

LA EXPRESIÓN ALOTÓPICA: ¿TAREA IMPOSIBLE O ESTRATEGIA FACTIBLE PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES MITOCONDRIALES?

Francisco J. Figueroa-Martínez y Diego González-Halphen

Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo. Postal 70-242, C.P. 04510, Coyoacán, México, D.F. E-mail: dhalphen@ifc.unam.mx

RESUMEN

La expresión alotópica es la relocalización funcional de genes de un compartimento celular a otro. En este trabajo, se refiere a la expresión de genes mitocondriales desde el núcleo o desde un vector citosólico. Se considera que esta estrategia es una de las más prometedoras para desarrollar terapias génicas para el eventual tratamiento de enfermedades ocasionadas por mutaciones en el genoma mitocondrial. Actualmente, existen herramientas para introducir material genético en los cromosomas nucleares, se tiene un conocimiento razonable de los mecanismos de importación de proteínas a la mitocondria y en teoría, una sola copia del gen por célula es suficiente para que se sintetice la proteína necesaria y se distribuya en todas las mitocondrias afectadas. Durante los últimos 20 años se ha intentado la expresión alotópica de diversos genes mitocondriales en levaduras, plantas y células de mamífero, así como en animales con enfermedades mitocondriales. Muchos trabajos publicados en los últimos 10 años apuntaban a que la expresión alotópica era una estrategia exitosa, al grado de que han autorizado los primeros estudios clínicos para tratar mediante terapia génica a pacientes con enfermedades mitocondriales. Sin embargo, también se han reportado evidencias que cuestionan la viabilidad de la expresión alotópica y que proponen nuevos criterios para asegurar que las proteínas expresadas alotópicamente verdaderamente se integraron al complejo mitocondrial al cual pertenecen. En este trabajo, presentamos una breve introducción de lo que es la expresión alotópica, hacemos una revisión de los resultados más relevantes en el campo de la expresión de genes mitocondriales desde el núcleo y discutimos las dificultades que consideramos que hay que sortear antes de proponer terapias génicas para combatir con éxito las enfermedades mitocondriales.

Palabras Clave: Enfermedades mitocondriales, expresión alotópica, fosforilación oxidativa, mitocondria, terapia génica.

ABSTRACT

Allotopic expression refers to the functional relocation of genes from one cellular compartment to another. Here, it refers to the expression of mitochondrial genes either from the nucleus or from a cytosolic vector. It is considered a promising strategy to develop gene therapies against diseases caused by mutations in the mitochondrial genome. Nowadays, it is possible to introduce genetic material into the nuclear chromosomes and there is a good knowledge about the mechanisms of protein import into mitochondria so in principle, a single gene copy per cell would be sufficient to synthesize the necessary proteins and deliver them to all affected mitochondria. In the last 20 years allotopic expression has been tried in yeasts, plants, mammal cells and animals carrying mitochondrial diseases. Many studies published in the last 10 years suggest that allotopic expression is a successful strategy and some clinical trials using this approach are currently being carried out. Nevertheless, there is also a large number of evidence that questions the viability of allotopic expression and that proposes more stringent criteria to make sure that the allotopically-expressed proteins are actually assembled into their corresponding mitochondrial complex. In this work, we first introduce the concept of allotopic expression, then we review the most relevant data in the field and, finally, we discuss the difficulties that must be overcome before attempting gene therapies in patients with mitochondrial diseases.

Key Words: Mitochondrial diseases, allotopic expression, oxidative phosphorylation, mitochondria, gene therapy.

LAS MITOCONDRIAS: SU ORIGEN EVOLUTIVO, SU MATERIAL GENÉTICO Y LAS PROTEÍNAS DE LA FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

Las mitocondrias son organelos presentes en el citosol de la mayoría de los organismos eucariontes; no tienen una morfología definida pero se pueden reconocer fácilmente al microscopio debido a que están delimitadas por dos membranas: una membrana externa y una interna que presenta múltiples invaginaciones, denominadas crestas, en las que se alojan los complejos de la fosforilación oxidativa. El espacio que se encuentra entre las dos membranas se denomina espacio intermembranal y rodeada por la membrana interna se encuentra la matriz mitocondrial, en donde se llevan a cabo muchas reacciones del metabolismo celular. Las mitocondrias están implicadas en la síntesis de los ácidos grasos, la regulación del metabolismo, el control del ciclo celular, el envejecimiento y la muerte celular programada¹. Sin embargo, su función primordial es la producción de energía celular en forma de ATP, a través de la fosforilación oxidativa (Figura 1).

Se piensa que el origen de la mitocondria fue endosimbiótico², es decir, que surgió hace más de 2500 millones de años cuando una alfa-proteobacteria fue engullida por otra célula, estableciéndose una relación simbiótica. Las mitocondrias conservan remanentes de su origen bacteriano, por ejemplo, en la matriz existen varias copias de ADN (ADNmt) cuyo tamaño y contenido génico varía entre las diferentes especies. Sin embargo, la mayoría de los organismos conservan en su ADNmt genes que codifican para los ARN ribosomales, los ARN de transferencia, y para un número variable de proteínas hidrofóbicas que forman parte de los complejos de la fosforilación oxidativa³. Así, como ejemplo, las mitocondrias humanas poseen un ADNmt circular de 16.8 kb que codifica para 13 proteínas que participan en la fosforilación oxidativa: 7 subunidades del complejo I (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 Y ND6), tres subunidades de la citocromo c oxidasa (COX1, COX2, COX3), el citocromo b del

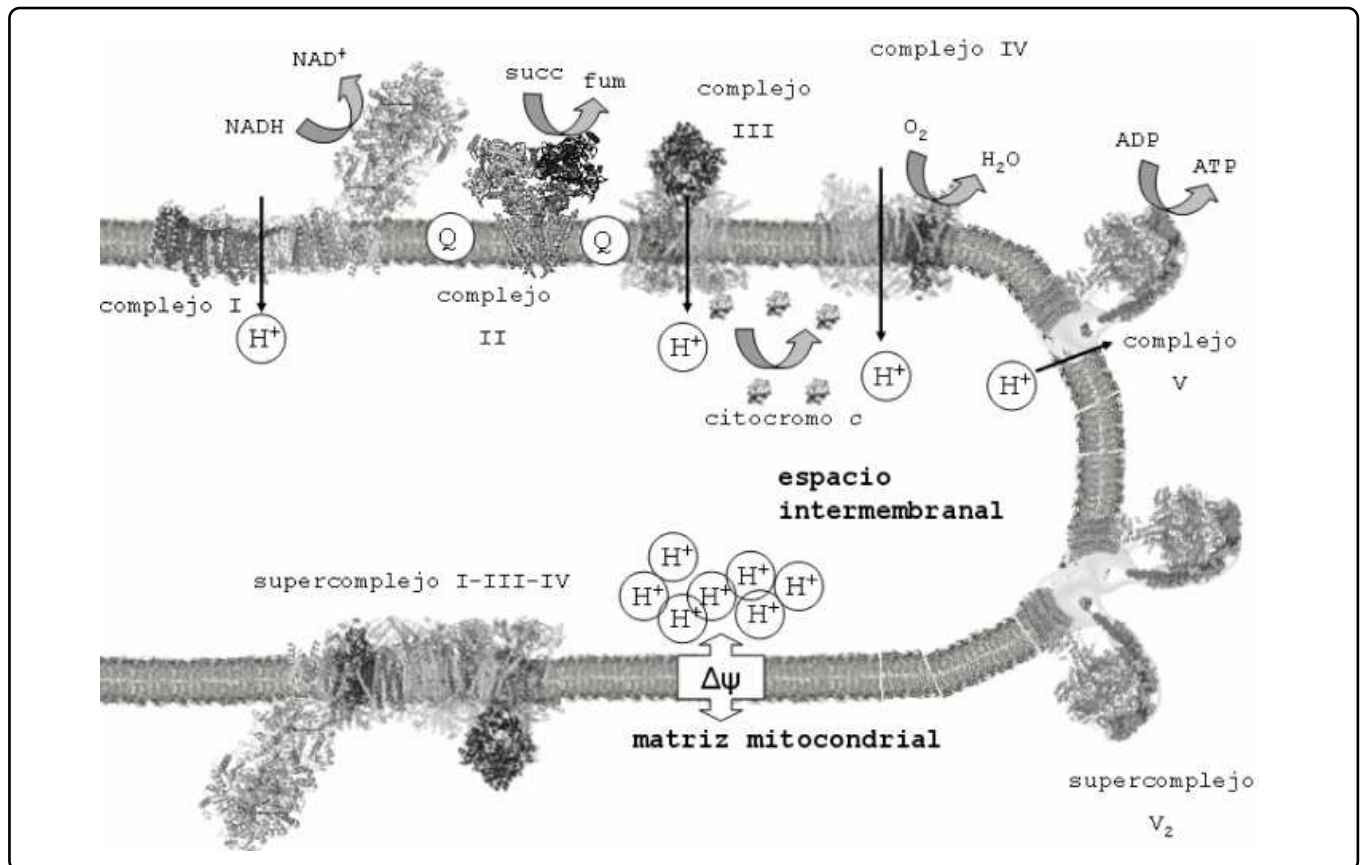


Figura 1. Complejos de la fosforilación oxidativa embebidos en la membrana interna mitocondrial. Se muestran las estructuras tridimensionales de cada complejo obtenidas por cristalografía de rayos X. Complejo I o NADH-ubiquinona óxido-reductasa, complejo II o succinato-ubiquinona óxido-reductasa, complejo III (complejo bc₁) o ubiquinol-citocromo c óxido-reductasa, complejo IV o citocromo c oxidasa, complejo V o ATP sintasa. Los complejos I, III y IV bombean protones hacia el espacio intermembranal generando un gradiente electroquímico ($\Delta\psi$) que es utilizado por la ATP sintasa para generar ATP. Se muestran también algunos supercomplejos, o asociaciones de complejos como el supercomplejo V₂ y el supercomplejo I-III-IV.

complejo III (Cit *b*) y dos subunidades de la ATP sintasa (ATP6 Y ATP8) (Figura 2). El genoma también codifica los ARN necesarios para la traducción de proteínas (los ARN ribosomales 12S y 16S y los 22 ARN de transferencia)^{4,5}. El resto de las más de 1500 proteínas que se pueden encontrar en la mitocondria⁶ son codificadas en el genoma nuclear, sintetizadas en el citosol e importadas al interior de la mitocondria a través de una maquinaria constituida por receptores y translocadores ubicados en las membranas mitocondriales (Figura 3). Así, la mitocondria importa más del 90% de las proteínas que requiere para funcionar, sintetizando por sí misma únicamente una decena de proteínas, que sin embargo, son esenciales para la respiración y la síntesis de ATP.

