

DOS GENOMAS Y UN DESTINO: LA MITOCONDRIA. PEQUEÑAS HISTORIAS DE UNA VIEJA AMISTAD

Rafael Garesse Alarcón

Discurso de ingreso como Académico Correspondiente en Madrid, 12 de marzo de 2018

Excelentísimos Srs. Presidentes de la Academia Malagueña de Ciencias y del Instituto de Academias de Andalucía.

Ilustrísimos Señores Académicos, autoridades, querida familia, amigos y amigas.

Es para mí un gran honor estar en estos momentos en un lugar tan emblemático de mi querida ciudad de Málaga, dispuesto a leer mi discurso de ingreso como académico correspondiente en esta prestigiosa institución, con más de 140 años de historia. Agradezco a todos los académicos la confianza que han depositado en mí, y muy particularmente a su presidente, el Dr. Fernando Orellana y a los ilustres académicos Alfredo Asensi, Luis Machuca y José Becerra, que han tenido la gentileza de proponerme. También a mi ilustre colega José Ángel Narváez, académico de número y rector de la universidad de Málaga por su cariñosa presentación.

Se trata de un reconocimiento que me llena de alegría, pero también de profundo agradecimiento a las personas que me han ayudado a lo largo de mi trayectoria personal y profesional. Se trata de un reconocimiento, sin duda, compartido con todas ellas. Quisiera agradecer particularmente a mi maestro Roberto Marco, un universitario ejemplar que nos dejó siendo aún joven. A todos los componentes de mi grupo de investigación, que han constituido siempre una gran familia, a los compañeros de departamento e Instituto, por tantos años de amistad y trabajo compartido. A Joaquín Arenas, sin duda el referente de los estudios en patología mitocondrial en España, que me introdujo en este fascinante campo de estudio. A José María Sanz, rector de la UAM que me incorporó a su equipo. A todas las vicerrectoras y todos los vicerrectores, compañeros y compañeras de viaje de los que tanto he aprendido. Y muy especialmente a mi familia, que me acompaña hoy con su presencia física o emocional. A mi madre María Rosa, que me transmitió los valores esenciales de la vida

y me enseñó a intentar ser siempre una buena persona, como era ella, y a mi querida tía Adela. A mi mujer Mari Carmen, sin cuyo apoyo nada hubiera sido posible, y a mis hijos Macarena y Javier, para su padre, lo mejor de este mundo.

El tema que he elegido para mi discurso es la mitocondria, un diminuto orgánulo esencial para la vida y la muerte de la célula. No podía ser de otra manera, ya que yo, más que farmacéutico, bioquímico o biólogo molecular, me considero mitocondriólogo. Siempre que he tenido oportunidad de decirlo no puedo evitar que me venga a la memoria una conocida anécdota taurina que se atribuye al diestro Rafael Gómez Ortega, El Gallo. El famoso torero se relacionaba con lo mejor de la sociedad de su tiempo y, cierto día, un amigo le presentó a Ortega y Gasset, por cierto, antiguo alumno del colegio de los jesuitas de El Palo. Al preguntar quién era ese señor le contestaron que un eminente filósofo. Entonces el matador pidió que le explicaran en qué consistía su profesión. *“Los filósofos se dedican a pensar”* le contestaron. Asombrado, El Gallo exclamó: *“Hay gente pa’ tó”*. No quiero ni imaginarme que hubiera dicho el maestro si le hubieran presentado a un mitocondriólogo.

La mitocondria es un orgánulo de la célula que se encarga de generar la mayor parte de la energía que necesitan los diferentes tejidos del organismo. Para ello, oxida los alimentos que consumimos y transforma la energía que contienen en una pequeña molécula, el ATP, fácil de utilizar en todos los procesos celulares, desde la contracción muscular a la transmisión del impulso nervioso. El proceso de síntesis de ATP tiene lugar en la membrana interna de la mitocondria, donde se localiza la cadena de transporte electrónico. Se trata de cuatro grandes complejos formados por más de 70 proteínas, que atraviesan la membrana y utilizan los electrones extraídos de los alimentos para bombear protones fuera de la mitocondria en contra de un fuerte gradiente electroquímico. Estos protones vuelven a entrar en la mitocondria, ahora

a favor de gradiente, por otro complejo el V o ATP sintasa, que aprovecha la energía que se libera para sintetizar ATP. En el mundo actual en el que vivimos con grandes desarrollos tecnológicos, la cadena respiratoria mitocondrial o respirasoma constituye una asombrosa obra de ingeniería, de la que hoy en día conocemos casi todos sus detalles estructurales. Es una auténtica máquina molecular dotada de gran belleza y una gran eficiencia en la transformación de energía, primero almacenada en poder reductor, el que contiene los alimentos que consumimos, más tarde en energía electroquímica, almacenada en un gradiente, después en energía mecánica, ya que la ATP sintasa es un auténtico motor molecular que gira a gran velocidad, y finalmente en energía química, la molécula de ATP. Por ello, la mitocondria se ha conocido tradicionalmente como la cocina o la central energética de la célula (Fig. 1).

