

Máster en Biotecnología Avanzada

Universidade de Vigo



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



Estudio de la relación de las mutaciones de la subunidad pequeña del RNAr mitocondrial con patologías humanas

Study of the relationship between mutations in the small subunit of mitochondrial rRNA and human pathologies

Estudo da relación das mutacións da subunidade pequena do RNAr mitocondrial con patoloxías humanas

Andrés Amado Fondo
Julio del 2016



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Máster en Biotecnología Avanzada

Universidade de Vigo

 UNIVERSIDADE DA CORUÑA



**FACULTADE DE CIENCIAS
UNIVERSIDADE DA CORUÑA**

**Estudio de la relación de las mutaciones de la subunidad pequeña del
RNAr mitocondrial con patologías humanas**

Study of the relationship between mutations in the small subunit of
mitochondrial rRNA and human pathologies

Estudo da relación das mutacións da subunidade pequena do RNAr
mitocondrial con patoloxías humanas

Trabajo de Fin de Máster

Andrés Amado Fondo

Dr. Antón Vila Sanjurjo en calidad de tutor/es de este trabajo autoriza/n su
presentación ante el Tribunal Evaluador

Antón Vila Sanjurjo

En A Coruña a Julio 2016



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

A todas aquellas personas que con mucha paciencia
me han apoyado a lo largo de estos años.
A mi familia y amigos, y a mi tutor, Antón.

Índice

| | |
|---|----|
| Introducción..... | 1 |
| 1. Origen y función mitocondrial | 3 |
| 2. La organización genómica mitocondrial | 4 |
| 3. El ribosoma mitocondrial | 5 |
| 3.1. Breve introducción de los estudios estructurales del mitorribosoma | 6 |
| 3.2. Composición del mitorribosoma | 6 |
| 4. La síntesis proteica en la mitocondria | 8 |
| 4.1. Iniciación | 8 |
| 4.2. Elongación..... | 8 |
| 4.3. Terminación..... | 9 |
| 4.4. Reciclaje ribosómico | 9 |
| 5. El papel de las mutaciones mitocondriales..... | 9 |
| 5.1. Las mutaciones mitorribosomales en el contexto del daño mitocondrial..... | 11 |
| 6. El análisis inferencial heterólogo (HIA) como método predictivo del daño ribosomal | 12 |
| Objetivos..... | 13 |
| Material y Método | 17 |
| 1. Requerimientos computacionales necesarios para análisis HIA | 19 |
| 2. Búsqueda y preparación de las secuencias mitocondriales para HIA | 19 |
| 3. Estudio del potencial disruptivo de la mutación..... | 20 |
| 3.1. Localización de las variaciones a sus posiciones en el mt-rRNA | 20 |
| 3.2. Observación de la estructura local del residuo problema | 20 |
| 4. Criterio para la asignación del potencial disruptivo | 24 |
| Resultados y Discusión..... | 25 |
| Conclusiones..... | 37 |
| Anexo | 41 |
| I. Listado de mutaciones de la subunidad pequeña sujetas a análisis estructural | 43 |

| | |
|--|----|
| II. Listado de mutaciones identificadas de la subunidad grande del ribosoma mitocondrial susceptibles de estar relacionadas con procesos tumorales..... | 46 |
| Bibliografía..... | 49 |

Abreviaturas

| | |
|------------------|---------------------------------|
| ATP | adenosina trifosfato |
| Cryo-EM | Crío-microscopía electrónica |
| DNA | ácido desoxirribonucleico |
| HIA | análisis inferencial heterólogo |
| HSP | promotor de la cadena pesada |
| LSP | promotor de la cadena ligera |
| LSU | subunidad grande del ribosoma |
| mito- | mitocondrial |
| MRPS | proteínas ribosomales |
| mt- | mitocondrial |
| mtIM | membrana interna mitocondrial |
| NCR | región no codificante |
| NGS | next generation sequencing |
| PDB | Protein Data Bank |
| PoTC | complejo post-transcripcional |
| RNA _m | ácido ribonucleico mensajero |
| RNA _r | ácido ribonucleico ribosomal |
| RNA _t | ácido ribonucleico transferente |
| ROS | especies reactivas de oxígeno |
| SSU | subunidad pequeña del ribosoma |
| TFM | trabajo de fin de máster |

Introducción

1. Origen y función mitocondrial

La mitocondria es un orgánulo responsable de la confluencia de las rutas metabólicas en la producción de energía a gran escala a través de la ruta de la fosforilación oxidativa. Se componen de una doble membrana, una externa que separa el orgánulo del citosol y una membrana interna que presenta invaginaciones formando las crestas que protruyen a la matriz mitocondrial. En la membrana interna se sitúan los complejos enzimáticos que forman parte del sistema de respiración celular. El espacio situado entre las dos membranas (espacio periplásmico) será donde se acumulen los hidrogeniones que en última instancia proporcionarán la fuerza protón-motriz capaz de impulsar la reacción catalítica de obtención de ATP. Además de su papel en la producción de energía, la mitocondria es punto de control de muchos otros procesos celulares como la muerte celular programada o el metabolismo lipídico.

Todavía se debate el origen de la mitocondria, pero se postula que evolutivamente las mitocondrias se originaron por relación endosimbiótica de una célula eucariota primitiva con un ancestro del grupo de las α -proteobacterias (Gray et al. 2001). Dicha relación le permitió a la célula desarrollar protección frente a una atmósfera rica en oxígeno que le resultaba tóxica. A pesar de que fueron capaces de mantener cierta independencia, durante su evolución interna transfirieron muchos de sus genes esenciales a los cromosomas nucleares y se quedaron exclusivamente con aquellos que codifican para las proteínas de la cadena de fosforilación oxidativa (Becker et al. 2012). Entre los argumentos a favor que respaldan la conservación de dicho material genético por parte de la mitocondria están: la traducción de proteínas demasiado hidrofóbicas para ser importadas a través de las membranas mitocondriales (Popot & de Vitry 1990), la evolución divergente en el uso de los codones que harían el DNA mitocondrial ilegible por parte del núcleo (Andersson & Kurland 1991) y por último la facilidad en la regulación de la expresión génica ante cambios ambientales por parte de un genoma pequeño que permite adaptarse a ellos de una manera más rápida y eficiente (Wallace 2007).

incorporan en el NCR un tercer segmento de DNA lineal de una longitud aproximada de 650 nucleótidos formando una estructura de triple cadena, denominada loop de desplazamiento o D-loop (Kasamatsu & Vinograd 1974), en la cual el fragmento lineal complementario a la cadena ligera (denominado DNA 7S por sus características de sedimentación) desplaza a la cadena pesada.

Además de las proteínas codificadas por su propio genoma, son necesarias alrededor de unas 1000 proteínas más para completar el proteoma mitocondrial necesario para el correcto funcionamiento del orgánulo. Dichas proteínas restantes están codificadas por el DNA nuclear, traducidas en el citosol celular e importadas posteriormente a la mitocondria (Pagliarini et al. 2008).

3. El ribosoma mitocondrial

La mitocondria proporciona más del 90% de la energía consumida por las células de los mamíferos a través del sistema de transporte electrónico de la membrana mitocondrial. Las trece proteínas codificadas por el genoma mitocondrial son sintetizadas por el mitorribosoma, hecho que hace imperativo su estudio.