LAS ENFERMEDADES MITOCONDRIALES

Se han descrito un grupo de enfermedades humanas, denominadas en lo general síndromes mitocondriales, producidas por fallas en el sistema de la fosforilación oxidativa con la consiguiente disminución de la síntesis de ATP. Estas

enfermedades afectan principalmente a órganos y tejidos con una alta demanda energética, como es el cerebro, los músculos y el sistema endocrino. Entre sus manifestaciones clínicas se incluyen debilidad muscular, intolerancia al ejercicio, ceguera, retraso mental, demencia, disfunción renal e incluso se han relacionado con enfermedades metabólicas como la diabetes, la obesidad, enfermedades cardiovasculares y el cáncer¹. Las enfermedades mitocondriales pueden ser causadas por mutaciones en el ADNmt o en el ADN nuclear. Las mutaciones en el genoma nuclear pueden afectar genes que codifican proteínas estructurales de los complejos respiratorios, o a alguno de los múltiples factores de ensamblaje que participan en la biogénesis de la cadena respiratoria⁷. En este trabajo nos enfocaremos en la corrección de enfermedades mitocondriales causadas por mutaciones que ocurren en el ADNmt y que afectan a alguno de los 13 polipéptidos codificados en el ADNmt humano. Hasta la fecha se han reportado más de 150 mutaciones puntuales y varias ablaciones y duplicaciones que involucran regiones relativamente grandes del ADNmt relacionadas con padecimientos en humanos⁸. Estudios epidemiológicos han demostrado que 1 de cada 6000 individuos presenta mutaciones patogénicas en el ADNmt⁹, mientras que otros estudios han detectado mutaciones patogénicas en el ADNmt en sangre obtenida del cordón umbilical en 1 de cada 200 nacimientos¹⁰. Sin embargo, el número de personas afectadas es mucho más bajo debido a una característica fundamental de la genética mitocondrial: cada mitocondria posee múltiples copias de su ADN y cada célula contiene cientos o miles de mitocondrias. La aparición de una enfermedad mitocondrial y la severidad de las manifestaciones clínicas están directamente relacionadas con la proporción de ADN mutante presente en las mitocondrias de un organismo o de un órgano en particular. Cuando en un mismo organismo o célula coexisten copias del ADNmt silvestre con ADNmt mutante se habla de heteroplasmia; mientras que si la población de ADNmt es sólo silvestre o sólo mutante se habla de homoplasmia. En general, para que se manifieste una enfermedad mitocondrial la mutación debe estar presente en al menos el 90% de la población de ADNmt⁷.

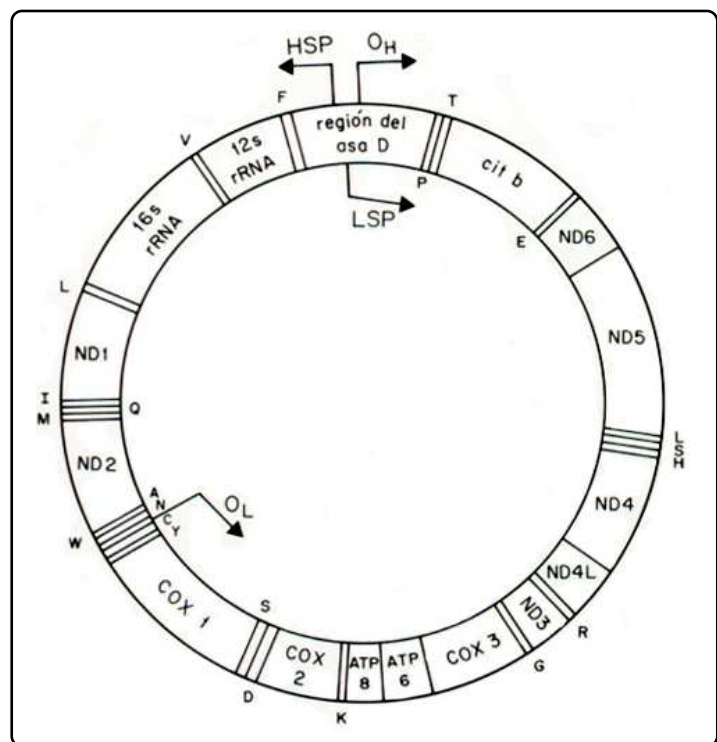


Figura 2. El ADN mitocondrial humano. Se trata de una doble cadena circular de ADN, que codifica para varias subunidades de los complejos de la fosforilación oxidativa. Los genes ND1-4, ND4L, ND5 y ND6 codifican subunidades del complejo I, el gen *cit b* al citocromo *b* del complejo III, los genes COX1-3 a las subunidades 1-3 de la citocromo oxidasa y los genes *atp6* y *atp8* a las subunidades ATP6 y A6L de la ATP sintasa. Además existen genes que codifican a los ARN ribosomales (rARN) 16s y 18s y a los ARN de transferencia para 20 aminoácidos. El asa D es una región altamente variable donde se encuentra un origen de replicación de la cadena pesada O_H y las regiones promotoras HSP y LSP.

MODELOS DE ENFERMEDADES MITOCONDRIALES

Hoy por hoy no existen técnicas que permitan transformar el ADNmt de organismos multicelulares, por lo que no es posible corregir directamente mutaciones en el ADNmt. Sin embargo, en organismos unicelulares, como la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* sí es posible transformar el ADNmt mediante bio-balística, una técnica que permite bombardear las células con partículas de oro o tungsteno recubiertas de ADN¹¹. Como estos organismos no son totalmente dependientes del metabolismo oxidativo para sobrevivir (las levaduras pueden fermentar y las algas realizar la

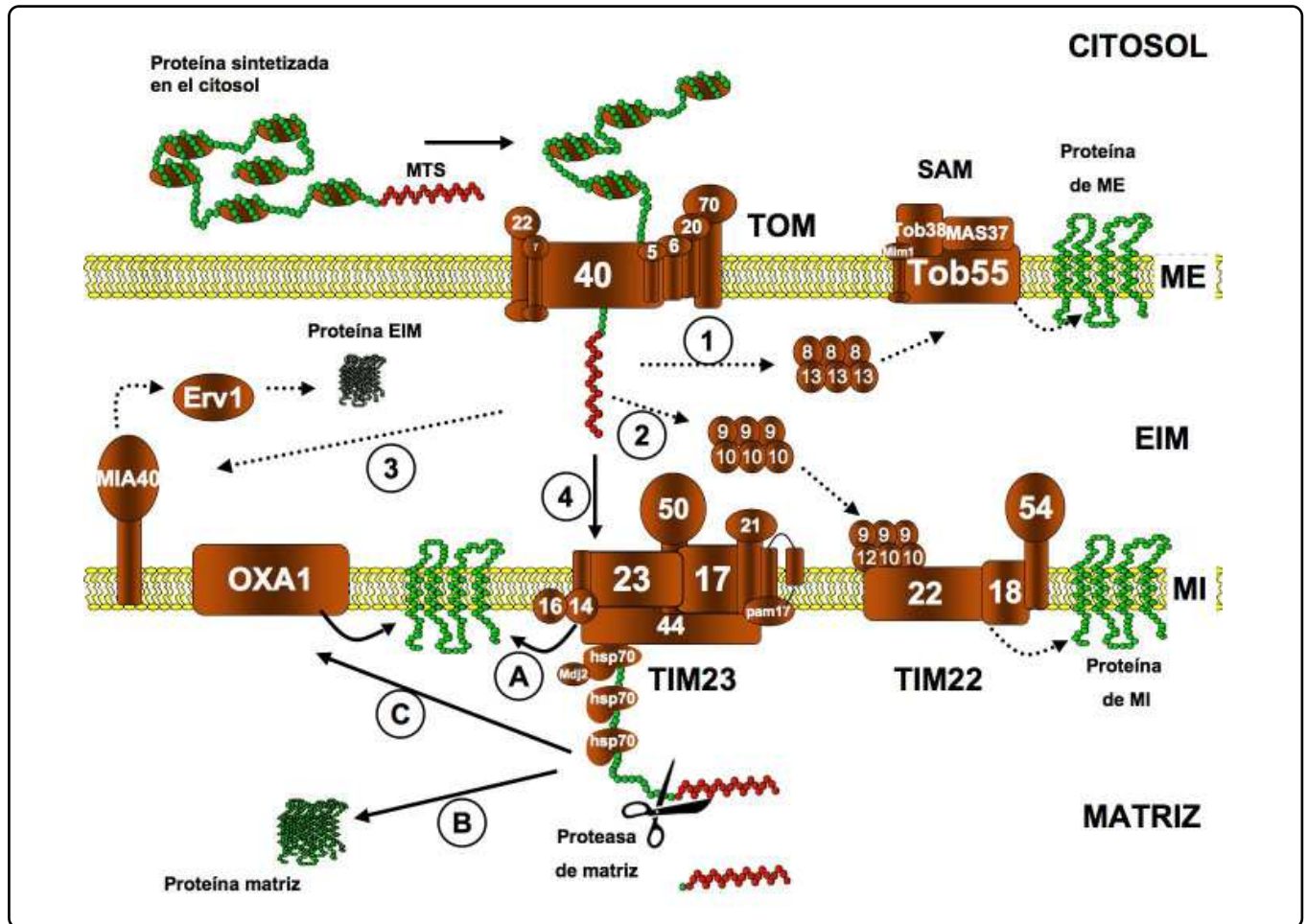


Figura 3. Maquinaria de importación de proteínas en *S. cerevisiae*. Las proteínas sintetizadas en el citosol, unidas a chaperonas citosólicas, son dirigidas hacia el complejo TOM (Translocasa de la Membrana Externa) gracias a la secuencia de direccionamiento a mitocondria o MTS (en rojo). Una vez que las proteínas comienzan a cruzar la membrana externa pueden seguir 4 rutas diferentes: ayudadas por chaperonas pueden interaccionar con el complejo SAM (Sorting and Assembly Machinery) y ser integradas a la membrana externa (1); dirigirse al complejo TIM 22 (Translocasa de Membrana Interna) y ser liberadas de manera lateral en la membrana interna (2); las proteínas que tienen como destino final el espacio intermembranal siguen por la vía de MIA (Mitochondrial Intermembrane Space Import and Assembly) que las asiste en el plegamiento (3); finalmente, la proteína puede dirigirse al complejo TIM23 (4) en donde pueden ser liberadas de manera lateral a la membrana interna (A) o translocadas totalmente con ayuda de las chaperonas mitocondriales (HSP70). Cuando las proteínas alcanzan la matriz, la MTS es eliminada por una proteasa mitocondrial; si la proteína es una proteína soluble adquiere su estructura tridimensional en este punto (B); si se trata de una proteína hidrofóbica, es insertada en la membrana interna mitocondrial a con la ayuda de la proteína OXA (C). La estrategia de la expresión alotópica está basada en la opción 4-C; las proteínas expresadas alotópicamente deben alcanzar la matriz mitocondrial, ser procesadas en la matriz mitocondrial y después integrarse a la membrana interna a través de OXA. EIM, Espacio Intermembranal; ME, Membrana Externa; MI, Membrana Interna.

fotosíntesis) se pueden obtener cepas mutantes que son incapaces de respirar.