Hoy en día sabemos que la mitocondria es mucho más y que desempeña un papel regulador no solo en la vida, sino también en la muerte de la célula, ya que está implicada en apoptosis, o muerte celular programada, el

elegante e importante mecanismo fisiológico de suicidio celular. Está dotada de un gran dinamismo, mediante fenómenos de fusión y fisión, que le permiten cambiar de forma y adoptar una estructura fibrilar o dividirse en pequeñas unidades individuales. Regula numerosos procesos celulares a través de mediadores como el calcio o los radicales libres de oxígeno. Son fundamentales para la termogénesis adaptativa y la respuesta inmune innata.

Las mitocondrias de los diferentes tejidos se especializan para cumplir adecuadamente su función, que es diferente en una célula hepática o en una neurona, e incluso dentro de una célula puede haber subpoblaciones diferentes de mitocondrias. Por tanto, no es solo una central energética, sino un importante centro de control celular.

No pretendo ni mucho menos hablar de todo ello, sino ilustrar con algunos ejemplos, pequeñas historias en general extraídas de experiencias propias, el fascinante mundo de esta organela y su implicación en un relevante número de enfermedades que se conocen

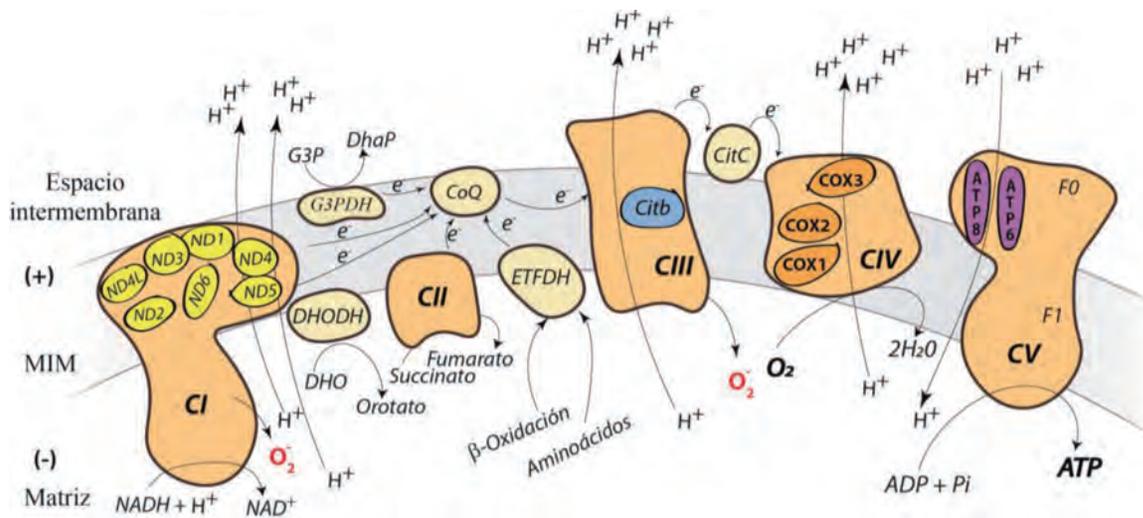


Figura 1. Esquema de la cadena respiratoria y el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS). Los complejos de esta gran máquina molecular productora de energía se encuentran insertados en la membrana interna de la mitocondria. Se muestran en naranja (CI-CIV, junto con la ATP sintasa o CV) y en su interior se destacan las subunidades codificadas por el ADNmt. Los cofactores reducidos NADH+H+ y FADH2, provenientes del catabolismo de los nutrientes celulares, se oxidan y ceden sus electrones (e-) a los complejos I y II respectivamente. Los electrones fluyen por la cadena de transporte electrónico hasta finalmente llegar al O₂ y formar H₂O. El gradiente de protones (H⁺) generado es utilizado por el complejo V, ATP sintasa, para la síntesis de ATP. **DHODH**: Dihidroorotato deshidrogenasa. **DHO**: dihidroorotato. **EFTDH**: *electron transfer flavoprotein:ubiquinone oxidoreductase*. **CoQ**: Ubiquinona. **CitC**: citocromo C. **G3PDH**: glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial. **G3P**: glicerol-3-fosfato. **DhaP**: dihidroxiacetona fosfato.

genéricamente con el nombre de enfermedades mitocondriales.

EL ORIGEN DE LAS MITOCONDRIAS

El origen de las mitocondrias se sitúa hace 2.000 millones de años, periodo en el que se produjo un aumento en la concentración de oxígeno en la atmósfera. Una proteobacteria capaz de consumir oxígeno invadió a otra bacteria anaerobia, la precursora de las actuales células eucariotas y por tanto de todos los organismos pluricelulares, incluida la especie humana. La proteobacteria invasora retiraba el oxígeno del citoplasma de su huésped evitando de este modo su efecto tóxico, y por su parte, la célula huésped le proporcionaba diferentes metabolitos, como glicerol, lípidos o aminoácidos. Se estableció de este modo entre ambas células primitivas una simbiosis, lo que podríamos llamar coloquialmente una buena amistad, que dura ya 2.000 millones de años. Esta hipótesis, llamada endosimbiótica, fue formulada a mediados de los años 70 por la bióloga Linus Margulis y numerosos estudios filogenéticos muestran que dicho evento ocurrió una sola vez a lo largo de la evolución, y por lo tanto se admite un origen único y común del conjunto de mitocondrias presentes en los distintos organismos eucariotas.