Tabla 1. Esquema de las estructuras de los ribosomas mitocondriales de organismos eucariotas más representativos obtenidos hasta la fecha por cryo-EM. Extraído de <http://www.rcsb.org>

| Código de acceso | Organismo | Resolución (Å) | ID Pubmed | Referencia |
|------------------|---------------------------------|----------------|-----------|----------------------------|
| 5AJ3 | <i>Sus scrofa</i> | 3,6 | 25837512 | (Greber et al. 2015) |
| 5AJ4 | <i>Sus scrofa</i> | 3,8 | 25837512 | (Greber et al. 2015) |
| 3J9M | <i>Homo sapiens</i> | 3,5 | 25838379 | (Amunts et al. 2015) |
| 3J7Y | <i>Homo sapiens</i> | 3,4 | 25278503 | (Brown et al. 2014) |
| 4V19 | <i>Sus scrofa</i> | 3,4 | 25271403 | (B. J. Greber et al. 2014) |
| 4V1A | <i>Sus scrofa</i> | 3,4 | 25271403 | (B. J. Greber et al. 2014) |
| 3J6V | <i>Bos taurus</i> | 7,0 | 24799711 | (Kaushal et al. 2014) |
| 3J6B | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 3,2 | 24675956 | (Amunts et al. 2014) |
| 4CE4 | <i>Sus scrofa</i> | 4,9 | 24362565 | (Greber et al. 2014) |

3.1. Breve introducción de los estudios estructurales del mitorribosoma

Hasta hace nada, la mejor técnica para la elucidación de las estructuras de las moléculas con gran precisión era la cristalografía de rayos X. La evolución de las técnicas de microscopía electrónica de transmisión permitieron superar las dificultades que implicaban la técnica de difracción de rayos X al necesitar menos cantidad de material o ser más tolerante con la heterogeneidad de la muestra o con las estructuras flexibles difíciles de cristalizar (Kühlbrandt 2014). En este procedimiento la muestra es congelada en la matriz de un líquido y atravesada por un haz de electrones que interaccionan finalmente con un detector. Es gracias al uso de detectores más potentes y al procesamiento posterior de la imagen obtenida lo que permite que la técnica haya evolucionado hasta conseguir imágenes con una resolución aproximada de 3Å (Bai et al. 2014). En el cuadro se hace un resumen de cómo evolucionó la visualización de la estructura del ribosoma mitocondrial.

3.2. Composición del mitorribosoma

En general, la maquinaria de traducción se compone de los ribosomas, RNAs, RNAs, factores de reciclaje y los factores de iniciación, elongación y terminación. Los ribosomas mitocondriales tienen una masa aproximada de unos 2.71 MDa (Manjuli R Sharma et al. 2003). El componente mayor de la maquinaria de traducción es el ribosoma 55S, que se constituye a su vez de las dos subunidades 28S y 39S, denominadas subunidad pequeña y grande respectivamente. La SSU del mitorribosoma en mamíferos se compone del RNAr 12S y 29 proteínas mientras que la LSU contiene el RNAr 16S y aproximadamente 50 proteínas accesorias (Cavdar Koc et al. 2001; Suzuki et al. 2001). Casi la mitad de las proteínas que conforman el mitorribosoma en mamíferos no tienen equivalente en bacterias. La mayor parte de ellas se sitúan en la periferia del mismo o en la cara del solvente cubriendo el RNAr (Manjuli R Sharma et al. 2003) participando alguna de ellas en puentes proteína-proteína entre las dos subunidades.

3.2.1. La subunidad pequeña 28S

La estructura general de la subunidad pequeña mitocondrial se encuentra muy alterada respecto a su homóloga bacteriana debido a las deleciones de grandes segmentos presentes en el RNAr bacteriano. El plegamiento del centro decodificador, núcleo funcional responsable de la actividad ribosomal, se encuentra conservado; así

como los tres dominios característicos: cuerpo, cabeza y plataforma (Sharma et al. 2013).

Las MRPs específicas de la mito-SSU (mito-MRPs) contribuyen en gran medida a su arquitectura única. Las MRPs ocupan la cabeza, cuerpo bajo y la cara del solvente de la subunidad (Manjuli R. Sharma et al. 2003). Además ciertas MRPs contienen prolongaciones en sus segmentos N y C-terminal que forman una entrada semejante a una puerta que podría estar involucrada en el reconocimiento de los RNAm “leaderless” de los mt-RNAm, los cuales carecen de región 5’-(UTR) (Temperley et al. 2010).

3.2.2. La subunidad grande 39S

Aproximadamente el 50% de los segmentos bacterianos de RNAr se han eliminado en la subunidad grande del ribosoma en mamíferos (mito-LSU). A pesar de esto, su estructura general no se encuentra alterada de manera exagerada y la presencia de las estructuras singulares de la LSU como son la protuberancia L1, la protuberancia central y el eje L7/L12 que sus bases estructurales son importantes para la traducción (Sharma et al. 2013). Como en el caso de la mito-SSU, los cambios evolutivos sufridos por la mito-LSU no han afectado a la estructura del centro activo principal (la región central con actividad peptidiltransferasa), pero si se ha visto afectada el sitio de salida para el RNAt (sitio exit “E”) (Mears et al. 2006) y el túnel de salida para el polipéptido naciente, remodelado casi por completo mediante MRPs mito-específicas (Manjuli R. Sharma et al. 2003).

En la mitocondria, todos los polipéptidos sintetizados son insertados en la mtIM (membrana interna mitocondrial) y por ello el túnel de salida que conduce a los polipéptidos están hechos a medida para facilitar su liberación e incorporación (Manjuli R. Sharma et al. 2003). El túnel de salida para los polipéptidos de la mt-LSU tiene dos aperturas accesibles al solvente: la salida convencional (PES “conventional polipeptide exit site”) y el sitio mito-específico accesible para polipéptidos (PAS de “polypeptide accessible site”) a través de los cuales el péptido naciente podrá protruir dependiendo de sus requerimientos de plegamiento (Sharma et al. 2013).

4. La síntesis proteica en la mitocondria

La síntesis proteica puede dividirse en cuatro fases, denominadas como iniciación, elongación, terminación y reciclaje ribosomal. Se dividen en las siguientes etapas (Koc & Koc 2013):

4.1. Iniciación

El inicio de la traducción comienza con la disociación del ribosoma en sus unidades básicas. El Met-RNAt formilado se aparea con el codón de inicio del RNAm en el sitio P de la subunidad pequeña. Hasta la fecha se sabe de dos factores de iniciación que juegan un papel importante en el proceso: IF2mt e IF3mt. IF3mt media la disociación inicial del ribosoma formando el complejo 28S-IF3mt y favoreciendo el reclutamiento del RNAm. Este factor de iniciación también está implicado en la disociación del complejo fMet-RNAt•IF2mt de la mt-SSU en ausencia del RNAm, previniendo la ocupación prematura del sitio P. El mecanismo de reconocimiento del RNAm no está claro todavía.

Por su parte, el IF2mt forma un complejo ternario con el fMet-RNAt y el GTP, para situarlo en el sitio de inicio P de la mt-SSU. Una vez formado el complejo de iniciación, IF2mt promueve su asociación con la mt-LSU mediante la interacción de uno de los dominios del IF2mt con el L7/L12 stalk de la mt-LSU. Tras la activación de la actividad GTPasa de IF2mt, se da lugar a la disociación de IF2mt e IF3mt resultando en formación del complejo de iniciación 55S, que entra en la fase de elongación.

4.2. Elongación

El proceso de elongación de la traducción es un evento cíclico donde el RNAm es decodificado para adicionar aminoácidos especificados por los codones a la cadena peptídica nascente. El estado de elongación se alterna entre la adición de un aminoacil-RNAt (aa-RNAt) y la translocación del complejo RNAm•(RNAt)₂ en el ribosoma y finaliza con el encuentro de un codón stop. En este proceso están involucrados varios factores de elongación que interaccionan directamente con el ribosoma: (i) EF-Tu_{mt}, que favorece la correcta interacción entre el aa-RNAt_{mt}, mediante la formación de un complejo ternario aa-RNAt_{mt}•EF-Tu_{mt}•GTP para la posición vacante A del ribosoma y (ii) EF-G1_{mt}, que después de la formación del enlace peptídico se une a al ribosoma en forma de EF-G1_{mt}•GTP y promueve la translocación del complejo RNAm-peptidil-RNAt para liberar de nuevo la posición A del ribosoma (el sitio de decodificación del RNAm) para la siguiente ronda de elongación.

4.3. Terminación

Cuando un codón stop (UAA/UAG) se sitúa en la posición A del ribosoma marca el final de la región codificante del gen de partida. Este codón es reconocido por el factor de liberación que cataliza la hidrólisis del enlace éster del peptidil-RNAt provocando la liberación del péptido naciente y finalizando el proceso de traducción. Se han identificado cuatro elementos que toman parte en el suceso: RF1_{mt}, RF1_{amt}, ICT1 y C12orf65.

