

```

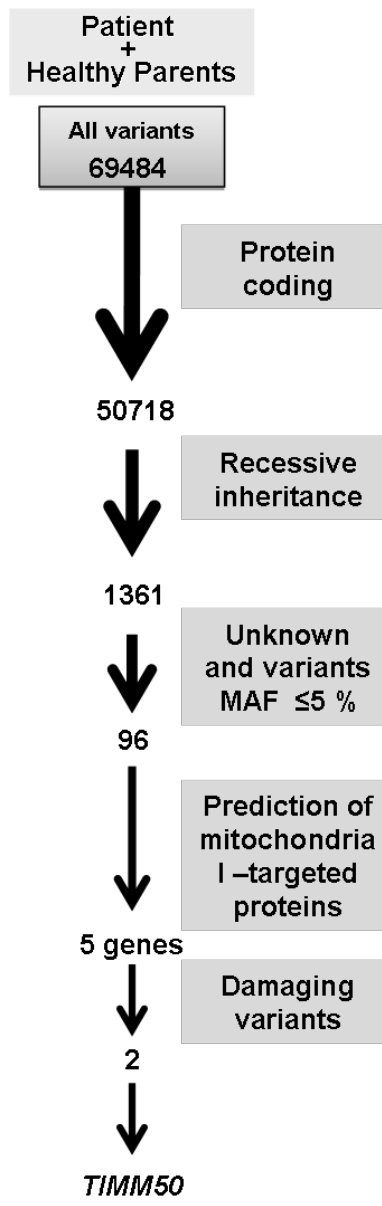
TIMM50 WT protein
MAASA AVFSRLR SGLR LGSRL CTRLAT PPRRAPDQAAE IESRGSTKA QGPQQ PGSEGPS YAKKVALW LAGLLGAGGTVSVV
YIFGNNPVDENGAKIPDEFDNDPILV

TIMM50 CRISPR/Cas9 edited
MAASA AVFSRLR SGLR LGSRL CTRLAT PPRRAPDQAAE IESRGSTMASTTAAAGR RDQEPQKR SGLLGCWSWWE LSTOP

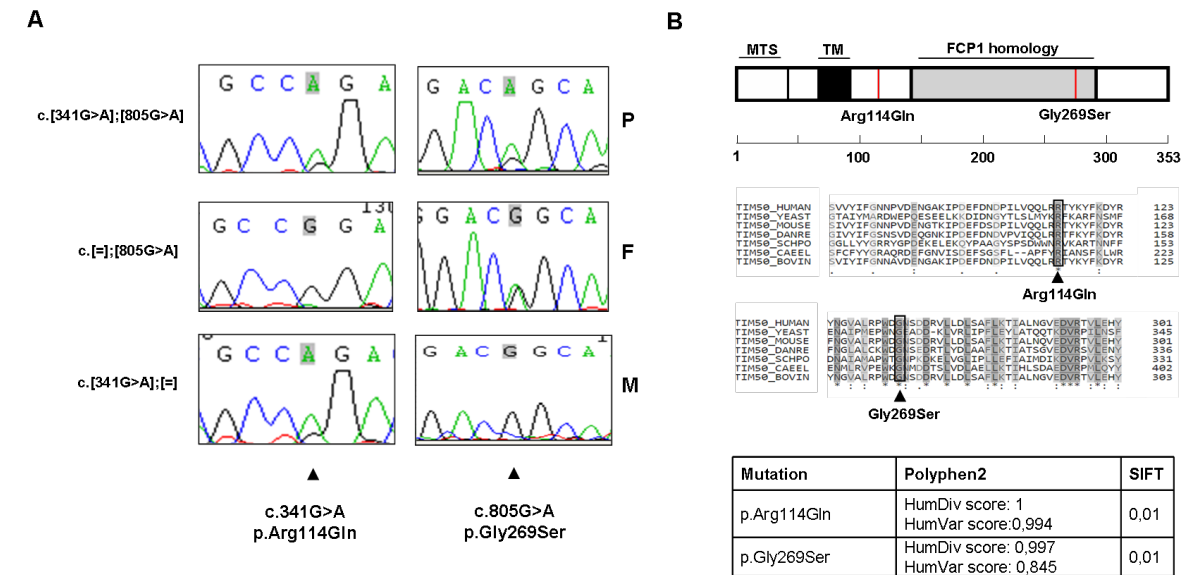
```

Supp. Figure S2. Sequence alignment comparison of the Homo Sapiens RefSeq of TIMM50 and the TIMM50 sequence in HEK293 cells after CRISPR/Cas9 gene editing.

(A) Outlined grey box sequences correspond to exon 2. Guide RNAs sequences used for CRISPR/Cas9 targeting are indicated in green (sg1), orange (sg2) and blue (sg3). (B) The mutations generated by CRISPR/Cas9 produce a frameshift leading to protein with a predicted premature termination codon at residue 80. Outlined grey box sequences correspond to aminoacids codified by *TIMM50* exon 2.

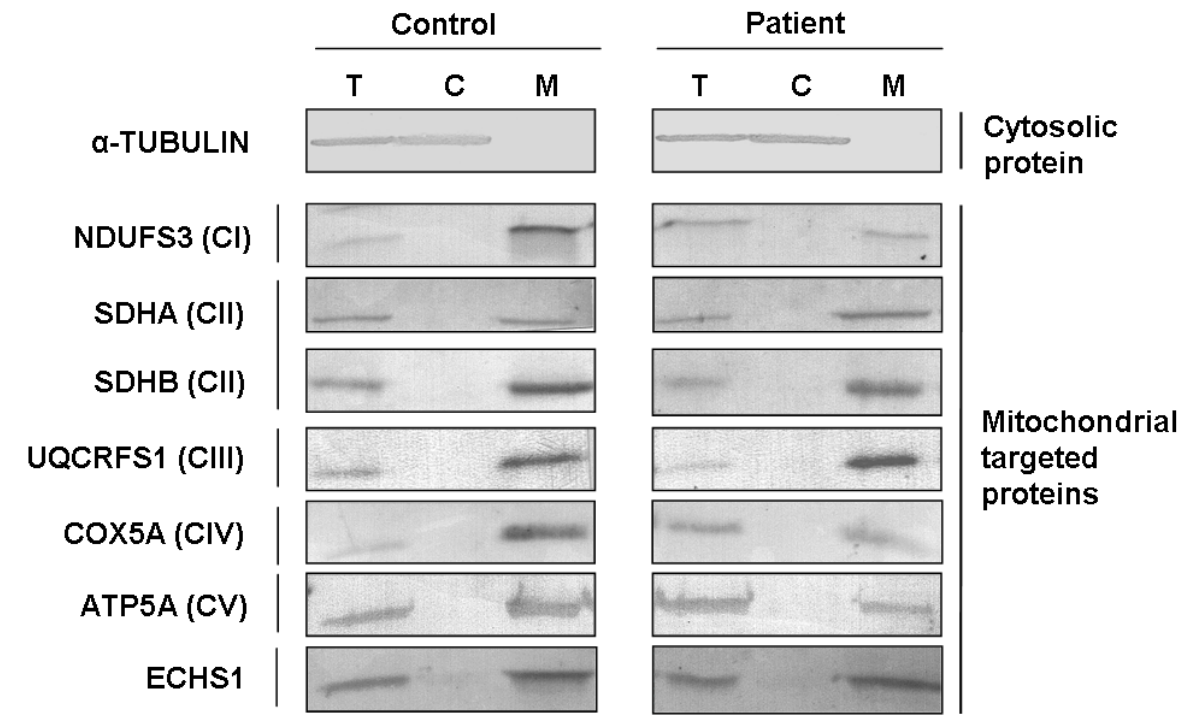


Supp. Figure S3. Identification of *TIMM50* mutations. Exome data analysis and filtering steps leading to the identification of mutations in *TIMM50* as a putative genetic cause of the disease. We filtered for genes containing variants found to be heterozygous in the healthy parents, and homozygous in the index case or for genes with two heterozygous variants that segregated separately in the parents. As 3-methylglutaconic acid excretion (observed in the patient) is a biomarker of mitochondrial dysfunction, we also prioritized for genes encoding for proteins with a strong support of mitochondrial localization. MAF, minor allele frequency.

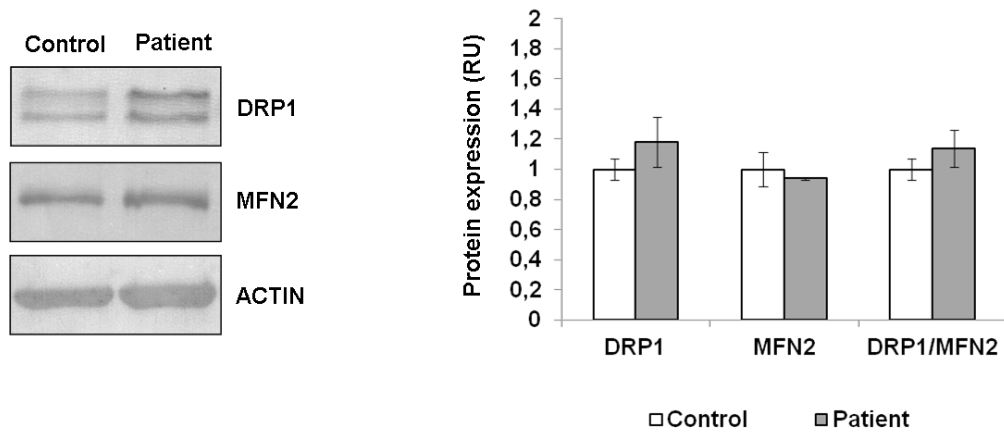


Supp. Figure S4. Compound heterozygous mutations in TIMM50 patient.

(A) Mutations were verified by Sanger sequencing. Father (F) was heterozygous for c.805G>A and mother (M) heterozygous for c.341G>A, confirming the compound heterozygosity status of the patient (P). *TIMM50* GenBank NM_001001563.5. Nucleotide numbering is relative to cDNA numbering, whereby +1 is the A in the ATG of the start codon. (B) Both mutations (p.Arg114Gln and p.Gly269Ser) affect highly evolutionarily conserved residues of the protein. *In silico* predictions of pathogenicity (Polyphen2 and SIFT) are also shown. The PolyPhen-2 score ranges from 0.0 (tolerated) to 1.0 (deleterious). For the SIFT score, the amino acid substitution is predicted to be damaging if the score is ≤ 0.05 , and tolerated if the score is > 0.05 . MTS, mitochondrial-targeting signal; TM, transmembrane domain.



Supp. Figure S5. Sublocalization analysis of mitochondria-targeted proteins. Cell fractionation analysis showed no misslocalization of any of the analyzed mitochondrial markers in TIMM50 patient cells. Tubulin was used as cytosolic marker to corroborate that the fractionation was correctly performed. T, total lysate; C, cytosolic fraction; M, mitochondrial fraction.



Supp. Figure S6. Western blot for DRP1 (involved in fission) and MFN2 (involved in fusion) showed that the expression of these proteins was not significantly altered in *TIMM50*-mutated patient cells. β -actin was used as loading control.

Supp. Table S1. Oligonucleotides used in this study

qPCR	OLIGONUCLEOTIDE	SEQUENCE
TIMM50	Forward	5'-GGGACTGTGAGCGTCGTCTA-3'
	Reverse	5'-ATCTTGGCACCATTTTCGTC-3'
GAPDH	Forward	5'-ACCCACTCCTCCACCTTTGA-3'
	Reverse	5'-TGTTGCTGTAGCCAAATTCGTT-3'
CRISPR/Cas9	OLIGONUCLEOTIDE	SEQUENCE
	sg1	5'- CGCGGGAGCACTAAGGCGCA-3'
	sg2	5'-ATGCCAAAAAAGTTGCGCTC-3'
	sg3	5'-CCGCAGAGATCGGGAGCCGC-3'

Supp. Table S2. Antibodies used in this study

Protein	Reference	Manufacturer
NDUFA9	459100	ThermoScientific, USA
SDHA	MS204	MitoSciences, USA
SDHB	MS203	MitoSciences, USA
UQCRC2	ab14745	Abcam, UK
UQCRFS1	ab14746	Abcam, UK
COX5A	ab110262	Abcam, UK
ATP5A	ab14748	Abcam, UK
NDUFS3	ab14711	Abcam, UK
α -TUBULIN	ab176560	Abcam, UK
GAPDH	sc-47724	Santa Cruz Biotechnology, USA
TIMM50	ab109527	Abcam, UK
DRP1	sc-271583	Santa Cruz Biotechnology, USA
MFN2	ab56889	Abcam, UK
MTCO1	ab14705	Abcam, UK
COX4L	ab110261	Abcam, UK
NDUFS2	sc-390596	Santa Cruz Biotechnology, USA

ARTÍCULO 2

Título: Physiopathological Bases of the Disease Caused by *HACE1* Mutations: Alterations in Autophagy, Mitophagy and Oxidative Stress Response.

Autores: Ugarteburu O, Sánchez-Vilés M, Ramos J, Barcos-Rodríguez T, Garrabou G, García-Villoria J, Ribes A, Tort F.

Revista: J ClinMed. 2020 Mar; 9(4):913. **Factor de impacto:** 3.303 (Q1: Medicine, general & internal)

Defectos en el gen *HACE1* se han asociado con patología severa del neurodesarrollo (OMIM: 616756). Sin embargo, las bases fisiopatológicas de la enfermedad no se conocen en detalle. Mediante la secuenciación del exoma celular se identificaron mutaciones en homocigosis en el gen *HACE1* (c. 240C>A, p.Cys80Ter) en un paciente con atrofia cerebral, retraso psicomotor y aciduria 3-metilglutacónica (3-MG), un biomarcador de disfunción mitocondrial. Con el fin de investigar los mecanismos patológicos subyacentes en la deficiencia de *HACE1*, realizamos un análisis molecular exhaustivo en fibroblastos del paciente. El estudio de Western blot demostró el efecto deletéreo de la mutación, ya que el paciente tenía una ausencia total de proteína *HACE1*. Los estudios de inmunofluorescencia mostraron niveles aumentados de partículas LC3 en el paciente, que junto con una iniciación normal de la cascada autofágica, sugerían una reducción del flujo autofágico. La respuesta al estrés oxidativo en fibroblastos también estaba alterada, ya que se observaron niveles disminuidos del mRNA de *NQO1* y *Hmox1* respecto al control en células tratadas con H₂O₂. También se detectaron niveles elevados de peroxidación lipídica compatibles con el acúmulo de daño oxidativo. Aunque el fenotipo del paciente era similar al de una enfermedad mitocondrial, el estudio de la función mitocondrial no mostró alteraciones severas. Sin embargo, se observó un acúmulo de marcadores de estrés oxidativo y una disminución del flujo mitofágico, indicando que la proteína *HACE1* podría estar involucrada en el proceso de reciclaje de las mitocondrias dañadas. En resumen, demostramos por primera vez que defectos en el proceso de autofagia, mitofagia y respuesta al daño oxidativo podrían estar implicados en la fisiopatología de la deficiencia de *HACE1*.



Article

Physiopathological Bases of the Disease Caused by *HACE1* Mutations: Alterations in Autophagy, Mitophagy and Oxidative Stress Response

Olatz Ugarteburu ¹, Marta Sánchez-Vilés ¹, Julio Ramos ², Tamara Barcos-Rodríguez ³, Gloria Garrabou ³, Judit García-Villoria ¹, Antonia Ribes ^{1,*} and Frederic Tort ^{1,*}

¹ Section of Inborn Errors of Metabolism-IBC, Department of Biochemistry and Molecular Genetics, Hospital Clínic, IDIBAPS, CIBERER, 08028 Barcelona, Spain; ugarteburu@clinic.cat (O.U.); msanchezviles@gmail.com (M.S.-V.); JUGARCIA@clinic.cat (J.G.-V.)

² Hospital of Torrecardenas, 04009 Almeria, Spain; jramoslizana2@gmail.com

³ Muscle Research and Mitochondrial Function Laboratory, Cellex-IDIBAPS, Faculty of Medicine and Health Science-University of Barcelona, Internal Medicine Service-Hospital Clínic of Barcelona, CIBERER, 08036 Barcelona, Spain; BARCOS@clinic.cat (T.B.-R.); garrabou@clinic.cat (G.G.)

* Correspondence: aribes@clinic.cat (A.R.); ffort@ciberer.es (F.T.)

Received: 28 February 2020; Accepted: 24 March 2020; Published: 26 March 2020



Abstract: Recessive *HACE1* mutations are associated with a severe neurodevelopmental disorder (OMIM: 616756). However, the physiopathological bases of the disease are yet to be completely clarified. Whole-exome sequencing identified homozygous *HACE1* mutations (c.240C>A, p.Cys80Ter) in a patient with brain atrophy, psychomotor retardation and 3-methylglutaconic aciduria, a biomarker of mitochondrial dysfunction. To elucidate the pathomechanisms underlying *HACE1* deficiency, a comprehensive molecular analysis was performed in patient fibroblasts. Western Blot demonstrated the deleterious effect of the mutation, as the complete absence of *HACE1* protein was observed. Immunofluorescence studies showed an increased number of LC3 puncta together with the normal initiation of the autophagic cascade, indicating a reduction in the autophagic flux. Oxidative stress response was also impaired in *HACE1* fibroblasts, as shown by the reduced *NQO1* and *Hmox1* mRNA levels observed in H₂O₂-treated cells. High levels of lipid peroxidation, consistent with accumulated oxidative damage, were also detected. Although the patient phenotype could resemble a mitochondrial defect, the analysis of the mitochondrial function showed no major abnormalities. However, an important increase in mitochondrial oxidative stress markers and a strong reduction in the mitophagic flux were observed, suggesting that the recycling of damaged mitochondria might be targeted in *HACE1* cells. In summary, we demonstrate for the first time that the impairment of autophagy, mitophagy and oxidative damage response might be involved in the pathogenesis of *HACE1* deficiency.

Keywords: *HACE1*; genetic disorder; autophagy; mitophagy; mitochondria; 3-methylglutaconic; oxidative stress

1. Introduction

HACE1 (MIM#610876) encodes for a HECT domain and ankyrin repeat-containing ubiquitin ligase which is reported to be involved in tagging specific target proteins for subcellular localization or for degradation [1]. In addition, this protein is a potential tumor suppressor, as it has been shown to be downregulated in many human tumors [2,3]. In addition, studies performed in cellular and mouse models demonstrated that *HACE1* is potentially involved in other physiological processes, including the regulation of the response to oxidative stress [4–6] and autophagy [7,8].

Recessive mutations in *HACE1* causing loss-of-function have been associated to a severe genetic neurodevelopmental disorder classified as spastic paraplegia and psychomotor retardation with or without seizures (SPPRS) (OMIM: 616756) [9]. Affected individuals presented, in the first months of life or infancy, with a variety of clinical symptoms, including delayed psychomotor development, intellectual disability, epilepsy, hypotonia, spasticity, ataxia, and poor speech skills. Brain abnormalities are also present in some patients and include hypoplastic corpus callosum, cerebral atrophy, delayed myelination and reduced white matter content. Although mutations in *HACE1* have been reported in 18 patients from eight unrelated families, the molecular mechanism underlying the pathogenesis of the disease has not been well determined [10–13]. In fact, a very recent manuscript reported the unique evidence to date about the pathogenic mechanisms underlying this disorder [13]. This research showed that elevated levels of the Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 protein (RAC1), a well-known target of *HACE1*, were found in *HACE1*-knockout mice as well as in patient cells, hypothesizing that altered RAC1 signalling might contribute to the pathogenesis of the disorder [13,14]. The role of RAC1 in the physiopathology of *HACE1* deficiency is supported by the fact that this protein is involved in brain development and in the regulation of reactive oxygen species (ROS) levels [6,15–17]. However, the fact that *HACE1* has multiple substrates which participate in different fundamental biological processes suggest that mechanisms other than RAC1 upregulation may also be to blame for this disorder [18].

Here, we present a detailed study that provides further insight into elucidating the potential pathomechanisms underlying *HACE1* deficiency. We report a patient carrying *HACE1* mutations presenting with psychomotor retardation, brain atrophy and high urinary excretion of 3-methylglutaconic acid (3-MGA), a well-established biomarker of mitochondrial dysfunction [19]. Molecular studies revealed a severe defect in the regulation of the autophagic flux and a diminished ability to respond to oxidative damage in *HACE1* patient cells. The patient phenotype could resemble a mitochondrial defect and the analysis of the mitochondrial function showed altered mitochondrial morphology and a partial disassembly of the oxidative phosphorylation (OXPHOS) system. Notably, an important increase in mitochondrial oxidative stress and a strong reduction in the mitophagic flux were demonstrated, suggesting that the recycling of damaged mitochondria might be targeted in these cells. Altogether, our results demonstrated that *HACE1* mutations lead to a severe neurodevelopmental disorder by targeting key physiological processes such as autophagy, mitophagy and the ability to properly respond to oxidative damage.

2. Experimental Section

2.1. Case Report

We present the third child of healthy non-consanguineous parents of Pakistani origin. Pregnancy and delivery were uneventful; the birth weight was 3500 g. During the first months of life, the patient presented general psychomotor retardation without signs of regression. At the age of four years, he achieved sedestation, but, currently, at 10 years of age, he is still not able to walk independently. He has severe intellectual disability with greater impairment in the area of language. He displays good connections with people by employing gestures to make him understood, although he only uses familiar names and understands simple orders. Physical examination revealed paresis of the lower extremities with rigidity and exalted osteotendinous reflexes with no other remarkable findings. A brain magnetic resonance imaging (MRI) showed diffuse cortical atrophy and an arachnoid cyst in the right temporal lobe. Routine biochemical analyses were normal, including amino acids and acylcarnitines. The urinary organic acid profile showed persistently elevated levels of 3-methylglutaconic and 3-methylglutaric acids, a biomarker associated to several mitochondrial diseases.

2.2. Whole Exome Sequencing

Trio-exome enrichment and sequencing was performed in the Wellcome Trust Sanger Institute. Analysis of the primary data was done in the Centre Nacional d'Anàlisi Genòmica (CNAG) using the RD-Connect Genome-Phenome Analysis Platform (GPAP) standardised analysis pipeline [20]. The variant calls were analyzed using the RD-Connect GPAP (<https://platform.rd-connect.eu/>).

2.3. Cell Culture

Human skin fibroblasts obtained from healthy donors and from a patient with mutations in *HACE1* were maintained in minimum essential medium (MEM) (1 g/L glucose, 10% fetal calf serum and 1% penicillin-streptomycin). Cells were grown to confluence in 25 cm² flasks, harvested by trypsinization and pelleted by centrifugation or reseed.

2.4. Protein Expression Analysis

Cell pellets obtained from cultured fibroblasts were homogenized with RIPA buffer (SDS 0.1%, NP40 1%, Sodium deoxycholate 0.5% in PBS) containing protease inhibitors (cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail 4693159001, Roche, Indianapolis, IN, USA). Cell lysates were subjected to SDS-PAGE and electroblotted. Proteins were visualized by immunostaining with specific antibodies (Table S1) followed by colorimetric detection (1708235 Opti-4CNTM Substrate Kit, Bio-Rad, Hercules, California, USA). ImageJ software was used for densitometry analysis of protein expression.

Subcellular fractionation was performed in order to obtain total, cytoplasmatic and organelle-enriched fractions. Cells were permeabilized with Lysis Buffer (5 mM Tris/HCl pH 7.4, 250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM PMSF) containing 0.01% digitonin and centrifuged at 15000× *g* for 10 min at 4 °C. Supernatants (cytoplasmatic fraction) and pellets (membranous fraction) were recovered and subjected to further analysis.

2.5. Blue Native-PAGE Analysis of Mitochondrial Complex and Supercomplex Assembly

Mitochondria-enriched pellets were obtained as described [21]. In order to extract mitochondrial respiratory chain complexes, cells were homogenized with 1% *n*-dodecyl β-D-maltoside. For supercomplex analysis, cells were solubilized with digitonin, a weaker detergent that maintains the interactions between complexes. Lysates were electrophoresed in 4–15% polyacrylamide gradient gels, immunoblotted with specific antibodies against representative subunits of the mitochondrial respiratory chain complexes I–V (Table S1) and visualized by colorimetric detection (1708235 Opti-4CN™ Substrate Kit, Bio-Rad).

2.6. High-Resolution Respirometry

Oxygen consumption of control and *HACE1* patient fibroblasts was analyzed by high resolution respirometry using polarographic oxygen sensors in a two-chamber Oxygraph-2k system according to manufacturer's instructions (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria). Cells were trypsinised and resuspended in MiR05 mitochondrial respiration medium (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria). OXPHOS inhibitors (oligomycin, 04876-5MG, Sigma, St. Louis, MI, USA), antimycin, A8674-25MG, Sigma, St. Louis, MI, USA) and uncoupler carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP, C2759, Sigma, St. Louis, MI, USA) were manually titrated using Hamilton syringes (Hamilton Company, Reno, NV, USA) as previously described [22]. The concentrations used were 1 µg/mL of oligomycin, stepwise 1 µM titration of CCCP and 2.5 µM of antimycin A. The data were recorded using the DatLab software v7.1.0.21 (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria).

2.7. Mitochondrial Network and Mitochondria Morphology Analysis

The mitochondrial morphology and mitochondrial network were analysed by immunofluorescence followed by confocal microscopy. Cells were grown on glass coverslips, fixed with 4% paraformaldehyde and the reaction was stopped using NH₄Cl. Fibroblasts were permeabilized with 0.1% TritonX-100 and

mitochondria were stained using anti-TOM20 antibody (Table S1), which recognises a mitochondrial membrane protein. Coverslips were mounted with Mowiol 4-88 Mounting Medium (81381 Sigma-Aldrich, Sant Luis, MI, USA) and images were obtained using a Leica TCS SL laser scanning confocal spectral microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Analysis was performed using ImageJ software [23]. Mitochondrial length, the ratio between mitochondria length and width (aspect ratio, AR) and the degree of mitochondrial network branching (form factor, FF) were calculated.

2.8. Analysis of Autophagy and Mitophagy in Fibroblasts

We assessed autophagy by analyzing LC3 protein by immunofluorescence and confocal microscopy. Briefly, cells were grown on glass coverslips and fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilized using digitonin 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. In order to stain autophagosomes, a primary antibody anti-LC3 (Table S1) was used. After mounting coverslips with Mowiol 4-88 Mounting Medium (81381, Sigma-Aldrich, USA), images were obtained by Leica TCS SL laser scanning confocal spectral microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Image analysis was done using ImageJ software and the average number of LC3-II puncta (corresponding to autophagosomal LC-II form) was quantified. In order to analyse the autophagic flux, LC3 puncta was analyzed in the presence and in the absence of 24 h EP (E64D-pepstatin A) treatment, two inhibitors of lysosomal hydrolases (10 μM E64D (E8640, Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA) and 10 μM Pepstatin A (77170, Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA)). Autophagic flux was determined as the relative increase in LC3-II puncta upon EP treatment compared to those observed at the basal state.

Mitophagy was assessed by analyzing the colocalization between mitochondrial and LC3 areas, as described [24]. Coverslips were prepared as described above. In this case, we determined the colocalization areas using primary antibodies (Table S1) against LC3, staining autophagosomes, and TOM20, staining the mitochondria. Mitophagy was calculated as the LC3-II/TOM20 colocalization area related to the total mitochondrial area. To monitor the mitophagic flux, the ratio between mitophagy upon EP treatment and without treatment was analysed. We measured the relative increase in LC3-II/TOM20 colocalization areas upon 24 h of EP treatment compared to those detected in the basal state.

To analyze autophagy induction, cells were subjected to nutrient starvation conditions by exchanging the culture medium for Hank's Balanced Salt solution (HBSS, 14170-088, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) during 2 h. Autophagosome formation was assessed as mentioned above. The nuclear translocation of the transcription factor EB TFEB (Table S1) was determined by immunofluorescence as described [25]. Images were obtained using Eclipse 50 equipment (Nikon instruments Inc., Melville, NY, USA) and the percentage of cells with nuclear TFEB was quantified for each condition.

2.9. mRNA Expression Analysis

Total RNA extraction was performed using QIAshredder and RNeasy kits (74104 Qiagen, Hilden, Germany). We synthesized single-stranded complementary DNA (cDNA) using oligodT primers (C1101 Promega, Madison, WI, USA) and M-MLV Reverse Transcriptase, RNase H Minus, Point Mutant (M368A Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's protocols. The levels of mRNA expression were analysed by quantitative PCR using specific primers (Table S2). PCR was performed using SYBR Green reagent (4472908, Life Technologies Ltd, Renfrew, UK) in a Step One plus quantitative PCR system (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). In order to study the genes that are upregulated under oxidative stress conditions, cells were treated with H_2O_2 (hydrogen peroxide solution H1009, Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA).

2.10. Analysis of Mitochondrial Superoxide Levels

Mitochondrial superoxide levels were measured by MitoSOXRed probe (M36008, Invitrogene, Waltham, MA, USA). Fibroblasts were seeded at 80% confluence. Experiments were performed

following manufacturer's indications, incubating cells with 5 μ M MitoSOXRed for 10 min at 37 °C. MitoSOXRed containing the medium was removed and cells were rinsed with Hank's Balanced Salt Solution with calcium and magnesium (HBSS/Ca/Mg, 14025-092, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Fibroblasts were trypsinised and resuspended in HBSS/Ca/Mg. Fluorescence intensity was analysed by flow cytometry (BD FACS CANTOTM II). Results are shown as the fold increase in the average fluorescence intensity of each sample related to the controls.

2.11. Lipid Peroxidation Analysis

Lipid peroxidation levels were quantified using the BIOXYTECH® LPO-586™ colorimetric assay (Oxys International Inc., Beverly Hills, CA, USA). Specifically, the levels of malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxyalkenal (HAE), which are products of fatty acid peroxide decomposition, were analysed by spectrophotometry. Results are expressed as (μ M MDA + HAE)/mg protein.

2.12. Statistics

Statistical analyses were performed using the two-tailed Student's *t* test to compare the means of two independent groups of normally distributed data. The data were reported as the mean \pm S.E.E. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Identification of Mutations in HACE1

The clinical and biochemical phenotype of the patient reported here, in particular the persistently high levels of 3-MGA in urine, set up a strong suspicion of a mitochondrial energy metabolism disorder. However, mutations in all genes previously associated to 3-MGA-uria were ruled out using a self-designed customized gene panel (Haloplex, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). In order to elucidate the genetic cause of the disease, we performed whole-exome sequencing of the index case and his healthy parents. Genetic variants were filtered and prioritized as summarized in Figure S1. Data analysis revealed homozygous mutations in *HACE1* (NM_020771.4). The identified mutation (c.240C>A) is predicted to change the cysteine at position 80 of the protein for a translation termination codon (p.Cys80Ter), leading to a potentially truncated protein. Segregation was confirmed by the carrier status of both parents. *HACE1* encodes for a HECT domain and ankyrin repeat-containing E3 ubiquitin ligase 1 protein, involved in tagging specific target proteins for subcellular localization or for degradation [1].

3.2. HACE1 Protein Expression Is Absent in Patient Fibroblasts

To demonstrate the effect of the *HACE1* mutations on the encoded protein, a Western Blot analysis was performed. Results showed almost undetectable levels of HACE1 protein in patient fibroblasts, in contrast to the abundant protein expression levels observed in control individuals (Figure 1A). These results support the predicted disruptive effect of the mutation identified in our patient.

3.3. HACE1 Protein Is Mainly Expressed in Brain and Predominantly Localized in the Cytosolic Fraction

To investigate the physiological behavior of HACE1, we studied protein expression in a series of human control tissues (total brain extracts, cortex (grey matter), periventricular (white matter), muscle, heart, kidney, spleen and liver). Results showed that HACE1 was predominantly expressed in brain tissues. Kidneys showed intermediate levels, whereas muscle, liver and spleen showed the lowest levels (Figure 1B). As the patient phenotype was compatible with a mitochondrial disease, we performed a fractionation analysis to determine the subcellular localization of HACE1 in control fibroblasts and evaluate whether HACE1 could be associated to mitochondria. The results demonstrated that HACE1 protein is mainly located in the cytosolic fraction (Figure 1C).

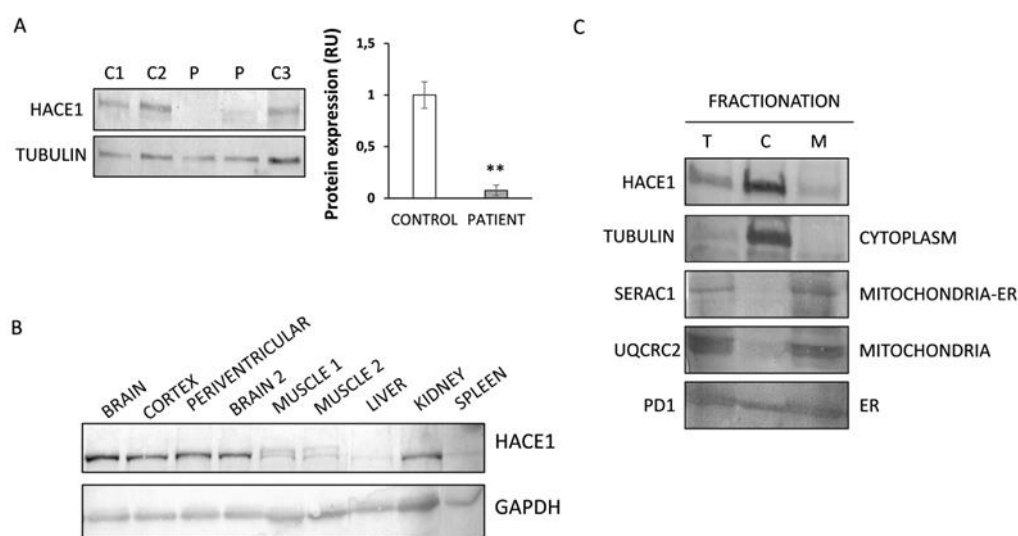


Figure 1. HACE1 protein expression analysis in patient fibroblasts and human tissues. **(A)** Western Blot analysis showed almost absent expression of HACE1 in patient fibroblasts. Extracts from several controls (C1: control 1; C2: control 2 and C3: control 3) and two different extracts from the patient were analysed. Tubulin was used as the loading control. $** p < 0.01$. **(B)** Protein expression analysis in human control tissues showed a predominant HACE1 expression in brain samples. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as the loading control. **(C)** Fractionation studies performed in control fibroblasts showed that HACE1 is mainly localized in the cytoplasmic fraction. Protein markers of different organelles (mitochondria, endoplasmic reticulum (ER) and cytoplasm) were studied in order to corroborate proper fractionation. The ER marker (PDI) showed a cytosolic leakage, a phenomenon already observed for this marker [26–28]. T: total extract; C: cytoplasmic extract; M: membranous organelle-enriched fraction extract.

3.4. Mitochondrial Function Characterization in HACE1 Patient Fibroblasts

As the HACE1 patient reported here has a biochemical phenotype suggestive of a mitochondrial disorder, we performed an exhaustive characterization of the mitochondrial function.

First, mitochondrial morphology and network branching were analysed by confocal microscopy. Results demonstrated a slight but statistically significant decrease in the parameters aspect ratio (AR) (indicative of morphology) and form factor (FF) (indicative of network branching) in HACE1 cells ($p < 0.05$). In addition, a significant reduction in the mitochondrial length was also observed in patient cells. These results suggest the presence of rounder and shorter mitochondria, as well as reduced network branching degree in HACE1 fibroblasts compared to controls (Figure 2A).

We next assessed the impact of HACE1 deficiency in the OXPHOS system and mitochondrial respiratory capacity. The Blue Native PAGE analysis revealed a generalized decrease in fully assembled individual OXPHOS complexes in HACE1 patient cells (Figure 2B). Similar mitochondrial content was observed in patient and control cells, as demonstrated by the expression levels of TIM50 (mitochondrial membrane protein) and ECHS1 (mitochondrial matrix protein) (Figure 2B, Figure S2). However, these defects had no impact in the assembly of the respirasome, since the levels of OXPHOS supercomplexes were not altered (Figure 2C). We then analysed the mitochondrial respiratory capacity by measuring the oxygen consumption rate (OCR) using high-resolution respirometry. Results showed no significant differences either in the basal respiratory rate or in the maximal respiratory capacity induced upon CCCP stimulation (Figure 2D, Figure S3). Unfortunately, due to material limitation and poor cell growth, a respirometry analysis to determine specific OXPHOS complex deficiencies could not be assessed.

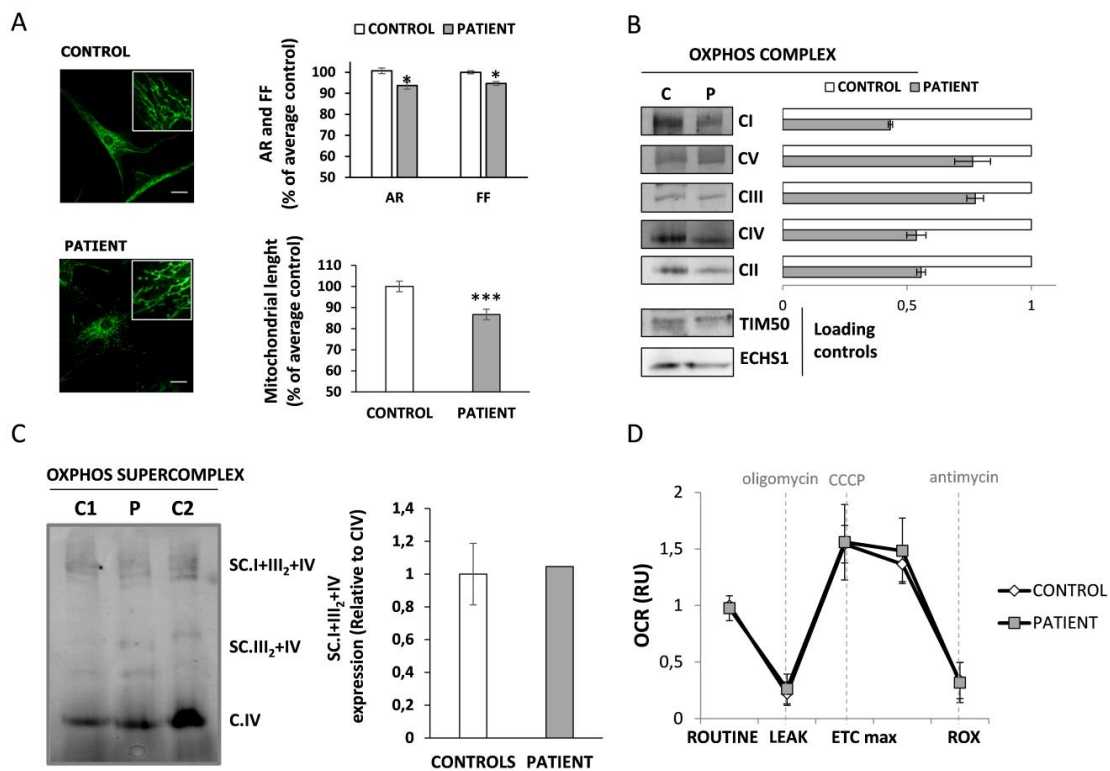


Figure 2. Mitochondrial function in HACE1 fibroblast. (A) Mitochondria morphology analysis was performed by immunofluorescence using TOM20 antibody as mitochondrial marker. Results showed a significant reduction in AR (Aspect ratio, indicative of morphology) and FF (Form factor, indicative of mitochondrial network branching) in patient fibroblasts. A significant reduction in the mitochondrial length was also observed in patient cells. A minimum of 70 cells were analysed for each sample. Scale bar, 30 μ m. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. (B) Blue Native-PAGE studies and densitometry analysis of OXPPOS complexes showed a partial reduction in the assembly of all complexes in HACE1 patient fibroblasts. The expression of TIM50 (a mitochondrial membrane protein) and ECHS1 (a mitochondrial matrix protein) were used as mitochondrial loading controls. (C) Blue Native-PAGE studies followed by densitometry analysis showed no alterations in the assembly of mitochondrial respiratory chain supercomplexes in HACE1 fibroblasts. (D) High resolution respirometry analysis showed no differences in the oxygen consumption rate between HACE1 and the control cells. Oxygen consumption rate at basal state (ROUTINE); residual oxygen consumption after oligomycin treatment (LEAK); maximum oxygen consumption induced by carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) titration (ETCmax); residual oxygen consumption after antimycin A treatment (ROX). Oxygen consumption rate (OCR) was measured as pmol/(second * millions of cells). The data is expressed as relative units (RU) of control cells.

3.5. Autophagic Flux Is Altered in HACE1 Patient Fibroblasts

As HACE1 has been associated with the regulation of autophagy we have analyzed whether this process could be altered in HACE1 patient fibroblasts. Thus, we studied autophagy by immunofluorescence and confocal microscopy by measuring the average number of LC3 puncta per cell, indicative of autophagosomes harboring LC3-II (the lipidated and activated form of LC3). Results revealed that, in the basal state, HACE1 fibroblasts had a marked and significant increase in the number of LC3 puncta (four-fold, $p < 0.001$) compared to control cells (Figure 3A, left panel).

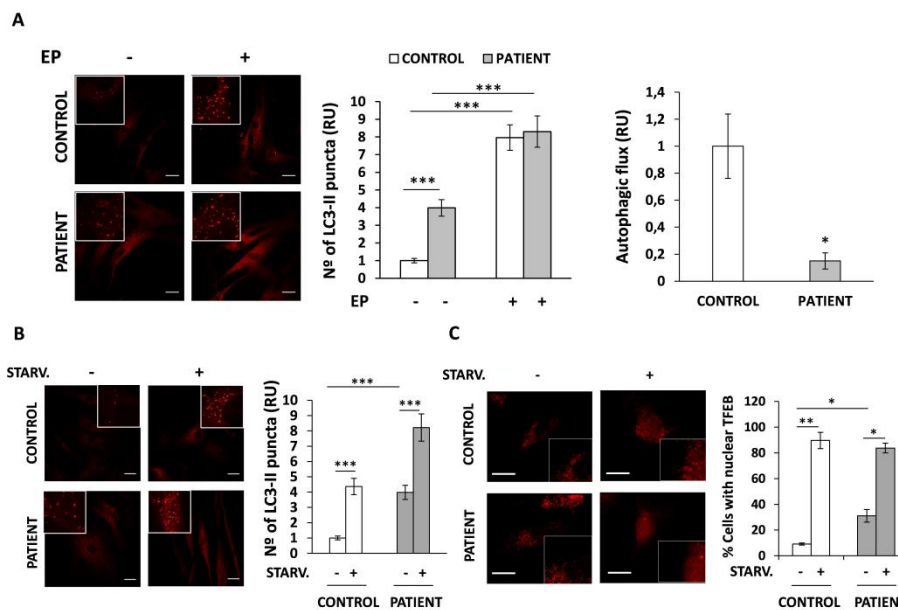


Figure 3. Autophagy analysis in HACE1 patient fibroblasts. Autophagy was measured by immunofluorescence measuring the average number of LC3 puncta per cell and the percentage of cells with TFEB translocated to the nucleus. (A) LC3 puncta was significantly increased in HACE1 fibroblasts compared to control cells. The autophagic flux, calculated as the relative increase in LC3puncta after 24 h of EP treatment compared to the basal levels observed in untreated cells, was importantly diminished in HACE1 fibroblasts. (B) Upon serum starvation treatment the number of LC3 puncta was increased in both, patient and control fibroblasts, indicating a normal activation of the autophagy. (C) The analysis of TFEB by immunofluorescence showed a massive translocation of TFEB to the nucleus after serum starvation treatment in both, control and HACE1 fibroblasts. In all cases a minimum of 70 cells were analysed. Scale bar, 30 μ m. Relative units (RU); E64D-Pepstatine A (EP); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

The fact that autophagy is a highly dynamic process made the rationale for the analysis of the autophagic flux in these cells, in addition to the above-mentioned determination of steady state LC3-II levels. Autophagic flux is defined as the process encompassing autophagosome formation to the delivery and degradation of autophagic substrates into the lysosome. To assess the autophagic flux, LC3 puncta was analyzed in the presence and in the absence of EP treatment, a strong inhibitor of the lysosomal hydrolases. This treatment blocks the degradation of autophagic substrates, including LC3-II, inside the autolysosome. Using this approach, we determined the amounts of LC3 particles which are delivered to lysosomes for degradation during EP treatment. As expected, our results showed that, upon EP treatment, the number of LC3-II puncta was significantly enhanced in both control and patient cells compared to their basal states ($p < 0.001$). Surprisingly, the fold increase in the number of LC3-II particles observed in HACE1 cells was lower (2.1-fold) than in control cells (7.9-fold), regardless of the higher levels observed at the basal state. Therefore, the autophagic flux, defined as the relative increase in LC3-II after EP treatment compared to the basal levels observed in untreated cells, was markedly reduced in HACE1 fibroblasts (Figure 3A, right panel).

To determine whether the alterations observed in HACE1 fibroblasts could rely on defects in the initial steps of the autophagic cascade, we monitored the formation of LC3-II puncta as well as the nuclear translocation of the transcription factor TFEB in cells treated with nutrient starvation, a well-known autophagy inducer. Results showed a significant increase ($p < 0.001$) in the levels of LC3-II in controls as well as in HACE1 cells upon nutrient deprivation, indicating a rapid induction of autophagy (Figure 3B). In addition, control and HACE1 fibroblasts showed a similar capacity to translocate TFEB to the nucleus, as observed by the massive percentage of cells (89.7% and 83.7%, respectively) harbouring nuclear TFEB in response to serum starvation (Figure 3C). Interestingly,

HACE1-mutated fibroblasts had an increased percentage of cells with nuclear TFEB at the basal state (31%) in comparison to that observed in controls (9.1%). Altogether, our results suggest that autophagy initiation, at least in response to nutrient deprivation stimuli, may not be significantly affected due to HACE1 mutations. Moreover, the basal mRNA expression levels of autophagy genes (*LC3*, *p62* and *Beclin1*) in patient cells were similar to those detected in controls (Figure S4).

3.6. Mitophagy Is Altered in HACE1 Fibroblasts

The suspicion of mitochondrial disorder together with the altered regulation of the autophagic flux detected in patient fibroblasts prompted us to analyze if mitophagy could also be affected in HACE1 cells. Therefore, we evaluated mitophagy by analyzing the colocalization area of the mitochondria (stained with an antibody against TOM20) and autophagosomes (stained with anti-LC3 antibody). Results demonstrated a significantly increased (2.2-fold, $p < 0.01$) mitochondria–autophagosome colocalization area in HACE1 fibroblasts, compared to controls (Figure 4, upper panel). To assess the mitophagic flux we analyzed the colocalization in cells grown with and without EP (an inhibitor of lysosomal degradation of the autophagosomal content). As expected, in control cells, the colocalization area was significantly enhanced upon EP treatment (4.2-fold, $p < 0.01$). In contrast, in HACE1 fibroblasts the effect of EP treatment was milder, resulting in a moderate increase (1.4-fold) of the colocalization respect to the basal situation (Figure 4, upper panel). The mitophagic flux was determined as the relative increase in the mitochondria–autophagosome colocalization area upon EP treatment compared to the basal colocalization. Results demonstrated that, in comparison to controls, the mitophagic flux was markedly reduced in HACE1 fibroblasts (Figure 4, lower panel).

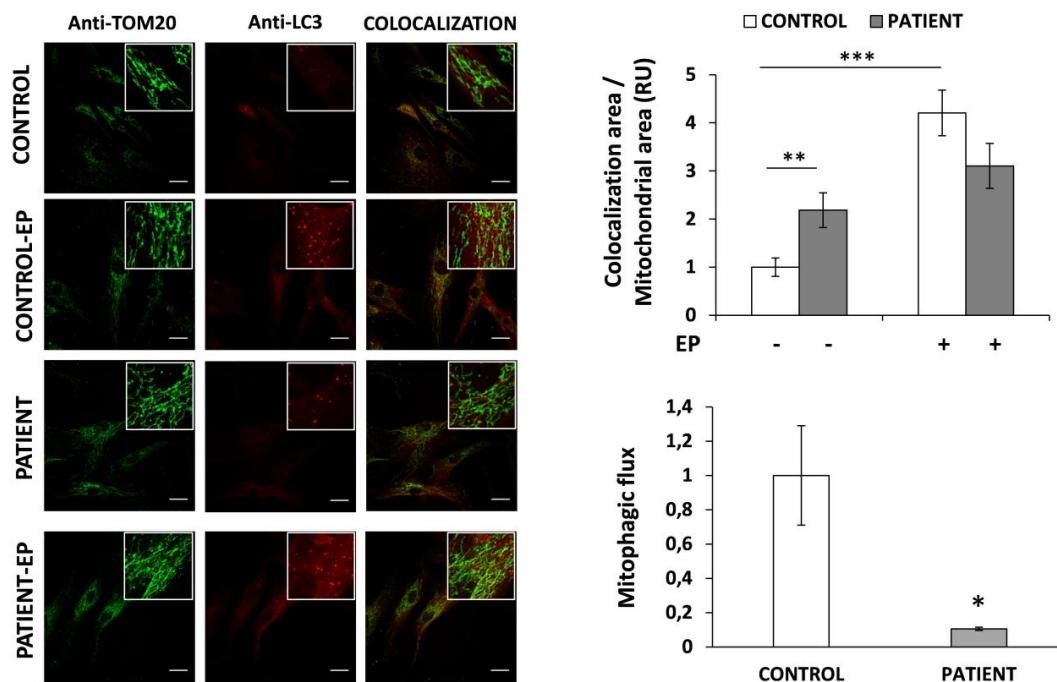


Figure 4. Mitophagy analysis in HACE1 patient fibroblasts. Mitophagy was assessed by immunofluorescence measuring the mitochondria–autophagosome colocalization. Mitochondria was stained with anti-TOM20 and autophagosomes with anti-LC3 antibody. Colocalization was significantly increased in HACE1 fibroblasts compared to control cells. The mitophagic flux, determined as the relative increase in the colocalization area observed after 24 h of EP treatment compared to the basal colocalization, was markedly reduced in HACE1 fibroblasts. In all conditions a minimum of 70 cells were analyzed. Scale bar, 30 μ m. Relative units (RU); E64D-Pepstatine A (EP); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.7. HACE1-Mutated Fibroblasts Accumulate Oxidative Damage and Have a Diminished Ability to Respond to Oxidative Stress

Cellular and animal models propose a role for HACE1 in oxidative stress response. To determine whether HACE1 deficiency could lead to oxidative damage, we analyzed lipid peroxidation in the HACE1 patient and control fibroblasts. Lipid peroxidation is one of the consequences derived from the accumulation of high levels of cellular ROS. Therefore, we studied the levels of malondialdehyde and 4-hydroxialkenal content and demonstrated a significant increase ($p < 0.05$) in both products in HACE1 mutant cells (Figure 5A). These results were indicative of accumulated cellular oxidative damage and raised the question whether the response to oxidative stress could also be impaired in HACE1 fibroblasts and, in consequence, involved in the physiopathology of the disease. To this effect, we analyzed the mRNA expression levels of *NQO1* and *HMOX1*, two well-known genes reported to be upregulated in response to oxidative stress. Interestingly, our results showed that the basal mRNA levels of both genes were significantly decreased in the patient's fibroblasts ($p < 0.01$). Furthermore, upon H_2O_2 -induced oxidative stress the induction of *NQO1* and *HMOX1* mRNA expression was also strongly diminished in HACE1-mutated cells (Figure 5B).