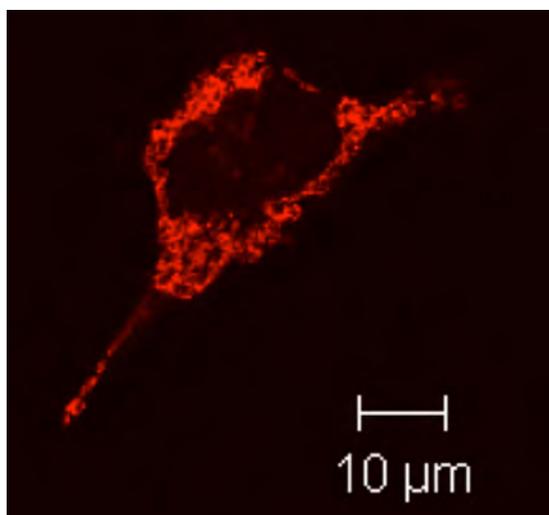


Figura 2. Célula HEK293T, donde se puede observar la red mitocondrial teñida de rojo.

Durante los millones de años de evolución conjunta, el genoma de la pre-mitocondria fue perdiendo genes o transfiriéndolos al genoma de la célula huésped. Por tanto, la práctica

totalidad de la información para sintetizar las proteínas que forman parte de las mitocondrias actuales se encuentran codificadas en el genoma de la célula que actuó de huésped, y que está localizado en el núcleo de las células eucariotas actuales. La mitocondria conservó sólo una pequeña molécula de ADN, el genoma mitocondrial, que se mantiene en su interior. Como existen cientos o miles de mitocondrias en cada célula, el genoma mitocondrial está presente en muchas copias en cada célula. Fue identificado por primera vez en 1963 en embriones de pollo por Margit y Sylvan Nass y su función fue un misterio que solo pudo resolverse 20 años más tarde, a principio de los años 80 (Fig. 2).

EL GENOMA MITOCONDRIAL: LO PEQUEÑO ES BONITO

Conocer la secuencia del genoma humano, un enorme volumen de información compuesta de 3.600 millones de nucleótidos que se encuentra en el núcleo de las células, ha sido uno de los grandes sueños de los científicos. Se cumplió a finales del siglo XX, gracias a un esfuerzo extraordinario y una inversión millonaria realizada especialmente en Europa y Estados Unidos. Fue un hito histórico anunciado en comparecencia pública conjuntamente por los presidentes Bill Clinton y Tony Blair el 26 de junio del año 2000.

El *proyecto genoma* había utilizado una ingeniosa técnica desarrollada en los años 70 por el científico británico Fred Sanger en el Laboratorio de Biología Molecular del Medical Research Council en Cambridge, Inglaterra. Sanger había puesto a punto inicialmente métodos eficientes para obtener la secuencia de aminoácidos de las proteínas, por lo que recibió su primer premio Nobel, y posteriormente un método para obtener la secuencia de nucleótidos del ADN, por el que obtuvo su segundo premio Nobel. Para poner a punto su sofisticado método decidió secuenciar moléculas de ADN de tamaño pequeño. En primer lugar, eligió un virus, el bacteriófago Φ X 174. A continuación, se decidió por la pequeña molécula de ADN mitocondrial. La purificó de placenta humana, y para su secuenciación utilizó una estrategia que podría parecer inicialmente disparatada: romperlo en miles de pedazos al azar, y una vez obtenida la secuencia de cada fragmento individual, reconstruir

el genoma completo como si se tratara de un puzle. Fue una auténtica hazaña, que culminó con la obtención de su secuencia completa en 1981, 20 años antes de la obtención del genoma nuclear. Para resaltar el significado de este logro Piet Borst y Leslie Grivel escribieron en la revista *Nature* una maravillosa reseña: "*Small is beautiful, portrait of a mitochondrial genome*". Cuando lo leí, quedé inmediatamente cautivado por esta pequeña molécula.

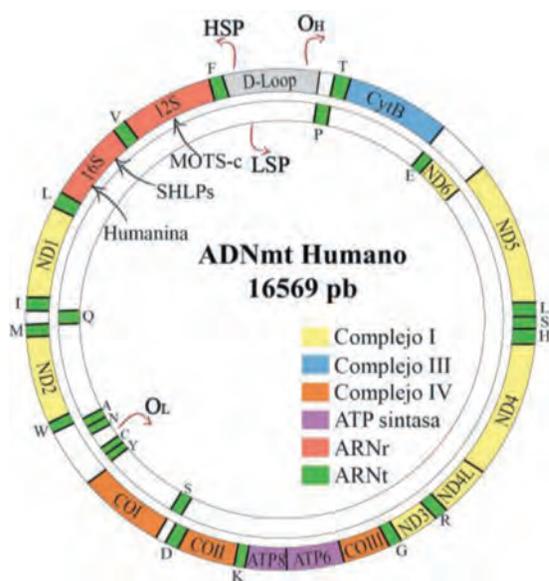


Figura 3. Representación esquemática del genoma mitocondrial humano. ADN de doble cadena (llamadas pesada y ligera) con una capacidad codificante pequeña pero esencial para la célula: 13 genes que codifican proteínas de los complejos I, III, IV y V de la cadena respiratoria, dos genes que codifican los RNA ribosómicos 12 y 16S y 22 genes que codifican tRNAs. Los 37 genes están representados con diferentes colores según indica la leyenda. Se indica el origen de replicación y la dirección de síntesis de la cadena pesada (OH) y de la cadena ligera (OL), así como los promotores a partir de los cuales se inicia la transcripción.