Los modelos celulares de enfermedades mitocondriales en vertebrados se denominan híbridos citoplasmáticos o “cíbridos” y fueron desarrollados por King y col.¹². Los cíbridos se obtienen al fusionar dos tipos de células: por una parte células de la piel (fibroblastos) de pacientes con enfermedades mitocondriales, a las cuales se les elimina el núcleo por métodos físicos; por otra

parte células de osteosarcoma a las cuales se les eliminó el ADNmt con bromuro de etidio. El resultado es una célula híbrida con el fondo genético de la célula cancerosa que puede cultivarse indefinidamente (célula immortalizada), pero que contiene las mitocondrias y el ADNmt del paciente. Si se hace una selección cultivando los cíbridos con bromuro de etidio se pueden obtener células homoplásmicas mutantes en un determinado gen. Como las células de los mamíferos dependen del metabolismo oxidativo, es necesario mantener los cíbridos homoplásmicos mutantes en

un medio de cultivo que tenga uridina y piruvato, de lo contrario las células mueren. Los cíbridos homoplásmicos con la mutación T8993G en el gen *atp6* (mutación que cambia la leucina 156 por una arginina) han sido muy utilizados^{13-15, 16-18}. Esta mutación está relacionada con los síndromes de Neuropatía, Ataxia y Retinopatía Pigmentosa (NARP)¹⁹ y con el Síndrome de Leigh de Herencia Materna (MILS)²⁰. Otro cíbrido homoplásmico contiene la mutación G11778A en el gen *nd4* (mutación que sustituye a la arginina 340 por histidina)²¹ asociada con la Neuropatía Óptica Hereditaria de Leber (LHON)²². Existen también cíbridos con la ablación 9480Δ15 que elimina 15 nucleótidos del gen *cox3* (y, por lo tanto, la ablación de 5 aa)²³, mutación asociada con un decremento en la actividad de la citocromo oxidasa²⁴.

Los modelos animales de las enfermedades mitocondriales son escasos y esto ha impedido el desarrollo de tratamientos para ellas. Uno de los modelos más conocidos es un ratón que perdió más de 4500 pb de su genoma mitocondrial, incluyendo varios tARN y 7 genes estructurales. Este ratón es conocido como “mito-mouse” y presenta varios de los síntomas que se presentan en pacientes con enfermedades mitocondriales²⁵. Otro ratón modelo contiene una interrupción en el gen mitocondrial *cox1*, presentando miopatía y cardiomiopatía^{26, 27}. Se han logrado también producir modelos animales de la enfermedad de LHON mediante la inhibición o la anulación del complejo I mitocondrial; para ello se ha recurrido a la administración intraocular de rotenona²⁸ o al uso de ARN interferente que bloquea la síntesis de NDUFA1, una subunidad esencial del complejo I²⁹.

TRATAMIENTOS ACTUALES DE LAS ENFERMEDADES MITOCONDRIALES

Hasta la fecha no hay un tratamiento para las enfermedades mitocondriales, excepto en aquéllos casos raros en los que la mutación en el ADNmt se encuentra solamente en un órgano en particular y es posible llevar a cabo un trasplante. El resto de los tratamientos existentes están dirigidos a mitigar los síntomas, e incluyen el ejercicio físico y el tratamiento farmacológico. El ejercicio físico se utiliza para tratar de mejorar enfermedades con una elevada proporción de ADNmt mutante en el músculo. El tratamiento farmacológico incluye la administración de anticonvulsivantes, fármacos para el control de disfunciones endocrinas, metabolitos y cofactores, como la carnitina y la coenzima Q10. También se administran antioxidantes como la vitamina E para reducir el daño ocasionado por las especies reactivas de oxígeno que se acumulan cuando está afectada la función mitocondrial o compuestos que evitan la acumulación de metabolitos nocivos, como el dicloro-acetato que evita el incremento de ácido láctico^{7,30,31}. En general, se considera que todos estos tratamientos son paliativos, ya que disminuyen los síntomas, pero no curan la enfermedad.

HACIA EL DESARROLLO DE TRATAMIENTOS GENÉTICOS PARA LAS ENFERMEDADES MITOCONDRIALES

La ausencia de tratamientos efectivos para las enfermedades

mitocondriales, han llevado a buscar estrategias de posibles terapias génicas. Entre las alternativas, existen tres opciones principales^{7, 32}:

1. *Inhibición selectiva de la propagación del ADNmt mutante.* Se trata de introducir a la mitocondria enzimas de restricción capaces de reconocer y cortar al ADNmt mutante³³ o introducir moléculas quiméricas de péptidos unidos covalentemente a ácidos nucleicos capaces de introducirse a la mitocondria para hibridar e inhibir la traducción y replicación del ADNmt mutante³⁴. Estas estrategias requieren que la mutación en el ADNmt sea heteroplásmica y que la enzima de restricción o las moléculas inhibidoras sean capaces de discriminar entre el ADNmt silvestre y el ADNmt mutante.
2. *Vectores de expresión mitocondriales.* Teóricamente, esta opción podría utilizarse para corregir cualquier tipo de mutación en el ADNmt sin importar si la mutación es homoplásmica o heteroplásmica. Consistiría en introducir ADNmt recombinante en el organelo, ya sea completo o en fragmentos, que contenga una copia silvestre del gen cuya expresión sea controlada por promotores de genes mitocondriales³². Como se indicó más arriba, a la fecha no es posible transformar mitocondrias *in vivo*. Sin embargo, sí se ha clonado el ADNmt de ratón (de 16.3 kb) en *Escherichia coli*, y se ha demostrado que puede ser incorporado a mitocondrias aisladas de ratón usando técnicas de electroporación³⁵.
3. *Expresión alotópica.* Ante la dificultad de introducir material genético a las mitocondrias y la dificultad de integrar una copia silvestre del gen mutante en cada mitocondria, se ha planteado otra posibilidad: expresar los genes mitocondriales desde el núcleo e introducir en las mitocondrias a la proteína silvestre sintetizada en el citosol (Figura 4), aprovechando la maquinaria de importación mitocondrial³⁶ (Figura 3).

LA EXPRESIÓN ALOTÓPICA Y SU POTENCIAL PARA EL DESARROLLO DE TERAPIAS GÉNICAS

La expresión alotópica se considera una de las opciones más viables para el tratamiento genético de las enfermedades causadas por mutaciones en el ADNmt, ya que posee al menos tres grandes ventajas: hay técnicas establecidas para introducir material genético en el núcleo celular; podría servir para el tratamiento tanto de enfermedades homoplásmicas como heteroplásmicas; y la proteína resultante llegaría a todas las mitocondrias presentes en la célula afectada³².

El gen que se pretende expresar alotópicamente debe ser modificado de tal manera que sea capaz de expresarse desde el núcleo. En primer lugar, se debe tener en cuenta que en los humanos el código genético y el uso de codones mitocondriales son diferentes a los nucleares, por ejemplo, el codón UAG que codifica para triptófano en el código genético mitocondrial es

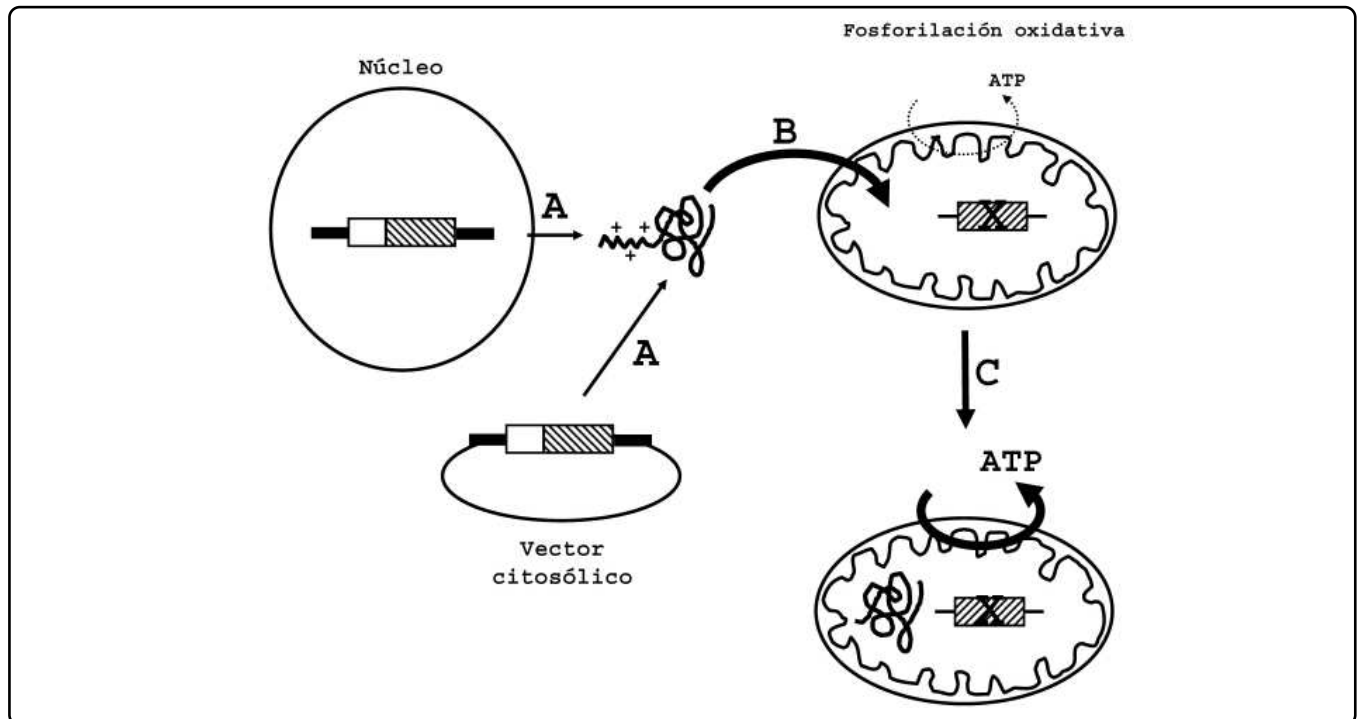


Figura 4. El fundamento de la expresión alotópica. Una mutación en un gen mitocondrial, denotada por una X, trae consigo una deficiencia en la fosforilación oxidativa en la mitocondria. La expresión de la proteína mitocondrial correspondiente, desde el núcleo o desde un vector citosólico (A) seguida de su importación a la mitocondria (B), podría en principio, restaurar el defecto en la fosforilación oxidativa (C). La presecuencia mitocondrial (MTS) se ilustra como una alfa-hélice con cargas positivas.

interpretado como un codón de paro en el código genético nuclear. Por lo tanto, el gen mitocondrial debe recodificarse para que su ARN correspondiente sea traducido correctamente por los ribosomas citosólicos. Después de ser sintetizada, la proteína debe dirigirse hacia la mitocondria e introducirse al organelo. Para ello, es necesario que la proteína alotópica cuente con una secuencia señal en el extremo amino terminal, denominada señal de direccionamiento a la mitocondria (MTS, por sus siglas del inglés Mitochondrial Targeting Sequence), que sea reconocida por la maquinaria de importación mitocondrial. La MTS funciona como un código postal, que asegura el envío de la proteína sintetizada en el citosol a la mitocondria y no a algún otro organelo en la célula. La mayoría de las proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo tienen las MTS de 20 a 40 aminoácidos (aa) que forman una alfa hélice anfipática (una cara de la hélice contiene residuos de aminoácidos hidrofóbicos y la cara opuesta residuos de aminoácidos cargados o hidrofílicos). La MTS es reconocida por el complejo translocador de proteínas ubicado en la membrana externa mitocondrial (conocido por sus siglas como TOM) y después de atravesar las dos membranas mitocondriales es removida por una proteasa específica en la matriz mitocondrial, dando lugar a la proteína madura. Aquellas proteínas que se pretenden expresar alotópicamente requieren que entre la MTS y la proteína madura exista un sitio de reconocimiento de las proteasas mitocondriales. Finalmente, y aunque esto no es una

modificación directa al gen alotópico, se debe considerar incluir los promotores adecuados para el control de la expresión del gen: una expresión muy baja de la proteína podría no ser suficiente para subsanar la deficiencia en la síntesis de ATP y una expresión exagerada podría resultar tóxica para la célula o desencadenar un proceso apoptótico.