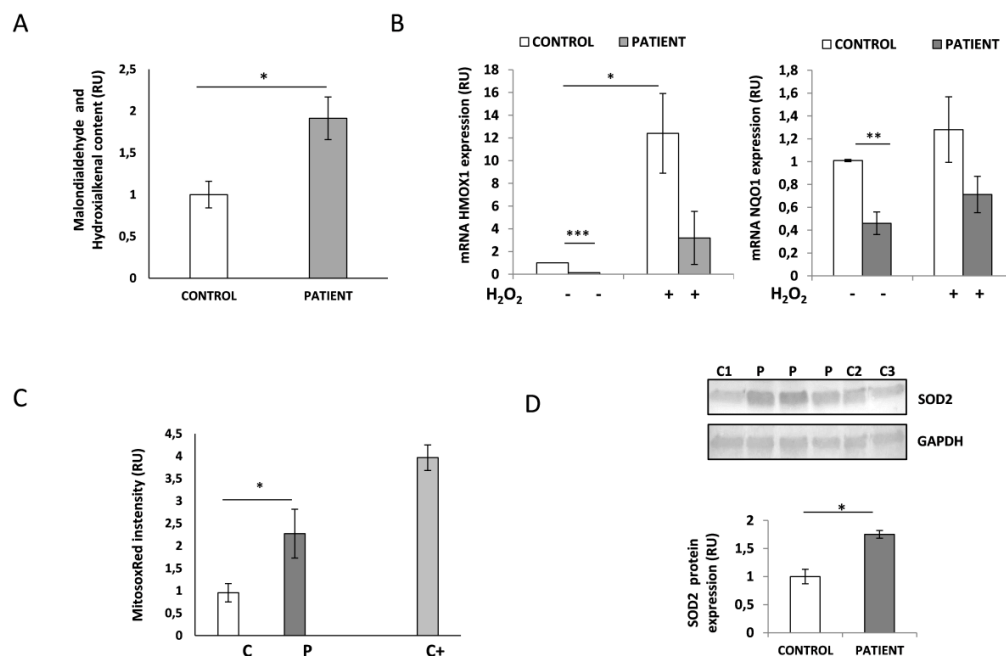


Figure 5. Analysis of oxidative stress in HACE1 patient fibroblasts. (A) The quantification of malondialdehyde and hydroxialkenal levels demonstrated higher levels of lipid peroxidation in HACE1 patient fibroblasts. P, patient; C1-C3, controls. * $p < 0.05$. (B) Quantitative PCR showed significantly decreased mRNA levels of *HMOX1* and *NQO1* at the basal state as well as upon oxidative stress induced by H_2O_2 in HACE1 patient. Experiments were performed in triplicate and results are expressed in relative units (RU). Peptidylprolyl isomerase A (*PPIA*) was used as an internal control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (C) Mitochondrial superoxide anion levels were analyzed by MitoSOXRed staining and flow cytometry. Increased levels of MitoSOXRed fluorescence intensity were detected in HACE1 patient fibroblasts. Cells treated with antimycin A were used as positive control. Results are expressed in relative units (RU). Patient (P); control (C); positive control (C+); * $p < 0.05$. (D) Western Blot analysis demonstrated higher levels of SOD2 protein expression in HACE1 patient fibroblasts. GAPDH was used as the loading control. Cell lysates from several controls (C) and four different extracts from the patient (P) were analyzed. * $p < 0.05$.

3.8. HACE1 Fibroblasts Had Increased Mitochondrial Oxidative Stress

In order to specifically analyze the presence of mitochondrial oxidative stress, we determined the levels of superoxide anion (the main mitochondrial ROS) in living cells by flow cytometry using a MitoSOXRed probe. Control fibroblasts treated with antimycin, which severely impairs mitochondrial respiratory chain activity and leads to ROS accumulation, were used as a positive control. As expected, antimycin treatment resulted in a significant increase (3.9-fold, $p < 0.001$) in MitoSOXRed intensity compared to untreated cells (Figure 5C). Interestingly, HACE1 fibroblasts showed a significant increase (2.2-fold, $p < 0.05$) in the basal levels of mitochondrial superoxide anion compared to the controls (Figure 5C). In addition, the levels of the mitochondrial antioxidant dismutase enzyme SOD2 analyzed by Western Blot were also increased in HACE1 fibroblasts ($p < 0.05$). Altogether, these results indicate enhanced mitochondrial oxidative stress in HACE1-mutated cells (Figure 5D).

4. Discussion

In the last decade, the implementation of next generation sequencing technologies has allowed the identification of an increasing number of disease-causing variants in genes associated to a wide variety of cellular processes [29]. However, the physiopathological bases of most rare genetic disorders are yet to be completely elucidated. Here, we report on a patient with psychomotor retardation, brain atrophy and 3-MGA-uria carrying a previously reported homozygous mutation (c.240C>A; p.Cys80Ter) in HACE1, which encodes for a HECT domain and ankyrin repeat-containing ubiquitin ligase protein [10]. The identified mutation was predicted to generate a premature termination codon at residue 80; therefore, the disruptive effect was demonstrated by Western Blot, as HACE1 protein expression levels were absent in patient fibroblasts. HACE1 plays an important role in tagging specific proteins for subcellular localization or proteasomal degradation [1] and, as confirmed here by Western Blot analysis, it is mainly expressed in brain tissues [13,30,31].

To date HACE1 bi-allelic mutations have been reported in eight unrelated families [10–13]. The clinical data of the previously described individuals do not differ from the phenotype of the patient reported here, but 3-MGA-uria has not been reported in any of the previous cases. Although the true origin of 3-MGA excretion is not well known, the presence of this metabolite in urine is considered a good biomarker of mitochondrial dysfunction; in particular, it has been associated to mutations in genes encoding for proteins related to the mitochondrial membrane [19,32]. Even though the patient phenotype could resemble a mitochondrial disorder, a subcellular fractionation analysis performed in control fibroblasts demonstrated that HACE1 mainly localizes in the cytosolic fraction. These results are concordant with previous observations made in NIH3T3 murine cells, which showed that HACE1 was barely expressed in the mitochondria but cofractionate with cytosolic and endoplasmic reticulum markers [30]. Since 3-MGA-uria is frequently associated to alterations of the mitochondrial morphology and the assembly of the OXPHOS system [19,32], we performed a detailed analysis of the mitochondrial function in HACE1 mutated cells. The results showed alterations in the mitochondrial morphology and a partial disassembly of the OXPHOS system. However, these alterations have no impact on the formation of the mitochondrial respiratory supercomplexes or in the cellular respiratory capacity.

Although mutations in HACE1 have already been reported, the physiopathological mechanisms underlying this disorder are not yet fully understood. To this regard, a very recent publication provided the first and, so far, most unique insight into the molecular consequences of HACE1 deficiency in human disease [13]. The authors demonstrated that RAC1, a well-known HACE1 target associated to brain development and regulation of intracellular ROS, is importantly upregulated in HACE1 patient cells. Indeed, ROS levels were also increased in these cells, pointing that altered RAC1 signalling might contribute to the pathogenesis of the disorder. However, it has been postulated that RAC1 upregulation would not explain the whole phenotypic spectrum of this disease, suggesting that other molecular pathways might also be involved [18]. Interestingly, several studies performed in different organisms and cellular models have implicated HACE1 in the regulation of other fundamental cellular processes, including autophagy [7,8], activation of antioxidant response and cell survival upon

oxidative damage [4,5]. In the present study, we wondered whether these pathways could also be impaired in *HACE1* patient fibroblasts and contribute to the pathophysiology of the disease.

Autophagy is an evolutionarily conserved process that recycles cellular components and organelles by targeting intracytoplasmic cargo to lysosomes for degradation [33–36]. In addition to lysosomes, the proper function of this process requires the formation of autophagosomes, highly specialized double-membraned organelles that enclose a portion of cytoplasmic material for further fusion and delivery to lysosomes. In the present study, we have analyzed autophagy by evaluating LC3 protein. LC3 is localized in the cytosol (LC3-I form) until it becomes activated and re-localized to the autophagosome membranes (LC3-II form). Autophagosomes can be detected and quantified by immunofluorescence as bright LC3 positive puncta [37]. Using this approach, we demonstrated a pronounced increase in LC3 puncta in patient fibroblasts when compared to control cells. These results indicate that, in the basal state, autophagosomes are abnormally accumulated in *HACE1* mutated cells. However, since autophagy is a dynamic process, the accumulation of LC3 particles can be promoted either by autophagy activation or by a blockade of downstream stages. In fact, the basal number of autophagosomes is the balance between the rate of autophagosome formation and the rate of autophagosome fusion with the lysosomes and the subsequent degradation of their content [34]. Interestingly, the mRNA levels of *LC3* as well as other autophagy regulators, such as *p62* and *Beclin 1*, were not increased in *HACE1* mutated cells. These observations suggested that the higher number of LC3 puncta observed in patient fibroblasts might be due to post transcriptional regulatory mechanisms rather than an induction of autophagy via the activation of mRNA transcription. Moreover, autophagy initiation seemed to be unaltered in *HACE1*-deficient cells since nutrient deprivation treatment, a well-known and potent autophagy inducer, provoked a massive nuclear translocation of TFEB and a rapid generation of autophagosomes in both patient and control fibroblasts [25,34]. We next measured the autophagic flux by analyzing the LC3-II turnover, treating the cells with EP, a strong inhibitor of the lysosomal hydrolases that allows autolysosome formation but blocks the degradation of the autolysosomal content [38]. We demonstrated that the autophagic flux, calculated as the relative increase in LC3-II levels observed upon EP treatment compared to those in the basal state, was strongly decreased in the *HACE1* patient's fibroblasts. Our results are consistent with the reported observations that showed an abnormal accumulation of LC3 protein in *HACE1*-knockout mice and also demonstrate that *HACE1* is involved in the late stages of the autophagosome maturation process [7]. These observations, along with the new data reported here, suggest that the reduced autophagic flux detected in the *HACE1* patient might be due to delayed completion of the autophagy pathway. Our results provide the first evidence of impaired autophagy in *HACE1* patients and propose the involvement of this mechanism in the pathophysiology of the disease.

Several studies performed in mice and cell models proposed a role for *HACE1* in the regulation of the oxidative stress response [4–6]. The principal consequence of a poor management of cellular redox disturbances is the increase in ROS levels, which react with and damage cellular components such as proteins, lipids and DNA [39–41]. Here, we demonstrated an abnormal accumulation of ROS-derived cellular damage in *HACE1* mutated fibroblasts, as seen by increased lipid peroxidation. In addition to *RAC1* regulation, *HACE1* is also involved in ROS detoxification by promoting the stability of the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2), a master regulator of the antioxidative response [4,5,42]. Under oxidative stress conditions NRF2 transcription factor translocates to the nucleus and induces the expression of a plethora of genes involved in the response to oxidative damage [43–45]. Indeed, it has been shown that, upon oxidative stress, the proper induction of NRF2 target genes is severely impaired in cells derived from *HACE1* knockout mice [4,5]. Notably, we demonstrated that in *HACE1* patient fibroblasts, the mRNA levels of *NQO1* and *HMOX1*, two NRF2 transcriptional targets, reported to be upregulated in response to oxidative stress, were significantly reduced even upon H₂O₂ treatment. These results suggest that the accumulation of oxidative damage in *HACE1* fibroblasts could rely, at least in part, on the diminished ability of these cells to respond to oxidative stress via NRF2. Our data

provide further evidence supporting the role of oxidative damage in the pathogenesis of HACE1 deficiency and complement the recently reported observations made by Nagy et al. (2019) [13].

As discussed above, the phenotype of the HACE1 patient reported here resembles a mitochondrial disorder. Mitochondria are the major source of intracellular ROS, where incomplete reduction of oxygen or electron leakage from the mitochondrial respiratory chain generates superoxide radical anions [39–41]. The fact that oxidative damage is importantly accumulated in HACE1 fibroblasts prompted us to specifically analyze mitochondrial ROS in these cells. Increased levels of superoxide radical anions and high SOD2 expression evidenced that mitochondrial oxidative stress was also present in HACE1 mutated cells. These observations could be controversial since it has been reported that SOD2 is also a target of NRF2. Nevertheless, the oxidative damage response pathways are complex and involve a large number of proteins and transcription factors. Therefore, the high levels of SOD2 detected in HACE1-deficient cells could be due to the action of factors other than NRF2, such as PGC-1 α , a master co-regulator of energy metabolism, SIRT3, among others [40]. These observations together with the persistently high levels of 3-MGA-uria and slight mitochondrial morphology alterations made the rationale to determine whether mitophagy, the selective form of autophagy that recycles damaged mitochondria, could also be targeted [46]. Mitophagy was determined by immunofluorescence, measuring the mitochondria–autophagosome colocalization area [24]. Similar to the results observed for general autophagy, the mitophagic flux was strongly decreased in patient cells, concluding that the turnover of damaged mitochondrial was also impaired as a consequence of HACE1 mutations. However, future experiments using more sophisticated analysis methods [47,48] will be required in order to obtain quantitative mitophagy data and to improve the knowledge of the defects caused by HACE1 deficiency.

5. Conclusions

In summary, the present study, together with the recently reported observations of Nagy et al. (2019) [13], represents the first characterization of the molecular mechanisms underlying HACE1 deficiency in human disease. Here, we demonstrated that HACE1 mutations lead to a severe impairment of the autophagic flux and a decreased ability to respond to oxidative damage. In addition, we also showed increased mitochondrial oxidative stress and altered mitophagy in HACE1 patient cells. Altogether, our observations suggest, for the first time, that these physiological processes may be involved in the pathogenesis of this disorder. However, future studies based on functional complementation of HACE1 patients' fibroblasts and the analysis of HACE1-deficient neuronal cell lines will be required to gain further knowledge about the contribution of altered autophagy, mitophagy and oxidative stress impairment in the physiopathology of this disorder.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2077-0383/9/4/913/s1>, Figure S1: Identification of HACE1 mutations. Figure S2: Quantification of TIM50 and ECHS1 protein expression. Figure S3: High resolution respirometry analysis normalized to protein content. Figure S4. mRNA expression analysis of autophagy genes. Table S1: Antibodies used in this study. Table S2: Oligonucleotides used in this study.

Author Contributions: Conceptualization, A.R. and F.T.; methodology, O.U., M.S.-V., J.G.-V. and F.T.; validation, O.U., J.G.-V., G.G., A.R. and F.T.; formal analysis, O.U. and M.S.-V.; investigation, O.U., M.S.-V., J.R., J.G.-V., T.B.-R., and G.G.; resources, J.R. and G.G.; writing—original draft preparation, O.U. and F.T.; writing—review & editing, O.U., M.S.-V., J.R., J.G.-V., T.B.-R., G.G., A.R. and F.T.; visualization, O.U., M.S.-V., J.R., J.G.-V., T.B.-R., G.G., A.R. and F.T.; supervision, A.R. and F.T.; project administration, A.R. and F.T.; funding acquisition, A.R. and F.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by the Instituto de Salud Carlos III (PI16/01048; PI19/01310) and the Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), an initiative of the Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain). This study was supported by the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR) (2014: SGR 393) and the CERCA Programme/Generalitat de Catalunya. This work was co-funded by the European Regional Development Fund (ERDF). The present study was supported by the 2016 BBMRI-LPC Whole-Exome Sequencing Call.

Acknowledgments: We would like to thank CNAG-CRG and the advanced optic microscopy facilities of the CCIT-UB for excellent technical assistance. We are indebted to the Cytomics core facility of the IDIBAPS for the

technical help. We are grateful to the family involved in this study. This work was performed in the context of the Biomedicine PhD Program of the University of Barcelona (UB).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Scheffner, M.; Kumar, S. Mammalian HECT ubiquitin-protein ligases: Biological and pathophysiological aspects. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* **2014**, *1843*, 61–74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Fernandez, C.V.; Lestou, V.S.; Wildish, J.; Lee, C.L.Y.; Sorensen, P.H.B. Detection of a novel t(6;15)(q21;q21) in a pediatric Wilms tumor. *Cancer Genet. Cytogenet.* **2001**, *129*, 165–167. [[CrossRef](#)]
3. Zhang, L.; Anglesio, M.S.; O'Sullivan, M.; Zhang, F.; Yang, G.; Sarao, R.; Nghiem, M.P.; Cronin, S.; Hara, H.; Melnyk, N.; et al. The E3 ligase HACE1 is a critical chromosome 6q21 tumor suppressor involved in multiple cancers. *Nat. Med.* **2007**, *13*, 1060–1069. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Rotblat, B.; Southwell, A.L.; Ehrnhoefer, D.E.; Skotte, N.H.; Metzler, M.; Franciosi, S.; Leprivier, G.; Somasekharan, S.P.; Barokas, A.; Deng, Y.; et al. HACE1 reduces oxidative stress and mutant Huntingtin toxicity by promoting the NRF2 response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 3032–3037. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Ehrnhoefer, D.E.; Southwell, A.L.; Sivasubramanian, M.; Qiu, X.; Villanueva, E.B.; Xie, Y.; Walzl, S.; Anderson, L.; Fazeli, A.; Casal, L.; et al. HACE1 is essential for astrocyte mitochondrial function and influences Huntington disease phenotypes in vivo. *Hum. Mol. Genet.* **2018**, *27*, 239–253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Daugaard, M.; Nitsch, R.; Razaghi, B.; McDonald, L.; Jarrar, A.; Torrino, S.; Castillo-Lluva, S.; Rotblat, B.; Li, L.; Malliri, A.; et al. Hace1 controls ROS generation of vertebrate Rac1-dependent NADPH oxidase complexes. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1–13. [[CrossRef](#)]
7. Zhang, L.; Chen, X.; Sharma, P.; Moon, M.; Sheftel, A.D.; Dawood, F.; Nghiem, M.P.; Wu, J.; Li, R.K.; Gramolini, A.O.; et al. HACE1-dependent protein degradation provides cardiac protection in response to haemodynamic stress. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 1–14. [[CrossRef](#)]
8. Liu, Z.; Chen, P.; Gao, H.; Gu, Y.; Yang, J.; Peng, H.; Xu, X.; Wang, H.; Yang, M.; Liu, X.; et al. Ubiquitylation of Autophagy Receptor Optineurin by HACE1 Activates Selective Autophagy for Tumor Suppression. *Cancer Cell* **2014**, *26*, 106–120. [[CrossRef](#)]
9. OMIM. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM[®]. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD). Available online: <http://omim.org/> (accessed on 26 February 2020).
10. Akawi, N.; McRae, J.; Ansari, M.; Balasubramanian, M.; Blyth, M.; Brady, A.F.; Clayton, S.; Cole, T.; Deshpande, C.; Fitzgerald, T.W.; et al. Discovery of four recessive developmental disorders using probabilistic genotype and phenotype matching among 4125 families. *Nat. Genet.* **2015**, *47*, 1363–1369. [[CrossRef](#)]
11. Hollstein, R.; Parry, D.A.; Nalbach, L.; Logan, C.V.; Strom, T.M.; Hartill, V.L.; Carr, I.M.; Korenke, G.C.; Uppal, S.; Ahmed, M.; et al. HACE1 deficiency causes an autosomal recessive neurodevelopmental syndrome. *J. Med. Genet.* **2015**, *52*, 797–803. [[CrossRef](#)]
12. Hariharan, N.; Ravi, S.; Pradeep, B.E.; Subramanyam, K.N.; Choudhary, B.; Srinivasan, S.; Khanchandani, P. A novel loss-of-function mutation in HACE1 is linked to a genetic disorder in a patient from India. *Hum. Genome Var.* **2018**, *5*, 1–4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Nagy, V.; Hollstein, R.; Pai, T.P.; Herde, M.K.; Buphamalai, P.; Moeseneder, P.; Lenartowicz, E.; Kavirayani, A.; Korenke, G.C.; Kozieradzki, I.; et al. HACE1 deficiency leads to structural and functional neurodevelopmental defects. *Neurol. Genet.* **2019**, *5*, e330. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Torrino, S.; Visvikis, O.; Doye, A.; Boyer, L.; Stefani, C.; Munro, P.; Bertoglio, J.; Gacon, G.; Mettouchi, A.; Lemichez, E. The E3 ubiquitin-ligase HACE1 catalyzes the ubiquitylation of active Rac1. *Dev. Cell* **2011**, *21*, 959–965. [[CrossRef](#)]
15. Luo, L.; Hensch, T.K.; Ackerman, L.; Barbel, S.; Jan, L.Y.; Jan, Y.N. Differential effects of the Rac GTPase on Purkinje cell axons and dendritic trunks and spines. *Nature* **1996**, *379*, 837–840. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Stankiewicz, T.R.; Linseman, D.A. Rho family GTPases: Key players in neuronal development, neuronal survival, and neurodegeneration. *Front. Cell. Neurosci.* **2014**, *8*, 314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

17. Mulherkar, S.; Uddin, M.D.; Couvillon, A.D.; Sillitoe, R.V.; Tolia, K.F. The small GTPases RhoA and Rac1 regulate cerebellar development by controlling cell morphogenesis, migration and foliation. *Dev. Biol.* **2014**, *394*, 39–53. [[CrossRef](#)]
18. Deng, H.X. HACE1, RAC1, and what else in the pathogenesis of SPPRS? *Neurol. Genet.* **2019**, *5*, 4–5. [[CrossRef](#)]
19. Wortmann, S.B.; Kluijtmans, L.A.; Engelke, U.F.H.; Wevers, R.A.; Morava, E. The 3-methylglutaconic acidurias: What's new? *J. Inherit. Metab. Dis.* **2012**, *35*, 13–22. [[CrossRef](#)]
20. Laurie, S.; Fernandez-Callejo, M.; Marco-Sola, S.; Trotta, J.R.; Camps, J.; Chacón, A.; Espinosa, A.; Gut, M.; Gut, I.; Heath, S.; et al. From Wet-Lab to Variations: Concordance and Speed of Bioinformatics Pipelines for Whole Genome and Whole Exome Sequencing. *Hum. Mutat.* **2016**, *37*, 1263–1271. [[CrossRef](#)]
21. Wittig, I.; Braun, H.P.; Schägger, H. Blue native PAGE. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 418–422. [[CrossRef](#)]
22. Pesta, D.; Gnaiger, E. High-Resolution Respirometry: OXPHOS Protocols for Human Cells and Permeabilized Fibers from Small Biopsies of Human Muscle. *Methods Mol. Biol.* **2012**, *810*, 25–58.
23. Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kayning, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 676–682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Diot, A.; Hinks-Roberts, A.; Lodge, T.; Liao, C.; Dombi, E.; Morten, K.; Brady, S.; Fratter, C.; Carver, J.; Muir, R.; et al. A novel quantitative assay of mitophagy: Combining high content fluorescence microscopy and mitochondrial DNA load to quantify mitophagy and identify novel pharmacological tools against pathogenic heteroplasmic mtDNA. *Pharmacol. Res.* **2015**, *100*, 24–35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Medina, D.L.; Settembre, C.; Ballabio, A. Methods to Monitor and Manipulate TFEB Activity During Autophagy. In *Methods in Enzymology. Molecular Characterization of Autophagic Responses Part, B*; Galluzi, L., Bravo-San Pedro, J.M., Kroemer, G., Eds.; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2017; Volume 588, pp. 61–78.
26. Kumar, S.; Flacke, J.P.; Kostin, S.; Appukuttan, A.; Reusch, H.P.; Ladilov, Y. SLC4A7 sodium bicarbonate co-transporter controls mitochondrial apoptosis in ischaemic coronary endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* **2011**, *89*, 392–400. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Zehmer, J.K.; Bartz, R.; Liu, P.; Anderson, R.G.W. Identification of a novel N-terminal hydrophobic sequence that targets proteins to lipid droplets. *J. Cell Sci.* **2008**, *121*, 1852–1860. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Terada, K.; Manchikalapudi, P.; Noiva, R.; Jauregui, H.O.; Stockert, R.J.; Schilsky, M.L. Secretion, surface localization, turnover, and steady state expression of protein disulfide isomerase in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 20410–20416. [[CrossRef](#)]
29. Boycott, K.M.; Hartley, T.; Biesecker, L.G.; Gibbs, R.A.; Innes, A.M.; Riess, O.; Belmont, J.; Dunwoodie, S.L.; Jovic, N.; Lassmann, T.; et al. A Diagnosis for All Rare Genetic Diseases: The Horizon and the Next Frontiers. *Cell* **2019**, *177*, 32–37. [[CrossRef](#)]
30. Anglesio, M.S.; Evdokimova, V.; Melnyk, N.; Zhang, L.; Fernandez, C.V.; Grundy, P.E.; Leach, S.; Marra, M.A.; Brooks-Wilson, A.R.; Penninger, J.; et al. Differential expression of a novel ankyrin containing E3 ubiquitin-protein ligase, Hace1, in sporadic Wilms' tumor versus normal kidney. *Hum. Mol. Genet.* **2004**, *13*, 2061–2074. [[CrossRef](#)]
31. Nagase, T.; Kikuno, R.; Ishikawa, K.I.; Hirose, M.; Ohara, O. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XVI. The complete sequences of 150 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res.* **2000**, *7*, 65–73. [[CrossRef](#)]
32. Jones, D.E.; Perez, L.; Ryan, R.O. 3-Methylglutaric acid in energy metabolism. *Clin. Chim. Acta* **2020**, *502*, 233–239. [[CrossRef](#)]
33. Levine, B.; Kroemer, G. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell* **2008**, *132*, 27–42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Mizushima, N.; Yoshimori, T.; Levine, B. Methods in Mammalian Autophagy Research. *Cell* **2010**, *140*, 313–326. [[CrossRef](#)]
35. Rubenstein, D.C. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* **2006**, *443*, 780–786. [[CrossRef](#)]
36. Peker, N.; Gozuacik, D. Autophagy as a cellular stress response mechanism in the nervous system. *J. Mol. Biol.* **2020**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Kabeya, Y.; Mizushima, N.; Ueno, T.; Yamamoto, A.; Kirisako, T.; Noda, T.; Kominami, E.; Ohsumi, Y.; Yoshimori, T. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg, is localized in autophagosomal membranes after processing. *EMBO J.* **2000**, *19*, 5720–5728. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

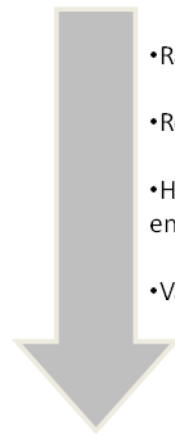
38. Tanida, I.; Minematsu-Ikeguchi, N.; Ueno, T.; Kominami, E. Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy* **2005**, *1*, 84–91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Zorov, D.B.; Juhaszova, M.; Sollott, S.J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol. Rev.* **2014**, *94*, 909–950. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Olsen, R.K.J.; Cornelius, N.; Gregersen, N. Redox signalling and mitochondrial stress responses; lessons from inborn errors of metabolism. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2015**, *38*, 703–719. [[CrossRef](#)]
41. Hamanaka, R.B.; Chandel, N.S. Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends Biochem. Sci.* **2010**, *35*, 505–513. [[CrossRef](#)]
42. Malhotra, D.; Portales-Casamar, E.; Singh, A.; Srivastava, S.; Arenillas, D.; Happel, C.; Shyr, C.; Wakabayashi, N.; Kensler, T.W.; Wasserman, W.W.; et al. Global mapping of binding sites for Nrf2 identifies novel targets in cell survival response through chip-seq profiling and network analysis. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 5718–5734. [[CrossRef](#)]
43. Kensler, T.W.; Wakabayashi, N.; Biswal, S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2007**, *47*, 89–116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Wild, A.C.; Moinova, H.R.; Mulcahy, R.T. Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression by the transcription factor Nrf2. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 33627–33636. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Itoh, K.; Chiba, T.; Takahashi, S.; Ishii, T.; Igarashi, K.; Katoh, Y.; Oyake, T.; Hayashi, N.; Satoh, K.; Hatayama, I.; et al. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *236*, 313–322. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Youle, R.J.; Narendra, D.P. Mechanisms of mitophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2011**, *12*, 9–14. [[CrossRef](#)]
47. McWilliams, T.G.; Ganley, I.G. Life in lights: Tracking mitochondrial delivery to lysosomes in vivo. *Autophagy* **2016**, *12*, 2506–2507. [[CrossRef](#)]
48. McWilliams, T.G.; Prescott, A.R.; Allen, G.F.; Tamjar, J.; Munson, M.J.; Thomson, C.; Muqit, M.M.; Ganley, I.G. mito-QC illuminates mitophagy and mitochondrial architecture in vivo. *J. Cell Biol.* **2016**, *214*, 333–345. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Supplementary Material

Trio WES



- Rare variants (MAF<0.01)
- Recessive inheritance
- High / Moderate effect on the encoded protein
- Variants associated to disease

HACE1

c.[240C>A];[240C>A]
p.[Cys80Ter];[Cys80Ter]

Figure S1. Identification of *HACE1* mutations. Exome data analysis and filtering steps leading to the identification of mutations in *HACE1*. MAF, minor allele frequency.

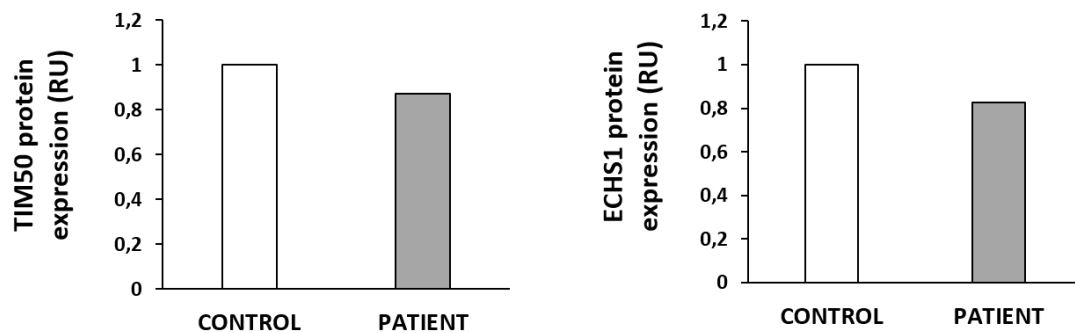


Figure S2. Quantification of TIM50 and ECHS1 protein expression. Western Blot analysis of TIM50 (mitochondrial membrane protein) and ECHS1 (mitochondrial matrix protein) showed similar expression levels between control and patient cells, indicating no differences in mitochondrial content. Results are expressed in relative units (RU).

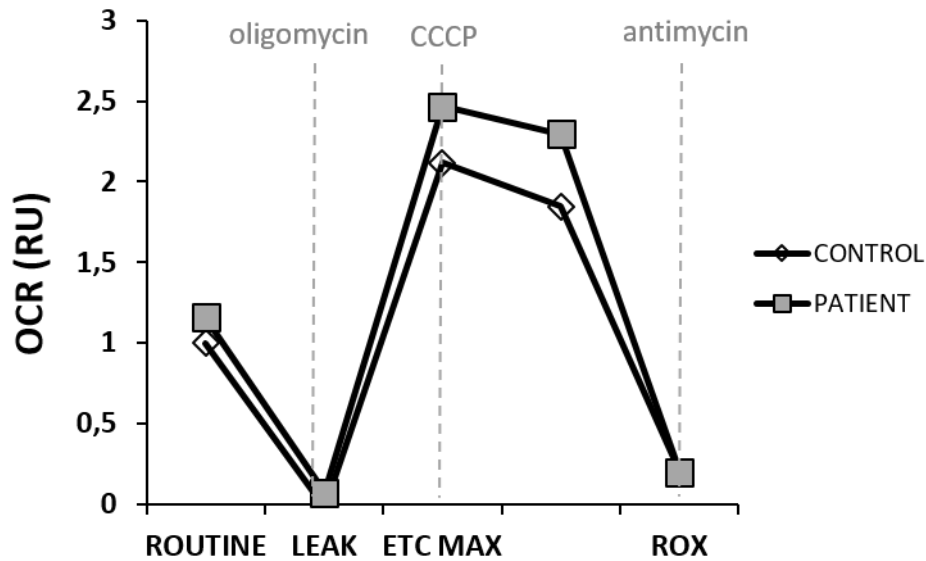


Figure S3. High resolution respirometry analysis normalized to protein content. High resolution respirometry analysis normalized to protein content showed no major differences in the oxygen consumption rate (OCR) between HACE1 and control cells. ROUTINE, oxygen consumption rate at basal state; LEAK, residual oxygen consumption after oligomycin treatment; ETCmax, maximum oxygen consumption induced by CCCP titration; ROX, residual oxygen consumption after antimycin A treatment. OCR was normalized to protein content. Data is expressed as relative units (RU) of control cells.

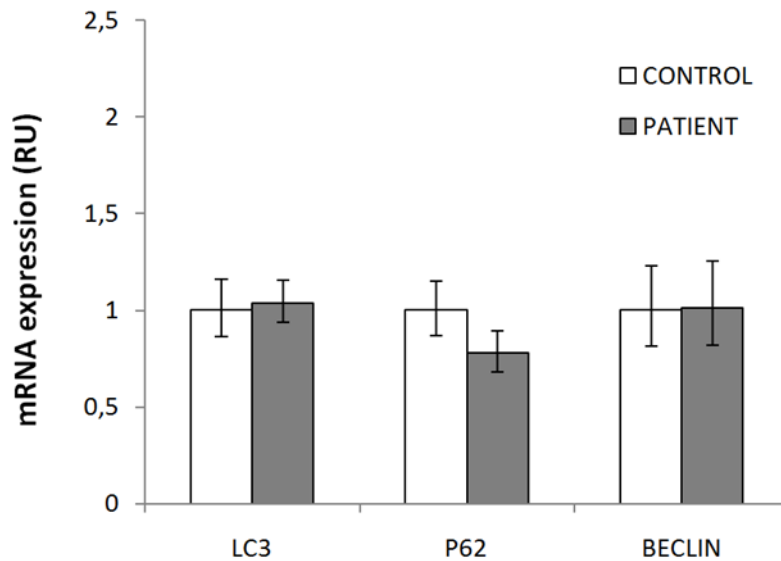


Figure S4. mRNA expression analysis of autophagy genes. Quantitative PCR showed significantly similar mRNA expression levels in HACE1 patient and control fibroblasts. Experiments were performed in triplicate and results are expressed in relative units (RU). PPIA was used as internal control.

Table S1. Antibodies used in this study

Protein	Reference	Manufacturer
NDUFA9	459100	ThermoScientific, USA
SDHA	MS204	MitoSciences, USA
UQCRC2	ab14745	Abcam, UK
UQCRFS1	ab14746	Abcam, UK
COX5A	ab110262	Abcam, UK
ATP5A	ab14748	Abcam, UK
HACE1	ab133637	Abcam, UK
PDI	MA3-019	ThermoScientific, USA
SERAC1	HPA025716	Sigma Aldrich, USA
SOD2	HPA001814	Sigma Aldrich, USA
LC3	PM036	MBL, USA
TOM20	Sc-11415	Sigma Aldrich, USA
α -TUBULIN	ab176560	Abcam, UK
GAPDH	sc-47724	Santa Cruz Biotechnology, USA

Table S2. Oligonucleotides used in this study.

Gene	Forward	Reverse
NQO1	5'-GCCGCAGACCTTGTGATATT-3'	5'-CTGGTTTGAGCGAGTGTTC-3'
HMOX1	5'-AACTTTCAGAAGGGCCAGGT	5'-GTAGACAGGGGCGAAGACTG-3'
LC3	5'-CATGAGCGAGTTGGTCAAGA	5'-CTCGTCTTTCTCCTGCTCGT-3'
SQSTM1	5'-GCACCCCAATGTGATCTGC	5'-CGCTACACAAGTCGTAGTCTGG-3'
BECLIN	5'-GGCTGAGAGACTGGATCAGG	5'-CTGCGTCTGGGCATAACG-3'
PPIA	5'-AAATGCTGGACCCAACACAAA-3'	5'-TTGCCAACACCATGCTT-3'

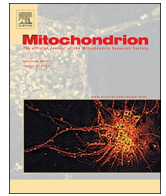
ARTÍCULO 3

Título: Complex I deficiency, due to *NDUFAF4* mutations, causes severe mitochondrial dysfunction and is associated to early death and dysmorphism.

Autores: Ugarteburu O, Teresa Garcia-Silva M, Aldamiz-Echevarria L, Gort L, Garcia-Villoria J, Tort F, Ribes A.

Revista: Mitochondrion. 2020 Nov; 55:78-84. **Factor de impacto:** 3.992 (Q2: Genetics & Heredity)

El gen *NDUFAF4* ha sido asociado a patología en algunos pacientes. En el presente trabajo aportamos nueva información que permite ampliar el espectro fenotípico de la deficiencia de *NDUFAF4*. Describimos dos hermanos que presentaron dismorfia facial y acidosis láctica en el periodo neonatal. Posteriormente, desarrollaron una encefalopatía temprana y fatal, acompañada de episodios apneicos, irritabilidad, hipoventilación central, afectación hepática e hiperamonemia. En uno de los pacientes se demostró la presencia de alteraciones en la sustancia blanca cerebral, y en el otro cardiomiopatía. En el estudio de ácidos orgánicos en orina se detectó una excreción elevada de ácido láctico, metabolitos del ciclo de Krebs y ácido 3-metilglutacónico (3-MGA). En la secuenciación del exoma celular de ambos hermanos se identificó una mutación, no descrita previamente, en homocigosis en el gen *NDUFAF4* (c.478G>T; p.Glu160Ter) que codifica un factor de ensamblaje del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. El efecto deletéreo de la mutación se demostró mediante Western blot, ya que los fibroblastos de los pacientes no expresaban proteína *NDUFAF4*. El estudio realizado mediante Blue-Native PAGE demostró niveles casi indetectables de complejo I así como de los supercomplejos que contienen complejo I. Además, se observó un acúmulo anormal de supercomplejos SCIII₂/IV₁. En cuanto a la morfología mitocondrial, los fibroblastos del paciente presentaban mitocondrias más redondeadas y una red mitocondrial menos ramificada. La capacidad respiratoria de las células con deficiencia de *NDUFAF4* también estaba reducida. En resumen, proporcionamos nueva información que permite conocer mejor las bases fisiopatológicas de la deficiencia de *NDUFAF4* además de ampliar el espectro clínico y bioquímico de esta enfermedad.



Complex I deficiency, due to *NDUFAF4* mutations, causes severe mitochondrial dysfunction and is associated to early death and dysmorphia

Olatz Ugarteburu^a, Maria Teresa Garcia-Silva^b, Luis Aldamiz-Echevarria^c, Laura Gort^a, Judit Garcia-Villoria^a, Frederic Tort^{a,1,*}, Antonia Ribes^{a,1,*}

^a Secció d'Errors Congènits del Metabolisme-IBC, Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, Hospital Clínic, IDIBAPS, CIBERER, Barcelona, Spain

^b Unidad de Enfermedades Mitocondriales- Enfermedades Metabólicas Hereditarias. Servicio de Pediatría. University Hospital 12 de Octubre, CIBERER, Universidad Complutense, Madrid, Spain

^c Group of Metabolism, Biocruces Bizkaia Health Research Institute, Linked Clinical Group of Rare Diseases CIBER (CIBERER), Barakaldo, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

NDUFAF4
OXPHOS
Exome
Mitochondrial morphology
High-resolution respirometry
Supercomplexes

ABSTRACT

Pathogenic mutations in *NDUFAF4* have been reported in very few cases. Here we present new data to further delineate the phenotypic spectrum of *NDUFAF4* deficiency. We describe two siblings presenting with facial dysmorphia and lactic acidosis in the neonatal period. Later on, they developed fatal early encephalopathy with apneic episodes, irritability, central hypoventilation, liver involvement and hyperammonemia. Abnormality of the cerebral white matter was demonstrated in one case, and cardiomyopathy in the other. Urine organic acid profile showed an increased excretion of lactate, Krebs cycle metabolites and 3-methylglutaconate. Whole-exome sequencing identified a novel homozygous nonsense mutation in *NDUFAF4* (c.478G > T; p.Glu160Ter), encoding a mitochondrial complex I assembly factor. The disruptive effect of the mutation was corroborated by the absence of *NDUFAF4* expression in patient fibroblasts. OXPHOS assembly studies demonstrated almost undetectable levels of fully assembled complex I and complex I-containing supercomplexes and an abnormal accumulation of SCIII₂IV₁ supercomplexes. Morphologically, fibroblasts showed rounder mitochondria and a diminished degree of branching of the mitochondrial network. Cellular respiratory capacity in fibroblasts was also markedly reduced. In sum, we provide insights into the physiopathological mechanisms underlying *NDUFAF4* deficiency and expand the knowledge about the clinical and biochemical spectrum of this disorder.

1. Introduction

The oxidative phosphorylation (OXPHOS) system comprises five heteropolymeric complexes (complexes I–V) located in the inner mitochondrial membrane. This molecular machinery is responsible for the production of the major bulk of cellular energy in form of ATP. Complex I is the largest component of the OXPHOS system, which consists of 45 structural subunits and requires the function of around 20 auxiliary proteins for its proper assembly and for formation of the active complex. The mature complex I further associates with other OXPHOS complexes to form multi-enzyme assemblies known as respiratory chain supercomplexes. Specifically, complex I binds to

dimeric complex III (SC_IIII₂) and to a variable number of complex IV units (SC_IIII₂IV_n) (Guerrero-Castillo et al., 2017). Complex I deficiency is among the most common biochemical alterations observed in pediatric mitochondrial disorders. Clinical symptoms associated to complex I deficiencies are heterogeneous, ranging from fatal neonatal lactic acidosis and severe neurological abnormalities in infancy, to isolated myopathy and exercise intolerance into adulthood (OMIM: PS252010). There are no obvious genotype-phenotype correlation, and inference of the underlying basis for disease from the clinical or biochemical presentation is difficult, if not impossible (Haack et al., 2012). However, in the last decade, implementation of next-generation sequencing has facilitated the identification of new disease-causing variants associated to

Abbreviations: 3-MGA, 3-methylglutaconate; 3-MGA-uria, 3-methylglutaconic aciduria; AR, aspect ratio; BN-PAGE, blue native polyacrylamide gel electrophoresis; FF, form factor; IGA, in gel activity; OMIM, *Online Mendelian Inheritance in Man*; OXPHOS, oxidative phosphorylation; PDH, pyruvate dehydrogenase; SC, supercomplex; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; WES, whole-exome sequencing

* Corresponding authors at: Secció d'Errors Congènits del Metabolisme-IBC, Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, Hospital Clínic, IDIBAPS, CIBERER C/Mejía Lequerica s/n, Edifici Helios III, planta baixa, 08028 Barcelona, Spain.

E-mail addresses: ftort@ciberer.es (F. Tort), aribes@clinic.cat (A. Ribes).

¹ Contributed equally.

<https://doi.org/10.1016/j.mito.2020.09.003>

Received 7 July 2020; Received in revised form 12 September 2020; Accepted 14 September 2020

Available online 17 September 2020

1567-7249/ © 2020 Elsevier B.V. and Mitochondria Research Society. All rights reserved.

disorders with broad phenotypic spectra.

To date, mutations in 42 genes encoding for either complex I structural subunits or assembly factors have been reported to cause this heterogeneous group of disorders (Thompson et al., 2020). Mutations in *NDUFAF4* (OMIM: *611776), which encodes a complex I assembly factor, have been reported only in three families (Saada et al., 2008; Haack et al., 2012; Baertling et al., 2017). Although the role of *NDUFAF4* in the initial steps of complex I biogenesis has been well studied, the knowledge about the physiopathological basis of *NDUFAF4* deficiency is still limited due to the few patients reported so far. Here we report two siblings carrying a novel *NDUFAF4* mutation. We also expand the clinical spectrum and the biochemical abnormalities associated to this disorder.

2. Methods

2.1. Organic acids

Urine organic acids were analyzed as their trimethylsilyl derivatives (TMS) by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) (Agilent 7890A/5975C GC/MS).

2.2. Enzymatic activities

Enzymatic activities of the mitochondrial respiratory chain complexes and PDH were determined as previously described (Quintana et al., 2010; Rustin et al., 1994). The respiratory chain activities were normalized to protein content (milligrams of protein) and to the citrate synthetase (CS) activity, a marker of the mitochondrial mass (Table 1, Supplementary Table 1).

2.3. Whole-exome sequencing

Genomic DNA was isolated from patient fibroblasts following the manufacturer's recommendations (QiAmp DNA Mini Kit, QIAGEN, Hilden, Germany). Whole-exome sequencing (WES) was performed for both affected siblings. Exome enrichment was performed using the SeqCap_EZ_Exome_v3 kit (Nimblegen) followed by sequencing using the Illumina HiSeq 2000 genome analyzer platform. Sequencing and analysis of the primary data (FASTQ files) were performed at the National Center for Genomic Analysis (CNAG-CRG, Barcelona, Spain) using a self-developed pipeline.

2.4. Cell culture

Human skin fibroblasts were maintained in MEM containing 1 g/L

Table 1
Mitochondrial respiratory chain (OXPHOS) enzymatic activities.

Enzyme activities (nmol/min/mg prot)	Fibroblasts	
	Patient 1	Controls
Complex I - NADH: Cytochrome C oxidoreductase	2256	1785–1931
Complex I + III - NADH: Cytochrome C reductase	304	244–336
Complex II + III - Succinate: Cytochrome C oxidoreductase	12	2.4–7.8
Complex IV - Cytochrome C oxidase	26	15–23
Citrate synthetase (CS)	25	6.2–15
Complex I / CS	89*	132–288
Complex I + III / CS	12*	23–39.4
Complex II + III / CS	0.47	0.39–0.53
Complex IV / CS	1.04*	1.57–2.44

OXPHOS, Oxidative phosphorylation system. Individual values are the mean of triplicate determinations. Number of controls used for each determination: Complex I, 3 controls; Complex I + III, 12 controls; Complex II + III, 11 controls; Complex V, 12 controls; CS, 7 controls. *Altered values.

glucose and supplemented with 10% fetal calf serum and 1% penicillin–streptomycin at 37 °C in 5% CO₂.

2.5. Analysis of protein steady-state levels

Protein steady-state levels were analyzed by western blot. Fibroblasts obtained from healthy donors and *NDUFAF4* patients were homogenized, and the extracts were analyzed by SDS-PAGE, as reported (Tort et al., 2019). Antibody details are given in the Supplementary Table 2.

2.6. Blue Native-PAGE analysis of mitochondrial respiratory chain complexes and supercomplexes

Mitochondria-enriched pellets were obtained from the *NDUFAF4*-patient fibroblasts and control fibroblasts, as described (Wittig et al., 2006). For analyses of the mitochondrial respiratory complexes and supercomplexes, pellets were solubilized and analyzed using 4% to 15% polyacrylamide gradient gels, followed by immunoblotting and colorimetric detection as described (Tort et al., 2019). Antibody details are given in the Supplementary Table 2. In-gel activity was performed as reported (Van Coster et al., 2001).

2.7. Immunofluorescence

Cells were grown in glass coverslips, rinsed with PBS, and fixed with 4% paraformaldehyde. Samples were permeabilized for 10 min with 0.1% TritonX-100. To analyze mitochondria morphology, cells were stained with anti-TOMM20 (sc-11415) antibody, and coverslips were mounted with Mowiol 4–88 Mounting Medium (Sigma-Aldrich, Sant Luis, MI, USA). Images were obtained using a Leica TCS SL laser scanning confocal spectral microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) and analyzed using ImageJ software. The ratios between mitochondria length and width (aspect ratio, AR) and the degree of mitochondrial branching (form factor, FF) were determined. As AR is the ratio between the major and the minor mitochondrial axis, it is indicative of the mitochondrial shape and elongation, whereby AR = 1 indicates a completely circular mitochondria, and increasing values indicate more elliptical form. FF is calculated as the inverse of circularity (whereby circularity is $4\pi \cdot \text{area} / \text{perimeter}$ (Haack et al., 2012) High FF values indicate branched and connected mitochondria. All experiments were performed in duplicate using three different controls. For each sample, at least 30 cells were analyzed.

2.8. High-resolution respirometry

High-resolution respirometry was performed in intact cells using polarographic oxygen sensors in a two-chamber Oroboros system according to manufacturer's instructions (OROBOROS Instruments, Innsbruck, Austria) and following previously reported methods (Pesta et al., 2012). The oxygen consumption rate (OCR) was measured as pmol/(second × millions of cells).

2.9. Statistics

The two-tailed Student's *t*-test was used to compare the means of two independent groups with normally distributed data. Data were reported as the mean ± S.E.M. Values of *p* < 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Patients

Patients reported here are siblings from healthy second-degree consanguineous parents. The first born of this family was a girl. She was

born at 41 weeks of gestation by caesarean section due to fetal suffering. Apgar score was 9/10. Birth weight, height and head circumference were normal (3250 g, 52 cm and 35 cm, respectively). Physical examination was uneventful except for peculiar facies with depressed nasal root and anteverted nostrils. Chromosomal abnormalities were ruled out. Glycosaminoglycans and very-long-chain fatty acids were normal. She was discharged at 9 days of age but admitted again on the 28th day of life because of fever and infection. Blood culture disclosed *Staphylococcus aureus*, and she was successfully treated with antibiotics. She then had a second infection of *Enterobacter cloacae* that was treated with cefotaxime. Subsequently, she developed recurrent metabolic acidosis with hyperlactatemia, neurologic deterioration, irritability and seizures. A heart murmur of II/VI grade was detected, and electrocardiography showed a right bundle branch block, while cardiac echography did not show abnormalities. First-line biochemical investigation showed both normocytic and normochromic anemia, as well as episodes of hyperglycemia and glycosuria, metabolic acidosis with high plasma levels of lactate (6.8 mmol/L; reference range 0.64–2.4), pyruvate (0.19 mmol/L; reference range 0.04–0.07) and ammonia (160 µg/dL; reference range 20–100). Urine organic acid profile showed high excretion of lactate, 2-hydroxybutyrate, 3-methylglutaconate (3-MGA) and Krebs cycle metabolites (succinate, fumarate and 2-ketoglutarate). Quantitative data were not available. At 3.5 months of age, she showed signs of failure to thrive, slight macrocephaly, progressive neurological deterioration with absence of eye contact, axial hypotonia and pyramidal signs. The EEG disclosed severe slowing of background and paroxysm, and brain CT and MRI showed white matter abnormalities more prominent in frontal regions. A deficiency of pyruvate dehydrogenase (PDH) was suspected, but a skin biopsy showed that PDH complex activity (measured in triplicate) was within the control range: 0.40 ± 0.11 nmol/min \times mg protein (reference range: 0.7 ± 0.3). Despite empirical treatment with biotin, thiamine and lipoic acid, the clinical status continued to worsen, and she suffered apneic episodes requiring mechanical ventilation. She died at 4.5 months of age during an intercurrent respiratory infection. Necropsy revealed liver steatosis. Post-mortem muscle tissue did not show abnormalities suggestive of a mitochondrial disease, but respiratory chain activities in fibroblasts showed evidence of complex I deficiency with a slight decrease of complex IV activity (Table 1).