El genoma mitocondrial humano es una doble hebra de ADN de 16.559 nucleótidos que codifica 37 genes, de los que únicamente 13 contienen información para sintetizar proteínas. Sorprendentemente, todas ellas son proteínas que forman parte de los complejos de la cadena respiratoria: siete del complejo I, una del complejo III, tres del complejo IV y dos del complejo V (Fig. 3). Es decir, de los miles de genes que codificaban proteínas presumiblemente contenidos en el genoma original de la proteobacteria precursora de la mitocondria, actualmente sólo han

permanecido 13, y todos ellos son esenciales para construir la cadena respiratoria y, por tanto, todos ellos son esenciales para la vida de la célula. Es decir, ¡¡la mitocondria ha guardado con celo en su interior durante la evolución, la información para poder controlar el suministro de energía de la célula!! Pero para ello necesita al genoma nuclear, ya que no solo el resto de las proteínas del respirasoma están codificadas en el núcleo, sino también el resto de las proteínas que forman parte de la mitocondria, incluidos todos los factores necesarios para replicar y expresar el propio genoma mitocondrial. La función de la mitocondria depende por tanto del diálogo y la comunicación continua entre los dos genomas diferentes que contienen nuestras células.

El genoma mitocondrial guardaba una segunda sorpresa. El científico francés Jacques Monod afirmó en su libro "*El azar y la necesidad*" que el código genético era universal "*todo lo que se constata como veraz para Escherichia coli, también debe ser cierto para el elefante*", afirmaba. La secuenciación del genoma mitocondrial humano demostró, sin embargo, que utiliza un código genético diferente, un lenguaje diferente, algo que nadie esperaba. El llegar a esta conclusión fue una de las historias más interesantes, auténticamente detectivesca, de la biología moderna, en la que ahora no puedo detenerme. Surgieron numerosas preguntas, ¿se trataba de algo específico del genoma mitocondrial humano? ¿Qué sucedía en otros organismos? ¿Cuándo se había producido el cambio en el código genético?

Me incorporé al grupo de Fred Sanger en 1982, en una época en la que secuenciar ADN era todavía un arte y en la atmósfera del LBM se respiraba lo que Severo Ochoa ha denominado la "*emoción de descubrir*". Mi proyecto consistió en secuenciar el genoma mitocondrial de un organismo que había sido fundamental en el desarrollo de la genética moderna, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. A mi regreso a España también conseguí obtener la secuencia completa del genoma mitocondrial de otro invertebrado que utilizó Severo Ochoa en sus estudios de síntesis de proteínas y había sido introducido en nuestro país por varios de sus discípulos, el crustáceo *Artemia salina*. La obtención de estas secuencias demostró que ambos genomas contienen los mismos genes que el genoma mitocondrial humano, aunque están organizados de forma diferente.

El código genético que utilizan es diferente al universal, pero también diferente al utilizado por el genoma mitocondrial humano, lo que demostraba que los cambios se habían producido varias veces a lo largo de la evolución. La comparación de las secuencias obtenidas demostraba que se acumulaban mutaciones a una velocidad diez veces superior a la del genoma nuclear, lo que indicaba que se trataba de un ADN poco protegido y que podía admitir numerosos cambios.

Otra característica notable del genoma mitocondrial es que se hereda exclusivamente de las madres, ya que las mitocondrias paternas que se incorporan al oocito en el proceso de fertilización son destruidas, otro misterio biológico aún sin resolver. Durante los años 80 se obtuvieron numerosas secuencias de genomas de diferentes organismos, y se secuenciaron fragmentos idénticos de numerosos individuos pertenecientes a grupos étnicos diferentes para comprobar su grado de variación. La idea era utilizar el genoma mitocondrial como un reloj molecular, ya que al ser su herencia materna y acumular cambios con relativa velocidad, se puede estudiar con facilidad la relación que tienen las diferentes moléculas entre sí, determinando su ancestro común.

En 1987 el científico norteamericano Allan Wilson y sus colaboradores de la universidad de Berkeley, pudieron seguir la línea genealógica del genoma mitocondrial y concluir que el ancestro original de los genomas que existen en la población actual procede de África, hace aproximadamente 100.000 años, lo que rápidamente se denominó la hipótesis de la Eva mitocondrial. Unos meses después Wilson dio una conferencia en la Facultad de Medicina de la UAM que me causó una fuerte impresión, y en la que en lugar de Eva prefería utilizar el término de "one lucky mother". Su trabajo abrió las puertas para realizar numerosos estudios en los que se han podido determinar con precisión los flujos migratorios de la especie humana y la distribución en las diferentes partes del mundo de los tipos de genomas mitocondriales existentes en la actualidad, que se pueden agrupar en los denominados haplogrupos (Fig. 4). Siguiendo una lógica similar en nuestro grupo estudiamos la relación de las secuencias mitocondriales de *Artemias* recibidas de diferentes partes del mundo, estableciendo las relaciones entre ellas y proponiendo un árbol de especiación, que hasta donde conozco, es el que se admite en la actualidad.