LA EXPRESIÓN ALOTÓPICA EN LA LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae*

Banroques fue el primero en lograr una expresión alotópica en levadura. Expresó una madurasa de ARN, una proteína soluble que se encuentra en la matriz mitocondrial y que está codificada en un intrón del gen mitocondrial del citocromo *b*. La madurasa de ARN es una proteína indispensable para el metabolismo oxidativo de la levadura porque está encargada del procesamiento del mARN de la subunidad I de la citocromo *c* oxidasa (COX1). Banroques y colaboradores lograron la expresión citosólica de la madurasa de ARN y su importación a la mitocondria utilizando la MTS de la subunidad ATP9 de la ATP sintasa de *Neurospora crassa*. Cuando la proteína se expresó en cepas de *S. cerevisiae* incapaces de crecer en medios de cultivos oxidativos por contener una ablación en la región del ADNmt que codifica para la madurasa, la proteína citosólica fue capaz de complementar y restaurar el fenotipo silvestre a las levaduras mutantes. De esta manera, se reportó por primera vez una estrategia para compensar

mutaciones en el ADNmt³⁷. Los primeros trabajos de expresión alotópica de proteínas membranales en levadura fueron realizados independientemente por el grupo de Jacq³⁷ y por el grupo de Nagley³⁸ en 1986. Nagley y Devenish acuñaron el término expresión alotópica³⁶ al demostrar experimentalmente que la subunidad ATP8 (o subunidad A6L, una proteína integral de membrana) de la ATPasa fusionada a la MTS de la subunidad ATP9 de *N. crassa* podía expresarse desde el citosol. Así, los autores lograron la complementación del metabolismo aeróbico de una cepa de *S. cerevisiae* que tenía una ablación en el gen *atp8* mitocondrial³⁹. También demostraron, inmunoprecipitando a la ATPasa mitocondrial, que la proteína ATP8 expresada desde el citosol de la levadura se había integrado funcionalmente al complejo⁴⁰. Estos resultados no son triviales si tomamos en cuenta la complejidad del proceso: ATP8 es una proteína integral de membrana (con un cruce transmembranal); para que esta proteína se integre al complejo de la ATP sintasa, primero debe dirigirse hacia la mitocondria, atravesar las dos membranas mitocondriales, plegarse de manera correcta tanto en las regiones transmembranales como en las solubles y adquirir la orientación correcta en la membrana para poder interactuar adecuadamente con el resto de las subunidades de la ATP sintasa. Nagley y colaboradores aportaron evidencia bioquímica y funcional de que la expresión alotópica era factible y con ello abrieron la puerta a la posibilidad de expresar el resto de las proteínas codificadas en el genoma mitocondrial desde el núcleo y sentaron las bases para un eventual tratamiento de las enfermedades mitocondriales.

Los trabajos del grupo de Nagley sirvieron también para comenzar a establecer los requerimientos para que una proteína pueda ser expresada alotópicamente. Mediante mutaciones puntuales en las que eliminan los aminoácidos cargados del extremo carboxilo terminal de la proteína ATP8, determinaron que la hidrofobicidad total de la proteína es quizá el parámetro más importante para permitir o no la importación de proteínas a la mitocondria^{41,42}. De esta manera, se aportó evidencia a la teoría originalmente propuesta por Popot y de Vitry en 1990, quienes propusieron que la hidrofobicidad de una proteína era el factor determinante para poder introducirse a la mitocondria⁴³. El grupo de Nagley mostró también que la subunidad ATP8 expresada alotópicamente se integra al complejo de la ATP sintasa sólo en levaduras donde el gen *atp8* ha sido eliminado o interrumpido, es decir, cuando está completamente inactivado y no hay síntesis de la proteína ATP8 mitocondrial. En cambio, cuando se expresa alotópicamente a la proteína ATP8 en levaduras que aún tienen una copia funcional del gen *atp8* mitocondrial, existe una competencia por el sitio de ensamblaje entre la subunidad ATP8 mitocondrial y la subunidad ATP8 alotópica. En estas condiciones, es la subunidad sintetizada dentro del organelo la que se ensambla preferentemente en la ATP sintasa, mientras que la subunidad alotópica es indetectable en el complejo inmunoprecipitado⁴⁰. Mostraron también que no siempre una expresión alotópica es exitosa. Por ejemplo, al expresar una versión nuclear de la proteína ATP9 de *S. cerevisiae* (usualmente codificada en la

mitocondria) unida a la MTS de ATP9 de *N. crassa*, la proteína se expresa y las mitocondrias de *Saccharomyces* son capaces de importar la proteína, pero ésta no se ensambla en la ATP sintasa ni complementa a levaduras mutantes en el gen *atp9* mitocondrial⁴⁴.

El trabajo de Nagley permitió también conocer la importancia de la naturaleza y la longitud de la MTS en mantener una proteína hidrofóbica en estado “importable”⁴¹: primero mostraron que no todas las MTS que se fusionen a la subunidad ATP8 son capaces de lograr la importación de la proteína en mitocondrias aisladas de levadura³⁸. Establecieron también que la longitud de las MTS puede ser un factor importante, ya que la MTS de la subunidad ATP9 de *N. crassa* duplicada en tándem mejora la eficiencia de importación de la proteína ATP8 y logra la importación *in vitro* de proteínas que no se importaban con una sola copia de la MTS⁴⁵.

En 1995, Claros y colaboradores utilizaron una estrategia ingeniosa para determinar los límites *in vivo* para la importación de proteínas hidrofóbicas en mitocondrias de levadura⁴⁶; diseñaron una serie de proteínas con tres regiones: en el extremo amino terminal, la MTS de la subunidad ATP9 de la ATP sintasa de *N. crassa*; la región central estaba constituida por uno o más segmentos transmembranales del apocitocromo *b* (proteína codificada exclusivamente en el ADNmt) y en la región carboxilo terminal fusionaron la madurasa de ARN. Transformaron un par de cepas de *S. cerevisiae* mutantes en el gen de la madurasa (e incapaces de crecer en medios de cultivo oxidativos) con sus diferentes construcciones y usaron el gen de la madurasa como gen reportero: si las cepas transformadas lograban crecer en medios de cultivo oxidativos, entonces la proteína (con los 7 cruces transmembranales del apocitocromo *b* y la madurasa) había sido translocada completamente hasta la matriz mitocondrial. Así, pudieron encontrar que el apocitocromo *b* no podía ser importado completo a la mitocondria, pero que sí se podía importar cada uno de sus cruces transmembranales por separado, con un límite de entre 3 y 4 cruces transmembranales a la vez. Aparentemente, este límite depende de la MTS que se utilice, de la naturaleza de los segmentos transmembranales y probablemente del organismo en el que se intente la expresión alotópica. Con estos experimentos, Claros y cols. notaron que cuando dos cruces transmembranales se encuentran separados por regiones hidrofílicas cortas, son más difíciles de importar que cuando los cruces están separados por regiones hidrofílicas más largas. Estas observaciones permitieron establecer un método para predecir si una proteína puede o no ser importada, basado en la relación de la hidrofobicidad máxima de un cruce transmembranal (17 aa) con la mesohidrofobicidad, es decir, hidrofobicidad media de una región de la proteína que podría incluir hasta 3 cruces transmembranales (60-80 aa)⁴⁷.

En 2010, Supekova y colaboradores, corroboraron la importancia de la MTS y de la hidrofobicidad media de la proteína que se

desea expresar alotópicamente. Trabajando con el gen mitocondrial *cox2*, que codifica para la subunidad 2 de la citocromo *c* oxidasa y que posee 2 cruces transmembranales, lograron su expresión alotópica en una cepa de levadura que tenía el gen *cox2* mitocondrial interrumpido y que, por lo tanto, era incapaz de crecer en un medio con sustratos respiratorios. La proteína COX2 se fusionó a las MTS de las proteínas OXA1 (42 aa), ATP9 (66 aa) y COX IV (25 aa). En los primeros experimentos, después de transformar levaduras, no pudieron observar una recuperación del fenotipo respiratorio. Al llevar a cabo un ciclo de mutagénesis al azar sobre el gen *cox2* y transformando de nuevo a las levaduras con los genes *cox2* mutantes, lograron que la levadura recuperara entre un 15 y un 30% de la tasa de consumo de oxígeno de la cepa silvestre. Al secuenciar las proteínas mutantes, encontraron que la sustitución de un solo residuo (triptófano 56 por arginina) era suficiente para reducir la hidrofobicidad del primer cruce transmembranal de la proteína COX2 y permitir su importación a la mitocondria. La complementación sólo se logró utilizando las MTS de Oxa1 y de ATP9, pero no con la MTS de COX4⁴⁸, evidenciando la importancia de una adecuada selección de la MTS.

LA EXPRESIÓN ALOTÓPICA EN PLANTAS

También se ha explorado la expresión alotópica de genes mitocondriales en organismos vegetales: en 2002, Daley y colaboradores en soya⁴⁹ y, en 2005, Pineau y colaboradores en *Nicotiana sylvestris*⁵⁰.