The second born of this family was a boy. Pregnancy and delivery were uneventful. Physical examination at birth was normal, except for facial dysmorphism like his sister, with depressed nasal root and anteverted nostrils, and diastasis recti abdominis. Biochemical analysis at 3 days of life disclosed high levels of lactate (5.3 mmol/L) and pyruvate (0.19 mmol/L), as well as hyperammonemia (164 µg/dL), hyperglycemia (145 mg/dL; reference range 65–120) and high levels of CK (394 U/L; reference range 10–200). At 11 days of age, he presented severe anemia that required red blood cell transfusion. A systolic murmur of I/VI degree was found, but functional cardiac examination was normal. Plasma amino acids showed an increased level of alpha-alanine (586 mmol/L; reference range 149–439), while carnitine and acylcarnitine levels were normal. His urine organic acid profile was almost identical to that of his sister, with high excretion of lactate (285 mmol/mol creatinine; reference values < 50), 3-methylglutaconate (71 mmol/mol creatinine; reference values < 20), fumarate (74 mmol/mol creatinine; reference values < 30) and 2-ketoglutarate (74 mmol/mol creatinine; reference values < 32). At 45 days of age, he presented with slight axial hypotonia, irritability, poor eye follow-up and decreased consistency of muscle mass, as the only signs of neurologic affection, and hepatomegaly without alteration of the hepatic enzymes. Plasma levels of lactate and ammonia were persistently high, of 8.6 mmol/L and 228 µg/dL, respectively, with tendency towards hyperglycemia (139 mg/dL) but with normal ketone bodies. He was treated empirically with a cocktail consisting of thiamine, riboflavin and coenzyme Q₁₀. At 2 months of age, he had an episode of sudden death at home but could be resuscitated. He was immediately

to a neonatal intensive care unit and put on mechanical ventilation due to frequent apnea. Cardiac studies revealed hypertrophic cardiomyopathy. He died 3 days after this episode due to cardiorespiratory arrest.

3.2. Identification of mutations in *NDUFAF4*

Mitochondrial respiratory chain activities in muscle and fibroblasts, as well as alterations of metabolites in plasma and urine, pointed to a mitochondrial energy metabolism disorder. We performed WES on DNA from both affected siblings. As we expected a recessive inheritance due to the consanguinity of the family, we filtered for homozygous rare variants (GMAF > 0.01) predicted to have a strong impact in the encoded protein. The filtering steps are detailed in Supplementary Fig. 1. As we suspected a mitochondrial dysfunction, we selected variants in genes annotated in the MitoCarta (Calvo et al., 2016). Local variation was also considered, and the prioritized variants were searched in the Spanish Variant Server (<http://csvs.clinbioinfospa.es/>), a database of genetic variation in the Spanish population. Using this strategy, we prioritized variants in *NUBPL* and *NDUFAF4* (encoding for complex I assembly factors) and *PDSS1* (associated to CoQ10 biosynthesis). Variants in *NUBPL* (c.383-5dupT, NM_025152.2) and *PDSS1* (c.163-5delT, NM_014317.3) were discarded as both were predicted to be benign, according to VarSome prediction tools, and had an allelic frequency of 0.02 and 0.03, respectively, in the Spanish population (Kopanos et al., 2019). In contrast, the homozygous nonsense mutation (c.478G > T; p.Glu160Ter) in *NDUFAF4* was predicted to be pathogenic, and was therefore prioritized it as the potential cause of the disease. This mutation was confirmed by Sanger sequencing (Supplementary Fig. 2).

3.3. Steady-state levels of *NDUFAF4* and complex I structural subunits were decreased in the patient fibroblasts

As the c.478G > T mutation was predicted to generate a truncated protein, we determined its effect by analyzing the expression of *NDUFAF4* by western blot. The results showed undetectable levels of *NDUFAF4* protein in both affected siblings (Fig. 1A). We also assessed the steady-state levels of representative subunits of complexes I–V and found a marked reduction of complex I structural components, but no changes in the subunits of complex II, III, IV or V (Fig. 1B).

3.4. Defective complex I assembly and supercomplexes formation in the *NDUFAF4* patient fibroblasts

As *NDUFAF4* is a complex I assembly factor, we used Blue Native-PAGE to analyze the assembly of the OXPHOS system. Our results showed an isolated defect in the assembly of complex I in fibroblasts from both patients (Fig. 2A). In addition, the levels of fully assembled supercomplexes (SC_{I,III₂} and SC_{I,III₂IV_n}) were almost absent (Fig. 2B). Interestingly, we detected an abnormal accumulation of the SC_{III₂IV} supercomplex in patient cells by western blot. These observations were further corroborated by in-gel-activity (IGA) analysis (Fig. 2B).

3.5. Mitochondrial network and morphology are altered in *NDUFAF4*-defective patient fibroblasts

Immunofluorescence studies demonstrated a significant reduction in AR (indicative of morphology) and FF (indicative of network branching) parameters in cells from the P1 and P2 individuals as compared to control cells (p < 0.05) (Fig. 3A). The *NDUFAF4*-deficient fibroblasts had rounder and shorter mitochondria as well as a diminished branching degree of the mitochondrial network. A TMEM70 individual with strong alterations of the mitochondrial network and morphology, was used as a positive control. We discarded the possibility of altered steady-state levels of MFN2 (involved in mitochondrial fusion) and DRP1 (involved in mitochondrial fission), as western blot

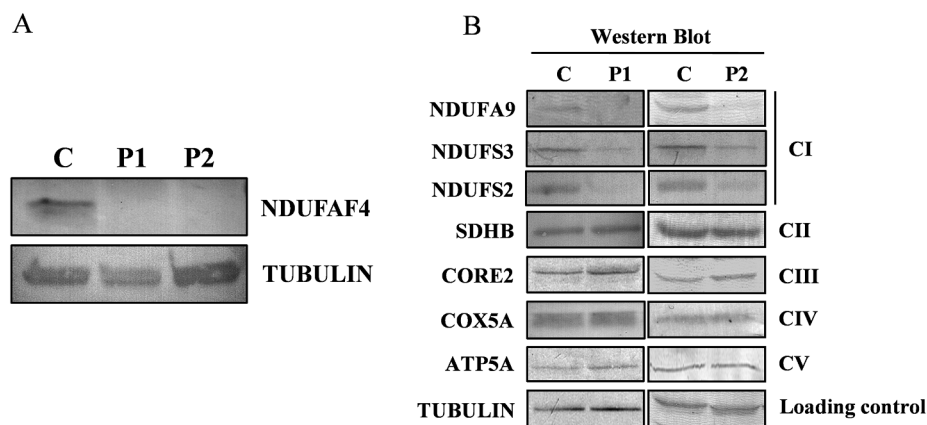


Fig. 1. Analysis of protein steady-state levels. (A) Western blot analysis showed undetectable levels of NDUFAF4. (B) Decreased levels of complex I subunits were observed patient fibroblasts. C, control; P1, patient 1; P2, patient 2.

assessment of these proteins showed no significant alterations (Supplementary Fig. 3).

3.6. Respiratory capacity was severely reduced in the NDUFAF4-defective patient fibroblasts

We determined the effect of NDUFAF4 mutations on mitochondrial function by high-resolution respirometry. The basal OCR as well as the maximal respiratory capacity was significantly reduced in P2 fibroblasts (Fig. 3B). Unfortunately, OCR could not be determined for P1 cells due to poor cell growth and to material unavailability.

4. Discussion

Mitochondrial respiratory chain complex I deficiencies are among the most common defects observed in patients with pediatric mitochondrial disorders. Mutations in 42 genes encoding either complex I structural subunits or assembly factors have been reported to be involved in this group of disorders (Thompson et al., 2020). However, there is a large degree of clinical and genetic heterogeneity in complex I deficiency and genotype–phenotype correlation has not yet been established (Haack et al., 2012).

To date, mutations in NDUFAF4, encoding for a complex I assembly factor, have only been described in three families (Saada et al., 2008; Haack et al., 2012; Baertling et al., 2017). We have compared the clinical, biochemical and molecular data of these reported individuals with the two patients described here for discussion (Table 2). In

contrast to other causes of complex I deficiency, patients with mutations in NDUFAF4 present quite uniform clinical symptoms. As it can be observed in Table 2 all of them present early after birth or during infancy with metabolic acidosis and high plasma and CSF lactate. Except for two patients who were still alive at 2 and 7 years of age, all affected individuals died very early (from one-week to 18-months of life). Individuals surviving the neonatal period showed failure to thrive, generalized hypotonia and irritability. Seizures were reported for four of the patients, while hypertonia, cardiomyopathy, nystagmus and optic atrophy were less commonly reported. All patients showed encephalopathy, and brain MRI performed for four patients showed grey and white matter atrophy, demyelination and cerebellar atrophy (Saada et al., 2008) or basal ganglia and brainstem and thalami lesions (Haack et al., 2012; Baertling et al., 2017). Liver involvement, hyperammonemia and facial dysmorphism have never been reported previously for NDUFAF4 deficiency. In fact, dysmorphism is an uncommon finding in mitochondrial diseases. To our knowledge, dysmorphism has been commonly reported only in a few particular conditions, such as those caused by mutations in FBXL4, TMEM70 and LRPPRC (Garone et al., 2018), and it is even more rare in complex I deficiencies (Koene et al., 2012; Alston et al., 2016, 2018; Fiedorczuk and Sazanov, 2018). Notably, the patients reported here showed increased urinary excretion of 3-MGA. This metabolite has been widely documented in mitochondrial disorders (Wortmann et al., 2013). Although the precise origin of 3-MGA excretion remains unclear, the detection of elevated levels of this metabolite in urine is considered a good biomarker of mitochondrial dysfunction (Fiedorczuk and Sazanov, 2018). Among OXPHOS

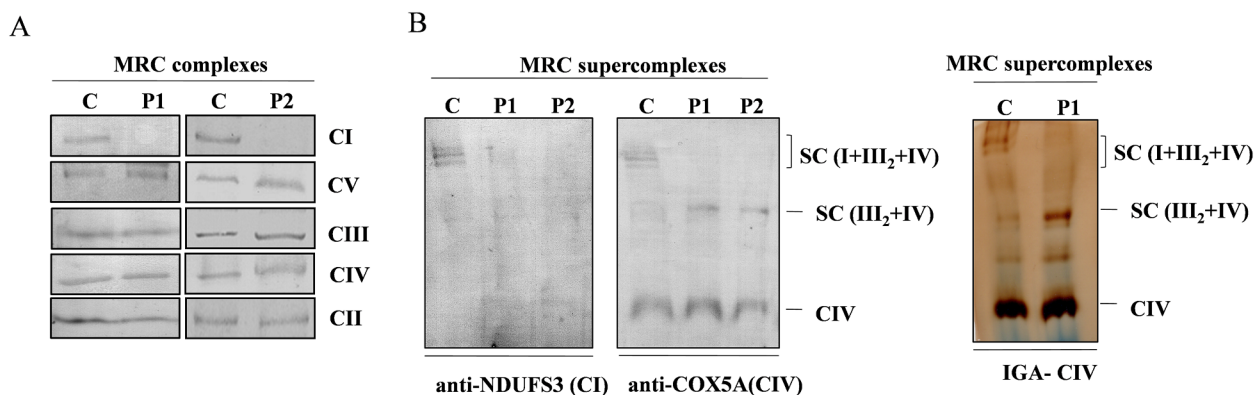


Fig. 2. Analysis of OXPHOS complexes and supercomplexes. (A) BN-PAGE showed an isolated deficiency of complex I in NDUFAF4 patients. (B) BN-PAGE demonstrated decreased SC_IIII₂IV_n and accumulation of SC_{III}II₂CIV supercomplexes in patient fibroblasts. MRC, mitochondrial respiratory chain; IGA, in-gel activity; C, control; P1, patient 1; P2, patient 2. Analyses of the OXPHOS complexes and supercomplexes were performed using three different sources of control fibroblasts. All experiments were performed in duplicate.

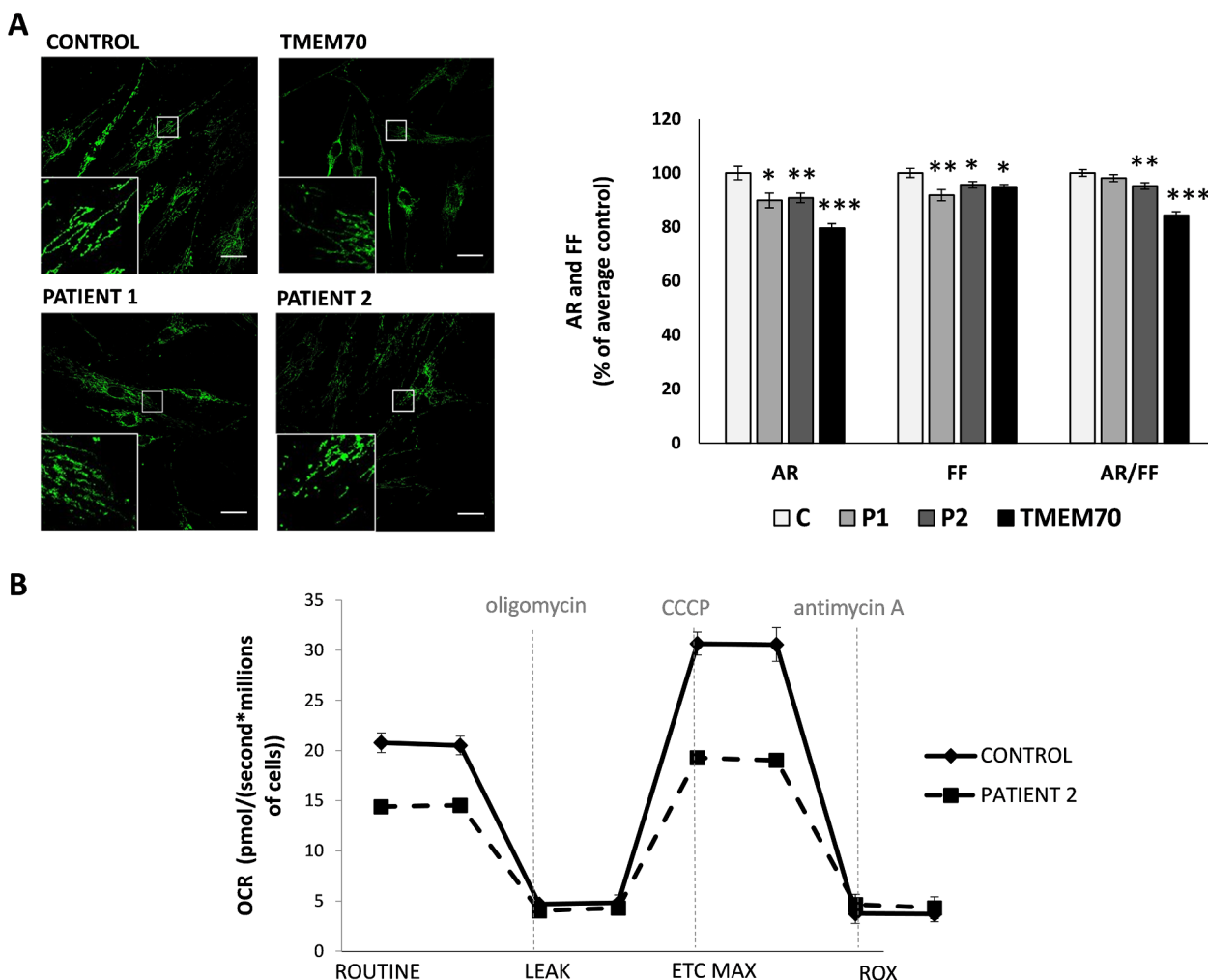


Fig. 3. Analysis of mitochondrial morphology and high-resolution respirometry. (A) Immunofluorescence analysis using the TOMM20 mitochondrial marker showed significantly altered aspect ratio (AR) and form factor (FF) parameters in patient fibroblasts. Two independent experiments using three different controls were performed. Scale bar, 30 μ m. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. (B) High-resolution respirometry in the *NDUFAF4* patient and control individuals showed an important reduction in the basal oxygen consumption rate (OCR; measured as pmol/[second * millions of cells]) as well as in the maximal respiratory capacity (ETCmax). Two independent experiments using two different control cell lines were performed. C, control; P1, patient 1; P2, patient 2; TMEM70, positive control of TMEM70 in patient fibroblasts.

defects, 3-MGA aciduria is commonly found in patients with primary complex V deficiency, and specifically those due to mutations in *ATPAF2*, *TMEM70*, *ATP5F1E* or *ATP5F1D*. However, 3-MGA aciduria is not a frequent finding in other OXPHOS defects, including disorders caused by mutations in complex I (Wortmann et al., 2013; Alban et al., 2017).

The genotypes of the *NDUFAF4* patients are shown in Table 2, and a comparative *in silico* analysis of all the reported mutations is summarized in Table 3. In the first cohort of patients, the identified mutation (c.194 T > C, p.Leu65Pro) targets a conserved amino acid located within a putative calmodulin-binding domain (Saada et al., 2008). Although protein analysis showed that *NDUFAF4* was importantly reduced (albeit not completely lacking) in patient fibroblasts, the impact of this mutation on complex I function was unequivocally demonstrated by functional recovery of complex I activity upon complementation with the wild-type *NDUFAF4* cDNA. However, despite the fact that all patients in this cohort had the same genotype, one of them is still alive at 7 years of age, while the others died very early (Table 2). The other two reported variants (c.7G > C, p.Ala3Pro and c23G > A, p.Gly8Glu) alter two conserved residues in the N-terminal region of the protein (Haack et al., 2012; Baertling et al., 2017). In contrast to that seen in the first cohort of patients (Saada et al., 2008), no *NDUFAF4*

protein was detectable in the individual carrying the c.7G > C substitution (Baertling et al., 2017). No functional data were reported for the c.23G > A variant (Haack et al., 2012).

The disruptive effect of the novel mutation (c.478G > T) reported here was predicted to generate a premature termination codon at residue 160; this was corroborated by western blot, which revealed that the *NDUFAF4* protein was absent in patient fibroblasts, similar to that observed for the individual reported by Baertling and co-workers (Baertling et al., 2017).

The physiopathological mechanisms underlying *NDUFAF4* defects are still not completely understood, probably due to the low numbers of reported patients. As *NDUFAF4* encodes for a complex I assembly factor, we studied the functional consequence of the c.478G > T mutation by analyzing the expression of several subunits of the OXPHOS system as well as the assembly of mitochondrial respiratory complexes and supercomplexes. Our results showed a marked reduction of the steady-state levels of complex I structural components as well as an almost complete absence of fully assembled complex I and complex I-containing supercomplexes (SCI₁III₂IV_n). Moreover, the levels of SCIII₂IV₁ supercomplexes were markedly increased in both patients. These results corroborate the previous observations of Baertling et al. (2017), who also observed an abnormal accumulation of SCIII₂IV₁

Table 2

Main clinical, biochemical and molecular aspects of the previously described NDUFAF4 deficient patients compared with the two siblings of this report.

CLINICAL FEATURES	This report		Saada et al. 2008			Haack et al. 2012	Baertling et al. 2017	
	Patient 1	Patient 2	F72, F511, F359	F334	F528			
Patients	Patient 1	Patient 2	F72, F511, F359	F334	F528			
Age of onset	Neonatal	Neonatal	Neonatal	Neonatal	Neonatal	< 6m	7 m	
Exitus	4.5 m	2 m	9-18 m	Alive at 7y	1st week	NR	Alive at 2y	
Failure to thrive	+	+	+	+	+	+	+	
Facial dysmorphism	+	+	NR	NR	NR	NR	-	
Hypotonia	-	+	+	+	+	+	+	
Irritability	+	+	+	+	NR	NR	+	
Seizures	+	-	2 of the patients			NR	+	
Hypertonia	+	-	NR	NR	NR	NR	+	
Nystagmus/visual problems	+	+	+	+	NR	NR	NR	
Optic atrophy	-	-	NR	+	NR	NR	NR	
Encephalopathy	+	+	+	+	+	+	+	
Brain MRI	Frontal bilateral alterations of the white matter	Not done	Proved in one patient: Grey and white matter atrophy, demyelination, subventricular cysts, Cerebellum atrophy			LeukodystrophySymmetrical basal ganglia and brain stem lesions		Diffuse bilateral alterations in the basal ganglia and thalami
Cardiomyopathy	-	+	-	-	+	-	-	
Liver disease	Steatosis	Hepatomegaly	NR	NR	NR	NR	NR	
Metabolic acidosis	+	+	+	+	+	NR	NR	
High lactate								
Urine	+	+	NR	NR	NR	NR	NR	
Plasma	+	+	+	+	+	+	+	
CSF	+	+	NR	NR	NR	+	+	
Hiperammonemia	+	+	NR	NR	NR	NR	NR	
Increased organic acids in urine	Lactate 2-OH-butyrate 3-MGA Krebs cycle metabolites	Lactate 2-OH-butyrate 3-MGA Krebs cycle metabolites	NR	NR	NR	NR	Lactate Krebs cycle metabolites	
Genotype	c.[558G > T]; [558G > T]	c.[558G > T]; [558G > T]	c.[194T > C]; [194T > C]	c.[194T > C]; [194T > C]	c.[194T > C]; [194T > C]	c.[23G > A]; [23G > A]	c.[7G > C]; [7G > C]	
Effect on protein	p.Glu160Ter	p.Glu160Ter	p.Leu65Pro	p.Leu65Pro	p.Leu65Pro	p.Gly8Asp	p.Ala3Pro	

supercomplexes in an NDUFAF4 patient. These results provide further evidence of an altered CIII and CIV association when the biogenesis of complex I-containing supercomplexes is impaired. Intriguingly, the mitochondrial respiratory chain activities analyzed in muscle and fibroblasts of one of the patients showed, in addition to complex I deficiency, a reduction in the activity of complex IV. In fact, variable alterations in the activities of the OXPHOS complexes have been already observed in other patients who have mutations in complex I assembly factors and structural subunits, such as *NDUFAF3*, *TMEM126B*, *NDUFAF2* and *NDUFA9* (Alston et al., 2016; Ishiyama et al., 2018; Herzer et al., 2010; Baertling et al., 2018). The nature of these alterations is not clear but could be a consequence of the general malfunction of the mitochondrial respiratory chain caused by defective complex I assembly. The consequences of these alterations on mitochondrial function were determined by high-resolution respirometry. We demonstrated that NDUFAF4-defective fibroblasts have an important reduction of the basal and the maximal respiratory capacity, suggesting

that the function of the electron transport chain might be severely compromised. Despite the severe decrease in the assembly and activity of complex I, only a 40% decrease of the basal oxygen consumption was observed in NDUFAF4-defective fibroblasts. The majority of reported patients with complex I deficiency had stronger reductions in the respiratory capacity. However, relatively normal or just slightly altered oxygen consumption rates have been also observed in some patients (Alston et al., 2018; Friederich et al., 2017; Simon et al., 2019). A detailed analysis using substrates for specific OXPHOS complexes could provide further insight to understanding the functional impact of NDUFAF4 deficiency on the respiratory capacity. However, the poor growth of fibroblasts from these patients has been a strong limitation. Consequently, these analyses could not be performed.

Mitochondrial respiration and energy production have been reported to be tightly correlated with mitochondrial morphology and network organization (Simcox et al., 2013). In fact, mitochondrial fragmentation and network abnormalities have been reported in

Table 3

In silico pathogenicity predictions of the previously NDUFAF4 described mutations compared with the mutation of this report.

Genetic variant	Effect on protein	Reference	In silico predictions		
			SIFT4G (Score)	MutationTaster (Probability)	Polyphen-2(Score)
c.7G > C	p.Ala3Pro	(Baertling et al., 2017)	Damaging(0.033)	Polymorphism(0.841)	Probably damaging(0.991)
c.23G > A	p.Gly8Asp	(Haack et al., 2012)	Tolerated(0.38)	Polymorphism(0.999)	Probably damaging(0.662)
c.194 T > C	p.Leu65Pro	(Saada et al., 2008)	Damaging(0.004)	Disease causing(1)	Probably damaging(1)
c.478G > T	p. Glu160Ter	This report	-	Disease causing(1)	-

cdNA nomenclature is based on RefSeq NM_014165. Protein nomenclature is based on Q9P032. SIFT4G – <https://sift.bii.a-star.edu.sg/sift4g/>; MutationTaster – <http://www.mutationtaster.org/>; Polyphen-2 – <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>.

The PolyPhen-2 score ranges from 0.0 (tolerated) to 1.0 (deleterious). For the SIFT score, the amino acid substitution is predicted to be damaging if the score is ≤ 0.05 , and tolerated if the score is > 0.05 . Mutation Taster categorizes the alteration to be either 'disease causing' or 'polymorphism', displaying a probability value for the prediction. Values close to 1 indicates a high 'security' of the prediction.

fibroblasts of patients carrying mutations in genes encoding structural complex I subunits (Koopman et al., 2007). In the present study, we demonstrated that NDUFAF4-deficient fibroblasts have rounder and isolated mitochondria, providing the first evidence of altered mitochondrial morphology and network associated to NDUFAF4 deficiency.

Altogether, we provide insight into the physiopathological basis underlying NDUFAF4 deficiency and expand the clinical spectrum as well as the biochemical abnormalities associated to this disorder. Notably, in addition to the previously reported clinical symptoms, the patients described here showed dysmorphia and 3-MGA aciduria, two features not previously reported in this disease.

Funding

This research was supported by the Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain) through the projects PI16/01048 and PI19/01310 (Co-funded by European Regional Development Fund “A way to make Europe”), Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR) (2014: SGR 393), CERCA Programme/Generalitat de Catalunya and 2013-CNAG Call: 300 exomes to elucidate rare diseases.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

We are grateful to the family involved in this study. We are very grateful to our colleague Paz Briones for all the work she has done to diagnose these patients, as well as for the fruitful contributions and scientific advice. We would also like to thank Xènia Ferrer-Cortès, the advanced optic microscopy facilities of the CCI-UB and CNAG-CRG. This work was performed in the context of the Biomedicine PhD Program of the University of Barcelona (UB).

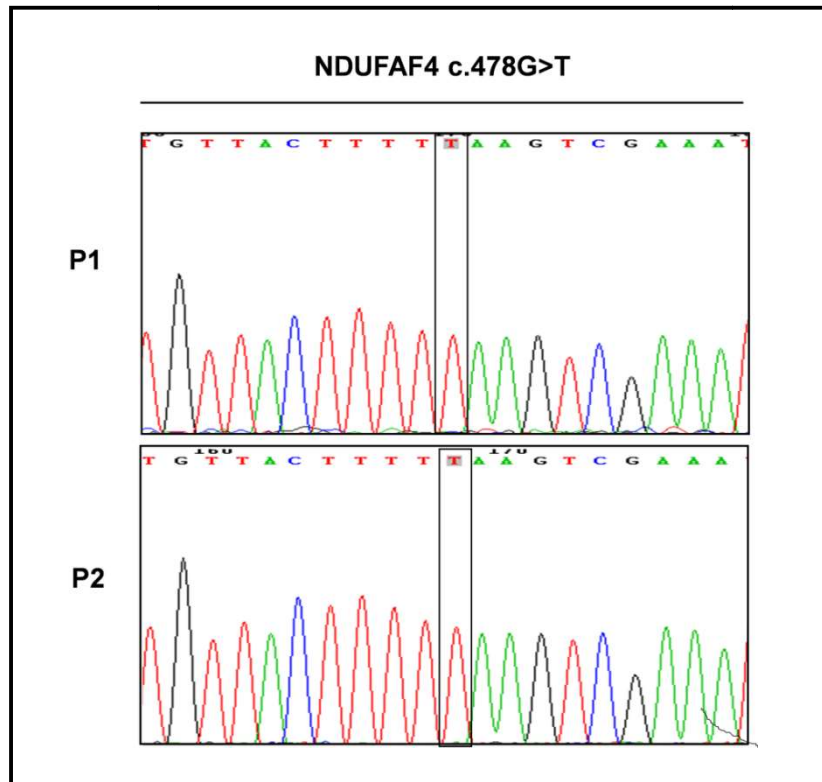
Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.mito.2020.09.003>.

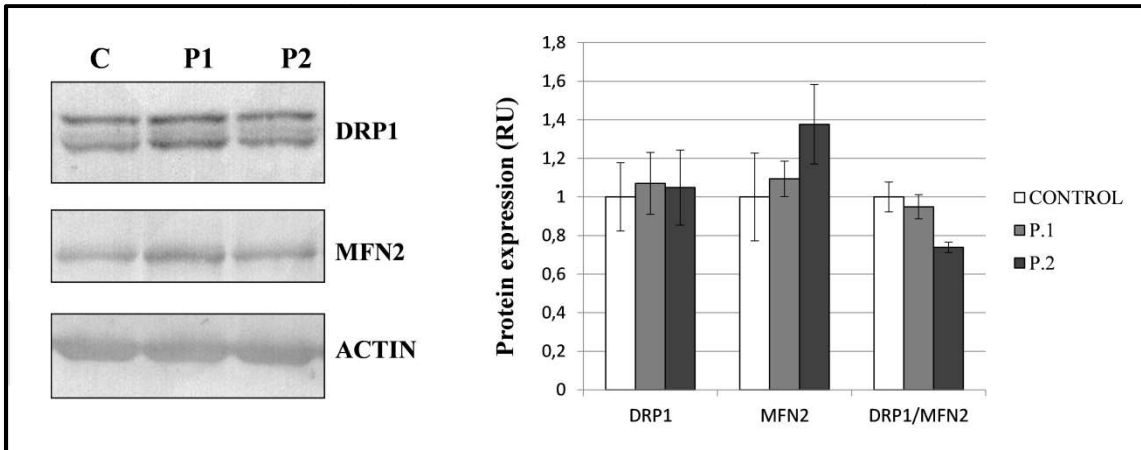
References

- Alban C, Fatale E, Joulani A, Ilin P, Saada A. 2017. The Relationship between Mitochondrial Respiratory Chain Activities in Muscle and Metabolites in Plasma and Urine: A Retrospective Study. *J. Clin. Med.* 6, 31. Doi: 10.3390/jcm6030031.
- Alston CL, Compton AG, Formosa LE, Strecker V, Oláhová M, Haack TB, et al. 2016. Biallelic Mutations in TMEM126B Cause Severe Complex I Deficiency with a Variable Clinical Phenotype. *Am. J. Hum. Genet.* 99:217–27. Doi: 10.1016/j.ajhg.2016.05.021.
- Alston, Charlotte L., Heidler, Juliana, Dibley, Marris G., Kremer, Laura S., Taylor, Lucie S., Fratter, Carl, French, Courtney E., Glasgow, Ruth I.C., Feichtinger, René G., Delon, Isabelle, Pagnamenta, Alistair T., Dolling, Helen, Lemonde, Hugh, Aiton, Neil, Bjørnstad, Alf, Henneke, Lisa, Gärtner, Jutta, Thiele, Holger, Tauchmannova, Katerina, Quaghebeur, Gerardine, Houstek, Josef, Sperl, Wolfgang, Raymond, F. Lucy, Prokisch, Holger, Mayr, Johannes A., McFarland, Robert, Poulton, Joanna, Ryan, Michael T., Wittig, Ilka, Henneke, Marco, Taylor, Robert W., 2018. Bi-allelic Mutations in NDUFA6 Establish Its Role in Early-Onset Isolated Mitochondrial Complex I Deficiency. *Am. J. Human Genet.* 103 (4), 592–601. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.08.013>.
- Baertling, F., Sánchez-Caballero, L., van den Brand, M.A.M., Wintjes, L.T., Brink, M., van den Brandt, F.A., Wilson, C., Rodenburg, R.J.T., Nijtmans, L.G.J., 2017. NDUFAF4 variants are associated with Leigh syndrome and cause a specific mitochondrial complex I assembly defect. *Eur. J. Hum. Genet.* 25 (11), 1273–1277. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2017.133>.
- Baertling, F., Sánchez-Caballero, L., van den Brand, M.A.M., Fung, C.-W., Chan, S.H.-S.,

- Wong, V.C.-N., Hellebrekers, D.M.E., de Coo, I.F.M., Smeitink, J.A.M., Rodenburg, R.J.T., Nijtmans, L.G.J., 2018. NDUFA9 point mutations cause a variable mitochondrial complex I assembly defect: BAERTLING et al. *Clin. Genet.* 93 (1), 111–118.
- Calvo, Sarah E., Clauser, Karl R., Mootha, Vamsi K., 2016. MitoCarta2.0: an updated inventory of mammalian mitochondrial proteins. *Nucleic Acids Res.* 44 (D1), D1251–D1257.
- Fiedorczuk, Karol, Sazanov, Leonid A., 2018. Mammalian Mitochondrial Complex I Structure and Disease-Causing Mutations. *Trends Cell Biol.* 28 (10), 835–867.
- Friederich MW, Erdogan AJ, Coughlin CR, Elos MT, Jiang H, O'Rourke, et al. 2017. Mutations in the accessory subunit NDUFB10 result in isolated complex I deficiency and illustrate the critical role of intermembrane space import for complex I holoenzyme assembly. *Hum. Mol. Genet.* 26: 702–716. Doi: 10.1093/hmg/ddw431.
- Keshavan N, Rahman S. 2018. Natural history of mitochondrial disorders: A systematic review. *Essays Biochem.* 62:423–42. Doi: 10.1042/EBC20170108.
- Guerrero-Castillo, S., Baertling, F., Kownatzki, D., Wessels, H.J., Arnold, S., Brandt, U., Nijtmans, L., 2017. The Assembly Pathway of Mitochondrial Respiratory Chain Complex I. *Cell Metab.* 25 (1), 128–139. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.09.002>.
- Haack, T.B., Madignier, F., Herzer, M., Lamantea, E., Danhauser, K., Invernizzi, F., Koch, J., Freitag, M., Drost, R., Hillier, I., Haberberger, B., Mayr, J.A., Ahting, U., Tiranti, V., Rötig, A., Iuso, A., Horvath, R., Tesarova, M., Baric, I., Uziel, G., Rolinski, B., Sperl, W., Meitinger, T., Zeviani, M., Freisinger, P., Prokisch, H., 2012. Mutation screening of 75 candidate genes in 152 complex I deficiency cases identifies pathogenic variants in 16 genes including NDUFB9. *J. Med. Genet.* 49 (2), 83–89. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2011-100577>.
- Herzer M, Koch J, Prokisch H, Rodenburg R, Rauscher C, Radauer W, et al. 2010. Leigh disease with brainstem involvement in complex I deficiency due to assembly factor NDUFAF2 Defect. *Neuropediatrics.* 41:30–34. Doi: 10.1055/s-0030-1255062.
- Ishiyama A, Muramatsu K, Uchino S, Sakai C, Matsushima Y, Makioka N, et al. 2018. NDUFAF3 variants that disrupt mitochondrial complex I assembly may associate with cavitating leukoencephalopathy. *Clin. Genet.* 93: 1103–06. Doi: 10.1111/cge.13215.
- Koene S, Rodenburg RJ, Van Der Knaap MS, Willemsen MAAP, Sperl W, Laugel V, et al. 2012. Natural disease course and genotype-phenotype correlations in Complex I deficiency caused by nuclear gene defects: What we learned from 130 cases. *J. Inher. Metab. Dis.* 35:737–47. Doi: 10.1007/s10545-012-9492-z.
- Koopman, Werner J.H., Verkaart, Sjoerd, Visch, Henk Jan, van Emst-de Vries, Sjenet, Nijtmans, Leo G.J., Smeitink, Jan A.M., Willems, Peter H.G.M., 2007. Human NADH:ubiquinone oxidoreductase deficiency: radical changes in mitochondrial morphology? *Am. J. Physiol. -Cell Physiol.* 293 (1), C22–C29.
- Kopanos C, Tsiolkas V, Kouris A, et al. 2018. VarSome: The Human Genomic Variant Search Engine. *Oxford Bioinformatics, bty897.* doi: 10.1093/bioinformatics/bty897.
- Pesta, D., Gnaiger, G.E., 2012. High-Resolution Respirometry, OXPHOS Protocols for Human Cells and Permeabilized Fibers from Small Biopsies of Human Muscle. *Humana Press* 25–58. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-382-0_3.
- Quintana E, Gort L, Busquets C, Navarro-Sastre A, Lissens W, Moliner S, et al. Mutational study in the PDHA1 gene of 40 patients suspected of pyruvate dehydrogenase complex deficiency. *Clin Genet* 2010;77:474–82. Doi: 10.1111/j.1399-0004.2009.01313.x.
- Rustin, P., Chretien, D., Bourgeron, T., Gérard, B., Rötig, A., Saudubray, J.M., Munnich, A., 1994. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin. Chim. Acta* 228 (1), 35–51. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(94\)90055-8](https://doi.org/10.1016/0009-8981(94)90055-8).
- Saada, A., Edvardson, S., Rapoport, M., Shaag, A., Amry, K., Miller, C., Lorberboum-Galski, H., Elpeleg, O., 2008. C6ORF6 Is an Assembly Factor of Mitochondrial Complex I. *Am. J. Human Genet.* 82 (1), 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.08.003>.
- Simcox EM, Reeve A, Turnbull D. 2013. Monitoring mitochondrial dynamics and complex I dysfunction in neurons: Implications for Parkinson's disease. *Biochem. Soc. Trans.* 41:1618–24. Doi: 10.1042/BST20130189.
- Simon, Mariella T., Eftekharian, Shaya S., Stover, Alexander E., Osborne, Aaron F., Braffman, Bruce H., Chang, Richard C., Wang, Raymond Y., Steenari, Maija R., Tang, Sha, Hwu, Paul Wuh-Liang, Taft, Ryan J., Benke, Paul J., Abdenur, Jose E., 2019. Novel mutations in the mitochondrial complex I assembly gene NDUFAF5 reveal heterogeneous phenotypes. *Mol. Genet. Metab.* 126 (1), 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2018.11.001>.
- Thompson, K., Collier, J.J., Glasgow, R.I.C., Robertson, F.M., Pyle, A., Blakely, E.L., Alston, C.L., Oláhová, M., McFarland, R., Taylor, R.W., 2020. Recent advances in understanding the molecular genetic basis of mitochondrial disease. *J. Inher. Metab. Dis.* 43 (1), 36–50. <https://doi.org/10.1002/jimd.12104>.
- Tort, F., Ugarteburu, O., Teixidó, L., Gea-Sorlí, S., García-Villoria, J., Ferrer-Cortès, X., Arias, A., Matalonga, L., Gort, L., Ferrer, I., Guitart-Mampel, M., Garrabou, G., Vaz, F.M., Pristoupilova, A., Rodríguez, M.I.E., Beltran, S., Cardellach, F., Wanders, R.J.A., Fillat, C., García-Silva, M.T., Ribes, A., 2019. Mutations in TIMM50 cause severe mitochondrial dysfunction by targeting key aspects of mitochondrial physiology. *Hum. Mutat.* 40 (10), 1700–1712. <https://doi.org/10.1002/humu.23779>.
- Van Coster, R., Smet, J., George, E., De Meirleir, L., Seneca, S., Van Hove, J., Sebire, G., Verhelst, H., De Bleecker, J., Van Vlem, B., Verlooy, P., Leroy, J., 2001. Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis: A Powerful Tool in Diagnosis of Oxidative Phosphorylation Defects. *Pediatr. Res.* 50 (5), 658–665. <https://doi.org/10.1203/00006450-200111000-00020>.
- Wittig, I., Braun, H.-P., Schägger, H., 2006. Blue native PAGE. *Nat. Protoc.* 1 (1), 418–428.
- Wortmann, Saskia B., Kluijtmans, Leo A.J., Rodenburg, Richard J., Sacc, Jörn Oliver, Nouws, Jessica, van Kaauwen, Edwin P., Kleefstra, Tjitske, Tranebjærg, Lisbeth, de Vries, Maaïke C., Isohanni, Pirjo, Walter, Katharina, Alkuraya, Fowzan S., Smuts, Izelle, Reinecke, Carolus J., van der Westhuizen, Francois H., Thorburn, David, Smeitink, Jan A.M., Morava, Eva, Wevers, Ron A., 2013. 3-Methylglutaconic aciduria—lessons from 50 genes and 977 patients. *J. Inher. Metab. Dis.* 36 (6), 913–921. <https://doi.org/10.1007/s10545-012-9579-6>.



Supplementary Figure 2. Identification of *NDUFAF4* mutations. Sanger sequencing validated the c.478G>T mutation in both affected siblings.



SupplementaryFigure3. Steady-state levels of MFN2 and DRP1. Western Blot analysis of DRP1, involved in mitochondrial fission and MFN2, involved in mitochondrial fusion, showed no alterations in the steady state levels of MFN2 and DRP1 in NDUFAF4 deficient cells.

Supplementary Table 1. Mitochondrial respiratory chain (OXPHOS) enzymatic activities in muscle.

Enzyme activities (nmol/min/mg prot)	Muscle	
	Patient 1	Controls
Complex I - NADH: Cytochrome C oxidoreductase	604	112-424
Complex I+III - NADH: Cytochrome C reductase	45	16-39
Complex II+III - Succinate: Cytochrome C oxidoreductase	19,8	7,4-15
Complex IV - Cytochrome C oxidase	65,5	28-85
Citrate synthetase (CS)	176	59-130
Complex I / CS	3.43	1.9-3.26
Complex I+III / CS	0.26*	0.28-0.30
Complex II+III / CS	0.11	0.11-0.13
Complex IV / CS	0.37*	0.47-0.65

OXPHOS, Oxidative phosphorylation system. Number of controls used for each determination: Complex I, 3 controls; Complex I+III, 4 controls; Complex II+III, 4 controls; Complex V, 4 controls; CS, 3 controls. *Altered values.

Supplementary Table 2.Antibodies used in this study

Protein	Reference	Manufacturer
NDUFAF4	SAB2701035	Sigma Aldrich, USA
NDUFA9	459100	ThermoScientific, USA
NDUFS3	ab14711	Abcam, UK
NDUFS2	sc-390596	Santa Cruz Biotechnology, USA
SDHB	MS203	MitoSciences, USA
CORE2	ab14745	Abcam, UK
COX5A	ab110262	Abcam, UK
ATP5A	ab14748	Abcam, UK
α -TUBULIN	ab176560	Abcam, UK
TOMM20	sc-11415	Santa Cruz Biotechnology, USA
DRP1	sc-271583	Santa Cruz Biotechnology, USA
MFN2	ab56889	Abcam, UK
B-ACTIN	A5441	Sigma Aldrich, USA

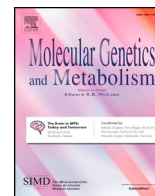
ARTÍCULO 4

Título: Biallelic mutations in *NDUFA8* cause complex I deficiency in two siblings with favorable clinical evolution.

Autores: Tort F, Barredo E, Parthasarathy R, Ugarteburu O, Ferrer-Cortès X, García-Villoria J, Gort L, González-Quintana A, Martín MA, Fernández-Vizarra E, Zeviani M, Ribes A.

Revista: Mol Genet Metab. 2020 Nov; 131(3):349-357. **Factor de impacto:** 4.170 (Q1: Genetics & Heredity)

La deficiencia aislada de complejo I (CI) es el defecto del sistema OXPHOS más frecuente. La secuenciación del exoma celular identificó una mutación en homocigosis en el gen *NDUFA8* (c.293G>T; p.Arg98Leu) en dos hermanos con una evolución clínica favorable. Este gen codifica una subunidad del complejo I. Los pacientes descritos en este trabajo son prácticamente asintomáticos a excepción de leves deficiencias del crecimiento y dificultades del lenguaje, a la edad de 6 y 9 años. Estas observaciones son muy relevantes ya que la mayoría de pacientes con deficiencia de complejo I, incluyendo el único paciente con mutaciones en *NDUFA8* descrito hasta el momento, muestran una evolución clínica muy desfavorable. Los estudios de Western blot demostraron que la expresión de la proteína *NDUFA8* estaba extremadamente reducida en fibroblastos y en tejido muscular de ambos pacientes. Además, se observó la disminución de otras subunidades del complejo I. El estudio realizado mediante Blue-Native PAGE mostró una deficiencia aislada en el ensamblaje y actividad del complejo I, además de defectos en la formación de supercomplejos y acúmulo anormal de los subensamblajes del complejo I. El análisis de inmunofluorescencia en fibroblastos identificó la presencia de mitocondrias más redondeas y de una red mitocondrial menos ramificada que en los controles. Los estudios de complementación funcional demostraron la patogenicidad de las mutaciones, ya que la transducción de cDNA *NDUFA8* “wild-type” a través de un lentivirus restauró los niveles de *NDUFA8* y la actividad enzimática del complejo I en fibroblastos inmortalizados. En resumen, aportamos nuevas evidencias sobre la fisiopatología de la enfermedad causada por mutaciones en *NDUFA8*, que se asocia a la alteración de la morfología mitocondrial, deficiencia de complejo I, defectos en la formación de supercomplejos y una progresión muy leve de la enfermedad.



Regular article

Biallelic mutations in *NDUFA8* cause complex I deficiency in two siblings with favorable clinical evolution



Frederic Tort^a, Estibaliz Barredo^b, Ranjani Parthasarathy^c, Olatz Ugarteburu^a, Xenia Ferrer-Cortès^a, Judit García-Villoria^a, Laura Gort^a, Adrián González-Quintana^d, Miguel A. Martín^d, Erika Fernández-Vizarra^c, Massimo Zeviani^c, Antonia Ribes^{a,*}

^a Secció d'Errors Congènits del Metabolisme-IBC, Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, Hospital Clínic, IDIBAPS, CIBERER, Barcelona, Spain

^b Neurologia Infantil, Hospital Gregorio Marañón, Madrid, Spain

^c MRC-Mitochondrial Biology Unit, University of Cambridge, Cambridge, UK

^d Laboratorio de Enfermedades Mitocondriales, Servicio de Bioquímica, Instituto de Investigación Hospital, 12 de Octubre (imas12), CIBERER, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

NDUFA8

OXPHOS

Exome

Complex I

Mitochondrial morphology

Supercomplexes

ABSTRACT

Isolated complex I (CI) deficiency is the most common cause of oxidative phosphorylation (OXPHOS) dysfunction. Whole-exome sequencing identified biallelic mutations in *NDUFA8* (c.[293G > T]; [293G > T], encoding for an accessory subunit of CI, in two siblings with a favorable clinical evolution. The individuals reported here are practically asymptomatic, with the exception of slight failure to thrive and some language difficulties at the age of 6 and 9 years, respectively. These observations are remarkable since the vast majority of patients with CI deficiency, including the only *NDUFA8* patient reported so far, showed an extremely poor clinical outcome. Western blot studies demonstrated that *NDUFA8* protein was strongly reduced in the patients' fibroblasts and muscle extracts. In addition, there was a marked and specific decrease in the steady-state levels of CI subunits. BN-PAGE demonstrated an isolated defect in the assembly and the activity of CI with impaired supercomplexes formation and abnormal accumulation of CI subassemblies. Confocal microscopy analysis in fibroblasts showed rounder mitochondria and diminished branching degree of the mitochondrial network. Functional complementation studies demonstrated disease-causality for the identified mutation as lentiviral transduction with wild-type *NDUFA8* cDNA restored the steady-state levels of CI subunits and completely recovered the deficient enzymatic activity in immortalized mutant fibroblasts. In summary, we provide additional evidence of the involvement of *NDUFA8* as a mitochondrial disease-causing gene associated with altered mitochondrial morphology, CI deficiency, impaired supercomplexes formation, and very mild progression of the disease.

1. Introduction

Mitochondrial disorders are a large and heterogeneous group of diseases presenting with a wide variety of clinical symptoms, particular metabolic profiles and variable enzymatic defects [1–3]. The pathophysiology of mitochondrial diseases is complex and involves genetic mutations in either mitochondrial or nuclear DNA. Among them, disorders caused by genetic defects directly targeting the oxidative phosphorylation (OXPHOS) system are the most abundant, being isolated CI deficiency the most common cause of OXPHOS dysfunction [4,5]. Complex I is the largest component of the human OXPHOS system, which is composed by five multisubunit enzymatic complexes located

in the inner mitochondrial membrane. Complexes I, III and IV generate an electrochemical gradient that allow the synthesis of the major bulk of cellular ATP, the principal energy-storage molecule. This is done by ATP synthase or complex V, driven by the proton gradient. Complex I contains a total of 45 subunits (14 core and 30 accessory subunits, having two copies of *NDUFAB1*). In addition, 25 auxiliary proteins are known to be necessary for the proper assembly of the functional complex [6]. Seven of the core subunits are encoded by the mitochondrial DNA, whereas the remaining components are encoded by the nuclear genome [7,8]. In human cells, nearly the totality of complex I is associated with respiratory chain complexes III and IV forming the respiratory supercomplexes or 'respirasomes', the physiological relevance

* Corresponding author at: Secció d'Errors Congènits del Metabolisme-IBC, Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, Hospital Clínic, IDIBAPS, CIBERER, C/Mejía Lequerica s/n, Edifici Helios III, Planta baixa, 08028 Barcelona, Spain.

E-mail address: aribes@clinic.cat (A. Ribes).

<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2020.10.005>

Received 9 October 2020; Accepted 9 October 2020

Available online 13 October 2020

1096-7192/ © 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

of which is still a matter of study and debate [9–14].

Clinically, a widespread spectrum of phenotypes has been associated to mitochondrial complex I deficiency (OMIM: 252010). The presentation of the first symptoms usually occurs early after birth or during the pediatric age. Clinical features include neurological abnormalities, such as Leigh syndrome and leukoencephalopathy; lactic acidosis; cardiomyopathy and exercise intolerance. In general, the course of the disease is progressive with a very poor outcome, as the vast majority of patients die in the neonatal period or during infancy [15].

The clinical and genetic heterogeneity of patients with complex I deficiency, together with the absence of a clear genotype–phenotype association, make the diagnosis of these disorders challenging [2,16]. In the last decade, the implementation of next generation sequencing strategies has allowed the identification of an increasing number of disease-causing mutations in genes involved in mitochondrial function [3]. In particular, the identification of patients carrying deleterious mutations in complex I subunits and assembly factors greatly expanded the knowledge of this group of disorders, and also provided new insights about the structure and function of this enzymatic complex.

To date, mutations in 43 genes encoding either for complex I structural subunits or assembly factors have been reported in this heterogeneous group of disorders [3]. Moreover, complex I deficiency can also be secondarily caused by other alterations in the mitochondrial function [5,17].

Here we present two siblings with a newly described mitochondrial disorder caused by mutations in *NDUFA8*, encoding for a structural subunit of complex I. At present only one patient with mutations in *NDUFA8* has been very recently reported in a case with an extremely poor outcome [18]. On the contrary, the siblings reported here showed a favorable clinical evolution being practically asymptomatic at the age of 6 and 9 years, respectively, with the exception of slight failure to thrive and some language difficulties.

Molecular studies performed in patient-derived skin fibroblasts demonstrated altered mitochondrial morphology, complex I deficiency and impaired supercomplexes formation. Functional complementation studies demonstrated disease-causality for the identified mutation as the expression of wild-type *NDUFA8* in immortalized patients' fibroblasts resulted in a complete recovery of complex I protein levels and enzyme functionality.