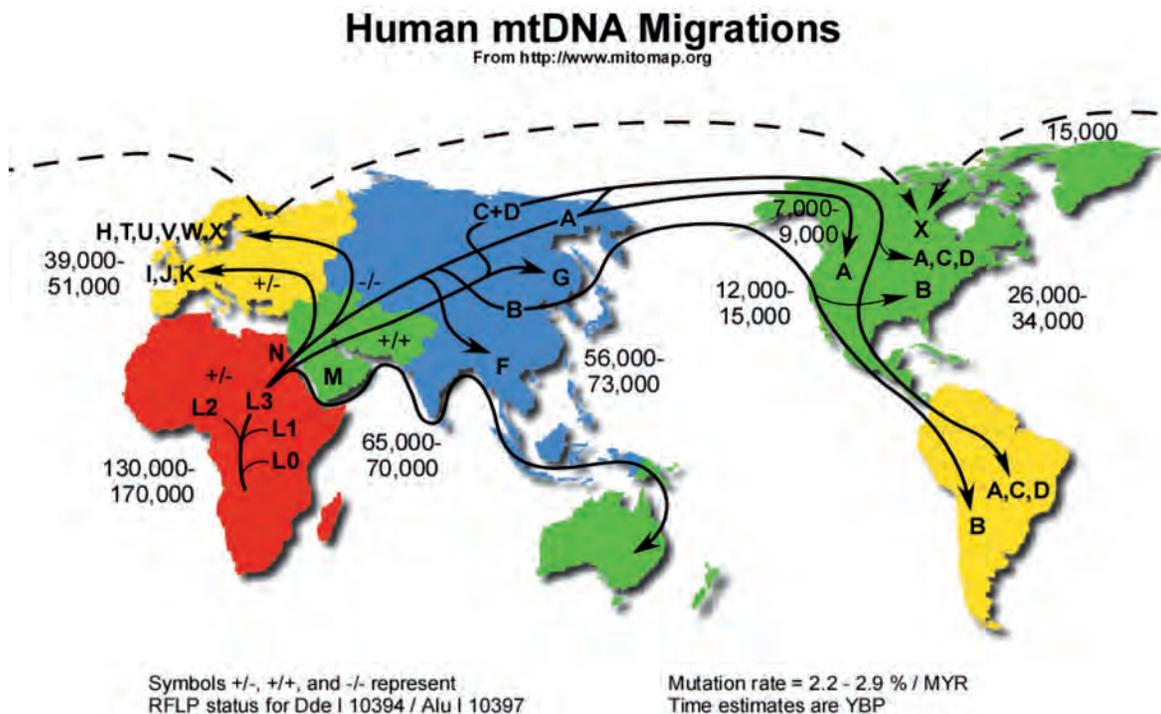


Figura 4. ADN mitocondrial en la adaptación y evolución humana.

LA COMUNICACIÓN ENTRE NÚCLEO Y MITOCONDRIA

Para poder mantener el genoma mitocondrial la célula utiliza una enorme cantidad de recursos. En el núcleo se encuentra la información para sintetizar todos los enzimas y factores necesarios para su replicación y expresión de un modo regulado. Por tanto, deben sintetizarse en el citoplasma e importarse a la mitocondria. Se trata de centenares de proteínas diferentes. Toda esta fantástica maquinaria encargada de mantener la función de la pequeña molécula de ADN mitocondrial era completamente desconocida en los años 80 y aún hoy en día contiene muchos elementos por descubrir. Cuando finalicé la secuenciación del genoma mitocondrial de *Drosophila*, el grupo de la Dra. Laurie Kaguni en la universidad de Michigan había logrado purificar el enzima que se encarga de su replicación, es decir de sintetizar las copias idénticas que se transmitirán generación tras generación, la DNA polimerasa γ . Le escribí proponiéndole una colaboración cuyo objetivo era clonar el gen que codificaba este enzima, ya que contiene una parte importante de la clave de la comunicación núcleo-mitocondrial. En más de veinte años de trabajo conjunto hemos logrado identificar y clonar los genes que codifican sus dos subunidades, estudiar su expresión, producir y caracterizar numerosos mutantes en sus sitios funcionales y generar líneas transgénicas en *Drosophila* que sintetizan variantes genéticas del enzima.

Uno de los hallazgos en mi opinión más interesantes que encontramos es que en *Drosophila*, los genes de las dos subunidades que forman el enzima se encuentran codificados en la misma región cromosómica, dentro de un complejo con una alta densidad génica que denominamos el complejo γ -pol. El resto de los genes del complejo codificaban también proteínas mitocondriales o relacionadas con la función mitocondrial, y sorprendentemente, algunos eran bicistrones, es decir, genes que codificaban no una, sino dos proteínas. Se trataba de una organización similar a la que se encuentra frecuentemente en los genomas bacterianos, o incluso en virus, pero excepcional en eucariotas, es decir, se trataba de una huella de la transferencia de los genes originalmente presentes en el genoma de la proteobacteria precursora de la mitocondria al núcleo. Algunos de los genes codificados en

los bicistrones eran de función desconocida, pero estaban perfectamente conservados en el genoma humano. Utilizando diversas metodologías hemos podido identificar la función de varios de ellos en células humanas a lo largo de los últimos años, estando todos implicados en la comunicación núcleo-mitocondrial y en la regulación de la biogénesis del respirasoma.