RF1_{amt} reconoce ambos codones stop y finaliza la traducción de las 13 proteínas codificadas por el genoma mitocondrial. En su centro activo, un residuo de glutamina cataliza la hidrólisis del peptidil-RNAt coordinando una molécula de agua. Un dominio se encarga del reconocimiento específico del codón de terminación. El papel del RF1_{mt} aún no se conoce con precisión, pero se teoriza acerca de un papel análogo al ARN transferente-mensajero, reconociendo la posición A del ribosoma en el caso de ribosomas estancados (por ejemplo, en ausencia de un codón stop). ICT1 es un componente de la mt-LSU y tiene actividad hidrolasa dependiente de peptidil-RNAt de manera no codón-dependiente. Su actividad se ha implicado en la hidrólisis de los peptidil-RNAts previamente terminados en los ribosomas estancados. Por último, el C12orf65, se sugirió como mediador en el reciclaje de especies peptidil-RNAt abortivas liberadas del mitorribosoma durante la fase de elongación de la traducción.

4.4. Reciclaje ribosómico

Tras la terminación de la traducción, el complejo ribosomal post-transcripción (PoTC) permanece ocupado por el RNAm recién traducido y el RNAt desacilado en la posición P/E. Dos factores de traducción mitocondrial trabajan en conjunto para facilitar el paso de reciclaje del ribosoma desensamblando el complejo. El mediador más característico de este punto es el factor de reciclaje ribosomal (RRF_{mt}). La unión del factor se cree que irrumpe los puentes de tipo B1 desestabilizando la estructura 55S. Posteriormente, el factor de elongación mitocondrial G2 (EF-G2_{mt}), interacciona con el complejo 55S•EF-G2_{mt} para catalizar la disociación del PoTC (por ello también se le denominó RRF2_{mt}).

5. El papel de las mutaciones mitocondriales

Como ya se comentó el mtDNA está presente como una molécula cerrada en la matriz mitocondrial con múltiples copias existentes. En caso de que en una de ella

ocurriese una mutación sería posible la coexistencia en la misma mitocondria de la variante salvaje y la mutada, estado denominado de heteroplasmia, contrario al de homoplasmia, en el que todas las copias son iguales. La heteroplasmia puede ser perjudicial a partir del momento en el que la copia defectiva cause cambios en el fenotipo celular (Li et al. 2010).

Normalmente en patologías se encuentran en este estado reflejando una severidad dependiente del número de copias de las variables mutadas (Wang et al. 2012) habiéndose reportado también casos de homoplasmia (Polyak et al. 1998). Entre las razones por la que un tejido heteroplásmico pudiera volverse homoplásmico en un determinado momento se encuentran: que la copia mutada presente algún tipo de ventaja replicativa respecto a las salvajes (Polyak et al. 1998) o que mediante segregación aleatoria durante la división celular se acumulen los fenotipos mutados (Coller et al. 2001).

Las mutaciones en el mtDNA pueden heredarse de la línea materna o adquirirse de forma somática (Brandon et al. 2006) y su presencia pueden comprometer la funcionalidad de varias proteínas codificadas por el genoma mitocondrial, influenciar la capacidad de la traducción y transcripción mitocondrial o alterar el procesamiento de los mt-RNAs y RNAs (Craig 2012). En su relación con el cáncer no se puede determinar si dichas mutaciones forman parte de la etiología de la enfermedad o por el contrario son consecuencia de la génesis tumoral.

Se han hecho revisiones en las que se pretende estudiar la asociación entre las mutaciones que afectan a componentes mitocondriales y la etiología del cáncer (Brandon et al. 2006). Partiendo de la premisa de que los cambios en el metabolismo mitocondrial debido a defectos en la cadena respiratoria pueden estar implicados en la etiología y/o evolución tumoral se estudia la presencia de mutaciones nucleares o mitocondriales en los genotipos patológicos. La existencia de mutaciones mitocondriales de la línea germinal asociadas al desarrollo de ciertos cánceres y la presencia de mutaciones somáticas en muchos otros finaliza con la conclusión de que las mutaciones del mtDNA pueden clasificarse en dos grandes grupos: protumorales o adaptativas. Las mutaciones protumorales se relacionan con la formación ROS que dañan el material genético y promueven la mutación de proto-oncogenes y la proliferación celular al estimular el comienzo replicativo (Brandon et al. 2006). Las mutaciones adaptativas son aquellas que se observan en la población general o que

aparecen durante el envejecimiento y/o patología. Se relacionan con la supervivencia tumoral en condiciones adversas como pueden ser sustratos energéticos alterados y/o reducidos, tensión de oxígeno reducida, variación de la temperatura ambiental o aumento de tolerancia a ROS (Brandon et al. 2006).

5.1. Las mutaciones mitorribosomales en el contexto del daño mitocondrial

Existen identificadas muchas mutaciones del genoma mitocondrial que están relacionadas con fenotipos patológicos. La mayor parte de estas mutaciones se encuentran localizadas en genes codificantes para componentes de la cadena de transporte electrónico ([http://www.mitomap.org /foswiki /bin /view /MITOMAP/ Clinical Phenotypes Polypeptide](http://www.mitomap.org/foswiki/bin/view/MITOMAP/ClinicalPhenotypesPolypeptide)). o mt-RNAs y mt-RNAs ([http://www.mitomap.org /foswiki /bin /view /MITOMAP/MutationsRNA](http://www.mitomap.org/foswiki/bin/view/MITOMAP/MutationsRNA)). De entre todas ellas existen dos mutaciones de las que se conoce con exactitud la patología que producen y son la A908G (A1555G) y la C847U (C1494T). El mecanismo del aumento de la toxicidad de los antibióticos aminoglucósidos por el cual dichas mutaciones llegan a producir la pérdida auditiva se debe al aumento que produce dicha mutación en la estabilización de la unión del antibiótico al su bolsillo de unión resultando por tanto en la aparición de dicha susceptibilidad (Böttger 2010).

En su vinculación con los procesos tumorales la evidencia sugiere una correlación existente entre varios cánceres y mutaciones en el mtDNA (Baysal et al. 2000; Niemann & Müller 2000; Astuti et al. 2001; Lehtonen et al. 2004; Vanharanta et al. 2004) entre los que destaca la mutación G2056A afectando al gen codificante para el RNAr 16S, que se asocia con un mayor riesgo en el desarrollo de cáncer de vejiga (Fliss et al. 2000), contribuyendo presuntamente en la etiología del cáncer.

Estos indicios, junto con la identificación de mutaciones en distintos tipos de tumores que involucran a genes nucleares relacionados con la actividad mitocondrial acabaron con la utilización de métodos de secuenciación masiva para obtener espectros de las mutaciones mitocondriales posiblemente involucradas (Larman et al. 2012) entre las cuales aparecieron mutaciones implicadas en los genes codificantes para los mt-RNAs.

6. El análisis inferencial heterólogo (HIA) como método predictivo del daño ribosomal

A pesar de todas las identificaciones de las mutaciones mitocondriales no ha sido posible clarificar su papel directo en la patología a excepción de las dos mutaciones antes descritas relacionadas con la sensibilidad a aminoglucósidos y la pérdida auditiva. Comprobar con que gravedad afecta la presencia de dichas variaciones resulta complicado debido a tres razones (Smith et al. 2014) i) que en función de su estado de heterogeneidad pueden presentar penetrancia incompleta, así como debido a la presencia de modificadores nucleares, ii) la imposibilidad de poner a examen las mutaciones mitorribosomales directamente y iii) la existencia de distintos haplogrupos humanos dificulta un poco más el trabajo de la asignación correcta de las mutaciones, ya que la penetrancia de algunas variantes puede cambiar en contextos genéticos distintos.

El Análisis Inferencial Heterólogo (HIA) nace como un método indirecto para la evaluación de las posibles consecuencias que pueden derivar de mutaciones mitocondriales localizadas en los genes que codifican para el mt-RNAr (Elson et al. 2015).

El fundamento de dicha técnica se basa en la identificación de residuos funcionalmente y estructuralmente equivalentes en orígenes filogenéticamente divergentes gracias a la universalidad del ribosoma y de su núcleo activo, junto con la elevada conservación del plegamiento del RNAr. Mediante alineamientos, esta técnica permite establecer relaciones estructurales entre residuos del RNAr de organismos u orgánulos para los cuales todavía no existen estructuras en alta resolución. HIA permite además tener en consideración elementos importantes como son todas aquellas interacciones intramoleculares que no son interacciones canónicas de Watson-Crick (A-T, C-G) entre los distintos elementos que conforman la estructura final del mitorribosoma.