2. Material and methods

2.1. Patients

Here we present two siblings of first degree consanguineous healthy Spanish parents of gipsy origin. The first born of this family was a girl. Pregnancy and delivery were uneventful, birth weight was 2360 g, Apgar score was 9/10. At 48 h of life she was admitted to the intensive health care unit with generalized hypotonia, respiratory distress, cyanosis and sustained lactic acidosis, which led to the suspicion of inherited metabolic disease. Biochemical studies showed altered plasma alpha-alanine 888 mmol/L (C.V. < 439), lactate 9 mmol/L (C.V. < 2.4), pyruvate 0.247 mmol/L (C.V. < 0,07) and lactate/pyruvate ratio of 37 (C. V. < 25). Echocardiogram revealed a mild hypertrophy of the left ventricle and slight pulmonary hypertension, both evolving favorably in posterior follow-up visits. MRI with spectroscopy did not show relevant alterations except for hyperintensity at T2 signal in the parietal white matter, of unclear pathologic significance.

Follow up during the first year of life showed hypertonic syndrome with slight delay of motor skills, and failure to thrive. Plasma lactate remained high, 10–7 mmol/L. Muscle biopsy investigations revealed signs of congenital myopathy with disproportion of fibers, mitochondrial alterations and altered expression of dystrophin, with expression of utrophin and numerous myoblast-like cells. Muscle biopsy also

Table 1

Mitochondrial respiratory chain enzyme activities in skeletal muscle homogenate of patient 1.

	Patient 1 ^b	Control values ^{b,c}
CI (NADH- decylubiquinone oxidoreductase)	7.3	15–37
CII (Succinate-decylubiquinone oxidoreductase)	24	26–65
CIII (Decyl-ubiquinol cytochrome c oxidoreductase)	39	40–89
CIV (Cytochrome c oxidase)	84	70–228
Citrate synthase (CS) ^a	406	105–350

^a nmol min⁻¹ mg⁻¹ protein.

^b nmol min⁻¹ mg⁻¹ protein enzyme activity expressed in percentage respect to CS activity.

^c Control range, 2.5–97.5 percentile (n: 95).

revealed increased citrate synthase activity, severe decreased activity of the mitochondrial respiratory chain complex I (51% respect to the lower limit of controls - 2.5th percentile -), and very mild reductions (< 8%) in the activities of complex II and complex III (Table 1). No more muscle sample was available to perform blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) or other studies.

At 13 months of age she was admitted again to the hospital due to status epilepticus in the context of a stroke-like episode, requiring the administration of various anticonvulsant drugs. MRI showed multiple acute infarcts in the temporo-occipital regions, the left pallidum and the left caudate nucleus without calcifications of the basal ganglia. At that age treatment with levetiracetam, thiamine, carnitine and biotin was started. Sequencing of mtDNA did not show any alteration including mutations associated to MELAS. At present she is 9 years old, lactic acidosis normalized and no additional episodes of convulsions were recorded. She remains asymptomatic, although with certain degree of muscle hypotrophy. Motor skills are normal but expressive language is delayed.

The second born of this family was a boy. Pregnancy and delivery were uneventful. He was asymptomatic until 4 years old when after anesthesia induction in the context of hypospadias surgery, he presented bradycardia, hypotension and severe pulmonary hypertension with right ventricular dilation. Brain MRI revealed mild bilateral cortical atrophy without other associated alterations. Treatment with Bosentan and Sildenafil as well as treatment for pulmonary hypertension was started. Metabolic studies including organic acids, amino acids and plasma lactate were all normal. However, in the suspicion of mitochondrial disease, like his sister, carnitine, thiamine and biotin were started. Muscle biopsy studies showed mild increase of lipid droplets and isolated fibers with subsarcolemmal oxidative staining. Unfortunately, there was not enough muscle left to perform mitochondrial respiratory chain activities, but we could perform BN-PAGE and western blot in this tissue (see results section). Respiratory chain activities could only be conducted in fibroblast (Supplementary Table 1). Follow-up at 6 years of age showed only slight failure to thrive and mild retardation in verbal skills, with adequate understanding but with problems in language articulation. No seizures were recorded.

2.2. Whole exome sequencing

Informed consent for exome sequencing was obtained from the parents. Whole-exome analysis was performed in the index case in the Centre Nacional d'Anàlisi Genòmica (CNAG-CRG). Exome enrichment was performed using the Nimblegen SeqCap EZ MedExome + mtDNA 47 Mb capture kit followed by sequencing using the Illumina HiSeq 2000 genome analyzer platform. Analysis of the primary data (FASTQ files) was done using the pipeline developed by CNAG. Sequence reads were mapped to Human genome build hg19/GRCh37. Population frequencies were obtained from the 1000 Genomes Project [19], the [20], ExAC [21] and from an internal database. The variant calls were

analyzed using the URDCAT genome-phenome analysis platform (<https://rdcat.cnag.crg.eu/>).

2.3. Cell culture

Human skin fibroblasts obtained from healthy donors and from affected individuals carrying mutations in *NDUFA8* were maintained in MEM (1 g/L glucose, 10% foetal calf serum and 1% penicillin-streptomycin). Immortalized fibroblasts were grown in DMEM High Glucose (4.5 g/L) plus Glutamax® and sodium pyruvate supplemented with 10% foetal calf serum. Cells were grown to confluence in 25cm² flasks, harvested by trypsinization and pelleted by centrifugation or reseed.

2.4. Protein expression analysis

Fibroblasts from both patients and muscle tissue from patient 2 were homogenized as described [22]. Cleared lysates were subjected to SDS-PAGE and electroblotted, and proteins were visualized by immunostaining with specific antibodies followed by colorimetric detection (using the Opti-4CNTM Substrate Kit; Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The antibodies used in this study are indicated in Supplementary table 2.

2.5. Blue native PAGE analysis of mitochondrial respiratory chain complexes and supercomplexes

Mitochondrial enriched pellets from fibroblasts and muscle tissue were obtained as described [23]. To analyze the mitochondrial respiratory chain complexes, the mitochondrial pellets were solubilized in 1% n-dodecyl β-D-maltoside. Extraction of supercomplexes was performed using digitonin (1.2 g digitonin/g protein). Mitochondrial extracts were analyzed by blue native PAGE (BN-PAGE) in 4% to 15% polyacrylamide gradient gels, followed by immunoblotting with specific antibodies (Supplementary Table 2). Colorimetric detection (Opti-4CN™ Substrate Kit, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) allowed visualization of complexes and supercomplexes. In-gel-activity was performed as reported [24].

2.6. Mitochondrial network and mitochondria morphology analysis

Mitochondrial network and mitochondria morphology were analyzed by immunofluorescence followed by confocal microscopy. Briefly, cells were grown on glass coverslips, rinsed in PBS, and fixed for 10 min with 4% paraformaldehyde. The reaction was stopped with NH₄Cl, and samples were permeabilized with 0.1% Triton X-100. Cells were stained with anti-TOMM20 antibody, and coverslips were mounted with Mowiol 4–88 Mounting Medium (Sigma-Aldrich, Sant Luis, MI, USA). Images were obtained using a Leica TCS SL laser scanning confocal spectral microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) and analyzed using ImageJ software. The ratios between mitochondria length and width (aspect ratio, AR) and the degree of mitochondrial network branching (form factor, FF) were calculated. A minimum of 50 cells were analyzed for each sample (Control 1: 69 cells; control 2: 52 cells; Patient 1: 51 cells; Patient 2: 54 cells).

2.7. High-resolution respirometry

High-resolution respirometry was performed at 37 °C using polarographic oxygen sensors in a two-chamber Oxygraph-2 k system according to manufacturer's instructions (OROBOROS Instruments, Innsbruck, Austria). Manual titration of OXPHOS inhibitors (Oligomycin, Antimycin) and uncouplers (CCCP) was performed using Hamilton syringes (Hamilton Company, Reno, NV, USA) as previously described [25]. Data were recorded using the DatLab software v5.1.1.9 (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria).

2.8. Functional complementation studies

For the functional recovery studies fibroblasts were immortalized and a wild-type *NDUFA8* cDNA was expressed by lentiviral transduction. Briefly, the immortalization of the patient-derived cell lines was achieved by lentiviral transduction of the pLOX-Ttag-iresTK vector (Addgene plasmid # 12246; <http://n2t.net/addgene:12246>; RRID:Addgene_12,246) [26]. The *NDUFA8* coding sequence was amplified by PCR from a cDNA template created using total RNA extracted from control human fibroblasts using the TRizol Plus purification kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) and the OneStep RT PCR kit (Qiagen). The insert was cloned into a modified version of the pWPXLd lentiviral expression vector (Addgene plasmid #12258; <http://n2t.net/addgene:12258>; RRID:Addgene_12,258), containing a puromycin resistance cassette, using the Gibson Assembly® kit (New England Biolabs). Lentiviral particles were generated by co-transfection of the expression vector, the packaging psPAX2 (Addgene plasmid #12260) and envelope pMD2.G (Addgene plasmid #12259) vectors in HEK293T packaging cells, using FuGENE 6 (Promega) as the transfection reagent. All lentiviral vectors were a gift from Didier Trono. Target cells were transduced as described [27]. Twenty-four hours after transduction, cells were selected by adding 1 µg/mL of puromycin to the culture medium.

The recovery of complex I (NADH:CoQ₁ oxidoreductase) activity was measured spectrophotometrically as described [28], with slight modifications. The kinetics of the reactions were followed for 3 min in 96-well plates in a final volume of 200 µL. Citrate synthase activity in the same samples was used for normalization.

2.9. Statistics

In all cases, statistical analyses were performed using the two-tailed Student's *t*-test to compare the means of two independent groups of normally distributed data. Data were reported as the mean ± S.E.M. Values of *P* < 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Identification of mutation in *NDUFA8*

To determine the genetic cause of the disease, we performed whole-exome sequencing (WES) in the index case. Consanguinity was reported in the clinical history of this family and it was genetically corroborated by the significant increase in the number of detected homozygosity regions. Therefore, we analyzed the WES data by searching for genetic variants within these regions. The annotated variants were further filtered by frequency (allele frequency < 1% in population databases, including 1000G, gnomAD and ExAC) and by functional impact (high or moderate impact on the encoded protein). Using this approach a homozygous mutation in *NDUFA8* (NM_014222.3), encoding a subunit of the mitochondrial respiratory chain complex I, was identified. The variant (c.293G > T) was predicted to change a conserved arginine to leucine at position 98 of the protein (p.Arg98Leu). *In silico* predictors (Polyphen2, SIFT and Mutation Taster) showed controversial interpretations of pathogenicity for this variant and, according to the criteria of the American College of Medical Genetics (ACMG), it was classified as a variant of uncertain significance (Supplementary Table 3) [29–32]. A comparison of the mutation found in our patient (p.Arg98Leu) with the previously reported *NDUFA8* mutation (p.Arg47Cys) [18] for evolutionary conservation and structural contacts was performed (Fig. 2B). The analysis of the ovine complex I structure (PDB: 6QA9) corroborated the interaction of Arg47 with residues in the NDUFA13 and NDUF5 subunits [18] whereas Arg98 appears not to be involved in intramolecular contacts or in interactions with other complex I subunits. The mutation was confirmed by Sanger sequencing in the index case, as well as in her affected brother. Segregation was confirmed by the carrier status of the healthy parents (Supplementary Fig. 1).

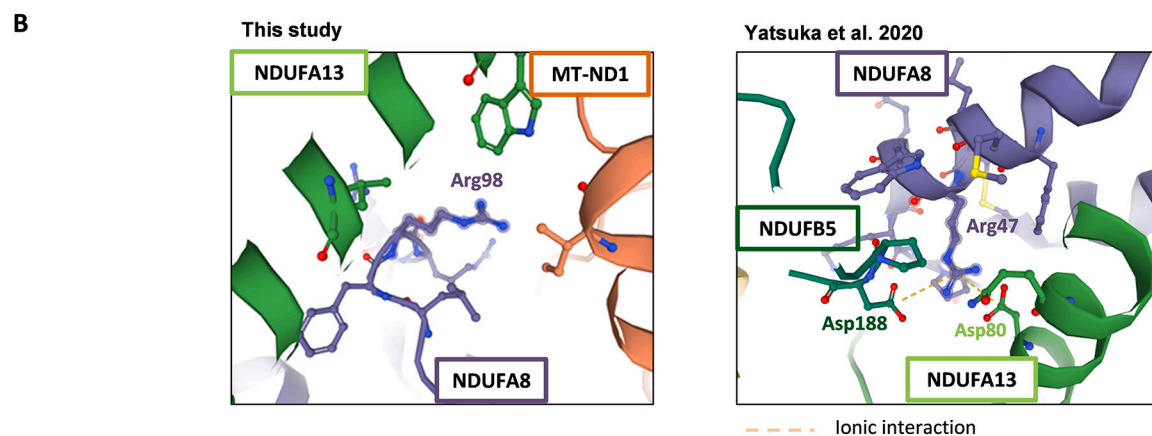
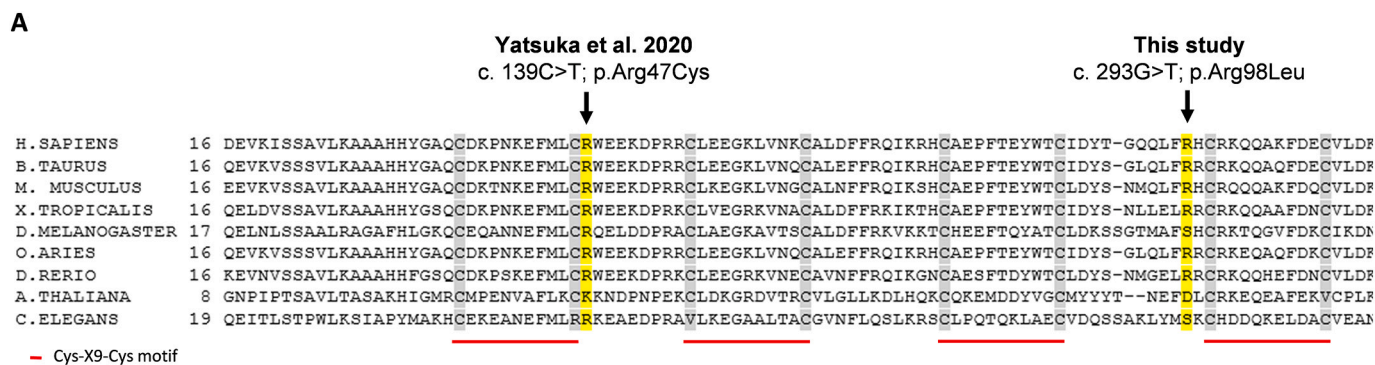


Fig. 1. Alignment of NDUF8 protein and aminoacid conservation. (A) The c.293G > T mutation affects a conserved residue (p.Arg98). The previously reported c.139C > T variant, affecting arginine at position 47, is also shown. (B) Visualization of ovine complex I structure (PDB: 6QA9) showing Arg98 and Arg47 molecular contacts. Asp188 and Asp80 residues of NDUFB5 and NDUF13, respectively, are indicated. Disulfide bonds are indicated in yellow. Ionic interactions are indicated in orange dotted line. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

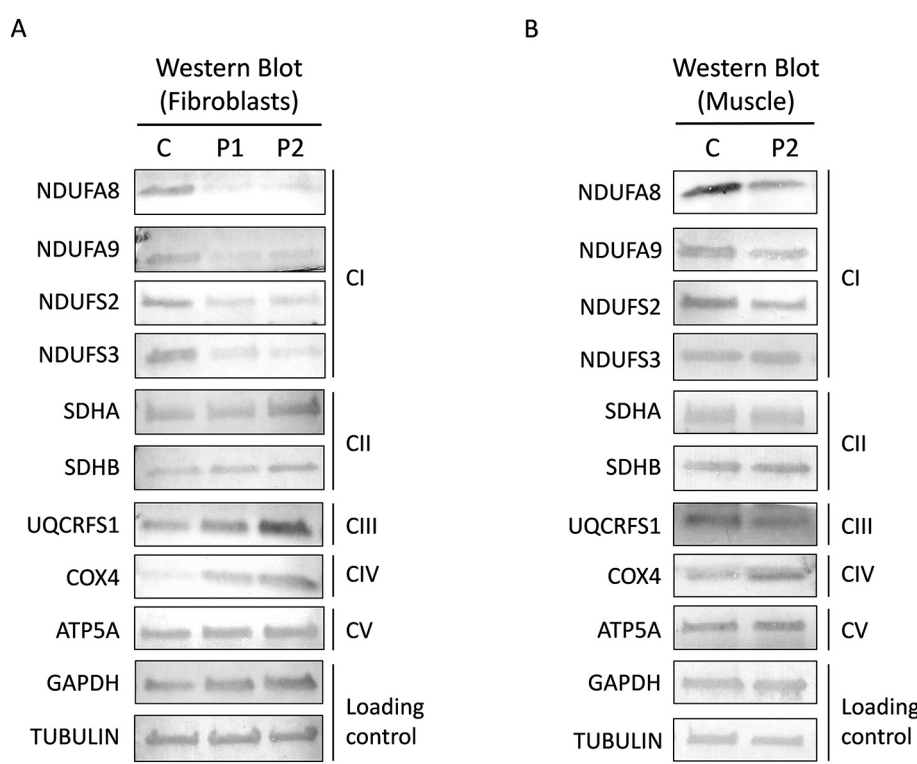


Fig. 2. Steady state levels of OXPHOS subunits in NDUF8 patients' fibroblasts and muscle. (A) Western blot analysis showed reduced levels of NDUF8 protein in patients' fibroblasts. Immunostaining showed decreased levels of complex I subunits (NDUFS2, NDUFS3, NDUF9) but not of components of complex II (SDHA, SDHB), complex III (UQCRRF1) and complex V (ATP5A). The levels of the complex IV subunit COX4 were elevated in both individuals. (B) Western blot studies performed in P2 muscle showed reduced levels of NDUF8, NDUF9 and NDUFS2. The levels of COX4 were increased whereas complex II (SDHA, SDHB), complex III (UQCRRF1) and complex V (ATP5A) subunits were similar to control. C, control; P1, patient1; P2, patient 2.

3.2. Expression of OXPHOS proteins

To determine the effect of the identified mutations, we analyzed NDUFA8 expression by Western blot in patient's fibroblasts and in muscle of patient 2. Interestingly, both siblings had a strong reduction of NDUFA8 expression levels in fibroblasts compared to control cells (Fig. 2A). The analysis of the steady state levels of representative components of OXPHOS complexes I-V in fibroblasts revealed a reduction of complex I subunits (NDUFS2, NDUFS3, NDUFA9). In contrast, the levels of complex II (SDHA, SDHB), complex III (UQCRCF1) and complex V (ATP5A) subunits were similar to those seen in control cells. Interestingly, the steady state levels of complex IV subunit COX4 were elevated in cells from both individuals.

The OXPHOS subunits were also analyzed in muscle extracts from patient 2. In agreement with fibroblasts results, western blot analysis showed a decrease in the levels of NDUFA8, NDUFS2 and NDUFA9 together with an elevation of COX4. The steady state levels of NDUFS3 were not altered and no differences were detected in the levels of complexes II, III and V subunits (Fig. 2B).

3.3. Assembly of OXPHOS complexes and supercomplexes

Since NDUFA8 is a structural subunit of mitochondrial respiratory chain complex I, we analyzed if the assembly of the OXPHOS system was compromised in the patients' fibroblasts. BN-PAGE studies showed a strong defect in the assembly of complex I in both siblings, whereas the remaining complexes (CII-V) were properly assembled (Fig. 3A). Accordingly, in gel activity analysis demonstrated marked reduction of complex I in patient cells (Fig. 3B). The analysis performed in muscle extracts from patient 2 corroborated the isolated complex I assembly deficiency observed in fibroblasts (Fig. 3C).

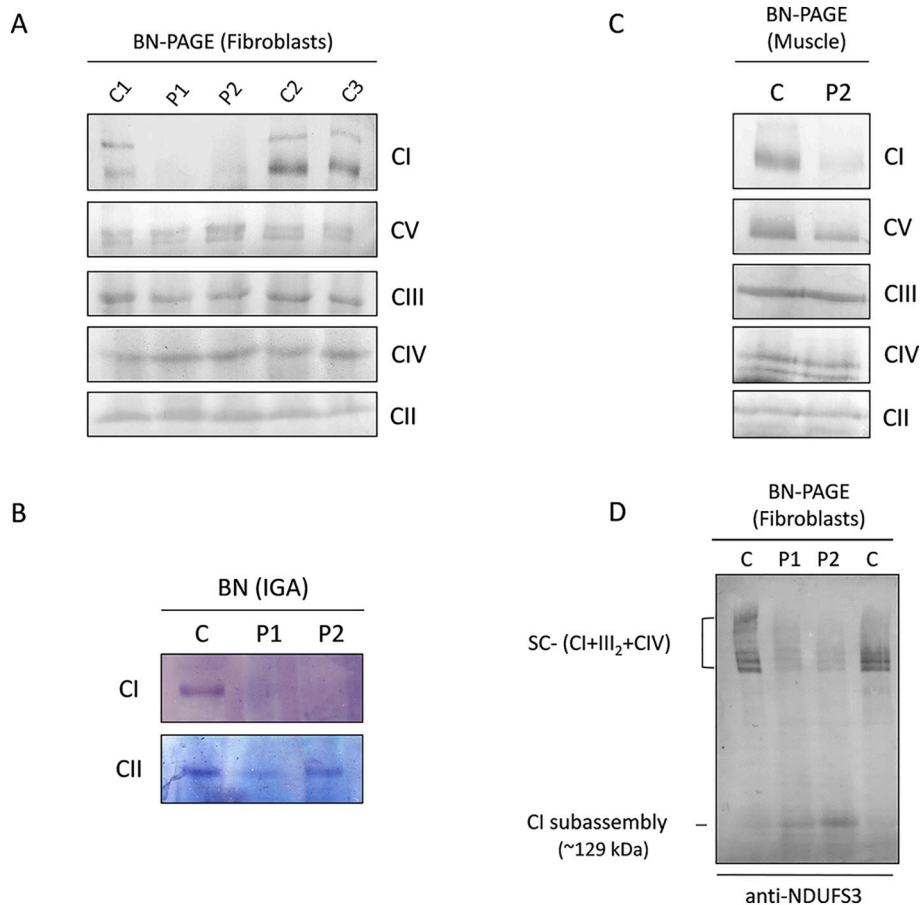


Fig. 3. OXPHOS system assembly in NDUFA8 patient fibroblasts and muscle. (A) BN-PAGE demonstrated a strong defect in the assembly of complex I in P1 and P2 fibroblasts whereas the remaining complexes (CII-V) were unaltered. (B) In-gel activity revealed almost absent complex I enzymatic activity in patients' cells. (C) BN-PAGE showed an isolated defect in the assembly of complex I in muscle extracts obtained from P2. (D) BN-PAGE showed reduced amounts of high molecular weight OXPHOS supercomplexes and accumulation of complex I subassemblies in NDUFA8 fibroblasts. C, control; P1, patient1; P2, patient 2; IGA, in-gel activity; CI-V, complexes I-V; SC, supercomplexes.

A mild detergent, i.e. digitonin, was used to study the assembly of the respiratory supercomplexes by BN-PAGE. This analysis showed a strong defect in the formation of high molecular weight supercomplexes in patients' fibroblasts. Interestingly, an abnormal accumulation of low molecular weight bands, probably corresponding to complex I subassemblies, was also detected in P1 and P2 but not in control fibroblasts (Fig. 3D).

3.4. Mitochondrial network and mitochondria morphology in NDUFA8 fibroblasts

To determine whether mitochondrial network and morphology were altered in NDUFA8 deficient fibroblasts we performed immunostaining and confocal microscopy. By image analysis we calculated Aspect Ratio (AR, indicative of morphology) and Form Factor (FF, indicative of network branching). A statistically significant reduction of AR and FF was observed in NDUFA8 fibroblasts compared to controls ($p < 0.05$), showing rounder and shorter mitochondria as well as reduced network branching in the patients (Fig. 4).

3.5. High-resolution respirometry

We analyzed the mitochondrial respiratory capacity of NDUFA8 fibroblasts by measuring the oxygen consumption rate (OCR) using high-resolution respirometry. Results showed no significant differences in both basal respiratory rate and maximal respiratory capacity induced by CCCP stimulation (Fig. 5).

3.6. Functional complementation of NDUFA8-mutated fibroblasts

To demonstrate the pathogenic effect of the NDUFA8 c.293G > T mutation on complex I assembly and function, we performed functional

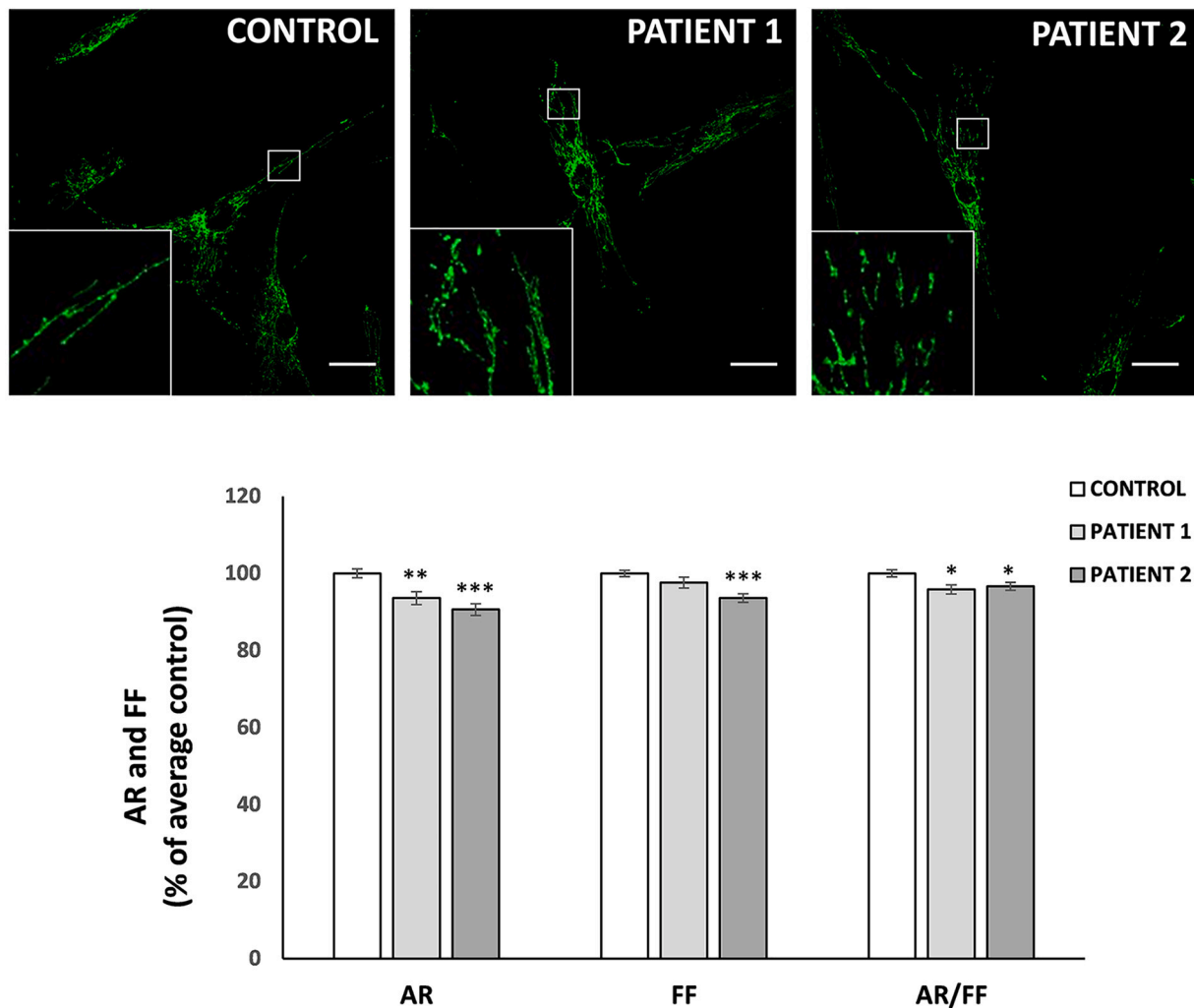


Fig. 4. Mitochondria morphology and network analysis in *NDUFA8* patients' fibroblasts. Mitochondria morphology and network analysis was performed by immunofluorescence using TOMM20 antibody as mitochondrial marker. Results showed a significant reduction of AR (Aspect ratio, indicative of morphology) and FF (Form factor, indicative of mitochondrial network branching) in patients' fibroblasts. Statistical analyses were performed using the two-tailed Student's *t*-test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. The number of analyzed cells was as follows: Control (control 1: 69 cells, control 2: 52 cells), Patient 1: 51 cells, Patient 2: 54 cells.

complementation studies in immortalized fibroblasts of both siblings. Results showed that expression of wild-type *NDUFA8* in the patient cells determined complete recovery of another complex I subunit (*NDUFA9*). The expression of complex II (*SDHA*) and complex IV (*MT-CO2*) components remained unaltered (Fig. 6A). The enzymatic activity of complex I, measured by a spectrophotometric kinetic assay, which was significantly reduced in P1 and P2 naïve fibroblasts, was completely recovered upon lentiviral transduction with wild-type *NDUFA8*, but not with viral particles containing an empty vector (Fig. 6B).

4. Discussion

Complex I deficiency is among the most prevalent biochemical abnormalities observed in patients with pediatric mitochondrial disorders [3]. Here we provide the second description of disease-causing mutations in *NDUFA8* gene, encoding an accessory subunit of mitochondrial complex I [6,33]. The two patients reported here are siblings, one of them presenting early-onset hypotonia, respiratory distress, and lactic acidosis, while the other was asymptomatic until the age of 4 years when symptoms were triggered by anesthesia. The affected individual reported by Yatsuka et al. [18] had psychomotor retardation, microcephaly and epilepsy. Brain MRI showed cerebral atrophy and thinning of the body of the corpus callosum. Although the patient was alive at

26 years of age, he developed severe quadriplegia and became bed-ridden with artificial respiratory management and tube feeding. In contrast, the siblings reported here showed a favorable clinical outcome. Currently, at the age of 6 and 9 years they are almost asymptomatic, showing only slight failure to thrive and some language difficulties. These observations are remarkable since the vast majority of patients with complex I deficiency showed a progression of the disease with an extremely poor outcome, leading to death in the first years of life [15]. The clinical differences between our patients and the patient reported by Yatsuka et al. [18] may be due to the different nature of the identified mutations in each case. *NDUFA8* has been characterized as an accessory subunit located at the intermembrane surface of complex I. This protein plays an important stabilizing role necessary for enzyme assembly [6,33–35]. The siblings reported here are homozygous for a missense variant affecting Arg98 (p.Arg98Leu), a conserved residue in vertebrates but not in other organisms. In contrast, the individual reported by Yatsuka et al. [18] was homozygous for a mutation altering a highly conserved amino acid at position 47 (p.Arg47Cys) Fig. 1. This substitution generates an additional cysteine adjacent to the *NDUFA8* Cys-X9-Cys motif, which is involved in the formation of intramolecular disulfide bonds and in the stabilization of complex I [34]. Thus, this extra Cys residue is proposed to affect the formation of the disulfide bridges in *NDUFA8* [18]. Furthermore, in the ovine complex I structure

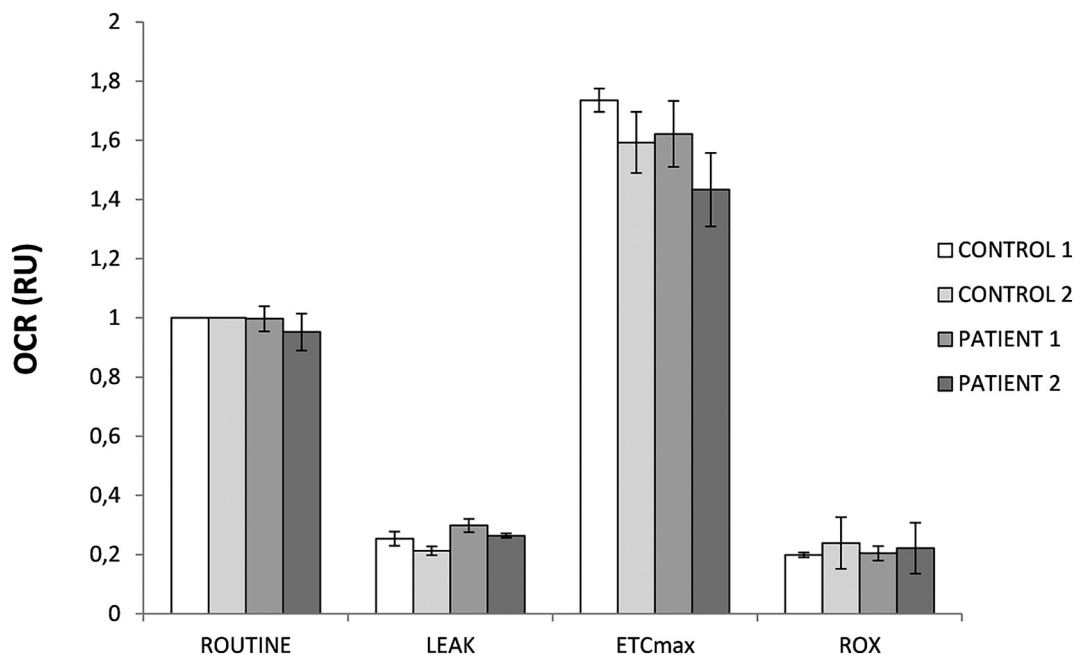


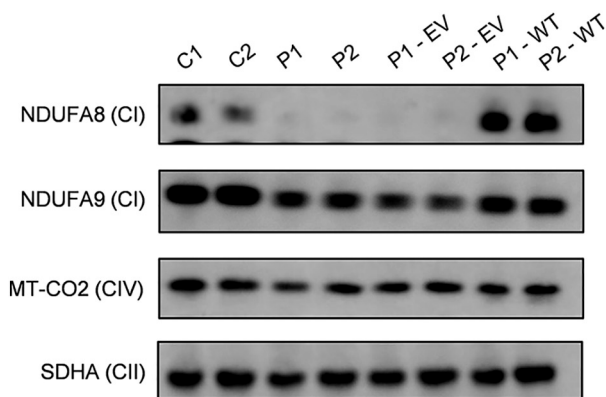
Fig. 5. High resolution respirometry analysis. No significant differences in the oxygen consumption rates were observed between *NDUFA8* and control cells. ROUTINE, oxygen consumption rate at basal state; LEAK, residual oxygen consumption after oligomycin treatment; ETCmax, maximum oxygen consumption induced by CCCP titration; ROX, residual oxygen consumption after antimycin A treatment. Oxygen consumption rate (OCR) is expressed as relative units (RU) of control cells. Statistical analyses were performed using the two-tailed Student's t-test.

(PDB: 6QA9) Arg47 interacts with *NDUFA13* and *NDUFB5* [18]. On the contrary, Arg98 may not be involved in interactions with other complex I subunits (Fig. 1B). However, our functional data demonstrated that the identified mutation may affect *NDUFA8* protein stability, as seen by the low levels of protein detected by western blot, and has an important impact on complex I assembly and activity.

To determine the consequences of the *NDUFA8* variant (c.293G > T), identified in our patients, a detailed analysis of the mitochondrial function was performed in primary skin fibroblasts. As mitochondrial physiology is tightly associated with the maintenance of

proper mitochondrial structure [36,37], we examined the mitochondrial network organization and morphology in *NDUFA8* patient's cells. Similarly to other complex I deficiencies [38], *NDUFA8* fibroblasts showed slight but significant morphological alterations, such as rounder and more isolated mitochondria compared to control cells. The physiopathological significance of these alterations is not clear since it has been reported that the mitochondrial morphology phenotypes associated to complex I deficiencies are variable, ranging from severe to almost normal or even completely normal morphology parameters [38–40].

A



B

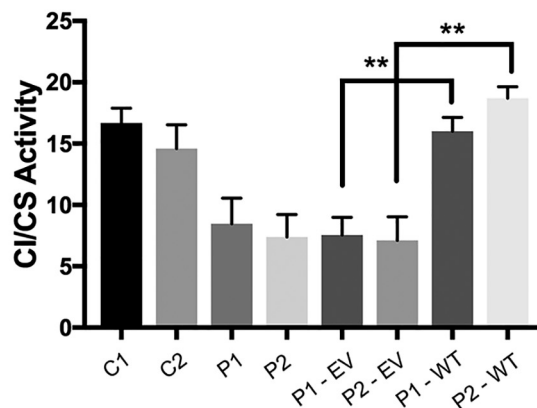


Fig. 6. Functional complementation of *NDUFA8*-mutated fibroblasts. (A) Lentiviral transduction with wild-type *NDUFA8* cDNA restored the expression of *NDUFA8* as well as the steady-state levels of *NDUFA9*. The expression of other OXPHOS components (*SDHA*, complex II; *MTCO2*, complex IV) was not affected. (B) Complex I activity was recovered upon lentiviral transduction with wild-type *NDUFA8* but not with viral particles containing an empty vector. Statistical analyses were performed using the two-tailed Student's t-test (***p* < 0.01). C1-2, control fibroblasts; P1, patient 1; P2, patient 2; P-EV, patient cells transduced with empty vector; P2-WT, patient cells transduced with wild-type *NDUFA8* cDNA; CI/CS, complex I activity normalized with citrate synthase.

The particular role of NDUFA8 has been illustrated in a comprehensive study using knock-out cell lines for different complex I accessory subunits, demonstrating its requirement for the proper assembly of this complex [6]. Therefore, we analyzed the expression of several complex I subunits in fibroblasts from both patient's as well as in muscle biopsy from the younger sibling. Our results showed a marked reduction in the steady state levels of NDUFA8 as well as in other complex I subunits. In agreement with these observations, a severe reduction of fully assembled complex I was detected in both tissues, whereas the other OXPHOS complexes remained unaltered. Notably, an abnormal accumulation of low molecular weight complex I intermediates was also detected in patients cells. These observations fit well with current complex I assembly models that propose a step-wise process involving the formation of different functional modules (designated as N-, Q- and P-modules) [41]. According to these authors NDUFA8 is incorporated to the preformed Q-module and, together with other accessory subunits, allows the formation of the Q/P intermediates during complex I assembly. The subcomplexes detected in fibroblasts of our patients are indeed consistent with the 129 kDa Q-module subassemblies reported by Guerrero-Castillo and coworkers, as they were detected using an antibody against NDUFS3, a subunit incorporated at the very early stages of Q module formation [41]. Complex I is mostly found associated with other OXPHOS components, either binding to dimeric complex III to form CI/III₂ supercomplexes or to a variable number of complex IV units to form CI/III₂/IV_n supercomplexes, forming the so-called respirasome [41–43]. We wondered whether, in addition to the isolated complex I deficiency observed in NDUFA8 patients' cells, the mitochondrial supercomplexes could also be affected. Consistent with the partial loss of complex I observed in our patients we demonstrated that the levels of fully assembled CI/III₂/IV_n supercomplexes were severely reduced, albeit not completely absent, in both NDUFA8 mutant individuals. These observations, together with the fact that reduced, but detectable, amounts of NDUFA8 are present in patients' cells, suggested the possibility that the mutated protein could be still incorporated into the supercomplexes. This hypothesis could explain the fact that fully built supercomplexes, but not faster migrating forms, are detected in the patients. The structural proximity of the complexes in the supercomplex structures is supposed to provide a catalytical advantage to the respiratory chain [10], although this hypothesis has been contested, since the distance between the different catalytic centers is large enough to allow free diffusion of the mobile electron carriers [44]. Therefore, it is not clear whether this possible functional advantage or the small remaining amounts of complex I and supercomplexes detected in the patients, could provide a potential explanation for the relatively normal basal and CCCP-stimulated oxygen consumption rates. This phenomenon has been occasionally reported in individuals with complex I deficiency [45–47].

In order to demonstrate the pathogenic effect caused by the c.293G > T variant, complementation studies were performed in patients' fibroblasts. Lentiviral transduction with wild-type NDUFA8 cDNA restored the steady-state levels of complex I subunits and completely recovered the deficient enzymatic activity in immortalized mutant fibroblasts. Although the c.293G > T variant targets an amino acid conserved in vertebrates, *in silico* predictions for the p.Arg98Leu substitution were non-conclusive, ranging from benign to pathogenic effects. Indeed, according to the ACMG criteria, the c.293G > T variant was classified as a “variant of uncertain significance”. The co-segregation of this variant in both affected siblings together with the functional data establishing *in vivo* evidence supporting the damaging effect, fully fit the PS3 and PP1 criteria of the ACMG. Altogether, our results demonstrated that the homozygous c.293G > T mutation found in NDUFA8 is the cause of the biochemical complex I defect and the disease in our patients. Therefore, the variant c.293G > T should now be reclassified as “pathogenic”.

5. Conclusions

In summary, we provide additional evidence of the involvement of NDUFA8 as a mitochondrial disease gene associated with altered mitochondrial morphology, complex I deficiency, impaired

supercomplexes formation, and very mild progression of the disease. We also highlight the usefulness of next generation sequencing and the fundamental importance of functional validation studies to identify new disease-causing variants, particularly in diseases with a wide phenotypic spectrum, such as mitochondrial disorders.

Financial disclosure

The authors have no financial relationships relevant to this article to disclose.

Potential conflicts of interest

The authors have no conflicts of interest to disclose.

Ethics

All procedures were approved by the ethics committee of the Hospital Clínic, Barcelona.

Acknowledgements and funding

This research was supported by the Instituto de Salud Carlos III (PI16/01048; PI18/01374; PI19/01310) (Co-funded by European Regional Development Fund “A way to make Europe”) and the Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), an initiative of the Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain). This study was supported by the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR) (2014: SGR 393) and the CERCA Programme/Generalitat de Catalunya. The present study was supported by the Departament de Salut, Generalitat de Catalunya (URDCAT project, SLT002/16/00174). We would like to thank CNAG-CRG and the advanced optic microscopy facilities of the CCIT-UB for excellent technical assistance. This work was performed in the context of the Biomedicine PhD Program of the University of Barcelona (UB).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2020.10.005>.

References

- [1] G.S. Gorman, P.F. Chinnery, S. DiMauro, M. Hirano, Y. Koga, R. McFarland, A. Suomalainen, D.R. Thorburn, M. Zeviani, D.M. Turnbull, Mitochondrial diseases, *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2 (2016) 1–23, <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.80>.
- [2] S. Parikh, A. Karaa, A. Goldstein, E.S. Bertini, P.F. Chinnery, J. Christodoulou, B.H. Cohen, R.L. Davis, M.J. Falk, C. Fratter, R. Horvath, M.K. Koenig, M. Mancuso, S. McCormack, E.M. McCormick, R. McFarland, V. Nesbitt, M. Schiff, H. Steele, S. Stockler, C. Sue, M. Tarnopolsky, D.R. Thorburn, J. Vockley, S. Rahman, Diagnosis of possible mitochondrial disease: an existential crisis, *J. Med. Genet.* 56 (2019) 123–130, <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2018-105800>.
- [3] K. Thompson, J.J. Collier, R.I.C. Glasgow, F.M. Robertson, A. Pyle, E.L. Blakely, C.L. Alston, M. Oláhová, R. McFarland, R.W. Taylor, Recent advances in understanding the molecular genetic basis of mitochondrial disease, *J. Inher. Metab. Dis.* 43 (2020) 36–50, <https://doi.org/10.1002/jimd.12104>.
- [4] J. Tan, M. Wagner, S.L. Stenton, T.M. Strom, S.B. Wortmann, H. Prokisch, T. Meitinger, K. Oexle, T. Klopstock, Lifetime risk of autosomal recessive mitochondrial disorders calculated from genetic databases, *EBioMedicine.* 54 (2020) 102730, <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102730>.
- [5] E. Fassone, S. Rahman, Complex I deficiency: clinical features, biochemistry and molecular genetics, *J. Med. Genet.* 49 (2012) 578–590, <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2012-101159>.
- [6] D.A. Stroud, E.E. Surgenor, L.E. Formosa, B. Reljic, A.E. Frazier, M.G. Dibley, L.D. Osellame, T. Stait, T.H. Beilharz, D.R. Thorburn, A. Salim, M.T. Ryan, Accessory subunits are integral for assembly and function of human mitochondrial complex I, *Nature.* 538 (2016) 123–126, <https://doi.org/10.1038/nature19754>.
- [7] L.E. Formosa, M.G. Dibley, D.A. Stroud, M.T. Ryan, Building a complex complex: assembly of mitochondrial respiratory chain complex I, *Semin. Cell Dev. Biol.* 76 (2018) 154–162, <https://doi.org/10.1016/j.semdb.2017.08.011>.
- [8] K. Fiedorczuk, L.A. Sazanov, Mammalian mitochondrial complex I structure and disease-causing mutations, *Trends Cell Biol.* 28 (2018) 835–867, <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.06.006>.
- [9] E. Lapuente-Brun, R. Moreno-Loshuertos, R. Acín-Pérez, A. Latorre-Pellicer,