Un segundo hallazgo interesante lo encontramos estudiando moscas transgénicas en las que habíamos logrado reducir el número de moléculas de ADN mitocondrial en tejidos específicos, particularmente, en músculo y sistema nervioso. Se producía una alteración funcional en ambos tejidos, y cuando estudiamos la causa nos encontramos con la sorpresa de que era debido, no a un fallo energético, sino a un importante aumento de la apoptosis. Las células con menor contenido de ADN mitocondrial inducían su suicidio, quizás tratando de preservar la funcionalidad del tejido. Estos resultados ilustran la cuidada y constante comunicación entre el núcleo y la mitocondria para mantener la homeostasis celular y tisular.

LAS ENFERMEDADES MITOCONDRIALES: UN PROBLEMA DE DOS GENOMAS DIFERENTES

Una mañana de 1988 me encontraba en mi laboratorio del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UAM preparando uno de los geles de poliacrilamida que se utilizaban en aquellos años para secuenciar ADN, cuando el Dr. Alberto Sols, entonces director del Departamento y siempre científico apasionado, entró corriendo mientras agitaba una revista que llevaba en la mano y gritando "Rafa, acaban de publicar en *Nature* un trabajo que demuestra que alteraciones en el genoma mitocondrial provocan miopatías muy graves", ¡¡tienes que leerlo y ponerte a trabajar en este campo!! El primer firmante de este artículo era Ian Holt, un joven predoctoral del laboratorio de Morgan-Hughes en Londres. En pocos meses aparecieron dos trabajos más, que demostraban que mutaciones mitocondriales eran responsables del síndrome de Leber y del síndrome de Kearns-Sayre, dos alteraciones conocidas clínicamente, pero de etiología desconocida hasta el momento. Uno de los autores de los trabajos era Massimo Zeviani

un científico italiano que actualmente es el director de la Mitochondrial Biology Unit en Cambridge, un laboratorio de referencia a nivel mundial.

Unos años más tarde, en 1992, se celebró en Madrid el 5º congreso de la Sociedad Internacional de Biología Celular, y me invitaron junto al profesor Howy Jacobs, también mitocondriólogo, y en aquellos momentos fellow de la Royal Society en el Instituto de Genética de Glasgow, a organizar un workshop sobre lo que se conocía en aquel momento de la regulación de la biogénesis mitocondrial. Durante aquellos días tuvimos la oportunidad de discutir sobre el interés del reciente campo de la patología mitocondrial y decidimos organizar una reunión con científicos europeos para solicitar un proyecto y comenzar a trabajar en el tema. Unos meses después nos reunimos durante varios días en La Cristalera, una residencia de la Universidad Autónoma de Madrid situada en Miraflores de la Sierra. A la reunión acudieron entre otros científicos Ian Holt, Massimo Zeviani, Mino Cantatore y Coby Van der Boguen. El resultado fue el desarrollo de varios proyectos colaborativos y la organización de una red europea de investigación en las enfermedades mitocondriales que funcionó durante más de diez años y que aún continúa promoviendo actividades científicas. En mi opinión, la patología mitocondrial es una de las áreas donde investigadores europeos han ejercido un importante liderazgo a nivel mundial y he tenido la inmensa fortuna de conocer y entablar una buena amistad con la mayoría de ellos.

Las enfermedades mitocondriales constituyen un amplio grupo de enfermedades genéticas cuyo nexo de unión es una disfunción de la cadena respiratoria, la extraordinaria máquina molecular localizada en la membrana interna de las mitocondrias. Son enfermedades genéticas muy particulares, ya que la biogénesis de la cadena respiratoria es el único proceso en la célula que requiere la expresión coordinada, es decir, el diálogo de dos genomas localizados en compartimentos celulares física y genéticamente separados, el mitocondrial y el nuclear. Las enfermedades mitocondriales pueden por tanto estar causadas por mutaciones en genes codificados en el genoma mitocondrial o en genes codificados en el genoma nuclear. La frecuencia de portadores de mutaciones en el mtDNA es alrededor de

1:200 y en conjunto la prevalencia de las EM es de 1:5.000. En general son enfermedades multisistémicas, aunque suelen afectar preferentemente a los tejidos con una alta demanda energética como cerebro, músculo esquelético, corazón y sistema endocrino. Sin embargo, cualquier órgano puede estar afectado y los defectos mitocondriales pueden provocar también manifestaciones clínicas únicas como ceguera, sordera neurosensorial o disfunción renal.