El trabajo de Daley subrayó la importancia del tamaño de las MTS y de la hidrofobicidad de la proteína como una de las principales barreras para la transferencia de genes mitocondriales al núcleo, estudiando a la proteína COX2 de soya^{49, 51}. La subunidad 2 de la citocromo *c* oxidasa (COX2) generalmente está codificada en el genoma mitocondrial, sin embargo, en las plantas leguminosas puede estar en el genoma mitocondrial, en el genoma nuclear o incluso en ambos genomas, dependiendo de la especie. En el caso particular de la soya, el gen *cox2* está en el genoma nuclear, mientras que el genoma mitocondrial posee un remanente del gen *cox2* que no se traduce. Daley y cols. encontraron que la proteína COX2 codificada en el núcleo posee una MTS de 136 aminoácidos (mucho más larga que las MTS comunes), la cual se procesa en varias etapas, y que es absolutamente necesaria para la importación de la proteína. Además, sólo las mitocondrias de soya son capaces de procesar esta MTS.

La versión nuclear de la proteína COX2 de soya tiene 25 aminoácidos diferentes con respecto a la versión mitocondrial y algunos de estos residuos disminuyen la hidrofobicidad del primer cruce transmembranal. Daley y colaboradores demostraron que la MTS de la COX2 nuclear de soya era incapaz por sí sola de importar *in vitro* a la versión mitocondrial de COX2, sin embargo, al sustituir dos aminoácidos hidrofóbicos en el primer cruce transmembranal por otros más hidrofílicos, lograron la

importación *in vitro* de la versión mitocondrial de COX2 unida a la MTS de COX2 nuclear.

En 2005, Pineau y colaboradores hicieron uno de los trabajos más sólidos de expresión alotópica utilizando una mutante de la planta de tabaco *Nicotiana sylvestris* que contenía el gen mitocondrial *nd7* interrumpido y que era incapaz de sintetizar la subunidad ND7 del complejo I. La planta mutante no podía ensamblar el complejo I mitocondrial y esto se traducía en un crecimiento pobre y en anomalías en las hojas y flores. El grupo logró la expresión alotópica de la proteína ND7 con la MTS de la formato deshidrogenasa de papa (25 aa + 4 aa de la proteína madura) y observaron que las plantas transfectadas recuperaron el fenotipo silvestre. Pineau y cols. no sólo demostraron que las plantas que expresaban la subunidad ND7 alotópicamente volvían a recuperar la actividad del complejo I, sino que además mostraron de manera inequívoca (mediante electroforesis nativa, inmunoréplicas y espectrometría de masas) que la subunidad ND7 expresada alotópicamente se encontraba integrada al complejo I mitocondrial⁵⁰.

EXPRESIÓN ALOTÓPICA EN CULTIVOS CELULARES (CÉLULAS DE MAMÍFERO)

La expresión alotópica se ha intentado también en varias líneas celulares de mamífero, así como en cíbridos homoplásmicos mutantes en algún gen mitocondrial. En 2003, Tsukihara y colaboradores expresaron alotópicamente a la subunidad I de la citocromo oxidasa (COX1) con el fin de explorar cómo bombea los protones la citocromo oxidasa. La proteína COX1 se fusionó a la MTS de la subunidad COX4 de bovino (de 25 aa) y se expresó en células HELA (células de cáncer cervical de humano)⁵². Aún cuando los autores no purificaron a la COX híbrida debido a lo escaso del material biológico, sus experimentos de inmunoréplicas sugieren que la proteína se expresó alotópicamente en las células y se integró al complejo IV, desplazando a la subunidad COX1 humana sintetizada en el interior del organelo. Además, el complejo IV híbrido tenía actividad de citocromo oxidasa, pero era incapaz de bombear los protones, esto último ocasionado por una mutación que se introdujo en uno de los cruces transmembranales de la COX1 como parte del objetivo del estudio. Los genes que codifican a la COX1 y al citocromo *b* del complejo *bc₁* están invariablemente presentes en los genomas mitocondriales, probablemente por que son las proteínas más hidrofóbicas de los complejos de la fosforilación oxidativa (y por ende, los más difíciles de importar a la mitocondria). Resulta sorprendente que la subunidad COX1, proteína extremadamente hidrofóbica con 11 cruces transmembranales, se haya podido expresar alotópicamente con tanta facilidad.

El grupo de Eric Schon fue el primero en utilizar los cíbridos homoplásmicos con mutaciones en el ADNmt para evaluar la expresión alotópica de genes mitocondriales humanos. En un primer trabajo utilizaron cíbridos homoplásmicos con la mutación T8993G en el gen mitocondrial *atp6*, que codifica a la subunidad

6 de la ATP sintasa¹³. Expresaron alotópicamente una versión nuclear de la subunidad ATP6 mitocondrial silvestre fusionada a la MTS de la subunidad ATP9 y a la MTS de la subunidad COX18 de la citocromo c oxidasa (61 y 25 aa, respectivamente). De acuerdo a sus resultados, la subunidad expresada alotópicamente fue capaz de integrarse en el complejo de la ATP sintasa y de incrementar la capacidad de síntesis de ATP de las células transfectadas. Los mismos autores intentaron corregir la actividad de la ATP sintasa en los mismos cíbridos con un gen *atp6* deficiente mediante la expresión alotópica de la proteína ATP6 del alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*¹⁴ (un organismo en el cual esta proteína es naturalmente expresada desde el genoma nuclear⁵³). La proteína del alga se importó con una mayor eficiencia que la proteína humana y fue capaz de restaurar la capacidad de síntesis de ATP de los cíbridos transfectados. La mayor eficiencia se atribuyó a la presencia de una MTS larga y a una baja hidrofobicidad media de la proteína ATP6 del alga. Este trabajo demostró también que la maquinaria de importación de proteínas de un organismo era capaz de reconocer las MTS presentes en proteínas de un organismo filogenéticamente distante. Cabe señalar que en algunos trabajos, a la estrategia de expresar alotópicamente una proteína que proviene de un organismo diferente se le denomina expresión xenotópica.

En el 2002, el grupo de Guy estudió la expresión alotópica del gen *nd4*, el cual codifica para la subunidad ND4 del complejo I mitocondrial²¹. Utilizaron cíbridos homoplásmicos en la mutación G11778A, la cual resulta en el cambio de la arginina 340 por histidina y que se ha asociado con el 50% de los casos de LHON (Neuropatía Óptica Hereditaria de Leber) en el mundo^{54,55}. Los pacientes con LHON presentan pérdida de la visión en ambos ojos por atrofia del nervio óptico. Los autores construyeron dos diferentes versiones de la proteína ND4 mitocondrial: una fusionada a la MTS (61 aa) de la subunidad ATP9 y con un epítipo FLAG en el extremo carboxilo terminal para su detección con anticuerpos; la otra fusionada a la MTS (19 aa) de la aldehído deshidrogenasa mitocondrial y a la proteína verde fluorescente GFP en el extremo carboxilo terminal. Mediante microscopía confocal mostraron que sólo la versión de la proteína ND4 con la MTS de ATP9 se importó en la mitocondria y le dio la capacidad a los cíbridos mutantes de crecer en medios respiratorios e incrementar su capacidad de sintetizar ATP.

Por su parte, en 2005, Zullo y cols. continuaron con los trabajos de expresión alotópica del gen *atp6* tanto en cíbridos como en células CHO¹⁵. En su trabajo, fusionaron la proteína ATP6 a la MTS de 32 aminoácidos de descarboxilasa de ornitina. Además, utilizaron una versión mutante de ATP6, la cual es resistente al inhibidor oligomicina. Concluyen que la proteína resultante se dirige a la mitocondria, ya que las células CHO transfectadas son capaces de resistir concentraciones de oligomicina hasta 1000 veces por arriba de lo que pueden resistir las células no transfectadas. Transfectaron también cíbridos con la mutación

T8993G (que son modelos de la enfermedad de NARP) y aunque obtienen cierta resistencia de los cíbridos a la oligomicina, la proteína exógena no incrementa la capacidad de crecimiento de los cíbridos transfectados con respecto a los no transfectados y tampoco elimina la dependencia de los cíbridos a la uridina y piruvato. Los autores concluyeron que la expresión alotópica es posible, pero que no lograron la complementación de los cíbridos mutantes porque usaron la proteína ATP6 de hámster y no de humano. Sus resultados sugieren que la proteína alotópica logra desplazar a la subunidad ATP6 endógena por el sitio de ensamblaje, resultado que discrepa del obtenido con la proteína ATP8⁴⁰.

LA IMPORTANCIA DE LOS EXTREMOS 3'UTR

En 2006, el grupo de Corral-Debrinski añadió al diseño experimental una nueva variable para optimizar la expresión alotópica de proteínas hidrofóbicas: propusieron incluir en los genes que se integran al genoma nuclear las regiones 3'UTR de genes que codifican para proteínas mitocondriales, pues se ha descrito que estas regiones no traducidas son importantes para dirigir el mRNA a ribosomas asociados a la membrana externa mitocondrial^{56,57}. Así, la traducción de la proteína cuyo destino es la mitocondria ocurre en la periferia de la membrana externa y la importación se lleva a cabo de manera co-traducciona (las proteínas se van insertando en la mitocondria a medida que se sintetizan). Con ello se evita la agregación de la proteína hidrofóbica en el citosol, reduciendo la posibilidad de que la proteína exógena resulte tóxica para la célula^{16,58}. Los autores construyeron una versión nuclear de ATP6 fusionada con la MTS (30 aa) de la súper-óxido dismutasa mitocondrial (SOD2) y en el extremo 3' añadieron la región 3'UTR del mRNA de la SOD2 (215 pb). Demostraron que el ARN correspondiente se asocia preferentemente a los ribosomas unidos a la membrana externa mitocondrial mediante experimentos de inmunofluorescencia. Concluyeron que la proteína alotópica ATP6 co-localiza con la ATP sintasa y demostraron mediante inmunoréplicas que la proteína ATP6 alotópica se encuentra asociada a la fracción mitocondrial y que su peso molecular corresponde al de la proteína madura (sin MTS). Todo esto los llevó a concluir que la proteína se procesa correctamente y se integra funcionalmente a la ATP sintasa⁵⁸.

Posteriormente, llevaron a cabo la expresión alotópica de ATP6 (utilizando la presecuencia y el 3'UTR de SOD2) en fibroblastos de un paciente con NARP (95% de heteroplasmia mutante) y de la proteína ND4 a la cual añadieron la MTS (21 aa) y la región 3'UTR (1425 nucleótidos) de COX10 en cíbridos homoplásmicos mutantes. De acuerdo a sus resultados, determinaron por inmunofluorescencia que ambas proteínas co-localizaron con la proteína alfa de la ATP sintasa y las células transfectadas eran capaces de crecer en medios de cultivo sin glucosa, por lo que asumieron que habían recuperado la capacidad de sintetizar ATP¹⁶.

LOS MODELOS ANIMALES

Después del aparente éxito en la expresión alotópica en cultivos celulares, se ha intentado probar la misma estrategia en modelos animales. Sin embargo, el ratón conocido como “mito-mouse”²⁵ no es idóneo para llevar a cabo experimentos de expresión alotópica, pues contiene múltiples defectos en la fosforilación oxidativa debidos a la ausencia de una gran parte del genoma mitocondrial. Los modelos murinos de la enfermedad de LHON obtenidos mediante la administración intraocular de rotenona²⁸ o mediante el bloqueo de la expresión de NDUFA1²⁹, subunidad esencial del complejo I, podrían ser utilizados para entender la patogenia de la enfermedad de LHON, pero no como modelos para intentar la expresión alotópica.