- C. Colaś, E. Balsa, E. Perales-Clemente, P.M. Quirós, E. Calvo, M.A. Rodríguez-Hernández, P. Navas, R. Cruz, Á. Carracedo, C. López-Otín, A. Pérez-Martos, P. Fernández-Silva, E. Fernández-Vizarrá, J.A. Enríquez, Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain, *Science*. 340 (2013) 1567–1570, <https://doi.org/10.1126/science.1230381>.
- [10] J.A. Enríquez, Supramolecular organization of respiratory complexes, *Annu. Rev. Physiol.* 78 (2016) 533–561, <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105031>.
- [11] H. Schägger, K. Pfeiffer, Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria, *EMBO J.* 19 (2000) 1777–1783, <https://doi.org/10.1093/emboj/19.8.1777>.
- [12] T. Lobo-Jarne, C. Ugalde, Respiratory chain supercomplexes: structures, function and biogenesis, *Semin. Cell Dev. Biol.* 76 (2018) 179–190, <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.07.021>.
- [13] D. Milenkovic, J.N. Blaza, N.G. Larsson, J. Hirst, The enigma of the respiratory chain supercomplex, *Cell Metab.* 25 (2017) 765–776, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.03.009>.
- [14] M. Protasoni, R. Pérez-Pérez, T. Lobo-Jarne, M.E. Harbour, S. Ding, A. Peñas, F. Diaz, C.T. Moraes, I.M. Fearnley, M. Zeviani, C. Ugalde, E. Fernández-Vizarrá, Respiratory supercomplexes act as a platform for complex III-mediated maturation of human mitochondrial complexes I and IV, *EMBO J.* 39 (2020) 1–19, <https://doi.org/10.15252/emboj.2019102817>.
- [15] S. Koene, R.J. Rodenburg, M.S. Van Der Knaap, M.A.A.P. Willemsen, W. Sperl, V. Laugel, E. Ostergaard, M. Tarnopolsky, M.A. Martin, V. Nesbitt, J. Fletcher, S. Edvardson, V. Procaccio, A. Slama, L.P.W.J. Van Den Heuvel, J.A.M. Smeitink, Natural disease course and genotype-phenotype correlations in complex I deficiency caused by nuclear gene defects: what we learned from 130 cases, *J. Inher. Metab. Dis.* 35 (2012) 737–747, <https://doi.org/10.1007/s10545-012-9492-z>.
- [16] E.J. Tucker, A.G. Compton, S.E. Calvo, D.R. Thorburn, The molecular basis of human complex I deficiency, *IUBMB Life* 63 (2011) 669–677, <https://doi.org/10.1002/iub.495>.
- [17] R.J. Rodenburg, Mitochondrial complex I-linked disease, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1857 (2016) 938–945, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.02.012>.
- [18] Y. Yatsuka, Y. Kishita, L.E. Formosa, M. Shimura, F. Nozaki, T. Fujii, K.R. Nitta, A. Ohtake, K. Murayama, M.T. Ryan, Y. Okazaki, A homozygous variant in NDUFA8 is associated with developmental delay, microcephaly, and epilepsy due to mitochondrial complex I deficiency, *Clin. Genet.* 98 (2020) 155–165, <https://doi.org/10.1111/cge.13773>.
- [19] The 1000 Genomes Project Consortium, A global reference for human genetic variation, *Nature* 526 (2015) 68–74, <https://doi.org/10.1038/nature15393>.
- [20] K.J. Karczewski, L.C. Francioli, G. Tiao, B.B. Cummings, J. Alfoldi, Q. Wang, R.L. Collins, K.M. Laricchia, A. Ganna, D.P. Birnbaum, L.D. Gauthier, H. Brand, M. Solomonson, N.A. Watts, D. Rhodes, M. Singer-Berk, E.M. England, E.G. Seaby, J.A. Kosmicki, R.K. Walters, K. Tashman, Y. Farjoun, E. Banks, T. Poterba, A. Wang, C. Seed, N. Whiffin, J.X. Chong, K.E. Samocha, E. Pierce-Hoffman, Z. Zappala, A.H. O'Donnell-Luria, E.V. Minikel, B. Weisburd, M. Lek, J.S. Ware, C. Vittal, I.M. Armean, L. Bergelson, K. Cibulskis, K.M. Connolly, M. Covarrubias, S. Donnelly, S. Ferriera, S. Gabriel, J. Gentry, N. Gupta, T. Jeandet, D. Kaplan, C. Llanwarne, R. Munshi, S. Novod, N. Petrillo, D. Roazen, V. Ruano-Rubio, A. Saltzman, M. Schleicher, J. Soto, K. Tibbetts, C. Tolonen, G. Wade, M.E. Talkowski, T.G.A.D. Consortium, B.M. Neale, M.J. Daly, D.G. MacArthur, Variation across 141,456 human exomes and genomes reveals the spectrum of loss-of-function intolerance across human protein-coding genes, *BioRxiv* (2019), <https://doi.org/10.1101/531210>.
- [21] M. Lek, K.J. Karczewski, E.V. Minikel, K.E. Samocha, E. Banks, T. Fennell, A.H. O'Donnell-Luria, J.S. Ware, A.J. Hill, B.B. Cummings, T. Tukiainen, D.P. Birnbaum, J.A. Kosmicki, L.E. Duncan, K. Estrada, F. Zhao, J. Zou, E. Pierce-Hoffman, J. Berghout, D.N. Cooper, N. DeLuca, M. DePristo, R. Do, J. Flannick, M. Fromer, L. Gauthier, J. Goldstein, N. Gupta, D. Howrigan, A. Kiezun, M.I. Kurki, A.L. Moonshine, P. Natarajan, L. Orozco, G.M. Peloso, R. Poplin, M.A. Rivas, V. Ruano-Rubio, S.A. Rose, D.M. Ruderfer, K. Shakir, P.D. Stenson, C. Stevens, B.P. Thomas, G. Tiao, M.T. Tusie-Luna, B. Weisburd, H.H. Won, D. Yu, D.M. Altshuler, D. Ardissino, M. Boehnke, J. Danesh, S. Donnelly, R. Elosua, J.C. Florez, S.B. Gabriel, G. Getz, S.J. Glatt, C.M. Hultman, S. Kathiresan, M. Laakso, S. McCarrroll, M.I. McCarthy, D. McGovern, R. McPherson, B.M. Neale, A. Palotie, S.M. Purcell, D. Saleheen, J.M. Scharf, P. Sklar, P.F. Sullivan, J. Tuomilehto, M.T. Tsuang, H.C. Watkins, J.G. Wilson, M.J. Daly, D.G. MacArthur, Exome Aggregation Consortium, Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans, *Nature* 536 (2016) 285–291, <https://doi.org/10.1038/nature19057>.
- [22] F. Tort, O. Ugarteburu, L. Texidó, S. Gea-Sorlí, J. García-Villoria, X. Ferrer-Cortés, Á. Arias, L. Matalonga, L. Gort, I. Ferrer, M. Guitart-Mampel, G. Garrabou, F.M. Vaz, A. Pristoupilova, M.I.E. Rodríguez, S. Beltran, F. Cardellach, R.J.A. Wanders, C. Fillat, M.T. García-Silva, A. Ribes, Mutations in TIMM50 cause severe mitochondrial dysfunction by targeting key aspects of mitochondrial physiology, *Hum. Mutat.* 40 (2019) 1700–1712, <https://doi.org/10.1002/humu.23779>.
- [23] H. Wittig, I. Braun, H.P. Schägger, Blue native PAGE, *Nat. Protoc.* (2006) 418–422.
- [24] R. Van Coster, J. Smet, E. George, L. De Meirleir, S. Seneca, J. Van Hove, G. Sebire, H. Verhelst, J. De Bleecker, B. Van Vlem, P. Verlooy, J. Leroy, Blue native polyacrylamide gel electrophoresis: a powerful tool in diagnosis of oxidative phosphorylation defects, *Pediatr. Res.* 50 (2001) 658–665, <https://doi.org/10.1203/00006450-200111000-00020>.
- [25] D. Pesta, E. Gnaiger, High-Resolution Respirometry: OXPHOS Protocols for Human Cells and Permeabilized Fibers from Small Biopsies of Human Muscle, Humana Press, 2012, pp. 25–58, https://doi.org/10.1007/978-1-61779-382-0_3.
- [26] P. Salmon, J. Oberholzer, T. Occhiodoro, P. Morel, J. Lou, D. Trono, Reversible immortalization of human primary cells by lentivector-mediated transfer of specific genes, *Mol. Ther.* 2 (2000) 404–414, <https://doi.org/10.1006/mthe.2000.0141>.
- [27] E. Perales-Clemente, M.P. Bayona-Bafaluy, A. Pérez-Martos, A. Barrientos, P. Fernández-Silva, J.A. Enríquez, Restoration of electron transport without proton pumping in mammalian mitochondria, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 18735–18739, <https://doi.org/10.1073/pnas.0810518105>.
- [28] D.M. Kirby, D.R. Thorburn, D.M. Turnbull, R.W. Taylor, Biochemical assays of respiratory chain complex activity, *Methods Cell Biol.* 80 (2007) 93–119, [https://doi.org/10.1016/B0091-679X\(06\)80004-X](https://doi.org/10.1016/B0091-679X(06)80004-X).
- [29] J.M. Schwarz, D.N. Cooper, M. Schuelke, D. Seelow, Mutationtaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age, *Nat. Methods* 11 (2014) 361–362, <https://doi.org/10.1038/nmeth.2890>.
- [30] R. Vaser, S. Adusumalli, S.N. Leng, M. Sikic, P.C. Ng, SIFT missense predictions for genomes, *Nat. Protoc.* 11 (2016) 1–9, <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.123>.
- [31] I.A. Adzhubei, S. Schmidt, L. Peshkin, V.E. Ramensky, A. Gerasimova, P. Bork, A.S. Kondrashov, S.R. Sunyaev, A method and server for predicting damaging missense mutations, *Nat. Methods* 7 (2010) 248–249, <https://doi.org/10.1038/nmeth0410-248>.
- [32] L.S. Richards, A. Nazneen, B. Sherri, B. David, S. Das, J. Gastier-Foster, W.W. Grody, M. Hegde, E. Lyon, E. Spector, K. Voelkerding, H.L. Rehm, S. Richards, N. Aziz, S. Bale, D. Bick, S. Das, J. Gastier-Foster, W.W. Grody, M. Hegde, E. Lyon, E. Spector, K. Voelkerding, H.L. Rehm, Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American college of medical genetics and genomics and the association for molecular pathology sue, *Genet. Med.* 17 (2015) 405–424, <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>.
- [33] J. Zhu, K.R. Vinothkumar, J. Hirst, Structure of mammalian respiratory complex I, *Nature*. 536 (2016) 354–358, <https://doi.org/10.1038/nature19095>.
- [34] R. Szklarczyk, B.F.J. Wanschers, S.B. Nabuurs, J. Nouws, L.G. Nijtmans, M.A. Huynen, NDUFB7 and NDUFA8 are located at the intermembrane surface of complex I, *FEBS Lett.* 585 (2011) 737–743, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.01.046>.
- [35] K. Fiedorczuk, J.A. Letts, G. Degliesposti, K. Kaszuba, M. Skehel, L.A. Sazanov, Atomic structure of the entire mammalian mitochondrial complex I, *Nature*. 538 (2016) 406–410, <https://doi.org/10.1038/nature19794>.
- [36] A. Kasahara, L. Scorrano, Mitochondria: from cell death executioners to regulators of cell differentiation, *Trends Cell Biol.* 24 (2014) 761–770, <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.08.005>.
- [37] S. Cogliati, J.A. Enríquez, L. Scorrano, Mitochondrial cristae: where beauty meets functionality, *Trends Biochem. Sci.* 41 (2016) 261–273, <https://doi.org/10.1016/j.tics.2016.01.001>.
- [38] W.J.H. Koopman, S. Verkaar, H.J. Visch, S. Van Emst-De Vries, L.G.J. Nijtmans, J.A.M. Smeitink, P.H.G.M. Willems, Human NADH:ubiquinone oxidoreductase deficiency: radical changes in mitochondrial morphology? *Am. J. Phys. Cell Phys.* 293 (2007) 22–29, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00194.2006>.
- [39] P.H. Willems, J.A. Smeitink, W.J. Koopman, Mitochondrial dynamics in human NADH:ubiquinone oxidoreductase deficiency, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41 (2009) 1773–1782, <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.01.012>.
- [40] O. Ugarteburu, M.T. Garcia-Silva, L. Aldamiz-Echevarria, L. Gort, J. Garcia-Villoria, F. Tort, A. Ribes, Complex I deficiency, due to NDUFA4 mutations, causes severe mitochondrial dysfunction and is associated to early death and dysmorphism, *Mitochondrion*. 55 (2020) 78–84, <https://doi.org/10.1016/j.mito.2020.09.003>.
- [41] S. Guerrero-Castillo, F. Baertling, D. Kownatzki, H.J. Wessels, S. Arnold, U. Brandt, L. Nijtmans, The assembly pathway of mitochondrial respiratory chain complex I, *Cell Metab.* 25 (2017) 128–139, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.09.002>.
- [42] R. Guo, S. Zong, M. Wu, J. Gu, M. Yang, Architecture of human mitochondrial respiratory megacomplex I2III2IV2, *Cell* 170 (2017) 1247–1257 (e12), <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.050>.
- [43] M. Wu, J. Gu, R. Guo, Y. Huang, M. Yang, Structure of mammalian respiratory Supercomplex IIIIII2IV1, *Cell*. 167 (2016) 1598–1609, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.012>.
- [44] J. Hirst, Open questions: respiratory chain supercomplexes-why are they there and what do they do? *BMC Biol.* 16 (2018) 5–8, <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0577-5>.
- [45] C.L. Alston, J. Heidler, M.G. Dibley, L.S. Kremer, L.S. Taylor, C. Fratter, C.E. French, R.I.C. Glasgow, R.G. Feichtinger, I. Delon, A.T. Pagnamenta, H. Dolling, H. Lemonde, N. Aiton, A. Bjørnstad, L. Henneke, J. Gärtner, H. Thiele, K. Tauchmannova, G. Quaghebeur, J. Houstek, W. Sperl, F.L. Raymond, H. Prokisch, J.A. Mayr, R. McFarland, J. Poulton, M.T. Ryan, I. Wittig, M. Henneke, R.W. Taylor, Bi-allelic mutations in NDUFA6 establish its role in early-onset isolated mitochondrial complex I deficiency, *Am. J. Hum. Genet.* 103 (2018) 592–601, <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.08.013>.
- [46] M.W. Friederich, A.J. Erdogan, C.R. Coughlin, M.T. Elos, H. Jiang, C.P. O'Rourke, M.A. Lovell, E. Wartchow, K. Gowan, K.C. Chatfield, W.S. Chick, E.B. Spector, J.L.K. Van Hove, J. Riemer, Mutations in the accessory subunit NDUFB10 result in isolated complex I deficiency and illustrate the critical role of intermembrane space import for complex I holoenzyme assembly, *Hum. Mol. Genet.* 26 (2017) 702–716, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw431>.
- [47] M.T. Simon, S.S. Eftekharian, A.E. Stover, A.F. Osborne, B.H. Braffman, R.C. Chang, R.Y. Wang, M.R. Steenari, S. Tang, P.W.L. Hwu, R.J. Taft, P.J. Benke, J.E. Abdenu, Novel mutations in the mitochondrial complex I assembly gene NDUFA5 reveal heterogeneous phenotypes, *Mol. Genet. Metab.* 126 (2019) 53–63, <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2018.11.001>.

Supplementary material

Supplementary Table 1. Mitochondrial respiratory chain activities in Patient 2 fibroblasts.

	Patient 2 ²	Control values ²
CI + III	0.4	0.3 - 3
CII	0.6	0.3 – 0.5
CII+III	0.3	0.2-0.6
CIII	0.8	0.5 – 1.2
CIV	1.3	0.8 - 2
Citrate synthase (CS) ¹	84	36 - 78

¹ nmol min⁻¹ mg⁻¹ protein

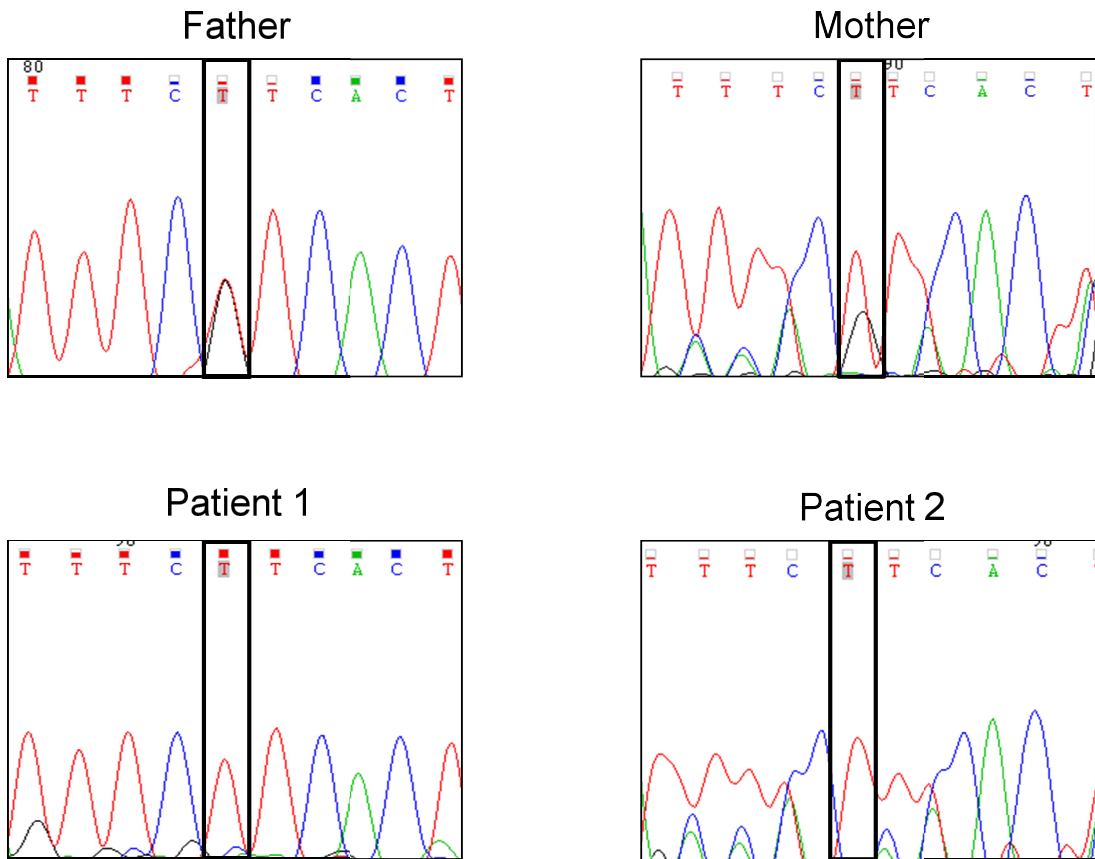
² nmol min⁻¹ mg⁻¹ protein enzyme activity expressed in percentage respect to CS activity.

Protein	Reference	Manufacturer
NDUFA9	459100	ThermoScientific, US
SDHA	459200	ThermoScientific, US
SDHB	459230	ThermoScientific, US
NDUFA8	ab184952	Abcam, UK
UQCRRS1	ab14746	Abcam, UK
NDUFS2	sc-390596	Santa Cruz Biotechnology, US
ATP5A	ab14748	Abcam, UK
NDUFS3	ab14711	Abcam, UK
GAPDH	sc-47724	Santa Cruz Biotechnology, US
TOMM20	sc-11415	Santa Cruz Biotechnology, US
COX4	ab110261	Abcam, UK
TUBULIN	ab176560	Abcam, UK

Supplementary Table 2. Antibodies used in this study.

	PREDICTION
Polyphen 2	0.373 (Benign)
SIFT	0.112 (Tolerated)
Mutation Taster	1 (Deleterious)

Supplementary Table 3. In silico predictions of pathogenicity (Polyphen2, SIFT and Mutation Taster) for the p.Arg98Leu are shown. The PolyPhen-2 score ranges from 0.0 (tolerated) to 1.0 (deleterious). For the SIFT score, the amino acid substitution is predicted to be damaging if the score is ≤ 0.05 , and tolerated if the score is > 0.05 . Mutation Taster categorizes the alteration to be either 'disease causing' or 'polymorphism', displaying a probability value for the prediction. Values close to 1 indicates a high 'security' of the prediction.



Supplementary Figure 1. The homozygous c.293G>T variant identified in *NDUF48* was verified by Sanger sequencing in both affected individuals. Segregation was corroborated by the carrier status of the healthy parents.

DISCUSIÓN CONJUNTA

Las enfermedades del metabolismo energético mitocondrial son un grupo de patologías poco frecuentes que presentan características clínicas, bioquímicas y genéticas muy heterogéneas. Dicha variabilidad hace que su diagnóstico sea muy complejo. En los últimos años, la implementación de herramientas de “next generation sequencing” (NGS) ha permitido identificar la causa genética de la enfermedad en un gran número de pacientes así como descubrir nuevas entidades patológicas. Sin embargo, un porcentaje importante de casos permanecen todavía sin un diagnóstico genético definitivo (Boycott et al., 2019; Stenton & Prokisch, 2020a; Thompson et al., 2020). Uno de los retos que ha propiciado la utilización de las metodologías NGS en la rutina diagnóstica es la priorización e interpretación del gran número de variantes encontradas en cada individuo, principalmente de las variantes de significado incierto (VUS). Para determinar la patogenicidad de dichas variantes, es esencial realizar estudios funcionales que pongan de manifiesto que las alteraciones observadas en los pacientes, en este caso asociadas a la función mitocondrial, son consecuencia de las variantes genéticas identificadas.

Por todo ello, el objetivo de esta tesis doctoral es determinar la causa genética de la enfermedad en pacientes con sospecha de patología mitocondrial, así como estudiar el impacto funcional de las variantes identificadas y realizar una caracterización exhaustiva de la función mitocondrial que nos permita comprender los mecanismos fisiopatológicos de estas enfermedades. Es importante resaltar este último aspecto, ya que las bases moleculares de muchas enfermedades mitocondriales no se conocen todavía en profundidad. En este sentido, la caracterización de los procesos a nivel molecular, celular y bioquímico no solo proporcionará nuevos conocimientos sobre estas enfermedades, sino que también serán esenciales para el futuro desarrollo de posibles estrategias terapéuticas.

Tal y como se ha comentado en la introducción de la tesis, la caracterización del fenotipo clínico y bioquímico de los pacientes basada en el estudio de biomarcadores, permite dirigir el diagnóstico hacia alteraciones de ciertas vías metabólicas o celulares concretas. Un biomarcador de alteración mitocondrial ampliamente aceptado es la presencia de niveles elevados de ácido 3-metilglutacónico (3-MGA) en orina, que es el principal hilo conductor de esta tesis. La mayoría de las patologías asociadas a aciduria 3-metilglutacónica (3-MG) están causadas por mutaciones en genes que codifican proteínas asociadas a la membrana mitocondrial (Wortmann, et al., 2013).

Diversos estudios han demostrado que la mitocondria es un orgánulo dinámico que adapta y modifica su estructura en función de las diferentes condiciones fisiológicas y necesidades

energéticas del organismo. Entre otros procesos, esta adaptación implica la regulación de la composición de la membrana, cambios en la morfología y una reorganización de las crestas mitocondriales. Es precisamente en las crestas dónde se albergan los complejos de la CRM, responsables de la producción de energía celular. En una situación fisiológica, estos complejos se encuentran agrupados en unidades funcionales superiores denominados supercomplejos, por lo que cambios en la membrana mitocondrial interna podrían alterar su organización. Así, la composición de la membrana, la morfología mitocondrial y el funcionamiento del sistema OXPHOS están íntimamente ligados. Teniendo en cuenta estos antecedentes, los estudios funcionales realizados en esta tesis se han centrado en la caracterización de la morfología mitocondrial, el ensamblaje de los complejos y supercomplejos de la CRM y la respiración celular. Dichos estudios, realizados en fibroblastos de los pacientes o en modelos celulares, son por tanto complementarios y aportan una visión general de la afectación mitocondrial. Cabe destacar, que otros autores han demostrado alteraciones en acidurias 3-MG tanto de la morfología mitocondrial como del ensamblaje del sistema OXPHOS (Cameron et al., 2011; Grau et al., 2013; Guarani et al., 2016; Jonckheere et al., 2011; Powell et al., 2011; Richter-Dennerlein et al., 2014; Wortmann, et al., 2013; Zeharia et al., 2016).

Por otro lado, en cada una de las enfermedades incluidas en la tesis, se han realizado estudios más específicos relacionados con la función particular del gen alterado, dando en su conjunto una amplia visión de las bases moleculares subyacentes en cada patología.

En esta tesis se ha estudiado un total de **36 pacientes** con sospecha de enfermedad mitocondrial en los que se han realizado análisis genéticos y funcionales con el fin de dirigir su diagnóstico. **14** de ellos presentaban niveles elevados de **3-MGA** en orina, pudiéndose confirmar la causa genética de la enfermedad en 11 pacientes con mutaciones en los genes *ECHS1*, *DNAJC19*, *TMEM70*, *SERAC1*, *ATPAF2*, *AR*, *TIMM50*, *HACE1* y *NDUFAF4*. Los genes *ECHS1*, *DNAJC19*, *TMEM70*, *SERAC1* y *ATPAF2* ya habían sido asociados a aciduria 3-MG previamente. Sin embargo, el gen *AR*, que codifica para el receptor de andrógenos, aunque ya había sido asociado a patología, nunca antes se había relacionado con aciduria 3-MG. No obstante, en un estudio reciente se han descrito pacientes con mutaciones en *AR* que presentan alteraciones severas en la función mitocondrial y en los niveles de cardiolipinas, lo cual podría explicar la presencia de 3-MGA en nuestro paciente (Borgia et al., 2017). En cualquier caso, sería interesante estudiar los niveles de 3-MGA en orina de otros pacientes con mutaciones en dicho gen para incrementar el conocimiento sobre este biomarcador y contextualizar esta enfermedad con el conjunto de las acidurias 3-MG descritas hasta la fecha.

En los **22 pacientes restantes** la implementación de los estudios funcionales desarrollados en esta tesis ha permitido dirigir su diagnóstico, ya sea confirmando la causalidad de los genes candidatos o descartando las variantes priorizadas (**ANEXO**). En 17 casos, estos estudios han confirmado la patogenicidad de las variantes. Entre ellos, es de especial interés destacar que 5 pacientes presentaron deficiencia del complejo I de la CRM como principal característica bioquímica. En estos casos se identificaron mutaciones en *ND6*, *NDUFS2* y *NDUFA8*, todos ellos codificantes de subunidades del complejo I. Por otro lado, es importante mencionar que los 5 casos en los que se han descartado las variantes priorizadas inicialmente siguen en estudio, en este caso realizando nuevas aproximaciones genéticas basadas en RNAseq.

La descripción de pacientes con alteraciones en *TIMM50*, *HACE1*, *NDUFA4* y *NDUFA8* han sido objeto de la publicación de 4 artículos y serán discutidos detalladamente a continuación.

1. Estudio de la fisiopatología de la enfermedad causada por mutaciones en *TIMM50*

Las acidurias 3-MG son un grupo heterogéneo de enfermedades mitocondriales que está en constante crecimiento. **En el primer artículo** de esta tesis identificamos un paciente con mutaciones en el gen *TIMM50*, que codifica para una subunidad del complejo TIM23, localizado en la membrana mitocondrial interna e implicado en el transporte de proteínas desde el citosol hacia el interior del orgánulo (Geissler et al., 2002; Mokranjac et al., 2003, 2009; Niemi et al., 2019; Tamura et al., 2009). Las mutaciones identificadas (c.341G>A; p.Arg114Gln y c.805G>A; p.Gly269Ser) afectan a dos aminoácidos muy conservados a lo largo de la evolución, lo que sugiere que éstas podrían tener un impacto importante sobre la función de la proteína. El estudio mediante PCR cuantitativa (qPCR) no detectó ninguna alteración en la expresión del mRNA. Sin embargo, el análisis de la expresión proteica a través de Western blot demostró una reducción muy importante, aunque no total, de los niveles de la proteína *TIMM50* en fibroblastos del paciente. Estos resultados podrían indicar que las mutaciones estarían alterando la estabilidad de la proteína.

En el momento en que se encontraron las mutaciones *TIMM50* en nuestro paciente, las alteraciones en este gen no se habían asociado todavía a ninguna patología. Sin embargo, durante la realización de estos estudios se publicaron dos artículos en los que se describían 3 familias con mutaciones en *TIMM50* (Reyes et al., 2018; Shahrour et al., 2017). Posteriormente a la publicación de nuestros resultados, se identificó otro paciente *TIMM50* (Mir et al., 2020). El fenotipo clínico de los pacientes publicados hasta la fecha es compatible con el descrito por nosotros, presentado todos ellos convulsiones, discapacidad intelectual, retraso psicomotor,

hipotonía y lesiones cerebrales. Además, nuestro paciente presentaba cardiopatía y neutropenia. La cardiopatía es una característica que, aunque es muy común en otras acidurias 3-MG como el síndrome de Barth (Barth et al., 1983; Bione et al., 1996), el síndrome DCMA (Davey et al., 2006) y la deficiencia de TMEM70 (Čížková et al., 2008), no se había descrito en ninguno de los pacientes TIMM50 publicados inicialmente (Reyes et al., 2018; Shahrour et al., 2017). Curiosamente, el paciente recientemente identificado por (Mir A et al., 2020) presentaba hipertrofia ventricular. Estas observaciones concuerdan con diversos estudios realizados en modelos celulares y animales, en los que se detectan alteraciones cerebrales y cardíacas como consecuencia de la deficiencia en TIMM50 (Guo et al., 2004; Tang et al., 2017). Por otro lado, nuestro paciente sufrió dos episodios de neutropenia, eventos descritos también en pacientes con síndrome de Barth (Aprikyan & Khuchua, 2013; Finsterer & Frank, 2013), en individuos con mutaciones en *CLPB* (Saunders et al., 2015; Wortmann, et al., 2015) y *HTRA2* (Kovacs-Nagy et al., 2018; Mandel et al., 2016; Oláhová et al., 2017). La presencia de aciduria 3-MG ha sido descrita en todos los pacientes TIMM50 a excepción del publicado por (Reyes et al., 2018), por lo que parece ser una característica bioquímica relevante para la identificación de mutaciones en TIMM50. De hecho, OMIM ya ha incluido la deficiencia de TIMM50 como aciduria 3-MG secundaria tipo IX (617698).

Aunque se sabe que la proteína TIMM50 está implicada en el transporte de proteínas hacia el interior de la mitocondria, la fisiopatología de la enfermedad causada por mutaciones en este gen aún no se conoce en detalle. Los estudios realizados por (Reyes et al., 2018) mostraron la presencia de niveles reducidos de varias subunidades de los complejos del sistema OXPHOS en fibroblastos de su paciente, así como defectos severos en el importe de proteínas a través del complejo TIM23. Con el fin de comprobar si las mutaciones identificadas en nuestro paciente tenían un impacto similar, realizamos un fraccionamiento subcelular en fibroblastos y analizamos la expresión de diversas proteínas mitocondriales mediante Western blot. Sin embargo, no observamos defectos en la sublocalización en ninguna de las proteínas estudiadas. Estos hallazgos se podrían explicar en base a un estudio realizado en levaduras, en el que se demostró que la deficiencia en TIMM50 podría tener un efecto variable sobre el importe proteico, dependiendo del polipéptido concreto que se dirija hacia la mitocondria (Schendzielorz et al., 2017). Además, el estudio de los niveles basales de proteínas representativas del sistema OXPHOS tampoco mostró alteraciones en fibroblastos de nuestro paciente. No obstante, el análisis en tejido muscular presentó una disminución de los niveles de varias subunidades de los complejos OXPHOS cuando normalizábamos los datos en función de la actividad citrato sintasa, marcador de masa mitocondrial. Concretamente, observamos

una disminución de las proteínas SDHA (complejo II), MTCO1 y COX4 (complejo IV), todas ellas reducidas también en el estudio de (Reyes et al., 2018).

Por otro lado, las diferencias observadas entre dicho estudio y el nuestro podrían deberse a las distintas mutaciones identificadas en los pacientes. El individuo que nosotros estudiamos presentaba dos mutaciones “missense” en heterocigosis compuesta, que afectaban a aminoácidos localizados en el dominio intermembrana (p.Arg114Gln; p.Gly269Ser), una situación similar a la de los primeros pacientes TIMM50 descritos por (Shahrour et al., 2017) y al descrito recientemente por (Mir et al., 2020). Sin embargo, el individuo reportado por (Reyes et al., 2018) presentaba una mutación “missense” afectando a un aminoácido situado en la región transmembrana de la proteína (p.Gly190Ala) y otra mutación “non-sense” que generaba un codón stop prematuro (p.Ser122Ter). Estos cambios podrían tener un mayor impacto sobre la funcionalidad de la proteína que las descritas en nuestro paciente. De hecho, la progresión clínica de los pacientes también difería, siendo mucho más severa en el caso reportado por (Reyes et al., 2018).

A continuación, nos propusimos realizar una detallada caracterización de la función mitocondrial en fibroblastos de nuestro paciente TIMM50, con el fin de profundizar en las bases moleculares de la enfermedad y contextualizarla con otras patologías mitocondriales.

El estudio de la morfología mitocondrial realizado mediante microscopía confocal demostró que los fibroblastos TIMM50 tenían mitocondrias más cortas y redondeadas además de una red mitocondrial menos ramificada que las células control. Asimismo, un análisis más detallado a través de microscopía electrónica, demostró alteraciones en la organización de las crestas mitocondriales. Estas alteraciones eran menos pronunciadas que las que se observaban en células TMEM70, que fueron utilizadas como control positivo para estos experimentos. Ha sido ampliamente reportado que las mutaciones en *TMEM70* provocan alteraciones severas en la morfología y ultraestructura mitocondrial, probablemente debido a que la proteína TMEM70 está directamente implicada en la dimerización del complejo V, un proceso necesario para la formación de las crestas (Cogliati et al., 2016; Jonckheere et al., 2012). TIMM50 es una proteína que forma parte de la maquinaria de importe de proteínas, la cual se ha vinculado con la organización de las crestas mitocondriales (Becker et al., 2012). Además, defectos en TIM17, otro componente del complejo TIM23, se han asociado con alteraciones morfológicas de la mitocondria (Matta et al., 2017). Por ello, no es de extrañar que se encontraran también alteraciones morfológicas en los pacientes TIMM50.

En los últimos años, se ha demostrado que algunas acidurias 3-MG están asociadas a alteraciones en la composición de fosfolípidos de la membrana mitocondrial (Wortmann, et al., 2013). En este sentido, está ampliamente evidenciado que las mutaciones en *TAZ* (síndrome de Barth) provocan defectos en la remodelación de las cardiolipinas (CL), causando un aumento de monolisocardiolipinas y una deficiencia de las CL maduras. Por otro lado, la deficiencia de *SERAC1* (síndrome de MEGDEL) da lugar a un desbalance de subespecies concretas de CL sin causar alteraciones en el contenido global de este fosfolípido (Houtkooper et al., 2009; Schlame & Ren, 2006; Wortmann et al., 2012). Por este motivo, realizamos un análisis del perfil lipídico en fibroblastos del paciente *TIMM50* y otras acidurias 3-MG mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS y LC/MS-Qtrap). Este estudio se realizó en el “Centre of Omic Sciences, Reus” posteriormente a la publicación del artículo 1 de esta tesis. Los resultados preliminares demuestran que el contenido total de CL no se encuentra alterado en los fibroblastos *TIMM50*. Sin embargo, estos presentan una acumulación de las CL de cadena carbonada más corta y con menos insaturaciones. Por el contrario, las CL con cadenas más largas y mayor número de dobles enlaces se encuentran disminuidas. Este patrón es similar al observado en un paciente *SERAC1* y difiere del perfil detectado en otras acidurias 3-MG como *TMEM70* y *ATPAF2*. Si bien estos resultados suponen la primera evidencia de una asociación entre la deficiencia de *TIMM50* y alteraciones en las CL, será necesario llevar a cabo más estudios para clarificar completamente el papel de *TIMM50* en este proceso.

Por otro lado, realizamos un estudio mediante Blue-Native PAGE (BN) en fibroblastos del paciente y demostramos, por vez primera, una deficiencia generalizada en el ensamblaje de los complejos y supercomplejos en un paciente con mutaciones en *TIMM50*. Dado que el estudio de expresión de las subunidades de la CRM sugería que los defectos del sistema OXPHOS eran más marcados en tejido muscular que en fibroblastos, analizamos también el ensamblaje de los complejos OXPHOS en músculo del paciente. Los resultados corroboraron estas observaciones. Cabe destacar que algunas evidencias sugieren que podría haber una conexión física entre el complejo TIM23 y los complejos y supercomplejos de la CRM, de manera que nuestros resultados estarían en consonancia con dichos estudios (Becker et al., 2012). Con el fin de conocer el efecto de estas alteraciones, se estudió la actividad de los complejos de la CRM en tejido muscular del paciente, demostrando una disminución generalizada en la actividad de los mismos. En los individuos con defectos en *TIMM50* previamente descritos, las actividades de la CRM fueron variables, mostrando desde actividades normales (Shahrour et al., 2017) hasta deficiencias aisladas del CV (Shahrour et al., 2017) o del complejo II (Reyes et

al., 2018). Adicionalmente, analizamos el consumo de oxígeno en fibroblastos del paciente TIMM50 a través de respirometría de alta resolución. Los resultados mostraron una reducción de la capacidad respiratoria máxima, compatible con los defectos observados en el funcionamiento del sistema OXPHOS. Además, en colaboración con otro grupo de investigación (Dra. Cristina Fillat, IDIBAPS), generamos un modelo celular HEK293 deficiente para TIMM50 mediante CRISPR/Cas9. Los estudios en este modelo mimetizaron los defectos en la respiración mitocondrial observados en los fibroblastos del paciente. La transfección de la proteína TIMM50 “wild-type” rescataba este fenotipo, demostrando que TIMM50 juega un papel clave en la función mitocondrial.

En resumen, nuestro trabajo aporta nueva y relevante información sobre las bases fisiopatológicas y moleculares de la deficiencia de TIMM50. Demostramos que las mutaciones en este gen dan lugar a defectos severos de la función mitocondrial caracterizada por alteraciones en el mantenimiento de la morfología mitocondrial, el ensamblaje del sistema OXPHOS y la respiración mitocondrial.

2. Identificación de mutaciones en *HACE1* asociadas a un paciente con aciduria 3-MG

En general, el paciente con mutaciones en *TIMM50* del primer artículo, se podría describir cómo un caso de aciduria 3-MG típica. Por el contrario, en el segundo trabajo de esta tesis doctoral (publicado en **el artículo 2**) describimos un paciente con sospecha de patología mitocondrial en el que identificamos mutaciones en un gen que codifica una proteína citoplasmática. El paciente presentaba retraso psicomotor, atrofia cerebral y niveles elevados y repetitivos de 3-MGA en orina. Tras descartar las causas de aciduria 3-MG conocidas hasta la fecha a través de un panel de genes diseñado por nuestro grupo, realizamos la secuenciación del exoma completo del paciente y de ambos progenitores. Aunque en su conjunto la presentación clínica y bioquímica daba lugar a una sospecha de enfermedad mitocondrial, en este caso, la causa primaria de la enfermedad resultó ser la alteración de una proteína citoplasmática. Así, tras el análisis de los datos genéticos, identificamos una mutación en homocigosis (c.240C>A; p.Cys80Ter) en el gen *HACE1*, que codifica una proteína con actividad ubiquitina ligasa con dominios HECT y dominios de repeticiones de ankyrina. Además, la mutación c.240C>A ya había sido descrita previamente asociada a patología. La función de *HACE1* no se conocía en detalle aunque diferentes estudios indicaban que estaba implicada en el marcaje de ciertas proteínas para dirigirlas hacia determinadas regiones subcelulares o hacia el proceso de degradación vía proteosoma (Scheffner & Kumar, 2014).

La mutación identificada en nuestro paciente generaba un codón stop prematuro que potencialmente daría lugar a una proteína truncada. Los estudios de Western blot en fibroblastos confirmaron que la expresión de la proteína era prácticamente nula. Por otro lado, al contrario de lo que se podría esperar en base al fenotipo del paciente, la proteína HACE1 se localizaba en el citoplasma, tal y como se demuestra en el estudio de fraccionamiento celular realizado en este trabajo y en la bibliografía (Anglesio et al., 2004). Cabe destacar, que HACE1 se expresa principalmente en tejidos neuronales (Anglesio et al., 2004; Nagase et al., 2001; Nagy et al., 2019), de forma que la alteración de esta proteína podría encajar con los defectos neurológicos que presentaba el paciente. Hasta el momento, se han descrito 8 familias con mutaciones en *HACE1* (Akawi et al., 2015; Hariharan et al., 2018; Hollstein et al., 2015; Nagy et al., 2019). Su deficiencia está asociada a patología autosómica recesiva con paraplegia espástica y retraso psicomotor, que puede presentarse con o sin convulsiones (OMIM 616756) y aunque este fenotipo es compatible con el observado en nuestro paciente, la aciduria 3-MG no se había reportado en ninguno de los pacientes descritos hasta el momento (Akawi et al., 2015; Hariharan et al., 2018; Hollstein et al., 2015; Nagy et al., 2019).

Con el fin de poner esta enfermedad en contexto de las acidurias 3-MG y explorar la posible relación de HACE1 y la mitocondria, realizamos una detallada caracterización de la estructura y función mitocondrial en fibroblastos de nuestro paciente. Tal y como se ha comentado previamente, diversas acidurias 3-MG muestran alteraciones en la morfología mitocondrial y defectos variables en el ensamblaje del sistema OXPHOS. Por ejemplo, la deficiencia de TIMM50, discutida anteriormente, provoca un defecto generalizado del ensamblaje de los complejos y supercomplejos de la CRM además de alteraciones severas en la morfología y ultraestructura mitocondrial. En el paciente con mutaciones en *HACE1* el ensamblaje de los complejos del sistema OXPHOS también se encontraba disminuido de forma generalizada, aunque estos defectos no alteraban la formación de los supercomplejos. De hecho, a diferencia del paciente TIMM50, el estudio de respirometría de alta resolución no mostró diferencias significativas respecto a las células control. Remarcablemente, el análisis de la morfología mitocondrial mostró que la longitud de las mitocondrias, así como los parámetros AR (indicativo de la circularidad) y FF (indicativo del grado de ramificación de la red mitocondrial) se encontraban reducidos de forma leve aunque estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

A pesar de que se han reportado pacientes con mutaciones en *HACE1*, los mecanismos moleculares subyacentes de este trastorno aún no se conocen en detalle. Sin embargo, diversos estudios realizados en modelos animales y celulares han asociado la proteína HACE1

con la regulación de procesos fundamentales para la fisiología celular como la autofagia y la activación de las vías de respuesta al estrés oxidativo. Por este motivo, decidimos explorar estas vías y tratar de profundizar en las bases fisiopatológicas de esta enfermedad (Ehrnhoefer et al., 2018; S. Li et al., 2020; Liu et al., 2014; Rotblat et al., 2014; Zhang et al., 2014).

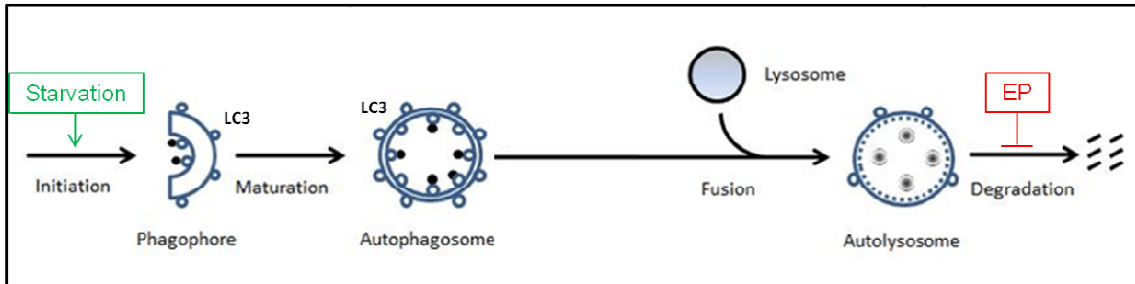


Figura 13. Esquema sobre el el proceso de autofagia y su estudio.

La autofagia es un proceso altamente conservado en la evolución que permite la renovación de componentes y orgánulos celulares (Levine & Kroemer, 2008; Mizushima et al., 2010; Peker & Gozuacik, 2020; Rubinsztein, 2006). Para su correcto funcionamiento, este proceso requiere la formación de autofagosomas, unas vesículas altamente especializadas que envuelven el material citoplasmático para degradar, también denominado cargo. Una vez formados, los autofagosomas sufren un complejo proceso de maduración y finalmente se fusionan con un lisosoma, permitiendo la degradación y reciclaje del cargo (**Figura 13**). En el presente estudio, hemos analizado la autofagia mediante la evaluación de la proteína LC3, uno de los principales marcadores de autofagosomas. En estado basal, esta proteína se encuentra localizada en el citoplasma en forma de LC3-I, la cual una vez activada se re-localiza en las membranas de los autofagosomas en forma de LC3-II. Por ello, los autofagosomas pueden ser detectados y cuantificados mediante inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-LC3, visualizando estas vesículas como puntos luminosos (Kabeya et al., 2003). El estudio realizado en fibroblastos de nuestro paciente HACE1 mostró un incremento del número de partículas LC3 en comparación con células control, indicando un acúmulo anormal de autofagosomas. Este evento puede producirse como consecuencia de una mayor inducción de la autofagia o por un defecto en los estadios más tardíos del proceso, como son la fusión autofagosoma-lisosoma o la degradación del cargo. En nuestro paciente, los niveles de mRNA tanto de *LC3* como de *Beclina* y *p62*, factores implicados en la activación de la autofagia, no estaban alterados. Además, tras inducir la autofagia con un tratamiento de privación de nutrientes, las células HACE1 eran capaces de responder de forma efectiva, provocando la translocación nuclear del factor TFEB (un conocido

evento en los primeros pasos del proceso autofágico), dando lugar a un aumento del número de autofagosomas (Medina et al., 2017; Mizushima et al., 2010). En conjunto, estos resultados sugirieron que las etapas iniciales de la autofagia no estaban alteradas en el paciente HACE1 y que por tanto, el aumento de autofagosomas podría deberse a alteraciones post-traduccionales o eventos más tardíos. Dado que la autofagia es un proceso dinámico, analizamos el flujo autofágico midiendo la renovación de la proteína LC3. Para ello, estudiamos la acumulación de autofagosomas en células tratadas con E64D-Pepstatina A (EP), un inhibidor de las hidrolasas lisosomales que permite la fusión autofagosoma-lisosoma pero bloquea la degradación del cargo y del propio LC3 (Tanida et al., 2005). Así, el flujo autofágico fue calculado como el incremento relativo del número de partículas de LC3 observado tras el tratamiento con EP respecto al detectado en estado basal. Utilizando esta aproximación, demostramos que el paciente HACE1 presentaba una reducción importante del flujo autofágico. Estas observaciones coinciden con estudios previos realizados en modelos murinos, ya que se postulaban que HACE1 podría estar participando en las últimas etapas del proceso de maduración de los autofagosomas (Zhang et al., 2014).

En su conjunto, todos estos resultados sugieren que las alteraciones en la autofagia observadas en el paciente HACE1 afectan sobre todo en las fases más tardías del proceso. Nuestro trabajo ha supuesto la primera demostración de la implicación de la autofagia en la fisiopatología de la deficiencia de HACE1 en humanos.

Como se ha mencionado anteriormente, estudios previos han sugerido que además de participar en la autofagia, la proteína HACE1 podría tener un papel importante en la regulación de los sistemas de respuesta a estrés oxidativo (Daugaard et al., 2013; Ehrnhoefer et al., 2018; Rotblat et al., 2014). Cuando estos mecanismos no funcionan correctamente, se acumulan especies reactivas de oxígeno (ROS) que reaccionan con componentes celulares como proteínas, lípidos y DNA, causando daño celular (Hamanaka & Chandel, 2010; Olsen et al., 2015; Zorov et al., 2014). En este sentido, nuestros estudios detectaron niveles elevados de peroxidación lipídica en fibroblastos HACE1, indicando la acumulación de daño celular derivado de ROS. De hecho, en el único trabajo publicado hasta el momento en el que se ahonda en las bases fisiopatológicas de esta enfermedad, se observó un aumento de ROS en células de pacientes con mutaciones en *HACE1* (Nagy et al., 2019). Asimismo, estos autores detectaron niveles elevados de RAC1, una conocida diana de HACE1 que está implicada en la regulación intracelular de los niveles de ROS. Además de RAC1, se ha demostrado que HACE1 también estabiliza el factor de transcripción NRF2, otro elemento clave para de regulación de los sistemas celulares de detoxificación de componentes celulares dañinos (Ehrnhoefer et al.,

2018; Malhotra et al., 2010; Rotblat et al., 2014). En condiciones de estrés oxidativo, NRF2 se estabiliza y se transloca al núcleo, donde induce la expresión de múltiples genes implicados en la respuesta al daño oxidativo (Itoh et al., 1997; Kensler et al., 2007; Wild et al., 1999). En base a estas evidencias, analizamos los niveles de mRNA de *NQO1* y *Hmox1*, dos dianas transcripcionales de NRF2, tras inducir daño oxidativo mediante el tratamiento con H₂O₂ en células de nuestro paciente. Los resultados demostraron que dichas células no eran capaces de activar la transcripción de estos genes a unos niveles equiparables a los de los controles. Estos resultados mimetizaban las observaciones publicadas en modelos de ratón “knock-out” para *HACE1* (Ehrnhoefer et al., 2018; Rotblat et al., 2014) sugiriendo además que la acumulación de daño oxidativo en fibroblastos HACE1 podría depender, al menos en parte, de la capacidad disminuida de estas células para responder al estrés oxidativo a través de NRF2. Cabe destacar, que el principal productor de ROS de la célula es la mitocondria, a través de la reducción incompleta del oxígeno molecular que se produce durante la fosforilación oxidativa (Murphy, 2009). Por ello, existen diversos mecanismos antioxidantes específicos en este orgánulo. El hecho de que el fenotipo del paciente HACE1 fuera compatible con una patología mitocondrial, nos impulsó a analizar específicamente la presencia de estrés oxidativo en la mitocondria. Los fibroblastos del paciente mostraron niveles elevados de ROS y un aumento de la expresión de la enzima antioxidante mitocondrial SOD2. Estos resultados podrían parecer contradictorios, ya que SOD2 también está regulado por NRF2. Sin embargo, los mecanismos de respuesta al daño oxidativo son extremadamente complejos y se regulan mediante una gran cantidad de proteínas y factores de transcripción. Por lo tanto, es posible que los elevados niveles de SOD2 estén inducidos por otros factores ajenos a NRF2, como PGC- α o SIRT3, entre otros (Olsen et al., 2015).

En cualquier caso, los niveles elevados de 3-MGA en orina observados en el paciente, las alteraciones de la morfología mitocondrial y la presencia de estrés oxidativo mitocondrial sugieren que las alteraciones de este orgánulo podrían estar implicadas en la fisiopatología de la enfermedad. Además, dado que nuestros resultados ya habían demostrado que la autofagia se encontraba alterada en el paciente HACE1, hipotetizamos que el reciclaje de las mitocondrias mediada por la mitofagia podría ser defectuosa. Para corroborar esta idea, realizamos un estudio mediante inmunofluorescencia midiendo el área de co-localización mitocondria-autofagosoma (Diot et al., 2015). Así, pudimos demostrar que el flujo mitofágico se encontraba disminuido en fibroblastos deficientes en HACE1, de manera que la renovación de mitocondrias alteradas también estaba comprometida. En un contexto en que HACE1 no es funcional, la presencia de mitocondrias dañadas que no han podido ser correctamente

recicladas favorecería la acumulación de ROS. A su vez, estas células no serían capaces de responder de forma efectiva al estrés oxidativo generado. Así pues, en su conjunto esta situación provocaría un círculo vicioso que daría lugar a las alteraciones celulares observadas en los pacientes HACE1 (**Figura 14**).

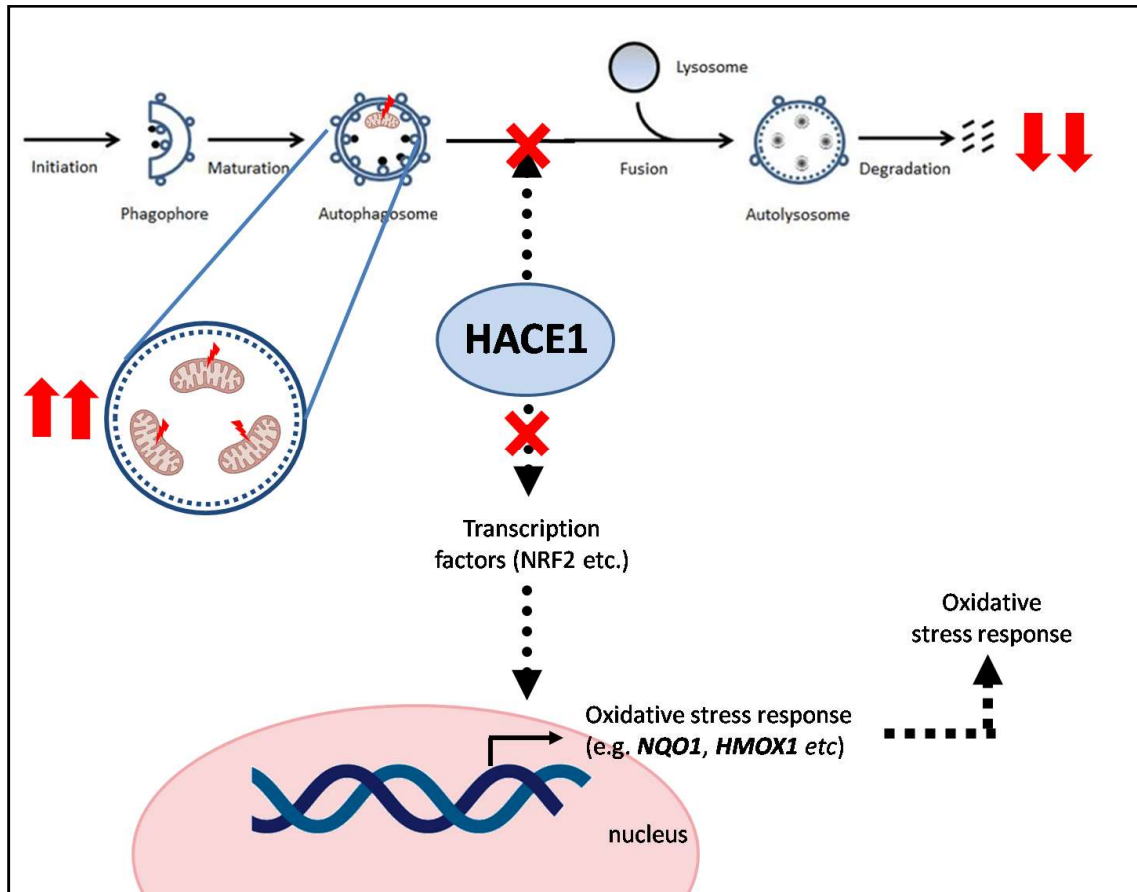


Figura 14. En esta figura se representa la hipótesis formulada en esta tesis sobre las alteraciones celulares que darían lugar a la enfermedad causada por mutaciones en *HACE1*.

Nuestros resultados sugieren por primera vez, que la autofagia, la mitofagia y la respuesta al estrés oxidativo pueden estar implicados en la patogénesis de la enfermedad causada por mutaciones en *HACE1*. Por otro lado, sería de gran interés analizar la presencia de 3-MGA en más pacientes *HACE1* para determinar si este metabolito podría ser un biomarcador de la enfermedad.

3. Caracterización de las bases moleculares de las deficiencias de complejo I causadas por mutaciones en *NDUFA4* y *NDUFA8*

Como se ha indicado en la introducción de esta tesis, la aciduria 3-MG se puede encontrar en otras patologías con alteraciones de la función mitocondrial (Fiedorczuk & Sazanov, 2018).