Actualmente, se han identificado un elevado número de mutaciones en el mtDNA, que incluyen reorganizaciones del genoma y más de 150 mutaciones puntuales, que lógicamente se heredan exclusivamente por vía materna. También se han identificado mutaciones en un elevado número de genes que se encuentran codificados en el núcleo y su herencia es por tanto mendeliana. Los genes afectados codifican proteínas que participan en muy variados procesos relacionados con el mantenimiento y regulación del genoma mitocondrial y con la biogénesis de la cadena respiratoria. Las enfermedades mitocondriales normalmente cursan con un deterioro progresivo, lo que provoca discapacidad y en algunos casos muerte prematura, frecuentemente debida a defectos en la conducción cardíaca o a la presencia de convulsiones. Su presentación clínica es muy variable en relación a la edad de inicio, los síntomas, la gravedad y el pronóstico, que unido a su herencia materna o mendeliana, hace que las EM sean muy difíciles de diagnosticar y de tratar.

Un par de ejemplos pueden ilustrar la complejidad de este tipo de patología. En nuestro laboratorio hemos identificado y caracterizado durante los últimos veinte años varias mutaciones asociadas a enfermedades mitocondriales, utilizando una ingeniosa metodología desarrollada inicialmente por el grupo de Giuseppe Attardi en el Instituto Tecnológico de California, la generación de híbridos transmitocondriales. Consiste en fusionar células del paciente (plaquetas o fibroblastos a los que se ha eliminado el núcleo) con células provenientes de un osteosarcoma humano que las que se ha eliminado su genoma mitocondrial. De este modo se generan líneas celulares híbridas, con un núcleo común (el del osteosarcoma) y las mitocondrias del paciente. Estas líneas celulares permiten realizar estudios

funcionales detallados para caracterizar la patogenicidad y estudiar los efectos que provocan las diferentes mutaciones. Utilizando esta metodología hemos podido demostrar que mutaciones que estaban descritas en la literatura asociadas a enfermedades mitocondriales eran variantes genéticas no patogénicas y, al contrario, que mutaciones que estaban descritas como variantes genéticas funcionales producían severas alteraciones en el funcionamiento de la cadena respiratoria.

El segundo ejemplo es un estudio que realizamos con células de pacientes que sufrían una neuropatía óptica no sindrómica debida a mutaciones en el gen OPA-1, que codifica una proteína que interviene en la dinámica mitocondrial. En muchos pacientes aparecían miopatías que eran difíciles de explicar. De un modo completamente inesperado, encontramos que mutaciones en este gen provocan fallos en la estabilidad del genoma mitocondrial, donde teóricamente esta proteína no ejercía ninguna función. Gracias a este trabajo se pudo demostrar que OPA-1, además de participar en la dinámica mitocondrial, es importante para la estabilidad del mtDNA y en su ausencia se acumulan genomas a los que le faltan fragmentos enteros. De ese modo se afecta la funcionalidad de la cadena respiratoria, y se puede explicar la aparición de miopatías. Tuvimos la suerte de que Massimo Zeviani escribiera una bonita editorial en la revista *Brain* para resaltar la importancia de este hallazgo.

Un problema recurrente en el estudio de las enfermedades mitocondriales es la falta de modelos animales y celulares adecuados para su estudio. Los tejidos dianas de estas enfermedades son músculo y sistema nervioso, pero obviamente no son accesibles para la investigación, por lo que es necesario utilizar fibroblastos obtenidos de una biopsia de piel. Por otro lado, las terapias actuales de las EM se centran fundamentalmente en tratar de aliviar los síntomas, la mayor parte de las veces sin éxito. Por ello, existe una necesidad apremiante de desarrollar nuevas aproximaciones de estudio y terapéuticas.

Durante mi estancia en el Laboratorio de Biología Molecular del MRC conocí a un científico británico enormemente brillante, John Gurdon. Había realizado a principio de los años 60 un experimento notable. Inyectó el núcleo

obtenido de células epiteliales de renacuajo en un oocito de rana al que le había eliminado el DNA. El resultado fue asombroso para la época, ya que el oocito se desarrollaba con normalidad y crecían renacuajos que llegaban a ranas adultas. Increíblemente, el ADN de la célula intestinal se había reprogramado y recuperado la posibilidad de generar un organismo completo. Cuarenta y cinco años más tarde, el médico japonés Shinya Yamanaka consiguió reprogramar fibroblastos obtenidos de piel humana a células madres, que se denominan células madre pluripotentes inducidas (iPSCs). Mediante diferentes tratamientos fáciles de realizar en el laboratorio, y estas células se pueden diferenciar a los diferentes tejidos del organismo adulto.

La posibilidad de reprogramar fibroblastos de pacientes a iPSCs y de estudiar el fenotipo molecular que provocan en las células diferenciadas, particularmente músculo y tejido nervioso, resulta de enorme utilidad, no sólo para el estudio de la enfermedad en su tejido diana, sino también para su utilización como plataforma para la identificación de nuevos fármacos y, potencialmente, para su uso en terapia celular. En el momento presente, aunque la medicina regenerativa ya se está empezando a implementar para algunas patologías, todavía no se ha podido aplicar en el campo de las EM. En nuestro laboratorio hemos puesto a punto esta metodología y generado iPSCs a partir de fibroblastos de pacientes que tienen mutaciones en diferentes genes, tanto en el genoma mitocondrial, como en el nuclear. Actualmente estamos caracterizando sus efectos en células nerviosas, cardíacas y musculares.