Objetivos

El objetivo de este trabajo es el de comenzar los estudios del espectro mutacional del RNAr mitocondrial en relación con el cáncer. Los estudios de NGS (Next Generation Sequencing) de tejidos cancerosos están aumentando enormemente la cantidad de datos mutacionales del genoma mitocondrial que poseemos. Dado el interés de nuestro laboratorio en estudiar el papel del ribosoma mitocondrial humano y su relación con condiciones patológicas, hemos decidido abordar el estudio por medio de HIA, de una amplia serie de mutaciones somáticas en el RNAr mitocondrial identificadas por NGS en tejidos cancerosos. Dada la magnitud del estudio, el objetivo concreto de este TFM es el de extraer toda la información mutacional de los artículos seleccionados al comienzo del estudio y organizar los datos para su posterior análisis por HIA y efectuar dicho análisis para un subgrupo de mutaciones elegidas por su potencial interés funcional

Material y Método

1. Requerimientos computacionales necesarios para análisis HIA

HIA es un método completamente computacional (Elson et al. 2015). El programa usado para el análisis interactivo y la visualización de las moléculas es el UCSF Chimera (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera7/>). El programa fue desarrollado por Recursos para la Bioinformática, Visualización e Informática y fundado por los Institutos Nacionales de la Salud de EEUU (NIGMS P41-GM103311). El análisis del mt-SSU RNAr mediante UCSF Chimera se realizó en un ordenador con procesador Intel(R) core(TM) i5CPU M460 (2.53GHz), 4,00Gb de RAM, con una tarjeta gráfica ATI Mobility Radeon HD5470 512MB y sistema operativo Windows 10 Home 64-bit.

2. Búsqueda y preparación de las secuencias mitocondriales para HIA

Se recurrió a publicaciones de secuenciación del genoma mitocondrial en muestras de tejido patológico de distintos tipos (Larman et al. 2012; Ju et al. 2014; McMahon & LaFramboise 2014; Davis et al. 2014). De todo el listado de mutaciones presentes se seleccionaron aquellas que cumplieran los siguientes criterios: (a) variaciones identificadas en sujetos humanos en patologías con sospechas de daño mitocondrial, principalmente en tumores. (b) Mutaciones del DNA mitocondrial sujetas a expansión clonal en pacientes. Para identificar la variante como mutación somática sujeta a expansión clonal, fue necesaria la existencia de un tejido control no mutado y no canceroso del mismo paciente.

En el presente estudio, el método HIA se ha usado para evaluar el potencial disruptivo de mutaciones con apariciones cero en controles, para aumentar la probabilidad de que la variante juegue un papel determinante en la patología. Para ello, todas las mutaciones fueron comparadas con la base de datos de MITOMAP, dentro del apartado MITOMAP: Reported Mitochondrial DNA Base Substitution Diseases: rRNA/tRNA mutations (www.mitomap.org/foswiki/bin/view/MITOMAP/MutationsRNA). Del listado de mutaciones se comprobó la frecuencia de aparición en GeneBank y se seleccionaron aquellas que presentaban un número de apariciones inferior o igual que 10. Para variaciones con número de apariciones inferior, se investigó la posibilidad de que las secuencias individuales pudieran estar relacionadas con una patología mitocondrial recurriendo a las fuentes bibliográficas relacionadas con ellas.

3. Estudio del potencial disruptivo de la mutación

3.1. Localización de las variaciones a sus posiciones en el mt-rRNA

El rRNA 12S comienza en la posición 648, dentro del genoma mitocondrial. Por tanto, todas las posiciones fueron recalculadas mediante sustracción de 647 de las posiciones genómicas correspondientes. Las mutaciones se posicionaron en un mapa de la estructura secundaria (Cannone et al. 2002) que se muestran como una buena herramienta para esquematizar la información.

Las mutaciones pueden ser analizadas usando estructuras de alta resolución de los modelos ribosomales. Los archivos con las estructuras tridimensionales en alta resolución están depositados en RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>). A día de hoy, hay disponibles modelos con resolución atómica tanto obtenidos por difracción de rayos X como por microscopía óptica, gracias a los avances experimentados en el último año.

3.2. Observación de la estructura local del residuo problema

El ribosoma bacteriano ha sido el más estudiado hasta la fecha, tanto su bioquímica, su genético y su estructura. Como resultado, hay disponibles múltiples estructuras en varias conformaciones y con distintos ligandos necesarios en el proceso de traducción. Hay dos parámetros importantes dichas resoluciones, el parámetro R y el R-free, ya que nos informan de la calidad del modelo obtenido a partir de los datos cristalográficos (Kleywegt & Jones 1997). Los valores R típicos para las resoluciones estructurales ribosomales a escala atómica se sitúan entre 0.2 y 0.3, situándose el R-free ligeramente por encima. Para este estudio se utilizaron las estructuras de PDB 2J00 de la estructura 4V51 procedente del organismo *Thermus thermophilus* y 3J9M estructura del ribosoma mitocondrial del *Homo sapiens*.

El software para la visualización UCSF Chimera (Pettersen et al. 2004) proporciona una herramienta gratuita, potente y con un entorno gráfico agradable para el análisis de las estructuras ribosomales. Existen manuales online y tutoriales en línea, disponibles en <https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>. Se describen las instrucciones para cargar, visualizar y desarrollar el análisis con UCSF Chimera candidate versión 1.11 (build 41084) a través de un plan de acción para la elucidación del rol de cualquier residuo del rRNA sin necesidad de un conocimiento preliminar del funcionamiento del programa:

1. Cargar el archivo para la estructura 12S del mitorribosoma humano, con la mayor resolución posible. El archivo se descarga de RCSB Protein Data Bank (elegir la opción del archivo en formato PDB). Se tendrá en cuenta que el RCSB Protein Data Bank proporciona una lista de todas las cadenas presentes en el archivo.
2. El residuo de interés se localiza seleccionando su posición en su secuencia primaria:
 - a. Clicar **Tools:Sequence** y luego seleccionar la cadena ID correspondiente al RNA donde el residuo se localiza.
 - b. Se remarca en la secuencia, que permite seleccionar el residuo en su estructura tridimensional para su posterior manipulación.
 - c. Clicar **Actions:Focus** para situarnos en el residuo.
 - d. Clicar **Action:Atoms/Bonds:Show** para mostrar un modelo extendido del residuo.
 - e. Ctrl-click en cualquier átomo para seleccionarlo. Luego pulsar **Actions:Label:Other** para abrir una ventana donde se podrá escribir una etiqueta para el residuo situada en el átomo seleccionado. Además se podrá marcar con color dicho residuo para facilitar el trabajo tras Ctrl-click en su porción de lazo de la estructura tridimensional para seleccionar todos los átomos y seleccionar el color en la paleta de color mostrada en **Actions:Color**.
 - f. Ctrl-click en los residuos de rRNA vecinos para identificar todos las posibles interacciones secundarias, terciarias o cuaternarias. Eso estará determinado por las distancias entre los átomos de los distintos residuos, ya que, la distancia media para un enlace de hidrógeno en proteínas y ácidos nucleicos ronda sobre los 3,0 Å (George 1997). Es por tanto que cualquier par aproximado a los 3,0 Å se corresponda muy posiblemente con un enlace de hidrógeno. En aquellos casos que el residuo forme parte de una interacción canónica de Watson-Crick, su pareja debería encontrarse fácilmente al mostrar los residuos en su vista extendida.
 - g. Ctrl-click en un átomo y Ctrl-Shift-click en un segundo átomo para determinar las distancias entre ellos. Para que se muestren las distancias entre átomos se utilizará el asistente para distancias (**Tools:Structure Analysis:Distances**)

- h. Se aconseja salvar la sesión de Chimera para que pueda ser cargada más tarde (**File:Save Session**). Si se analizasen muchas posiciones, es recomendable salvar las sesiones para cada mutación para su estudio posterior sin necesidad de su procura (**File:Save Session as...**).
- i. Podrá extraerse la información en formato .jpeg a través de (**File:Save image as**) o también de las distancias a través del botón **Save** en el asistente para las distancias, indicando la extensión del archivo .txt.