Recientemente, se ha utilizado la expresión alotópica como herramienta para producir modelos animales de LHON: Ellouze y colaboradores en la rata⁵⁹, y el grupo de Guy en ratones⁶⁰, lograron producir un fenotipo similar a la neuropatía óptica mediante la expresión alotópica de una versión nuclear del gen *nd4* con la mutación G11778A, la mutación causante del 60% de los casos de LHON⁵⁵. El fenotipo observado incluye pérdida de la visión por atrofia del nervio óptico. De acuerdo a los autores, la pérdida de la visión ocurre por que la subunidad ND4 mutante logra introducirse a la mitocondria y ensamblarse en el complejo I desplazando a la subunidad ND4 que se sintetiza en la mitocondria^{59,60}.

Estos ensayos llevaron a los autores a preguntarse si ocurriría lo mismo *in vivo* si se expresa alotópicamente al gen *nd4* sin la mutación patogénica en el aminoácido 340. Después de la inyección intraocular del gen *nd4* observaron que la proteína ND4 silvestre expresada desde el núcleo no produce ninguno de los síntomas asociados con LHON, por lo que la expresión alotópica del gen *nd4* en el ojo de ratones sanos parece no causar alteraciones⁶¹. Corroboraron mediante microscopía confocal que la proteína ND4 se importa a la mitocondria, ya que su señal co-localizó con Mitotracker (un colorante específico de mitocondria). También, mediante inmuno-localización con partículas oro y microscopía electrónica, concluyeron que la proteína se encontraba dentro de las mitocondrias. Los resultados de este estudio sugirieron que proteína ND4 se integró funcionalmente al complejo I mitocondrial⁶¹. Más aún, mostraron que si primero se provoca la aparición de los síntomas característicos de LHON mediante la expresión alotópica de la versión mutante de ND4 y después se expresa la proteína ND4 silvestre, se puede detener el daño que causa la proteína mutante a las células de retina y al nervio óptico. Estos experimentos condujeron a intentar lo mismo en primates⁶², y dado que parece ser inocua la inyección intraocular de adenovirus que contienen el gen de *nd4* silvestre, el grupo de Guy ha comenzado a realizar estudios clínicos en pacientes con LHON⁶³. Hasta la fecha, han reclutado a 25 pacientes, de los cuales 21 presentan la mutación G11778A. Los pacientes se encuentran en diferentes estadios de la enfermedad, desde los que son asintomáticos y únicamente

portadores de la mutación, hasta pacientes con total pérdida de visión. A todos ellos se les pretende inyectar una carga de adenovirus que contiene una copia silvestre del gen *nd4* en el humor vítreo del ojo afectado⁶³. Este estudio está en proceso y hay que esperar los resultados del mismo. Sin embargo, otros autores opinan que es muy pronto para aventurarse a llevar a cabo la expresión alotópica en humanos y han aportado evidencia que lleva a pensar que aún se requiere más experimentación antes de llevar a cabo estudios clínicos.

En 2003, el grupo de Moraes⁶⁴ emprendió un estudio de expresión alotópica de las proteínas ND4, del apocitocromo b y de versiones truncas de estas dos proteínas utilizando la MTS de la nicotinamida nucleótido transhidrogenasa (NNT, 43 aa), la MTS de COX8 y la MTS de ATP9. Sin embargo, Oca-Cossio y cols. reportaron resultados negativos y completamente opuestos a los de los reportes anteriores^{13,21}: por un lado, mostraron que las diferentes construcciones no eran importadas *in vitro* en mitocondrias aisladas de rata y, por otro lado, mostraron que al ser expresadas en la línea celular COS7 las proteínas alotópicas parecen asociarse a la mitocondria, pero no son importadas ni ensambladas en sus respectivos complejos respiratorios. Oca-Cossio y cols. sugirieron que las proteínas expresadas alotópicamente probablemente son reconocidas por la maquinaria de importación mitocondrial, pero que debido a la alta hidrofobicidad de las proteínas, particularmente en sus primeros 100 aminoácidos, no pueden cruzar las membranas mitocondriales y quedan insertadas de manera parcial en la cara externa de la mitocondria; esto ocasiona un efecto deletéreo en las células e inducen muerte celular por apoptosis⁶⁴.

En 2006, el grupo de Ian Holt¹⁷ se abocó a investigar más a fondo la expresión alotópica de la proteína ATP6 humana, de la ATP6 de *C. reinhardtii* y de otras proteínas ATP6 quiméricas con características de alga y de humano, en cíbridos homoplásmicos con la mutación T8993G en el gen *atp6* mitocondrial. Este grupo también encontró dificultades para lograr la expresión alotópica de sus construcciones, y planteó serias dudas sobre trabajos anteriores, sobre todo porque utilizaron los mismos vectores, construcciones y líneas celulares que se utilizaron en los trabajos previos^{13,14}. Por un lado, lograron la expresión de sus proteínas y encontraron (al igual que trabajos anteriores) que las proteínas expresadas co-localizan con Mitotracker, con una mejor co-localización conforme disminuye la hidrofobicidad media de las proteínas (mejor para la proteína ATP6 de *C. reinhardtii*, después para las quiméricas y finalmente para la humana). Sin embargo, después de aislar mitocondrias de las células transfectadas, y separar los complejos de la fosforilación oxidativa mediante geles azules nativos, encontraron que la proteína alotópica ATP6 no se encontraba asociada a la ATP sintasa como habían descrito previamente¹³, sino que formaba agregados de alto peso molecular¹⁷. El grupo demostró también que el criterio de recuperación de la funcionalidad de la ATP sintasa medido mediante la determinación de las velocidades de síntesis de ATP

también debía ser analizado con más cuidado, pues aunque encontraron ligeros aumentos en la síntesis de ATP de las células transfectadas, también los observaron en células transfectadas con una versión nuclear de la proteína ATP6 mutante (ATP6 Leu156Arg causante de NARP) la cual no debía incrementar la síntesis de ATP, ya que contiene una mutación deletérea. Los autores atribuyeron este incremento a artificios experimentales creados por el método de selección para la obtención de clonas establemente transfectadas: las células transfectadas se sembraron inicialmente en presencia de antibiótico y, posteriormente, en medio de cultivo con galactosa en lugar de glucosa. Es posible que el estrés de la transfección y del método de selección, favorecieron que las células que de manera natural sintetizan más ATP prevalecieran y esto es lo que aparentó un incremento en la síntesis de ATP¹⁷.

En el 2011, nuestro grupo de investigación también se involucró en el tema e intentamos la expresión alotópica de las proteínas ATP6 (subunidad 6 de la ATP sintasa) y COX3 (subunidad 3 de la citocromo c oxidasa) codificadas en el ADNmt en humanos¹⁸. Considerando los resultados anteriores, y asumiendo que la hidrofobicidad de las proteínas constituyen una de las barreras más grandes para la expresión alotópica, decidimos construir proteínas quiméricas usando a las proteínas ATP6 y COX3 del alga verde *C. reinhardtii* como modelo natural de la migración de proteínas mitocondriales al núcleo. En *C. reinhardtii* las proteínas ATP6 y COX3 están naturalmente codificadas en el genoma nuclear^{53,65}. ATP6 y COX3 presentan una hidrofobicidad media menor a la observada para proteínas homólogas en otros organismos y son dirigidas a la mitocondria por medio de una MTS particularmente larga⁶⁶. Por lo tanto, para construir las proteínas quiméricas redujimos la hidrofobicidad media de las proteínas humanas y añadimos las presecuencias de ATP6 y de COX3 del alga en el extremo amino terminal. Expresamos tanto las proteínas quiméricas como la subunidad ATP6 de *C. reinhardtii* en cíbridos homoplásmicos, ya sea mutantes en el gen *atp6* (T8993G)⁶⁷ o en el gen *cox3* (9480A15)²³. Nuestros resultados demostraron que aún cuando las proteínas tenían las MTS de proteínas de un organismo filogenéticamente muy lejano, son reconocidas por la maquinaria de importación de los cíbridos humanos, pues aparentan estar en el interior de las mitocondrias cuando se les analiza mediante inmunofluorescencia indirecta; sin embargo, la expresión de las subunidades ATP6 alotópicas no tuvieron efecto sobre la velocidad de síntesis de ATP y tampoco logramos identificar a las proteínas alotópicas en la ATP sintasa inmuno-precipitada a partir de las mitocondrias de células transfectadas. Todo esto nos llevó a concluir que las proteínas son dirigidas correctamente a la mitocondria, pero no son importadas completamente ni integradas a sus complejos correspondientes, por lo que el hecho de observar co-localización de las proteínas alotópicas con algún marcador mitocondrial no es un criterio suficiente para afirmar que una proteína se importó correctamente en la mitocondria¹⁸.

También en 2011, Perales-Clemente y colaboradores publicaron un estudio cuestionando los resultados de la expresión alotópica⁶⁸. En este caso intentaron la expresión alotópica del gen *nd6* fusionado a la presecuencia de 25 aa de COX8 en una línea celular de ratón que había sido identificada como homoplásmica para una ablación de un nucleótido en la posición 13887 que tiene como consecuencia la síntesis de una proteína trunca que afecta el ensamblaje y la actividad del complejo I mitocondrial. Los autores encontraron que las células que expresaban alotópicamente la subunidad ND6 eran capaces de crecer en medio de cultivo con galactosa, se ensamblaba nuevamente el complejo I y además demostraron la presencia de la proteína ND6 en el complejo. Sin embargo, mediante un ensayo en el cual marcaron radiactivamente las proteínas sintetizadas en la mitocondria, encontraron que la proteína ND6 presente en el complejo había sido sintetizada en el organelo y no correspondía a la proteína expresada alotópicamente. Análisis más cuidadosos mostraron que las células no eran mutantes homoplásmicas y que el estrés de la transfección y de los medios de cultivo selectivos favorecieron la proliferación de ADN mitocondrial silvestre y con ello reestablecieron la síntesis mitocondrial de la proteína ND6 mitocondrial. En lo que respecta a la proteína ND6 expresada alotópicamente, ésta era dirigida a la mitocondria y probablemente interactuaba de alguna manera con la membrana externa del organelo, pero no era importada hasta la matriz mitocondrial ni se ensamblaba con el complejo I.