UN PASO MÁS: MITOCONDRIA Y ENFERMEDADES PREVALENTES

Aunque las enfermedades mitocondriales son individualmente raras, en su conjunto agrupan a una amplia variedad de trastornos genéticos y, hoy en día, se sabe que las alteraciones de la función mitocondrial están implicadas en el mecanismo patogénico de enfermedades prevalentes asociadas al envejecimiento, entre las que se incluyen diversas enfermedades neurodegenerativas, diabetes, enfermedades cardiovasculares y cáncer. Un buen ejemplo es la implicación de la mitocondria en el cáncer.

En 1927 el fisiólogo alemán Otto Warburg publicó una curiosa observación, que se conoce como efecto Warburg. Las células tumorales utilizan fundamentalmente la vía glicolítica para obtener energía, y no la fosforilación oxidativa de la mitocondria, es decir, la cadena respiratoria, a pesar de crecer en presencia de oxígeno. En lugar de obtener la energía por oxidación, lo hacen por fermentación. Con la llegada de la genética molecular y la identificación de los oncogenes y los genes supresores de tumores, esta observación quedó en el olvido y la investigación en el área del cáncer se centró fundamentalmente en las rutas de transducción de señales y en las vías de regulación del ciclo celular. Pero el efecto Warburg era una realidad a la que era necesario buscar una explicación, ya que es una de las características imprescindibles para que una célula se convierta en tumoral. Ello es probablemente debido a que un crecimiento celular rápido, característico del crecimiento tumoral, necesita un continuo aporte de metabolitos que solo puede suministrar la glucólisis. En definitiva, la mitocondria es silenciada por las células tumorales, y por tanto encontrar la vía de reactivar su funcionamiento se ha convertido en una interesante línea de investigación en el desarrollo de terapias antitumorales.

Pero ¿cómo pasa un tumor de un metabolismo oxidativo (mitocondrias activas) a un metabolismo glicolítico (mitocondrias inactivas) en presencia de oxígeno? La secuenciación masiva de ADN mitocondrial extraído de tejido tumoral, comparado con el extraído de tejido sano, reveló que en las células cancerosas se acumula un gran número de mutaciones en el genoma mitocondrial, pero muy variadas y algunas de ellas en regiones que teóricamente no provocaban cambios funcionales. ¿Qué está sucediendo a medida que el tumor crece? Eran resultados muy difíciles de interpretar.

En nuestro laboratorio hemos intentado responder a esta pregunta utilizando la amplia colección de híbridos transmitocondriales que habíamos generado en los últimos años. Inyectamos en la piel desnuda de ratones inmunodeprimidos células híbridas que contenían versiones del genoma mitocondrial funcionales, con mutaciones poco patogénicas, es decir que provocaban cambios moderados en la actividad de la cadena respiratoria, y con

mutaciones muy patogénicas, que eliminaban la función de la cadena respiratoria. El resultado fue sorprendente. Únicamente las células que tienen una función mitocondrial moderada inducen tumores, mientras las que tienen mitocondrias normales o mitocondrias gravemente afectadas no son tumorigénicas. Es decir, las células tumorales necesitan para crecer una actividad mitocondrial moderada y ello se logra, al menos en parte, acumulando mutaciones poco patogénicas en su genoma. Es exactamente lo que se encuentra en biopsias de pacientes. Durante las primeras fases del crecimiento tumoral se van seleccionando moléculas de ADN mitocondrial con mutaciones que disminuyen la actividad mitocondrial, pero que no la suprimen completamente. Es decir, genomas mitocondriales que ayudan a realizar una transición de un metabolismo oxidativo a uno glicolítico.

CONCLUSIONES

Hace 2.000 millones de años una célula primitiva invadió a otra y entre ellas se estableció una buena relación mutua. La célula huésped fue la precursora de las células eucarióticas que forman la unidad funcional de todos los seres vivos. La célula invasora, la pre-mitocondria, fue transfiriendo su información genética al genoma de la célula huésped haciéndose cada vez más dependiente de ella, pero conservó una joya en su interior, un pequeño fragmento de ADN, el genoma mitocondrial. Su secuencia fue obtenida en 1981, y durante los más de 35 años transcurridos desde entonces, cientos de científicos han escrito mediante sus ingeniosos experimentos fascinantes historias que han puesto en evidencia la perfecta comunicación que existe entre el genoma mitocondrial y el genoma nuclear. Gracias a este diálogo continuo la mitocondria ha ido adquiriendo una función central en la regulación de numerosos procesos celulares, que incluye la producción de energía en la cadena respiratoria. No es de extrañar que fallos en esta comunicación y en estos procesos originen graves enfermedades de una importante complejidad. Incluso hoy en día se admite que la mitocondria está implicada de un modo directo o indirecto en la mayoría de las enfermedades humanas, incluyendo el cáncer.

Aunque aún quedan muchas proteínas mitocondriales por identificar y caracterizar

su función, muchas pequeñas y bonitas historias por escribir, en los últimos años se han producido avances significativos que nos permiten mirar hacia el futuro con optimismo en la comprensión de esta vieja amistad entre núcleo y mitocondria. Ello nos

ayudará a comprender mejor nuestras células y a desarrollar estrategias terapéuticas para el tratamiento de este importante grupo de enfermedades.

Muchas gracias por su atención.