Esquema del procedimiento

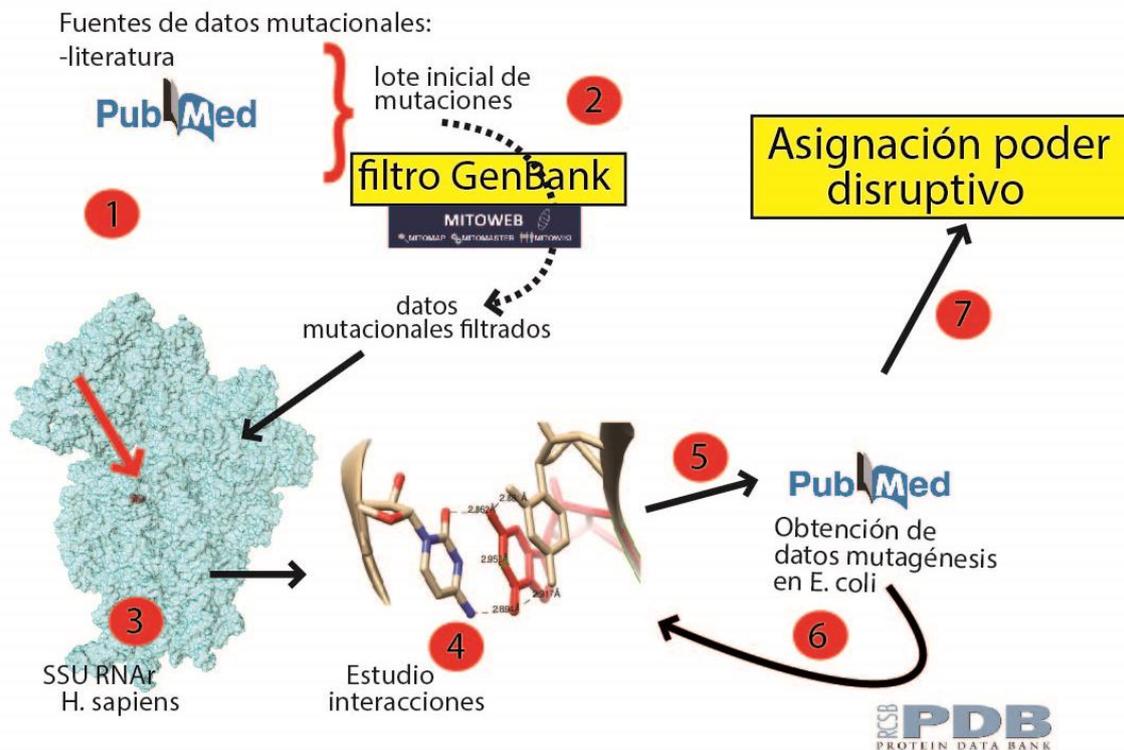


Ilustración 2. Esquema del procedimiento realizado para la asignación del poder disruptivo mutacional. Modificado a partir de (Elson et al. 2015).

A pesar de toda la información que puede proporcionar las estructuras tridimensionales del ribosoma para la elucidación del papel de los residuos individuales del rRNA en la estabilización de la estructura local, la gran dimensión de la subunidad pequeña del ribosoma respecto al tamaño de un nucleótido disuelve los efectos que las mutaciones puntuales puedan tener sobre la función ribosomal normal. Es por eso que las conclusiones de los estudios estructurales primarios deben ser complementados con una búsqueda de datos bioquímicos y genéticos que puede utilizarse para racionalizar los posibles efectos de la perturbación estructural en la función ribosomal. Un punto de partida es la búsqueda en la base de datos de Triman de las Mutaciones del RNA

(<http://www.rna.cccb.utexas.edu/SAE/2B/triman.php>) y las referencias asociadas a ellas (Triman 2007) para elucidar si la posición heteróloga equivalente o un nucleótido vecino ha sido diana de estudios de mutagénesis dirigida en ribosomas no mitocondriales. Posteriormente, se realiza la búsqueda de información (Google, Pubmed) que relacionen directamente la región mutada del ribosoma con sus aspectos funcionales. Para la identificación de dichos nucleótidos en el ribosoma bacteriano a partir de la estructura del ribosoma mitocondrial se superponen las estructuras mediante la herramienta del UCSF Chimera “MatchMaker”. Se sigue el siguiente procedimiento:

1. Una vez identificadas las posiciones y marcadas en la estructura del mitorribosoma (3J9M) se abre en la misma sesión la estructura para la subunidad pequeña del ribosoma bacteriano (2J00). UCSF Chimera proporcionará de manera automática números ID consecutivos a cada modelo empezando desde el número 0.
2. La SSU bacteriana (#1) se superpone a la SSU del mitorribosoma (#0) seleccionando **Tools:Structure Comparison:MatchMaker**. En el cuadro de diálogo del MatchMaker, se selecciona la opción **Specific chain(s) in reference with specific chains(s) in match structure**. Se asegurará que la casilla **Matrix** muestra la opción **Nucleic**, dejando las demás opciones como por defecto.
3. Con las estructuras alineadas es posible descubrir el residuo heterólogo en bacterias simplemente aproximando el puntero del ratón sobre el residuo de la cadena del rRNA bacteriano que cae en la posición marcada de la secuencia del mitorribosoma. Para facilitar el desplazamiento en el entorno gráfico es posible ocultar o mostrar cualquiera de las cadenas a través del **Model Panel (Favorites:Model Panel)** y clicar en la opción **Select chain(s)** para cada una de las estructuras abiertas que abrirá un cuadro de diálogo donde se mostrarán todas las cadenas que conforman la estructura. En este punto hay que saber previamente cuales son las cadenas de interés (del RNAr) con las que queremos trabajar para poder filtrar la información necesaria. Para el caso de la SSU bacteriana en la secuencia 2J00 se encontraron las cadenas A para el rRNA 12S, Y para el tRNA en la posición ribosomal A, V para la posición ribosomal P, W para la posición ribosomal

E, X para el segmento de RNAm y en “misc.” se encontró la molécula de antibiótico resuelta en la estructura.

4. Criterio para la asignación del potencial disruptivo

El fin último del HIA es establecer el potencial disruptivo de una mutación ocurriendo en el residuo equivalente heterólogo, como base para la estimación del grado de patogenicidad de la variación mitocondrial original. Se establece el siguiente sistema de puntuación (Elson et al. 2015):

1. Datos de mutagénesis dirigida demuestran datos claros en contra de un posible efecto patológico de la mutación y/o su base pareja en la función ribosomal → **N** = “con certeza no disruptiva”.
2. No existen datos sobre mutagénesis dirigida, pero existe todavía información indirecta en contra de una posible actividad disruptiva de la mutación y/o su base pareja en la función ribosomal → **U** = “posiblemente no disruptiva”.
3. No hay datos directos ni indirectos que argumenten a favor o en contra de un efecto disruptivo de la mutación en la función ribosomal → **NEE** = “sin evidencia suficiente”.
4. Datos indirectos suficientes (pero no mutagénesis dirigida) que sugieren un efecto nocivo asociado con la mutación → **L** = “posiblemente nociva”.
5. Datos de mutagénesis dirigida demuestran un efecto nocivo asociado a la mutación → **C** = “ciertamente nociva”.

Resultados y Discusión

El presente estudio se engloba dentro de un análisis más amplio del papel del ribosoma mitocondrial en los procesos de cáncer. Aparte de la evidencia analizada por nuestro grupo en dos trabajos ya publicados (Smith et al. 2014; Elson et al. 2015), el uso de técnicas de secuenciación masiva para identificar mutaciones en el ADN mitocondrial, especialmente en pacientes con cáncer, provee de una fuente gigantesca de nuevas mutaciones potencialmente relacionadas a esta patología. El mapeado y análisis de tal cantidad de mutaciones no puede ser abordado en un TFM. Por lo tanto, este trabajo ha de ser considerado como una primera aproximación al estudio del papel del ribosoma mitocondrial en el cáncer.

Se extrajeron en un principio 440 mutaciones recogidas en la bibliografía descrita para las subunidades grande (LSU) y pequeña (SSU) del mitorribosoma. De ellas 190 fueron descartadas por no cumplir los criterios de selección descritos en el apartado anterior y 250 fueron clasificadas como susceptibles de estudio. Debido al gran número de ellas, para este trabajo se seleccionaron aquellas correspondientes a la SSU, que fueron un total de 109 mutaciones que se examinaron estructuralmente en el programa informático USCF Chimera.