Dentro de las enfermedades mitocondriales, los trastornos causados por defectos genéticos que afectan directamente al sistema OXPHOS son los más frecuentes. Entre ellos, es común identificar niveles elevados de 3-MGA en deficiencias aisladas del complejo V de la CRM. De hecho, aquellas causadas por mutaciones en los genes *ATPAF2* (OMIM 604273), *TMEM70* (OMIM 614052), *ATP5E* (OMIM 614053) y *ATP5F1D* (OMIM 618120) ya están clasificadas en OMIM como aciduria 3-MG, tal y como se ha ilustrado en la **tabla 1** de la introducción. No obstante, es inusual encontrar niveles elevados de este metabolito en deficiencias del complejo I de la CRM (Alban et al., 2017; Wortmann, et al., 2013). Por ello, resulta de interés el caso publicado en el **artículo 3**. En este trabajo estudiamos una familia consanguínea en la que identificamos dos hermanos con niveles elevados de 3-MGA en orina. Los pacientes presentaron dismorfia y acidosis láctica desde el nacimiento, desarrollando más tarde encefalopatía fatal, episodios apneicos, irritabilidad, hipoventilación central y afectación hepática. Bioquímicamente, destacaban los niveles elevados de lactato en fluidos biológicos, la presencia de hiperamonemia y aciduria 3-MG. Además, uno de los pacientes presentó alteraciones de la sustancia blanca cerebral y el otro cardiomiopatía. Se realizó la secuenciación del exoma de ambos individuos identificándose una mutación en homocigosis en el gen *NDUFAF4* (c.478G>T; p.Glu160Ter), que codifica para un factor de ensamblaje del complejo I de la CRM (Saada et al., 2008). Hasta el momento, solamente se habían descrito 3 familias que presentaban mutaciones en este gen (Baertling et al., 2017; Haack et al., 2012; Saada et al., 2008). Tal y como se observa en la tabla 2 del artículo 3, el fenotipo clínico de nuestros pacientes y el de los previamente reportados era muy similar. Todos ellos presentaron encefalopatía y a excepción de dos individuos, el resto fallecieron a una edad muy temprana. Los que sobrevivieron al periodo neonatal mostraron irritabilidad, hipotonía y retraso del desarrollo. Además, algunos presentaron convulsiones, hipertonía, cardiomiopatía y atrofia óptica. No obstante, en ninguno de ellos se habían descrito alteraciones hepáticas, hiperamonemia, aciduria 3-MG y dismorfia. De hecho, la dismorfia es un rasgo muy poco común en las enfermedades mitocondriales en general y en las deficiencias de complejo I en particular (Alston et al., 2016, 2018; Fiedorczuk & Sazanov, 2018; Koene et al., 2012).

Con el fin de comparar las mutaciones de nuestros pacientes con las descritas previamente, realizamos un análisis “in silico”. La primera cohorte de pacientes *NDUFAF4* presentaba la mutación c.194T>C (p.Leu65Pro) en homocigosis, que afectaba a un aminoácido conservado del dominio de unión a calmodulina de la proteína (Saada et al., 2008). El estudio mediante Western blot en estos pacientes mostraba niveles muy reducidos pero detectables de proteína y la patogenicidad de la mutación fue confirmada mediante estudios de complementación

funcional. Sin embargo, la progresión de la enfermedad difería entre los pacientes. Así, a pesar de que todos ellos tenían el mismo genotipo, algunos individuos fallecieron de forma muy temprana mientras que otros tenían 2 y 7 años en el momento de la publicación. Esta falta de correlación genotipo-fenotipo es usual en las deficiencias de complejo I de la CRM (Koene et al., 2012; Rodenburg, 2016; Tucker et al., 2011). Las otras dos variantes previamente descritas también generaban un cambio de amino ácido (p.Ala3Pro y p.Gly8Glu) que en este caso afectaban a la región N-terminal de la proteína (Baertling et al., 2017; Haack et al., 2012). A diferencia de los pacientes descritos en el anterior artículo, la proteína *NDUFAF4* era indetectable en fibroblastos del individuo con la mutación (c.7G>C) (Baertling et al., 2017). Lamentablemente, no se dispone de información funcional del efecto de la variante (c.23G>A). En nuestro trabajo identificamos una nueva mutación en *NDUFAF4* (c.478G>T; p.Glu160Ter) que potencialmente podía dar lugar a una proteína truncada. El estudio Western blot en fibroblastos de los pacientes confirmó una ausencia total de proteína, produciendo un efecto similar al de la mutación descrita por (Baertling et al., 2017).

Las bases fisiopatológicas de la deficiencia de *NDUFAF4* no se conocen con detalle, probablemente debido a los pocos pacientes que se han descrito hasta ahora. Por ello, dado que este gen codifica para un factor de ensamblaje del complejo I de la CRM, analizamos la expresión de varias subunidades representativas del sistema OXPHOS y estudiamos el ensamblaje de los complejos y supercomplejos de la CRM en fibroblastos de los pacientes. Los resultados mostraron una disminución de los niveles basales de diversas subunidades del complejo I, mientras que la expresión de subunidades de otros complejos no se veía alterada. Además, el complejo I se encontraba completamente desensamblado y se observó una disminución drástica de los supercomplejos de alto peso molecular ($SCI_1/III_2/IV_n$). Curiosamente, detectamos una acumulación anormal de los supercomplejos $SCI_1/III_2/IV_n$, probablemente como consecuencia de la ausencia de complejo I. Estos resultados concuerdan con los estudios realizados por Baertling et al., 2017 dónde observan el mismo efecto en otro paciente *NDUFAF4* (Baertling et al., 2017). Nuestras observaciones reafirman que la asociación entre los complejos III y IV puede alterarse cuando la biogénesis de los supercomplejos $SCI_1/III_2/IV_n$ no se produce correctamente.

Por otro lado, analizamos las actividades de los complejos de la CRM tanto en fibroblastos como en músculo. Sorprendentemente, además de la esperada reducción en la actividad del complejo I, observamos una disminución de la actividad del complejo IV en uno de los pacientes. Se han descrito alteraciones similares en otros pacientes con mutaciones en factores de ensamblaje y subunidades del complejo I, como por ejemplo *NDUFAF3*,

TMEM126B, *NDUFAF2* y *NDUFA9* (Alston et al., 2016; Baertling et al., 2018; Herzer et al., 2010; Ishiyama et al., 2018). La naturaleza de estos defectos no está clara, pero podría ser una consecuencia del mal funcionamiento general de la CRM causado por el desensamblaje del complejo I. Con el fin de determinar el impacto funcional de dichas alteraciones, realizamos un estudio mediante respirometría de alta resolución. Los resultados demostraron que los fibroblastos *NDUFA4* tenían una disminución tanto de la capacidad respiratoria basal como de la capacidad respiratoria máxima. A pesar de la grave disminución en el ensamblaje y en la actividad del complejo I de los pacientes, sólo observamos una reducción del 40% en el consumo basal de oxígeno. Según la literatura, la mayoría de los pacientes con deficiencia del complejo I presentan reducciones más drásticas en la capacidad respiratoria. Sin embargo, en algunos casos con deficiencia de complejo I se han descrito tasas de consumo de oxígeno relativamente normales o solo ligeramente alteradas (Alston et al., 2018; Friederich et al., 2017; Simon et al., 2019).

La función mitocondrial y por tanto la capacidad respiratoria, está estrechamente ligada a la morfología mitocondrial y a la organización de su red (Simcox et al., 2013). Por ello, realizamos un análisis mediante microscopía confocal en el que demostramos que nuestros pacientes presentaban unas mitocondrias más redondeadas y una red mitocondrial fragmentada respecto a los controles. Estos resultados concuerdan con estudios previamente publicados donde se describe la presencia de mitocondrias alteradas y anomalías de la red mitocondrial en fibroblastos de pacientes con mutaciones en genes que codifican subunidades estructurales del complejo I (Koopman et al., 2007).

En conjunto, nuestro estudio proporciona nuevo conocimiento sobre las bases fisiopatológicas de la enfermedad causada por mutaciones en *NDUFA4* y amplía su espectro fenotípico. En concreto, además de los síntomas clínicos descritos anteriormente, los pacientes presentados en este trabajo mostraron dismorfia y aciduria 3-MG, dos características que no se habían descrito en esta enfermedad.

Precisamente, la deficiencia del complejo I de la CRM es la alteración enzimática más frecuente entre las enfermedades mitocondriales (Fassone & Rahman, 2012). En el **artículo 4** de esta tesis describimos una familia con 2 hijos afectados que presentaban defectos en este complejo, en los que mediante la secuenciación del exoma identificamos una mutación en homocigosis en *NDUFA8* (c.293G>T; p.Arg98Leu). *NDUFA8* codifica una subunidad del complejo I de la CRM (Stroud et al., 2016). En el momento en que se identificaron estas mutaciones no se conocían variantes en *NDUFA8* asociadas a patología, pero durante la redacción del artículo 4 se publicó

el primer caso (Yatsuka et al., 2020). Así, nuestro trabajo es la segunda descripción de pacientes con deficiencia de NDUFA8.

Al contrario que el resto de los casos que se han estudiado en la tesis, estos pacientes no presentaron aciduria 3-MG, sino que su peculiaridad reside en una progresión sorprendentemente favorable de la enfermedad. El caso índice presentó hipotonía, dificultad respiratoria y acidosis láctica en el periodo neonatal. Su hermana fue asintomática hasta los 4 años, cuando la aplicación de una anestesia desencadenó la aparición de los primeros síntomas. Sin embargo, estas manifestaciones han ido remitiendo progresivamente hasta la actualidad. Ahora, a la edad de 6 y 9 años, ambos individuos son prácticamente asintomáticos y únicamente presentan un leve retraso del desarrollo y dificultades en el habla. Esta evolución favorable del fenotipo clínico es extremadamente atípica en una deficiencia de complejo I, ya que este grupo de enfermedades suelen presentar formas clínicas severas con una esperanza de vida muy reducida (Koene et al., 2012). Por el contrario, el paciente previamente reportado por Yatsuka et al., 2020 cursó con retraso psicomotor, microcefalia, epilepsia y atrofia cerebral con alteraciones del cuerpo calloso. Aunque en el momento de la publicación seguía vivo a la edad de 26 años, ha desarrollado cuadriplejia severa y se encuentra postrado en una cama con respiración artificial y alimentación por sonda nasogástrica (Yatsuka et al., 2020). Es probable que las consecuencias clínicas tan distintas entre nuestros pacientes y el descrito previamente puedan ser debidas a la diferente naturaleza de las mutaciones identificadas en cada caso. Con el fin de explorar dicha hipótesis, realizamos un análisis comparativo “in silico” entre la mutación previamente reportada y la identificada en nuestros pacientes. Los individuos reportados en nuestro trabajo mostraban una mutación en homocigosis (c.293G>T; p.Arg98Leu) que afectaba a una arginina altamente conservada en vertebrados, pero no en otros organismos. Los predictores “in silico” mostraron diferentes interpretaciones sobre la patogenicidad de esta variante y según los criterios del American Collage of Medical Genetics (ACMG) se clasificó como VUS. Por otro lado, el paciente descrito por Yatsuka et al., 2020 presentaba una mutación en homocigosis (c.139C>T;p.Arg47Cys) que alteraba un aminoácido evolutivamente más conservado. Esta mutación genera una cisteína en el residuo adyacente a un motivo Cys-X9-Cys, que estaría implicado en la formación de puentes disulfuro intramoleculares y en la estabilidad del complejo I (Szklarczyk et al., 2011). Además, de acuerdo con la estructura ovina publicada del complejo I (PDB: 6QA9), la arginina 47 interacciona con otras dos subunidades (NDUFA13 y NDUF5), mientras que la arginina 98 mutada en nuestros pacientes, no está implicada en interacciones con otras subunidades del complejo I. Todo ello sugiere que la mutación descrita por Yatsuka et al. podría tener un mayor

impacto sobre la función de la proteína que la descrita en nuestro trabajo. No obstante, los estudios funcionales demuestran que la mutación identificada en nuestros pacientes afectaría de manera importante la estabilidad de la proteína y la función del complejo I. Los estudios Western blot realizados tanto en fibroblastos como en músculo de los pacientes, demostraron niveles muy reducidos de NDUFA8 y de otras subunidades del complejo I. Además, el ensamblaje de este complejo estaba drásticamente disminuido en ambos tejidos. Como era esperable, la actividad del complejo I también se encontraba reducida. En un contexto fisiológico la mayoría de complejo I se encuentra formando parte de supercomplejos, por lo que realizamos el análisis del ensamblaje de estas estructuras. De forma similar a lo que sucede en los individuos NDUFAF4, se observó una disminución de los supercomplejos de alto peso molecular, es decir, aquellos que contienen el complejo I (SCI/III₂/IV_n). Curiosamente, en el caso de los pacientes NDUFA8 se detectó un acúmulo anormal de subensamblajes del complejo I, pero no un incremento de los supercomplejos SCIII₂/IV_n como ocurría en los pacientes NDUFAF4. Dichos hallazgos concordarían con el modelo de ensamblaje del complejo I actual, en el que se sugiere que primero se ensamblan 3 módulos funcionales diferenciados (denominados N, Q y P) que posteriormente se unirán entre ellos para dar lugar al complejo I maduro (Guerrero-Castillo et al., 2017). Según este modelo, NDUFA8 se incorpora al módulo Q pre-formado y junto con otras subunidades permitiría su unión al módulo P (**Figura 15**). Los subsensamblajes que nosotros detectamos encajan con los intermediarios de las fases iniciales de la formación del módulo Q (129kDa). Estas observaciones, junto con el hecho de que las células de los pacientes presentan niveles reducidos pero detectables de la proteína NDUFA8, sugirieron la posibilidad de que la proteína mutada pudiera seguir incorporándose a los supercomplejos. A pesar de las alteraciones detectadas, en el estudio de respirometría de alta resolución no se observaron diferencias entre las células de los pacientes y las células control. Aunque se podría esperar un impacto más importante en la respiración mitocondrial, lo cierto es que dichos resultados concuerdan con la sintomatología leve que presentan nuestros pacientes. Cómo se ha ido nombrando a lo largo de la discusión de la tesis, la morfología mitocondrial también es un parámetro informativo para conocer el impacto de las mutaciones en la función mitocondrial. Si bien es cierto, en el caso concreto de las deficiencias del complejo I, los efectos en la morfología mitocondrial pueden ser muy variables (Koopman et al., 2007; Willems et al., 2009). De manera similar a a los pacientes NDUFAF4 se identificaron alteraciones leves aunque estadísticamente significativas en los individuos NDUFA8 (p<0.05).

Finalmente, con el fin de demostrar la patogenicidad de la mutación c.139C>T, realizamos un estudio de complementación funcional en fibroblastos inmortalizados de ambos pacientes.

Este estudio se llevó cabo en colaboración con el grupo del Dr Massimo Zeviani (University of Cambridge, UK). Los resultados demostraron que tras la transducción del cDNA “wild-type” *NDUFA8*, se recuperaba tanto la expresión basal de las subunidades del complejo I como la actividad enzimática de este complejo. Así pues, aunque esta variante se clasificó como VUS de acuerdo con los criterios del ACMG, nuestro trabajo ha demostrado su patogenicidad permitiendo reclasificarla como variante patogénica.

En resumen, en este trabajo confirmamos la implicación de mutaciones en *NDUFA8* como causa de enfermedad mitocondrial. De manera similar a las observaciones realizadas en los pacientes *NDUFA4*, la deficiencia de *NDUFA8* provoca defectos severos en la formación del complejo I y de los supercomplejos de la CRM, mostrando alteraciones leves pero significativas de la morfología mitocondrial. En el caso de los pacientes *NDUFA8*, el curso clínico de la enfermedad fue leve en comparación con el fenotipo severo neonatal observado en los individuos *NDUFA4*.

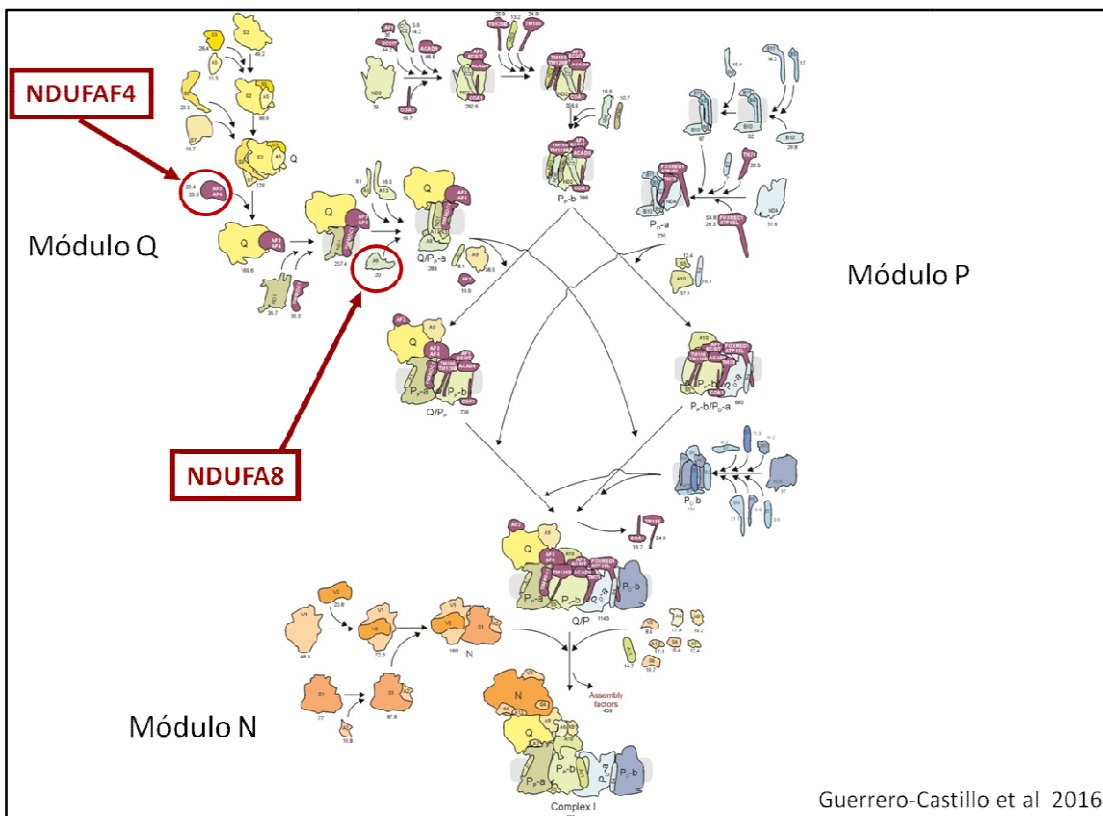


Figura 15. Modelo de ensamblaje del complejo I. El ensamblaje del complejo I implica la formación de módulos que se combinan para dar lugar al CI maduro. Modificado de (Guerrero-Castillo et al., 2017).

CONCLUSIONES

1. Las aproximaciones NGS han permitido identificar la causa genética de la enfermedad en pacientes con aciduria 3-MG y deficiencia del complejo I de la CRM.
2. Los estudios funcionales realizados en fibroblastos de los pacientes son una excelente herramienta para validar las consecuencias de las variantes genéticas identificadas mediante NGS.
3. La caracterización detallada de la función mitocondrial ha permitido profundizar en el conocimiento de la fisiopatología y en las bases moleculares implicadas en la patogénesis de las enfermedades mitocondriales estudiadas en esta tesis.
4. La deficiencia de TIMM50 produce una reducción generalizada del ensamblaje de los complejos y supercomplejos de la CRM, así como defectos en la composición de cardiolipinas, morfología y respiración mitocondrial.
5. La deficiencia de la proteína citosólica HACE1 se ha asociado a alteraciones de la morfología y de la función mitocondrial en un paciente con aciduria 3-MG.
6. Las alteraciones en la regulación de la autofagia, mitofagia y vías de respuesta al estrés oxidativo celular y mitocondrial están implicadas en la patogénesis de la enfermedad causada por mutaciones en *HACE1*.
7. Mutaciones en los genes *NDUFA4* y *NDUFA8* dan lugar a sendas deficiencias del complejo I de la CRM y provocan defectos severos en la formación de los supercomplejos que corroboran el papel de estas proteínas en el modelo actual de ensamblaje del complejo I.
8. Mutaciones en los genes *NDUFA4* y *NDUFA8* se asocian a alteraciones leves de la morfología mitocondrial.
9. La generación de modelos celulares y los estudios de complementación en fibroblastos inmortalizados han permitido determinar el impacto funcional de la deficiencia de TIMM50, así como la patogenicidad de la mutación identificada en *NDUFA8*.
10. La presencia de 3-MGA en orina ha permitido dirigir el diagnóstico genético en pacientes con mutaciones en *TIMM50*, *TMEM70*, *ATPAF2*, *DNAJC19*, *SERAC1* y *ECHS1*.
11. Es necesario el estudio de 3-MGA en orina en cohortes ampliadas de pacientes con mutaciones en *AR* y *HACE1* para incrementar el conocimiento sobre este biomarcador y contextualizar estas dos enfermedades en el conjunto de las acidurias 3-MG, ya que es la primera vez que se describe esta asociación.

BIBLIOGRAFÍA

A

Acín-Pérez, R., Bayona-Bafaluy, M. P., Fernández-Silva, P., Moreno-Loshuertos, R., Pérez-Martos, A., Bruna, C., Moraes, C. T., & Enríquez, J. A. (2004). Respiratory Complex III Is Required to Maintain Complex I in Mammalian Mitochondria. *Molecular Cell*, *13*(6), 805–815. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(04\)00124-8](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(04)00124-8)

Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Peleato, M. L., Pérez-Martos, A., & Enríquez, J. A. (2008). Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes. *Molecular Cell*, *32*(4), 529–539. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.10.021>

Akawi, N., McRae, J., Ansari, M., Balasubramanian, M., Blyth, M., Brady, A. F., Clayton, S., Cole, T., Deshpande, C., Fitzgerald, T. W., Foulds, N., Francis, R., Gabriel, G., Gerety, S. S., Goodship, J., Hobson, E., Jones, W. D., Joss, S., King, D., ... Hurles, M. E. (2015). Discovery of four recessive developmental disorders using probabilistic genotype and phenotype matching among 4,125 families. *Nature Genetics*, *47*(11), 1363–1369. <https://doi.org/10.1038/ng.3410>

Al Teneiji, A., Siriwardena, K., George, K., Mital, S., & Mercimek-Mahmutoglu, S. (2016). Progressive Cerebellar Atrophy and a Novel Homozygous Pathogenic DNAJC19 Variant as a Cause of Dilated Cardiomyopathy Ataxia Syndrome. *Pediatric Neurology*, *62*, 58–61. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2016.03.020>

Alban, C., Fatale, E., Joulani, A., Ilin, P., & Saada, A. (2017). The Relationship between Mitochondrial Respiratory Chain Activities in Muscle and Metabolites in Plasma and Urine: A Retrospective Study. *Journal of Clinical Medicine*, *6*(3), 31. <https://doi.org/10.3390/jcm6030031>

Alberts, B., Wilson, J. & Hunt, T. (2016). *Biología molecular de la célula*. Omega. http://cercabib.ub.edu/iii/encore/record/C__Rb2199272__SBIolog%EDa_molecular_de_la_c%E9lula__Orighresult__U__X7?lang=cat

Alston, C. L., Compton, A. G., Formosa, L. E., Strecker, V., Oláhová, M., Haack, T. B., Smet, J., Stouffs, K., Diakumis, P., Ciara, E., Cassiman, D., Romain, N., Yarham, J. W., He, L., De Paepe, B., Vanlander, A. V., Seneca, S., Feichtinger, R. G., Płoski, R., ... Taylor, R. W. (2016). Biallelic Mutations in TMEM126B Cause Severe Complex I Deficiency with a Variable Clinical Phenotype. *American Journal of Human Genetics*, *99*(1), 217–227. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.05.021>

Alston, C. L., Davison, J. E., Meloni, F., van der Westhuizen, F. H., He, L., Hornig-Do, H. T., Peet, A. C., Gissen, P., Goffrini, P., Ferrero, I., Wassmer, E., McFarland, R., & Taylor, R. W. (2012). Recessive germline SDHA and SDHB mutations causing leukodystrophy and isolated mitochondrial complex II deficiency. *Journal of Medical Genetics*, *49*(9), 569–577. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2012-101146>

Alston, C. L., Heidler, J., Dibley, M. G., Kremer, L. S., Taylor, L. S., Fratter, C., French, C. E., Glasgow, R. I. C., Feichtinger, R. G., Delon, I., Pagnamenta, A. T., Dolling, H., Lemonde, H., Aiton, N., Bjørnstad, A., Henneke, L., Gärtner, J., Thiele, H., Tauchmannova, K., ... Taylor, R. W. (2018). Bi-allelic Mutations in NDUFA6 Establish Its Role in Early-Onset Isolated Mitochondrial Complex I Deficiency. *American Journal of Human Genetics*, *103*(4), 592–601. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.08.013>

Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J. H., Staden, R., & Young, I. G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, *290*, 457–465.

Anglesio, M. S., Evdokimova, V., Melnyk, N., Zhang, L., Fernandez, C. V., Grundy, P. E., Leach, S., Marra, M. A., Brooks-Wilson, A. R., Penninger, J., & Sorensen, P. H. B. (2004). Differential expression of a novel ankyrin containing E3 ubiquitin-protein ligase, Hace1, in sporadic Wilms' tumor versus normal kidney. *Human Molecular Genetics*, *13*(18), 2061–2074. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh215>

Anikster, Y., Kleta, R., Shaag, A., Gahl, W. A., & Elpeleg, O. (2001). Type III 3-methylglutaconic aciduria (optic atrophy plus syndrome, or costeff optic atrophy syndrome): Identification of the OPA3 gene and its founder mutation in Iraqi Jews. *American Journal of Human Genetics*, *69*(6), 1218–1224. <https://doi.org/10.1086/324651>

Aprikyan, A. A., & Khuchua, Z. (2013). Advances in the understanding of Barth syndrome. *British Journal of Haematology*, *161*(3), 330–338. <https://doi.org/10.1111/bjh.12271>

B

Baertling, F., Sánchez-Caballero, L., van den Brand, M. A. M., Fung, C. W., Chan, S. H. S., Wong, V. C. N., Hellebrekers, D. M. E., de Coo, I. F. M., Smeitink, J. A. M., Rodenburg, R. J. T., & Nijtmans, L. G. J. (2018). NDUF9 point mutations cause a variable mitochondrial complex I assembly defect. *Clinical Genetics*, *93*(1), 111–118. <https://doi.org/10.1111/cge.13089>

Baertling, F., Sánchez-Caballero, L., Van Den Brand, M. A. M., Wintjes, L. T., Brink, M., Van Den Brandt, F. A., Wilson, C., Rodenburg, R. J. T., & Nijtmans, L. G. J. (2017). NDUF4 variants are associated with Leigh syndrome and cause a specific mitochondrial complex I assembly defect. *European Journal of Human Genetics*, *25*(11), 1273–1277. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2017.133>

Ban, T., Ishihara, T., Kohno, H., Saita, S., Ichimura, A., Maenaka, K., Oka, T., Mihara, K., & Ishihara, N. (2017). Molecular basis of selective mitochondrial fusion by heterotypic action between OPA1 and cardiolipin. *Nature Cell Biology*, *19*(7), 856–863. <https://doi.org/10.1038/ncb3560>

Bar-Peled, L., & Sabatini, D. M. (2014). Regulation of mTORC1 by amino acids. *Trends in Cell Biology*, *24*(7), 400–406. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.03.003>

Barile, M., Giancaspero, T. A., Brizio, C., Panebianco, C., Indiveri, C., Galluccio, M., Vergani, L., Eberini, I., & Gianazza, E. (2013). Biosynthesis of flavin cofactors in man: implications in health and disease. *Current Pharmaceutical Design*, *19*(14), 2649–2675. <https://doi.org/10.2174/1381612811319140014>

Barshop, B. A. (2004). Metabolomic approaches to mitochondrial disease: Correlation of urine organic acids. *Mitochondrion*, *4*(5-6 SPEC. ISS.), 521–527. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2004.07.010>

Barth, P. G., Scholte, H. R., Berden, J. A., Van Der Klei-Van Moorsel, J. M., Luyt-Houwen, I. E. M., Van'T Veer-Korthof, E. T., Van Der Harten, J. J., & Sobotka-Plojhar, M. A. (1983). An X-linked mitochondrial disease affecting cardiac muscle, skeletal muscle and neutrophil leucocytes. *Journal of the Neurological Sciences*, *62*(1–3), 327–355. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(83\)90209-5](https://doi.org/10.1016/0022-510X(83)90209-5)

Barth, P. G., Valianpour, F., Bowen, V. M., Lam, J., Duran, M., Vaz, F. M., & Wanders, R. J. A. (2004). X-Linked Cardioskeletal Myopathy and Neutropenia (Barth Syndrome): An Update. *American Journal of Medical Genetics*, *126 A*(4), 349–354. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.20660>

Becker, T., Böttinger, L., & Pfanner, N. (2012). Mitochondrial protein import: from transport pathways to an integrated network. *Trends in Biochemical Sciences*, *37*(3), 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.11.004>

Becker, T., Pfannschmidt, S., Guiard, B., Stojanovski, D., Milenkovic, D., Kutik, S., Pfanner, N., Meisinger, C., & Wiedemann, N. (2008). Biogenesis of the mitochondrial TOM complex: Mim1 promotes insertion and assembly of signal-anchored receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(1), 120–127. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706997200>

Bekheirnia, M. R., Zhang, W., Eble, T., Willis, A., Shaibani, A., Wong, L. J. C., Scaglia, F., & Dhar, S. U. (2012). POLG mutation in a patient with cataracts, early-onset distal muscle weakness and atrophy, ovarian dysgenesis and 3-methylglutaconic aciduria. *Gene*, *499*(1), 209–212. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.02.034>

Bell, E. L., & Chandel, N. S. (2007). Mitochondrial oxygen sensing: Regulation of hypoxia-inducible factor by mitochondrial generated reactive oxygen species. *Essays in Biochemistry*, *43*, 17–27. <https://doi.org/10.1042/BSE0430017>

Bénit, P., Chretien, D., Kadhom, N., De Lonlay-Debeney, P., Cormier-Daire, V., Cabral, A., Peudenier, S., Rustin, P., Munnich, A., & Rötig, A. (2001). Large-scale deletion and point mutations of the nuclear NDUFV1 and NDUF51 genes in mitochondrial complex I deficiency. *American Journal of Human Genetics*, *68*(6), 1344–1352. <https://doi.org/10.1086/320603>

- Benson, M. D., Ferreira, P., & MacDonald, I. M. (2017). Oculomotor apraxia and dilated cardiomyopathy with ataxia syndrome: A case report. *Ophthalmic Genetics*, 38(1), 88–90. <https://doi.org/10.3109/13816810.2015.1137327>
- Berein-Hahn, J., & Vöth, M. (1994). Dynamics of mitochondria in living cells: Shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microscopy Research and Technique*, 27(3), 198–219. <https://doi.org/10.1002/jemt.1070270303>
- Beyer, K., & Klingenberg, M. (1985). ADP/ATP carrier protein from beef heart mitochondria has high amounts of tightly bound cardiolipin, as revealed by ³¹P nuclear magnetic resonance. *Biochemistry*, 24(15), 3821–3826. <https://doi.org/10.1021/bi00336a001>
- Bione, S., D'Adamo, P., Maestrini, E., Gedeon, A. K., Bolhuis, P. A., & Toniolo, D. (1996). A novel X-linked gene, G4.5, is responsible for Barth syndrome. *Nature Genetics*, 12(4), 385–389. <https://doi.org/10.1038/ng0496-385>
- Bogenhagen, D. C. DA. (1978). Mechanism of mitochondrial DNA replication in mouse L-cells: Kinetics of synthesis and turnover of the initiation sequence. *Journal of Molecular Biology*, 119, 49–68.
- Bolender, N., Sickmann, A., Wagner, R., Meisinger, C., & Pfanner, N. (2008). Multiple pathways for sorting mitochondrial precursor proteins. *EMBO Reports*, 9(1), 42–49. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401126>
- Bolisetty, S., & Jaimes, E. A. (2013). Mitochondria and reactive oxygen species: Physiology and pathophysiology. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 6306–6344. <https://doi.org/10.3390/ijms14036306>
- Bonfante, E., Koenig, M. K., Adejumo, R. B., Perinjelil, V., & Riascos, R. F. (2016). The neuroimaging of Leigh syndrome: case series and review of the literature. *Pediatric Radiology*, 46(4), 443–451. <https://doi.org/10.1007/s00247-015-3523-5>
- Borgia, D., Malena, A., Spinazzi, M., Desbats, M. A., Salvati, L., Russell, A. P., Miotto, G., Tosatto, L., Pegoraro, E., Sorarù, G., Pennuto, M., & Vergani, L. (2017). Increased mitophagy in the skeletal muscle of spinal and bulbar muscular atrophy patients. *Human Molecular Genetics*, 26(6), 1087–1103. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx019>
- Bowron, A., Frost, R., Powers, V. E. C., Thomas, P. H., Heales, S. J. R., & Steward, C. G. (2013). Diagnosis of Barth syndrome using a novel LC-MS/MS method for leukocyte cardiolipin analysis. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 36(5), 741–746. <https://doi.org/10.1007/s10545-012-9552-4>
- Boycott, K. M., Hartley, T., Biesecker, L. G., Gibbs, R. A., Innes, A. M., Riess, O., Belmont, J., Dunwoodie, S. L., Jovic, N., Lassmann, T., Mackay, D., Temple, I. K., Visel, A., & Baynam, G. (2019). A Diagnosis for All Rare Genetic Diseases: The Horizon and the Next Frontiers. *Cell*, 177(1), 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.040>
- Brand, M. D. (2010). The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Experimental Gerontology*, 45(7–8), 466–472. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.01.003>
- Brandt, U. (2006). Energy Converting NADH: Quinone Oxidoreductase (Complex I). *Annual Review of Biochemistry*, 75(1), 69–92. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142539>
- Brix, J., Dietmeier, K., & Pfanner, N. (1997). Differential recognition of preproteins by the purified cytosolic domains of the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(33), 20730–20735. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.33.20730>
- Brown, G. K., Otero, L. J., LeGris, M., & Brown, R. M. (1994). Pyruvate dehydrogenase deficiency. *Journal of Medical Genetics*, 31(11), 875–879. <https://doi.org/10.1136/jmg.31.11.875>
- Budde, S. M. S., Van Den Heuvel, L. P. W. J., Janssen, A. J., Smeets, R. J. P., Buskens, C. A. F., DeMeirleir, L., Van Coster, R., Baethmann, M., Voit, T., Trijbels, J. M. F., & Smeitink, J. A. M. (2000). Combined enzymatic complex I and III deficiency associated with mutations in the nuclear encoded NDUFS4 gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 275(1), 63–68.

<https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3257>

Bugiani, M., Invernizzi, F., Alberio, S., Briem, E., Lamantea, E., Carrara, F., Moroni, I., Farina, L., Spada, M., Donati, M. A., Uziel, G., & Zeviani, M. (2004). Clinical and molecular findings in children with complex I deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1659(2–3), 136–147. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.09.006>

Buján, N., Arias, A., Montero, R., García-Villoria, J., Lissens, W., Seneca, S., Espinós, C., Navas, P., De Meirleir, L., Artuch, R., Briones, P., & Ribes, A. (2014). Characterization of CoQ₁₀ biosynthesis in fibroblasts of patients with primary and secondary CoQ₁₀ deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 37(1), 53–62. <https://doi.org/10.1007/s10545-013-9620-4>

Burki, F. (2016). Mitochondrial evolution: Going, going, gone. *Current Biology*, 26(10), R410–R412. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.04.032>

C

Calvo, S. E., Compton, A. G., Hershman, S. G., Lim, S. C., Lieber, S., Tucker, E. J., Laskowski, A., Garone, C., Liu, S., Jaffe, D. B., Christodoulou, J., Fletcher, J. M., & Bruno, D. L. (2012). Molecular Diagnosis of Infantile Mitochondrial Disease with Targeted Next-Generation Sequencing. *Science Translational Medicine*, 4(118). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003310>.

Cameron, J. M., Levandovskiy, V., MacKay, N., Ackerley, C., Chitayat, D., Raiman, J., Halliday, W. H., Schulze, A., & Robinson, B. H. (2011). Complex V TMEM70 deficiency results in mitochondrial nucleoid disorganization. *Mitochondrion*, 11(1), 191–199. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2010.09.008>

Cantlay, A., Shokrollahi, K., Allen, J., Lunt, P., Newbury-Ecob, R., & Steward, C. (1999). Genetic analysis of the G4.5 gene in families with suspected Barth syndrome. *The Journal of Pediatrics*, 135, 311–315.

Cantó, C., Gerhart-Hines, Z., Feige, J. N., Lagouge, M., Noriega, L., Milne, J. C., Elliott, P. J., Puigserver, P., & Auwerx, J. (2009). AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature*, 458(7241), 1056–1060. <https://doi.org/10.1038/nature07813>

Capo-Chichi, J. M., Boissel, S., Brustein, E., Pickles, S., Fallet-Bianco, C., Nassif, C., Patry, L., Dobrzyniecka, S., Liao, M., Labuda, D., Samuels, M. E., Hamdan, F. F., Velde, C. Vande, Rouleau, G. A., Drapeau, P., & Michaud, J. L. (2015). Disruption of CLPB is associated with congenital microcephaly, severe encephalopathy and 3-methylglutaconic aciduria. *Journal of Medical Genetics*, 52(5), 303–311. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2014-102952>

Chacinska, A., Lind, M., Frazier, A. E., Dudek, J., Meisinger, C., Geissler, A., Sickmann, A., Meyer, H. E., Truscott, K. N., Guiard, B., Pfanner, N., & Rehling, P. (2005). Mitochondrial presequence translocase: switching between TOM tethering and motor recruitment involves Tim21 and Tim17. *Cell*, 120(6), 817–829. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.011>

Chacinska, A., Pfanschmidt, S., Wiedemann, N., Kozjak, V., Sanjuán Szklarz, L. K., Schulze-Specking, A., Truscott, K. N., Guiard, B., Meisinger, C., & Pfanner, N. (2004). Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins. *The EMBO Journal*, 23(19), 3735–3746. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600389>

Chandel, N. S. (2014). Mitochondria as signaling organelles. *BMC Biology*, 12, 34. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-12-34>

Chatzisprou, I. A., Guerrero-Castillo, S., Held, N. M., Ruitter, J. P. N., Denis, S. W., IJlst, L., Wanders, R. J., van Weeghel, M., Ferdinandusse, S., Vaz, F. M., Brandt, U., & Houtkooper, R. H. (2018). Barth syndrome cells display widespread remodeling of mitochondrial complexes without affecting metabolic flux distribution. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*, 1864(11), 3650–3658. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.08.041>

Chen, X., Glytsou, C., Zhou, H., Narang, S., Reyna, D. E., Lopez, A., Sakellaropoulos, T., Gong, Y., Kloetgen, A., Yap, Y. S., Wang, E., Gavathiotis, E., & Tsirigos, A. (2020). *leukemia to Venetoclax treatment*. 9(7),

890–909. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0117.Targeting>

Chinnery, P. F. (2015). Mitochondrial disease in adults: what's old and what's new? *EMBO Molecular Medicine*, 7(12), 1503–1512. <https://doi.org/10.15252/emmm.201505079>

Chipuk, J. E., Bouchier-Hayes, L., & Green, D. R. (2006). Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: The innocent bystander scenario. *Cell Death and Differentiation*, 13(8), 1396–1402. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401963>

Christodoulou, J., McInnes, R., Jay, V., Wilson, G., Becker, L. E., Lehotay, D. C., Platt, B. A., Bridge, P. J., Robinson, B. H., & Clarke, J. T. R. (1994). Barth syndrome: clinical observations and genetic linkage studies. *American Journal of Medical Genetics*, 50(3), 255–264.

Chu, C. T., Ji, J., Dagda, R. K., Jiang, J. F., Tyurina, Y. Y., Kapralov, A. A., Tyurin, V. A., Yanamala, N., Shrivastava, I. H., Mohammadyani, D., Zhi, K., Wang, Q., Zhu, J., Klein, J., Balasubramanian, K., Amoscato, A. A., Huang, Z., Gusdon, A. M., Cheikhi, A., ... Valerian, E. (2013). Cardiolipin externalization to the outer mitochondrial membrane acts as an elimination signal for mitophagy in neuronal cells. *Nature Cell Biology*, 15(10), 1197–1205. <https://doi.org/doi:10.1038/ncb2837>

Ciafaloni, E., Ricci, E., Shanske, S., Moraes, C. T., Silvestri, G., Hirano, M., Simonetti, S., Angelini, C., Donati, M. A., Garcia, C., Martinuzzi, A., Mosewich, R., Servidei, S., Zammarchi, E., Bonilla, E., DeVivo, D. C., Rowland, L. P., Schon, E. A., & DiMauro, S. (1992). MELAS: Clinical features, biochemistry, and molecular genetics. *Annals of Neurology*, 31(4), 391–398. <https://doi.org/10.1002/ana.410310408>

Ciechanover, A., Heller, H., Elias, S., Haas, A. L., & Hershko, A. (1980). ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(3), 1365–1368. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.3.1365>

Čížková, A., Stránecký, V., Mayr, J. A., Tesařová, M., Havlíčková, V., Paul, J., Ivánek, R., Kuss, A. W., Hansíková, H., Kaplanová, V., Vrbacký, M., Hartmannová, H., Nosková, L., Honzík, T., Drahot, Z., Magner, M., Hejzlarová, K., Sperl, W., Zeman, J., ... Kmoch, S. (2008). TMEM70 mutations cause isolated ATP synthase deficiency and neonatal mitochondrial encephalomyopathy. *Nature Genetics*, 40(11), 1288–1290. <https://doi.org/10.1038/ng.246>

Cogliati, S., Enriquez, J. A., & Scorrano, L. (2016). Mitochondrial Cristae: Where Beauty Meets Functionality. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(3), 261–273. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.01.001>

Colina-Tenorio, L., Horten, P., Pfanner, N., & Rampelt, H. (2020). Shaping the mitochondrial inner membrane in health and disease. *Journal of Internal Medicine*, 287(6), 645–664. <https://doi.org/10.1111/joim.13031>

Colombini, M., Blachly-Dyson, E., & Forte, M. (1996). VDAC, a channel in the outer mitochondrial membrane. *Ion Channels*, 4, 169–202. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1775-1_5

Cooper, G. M. (2000). *The Cell, A Molecular Approach* (Sinauer associates (ed.); 2nd editio).

Costeff, H., Elpeleg, O., Apter, N., Divry, P., & Gadoth, N. (1993). 3-Methylglutaconic aciduria in “optic atrophy plus.” *Annals of Neurology*, 33(1), 103–104. <https://doi.org/10.1002/ana.410330117>

Costello, M. J., Brennan, L. A., Basu, S., Chauss, D., Mohamed, A., Gilliland, K. O., Johnsen, S., Menko, A. S., & Kantorow, M. (2013). Autophagy and mitophagy participate in ocular lens organelle degradation. *Experimental Eye Research*, 116, 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2013.08.017>

Craven, L., Alston, C. L., Taylor, R. W., & Turnbull, D. M. (2017). Recent Advances in Mitochondrial Disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 18(1), 257–275. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-091416-035426>

Cummings, B. B., Marshall, J. L., Tukiainen, T., Lek, M., Donkervoort, S., Reghan Foley, A., Bolduc, V., Waddell, L. B., Sandaradura, S. A., O, G. L., Estrella, E., Reddy, H. M., Zhao, F., Weisburd, B., Karczewski, K. J., O, A. H., Birnbaum, D., Sarkozy, A., Hu, Y., ... MacArthur, D. G. (2017). Improving genetic diagnosis

in Mendelian disease with transcriptome sequencing Beryl. *Sci Transl Med*, 12(386), 1–25. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aal5209>

Curran, S. P., Leuenberger, D., Oppliger, W., & Koehler, C. M. (2002). The Tim9p-Tim10p complex binds to the transmembrane domains of the ADP/ATP carrier. *The EMBO Journal*, 21(5), 942–953. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.5.942>

D

D’Silva, P. D., Schilke, B., Walter, W., Andrew, A., & Craig, E. A. (2003). J protein cochaperone of the mitochondrial inner membrane required for protein import into the mitochondrial matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(24), 13839–13844. <https://doi.org/10.1073/pnas.1936150100>

Danhelovska, T., Kolarova, H., Zeman, J., Hansikova, H., Vaneckova, M., Lambert, L., Kucerova-Vidrova, V., Berankova, K., Honzik, T., & Tesarova, M. (2020). Multisystem mitochondrial diseases due to mutations in mtDNA-encoded subunits of complex i. *BMC Pediatrics*, 20(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12887-020-1912-x>

Daugaard, M., Nitsch, R., Razaghi, B., McDonald, L., Jarrar, A., Torrino, S., Castillo-Lluva, S., Rotblat, B., Li, L., Malliri, A., Lemichez, E., Mettouchi, A., Berman, J. N., Penninger, J. M., & Sorensen, P. H. (2013). Hace1 controls ROS generation of vertebrate Rac1-dependent NADPH oxidase complexes. *Nature Communications*, 4, 1–13. <https://doi.org/10.1038/ncomms3180>

Davey, K. M., Parboosingh, J. S., McLeod, D. R., Chan, A., Casey, R., Ferreira, P., Snyder, F. F., Bridge, P. J., & Bernier, F. P. (2006). Mutation of DNAJC19, a human homologue of yeast inner mitochondrial membrane co-chaperones, causes DCMA syndrome, a novel autosomal recessive Barth syndrome-like condition. *Journal of Medical Genetics*, 43(5), 385–393. <https://doi.org/10.1136/jmg.2005.036657>

Davies, K. M., Strauss, M., Daum, B., Kief, J. H., Osiewacz, H. D., Rycovska, A., Zickermann, V., & Kühlbrandt, W. (2011). Macromolecular organization of ATP synthase and complex I in whole mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(34), 14121–14126. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103621108>

Davison, J. E., & Rahman, S. (2017). Recognition, investigation and management of mitochondrial disease. *Archives of Disease in Childhood*, 102(11), 1082–1090. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2016-311370>

De Laat, P., Koene, S., Van Den Heuvel, L. P. W. J., Rodenburg, R. J. T., Janssen, M. C. H., & Smeitink, J. A. M. (2012). Clinical features and heteroplasmy in blood, urine and saliva in 34 Dutch families carrying the m.3243A > G mutation. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 35(6), 1059–1069. <https://doi.org/10.1007/s10545-012-9465-2>

De Meirleir, L., Seneca, S., Lissens, W., De Clercq, I., Eyskens, F., Gerlo, E., Smet, J., & Van Coster, R. (2004). Respiratory chain complex V deficiency due to a mutation in the assembly gene ATP12. *Journal of Medical Genetics*, 41(2), 120–124. <https://doi.org/10.1136/jmg.2003.012047>

Dernoncourt, A., Bouchereau, J., Acquaviva-Bourdain, C., Wicker, C., De Lonlay, P., Gourguechon, C., Sevestre, H., Merle, P.-E., Maizel, J., & Brault, C. (2019). Myogenic Disease and Metabolic Acidosis: Consider Multiple Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency. *Case Reports in Critical Care*, 2019, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2019/1598213>

Di Malta, C., Siciliano, D., Calcagni, A., Monfregola, J., Punzi, S., Pastore, N., Eastes, A. N., Davis, O., De Cegli, R., Zampelli, A., Di Giovannantonio, L. G., Nusco, E., Platt, N., Guida, A., Ogmundsdottir, M. H., Lanfrancone, L., Perera, R. M., Zoncu, R., Pelicci, P. G., ... Ballabio, A. (2017). Transcriptional activation of RagD GTPase controls mTORC1 and promotes cancer growth. *Science (New York, N.Y.)*, 356(6343), 1188–1192. <https://doi.org/10.1126/science.aag2553>

Diaz, F., Enriquez, J. A., & Moraes, C. T. (2012). Cells Lacking Rieske Iron-Sulfur Protein Have a Reactive Oxygen Species-Associated Decrease in Respiratory Complexes I and IV. *Molecular and Cellular Biology*,

32(2), 415–429. <https://doi.org/10.1128/mcb.06051-11>

Diaz, Francisca, Fukui, H., Garcia, S., & Moraes, C. T. (2006). Cytochrome c Oxidase Is Required for the Assembly/Stability of Respiratory Complex I in Mouse Fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology*, 26(13), 4872–4881. <https://doi.org/10.1128/mcb.01767-05>

Diebold, L., & Chandel, N. S. (2016). Mitochondrial ROS regulation of proliferating cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 100, 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.198>

Dikic, I. (2017). Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. *Annual Review of Biochemistry*, 86(1), 193–224. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044908>

Dikic, I., & Elazar, Z. (2018). Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(6), 349–364. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0003-4>

Dimauro, S. (2011). A history of mitochondrial diseases. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 34(2), 261–276. <https://doi.org/10.1007/s10545-010-9082-x>

DiMauro, S., & Garone, C. (2010). Historical perspective on mitochondrial medicine. *Developmental Disabilities Research Reviews*, 16(2), 106–113. <https://doi.org/10.1002/ddrr.102>

Diot, A., Hinks-Roberts, A., Lodge, T., Liao, C., Dombi, E., Morten, K., Brady, S., Fratter, C., Carver, J., Muir, R., Davis, R., Green, C. J., Johnston, I., Hilton-Jones, D., Sue, C., Mortiboys, H., & Poulton, J. (2015). A novel quantitative assay of mitophagy: Combining high content fluorescence microscopy and mitochondrial DNA load to quantify mitophagy and identify novel pharmacological tools against pathogenic heteroplasmic mtDNA. *Pharmacological Research*. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.07.014>

Duchen, M. R. (2004). Mitochondria in health and disease: Perspectives on a new mitochondrial biology. *Molecular Aspects of Medicine*, 25(4), 365–451. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2004.03.001>

E

Eble, K. S., Coleman, W. B., Hantgan, R. R., & Cunningham, C. C. (1990). Tightly associated cardiolipin in the bovine heart mitochondrial ATP synthase as analyzed by ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(32), 19434–19440. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2147180>

Ehrnhoefer, D. E., Southwell, A. L., Sivasubramanian, M., Qiu, X., Villanueva, E. B., Xie, Y., Watti, S., Anderson, L., Fazeli, A., Casal, L., Felczak, B., Tsang, M., & Hayden, M. R. (2018). HACE1 is essential for astrocyte mitochondrial function and influences Huntington disease phenotypes in vivo. *Human Molecular Genetics*, 27(2), 239–253. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx394>

Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>

Elpeleg, O., Costeff, H., Joseph, A., Shental, Y., Weitz, R., & Gibson, K. (1994). 3-METHYLGLUTACONIC ACIDURIA IN THE IRAQI-JEWISH ‘OPTIC ATROPHY PLUS’ (COSTEFF) SYNDROME. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 36(2), 167–172.

Endo, H., Hasegawa, K., Narisawa, K., Tada, K., Kagawa, Y., & Ohta, S. (1989). Defective Gene in Lactic Acidosis: Abnormal Pyruvate Dehydrogenase E1 Alpha-Subunit Caused by a Frame Shift. *American Journal of Human Genetics*, 44(3), 358–364.