En conclusión, el tema de la expresión alotópica es y será en los próximos años un tema de debate. En la Tabla I se resumen todos los intentos de expresión alotópica que se han publicado. Si bien se han alcanzado consensos en cuanto a que no todas las presecuencias son capaces de dirigir una determinada proteína a la mitocondria y que la hidrofobicidad de la proteína es crítica para lograr su importación a la mitocondria, aún hay discrepancias respecto a la efectividad y viabilidad de la expresión alotópica. Por un lado, se han obtenido resultados contundentes que apoyan la idea de que la expresión alotópica es posible, pero por el otro existen opiniones contrarias que exponen la posibilidad de que algunos de los resultados positivos pudieran ser falsos positivos. Estas discrepancias aún están siendo evaluadas por varios grupos alrededor del mundo y seguramente en los próximos años la expresión alotópica continuará siendo un tema de debate científico, sobre todo si consideramos que ya se iniciaron los primeros estudios clínicos con pacientes⁶³. En nuestra opinión, para asegurarnos que la expresión alotópica es una estrategia exitosa, será necesario demostrar sin ambigüedades que la proteína alotópica se integró en el complejo de la fosforilación oxidativa al que pertenece.

En el título de esta revisión nos preguntamos si la expresión alotópica es una tarea imposible o una enfoque experimental poderoso para tratar las enfermedades mitocondriales. Consideramos que en la actualidad, existen evidencias experimentales convincentes que nos permiten asegurar que

Proteína	Origen	Presecuencia	MTS	Organismo	Referencia
ATP6	Hámster	Ornitín descarboxilasa	32 aa	Células CHO	Zullo, 2005
ATP6	Hámster	Ornitín descarboxilasa	32 aa	Cíbridos T8993G	Zullo, 2005
ATP8	<i>H. sapiens</i>	COX8	25 aa	Células COS7	Oca-Cosio, 2003
Cit b	<i>H. sapiens</i>	AT9 <i>H. sapiens</i>	61 aa	Células COS7	Oca-Cosio, 2003
Cit b	<i>H. sapiens</i>	COX8	25 aa	Células COS7	Oca-Cosio, 2003
Cit b	<i>H. sapiens</i>	COX8 + ATP9 <i>N. crassa</i>	25 aa + 66aa	Células COS7	Oca-Cosio, 2003
Cit b	<i>H. sapiens</i>	NNT	43 aa	Células COS7	Oca-Cosio, 2003
ND4	<i>H. sapiens</i>	AT9 <i>H. sapiens</i>	61 aa	Células COS7	Oca-Cosio, 2003
ND4	<i>H. sapiens</i>	COX8	25 aa	Células COS7	Oca-Cosio, 2003
ND4	<i>H. sapiens</i>	COX8 + ATP9 <i>H. sapiens</i>	25 aa + 61aa	Células COS7	Oca-Cosio, 2003
ND4	<i>H. sapiens</i>	NNT	43 aa	Células COS7	Oca-Cosio, 2003
ATP6	<i>H. sapiens</i>	SOD mitocondrial	30 aa	Células HeLa	Kaltimbacher, 2006
COX1	<i>H. sapiens</i>	COX4 de bovino	25 aa	Células HeLa	Tsukihara, 2003
COX3	Quimera	COX3 de <i>C. reinhardtii</i>	110 aa	Cíbridos 9480A15	Figueroa-Martínez, 2011
ND4	<i>H. sapiens</i>	ALDh mitocondrial	25 aa	Cíbridos G11778A	Guy, 2002
ND4	<i>H. sapiens</i>	AT9 <i>H. sapiens</i>	61 aa	Cíbridos G11778A	Guy, 2002
ND4	<i>H. sapiens</i>	COX10 <i>H. sapiens</i>	21 aa	Cíbridos G11778A	Bonnet, 2007
ATP6	<i>H. sapiens</i>	ATP9 <i>H. sapiens</i>	61 aa	Cíbridos T8993G	Manfredi, 2002
ATP6	<i>H. sapiens</i>	COX8 <i>H. sapiens</i>	25aa	Cíbridos T8993G	Manfredi, 2002
ATP6	<i>C. reinhardtii</i>	ATP6 de <i>C. reinhardtii</i>	107 aa	Cíbridos T8993G	Ojaimi, 2002
ATP6	Quimera	ATP6 de <i>C. reinhardtii</i>	107 aa	Cíbridos T8993G y 143B	Bokori-Brown, 2006
ATP6	Quimera	ATP6 de <i>C. reinhardtii</i>	107 aa	Cíbridos T8993G y 143B	Figueroa-Martínez, 2011
ATP6	<i>H. sapiens</i>	ATP9 <i>H. sapiens</i>	61 aa	Cíbridos T8993G y 143B	Bokori-Brown, 2006
ATP6	<i>H. sapiens</i>	COX8 <i>H. sapiens</i>	25 aa	Cíbridos T8993G y 143B	Bokori-Brown, 2006
ATP6	<i>C. reinhardtii</i>	ATP6 de <i>C. reinhardtii</i>	107 aa	Cíbridos T8993G y 143B	Bokori-Brown, 2006
ATP6	<i>C. reinhardtii</i>	ATP6 de <i>C. reinhardtii</i>	107 aa	Cíbridos T8993G y 143B	Figueroa-Martínez, 2011
ATP6	<i>H. sapiens</i>	ATP6 de <i>C. reinhardtii</i>	107 aa	Cíbridos T8993G y 143B	Bokori-Brown, 2006
ATP6	<i>H. sapiens</i>	Flavoproteína <i>H. sapiens</i>	44 aa	Cíbridos T8993G y 143B	Bokori-Brown, 2006
ATP6	<i>H. sapiens</i>	ATP6 de <i>C. reinhardtii</i>	107 aa	Cíbridos T8993G y 143B	Bokori-Brown, 2006
ATP6	<i>H. sapiens</i>	SOD mitocondrial	30 aa	Fibroblastos NARP	Bonnet, 2007
ND6-13887	Ratón	COX8 ratón	25 aa	Células de ratón	Perales-Clemente, 2011
ND4-LHON	Rata	COX10 ratón	21 aa	Retina de rata	Ellouze, 2008
ND4	Ratón	AT9 <i>H. sapiens</i>	61 aa	Retina de ratón	Guy, 2009
ND4-LHON	Ratón	AT9 <i>H. sapiens</i>	61 aa	Retina de ratón	Qi, 2007
ATP8	Levadura	ATP9 <i>N. crassa</i>	66 aa	Levadura	Gearing, 1986
COX2	Levadura	ATP9 <i>N. crassa</i>	66 aa	Levadura	Supekova, 2010
COX2	Levadura	COX4 levadura	25 aa	Levadura	Supekova, 2010
COX2	Levadura	OXA1 levadura	42 aa	Levadura	Supekova, 2010
Cit b	Cit b	ATP9 de <i>N. crassa</i>	66 aa	Levadura	Claros, 1995
Madurasa	Levadura	ATP9 de <i>N. crassa</i>	66 aa	Levadura	Banroques, 1986
COX2	Planta	COX2 de soya	136 aa	Soya	Daley, 2002
NAD7	Planta	Formato deshidrogenasa	25 aa	<i>Nicotiana sylvestris</i>	Pineau, 2005

Tabla I. Sistemas de expresión alotópica.

proteínas con uno o dos cruces transmembranales sí pueden expresarse alotópicamente. Sin embargo, para aquellas proteínas con tres o más segmentos hidrofóbicos, hace falta aportar evidencia experimental inequívoca de que se están importando y ensamblando correctamente en la mitocondria. Se trata todavía

de un campo donde hay trabajos con resultados muy prometedores pero donde existen otros tantos con resultados opuestos. El trabajo presente y futuro de varios grupos de investigación interesados en este tema eventualmente resolverán estas contradicciones.

AGRADECIMIENTOS

Diego González-Halphen agradece el apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (donativo 128110) y por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM IN203311-3) para llevar a cabo sus investigaciones. Se reconoce el apoyo técnico de la QBP Miriam Vázquez Acevedo.