Tabla 2. Resumen de las mutaciones analizadas sujetas a revisión bibliográfica.

| Residuo genómico | Residuo o mt-RNAr | Base original | Mut. | Equival. bacterias | Base en bacterias | Índice conservación | % Heteroplasmia | Tipo | Ref. |
|------------------|-------------------|---------------|------|--------------------|-------------------|---------------------|-----------------|---------|------------------|
| 659 | 12 | U | C | 17 | U | 1,919 | 29 | C | (Ju et al. 2014) |
| 902 | 255 | G | A | 530 | G | 1,931 | 42 | C | |
| 903 | 256 | U | C | 532 | A | 1,293 | 4,76 | N | |
| 1079 | 432 | G | A | 791 | G | 1,947 | 25 | C | |
| 1175 | 528 | G | A | 922 | G | 1,944 | 28 | L | |
| 1215 | 568 | U | C | 961 | U | 1,725 | 97,37 | NE E | |
| 1217 | 570 | G | A | 963 | G | 1,959 | 7,42 | C | |
| 1227 | 580 | G | A | 973 | G | 1,708 | 20 | C | |
| 1485 | 838 | G | A | 1401 | G | 1,885 | 7 | C | |

De todas ellas se han seleccionado para análisis exhaustivo y revisión bibliográfica las siguientes:

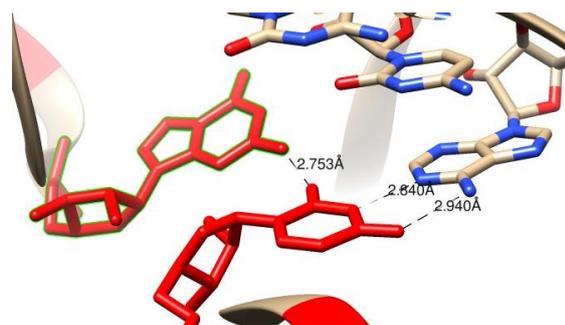
12U>C (m.659 U>C)

Ilustración 4. Se muestra el residuo 12U como el marcado en rojo en la parte inferior. Al lado se recogen los detalles de las posibles interacciones establecidas:

U 659 O4 <-> A 1171 N6: 2.940

A 1171 N1 <-> U 659 N3: 2.840

U 659 O2 <-> G 1285 N2: 2.753



Esta variación homoplásmica del 29% se ha encontrado en una muestra de tejido de un carcinoma adenoide-quístico (Ju et al. 2014). La posición homóloga en bacterias para este residuo es la *U17*.

El estudio estructural muestra interacciones Watson y Crick de las bases 12U y 524A. Se observa también una posible interacción de 12U y 638U con una distancia entre ambas bases de 2,753 Å.

Existe recogida bibliográfica de experimentos de mutagénesis dirigida para la posición homóloga *U17* en *Escherichia coli*. En el estudio se realizó el cambio de la U por la C acarreado como consecuencia una pérdida en la actividad ribosomal en un 70%. A pesar que esta mutación se encuentra en la hélice 2 situada en el “pseudoknot” central, lugar clave del ribosoma, la estructura funcional depende exclusivamente del buen apareamiento de la bases implicadas en dicho “pseudoknot” (Poot et al. 1998). Por lo tanto, la presencia de una mutación compensatoria en la posición *A918* que mantuviese el apareamiento, permitía mantener la actividad ribosomal.

Dado que la 12U>C (m.659 U>C) no permite dicho apareamiento, puede concluirse por tanto que se trata de una mutación de tipo C, “ciertamente disruptiva”. Queda por determinar, sin embargo, si la presencia de la mutación al 29% es suficiente para producir daños a la función mitocondrial.

255G>A (m.902G>A)

Se ha encontrado esta variación heteroplásmica en un 42% en células tumorales de tejido prostático (Ju et al. 2014). El residuo equivalente en bacterias es el *G530* que se encuentra en el loop530.

Este loop es uno de los centros funcionales más importantes del ribosoma y se encuentra conservado en los tres dominios filogenéticos (Powers & Noller 1990). El residuo en cuestión, tras su superposición al RNAr bacteriano junto a los demás elementos (RNAts, RNAm), se muestra enfrentado justo a la zona en la que el RNAt y

el RNAm interaccionan en la posición A ribosómica. Aunque no se observa una interacción directa de este residuo con ningún de los dos elementos esto no ocurre en el caso de su homólogo bacteriano, que si lo hace con una ribosa de la posición 35 del

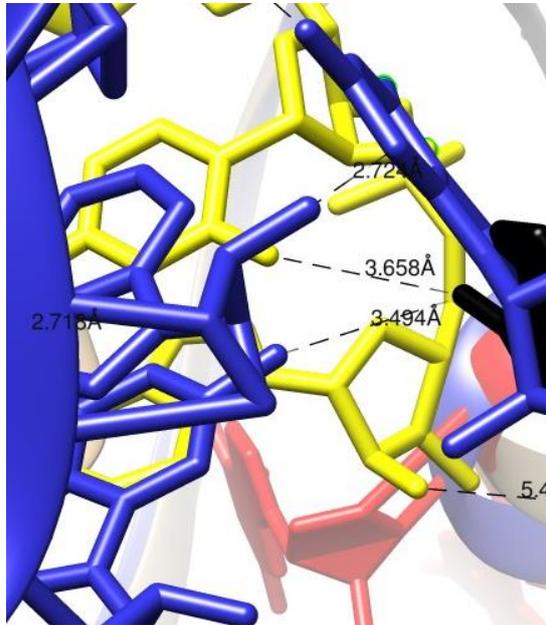


Ilustración 5. Se muestra el residuo 255G en negro sin interacción apreciable. El residuo en bacterias G530 (superpuesto en azul) sí interacciona con el RNAt (también en azul). En amarillo el RNAm.

G 530 N3 <-> A 35.Y O2': 2.724

RNAt del sitio A presentado una distancia de 2,724 Å. Dicha interacción está involucrada en la monitorización de la fidelidad en la codificación comprobando la interacción codón-anticodón en el sitio A (Ogle et al. 2001; Ogle et al. 2002). Dada la importancia crucial de este residuo en la decodificación, no nos ha de sorprender que alteraciones en la posición G530 hayan mostrado fenotipos dominantes letales (Powers & Noller 1990).

Estos datos concuerdan perfectamente con los predichos previamente (Smith et al. 2014) para esta posición mediante HIA sin el uso de las estructuras de los ribosomas mitocondriales en humanos. Por este motivo se clasifica dicha variante como “ciertamente disruptiva”, pudiendo dañar la función mitocondrial seriamente incluso a los niveles de heteroplasma detectados, debido a su dominancia sobre el fenotipo silvestre.

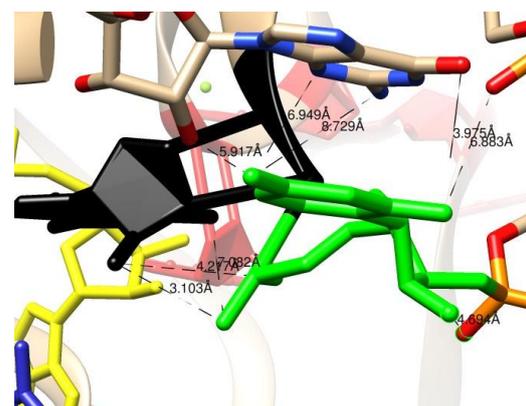
256U>C (m.903U>C)

Esta mutación fue encontrada en una muestra de tejido tumoral mamario (Ju et al. 2014) con un grado de heteroplasma de un 4,76%. El análisis estructural no mostró interacciones significativas entre los residuos vecinos. Su posición homóloga en bacterias es la U531.

Un estudio de mutagénesis dirigida en dicho residuo en *E. coli* no mostró efecto alguno en el crecimiento bacteriano ni en la síntesis proteica (Santer et al. 2002).

Podemos indicar aquí, por tanto, que

Ilustración 6. No se hayan posibles interacciones del residuo 256U (en verde).



existe evidencia suficiente para determinar que se puede clasificar esta mutación como N “ciertamente no disruptiva”.