Enríquez, J. A. (2016). Supramolecular Organization of Respiratory Complexes. *Annual Review of Physiology*, 78, 533–561. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105031>

Eura, Y., Ishihara, N., Yokota, S., & Mihara, K. (2003). Two Mitofusin Proteins, Mammalian Homologues of FZO, with Distinct Functions Are Both Required for Mitochondrial Fusion. *Journal of Biochemistry*, 134(3), 333–344. <https://doi.org/10.1093/jb/mvg150>

F

- Falk, M. J. (2020). *Mitochondrial Disease Gene Compendium - From Genes to Clinical Manifestations*. Academic Press.
- Fassone, E., & Rahman, S. (2012). Complex I deficiency: Clinical features, biochemistry and molecular genetics. *Journal of Medical Genetics*, 49(9), 578–590. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2012-101159>
- Feichtinger, R. G., Brunner-Krainz, M., Alhaddad, B., Wortmann, S. B., Kovacs-Nagy, R., Stojakovic, T., Erwa, W., Resch, B., Windischhofer, W., Verheyen, S., Uhrig, S., Windpassinger, C., Locker, F., Makowski, C., Strom, T. M., Meitinger, T., Prokisch, H., Sperl, W., Haack, T. B., & Mayr, J. A. (2017). Combined Respiratory Chain Deficiency and UQCC2 Mutations in Neonatal Encephalomyopathy: Defective Supercomplex Assembly in Complex III Deficiencies. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/7202589>
- Ferdinandusse, S., Friederich, M. W., Burlina, A., Ruiten, J. P. N., Coughlin, C. R., Dishop, M. K., Gallagher, R. C., Bedoyan, J. K., Vaz, F. M., Waterham, H. R., Gowan, K., Chatfield, K., Bloom, K., Bennett, M. J., Elpeleg, O., Van Hove, J. L. K., & Wanders, R. J. A. (2015). Clinical and biochemical characterization of four patients with mutations in ECHS1. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 10(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13023-015-0290-1>
- Fernández-Vizarra, E., Tiranti, V., & Zeviani, M. (2009). Assembly of the oxidative phosphorylation system in humans: What we have learned by studying its defects. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1793(1), 200–211. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.05.028>
- Fernandez-Vizarra, E., & Zeviani, M. (2018). Mitochondrial complex III Rieske Fe-S protein processing and assembly. *Cell Cycle*, 17(6), 681–687. <https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1417707>
- Fernández-Vizarra, E., & Zeviani, M. (2015). Nuclear gene mutations as the cause of mitochondrial complex III deficiency. *Frontiers in Genetics*, 6(APR), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00134>
- Ferreira, C. R., van Karnebeek, C. D. M., Vockley, J., & Blau, N. (2019). A proposed nosology of inborn errors of metabolism. *Genetics in Medicine*, 21(1), 102–106. <https://doi.org/10.1038/s41436-018-0022-8>
- Fiedorczuk, K., Letts, J. A., Degliesposti, G., Kaszuba, K., Skehel, M., & Sazanov, L. A. (2016). Atomic structure of the entire mammalian mitochondrial complex I. *Nature*, 538(7625), 406–410. <https://doi.org/10.1038/nature19794>
- Fiedorczuk, K., & Sazanov, L. A. (2018). Mammalian Mitochondrial Complex I Structure and Disease-Causing Mutations. *Trends in Cell Biology*, 28(10), 835–867. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.06.006>
- Finley, D. (2012). *Recognition and Processing of Ubiquitin-Protein Conjugates by the Proteasome* Finley, D. (2012). *Recognition and Processing of Ubiquitin-Protein Conjugates by the Proteasome*, 477–513. doi:10.1146/annurev.biochem.78.081507.101607. Recognition. 477–513. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.081507.101607.Recognition>
- Finsterer, J., & Frank, M. (2013). Haematological features in Barth syndrome. *Current Opinion in Hematology*, 20(1), 36–40. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e32835a01d9>
- Finsterer, J., Scorza, F. A., Fiorini, A. C., & Scorza, C. A. (2020). MEGDEL Syndrome. *Pediatric Neurology*, 110, 25–29. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2020.03.009>
- Fiorese, C. J., Schulz, A. M., Lin, Y. F., Rosin, N., Pellegrino, M. W., & Haynes, C. M. (2016). The Transcription Factor ATF5 Mediates a Mammalian Mitochondrial UPR. *Current Biology*, 26(15), 2037–2043. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.06.002>
- Fitzsimons, P. E., Alston, C. L., Bonnen, P. E., Hughes, J., Crushell, E., Geraghty, M. T., Tetreault, M., O'Reilly, P., Twomey, E., Sheikh, Y., Walsh, R., Waterham, H. R., Ferdinandusse, S., Wanders, R. J. A., Taylor, R. W., Pitt, J. J., & Mayne, P. D. (2018). Clinical, biochemical, and genetic features of four patients with short-chain enoyl-CoA hydratase (ECHS1) deficiency. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 176(5), 1115–1127. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.38658>

Formosa, L. E., & Ryan, M. T. (2018). Mitochondrial OXPHOS complex assembly lines. *Nature Cell Biology*, 20(5), 511–513. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0098-z>

Franco-Iborra, S., & Tanji, K. (2020). Histochemical and immunohistochemical staining methods to visualize mitochondrial proteins and activity. In *Methods in Cell Biology* (1st ed., Vol. 155). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2019.11.024>

Frazier, A. E., Thorburn, D. R., & Compton, A. G. (2019). Mitochondrial energy generation disorders: Genes, mechanisms, and clues to pathology. *Journal of Biological Chemistry*, 294(14), 5386–5395. <https://doi.org/10.1074/jbc.R117.809194>

Frazier, A. E., Vincent, A. E., Turnbull, D. M., Thorburn, D. R., & Taylor, R. W. (2020). Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymes in cells and tissues. In *Methods in Cell Biology* (1st ed., Vol. 155). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2019.11.007>

Frezza, C. (2017). Mitochondrial metabolites: undercover signalling molecules. *Interface Focus*, 7(2), 20160100. <https://doi.org/10.1098/rsfs.2016.0100>

Friederich, M. W., Erdogan, A. J., Coughlin, C. R., Elos, M. T., Jiang, H., O'Rourke, C. P., Lovell, M. A., Wartchow, E., Gowan, K., Chatfield, K. C., Chick, W. S., Spector, E. B., Van Hove, J. L. K., & Riemer, J. (2017). Mutations in the accessory subunit NDUFB10 result in isolated complex I deficiency and illustrate the critical role of intermembrane space import for complex I holoenzyme assembly. *Human Molecular Genetics*, 26(4), 702–716. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw431>

Friedman, J. R., Mourier, A., Yamada, J., Michael McCaffery, J., & Nunnari, J. (2015). MICOS coordinates with respiratory complexes and lipids to establish mitochondrial inner membrane architecture. *ELife*, 2015(4), 1–61. <https://doi.org/10.7554/eLife.07739>

G

García-Villoria, J., De Azua, B., Tort, F., Mosegaard, S., Ugarteburu, O., Texidó, L., Morales-Romero, B., Olsen, R. K. J., & Ribes, A. (2018). FLAD1, encoding FAD synthase, is mutated in a patient with myopathy, scoliosis and cataracts. *Clinical Genetics*, 94(6), 592–593. <https://doi.org/10.1111/cge.13452>

Garrod, A. . (1909). Inborn errors of metabolism. *Oxford University Press*.

Geissler, A., Chacinska, A., Truscott, K. N., Wiedemann, N., Brandner, K., Sickmann, A., Meyer, H. E., Meisinger, C., Pfanner, N., & Rehling, P. (2002). The mitochondrial presequence translocase: An essential role of Tim50 in directing preproteins to the import channel. *Cell*, 111(4), 507–518. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01073-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01073-5)

Gödiker, J., Grüneberg, M., Duchesne, I., Reunert, J., Rust, S., Westermann, C., Wada, Y., Classen, G., Langhans, C. D., Schlingmann, K. P., Rodenburg, R. J., Pohlmann, R., & Marquardt, T. (2018). QIL1-dependent assembly of MICOS complex-lethal mutation in C19ORF70 resulting in liver disease and severe neurological retardation. *Journal of Human Genetics*, 63(6), 707–716. <https://doi.org/10.1038/s10038-018-0442-y>

Gonorazky, H. D., Naumenko, S., Ramani, A. K., Nelakuditi, V., Mashouri, P., Wang, P., Kao, D., Ohri, K., Viththiyapaskaran, S., Tarnopolsky, M. A., Mathews, K. D., Moore, S. A., Osorio, A. N., Villanova, D., Kemaladewi, D. U., Cohn, R. D., Brudno, M., & Dowling, J. J. (2019). Expanding the Boundaries of RNA Sequencing as a Diagnostic Tool for Rare Mendelian Disease. *American Journal of Human Genetics*, 104(3), 466–483. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2019.01.012>

Gorman, G. S., Chinnery, P. F., DiMauro, S., Hirano, M., Koga, Y., McFarland, R., Suomalainen, A., Thorburn, D. R., Zeviani, M., & Turnbull, D. M. (2016). Mitochondrial diseases. *Nature Reviews Disease Primers*, 2, 1–23. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.80>

Gough, D. R., & Cotter, T. G. (2011). Hydrogen peroxide: A Jekyll and Hyde signalling molecule. *Cell Death and Disease*, 2(10), e213-8. <https://doi.org/10.1038/cddis.2011.96>

Grau, T., Burbulla, L. F., Engl, G., Delettre, C., Delprat, B., Oexle, K., Leo-Kottler, B., Roscioli, T., Krüger, R., Rapaport, D., Wissinger, B., & Schimpf-Linzenbold, S. (2013). A novel heterozygous OPA3 mutation located in the mitochondrial target sequence results in altered steady-state levels and fragmented mitochondrial network. *Journal of Medical Genetics*, *50*(12), 848–858. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2013-101774>

Greggio, C., Jha, P., Kulkarni, S. S., Lagarrigue, S., Broskey, N. T., Boutant, M., Wang, X., Conde Alonso, S., Ofori, E., Auwerx, J., Cantó, C., & Amati, F. (2017). Enhanced Respiratory Chain Supercomplex Formation in Response to Exercise in Human Skeletal Muscle. *Cell Metabolism*, *25*(2), 301–311. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.11.004>

Gu, J., Wu, M., Guo, R., Yan, K., Lei, J., Gao, N., & Yang, M. (2016). The architecture of the mammalian respirasome. *Nature*, *537*(7622), 639–643. <https://doi.org/10.1038/nature19359>

Guarani, V., Jardel, C., Chrétien, D., Lombès, A., Bénit, P., Labasse, C., Lacène, E., Bourillon, A., Imbard, A., Benoist, J. F., Dorboz, I., Gilleron, M., Goetzman, E. S., Gaignard, P., Slama, A., Elmaleh-Bergès, M., Romero, N. B., Rustin, P., de Baulny, H. O., ... Schiff, M. (2016). QIL1 mutation causes MICOS disassembly and early onset fatal mitochondrial encephalopathy with liver disease. *ELife*, *5*(September), 1–18. <https://doi.org/10.7554/eLife.17163>

Guarani, V., McNeill, E. M., Paulo, J. A., Huttlin, E. L., Fröhlich, F., Gygi, S. P., Vactor, D. Van, & Wade Harper, J. (2015). QIL1 is a novel mitochondrial protein required for MICOS complex stability and cristae morphology. *ELife*, *4*(MAY), 1–23. <https://doi.org/10.7554/eLife.06265>

Guerrero-Castillo, S., Baertling, F., Kownatzki, D., Wessels, H. J., Arnold, S., Brandt, U., & Nijtmans, L. (2017). The Assembly Pathway of Mitochondrial Respiratory Chain Complex I. *Cell Metabolism*, *25*(1), 128–139. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.09.002>

Guo, Y., Cheong, N. E., Zhang, Z. J., De Rose, R., Deng, Y., Farber, S. A., Fernandes-Alnemri, T., & Alnemri, E. S. (2004). Tim50, a component of the mitochondrial translocator, regulates mitochondrial integrity and cell death. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(23), 24813–24825. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402049200>

Gurumurthy, S., Xie, S. Z., Alagesan, B., Kim, J., Yusuf, R. Z., Saez, B., Tzatsos, A., Ozsolak, F., Milos, P., Ferrari, F., Park, P. J., Shirihai, O. S., Scadden, D. T., & Bardeesy, N. (2010). The Lkb1 metabolic sensor maintains haematopoietic stem cell survival. *Nature*, *468*(7324), 659–663. <https://doi.org/10.1038/nature09572>

H

Haack, T. B., Haberberger, B., Frisch, E. M., Wieland, T., Iuso, A., Gorza, M., Strecker, V., Graf, E., Mayr, J. A., Herberg, U., Hennermann, J. B., Klopstock, T., Kuhn, K. A., Ahting, U., Sper, W., Wilichowski, E., Hoffmann, G. F., Tesarova, M., Hansikova, H., ... Prokisch, H. (2012). Molecular diagnosis in mitochondrial complex I deficiency using exome sequencing. *Journal of Medical Genetics*, *49*(4), 277–283. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2012-100846>

Haas, R. H., Parikh, S., Falk, M. J., Saneto, R. P., Wolf, N. I., Darin, N., & Cohen, B. H. (2007). Mitochondrial disease: A practical approach for primary care physicians. *Pediatrics*, *120*(6), 1326–1333. <https://doi.org/10.1542/peds.2007-0391>

Haghighi, A., Haack, T. B., Atiq, M., Mottaghi, H., Haghighi-Kakhki, H., Bashir, R. A., Ahting, U., Feichtinger, R. G., Mayr, J. A., Rötig, A., Lebre, A. S., Klopstock, T., Dworschak, A., Pulido, N., Saeed, M. A., Saleh-Gohari, N., Holzerova, E., Chinnery, P. F., Taylor, R. W., & Prokisch, H. (2014). Sengers syndrome: Six novel AGK mutations in seven new families and review of the phenotypic and mutational spectrum of 29 patients. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *9*(1). <https://doi.org/10.1186/s13023-014-0119-3>

Hamacher-Brady, A., Brady, N. R., Logue, S. E., Sayen, M. R., Jinno, M., Kirshenbaum, L. A., Gottlieb, R. A., & Gustafsson, Å. B. (2007). Response to myocardial ischemia/reperfusion injury involves Bnip3 and

- autophagy. *Cell Death and Differentiation*, 14(1), 146–157. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401936>
- Hamanaka, R. B., & Chandel, N. S. (2010). Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(9), 505–513. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.04.002>
- Hariharan, N., Ravi, S., Pradeep, B. E., Subramanyam, K. N., Choudhary, B., Srinivasan, S., & Khanchandani, P. (2018). A novel loss-of-function mutation in HACE1 is linked to a genetic disorder in a patient from India. *Human Genome Variation*, 5(October 2017), 1–4. <https://doi.org/10.1038/hgv.2017.61>
- Harris, D. A., & Das, A. M. (1991). Control of mitochondrial ATP synthesis in the heart. *Biochemical Journal*, 280(3), 561–573. <https://doi.org/10.1042/bj2800561>
- Haslberger, T., Zdanowicz, A., Brand, I., Kirstein, J., Turgay, K., Mogk, A., & Bukau, B. (2008). Protein disaggregation by the AAA+ chaperone ClpB involves partial threading of looped polypeptide segments. *Nature Structural and Molecular Biology*, 15(6), 641–650. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1425>
- Hawlitsek, G., Schneider, H., Schmidt, B., Tropschug, M., Hartl, F. U., & Neupert, W. (1988). Mitochondrial protein import: identification of processing peptidase and of PEP, a processing enhancing protein. *Cell*, 53(5), 795–806. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90096-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90096-7)
- Hejzlarová, K., Mráček, T., Vrbacký, M., Kaplanová, V., Karbanová, V., Nůsková, H., Pecina, P., & Houštěk, J. (2014). Nuclear genetic defects of mitochondrial ATP synthase. *Physiological Research*, 63(SUPPL.). <https://doi.org/10.33549/physiolres.932643>
- Herhaus, L., & Dikic, I. (2015). *Expanding the ubiquitin code through post-translational modification Ubiquitin-a versatile post-translational modifier*. 16(9), 1071–1083. <https://doi.org/10.15252/embr.201540891>
- Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H., Haas, A. L., & Rose, I. A. (1980). Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(4), 1783–1786. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.4.1783>
- Herzer, M., Koch, J., Prokisch, H., Rodenburg, R., Rauscher, C., Radauer, W., Forstner, R., Pilz, P., Rolinski, B., Freisinger, P., Mayr, J. A., & Sperl, W. (2010). Leigh disease with brainstem involvement in complex I deficiency due to assembly factor NDUFAF2 Defect. *Neuropediatrics*, 41(1), 30–34. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1255062>
- Hildenbeutel, M., Theis, M., Geier, M., Haferkamp, I., Neuhaus, H. E., Herrmann, J. M., & Ott, M. (2012). The membrane insertase Oxa1 is required for efficient import of carrier proteins into mitochondria. *Journal of Molecular Biology*, 423(4), 590–599. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.07.018>
- Hirst, J. (2018). Open questions: Respiratory chain supercomplexes-why are they there and what do they do? *BMC Biology*, 16(1), 5–8. <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0577-5>
- Ho, G., Walter, J. H., & Christodoulou, J. (2008). Costeff optic atrophy syndrome: New clinical case and novel molecular findings. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 31(SUPPL. 2), 419–423. <https://doi.org/10.1007/s10545-008-0981-z>
- Hoefs, S. J. G., Skjeldal, O. H., Rodenburg, R. J., Nedregaard, B., van Kaauwen, E. P. M., Spiekerkötter, U., von Kleist-Retzow, J. C., Smeitink, J. A. M., Nijtmans, L. G., & van den Heuvel, L. P. (2010). Novel mutations in the NDUFS1 gene cause low residual activities in human complex I deficiencies. *Molecular Genetics and Metabolism*, 100(3), 251–256. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2010.03.015>
- Hoffmann, A., & Spengler, D. (2018). The mitochondrion as potential interface in early-life stress brain programming. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 12(December), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00306>
- Hollstein, R., Parry, D. A., Nalbach, L., Logan, C. V., Strom, T. M., Hartill, V. L., Carr, I. M., Korenke, G. C., Uppal, S., Ahmed, M., Wieland, T., Markham, A. F., Bennett, C. P., Gillissen-Kaesbach, G., Sheridan, E.

G., Kaiser, F. J., & Bonthron, D. T. (2015). HACE1 deficiency causes an autosomal recessive neurodevelopmental syndrome. *Journal of Medical Genetics*, 52(12), 797–803. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103344>

Holt, I. J., Harding, A. E., & Morgan-Hughes, J. A. (1988). Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature*, 331, 717–719.

Honzík, T., Tesarová, M., Mayr, J. A., Hansíková, H., Jesina, P., Bodamer, O., Koch, J., Magner, M., Freisinger, P., Huemer, M., Kostková, O., van Coster, R., Kmoč, S., Houstěk, J., Sperl, W., & Zeman, J. (2010). Mitochondrial encephalocardio-myopathy with early neonatal onset due to TMEM70 mutation. *Archives of Disease in Childhood*, 95(4), 296–301. <https://doi.org/10.1136/adc.2009.168096>

Hooper, R., Carroll, S., Aponte, A. M., Johnson, D. T., French, S., Rong-Fong, S., Witzman, F. A., Harris, R. A., & Balaban, R. S. (2006). Mitochondria matrix phosphoproteome: Effect of extra mitochondrial calcium. *Biochemistry*, 45(8), 2524–2536. <https://doi.org/10.1021/bi052475e>

Horst, M., Oppliger, W., Rospert, S., Schönfeld, H. J., Schatz, G., & Azem, A. (1997). Sequential action of two hsp70 complexes during protein import into mitochondria. *The EMBO Journal*, 16(8), 1842–1849. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.8.1842>

Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., Guan, J.-L., Oshiro, N., & Mizushima, N. (2009). Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Molecular Biology of the Cell*, 20(7), 1981–1991. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-12-1248>

Houtkooper, R. H., Rodenburg, R. J., Thiels, C., Lenthe, H. van, Stet, F., Poll-The, B. T., Stone, J. E., Steward, C. G., Wanders, R. J., Smeitink, J., Kulik, W., & Vaz, F. M. (2009). Cardiolipin and monolysocardiolipin analysis in fibroblasts, lymphocytes, and tissues using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry as a diagnostic test for Barth syndrome. *Analytical Biochemistry*, 387(2), 230–237. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.01.032>

Houtkooper, R. H., Turkenburg, M., Poll-The, B. T., Karall, D., Pérez-Cerdá, C., Morrone, A., Malvagia, S., Wanders, R. J., Kulik, W., & Vaz, F. M. (2009). The enigmatic role of tafazzin in cardiolipin metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1788(10), 2003–2014. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.07.009>

Houtkooper, R. H., & Vaz, F. M. (2008). Cardiolipin, the heart of mitochondrial metabolism. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 65(16), 2493–2506. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8030-5>

Howell, N., Bindoff, L. A., McCullough, D. A., Kubacka, I., Poulton, J., Mackey, D., Taylor, L., & Turnbull, D. M. (1991). Leber hereditary optic neuropathy: Identification of the same mitochondrial NDI mutation in six pedigrees. *American Journal of Human Genetics*, 49(5), 939–950.

Hughes, D. A., Jastroch, M., Stoneking, M., & Klingenspor, M. (2009). Molecular evolution of UCP1 and the evolutionary history of mammalian non-shivering thermogenesis. *BMC Evolutionary Biology*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-4>

I

Ichimiya, T., Yamakawa, T., Hirano, T., Yokoyama, Y., Hayashi, Y., Hirayama, D., Wagatsuma, K., Itoi, T., & Nakase, H. (2020). Autophagy and autophagy-related diseases: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms21238974>

Ieva, R., Schrempp, S. G., Opaliński, Ł., Wollweber, F., Höß, P., Heißwolf, A. K., Gebert, M., Zhang, Y., Guiard, B., Rospert, S., Becker, T., Chacinska, A., Pfanner, N., & vanderLaan, M. (2014). Mgr2 functions as lateral gatekeeper for preprotein sorting in the mitochondrial inner membrane. *Molecular Cell*, 56(5), 641–652. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.10.010>

IJlst, L., Loupatty, F. J., Ruiter, J. P., Duran, M., Lehnert, W., & Wanders, R. J. (2002). 3- Methylglutaconic aciduria type I is caused by mutations in AUH. *American Journal of Human Genetics*, 71(6), 1463–1466.

Invernizzi, F., D'Amato, I., Jensen, P. B., Ravaglia, S., Zeviani, M., & Tiranti, V. (2012). Microscale oxygraphy reveals OXPHOS impairment in MRC mutant cells. *Mitochondrion*, *12*(2), 328–335. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2012.01.001>

Ishihara, N., Jofuku, A., Eura, Y., & Mihara, K. (2003). Regulation of mitochondrial morphology by membrane potential, and DRP1-dependent division and FZO1-dependent fusion reaction in mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *301*(4), 891–898. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00050-0](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00050-0)

Ishiyama, A., Muramatsu, K., Uchino, S., Sakai, C., Matsushima, Y., Makioka, N., Ogata, T., Suzuki, E., Komaki, H., Sasaki, M., Mimaki, M., Goto, Y. I., & Nishino, I. (2018). NDUFAF3 variants that disrupt mitochondrial complex I assembly may associate with cavitating leukoencephalopathy. *Clinical Genetics*, *93*(5), 1103–1106. <https://doi.org/10.1111/cge.13215>

Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M., & Nabeshima, Y. (1997). An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *236*(2), 313–322. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6943>

Ivankovic, D., Chau, K. Y., Schapira, A. H. V., & Gegg, M. E. (2016). Mitochondrial and lysosomal biogenesis are activated following PINK1/parkin-mediated mitophagy. *Journal of Neurochemistry*, *136*(2), 388–402. <https://doi.org/10.1111/jnc.13412>

J

Jefferies, J. L. (2013). Barth syndrome. *American Journal of Medical Genetics, Part C: Seminars in Medical Genetics*, *163*(3), 198–205. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.31372>

Jiko, C., Davies, K. M., Shinzawa-Itoh, K., Tani, K., Maeda, S., Mills, D. J., Tsukihara, T., Fujiyoshi, Y., Kühlbrandt, W., & Gerle, C. (2015). Bovine F1Fo ATP synthase monomers bend the lipid bilayer in 2D membrane crystals. *eLife*, *2015*(4), 1–18. <https://doi.org/10.7554/eLife.06119>

Jonckheere, A. I., Huigsloot, M., Lammens, M., Jansen, J., van den Heuvel, L. P., Spiekerkoetter, U., von Kleist-Retzow, J.-C., Forkink, M., Koopman, W. J. H., Szklarczyk, R., Huynen, M. A., Fransen, J. A., Smeitink, J. A. M., & Rodenburg, R. J. T. (2011). Restoration of complex V deficiency caused by a novel deletion in the human TMEM70 gene normalizes mitochondrial morphology. *Mitochondrion*, *11*(6), 954–963. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2011.08.012>

Jonckheere, A. I., Renkema, G. H., Bras, M., van den Heuvel, L. P., Hoischen, A., Gilissen, C., Nabuurs, S. B., Huynen, M. A., De Vries, M. C., Smeitink, J. A. M., & Rodenburg, R. J. T. (2013). A complex VATP5A1defect causes fatal neonatalmitochondrial encephalopathy. *Brain*, *136*, 1544–1554. <https://doi.org/10.1093/brain/awt08>

Jonckheere, A. I., Smeitink, J. A. M., & Rodenburg, R. J. T. (2012). Mitochondrial ATP synthase: Architecture, function and pathology. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *35*(2), 211–225. <https://doi.org/10.1007/s10545-011-9382-9>

Julien, O., & Wells, J. A. (2017). Caspases and their substrates. *Cell Death and Differentiation*, *24*(8), 1380–1389. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.44>

Jung, C. H., Jun, C. B., Ro, S.-H., Kim, Y.-M., Otto, N. M., Cao, J., Kundu, M., & Kim, D.-H. (2009). ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Molecular Biology of the Cell*, *20*(7), 1992–2003. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-12-1249>

K

Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2003). Erratum: LC3, a mammalian homolog of yeast Apg8p, is localized in

- autophagosome membranes after processing (EMBO Journal (2000) 19 (5720-5728)). *EMBO Journal*, 22(17), 4577. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg454>
- Kadenbach, B. (2017). Regulation of Mammalian 13-Subunit Cytochrome c Oxidase and Binding of other Proteins: Role of NDUFA4. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 28(11), 761–770. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.09.003>
- Kang, P. J., Ostermann, J., Shilling, J., Neupert, W., Craig, E. A., & Pfanner, N. (1990). Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. *Nature*, 348(6297), 137–143. <https://doi.org/10.1038/348137a0>
- Karnkowska, A., Vacek, V., Zubáčová, Z., Treitli, S. C., Petrželková, R., Eme, L., Novák, L., Žárský, V., Barlow, L. D., Herman, E. K., Soukal, P., Hroudová, M., Doležal, P., Stairs, C. W., Roger, A. J., Eliáš, M., Dacks, J. B., Vlček, Č., & Hampl, V. (2016). A eukaryote without a mitochondrial organelle. *Current Biology*, 26(10), 1274–1284. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.03.053>
- Kaushik, S., & Cuervo, A. M. (2012). Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends in Cell Biology*, 22(8), 407–417. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.05.006>
- Keenan, T. W., Awasthi, Y. C., & Crane, F. L. (1970). Cardiolipin from beef heart mitochondria: fatty acid positioning an molecular species distribution. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 40(5), 1102–1109.
- Kelley, R. I. R. I., & Kratz, L. (1995). 3-methylglutaconic acidemia in SmithLemli-Opitz syndrome. *Pediatric Research*, 37(5), 671–674. <https://doi.org/10.1203/00006450-199505000-00020>
- Kemper, M. F., Stirone, C., Krause, D. N., Duckles, S. P., & Procaccio, V. (2014). Genomic and non-genomic regulation of PGC1 isoforms by estrogen to increase cerebral vascular mitochondrial biogenesis and reactive oxygen species protection. *European Journal of Pharmacology*, 723(1), 322–329. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.11.009>
- Kensler, T. W., Wakabayashi, N., & Biswal, S. (2007). Cell Survival Responses to Environmental Stresses Via the Keap1-Nrf2-ARE Pathway. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47(1), 89–116. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141046>
- Keshavan, N., & Rahman, S. (2018). Natural history of mitochondrial disorders: A systematic review. *Essays in Biochemistry*, 62(3), 423–442. <https://doi.org/10.1042/EBC20170108>
- Khalifat, N., Puff, N., Bonneau, S., Fournier, J. B., & Angelova, M. I. (2008). Membrane deformation under local pH gradient: Mimicking mitochondrial cristae dynamics. *Biophysical Journal*, 95(10), 4924–4933. <https://doi.org/10.1529/biophysj.108.136077>
- Khaminets, A., Behl, C., & Dikic, I. (2016). Ubiquitin-Dependent And Independent Signals In Selective Autophagy. *Trends in Cell Biology*, 26(1), 6–16. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.08.010>
- Kiebler, M., Pfaller, R., Söllner, T., Griffiths, G., Horstmann, H., Pfanner, N., & Neupert, W. (1990). Identification of a mitochondrial receptor complex required for recognition and membrane insertion of precursor proteins. *Nature*, 348(6302), 610–616. <https://doi.org/10.1038/348610a0>
- Kirby, D. M., Crawford, M., Cleary, M. A., Dahl, H. H. M., Dennett, X., & Thorburn, D. R. (1999). Respiratory chain complex I deficiency. An underdiagnosed energy generation disorder. *Neurology*, 52(6), 1255. <https://doi.org/https://doi.org/10.1212/WNL.52.6.1255>
- Kirby, D. M., McFarland, R., Ohtake, A., Dunning, C., Ryan, M. T., Wilson, C., Ketteridge, D., Turnbull, D. M., Thorburn, D. R., & Taylor, R. W. (2004). Mutations of the mitochondrial ND1 gene as a cause of MELAS. *Journal of Medical Genetics*, 41(10), 784–789. <https://doi.org/10.1136/jmg.2004.020537>
- Klein, A., Israel, L., Lackey, S. W. K., Nargang, F. E., Imhof, A., Baumeister, W., Neupert, W., & Thomas, D. R. (2012). Characterization of the insertase for β -barrel proteins of the outer mitochondrial membrane. *The Journal of Cell Biology*, 199(4), 599–611. <https://doi.org/10.1083/jcb.201207161>
- Koene, S., Rodenburg, R. J., Van Der Knaap, M. S., Willemsen, M. A. A. P., Sperl, W., Laugel, V.,

Ostergaard, E., Tarnopolsky, M., Martin, M. A., Nesbitt, V., Fletcher, J., Edvardson, S., Procaccio, V., Slama, A., Van Den Heuvel, L. P. W. J., & Smeitink, J. A. M. (2012). Natural disease course and genotype-phenotype correlations in Complex I deficiency caused by nuclear gene defects: What we learned from 130 cases. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *35*(5), 737–747. <https://doi.org/10.1007/s10545-012-9492-z>

Koenig, M. K. (2008). Presentation and diagnosis of mitochondrial disorders in children. *Pediatric Neurology*, *38*(5), 305–313. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2007.12.001>

Koopman, W. J. H., Verkaart, S., Visch, H. J., Van Emst-De Vries, S., Nijtmans, L. G. J., Smeitink, J. A. M., & Willems, P. H. G. M. (2007). Human NADH:ubiquinone oxidoreductase deficiency: Radical changes in mitochondrial morphology? *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, *293*(1), 22–29. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00194.2006>

Koopman, W. J. H., Willems, P. H. G. M., & Smeitink, J. A. M. (2012). Monogenic Mitochondrial Disorders. *The New England Journal of Medicine*, *366*(12), 1132–1141. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1012478>

Koshiba, T., Detmer, S. A., Kaiser, J. T., Chen, H., McCaffery, J. M., & Chan, D. C. (2004). Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science*, *305*(5685), 858–862. <https://doi.org/10.1126/science.1099793>

Kovacs-Nagy, R., Morin, G., Nouri, M. Al, Brandau, O., Saadi, N. W., Nouri, M. A., Van Den Broek, F., Prokisch, H., Mayr, J. A., & Wortmann, S. B. (2018). HTRA2 Defect: A Recognizable Inborn Error of Metabolism with 3-Methylglutaconic Aciduria as Discriminating Feature Characterized by Neonatal Movement Disorder and Epilepsy-Report of 11 Patients. *Neuropediatrics*, *49*(6), 373–378. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1667345>

Krebs, H. A. (1954). Chemical pathways of Metabolism. Chapter 4: The tricarboxylic acid cycle. In *Chemical pathways of Metabolism*. Elsevier. <https://doi.org/10.1126/science.1210858>

Kremer, L. S., Bader, D. M., Mertes, C., Kopajtic, R., Pichler, G., Iuso, A., Haack, T. B., Graf, E., Schwarzmayr, T., Terrile, C., Koňářikova, E., Repp, B., Kastenmüller, G., Adamski, J., Lichtner, P., Leonhardt, C., Funalot, B., Donati, A., Tiranti, V., ... Prokisch, H. (2017). Genetic diagnosis of Mendelian disorders via RNA sequencing. *Nature Communications*, *8*, 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms15824>

Krols, M., van Isterdael, G., Asselbergh, B., Kremer, A., Lippens, S., Timmerman, V., & Janssens, S. (2016). Mitochondria-associated membranes as hubs for neurodegeneration. *Acta Neuropathologica*, *131*(4), 505–523. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1528-7>

L

La Du, B., Zannoni, V., Laster, L., & Seegmiller, J. (1958). The nature of the defect in tyrosine metabolism in alcaptonuria. *Journal of Biological Chemistry*, *230*(1), 251–260.

Lake, N. J., Bird, M. J., Isohanni, P., & Paetau, A. (2015). Leigh Syndrome: Neuropathology and Pathogenesis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *74*(6), 482–492. <https://doi.org/10.1097/NEN.0000000000000195>

Lake, N. J., Compton, A. G., Rahman, S., & Thorburn, D. R. (2016). Leigh syndrome: One disorder, more than 75 monogenic causes. *Annals of Neurology*, *79*(2), 190–203. <https://doi.org/10.1002/ana.24551>

Lazarou, M., McKenzie, M., Ohtake, A., Thorburn, D. R., & Ryan, M. T. (2007). Analysis of the Assembly Profiles for Mitochondrial- and Nuclear-DNA-Encoded Subunits into Complex I. *Molecular and Cellular Biology*, *27*(12), 4228–4237. <https://doi.org/10.1128/mcb.00074-07>

Lazarou, M., Sliter, D. A., Kane, L. A., Sarraf, S. A., Wang, C., Burman, J. L., Sideris, D. P., Fogel, A. I., & Youle, R. J. (2015). The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature*, *524*(7565), 309–314. <https://doi.org/doi:10.1038/nature14893>

- Lebon, S., Chol, M., Benit, P., Mugnier, C., Chretien, D., Giurgea, I., Kern, I., Girardin, E., Hertz-Pannier, L., De Lonlay, P., Rötig, A., Rustin, P., & Munnich, A. (2003). Recurrent de novo mitochondrial DNA mutations in respiratory chain deficiency. *Journal of Medical Genetics*, *40*(12), 896–899. <https://doi.org/10.1136/jmg.40.12.896>
- Lebre, A. S., Rio, M., Faivre D’Arcier, L., Vernerey, D., Landrieu, P., Slama, A., Jardel, C., Laforêt, P., Rodriguez, D., Dorison, N., Galanaud, D., Chabrol, B., Paquis-Flucklinger, V., Grévent, D., Edvardson, S., Steffann, J., Funalot, B., Villeneuve, N., Valayannopoulos, V., ... Boddaert, N. (2011). A common pattern of brain MRI imaging in mitochondrial diseases with complex I deficiency. *Journal of Medical Genetics*, *48*(1), 16–23. <https://doi.org/10.1136/jmg.2010.079624>
- Lee, H., Huang, A. Y., Wang, L. kai, Yoon, A. J., Renteria, G., Eskin, A., Signer, R. H., Dorrani, N., Nieves-Rodriguez, S., Wan, J., Douine, E. D., Woods, J. D., Dell’Angelica, E. C., Fogel, B. L., Martin, M. G., Butte, M. J., Parker, N. H., Wang, R. T., Shieh, P. B., ... Nelson, S. F. (2020). Diagnostic utility of transcriptome sequencing for rare Mendelian diseases. *Genetics in Medicine*, *22*(3), 490–499. <https://doi.org/10.1038/s41436-019-0672-1>
- Lee, Hakjoo, & Yoon, Y. (2018). Mitochondrial membrane dynamics—functional positioning of OPA1. *Antioxidants*, *7*(12). <https://doi.org/10.3390/antiox7120186>
- Lee, J. E., Westrate, L., Wu, H., Page, C., & Voeltz, G. K. (2016). Multiple dynamin family members collaborate to drive mitochondrial division. *Nature*, *540*(7631), 139–143. <https://doi.org/10.1038/nature20555>
- Lee, J. J. Y., Wasserman, W. W., Hoffmann, G. F., Van Karnebeek, C. D. M., & Blau, N. (2018). Knowledge base and mini-expert platform for the diagnosis of inborn errors of metabolism. *Genetics in Medicine*, *20*(1), 151–158. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.108>
- Lenaers, G., Hamel, C., Delettre, C., Amati-Bonneau, P., Procaccio, V., Bonneau, D., Reynier, P., & Milea, D. (2012). Dominant optic atrophy. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *7*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-7-46>
- Letts, J. A., & Sazanov, L. A. (2017). Clarifying the supercomplex: The higher-order organization of the mitochondrial electron transport chain. *Nature Structural and Molecular Biology*, *24*(10), 800–808. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3460>
- Levine, B., & Kroemer, G. (2008). Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell*, *132*(1), 27–42. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.018>
- Li, L., Tan, J., Miao, Y., Lei, P., & Zhang, Q. (2015). ROS and Autophagy: Interactions and Molecular Regulatory Mechanisms. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *35*(5), 615–621. <https://doi.org/10.1007/s10571-015-0166-x>
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., & Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, *91*(4), 479–489. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80434-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80434-1)
- Li, S., Yang, H., Zhao, M., Gong, L., Wang, Y., Lv, Z., Quan, Y., & Wang, Z. (2020). Demethylation of HACE1 gene promoter by propofol promotes autophagy of human A549 cells. *Oncology Letters*, *20*(6), 1–1. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.12143>
- Liesa, M., Palacín, M., & Zorzano, A. (2009). Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiological Reviews*, *89*(3), 799–845. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2008>
- Lightowlers, R. N., Taylor, R. W., & Turnbull, D. M. (2015). Mutations causing mitochondrial disease: What is new and what challenges remain? *Science*, *349*(6255), 1494–1499. <https://doi.org/10.1126/science.aac7516>
- Liolitsa, D., Rahman, S., Benton, S., Carr, L. J., & Hanna, M. G. (2003). Is the mitochondrial complex I ND5 gene a hot-spot for MELAS causing mutations? *Annals of Neurology*, *53*(1), 128–132. <https://doi.org/10.1002/ana.10435>

Liu, Z., Chen, P., Gao, H., Gu, Y., Yang, J., Peng, H., Xu, X., Wang, H., Yang, M., Liu, X., Fan, L., Chen, S., Zhou, J., Sun, Y., Ruan, K., Cheng, S., Komatsu, M., White, E., Li, L., ... Hu, R. (2014). Ubiquitylation of Autophagy Receptor Optineurin by HACE1 Activates Selective Autophagy for Tumor Suppression. *Cancer Cell*, 26(1), 106–120. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.05.015>

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Bartimore, D., & Darnell, J. (2000). *Molecular Cell Biology* (W. H. Freeman (ed.); 4th editio).

Loeffen, J., Elpeleg, O., Smeitink, J., Smeets, R., Stöckler-Ipsiroglu, S., Mandel, H., Sengers, R., Trijbels, F., & Van Heuvel, L. Den. (2001). Mutations in the complex I NDUF52 gene of patients with cardiomyopathy and encephalomyopathy. *Annals of Neurology*, 49(2), 195–201. [https://doi.org/10.1002/1531-8249\(20010201\)49:2<195::AID-ANA39>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1531-8249(20010201)49:2<195::AID-ANA39>3.0.CO;2-M)

Loeffen, J. L. C. M., Smeitink, J. A. M., Trijbels, J. M. F., Janssen, A. J. M., Triepels, R. H., Sengers, R. C. A., & Van Den Heuvel, L. P. (2000). Isolated complex I deficiency in children: Clinical, biochemical and genetic aspects. *Human Mutation*, 15(2), 123–134. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(200002\)15:2<123::AID-HUMU1>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(200002)15:2<123::AID-HUMU1>3.0.CO;2-P)

M

Ma, Y. Y., Li, X. Y., Li, Z. Q., Song, J. Q., Hou, J., Li, J. H., Sun, L., Jiang, J., & Yang, Y. L. (2018). Clinical, biochemical, and genetic analysis of the mitochondrial respiratory chain complex i deficiency. *Medicine (United States)*, 97(32), 30–34. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000011606>

Maas, R. R., Marina, A. Della, de Brouwer, A. P. M., Wevers, R. A., Rodenburg, R. J., & Wortmann, S. B. (2015). SUCLA2 Deficiency: A Deafness-Dystonia Syndrome with Distinctive Metabolic Findings (Report of a New Patient and Review of the Literature). In *JIMD Reports* (Vol. 4, pp. 27–32). https://doi.org/10.1007/8904_2015_464

Machiraju, P., Wang, X., Sabouny, R., Huang, J., Zhao, T., Iqbal, F., King, M., Prasher, D., Lodha, A., Jimenez-Tellez, N., Ravandi, A., Argiropoulos, B., Sinasac, D., Khan, A., Shutt, T. E., & Greenway, S. C. (2019). SS-31 Peptide Reverses the Mitochondrial Fragmentation Present in Fibroblasts From Patients With DCMA, a Mitochondrial Cardiomyopathy. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 6(November). <https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00167>

Magner, M., Dvorakova, V., Tesarova, M., Mazurova, S., Hansikova, H., Zahorec, M., Brennerova, K., Bzduch, V., Spiegel, R., Horovitz, Y., Mandel, H., Eminoğlu, F. T., Mayr, J. A., Koch, J., Martinelli, D., Bertini, E., Konstantopoulou, V., Smet, J., Rahman, S., ... Honzik, T. (2015). TMEM70 deficiency: long-term outcome of 48 patients. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 38(3), 417–426. <https://doi.org/10.1007/s10545-014-9774-8>

Malhotra, D., Portales-Casamar, E., Singh, A., Srivastava, S., Arenillas, D., Happel, C., Shyr, C., Wakabayashi, N., Kensler, T. W., Wasserman, W. W., & Biswal, S. (2010). Global mapping of binding sites for Nrf2 identifies novel targets in cell survival response through chip-seq profiling and network analysis. *Nucleic Acids Research*, 38(17), 5718–5734. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq212>

Mandel, H., Saita, S., Edvardson, S., Jalas, C., Shaag, A., Goldsher, D., Vlodaysky, E., Langer, T., & Elpeleg, O. (2016). Deficiency of HTRA2/Omi is associated with infantile neurodegeneration and 3-methylglutaconic aciduria. *Journal of Medical Genetics*, 53(10), 690–696. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2016-103922>

Manwaring, N., Jones, M. M., Wang, J. J., Roctchina, E., Howard, C., Mitchell, P., & Sue, C. M. (2007). Population prevalence of the MELAS A3243G mutation. *Mitochondrion*, 7(3), 230–233. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2006.12.004>

Maranzana, E., Barbero, G., Falasca, A. I., Lenaz, G., & Genova, M. L. (2013). Mitochondrial respiratory supercomplex association limits production of reactive oxygen species from complex i. *Antioxidants and Redox Signaling*, 19(13), 1469–1480. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4845>

- Marcé-Grau, A., Martí-Sánchez, L., Baide-Mairena, H., Ortigoza-Escobar, J. D., & Pérez-Dueñas, B. (2019). Genetic defects of thiamine transport and metabolism: A review of clinical phenotypes, genetics, and functional studies. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 42(4), 581–597. <https://doi.org/10.1002/jimd.12125>
- Matta, S. K., Pareek, G., Bankapalli, K., Oblesha, A., & D’Silva, P. (2017). Role of Tim17 Transmembrane Regions in Regulating the Architecture of Presequence Translocase and Mitochondrial DNA Stability. *Molecular and Cellular Biology*, 37(6), 24–32. <https://doi.org/10.1128/MCB.00491-16>
- Mayr, J. A., Haack, T. B., Freisinger, P., Karall, D., Makowski, C., Koch, J., Feichtinger, R. G., Zimmermann, F. A., Rolinski, B., Ahting, U., Meitinger, T., Prokisch, H., & Sperl, W. (2015). Spectrum of combined respiratory chain defects. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 38(4), 629–640. <https://doi.org/10.1007/s10545-015-9831-y>
- Mayr, J. A., Haack, T. B., Graf, E., Zimmermann, F. A., Wieland, T., Haberberger, B., Superti-Furga, A., Kirschner, J., Steinmann, B., Baumgartner, M. R., Moroni, I., Lamantea, E., Zeviani, M., Rodenburg, R. J., Smeitink, J., Strom, T. M., Meitinger, T., Sperl, W., & Prokisch, H. (2012). Lack of the mitochondrial protein acylglycerol kinase causes sengers syndrome. *American Journal of Human Genetics*, 90(2), 314–320. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.12.005>
- Mayr, J. A., Havlíčková, V., Zimmermann, F., Magler, I., Kaplanová, V., Ješina, P., Pecinová, A., Nůsková, H., Koch, J., Sperl, W., & Houšťek, J. (2010). Mitochondrial ATP synthase deficiency due to a mutation in the ATP5E gene for the F1 ϵ subunit. *Human Molecular Genetics*, 19(17), 3430–3439. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq254>
- McGee, C. D., Lieberman, P., & Greenwood, C. E. (1996). Dietary fatty acid composition induces comparable changes in cardiolipin fatty acid profile of heart and brain mitochondria. *Lipids*, 31(6), 611–616.
- McKenzie, M., Lazarou, M., Thorburn, D. R., & Ryan, M. T. (2006). Mitochondrial respiratory chain supercomplexes are destabilized in Barth Syndrome patients. *Journal of Molecular Biology*, 361(3), 462–469. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.06.057>
- McKenzie, M., Liolitsa, D., Akinshina, N., Campanella, M., Sisodiya, S., Hargreaves, I., Nirmalanathan, N., Sweeney, M. G., Abou-Sleiman, P. M., Wood, N. W., Hanna, M. G., & Duchon, M. R. (2007). Mitochondrial ND5 gene variation associated with encephalomyopathy and mitochondrial ATP consumption. *Journal of Biological Chemistry*, 282(51), 36845–36852. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704158200>
- Medina, D. L., Settembre, C., & Ballabio, A. (2017). Methods to Monitor and Manipulate TFEB Activity During Autophagy. In *Methods in Enzymology. Molecular characterization of Autophagic Responses*.
- Merkwirth, C., Dargazanli, S., Tatsuta, T., Geimer, S., Löwer, B., Wunderlich, F. T., von Kleist-Retzow, J.-C., Waisman, A., Westermann, B., & Langer, T. (2008). Prohibitins control cell proliferation and apoptosis by regulating OPA1-dependent cristae morphogenesis in mitochondria. *Genes & Development*, 22(4), 476–488. <https://doi.org/10.1101/gad.460708>
- Mimaki, M., Wang, X., McKenzie, M., Thorburn, D. R., & Ryan, M. T. (2012). Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1817(6), 851–862. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.08.010>
- Mir, A., Hadab, S., Sammak, M., Alhazmi, R., Housawi, Y., & Bashir, S. (2020). Complete resolution of epileptic spasms with vigabatrin in a patient with 3-methylglutaconic aciduria caused by TIMM50 gene mutation. *Clinical Genetics*, 98(1), 102–103. <https://doi.org/10.1111/cge.13763>
- Mitchell, P. (1961). Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic Type of Mechanism. *Nature*, 191, 144–148. <https://doi.org/10.1038/191144a0>
- Mizushima, N., Yoshimori, T., & Levine, B. (2010). Methods in Mammalian Autophagy Research. *Cell*, 140(3), 313–326.
- Mokranjac, D., & Neupert, W. (2015). Cell biology: Architecture of a protein entry gate. *Nature*,

528(7581), 201–202. <https://doi.org/10.1038/nature16318>

Mokranjac, D., Paschen, S. A., Kozany, C., Prokisch, H., Hoppins, S. C., Nargang, F. E., Neupert, W., & Hell, K. (2003). Tim50, a novel component of the TIM23 preprotein translocase of mitochondria. *EMBO Journal*, 22(4), 816–825. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg090>

Mokranjac, D., Sichtung, M., Popov-Čeleketić, D., Mapa, K., Gevorkyan-Airapetov, L., Zohary, K., Hell, K., Azem, A., & Neupert, W. (2009). Role of Tim50 in the Transfer of Precursor Proteins from the Outer to the Inner Membrane of Mitochondria. *Molecular Biology of the Cell*, 20(5), 1400–1407. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-09-0934>

Morán, M., Rivera, H., Sánchez-Aragó, Blázquez, A., Merinero, B., Ugalde, C., Arenas, J., Cuezva, J. M., & Martín, M. A. (2010). Mitochondrial bioenergetics and dynamics interplay in complex I-deficient fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1802(5), 443–453. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.02.001>

Morava, E., Rahman, S., Peters, V., Baumgartner, M. R., Patterson, M., & Zschocke, J. (2015). Quo vadis: the re-definition of “inborn metabolic diseases.” *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 38(6), 1003–1006. <https://doi.org/10.1007/s10545-015-9893-x>

Moreno-Lastres, D., Fontanesi, F., García-Consuegra, I., Martín, M. A., Arenas, J., Barrientos, A., & Ugalde, C. (2012). Mitochondrial complex I plays an essential role in human respirasome assembly. *Cell Metabolism*, 15(3), 324–335. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.01.015>

Motohashi, H., & Yamamoto, M. (2004). Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends in Molecular Medicine*, 10(11), 549–557. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2004.09.003>

Mróz, D., Wyszowski, H., Szablewski, T., Zawieracz, K., Dutkiewicz, R., Bury, K., Wortmann, S. B., Wevers, R. A., & Ziętkiewicz, S. (2020). CLPB (caseinolytic peptidase B homolog), the first mitochondrial protein refoldase associated with human disease. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1864(4), 2019–2021. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129512>

Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417(1), 1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>

N

Nagase, T., Nakayama, M., Nakajima, D., Kikuno, R., & Ohara, O. (2001). Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XX. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Research*, 8(2), 85–95. <https://doi.org/10.1093/dnares/8.2.85>

Nagy, V., Hollstein, R., Pai, T. P., Herde, M. K., Buphamalai, P., Moeseneder, P., Lenartowicz, E., Kavirayani, A., Korenke, G. C., Kozieradzki, I., Nitsch, R., Cicvaric, A., Monje Quiroga, F. J., Deardorff, M. A., Bedoukian, E. C., Li, Y., Yigit, G., Menche, J., Perçin, E. F., ... Penninger, J. M. (2019). HACE1 deficiency leads to structural and functional neurodevelopmental defects. *Neurology: Genetics*, 5(3). <https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000330>

Naoé, M., Ohwa, Y., Ishikawa, D., Ohshima, C., Nishikawa, S.-I., Yamamoto, H., & Endo, T. (2004). Identification of Tim40 that mediates protein sorting to the mitochondrial intermembrane space. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(46), 47815–47821. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410272200>

Narendra, D. P., Kane, L. A., Hauser, D. N., Fearnley, I. M., & Youle, R. J. (2010). p62/SQSTM1 is required for Parkin-induced mitochondrial clustering but not mitophagy; VDAC1 is dispensable for both. *Autophagy*, 6(8), 1090–1106. <https://doi.org/10.4161/auto.6.8.13426>

Niemi, N. M., Wilson, G. M., Overmyer, K. A., Vögtle, F. N., Myketin, L., Lohman, D. C., Schueler, K. L., Attie, A. D., Meisinger, C., Coon, J. J., & Pagliarini, D. J. (2019). Pptc7 is an essential phosphatase for promoting mammalian mitochondrial metabolism and biogenesis. *Nature Communications*, 10(1), 1–14.