REFERENCIAS

- McBride, H.M., Neuspiel, M. & Wasiak, S. Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr Biol* **16**(14), R551-560 (2006).
- Margulis, L. Origin of eukaryotic cell (Yale University Press, New Heaven, Ct, 1970). 371 págs.
- Gray, M.W., Burger, G. & Lang, B.F. Mitochondrial evolution. *Science* **283**(5407), 1476-1481 (1999).
- Anderson, S. *et al.* Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**(5806), 457-465 (1981).
- Andrews, R.M. *et al.* Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet* **23**(2), 147 (1999).
- Calvo, S. *et al.* Systematic identification of human mitochondrial disease genes through integrative genomics. *Nat Genet* **38**(5), 576-582 (2006).
- Wallace, D.C., Fan, W. & Procaccio, V. Mitochondrial energetics and therapeutics. *Annu Rev Pathol* **5**, 297-348 (2010).
- DiMauro, S., Hirano, M., & Schon, E.A. Approaches to the treatment of mitochondrial diseases. *Muscle Nerve* **34**(3), 265-283 (2006).
- Schaefer, A.M. *et al.* Prevalence of mitochondrial DNA disease in adults. *Ann Neurol* **63**(1), 35-39 (2008).
- Elliott, H.R., Samuels, D.C., Eden, J.A., Relton, C.L. & Chinnery, P.F. Pathogenic mitochondrial DNA mutations are common in the general population. *Am J Hum Genet* **83**(2), 254-260 (2008).
- Remacle, C., Cardol, P., Coosemans, N., Gaisne, M. & Bonnefoy, N. High-efficiency biolistic transformation of *Chlamydomonas* mitochondria can be used to insert mutations in complex I genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(12), 4771-4776 (2006).
- King, M.P. & Attardi, G. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* **246**(4929), 500-503 (1989).
- Manfredi, G. *et al.* Rescue of a deficiency in ATP synthesis by transfer of MTATP6, a mitochondrial DNA-encoded gene, to the nucleus. *Nat Genet* **30**(4), 394-399 (2002).
- Ojaimi, J., Pan, J., Santra, S., Snell, W.J. & Schon, E.A. An algal nucleus-encoded subunit of mitochondrial ATP synthase rescues a defect in the analogous human mitochondrial-encoded subunit. *Mol Biol Cell* **13**(11), 3836-3844 (2002).
- Zullo, S.J. *et al.* Stable transformation of CHO Cells and human NARP cybrids confers oligomycin resistance (oli(r)) following transfer of a mitochondrial DNA-encoded oli(r) ATPase6 gene to the nuclear genome: a model system for mtDNA gene therapy. *Rejuvenation Res* **8**(1), 18-28 (2005).
- Bonnet, C. *et al.* Allotopic mRNA localization to the mitochondrial surface rescues respiratory chain defects in fibroblasts harboring mitochondrial DNA mutations affecting complex I or v subunits. *Rejuvenation Res* **10**(2), 127-144 (2007).
- Bokori-Brown, M. & Holt, I.J. Expression of algal nuclear ATP synthase subunit 6 in human cells results in protein targeting to mitochondria but no assembly into ATP synthase. *Rejuvenation Res* **9**(4), 455-469 (2006).
- Figueroa-Martínez, F. *et al.* What limits the allotopic expression of nucleus-encoded mitochondrial genes? The case of the chimeric Cox3 and Atp6 genes. *Mitochondrion* **11**(1), 147-154 (2011).
- Holt, I.J., Harding, A.E., Petty, R.K. & Morgan-Hughes, J.A. A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am J Hum Genet* **46**(3), 428-433 (1990).
- Tatuch, Y. *et al.* Heteroplasmic mtDNA mutation (T→G) at 8993 can cause Leigh disease when the percentage of abnormal mtDNA is high. *Am J Hum Genet* **50**(4), 852-858 (1992).
- Guy, J. *et al.* Rescue of a mitochondrial deficiency causing Leber Hereditary Optic Neuropathy. *Ann Neurol* **52**(5), 534-542 (2002).
- Wallace, D.C. *et al.* Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* **242**(4884), 1427-1430 (1988).
- Hoffbuhr, K.C. *et al.* A pathogenic 15-base pair deletion in mitochondrial DNA-encoded cytochrome c oxidase subunit III results in the absence of functional cytochrome c oxidase. *J Biol Chem* **275**(18), 13994-14003 (2000).
- Keightley, J.A. *et al.* A microdeletion in cytochrome c oxidase (COX) subunit III associated with COX deficiency and recurrent myoglobinuria. *Nat Genet* **12**(4), 410-416 (1996).
- Inoue, K. *et al.* Generation of mice with mitochondrial dysfunction by introducing mouse mtDNA carrying a deletion into zygotes. *Nat Genet* **26**(2), 176-181 (2000).
- Kawahara, A. *et al.* Generation of trans-mitochondrial mice carrying homoplasmic mtDNAs with a missense mutation in a structural gene using ES cells. *Hum Mol Genet* **15**(6), 871-881 (2006).
- Fan, W. *et al.* A mouse model of mitochondrial disease reveals germline selection against severe mtDNA mutations. *Science* **319**(5865), 958-962 (2008).
- Zhang, X., Jones, D. & González-Lima, F. Mouse model of optic neuropathy caused by mitochondrial complex I dysfunction. *Neurosci Lett* **326**(2), 97-100 (2002).
- Qi, X., Lewin, A.S., Hauswirth, W.W. & Guy, J. Suppression of complex I gene expression induces optic neuropathy. *Ann Neurol* **53**(2), 198-205 (2003).
- DiMauro, S. & Mancuso, M. Mitochondrial diseases: therapeutic approaches. *Biosci Rep* **27**(1-3), 125-137 (2007).
- Tuppen, H.A., Blakely, E.L., Turnbull, D.M. & Taylor, R.W. Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochim Biophys Acta* **1797**(2), 113-128 (2010).
- Doyle, S.R. & Chan, C.K. Mitochondrial gene therapy: an evaluation of strategies for the treatment of mitochondrial DNA disorders. *Hum Gene Ther* **19**(12), 1335-1348 (2008).
- Bacman, S.R., Williams, S.L., Hernández, D. & Moraes, C.T. Modulating mtDNA heteroplasmy by mitochondria-targeted restriction endonucleases in a 'differential multiple cleavage-site' model. *Gene Ther* **14**(18), 1309-1318 (2007).
- Taylor, R.W., Chinnery, P.F., Turnbull, D.M. & Lightowlers, R.N. Selective inhibition of mutant human mitochondrial DNA replication *in vitro* by peptide nucleic acids. *Nat Genet* **15**(2), 212-215 (1997).
- Yoon, Y.G. & Koob, M.D. Efficient cloning and engineering of entire mitochondrial genomes in *Escherichia coli* and transfer into transcriptionally active mitochondria. *Nucleic Acids Res* **31**(5), 1407-1415 (2003).
- Nagley, P. & Devenish, R.J. Leading organellar proteins along new pathways: the relocation of mitochondrial and chloroplast

- genes to the nucleus. *Trends Biochem Sci* **14**(1), 31-35 (1989).
37. Banroques, J., Delahodde, A. & Jacq, C. A mitochondrial RNA maturase gene transferred to the yeast nucleus can control mitochondrial mRNA splicing. *Cell* **46**(6), 837-844 (1986).
38. Gearing, D.P. & Nagley, P. Yeast mitochondrial ATPase subunit 8, normally a mitochondrial gene product, expressed in vitro and imported back into the organelle. *EMBO J* **5**(13), 3651-3655 (1986).
39. Nagley, P. *et al.* Assembly of functional proton-translocating ATPase complex in yeast mitochondria with cytoplasmically synthesized subunit 8, a polypeptide normally encoded within the organelle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(7), 2091-2095 (1988).
40. Law, R.H., Devenish, R.J. & Nagley, P. Assembly of imported subunit 8 into the ATP synthase complex of isolated yeast mitochondria. *Eur J Biochem* **188**(2), 421-429 (1990).
41. Nero, D., Ekkel, S.M., Wang, L.F., Grasso, D.G. & Nagley, P. Site directed mutagenesis of subunit 8 of yeast mitochondrial ATP synthase. Functional and import properties of a series of C-terminally truncated forms. *FEBS Lett* **270**(1-2), 62-66 (1990).
42. Roucou, X., Artika, I.M., Devenish, R.J. & Nagley, P. Bioenergetic and structural consequences of allotopic expression of subunit 8 of yeast mitochondrial ATP synthase. The hydrophobic character of residues 23 and 24 is essential for maximal activity and structural stability of the enzyme complex. *Eur J Biochem* **261**(2), 444-451 (1999).
43. Popot, J.L. & de Vitry, C. On the microassembly of integral membrane proteins. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **19**, 369-403 (1990).
44. Farrell, L.B., Gearing, D.P. & Nagley, P. Reprogrammed expression of subunit 9 of the mitochondrial ATPase complex of *Saccharomyces cerevisiae*. Expression *in vitro* from a chemically synthesized gene and import into isolated mitochondria. *Eur J Biochem* **173**(1), 131-137 (1988).
45. Galanis, M., Devenish, R.J. & Nagley, P. Duplication of leader sequence for protein targeting to mitochondria leads to increased import efficiency. *FEBS Lett* **282**(2), 425-430 (1991).
46. Claros, M.G. *et al.* Limitations to *in vivo* import of hydrophobic proteins into yeast mitochondria. The case of a cytoplasmically synthesized apocytochrome b. *Eur J Biochem* **228**(3), 762-771 (1995).
47. Claros, M.G. MitoProt, a Macintosh application for studying mitochondrial proteins. *Comput Appl Biosci* **11**(4), 441-447 (1995).
48. Supekova, L., Supek, F., Greer, J.E. & Schultz, P.G. A single mutation in the first transmembrane domain of yeast COX2 enables its allotopic expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(11), 5047-5052 (2010).
49. Daley, D.O. *et al.* Gene transfer from mitochondrion to nucleus: novel mechanisms for gene activation from Cox2. *Plant J* **30**(1), 11-21 (2002).
50. Pineau, B., Mathieu, C., Gerard-Hirne, C., De Paepe, R. & Chetrit, P. Targeting the NAD7 subunit to mitochondria restores a functional complex I and a wild type phenotype in the *Nicotiana sylvestris* CMS II mutant lacking nad7. *J Biol Chem* **280**(28), 25994-26001 (2005).
51. Daley, D.O., Clifton, R. & Whelan, J. Intracellular gene transfer: reduced hydrophobicity facilitates gene transfer for subunit 2 of cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(16), 10510-10515 (2002).
52. Tsukihara, T. *et al.* The low-spin heme of cytochrome c oxidase as the driving element of the proton-pumping process. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(26), 15304-15309 (2003).
53. Funes, S. *et al.* The typically mitochondrial DNA-encoded ATP6 subunit of the F1F0-ATPase is encoded by a nuclear gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem* **277**(8), 6051-6058 (2002).
54. Newman, N.J. Leber's hereditary optic neuropathy. New genetic considerations. *Arch Neurol* **50**(5), 540-548 (1993).
55. Man, P.Y. *et al.* The epidemiology of Leber hereditary optic neuropathy in the North East of England. *Am J Hum Genet* **72**(2), 333-339 (2003).
56. Corral-Debrinski, M., Blugeon, C. & Jacq, C. In yeast, the 3' untranslated region or the presequence of ATM1 is required for the exclusive localization of its mRNA to the vicinity of mitochondria. *Mol Cell Biol* **20**(21), 7881-7892 (2000).
57. Sylvestre, J., Vialette, S., Corral Debrinski, M. & Jacq, C. Long mRNAs coding for yeast mitochondrial proteins of prokaryotic origin preferentially localize to the vicinity of mitochondria. *Genome Biol* **4**(7), R44 (2003).
58. Kaltimbacher, V. *et al.* mRNA localization to the mitochondrial surface allows the efficient translocation inside the organelle of a nuclear recoded ATP6 protein. *RNA* **12**(7), 1408-1417 (2006).
59. Ellouze, S. *et al.* Optimized allotopic expression of the human mitochondrial ND4 prevents blindness in a rat model of mitochondrial dysfunction. *Am J Hum Genet* **83**(3), 373-387 (2008).
60. Qi, X., Sun, L., Lewin, A.S., Hauswirth, W.W. & Guy, J. The mutant human ND4 subunit of complex I induces optic neuropathy in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**(1), 1-10 (2007).
61. Guy, J. *et al.* Efficiency and safety of AAV-mediated gene delivery of the human ND4 complex I subunit in the mouse visual system. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50**(9), 4205-4214 (2009).
62. Koilkonda, R.D., Hauswirth, W.W. & Guy, J. Efficient expression of self-complementary AAV in ganglion cells of the *ex vivo* primate retina. *Mol Vis* **15**, 2796-2802 (2009).
63. Lam, B.L. *et al.* Leber hereditary optic neuropathy gene therapy clinical trial recruitment: year 1. *Arch Ophthalmol* **128**(9), 1129-1135 (2010).
64. Oca-Cossio, J., Kenyon, L., Hao, H. & Moraes, C.T. Limitations of allotopic expression of mitochondrial genes in mammalian cells. *Genetics* **165**(2), 707-720 (2003).
65. Pérez-Martínez, X. *et al.* Structure of nuclear-localized cox3 genes in *Chlamydomonas reinhardtii* and in its colorless close relative *Polytomella* sp. *Curr Genet* **40**(6), 399-404 (2002).
66. González-Halphen, D. *et al.* Genetic correction of mitochondrial diseases: using the natural migration of mitochondrial genes to the nucleus in chlorophyte algae as a model system. *Ann N Y Acad Sci* **1019**, 232-239 (2004).
67. Carrozzo, R. *et al.* Maternally-inherited Leigh syndrome-related mutations bolster mitochondrial-mediated apoptosis. *J Neurochem* **90**(2), 490-501 (2004).
68. Perales-Clemente, E., Fernández-Silva, P., Acín-Pérez, R., Pérez-Martos, A. & Enriquez, J.A. Allotopic expression of mitochondrial-encoded genes in mammals: achieved goal, undemonstrated mechanism or impossible task? *Nucleic Acids Res* **39**(1), 225-234 (2011).