432G>A (m.1079G>A)

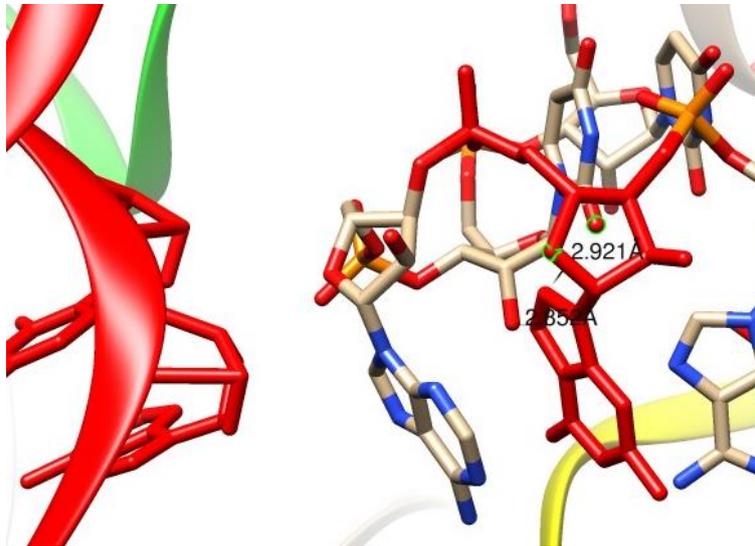


Ilustración 7. El residuo 432G se sitúa a unos 5Å del RNAt de la posición P (cinta roja).

$U\ 1077\ O2' \leftrightarrow G\ 1079\ N7: 2.852$
 $G\ 1079\ C8 \leftrightarrow U\ 1077\ O2: 2.921$

con una distancia de separación entre ambos de 2,852 Å. Puede observarse además que se encuentra en un plano por debajo de la posición 38 del RNAt del sitio P, situándose a una distancia de aproximadamente tan solo 5 Å.

Su homólogo bacteriano se corresponde con la posición *G791*, que se encuentra en el loop790. Esta región establece interacción con el factor de iniciación IF3 (Noller 1991) disminuyendo su afinidad por el factor en 10 veces y la asociación de las subunidades. (Tapprich et al. 1989). Por tanto, no es sorprendente que la mutación en la posición *G791* afecte el crecimiento bacteriano incluso en coexistencia con el alelo silvestre (Tapprich et al. 1989; O'Connor et al. 1997).

Se puede afirmar por tanto que hay documentación bibliográfica suficiente para afirmar que esta variante se clasifica como C “ciertamente disruptiva”. A pesar de esta consideración, la posibilidad de que 432G>A (m.1079G>A) pueda afectar la traducción mitocondrial a bajos niveles de heteroplasmia detectados (25%), queda por determinarse.

Este cambio de base se ha encontrado como mutación heteroplásmica en un 25% en muestra de tejido tumoral mamario (Ju et al. 2014). Su estudio reveló que no posee interacciones canónicas de Watson y Crick, pero si establece interacciones terciarias con el nucleótido 1077U a través de la ribosa

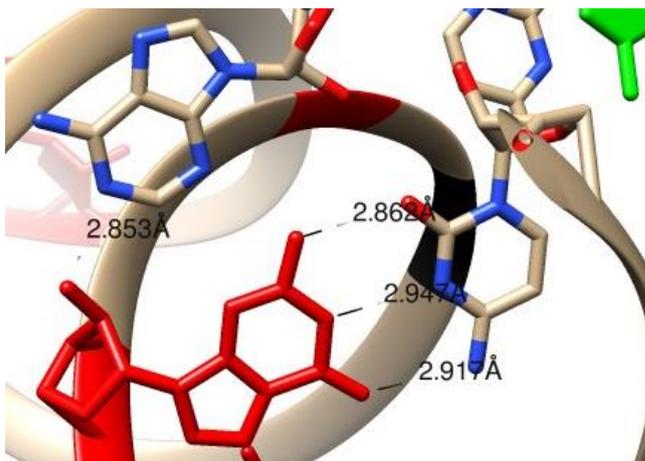
528G>A (m.1175G>A)

Ilustración 8. Interacciones del residuo 528G (en rojo):

G 1175 N2 <-> C 1479 O2: 2.862

G 1175 N1 <-> C 1479 N3: 2.947

G 1175 O6 <-> C 1479 N4: 2.917

A 1482 N1 <-> G 1175 O2': 2.853

838G (cuya mutación se describirá posteriormente) con una distancia de separación de unos 2,53 Å. La posición homóloga en bacterias a 528G es la *G922*.

La zona donde se sitúa esta mutación se denomina hélice 28 y se cree que juega un papel fundamental en el proceso de elongación de la cadena peptídica ayudando a la translocación del ribosoma (Mohan et al. 2014) así como en la unión de la unidad 50S durante la iniciación (Hickerson et al. 2005; Berk et al. 2006).

El análisis de mutagénesis dirigida sobre el residuo *G922* lo ha marcado como un residuo clave en la zona mostrando una reducción muy grande de la actividad ribosomal al presentar una sustitución G por A (Dunning 2016) o una reducción en la unión del RNAt al cambiar una G por U (Ericson et al. 1995). A falta de datos de crecimiento, consideramos que hay suficiente evidencia para clasificar dicha mutación como “L, presuntamente disruptiva”.

568U>C (m.1215U>C)

Esta mutación fue encontrada en una muestra de tejido de tumor ovárico, con un porcentaje de heteroplasma de un 97,37% (Ju et al. 2014). El análisis estructural mostró interacciones canónicas de Watson y Crick con su contraparte 684A (m.1331). Siendo los residuos heterólogos bacterianos *U961* para 568U y *A1201* para 684A.

Esta mutación 28% homoplásmica extraída de un paciente con cáncer de próstata (Ju et al. 2014). El análisis estructural ha mostrado cierta relevancia. Establece interacción de Watson y Crick con 832C y mediante la ribosa establece un puente de hidrógeno con la base de 835A. 832C establece a su vez interacción mediante la ribosa, con la ribosa del residuo

con la base de 835A. 832C establece a su vez interacción mediante la ribosa, con la ribosa del residuo

Esta mutación se encuentra en una zona denominada hélice h34. Esta región es un elemento importante en la cabeza del ribosoma y se ha implicado en funciones como la decodificación (Prescott et al. 1991; Prescott & Kornau 1992;

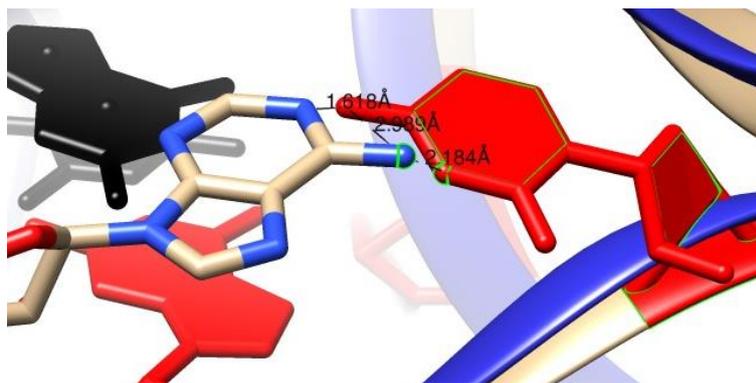


Ilustración 9. Se muestra en rojo (superior) el residuo 568U. Las interacciones se detallan a continuación:

A 1331 N1 <-> U 1215 O4: 1.618

U 1215 N3 <-> A 1331 N6: 2.184.

Moine & Dahlberg 1994), durante la fase de elongación, en la translocación (Bilgin et al. 1990; Matassova et al. 2001; Peske et al. 2004) y recientemente en el inicio de la traducción (Yassin et al. 2005).

Se han encontrado información de mutagénesis dirigida en *E. coli*. En ellos se describió el cambio de base *U961A*. Dicha mutación no tuvo un efecto directo en la viabilidad celular, pero si tuvo efectos en procesos celulares como la asociación de las subunidades del ribosoma, que mostró necesitar concentraciones mayores de Mg^{2+} para que se produjese la asociación para la formación de la unidad 70S (Kubarenko et al. 2006) aunque dicha asociación fue restaurada al introducir la mutación *A1251U* que reestructuraba las interacciones entre las bases. Además, también se mostró que la mutación *U691A* derivaba en un aumento en la frecuencia de aparición de errores sin sentido disminuyendo la fidelidad de la traducción (Kubarenko et al. 2006).