<https://doi.org/10.1038/s41467-019-11047-6>

Nouws, J., Nijtmans, L., Houten, S. M., Van Den Brand, M., Huynen, M., Venselaar, H., Hoefs, S., Gloerich, J., Kronick, J., Hutchin, T., Willems, P., Rodenburg, R., Wanders, R., Van Den Heuvel, L., Smeitink, J., & Vogel, R. O. (2010). Acyl-CoA dehydrogenase 9 is required for the biogenesis of oxidative phosphorylation complex I. *Cell Metabolism*, *12*(3), 283–294. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.08.002>

Nunnari, J., & Suomalainen, A. (2012). Mitochondria: In sickness and in health. *Cell*, *148*(6), 1145–1159. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.035>

O

Ogunjimi, E. O., Pokalsky, C. N., Shroyer, L. A., & Prochaska, L. J. (2000). Evidence for a conformational change in subunit III of bovine heart mitochondrial cytochrome c oxidase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, *32*(6), 617–626. <https://doi.org/10.1023/A:1005678729157>

Ojala, T., Polinati, P., Manninen, T., Hiippala, A., Rajantie, J., Karikoski, R., Suomalainen, A., & Tyni, T. (2012). New mutation of mitochondrial DNAJC19 causing dilated and noncompaction cardiomyopathy, anemia, ataxia, and male genital anomalies. *Pediatric Research*, *72*(4), 432–437. <https://doi.org/10.1038/pr.2012.92>

Okatsu, K., Saisho, K., Shimanuki, M., Nakada, K., Shitara, H., Sou, Y. S., Kimura, M., Sato, S., Hattori, N., Komatsu, M., Tanaka, K., & Matsuda, N. (2010). P62/SQSTM1 cooperates with Parkin for perinuclear clustering of depolarized mitochondria. *Genes to Cells*, *15*(8), 887–900. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2010.01426.x>

Oláhová, M., Thompson, K., Hardy, S. A., Barbosa, I. A., Besse, A., Anagnostou, M. E., White, K., Davey, T., Simpson, M. A., Champion, M., Enns, G., Schelley, S., Lightowlers, R. N., Chrzanowska-Lightowlers, Z. M. A., McFarland, R., Deshpande, C., Bonnen, P. E., & Taylor, R. W. (2017). Pathogenic variants in HTRA2 cause an early-onset mitochondrial syndrome associated with 3-methylglutaconic aciduria. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *40*(1), 121–130. <https://doi.org/10.1007/s10545-016-9977-2>

Oláhová, M., Yoon, W. H., Thompson, K., Jangam, S., Fernandez, L., Davidson, J. M., Kyle, J. E., Grove, M. E., Fisk, D. G., Kohler, J. N., Holmes, M., Dries, A. M., Huang, Y., Zhao, C., Contrepolis, K., Zappala, Z., Frésard, L., Waggott, D., Zink, E. M., ... Cowan, T. (2018). Biallelic Mutations in ATP5F1D, which Encodes a Subunit of ATP Synthase, Cause a Metabolic Disorder. *American Journal of Human Genetics*, *102*(3), 494–504. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.01.020>

Olsen, R. K. J., Cornelius, N., & Gregersen, N. (2015). Redox signalling and mitochondrial stress responses; lessons from inborn errors of metabolism. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *38*(4), 703–719. <https://doi.org/10.1007/s10545-015-9861-5>

P

Palikaras, K., & Tavernarakis, N. (2014). Mitochondrial homeostasis: the interplay between mitophagy and mitochondrial biogenesis. *Experimental Gerontology*, *56*, 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.01.021>

Parikh, S., Karaa, A., Goldstein, A., Bertini, E. S., Chinnery, P. F., Christodoulou, J., Cohen, B. H., Davis, R. L., Falk, M. J., Fratter, C., Horvath, R., Koenig, M. K., Mancuso, M., McCormack, S., McCormick, E. M., McFarland, R., Nesbitt, V., Schiff, M., Steele, H., ... Rahman, S. (2019). Diagnosis of possible' mitochondrial disease: An existential crisis. *Journal of Medical Genetics*, *56*(3), 123–130. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2018-105800>

Pedersen, P. ., & Amzel, L. . (1993). ATP synthases. Structure, reaction center, mechanism, and regulation of one of nature's most unique machines. *Journal of Biological Chemistry*, *268*(14), 9937–

9940.

Peker, N., & Gozuacik, D. (2020). Autophagy as a cellular stress response mechanism in the nervous system. *Journal of Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.01.017>

Pérez-Pérez, R., Lobo-Jarne, T., Milenkovic, D., Mourier, A., Bratic, A., García-Bartolomé, A., Fernández-Vizarra, E., Cadenas, S., Delmiro, A., García-Consuegra, I., Arenas, J., Martín, M. A., Larsson, N. G., & Ugalde, C. (2016). COX7A2L Is a Mitochondrial Complex III Binding Protein that Stabilizes the III2+IV Supercomplex without Affecting Respirasome Formation. *Cell Reports*, *16*(9), 2387–2398. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.081>

Pfanner, N., van der Laan, M., Amati, P., Capaldi, R. A., Caudy, A. A., Chacinska, A., Darshi, M., Deckers, M., Hoppins, S., Icho, T., Jakobs, S., Ji, J., Kozjak-Pavlovic, V., Meisinger, C., Odgren, P. R., Park, S. K., Rehling, P., Reichert, A. S., Sheikh, M. S., ... Nunnari, J. (2014). Uniform nomenclature for the mitochondrial contact site and cristae organizing system. *Journal of Cell Biology*, *204*(7), 1083–1086. <https://doi.org/10.1083/jcb.201401006>

Pfanner, N., Warscheid, B., & Wiedemann, N. (2019). Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *20*(5), 267–284. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0092-0>

Philip L, P., Keith, H., J, C., Colleen L, M., Yuezhou, Y., & Donald, T. (2012). Partial Pyridoxine Responsiveness in PNPO Deficiency. *JIMD Reports*, *4*, 113–116. <https://doi.org/10.1007/8904>

Picard, M., McManus, M. J., Csordás, G., Várnai, P., Dorn, G. W., Williams, D., Hajnóczky, G., & Wallace, D. C. (2015). Trans-mitochondrial coordination of cristae at regulated membrane junctions. *Nature Communications*, *6*, 6259. <https://doi.org/10.1038/ncomms7259>

Pickles, S., Vigié, P., & Youle, R. J. (2018). Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance. *Current Biology*, *28*(4), R170–R185. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.004>

Pícková, A., Paul, J., Petruzzella, V., & Houštěk, J. (2003). Differential expression of ATPAF1 and ATPAF2 genes encoding F 1-ATPase assembly proteins in mouse tissues. *FEBS Letters*, *551*(1–3), 42–46. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00890-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00890-1)

Popov-Celeketić, J., Waizenegger, T., & Rapaport, D. (2008). Mim1 functions in an oligomeric form to facilitate the integration of Tom20 into the mitochondrial outer membrane. *Journal of Molecular Biology*, *376*(3), 671–680. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.12.006>

Powell, K. A., Davies, J. R., Taylor, E., Wride, M. A., & Votruba, M. (2011). Mitochondrial Localization and Ocular Expression of Mutant Opa3 in a Mouse Model of 3-Methylglutaconicaciduria Type III. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *52*(7), 4369. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-6406>

Priesnitz, C., Pfanner, N., & Becker, T. (2020). Studying protein import into mitochondria. In *Mitochondria Biology* (1st ed., Vol. 155). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2019.11.006>

Pronicka, E., Ropacka-Lesiak, M., Trubicka, J., Pajdowska, M., Linke, M., Ostergaard, E., Saunders, C., Horsch, S., van Karnebeek, C., Yapliito-Lee, J., Distelmaier, F., Öunap, K., Rahman, S., Castelle, M., Kelleher, J., Baris, S., Iwanicka-Pronicka, K., Steward, C. G., Ciara, E., ... Additional individual contributors. (2017). A scoring system predicting the clinical course of CLPB defect based on the foetal and neonatal presentation of 31 patients. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *40*(6), 853–860. <https://doi.org/10.1007/s10545-017-0057-z>

Q

Quirós, P. M., Mottis, A., & Auwerx, J. (2016). Mitonuclear communication in homeostasis and stress. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *17*(4), 213–226. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.23>

Quirós, P. M., Prado, M. A., Zamboni, N., D'Amico, D., Williams, R. W., Finley, D., Gygi, S. P., & Auwerx, J. (2017). Multi-omics analysis identifies ATF4 as a key regulator of the mitochondrial stress response in

mammals. *Journal of Cell Biology*, 216(7), 2027–2045. <https://doi.org/10.1083/jcb.201702058>

R

Rahman, J., & Rahman, S. (2018). Mitochondrial medicine in the omics era. *The Lancet*, 391(10139), 2560–2574. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30727-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30727-X)

Rahman, S. (2020). Mitochondrial disease in children. *Journal of Internal Medicine*, 287(6), 609–633. <https://doi.org/10.1111/joim.13054>

Rahman, S., & Copeland, W. C. (2019). POLG-related disorders and their neurological manifestations. *Nature Reviews Neurology*, 15(1), 40–52. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0101-0>

Ranieri, M., Brajkovic, S., Riboldi, G., Ronchi, D., Rizzo, F., Bresolin, N., Corti, S., & Comi, G. P. (2013). Mitochondrial fusion proteins and human diseases. *Neurology Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/293893>

Rath, S., Sharma, R., Gupta, R., Ast, T., Chan, C., Durham, T. J., Goodman, R. P., Grabarek, Z., Haas, M. E., Hung, W. H. W., Joshi, P. R., Jourdain, A. A., Kim, S. H., Kotrys, A. V., Lam, S. S., McCoy, J. G., Meisel, J. D., Miranda, M., Panda, A., ... Mootha, V. K. (2021). MitoCarta3.0: An updated mitochondrial proteome now with sub-organelle localization and pathway annotations. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D1541–D1547. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1011>

Rawat, S., & Stemmler, T. L. (2011). Key Players and Their Role During Mitochondrial Iron–Sulfur Cluster Biosynthesis. *Chemistry*, 17(3), 746–753. <https://doi.org/doi:10.1002/chem.201002143>

Reczek, C. R., & Chandel, N. S. (2015). ROS-dependent signal transduction. *Current Opinion in Cell Biology*, 33, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.ccb.2014.09.010>

Reyes, A., Melchionda, L., Burlina, A., Robinson, A. J., Ghezzi, D., & Zeviani, M. (2018). Mutations in TIMM50 compromise cell survival in OxPhos-dependent metabolic conditions. *EMBO Molecular Medicine*, 10(10), 1–15. <https://doi.org/10.15252/emmm.201708698>

Richter-Dennerlein, R., Korwitz, A., Haag, M., Tatsuta, T., Dargazanli, S., Baker, M., Decker, T., Lamkemeyer, T., Rugarli, E. I., & Langer, T. (2014). DNAJC19, a Mitochondrial Cochaperone Associated with Cardiomyopathy, Forms a Complex with Prohibitins to Regulate Cardiolipin Remodeling. *Cell Metabolism*, 20(1), 158–171. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.04.016>

Rieger, B., Junge, W., & Busch, K. B. (2014). Lateral pH gradient between OXPHOS complex IV and F(0)F(1) ATP-synthase in folded mitochondrial membranes. *Nature Communications*, 5, 3103. <https://doi.org/10.1038/ncomms4103>

Robinson, B. H., De Meirleir, L., Glerum, M., Sherwood, G., & Becker, L. (1987). Clinical presentation of mitochondrial respiratory chain defects in NADH-coenzyme Q reductase and cytochrome oxidase: clues to pathogenesis of Leigh disease. *Journal of Pediatrics*, 110(2), 216–222. [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(87\)80157-9](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(87)80157-9)

Rodenburg, R. J. (2016). Mitochondrial complex I-linked disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1857(7), 938–945. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.02.012>

Rodenburg, R. J. (2018). The functional genomics laboratory: functional validation of genetic variants. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 41(3), 297–307. <https://doi.org/10.1007/s10545-018-0146-7>

Rokicki, D., Pajdowska, M., Trubicka, J., Thong, M. K., Ciara, E., Piekutowska-Abramczuk, D., Pronicki, M., Sikora, R., Haidar, R., Ołtarzewski, M., Jabłońska, E., Muthukumarasamy, P., Sthaneswar, P., Gan, C. S., Krajewska-Walasek, M., Carrozzo, R., Verrigni, D., Semeraro, M., Rizzo, C., ... Wortmann, S. B. (2017). 3-Methylglutaconic aciduria, a frequent but underrecognized finding in carbamoyl phosphate synthetase I deficiency. *Clinica Chimica Acta*, 471(February), 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.05.023>

Rotblat, B., Southwell, A. L., Ehrnhoefer, D. E., Skotte, N. H., Metzler, M., Franciosi, S., Leprivier, G.,

- Somasekharan, S. P., Barokas, A., Deng, Y., Tang, T., Mathers, J., Cetinbas, N., Daugaard, M., Kwok, B., Li, L., Carnie, C. J., Fink, D., Nitsch, R., ... Sorensen, P. H. (2014). HACE1 reduces oxidative stress and mutant Huntingtin toxicity by promoting the NRF2 response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(8), 3032–3037. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314421111>
- Rötig, A., Lebon, S., Zinovieva, E., Mollet, J., Sarzi, E., Bonnefont, J. P., & Munnich, A. (2004). Molecular diagnostics of mitochondrial disorders. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1659*(2–3), 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.07.007>
- Roulet, J.-B., Merkens, L. S., Pappu, A. S., Jacobs, M. D., Winter, R., Connor, W. E., & Steiner, R. D. (2012). No evidence for mevalonate shunting in moderately affected children with Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *35*(5), 859–869. <https://doi.org/10.1007/s10545-012-9453-6>
- Rubinsztein, D. C. (2006). The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature*, *443*(19), 780–786.
- Russell, O. M., Gorman, G. S., Lightowers, R. N., & Turnbull, D. M. (2020). Mitochondrial Diseases: Hope for the Future. *Cell*, *181*(1), 168–188. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.051>
- Rustin, P., Bourgeron, T., Parfait, B., Chretien, D., Munnich, A., & Rötig, A. (1997). Inborn errors of the Krebs cycle: A group of unusual mitochondrial diseases in human. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1361*(2), 185–197. [https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(97\)00035-5](https://doi.org/10.1016/S0925-4439(97)00035-5)
- Ryu, S. W., Jeong, H. J., Choi, M., Karbowski, M., & Choi, C. (2010). Optic atrophy 3 as a protein of the mitochondrial outer membrane induces mitochondrial fragmentation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *67*(16), 2839–2850. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0365-z>

S

- Saada, A., Edvardson, S., Rapoport, M., Shaag, A., Amry, K., Miller, C., Lorberboum-Galski, H., & Elpeleg, O. (2008). C6ORF66 Is an Assembly Factor of Mitochondrial Complex I. *American Journal of Human Genetics*, *82*(1), 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.08.003>
- Sagan, L. (1967). On the Origin of Mitosing Cells. *Journal of Theoretical Biology*, *14*, 225–274.
- Sánchez-Caballero, L., Elurbe, D. M., Baertling, F., Guerrero-Castillo, S., van den Brand, M., van Strien, J., van Dam, T. J. P., Rodenburg, R., Brandt, U., Huynen, M. A., & Nijtmans, L. G. J. (2020). TMEM70 functions in the assembly of complexes I and V. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1861*(8), 148202. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2020.148202>
- Sarig, O., Goldsher, D., Nousbeck, J., Fuchs-Telem, D., Cohen-Katsenelson, K., Iancu, T. C., Manov, I., Saada, A., Sprecher, E., & Mandel, H. (2013). Infantile mitochondrial hepatopathy is a cardinal feature of MEGDEL syndrome (3-Methylglutaconic aciduria type IV with sensorineural deafness, encephalopathy and Leigh-Like Syndrome) caused by novel mutations in SERAC1. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, *161*(9), 2204–2215. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36059>
- Sarraf, S. A., Raman, M., Guarani-Pereira, V., Sowa, M. E., Huttlin, E. L., Gygi, S. P., & Harper, J. W. (2013). Landscape of the PARKIN-dependent ubiquitylome in response to mitochondrial depolarization. *Nature*, *496*(7445), 372–376. <https://doi.org/10.1038/nature12043>
- Saunders, C., Smith, L., Wibrand, F., Ravn, K., Bross, P., Thiffault, I., Christensen, M., Atherton, A., Farrow, E., Miller, N., Kingsmore, S. F., & Ostergaard, E. (2015). CLPB variants associated with autosomal-recessive mitochondrial disorder with cataract, neutropenia, epilepsy, and methylglutaconic aciduria. *The American Journal of Human Genetics*, *96*(2), 258–265. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.12.020>
- Schägger, H., & Pfeiffer, K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO Journal*, *19*(8), 1777–1783. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.8.1777>

- Schägger, H., & Pfeiffer, K. (2001). The Ratio of Oxidative Phosphorylation Complexes I-V in Bovine Heart Mitochondria and the Composition of Respiratory Chain Supercomplexes. *Journal of Biological Chemistry*, 276(41), 37861–37867. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106474200>
- Scheffner, M., & Kumar, S. (2014). Mammalian HECT ubiquitin-protein ligases: Biological and pathophysiological aspects. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1843(1), 61–74. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.03.024>
- Schendzielorz, A. B., Schulz, C., Lytovchenko, O., Clancy, A., Guiard, B., Ieva, R., van der Laan, M., & Rehling, P. (2017). Two distinct membrane potential-dependent steps drive mitochondrial matrix protein translocation. *Journal of Cell Biology*, 216(1), 83–92. <https://doi.org/10.1083/jcb.201607066>
- Schlame, M., & Ren, M. (2006). Barth syndrome, a human disorder of cardiolipin metabolism. *FEBS Letters*, 580(23), 5450–5455. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.07.022>
- Schlieben, L. D., & Prokisch, H. (2020). The Dimensions of Primary Mitochondrial Disorders. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(November), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.600079>
- Schmidt, M., Birkebaek, N., Gonzalez, I., & Sunde, L. (2004). Barth syndrome without 3-methylglutaconic aciduria. *Acta Paediatrica*, 93(3), 419–421. <https://doi.org/10.1080/08035250410022837>
- Sciacco, M., Bonilla, E., Schon, E. A., Dimauro, S., & Moraes, C. T. (1994). Distribution of wild-type and common deletion forms of mtDNA in normal and respiration-deficient muscle fibers from patients with mitochondrial myopathy. *Human Molecular Genetics*, 3(1), 13–19.
- Scorrano, L. (2013). Keeping mitochondria in shape: A matter of life and death. *European Journal of Clinical Investigation*, 43(8), 886–893. <https://doi.org/10.1111/eci.12135>
- Sedlackova, L., & Korolchuk, V. I. (2019). Mitochondrial quality control as a key determinant of cell survival. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1866(4), 575–587. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.12.012>
- Sena, L. A., & Chandel, N. S. (2012). Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Molecular Cell*, 48(2), 158–167. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.025>
- Settembre, C., Fraldi, A., Medina, D. L., & Ballabio, A. (2013). Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 14(5), 283–296. <https://doi.org/10.1038/nrm3565>
- Shaham, O., Slate, N. G., Goldberger, O., Xu, Q., Ramanathan, A., Souza, A. L., Clish, C. B., Sims, K. B., & Mootha, V. K. (2010). A plasma signature of human mitochondrial disease revealed through metabolic profiling of spent media from cultured muscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(4), 1571–1575. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906039107>
- Shahrour, M. A., Staretz-Chacham, O., Dayan, D., Stephen, J., Weech, A., Damseh, N., Pri Chen, H., Edvardson, S., Mazaheri, S., Saada, A., Hershkovitz, E., Shaag, A., Huizing, M., Abu-Libdeh, B., Gahl, W. A., Azem, A., Anikster, Y., Vilboux, T., Elpeleg, O., & Malicdan, M. C. (2017). Mitochondrial epileptic encephalopathy, 3-methylglutaconic aciduria and variable complex V deficiency associated with TIMM50 mutations. *Clinical Genetics*, 91(5), 690–696. <https://doi.org/10.1111/cge.12855>
- Shoffner, J. M. (1999). Oxidative phosphorylation disease diagnosis. *Seminars in Neurology*, 19(4), 341–351. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1040849>
- Signes, A., & Fernandez-Vizarra, E. (2018). Assembly of mammalian oxidative phosphorylation complexes I–V and supercomplexes. *Essays in Biochemistry*, 62(3), 255–270. <https://doi.org/10.1042/EBC20170098>
- Signorile, A., Sgaramella, G., Bellomo, F., & De Rasmio, D. (2019). Prohibitins: A Critical Role in Mitochondrial Functions and Implication in Diseases. *Cells*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/cells8010071>
- Simcox, E. M., Reeve, A., & Turnbull, D. (2013). Monitoring mitochondrial dynamics and complex I dysfunction in neurons: Implications for Parkinson's disease. *Biochemical Society Transactions*, 41(6),

1618–1624. <https://doi.org/10.1042/BST20130189>

Simon, M. T., Eftekharian, S. S., Stover, A. E., Osborne, A. F., Braffman, B. H., Chang, R. C., Wang, R. Y., Steenari, M. R., Tang, S., Hwu, P. W. L., Taft, R. J., Benke, P. J., & Abdenur, J. E. (2019). Novel mutations in the mitochondrial complex I assembly gene NDUFA5 reveal heterogeneous phenotypes. *Molecular Genetics and Metabolism*, *126*(1), 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2018.11.001>

Sinkler, C. A., Kalpage, H., Shay, J., Lee, I., Malek, M. H., Grossman, L. I., & Hüttemann, M. (2017). Tissue- and Condition-Specific Isoforms of Mammalian Cytochrome c Oxidase Subunits: From Function to Human Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2017*. <https://doi.org/10.1155/2017/1534056>

Sirrenberg, C., Bauer, M. F., Guiard, B., Neupert, W., & Brunner, M. (1996). Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22. *Nature*, *384*(6609), 582–585. <https://doi.org/10.1038/384582a0>

Skladal, D., Halliday, J., & Thorburn, D. R. (2003). Minimum birth prevalence of mitochondrial respiratory chain disorders in children. *Brain*, *126*(8), 1905–1912. <https://doi.org/10.1093/brain/awg170>

Slater, E. C. (1953). Mechanism of Phosphorylation in the Respiratory Chain. *Nature*, *172*, 975–978.

Sperl, W., Fleuren, L., Freisinger, P., Haack, T. B., Ribes, A., Feichtinger, R. G., Rodenburg, R. J., Zimmermann, F. A., Koch, J., Rivera, I., Prokisch, H., Smeitink, J. A., & Mayr, J. A. (2015). The spectrum of pyruvate oxidation defects in the diagnosis of mitochondrial disorders. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *38*(3), 391–403. <https://doi.org/10.1007/s10545-014-9787-3>

Spiegel, R., Shaag, A., Mandel, H., Reich, D., Penyakov, M., Hujeirat, Y., Saada, A., Elpeleg, O., & Shalev, S. A. (2009). Mutated NDUFS6 is the cause of fatal neonatal lactic acidemia in Caucasus Jews. *European Journal of Human Genetics*, *17*(9), 1200–1203. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2009.24>

Spiegel, Ronen, Khayat, M., Shalev, S. A., Horovitz, Y., Mandel, H., Hershkovitz, E., Barghuti, F., Shaag, A., Saada, A., Korman, S. H., Elpeleg, O., & Yatsiv, I. (2011). TMEM70 mutations are a common cause of nuclear encoded ATP synthase assembly defect: further delineation of a new syndrome. *Journal of Medical Genetics*, *48*(3), 177–182. <https://doi.org/10.1136/jmg.2010.084608>

Stehling, O., Wilbrecht, C., & Lill, R. (2014). Mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis and human disease. *Biochimie*, *100*, 61–77. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.01.010>

Stenton, S. L., & Prokisch, H. (2020a). Genetics of mitochondrial diseases: Identifying mutations to help diagnosis. *EBioMedicine*, *56*. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102784>

Stenton, S. L., & Prokisch, H. (2020b). The Clinical Application of RNA Sequencing in Genetic Diagnosis of Mendelian Disorders. *Clinics in Laboratory Medicine*, *40*(2), 121–133.

Stolz, A., Ernst, A., & Dikic, I. (2014). Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nature Cell Biology*, *16*(6), 495–501. <https://doi.org/10.1038/ncb2979>

Stroud, D. A., Surgenor, E. E., Formosa, L. E., Reljic, B., Frazier, A. E., Dibley, M. G., Osellame, L. D., Stait, T., Beilharz, T. H., Thorburn, D. R., Salim, A., & Ryan, M. T. (2016). Accessory subunits are integral for assembly and function of human mitochondrial complex I. *Nature*, *538*(7623), 123–126. <https://doi.org/10.1038/nature19754>

Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., Bartlam, M., & Rao, Z. (2005). Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein Complex II. *Cell*, *121*(7), 1043–1057. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.025>

Suomalainen, A., & Battersby, B. J. (2018). Mitochondrial diseases: the contribution of organelle stress responses to pathology. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *19*(2), 77–92. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.66>

Suomalainen, A., Elo, J. M., Pietiläinen, K. H., Hakonen, A. H., Sevastianova, K., Korpela, M., Isohanni, P., Marjavaara, S. K., Tyni, T., Kiuru-Enari, S., Pihko, H., Darin, N., Öunap, K., Kluijtmans, L. A. J., Paetau, A.,

Buzkova, J., Bindoff, L. A., Annunen-Rasila, J., Uusimaa, J., ... Tyynismaa, H. (2011). FGF-21 as a biomarker for muscle-manifesting mitochondrial respiratory chain deficiencies: A diagnostic study. *The Lancet Neurology*, 10(9), 806–818. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70155-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70155-7)

Swalwell, H., Kirby, D. M., Blakely, E. L., Mitchell, A., Salemi, R., Sugiana, C., Compton, A. G., Tucker, E. J., Ke, B. X., Lamont, P. J., Turnbull, D. M., McFarland, R., Taylor, R. W., & Thorburn, D. R. (2011). Respiratory chain complex i deficiency caused by mitochondrial DNA mutations. *European Journal of Human Genetics*, 19(7), 769–775. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2011.18>

Swerdlow, N. S., & Wilkins, H. M. (2020). Mitophagy and the brain. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 1–26. <https://doi.org/10.3390/ijms21249661>

Szklarczyk, R., Wanschers, B. F. J., Nabuurs, S. B., Nouws, J., Nijtmans, L. G., & Huynen, M. A. (2011). NDUFB7 and NDUFA8 are located at the intermembrane surface of complex i. *FEBS Letters*, 585(5), 737–743. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.01.046>

T

Tamura, Y., Harada, Y., Shiota, T., Yamano, K., Watanabe, K., Yokota, M., Yamamoto, H., Sesaki, H., & Endo, T. (2009). Tim23 - Tim50 pair coordinates functions of translocators and motor proteins in mitochondrial protein import. *Journal of Cell Biology*, 184(1), 129–141. <https://doi.org/10.1083/jcb.200808068>

Tan, J., Wagner, M., Stenton, S. L., Strom, T. M., Wortmann, S. B., Prokisch, H., Meitinger, T., Oexle, K., & Klopstock, T. (2020). Lifetime risk of autosomal recessive mitochondrial disorders calculated from genetic databases. *EBioMedicine*, 54, 102730. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102730>

Tanaka, A., Cleland, M. M., Xu, S., Narendra, D. P., Suen, D. F., Karbowski, M., & Youle, R. J. (2010). Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *Journal of Cell Biology*, 191(7), 1367–1380. <https://doi.org/10.1083/jcb.201007013>

Tang, K., Zhao, Y., Li, H., Zhu, M., Li, W., Liu, W., Zhu, G., Xu, D., Peng, W., & Xu, Y. W. (2017). Translocase of Inner Membrane 50 Functions as a Novel Protective Regulator of Pathological Cardiac Hypertrophy. *Journal of the American Heart Association*, 6(4). <https://doi.org/10.1161/JAHA.116.004346>

Tang, S., Wang, J., Zhang, V. W., Li, F. Y., Landsverk, M., Cui, H., Truong, C. K., Wang, G., Chen, L. C., Graham, B., Scaglia, F., Schmitt, E. S., Craigen, W. J., & Wong, L. J. C. (2013). Transition to Next Generation Analysis of the Whole Mitochondrial Genome: A Summary of Molecular Defects. *Human Mutation*, 34(6), 882–893. <https://doi.org/10.1002/humu.22307>

Tanida, I., Minematsu-Ikeguchi, N., Ueno, T., & Kominami, E. (2005). Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy*, 1, 84–91.

Tanida, I., Ueno, T., & Kominami, E. (2008). LC3 and Autophagy. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 445, 77–88. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-157-4_4

Taylor, R. W., & Turnbull, D. M. (2005). Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nature Reviews Genetics*, 6(5), 389–402. <https://doi.org/10.1038/nrg1606>

Thompson, K., Collier, J. J., Glasgow, R. I. C., Robertson, F. M., Pyle, A., Blakely, E. L., Alston, C. L., Oláhová, M., McFarland, R., & Taylor, R. W. (2020). Recent advances in understanding the molecular genetic basis of mitochondrial disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 43(1), 36–50. <https://doi.org/10.1002/jimd.12104>

Tilokani, L., Nagashima, S., Paupe, V., & Prudent, J. (2018). Mitochondrial dynamics: Overview of molecular mechanisms. *Essays in Biochemistry*, 62(3), 341–360. <https://doi.org/10.1042/EBC20170104>

Timón-Gómez, A., Nývltová, E., Abriata, L. A., Vila, A. J., Hosler, J., & Barrientos, A. (2018). Mitochondrial cytochrome c oxidase biogenesis: Recent developments. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 76, 163–178. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.08.055>

Tort, F., Del Toro, M., Lissens, W., Montoya, J., Fernández-Burriel, M., Font, A., Buján, N., Navarro-Sastre, A., López-Gallardo, E., Arranz, J. A., Riudor, E., Briones, P., & Ribes, A. (2011). Screening for nuclear genetic defects in the ATP synthase-associated genes TMEM70, ATP12 and ATP5E in patients with 3-methylglutaconic aciduria. *Clinical Genetics*, *80*(3), 297–300. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2011.01650.x>

Tort, F., Ferrer-Cortes, X., & Ribes, A. (2016). Differential diagnosis of lipoic acid synthesis defects. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *39*(6), 781–793. <https://doi.org/10.1007/s10545-016-9975-4>

Tort, F., García-Silva, M. T., Ferrer-Cortès, X., Navarro-Sastre, A., Garcia-Villoria, J., Coll, M. J., Vidal, E., Jiménez-Almazán, J., Dopazo, J., Briones, P., Elpeleg, O., & Ribes, A. (2013). Exome sequencing identifies a new mutation in SERAC1 in a patient with 3-methylglutaconic aciduria. *Molecular Genetics and Metabolism*, *110*(1–2), 73–77. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.04.021>

Tort, F., Ugarteburu, O., Texidó, L., Gea-Sorlí, S., García-Villoria, J., Ferrer-Cortès, X., Arias, Á., Matalonga, L., Gort, L., Ferrer, I., Guitart-Mampel, M., Garrabou, G., Vaz, F. M., Pristoupilova, A., Rodríguez, M. I. E., Beltran, S., Cardellach, F., Wanders, R. J. A., Fillat, C., ... Ribes, A. (2019). Mutations in TIMM50 cause severe mitochondrial dysfunction by targeting key aspects of mitochondrial physiology. *Human Mutation*, *40*(10), 1700–1712. <https://doi.org/10.1002/humu.23779>

Triepels, R. H., Van Den Heuvel, L. P., Trijbels, J. M., & Smeitink, J. A. (2001). Respiratory chain complex I deficiency. *American Journal of Medical Genetics*, *106*(1), 37–45. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1397>

Tripathi, D. N., Chowdhury, R., Trudel, L. J., Tee, A. R., Slack, R. S., Walker, C. L., & Wogan, G. N. (2013). Reactive nitrogen species regulate autophagy through ATM-AMPK-TSC2-mediated suppression of mTORC1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(32), E2950–E2957. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307736110>

Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., & Yoshikawa, S. (1996). The Whole Structure of the 13-Subunit Oxidized Cytochrome c Oxidase at 2.8 Å. *Science*, *272*(5265), 1136–1144. <https://doi.org/10.1126/science.272.5265.1136>

Tucker, E. J., Compton, A. G., Calvo, S. E., & Thorburn, D. R. (2011). The molecular basis of human complex I deficiency. *IUBMB Life*, *63*(9), 669–677. <https://doi.org/10.1002/iub.495>

Turnbull, D. M., Andrews, R. M., Kubacka, I., Chinnery, P. F., Lightowlers, R. N., & Howell, N. (1999). Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA - Nature Genetics. *Nature Genetics*, *23*(2), 147. <http://www.nature.com/doi/10.1038/13779%5Cnpapers3://publication/doi/10.1038/13779>

U

Ucar, S. K., Mayr, J. A., Feichtinger, R. G., Canda, E., Çoker, M., & Wortmann, S. B. (2016). Previously Unreported Biallelic Mutation in DNAJC19: Are Sensorineural Hearing Loss and Basal Ganglia Lesions Additional Features of Dilated Cardiomyopathy and Ataxia (DCMA) Syndrome? *JIMD Reports*, *4*(Dcm), 39–45. https://doi.org/10.1007/8904_2016_23

V

Vafai, S. B., & Mootha, V. K. (2012). Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle. *Nature*, *491*(7424), 374–383. <https://doi.org/10.1038/nature11707>

Vamecq, J., Papegay, B., Nuyens, V., Boogaerts, J., Leo, O., & Kruys, V. (2020). Mitochondrial dysfunction, AMPK activation and peroxisomal metabolism: A coherent scenario for non-canonical 3-methylglutaconic acidurias. *Biochimie*, *168*, 53–82. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.10.004>

Van Den Heuvel, L., Ruitenbeek, W., Smeets, R., Gelman-Kohan, Z., Elpeleg, O., Loeffen, J., Trijbels, F., Mariman, E., De Bruijn, D., & Smeitink, J. (1998). Demonstration of a new pathogenic mutation in human

complex I deficiency: A 5-bp duplication in the nuclear gene encoding the 18-kD (AQDQ) subunit. *American Journal of Human Genetics*, 62(2), 262–268. <https://doi.org/10.1086/301716>

Vidoni, S., Harbour, M. E., Guerrero-Castillo, S., Signes, A., Ding, S., Fearnley, I. M., Taylor, R. W., Tiranti, V., Arnold, S., Fernandez-Vizarra, E., & Zeviani, M. (2017). MR-1S Interacts with PET100 and PET117 in Module-Based Assembly of Human Cytochrome c Oxidase. *Cell Reports*, 18(7), 1727–1738. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.044>

Vinothkumar, K. R., Jiapeng, Z., & Hirst, J. (2014). Architecture of mammalian respiratory complex I. *Nature*, 515(7525), 80–84. <https://doi.org/10.1038/nature13686>.Architecture

W

Wai, T., & Langer, T. (2016). Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 27(2), 105–117. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.12.001>

Walker, J. E. (2013). The ATP synthase: The understood, the uncertain and the unknown. *Biochemical Society Transactions*, 41(1), 1–16. <https://doi.org/10.1042/BST20110773>

Wallace, D. C., Singh, G., Lott, M. T., Hodge, J. A., Schurr, T. G., Lezza, A. M., Elsas, L. J., & Nikoskelainen, E. K. (1988). Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science*, 242(4884), 1427–1430. <https://doi.org/10.1126/science.3201231>

Wang, X.-L., Feng, S.-T., Wang, Z.-Z., Chen, N.-H., & Zhang, Y. (2021). Role of mitophagy in mitochondrial quality control: Mechanisms and potential implications for neurodegenerative diseases. *Pharmacological Research*, 165(December 2020), 105433. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105433>

Wasilewski, M., Chojnacka, K., & Chacinska, A. (2017). Protein trafficking at the crossroads to mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1864(1), 125–137. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.10.019>

Weatherall, D. J. (2008). The centenary of Garrod's Croonian lectures. *Clinical Medicine, Journal of the Royal College of Physicians of London*, 8(3), 309–311. <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.8-3-309>

Weisinger, R. A., & Fridovich, I. (1973). Mitochondrial Superoxide Dismutase. *The Journal of Biological Chemistry*, 248(13), 4793–4796.

Wellen, K. E., & Thompson, C. B. (2011). Nutrient Excess. *October*, 40(2), 323–332. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.10.004>.Cellular

Wevers, R. A., & Blau, N. (2018). Think big — think omics. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 41(3), 281–283. <https://doi.org/10.1007/s10545-018-0165-4>

White, S. L., Collins, V. R., Wolfe, R., Cleary, M. A., Shanske, S., DiMauro, S., Dahl, H. H. M., & Thorburn, D. R. (1999). Genetic counseling and prenatal diagnosis for the mitochondrial DNA mutations at nucleotide 8993. *American Journal of Human Genetics*, 65(2), 474–482. <https://doi.org/10.1086/302488>

Wiedemann, N., Kozjak, V., Chacinska, A., Schönfisch, B., Rospert, S., Ryan, M. T., Pfanner, N., & Meisinger, C. (2003). Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane. *Nature*, 424(6948), 565–571. <https://doi.org/10.1038/nature01753>

Wiedemann, N., & Pfanner, N. (2017). Mitochondrial Machineries for Protein Import and Assembly. *Annual Review of Biochemistry*, 86(1), 685–714. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014352>

Wild, A. C., Moinova, H. R., & Mulcahy, R. T. (1999). Regulation of γ -glutamylcysteine synthetase subunit gene expression by the transcription factor Nrf2. *Journal of Biological Chemistry*, 274(47), 33627–33636. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.47.33627>

Willems, P. H. G. M., Smeitink, J. A. M., & Koopman, W. J. H. (2009). Mitochondrial dynamics in human NADH:ubiquinone oxidoreductase deficiency. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*,

41(10), 1773–1782. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.01.012>

Wortmann, S. B., Duran, M., Anikster, Y., Barth, P. G., Sperl, W., Zschocke, J., Morava, E., & Wevers, R. A. (2013). Inborn errors of metabolism with 3-methylglutaconic aciduria as discriminative feature: Proper classification and nomenclature. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 36(6), 923–928. <https://doi.org/10.1007/s10545-012-9580-0>

Wortmann, S. B., Kluijtmans, L. A., Engelke, U. F. H., Wevers, R. A., & Morava, E. (2012). The 3-methylglutaconic acidurias: What's new? *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 35(1), 13–22. <https://doi.org/10.1007/s10545-010-9210-7>

Wortmann, S. B., Kluijtmans, L. A. J., Rodenburg, R. J., Sass, J. O., Nouws, J., Van Kaauwen, E. P., Kleefstra, T., Tranebjaerg, L., De Vries, M. C., Isohanni, P., Walter, K., Alkuraya, F. S., Smuts, I., Reinecke, C. J., Van Der Westhuizen, F. H., Thorburn, D., Smeitink, J. A. M., Morava, E., & Wevers, R. A. (2013). 3-Methylglutaconic aciduria - Lessons from 50 genes and 977 patients. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 36(6), 913–921. <https://doi.org/10.1007/s10545-012-9579-6>

Wortmann, S. B., Koolen, D. A., Smeitink, J. A., van den Heuvel, L., & Rodenburg, R. J. (2015). Whole exome sequencing of suspected mitochondrial patients in clinical practice. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 38(3), 437–443. <https://doi.org/10.1007/s10545-015-9823-y>

Wortmann, S. B., Mayr, J. A., Nuoffer, J. M., Prokisch, H., & Sperl, W. (2017). A Guideline for the Diagnosis of Pediatric Mitochondrial Disease: The Value of Muscle and Skin Biopsies in the Genetics Era. *Neuropediatrics*, 48(4), 309–314. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1603776>

Wortmann, S. B., Rodenburg, R. J. T., Jonckheere, A., De Vries, M. C., Huizing, M., Heldt, K., Van Den Heuvel, L. P., Wendel, U., Kluijtmans, L. A., Engelke, U. F., Wevers, R. A., Smeitink, J. A. M., & Morava, E. (2009). Biochemical and genetic analysis of 3-methylglutaconic aciduria type IV: A diagnostic strategy. *Brain*, 132(1), 136–146. <https://doi.org/10.1093/brain/awn296>

Wortmann, S. B., Vaz, F. M., Gardeitchik, T., Vissers, L. E. L. M., Renkema, G. H., Schuurs-Hoeijmakers, J. H. M., Kulik, W., Lammens, M., Christin, C., Kluijtmans, L. A. J., Rodenburg, R. J., Nijtmans, L. G. J., Grünwald, A., Klein, C., Gerhold, J. M., Kozicz, T., Van Hasselt, P. M., Harakalova, M., Kloosterman, W., ... De Brouwer, A. P. M. (2012). Mutations in the phospholipid remodeling gene SERAC1 impair mitochondrial function and intracellular cholesterol trafficking and cause dystonia and deafness. *Nature Genetics*, 44(7), 797–802. <https://doi.org/10.1038/ng.2325>

Wortmann, S. B., Ziętkiewicz, S., Kousi, M., Szklarczyk, R., Haack, T. B., Gersting, S. W., Muntau, A. C., Rakovic, A., Renkema, G. H., Rodenburg, R. J., Strom, T. M., Meitinger, T., Rubio-Gozalbo, M. E., Chrusciel, E., Distelmaier, F., Golzio, C., Jansen, J. H., Van Karnebeek, C., Lillquist, Y., ... Wevers, R. A. (2015). CLPB mutations cause 3-methylglutaconic aciduria, progressive brain atrophy, intellectual disability, congenital neutropenia, cataracts, movement disorder. *American Journal of Human Genetics*, 96(2), 245–257. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.12.013>

Wortmann, S., Rodenburg, R. J. T., Huizing, M., Loupatty, F. J., de Koning, T., Kluijtmans, L. A. J., Engelke, U., Wevers, R., Smeitink, J. A. M., & Morava, E. (2006). Association of 3-methylglutaconic aciduria with sensori-neural deafness, encephalopathy, and Leigh-like syndrome (MEGDEL association) in four patients with a disorder of the oxidative phosphorylation. *Molecular Genetics and Metabolism*, 88(1), 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2006.01.013>

Y

Yamaoka, S., Urade, R., & Kito, M. (1990). Cardiolipin molecular species in rat heart mitochondria are sensitive to essential fatty acid-deficient dietary lipids. *The Journal of Nutrition*, 120(5), 415–421. <https://doi.org/10.1093/jn/120.5.415>

Yang, Y., & Klionsky, D. J. (2020). Autophagy and disease: unanswered questions. *Cell Death and Differentiation*, 27(3), 858–871. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0480-9>

Yatsuga, S., Fujita, Y., Ishii, A., Fukumoto, Y., Arahata, H., Kakuma, T., Kojima, T., Ito, M., Tanaka, M., Saiki, R., & Koga, Y. (2015). Growth differentiation factor 15 as a useful biomarker for mitochondrial disorders. In *Annals of Neurology* (Vol. 78, Issue 5, pp. 814–823). <https://doi.org/10.1002/ana.24506>

Yatsuka, Y., Kishita, Y., Formosa, L. E., Shimura, M., Nozaki, F., Fujii, T., Nitta, K. R., Ohtake, A., Murayama, K., Ryan, M. T., & Okazaki, Y. (2020). A homozygous variant in NDUFA8 is associated with developmental delay, microcephaly, and epilepsy due to mitochondrial complex I deficiency. *Clinical Genetics*, *98*(2), 155–165. <https://doi.org/10.1111/cge.13773>

Yoshikawa, S., Shinzawa-Itoh, K., & Tsukihara, T. (1998). Crystal structure of bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å resolution. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, *30*(1), 7–14. <https://doi.org/10.1023/A:1020595108560>

Yoshinaka, T., Kosako, H., Yoshizumi, T., Furukawa, R., Hirano, Y., Kuge, O., Tamada, T., & Koshihara, T. (2019). Structural Basis of Mitochondrial Scaffolds by Prohibitin Complexes: Insight into a Role of the Coiled-Coil Region. *iScience*, *19*, 1065–1078. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.08.056>

Youle, R. J. (2019). Mitochondria—Striking a balance between host and endosymbiont. *Science*, *365*(6454). <https://doi.org/10.1126/science.aaw9855>

Youle, R. J., & Narendra, D. P. (2011). Mechanisms of mitophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *12*(1), 9–14. <https://doi.org/10.1038/nrm3028>

Yubero, D., Montero, R., Santos-Ocaña, C., Salviati, L., Navas, P., & Artuch, R. (2018). Molecular diagnosis of coenzyme Q10 deficiency: an update. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, *18*(6), 491–498. <https://doi.org/10.1080/14737159.2018.1478290>

Z

Zeharia, A., Friedman, J. R., Tobar, A., Saada, A., Konen, O., Fellig, Y., Shaag, A., Nunnari, J., & Elpeleg, O. (2016). Mitochondrial hepato-encephalopathy due to deficiency of QIL1/MIC13 (C19orf70), a MICOS complex subunit. *European Journal of Human Genetics*, *24*(12), 1778–1782. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2016.83>

Zeviani, M., Moraes, C. T., DiMauro, S., Nakase, H., Bonilla, E., Schon, E. A., & Rowland, L. P. (1988). Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology*, *38*(9), 1339–1346. <https://doi.org/10.1212/wnl.38.9.1339>

Zhang, L., Chen, X., Sharma, P., Moon, M., Sheftel, A. D., Dawood, F., Nghiem, M. P., Wu, J., Li, R. K., Gramolini, A. O., Sorensen, P. H., Penninger, J. M., Brumell, J. H., & Liu, P. P. (2014). HACE1-dependent protein degradation provides cardiac protection in response to haemodynamic stress. *Nature Communications*, *5*, 1–14. <https://doi.org/10.1038/ncomms4430>

Zhu, J., Vinothkumar, K. R., & Hirst, J. (2016). Structure of mammalian respiratory complex I. *Nature*, *536*(7616), 354–358. <https://doi.org/10.1038/nature19095>

Zorov, D. B., Juhaszova, M., & S.J., S. (2014). Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiological Reviews*, *94*(3), 909–950.

ANEXO

ANEXO. Resultados adicionales. Estudios genéticos y funcionales en pacientes con sospecha de enfermedad mitocondrial.

3-MGA como biomarcador	Gen	Variante	Efecto sobre la proteína	Estudios funcionales clave para dirigir el diagnóstico
+	<i>ECHS1</i>	c.[404A>G]; [404A>G]	p.[Asn135Ser];[Asn135Ser]	Ácido 2-metil-2,3-dihidrobutírico en orina
+	<i>ECHS1</i>	c.[123_124delAG];[c.371C>T]	p.[Gly42GlufsTer3];[Thr124Ile]	Expresión de la proteína ECHS1, ácido 2-metil-2,3-dihidrobutírico en orina
+	<i>TMEM70</i>	c.[317-2A>G];[317-2A>G]	p.[?];[?] ^a	Ensamblaje del sistema OXPHOS (CV) y morfología mitocondrial
+	<i>ATPAF2</i>	c.[280T>A]; [280T>A]	p.[Trp94Arg];[Trp94Arg]	Ensamblaje del sistema OXPHOS (CV)
+	<i>DNAJC19</i>	c.[178dupT]; [178dupT]	p.[Ser60LeufsTer40];[Ser60LeufsTer40]	Morfología mitocondrial
+	<i>SERAC1</i>	c.[777T>G];[777T>G]	p.[Tyr259Ter];[Tyr259Ter]	Expresión de la proteína SERAC1

+	<i>AR</i>	c.[1038dupT];[0]	p.[Leu347SerfsTer155];[0]	Material no disponible
+	<i>TIMM50</i>	c. [341G>A];[805 G>A]	p. [Arg114Gln];[Gly269Ser]	Estudios en el artículo 1
+	<i>HACE1</i>	c. [240C>A]; [240C>A]	p.[Cys80Ter]; [Cys80Ter]	Estudios en el artículo 2
+	<i>NDUFA4</i>	c.[478G>T]; c.[478G>T]	p.[Glu160Ter]; [Glu160Ter]	Estudios en el artículo 3
-	<i>GEMIN4</i>	c.[2452T>C];[761_762delAG]	p.[Trp818Arg];[Glu254GlyfsTer57]	Expresión de la proteína GEMIN4
-	<i>PKLR</i>	c.[312_316dupGGAGG];[312_316dupGGAGG]	p.[Ala137GlyfsTer44];[Ala137GlyfsTer44]	Expresión de la proteína PKLR
-	<i>SARS2</i>	c.[1347G>A];[c.1347G>A]	p.[Asn450ArgfsTer60];[p.Asn450ArgfsTer60]	Ensamblaje del sistema OXPHOS
-	<i>FDXR</i>	c.[203A>G];[79+2T>A]	p.[Tyr68Cys];[?] ^a	Expresión de la proteína FDXR, RNAseq

-	<i>MTO1</i>	c.[1923T>G];[1465C>T]	p.[Tyr641Ter];[Arg489Cys]	Ensamblaje del sistema OXPHOS (CIV)
-	<i>NADK2</i>	c.[956+6T>C];[956+6T>C]	p.[Trp319CysfsTer21];[Trp319CysfsTer21]	Expresión de la proteína NADK2, análisis de splicing aberrante
-	<i>COX15</i>	c.[649 C>T] ;[649 C>T]	p. [Arg217Trp]; [Arg217Trp]	Ensamblaje y actividad del sistema OXPHOS (CIV)
-	<i>FLAD1</i>	c.[797_798delAGinsT];[1555-3C>G]	p.[Glu266ValfsTer3];[?] ^a	Expresión de la proteína FLAD1 y proteínas que utilizan FAD como cofactor
-	<i>SUCGL1</i>	c.[901G>A]; [589 +1618 G>A]	p.[Gly301Arg]; [Ile198LeufsTer2]	Análisis de splicing aberrante
-	<i>COQ10A</i>	c.[559T>C];[559T>C]	p.[Cys187Arg];[Cys187Arg]	Respirometría de alta resolución
-	<i>COX4i1</i>	c.[64C>T];[73+1511A>G]	p.[Arg22Ter];[Glu25ValfsTer9]	Expresión de la proteína COX4i1, Ensamblaje del sistema OXPHOS (CIV)
-	<i>NDUFS2</i>	c.[422A>G];[?]	p.[Tyr141Cys];[?] ^b	Ensamblaje del sistema OXPHOS (CI), análisis de cDNA, RNAseq

-	<i>ND6</i>	m.14459G>A	p.Ala72Val	Actividad del complejo I de la CRM
-	<i>NDUFA8</i>	c.[293G>T];[293G>T]	p.[Arg98Leu]; [Arg98Leu]	Estudios en el artículo 4.

^a no se ha analizado el efecto de esta variante sobre el cDNA; ^b la segunda mutación no ha sido identificada todavía.