Aunque los datos de crecimiento en bacterias apuntan a un fenotipo silencioso de la mutación, los datos funcionales apuntados, junto con la altísima presencia de la mutación sugieren que en caso de haber efectos sutiles de la mutación en la actividad ribosomal mitocondrial la posibilidad de que se manifiesten en un fenotipo patogénico es alta. Por lo tanto, consideramos esta mutación NEE “sin evidencia suficiente”.

570G>A (m.1217G>A)

La mutación 570G>A fue encontrada en tumor procedente de tejido mamario con un grado de heteroplasma del 7,42% (Ju et al. 2014). Estructuralmente pudo observarse que 570G establece interacciones canónicas de Watson y Crick con la 579C (m.C1226). El homólogo bacteriano para 570G es el *G963* la cual tiene por base conjugada a la altamente conservada *G972*. Estos residuos se sitúan muy próximos al

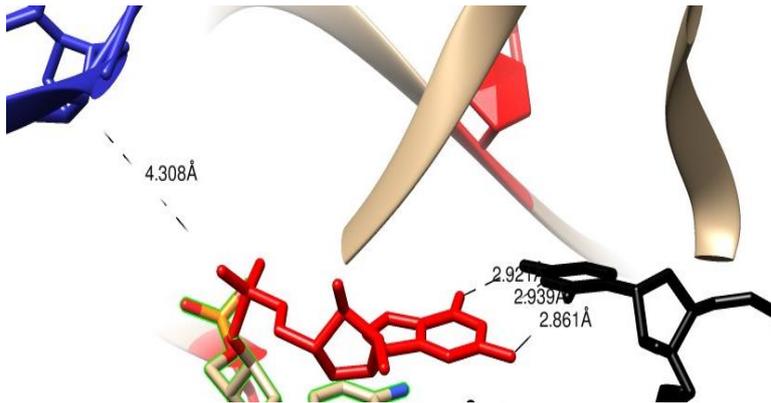


Ilustración 10. Se muestra en rojo el residuo 570G y en negro 579C. El análisis estructural reveló las siguientes interacciones:
 C 1226 O2 <-> G 1217 N2: 2.861
 G 1217 N1 <-> C 1226 N3: 2.939
 G 1217 O6 <-> C 1226 N4: 2.921
 G 1217 OP1 <-> U 32 OP1: 4.308

sitio de interacción codón-anticodón de los sitios A y P del ribosoma (se observa una distancia aproximada de unos 4,3 Å).

Este par de bases parece ser muy importante para la estabilización de la complicada estructural de

la hélice h31 (Smith et al. 2014) y mutaciones en la posición G972 se relacionan con defectos moderados pero dominantes en el crecimiento celular (Yassin et al. 2005) cobrando especial sentido en este caso debido a la proximidad de la zona mutada al sitio A de decodificación.

Estudios *in silico* han mostrado también importancia en el residuo G972 debido a la interacción del mismo con el factor ribosomal RbfA (Sekhar & Malik 2015) necesario para el procesamiento correcto del RNAr 16S (Dammel & Noller 1995; Bylund et al. 1998).

Estos hallazgos concuerdan perfectamente con otros ya predichos para la base pareja a la G570, la C579 (m. C1226) (Smith et al. 2014) y hacen que se pueda clasificar a la mutación 570G>A como C “ciertamente disruptiva”. Sin embargo, es muy posible que al bajo nivel de heteroplasmia detectado, los efectos patogénicos de la mutación sean nulos.

580G>A (m.1227G>A)

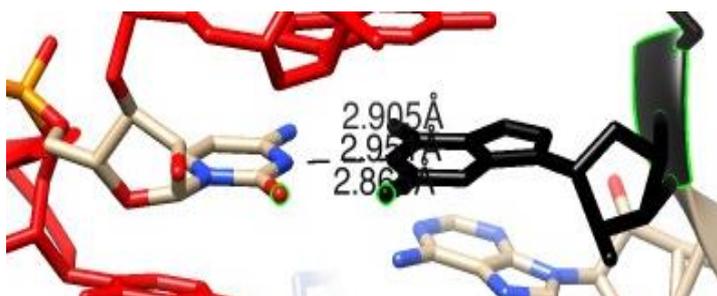


Ilustración 11. Se muestran las interacciones descritas para 580G (en negro):

G 1227 O6 <-> C 1216 N4: 2.905
 C 1216 N3 <-> G 1227 N1: 2.951
 G 1227 N2 <-> C 1216 O2: 2.865

Esta mutación se encontró en dos tejidos tumorales distintos, uno procedente de osteosarcoma, con un grado de heteroplasmia

del 20% y otro procedente de un carcinoma hepatocelular con un grado de heteroplasma del 88,7% (Ju et al. 2014). Tras su análisis estructural pudo concluirse que las interacciones que presenta dicho residuo son interacciones canónicas de Watson y Crick con su base apareada 569C (m. 1216C). Sus posiciones equivalentes en bacteria se corresponden con el par de bases *G973:C962*.

Al igual que la mutación anterior, la base *G973* en bacterias juega un papel muy importante en la estabilización de la hélice h31, pero en este caso, una mutación en dicho lugar genera un crecimiento celular gravemente afectado (Yassin et al. 2005). Este residuo también juega un papel importante en la unión del factor de maduración ribosomal rimM (Woodson 2008), necesario para el correcto ensamblaje y maduración de la unidad 30S (Bylund et al. 1997; Bylund et al. 1998; Bunner et al. 2010).

Nuevamente esto concuerda con lo predicho por el método HIA en base al modelo bacteriano (Smith et al. 2014) permitiendo identificar a esta mutación como C “ciertamente disruptiva”, pudiendo incluso tener efectos patogénicos a bajos niveles de heteroplasma.

838G>A (m.1485G>A)

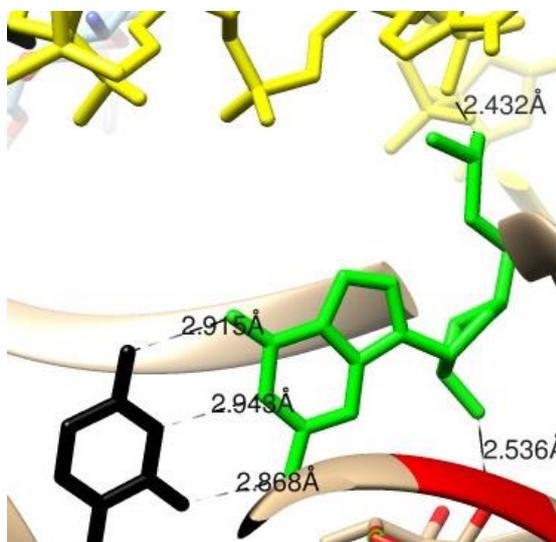


Ilustración 12. El residuo 838G (verde) establece muchas interacciones; de las cuales resalta la que presenta con el RNAm (amarillo):

G 1485 N2 <-> C 1566 O2: 2.868
G 1485 N1 <-> C 1566 N3: 2.943
G 1485 O6 <-> C 1566 N4: 2.915
U 19 OP1 <-> G 1485 OP1: 2.432
C 1479 O2' <-> G 1485 O2': 2.536.

Esta mutación heteroplásmica en un 7% se encontró en un paciente con síndrome mielodisplásico (Ju et al. 2014). El estudio estructural mostró que forma un par de bases conjugado con la base 919C. Se han establecido los homólogos bacterianos para ambas bases, siendo *G1401* para 838G y *C1501* para 919C. Puede observarse la proximidad de las pares de bases al RNAm, en la que se observa que la base 838G presenta una interacción directa con el RNAm con una distancia de 2,432 Å.

Se ha observado que las mutaciones en la posición 1401 en *E. Coli* suprimen casi por completo toda actividad funcional del

ribosomal (Cunningham, Nurse, Weitzmann, et al. 1992) y que la creación del doble

mutante *C1401:G1501* restablece la actividad casi a los valores naturales en la formación del complejo de iniciación 30S, pero no permite establecer la formación del primer enlace peptídico, explicando por tanto su ausencia en las variantes wild-type (Cunningham, Nurse, Bakin, et al. 1992), debido a la incapacidad de unir los RNAs elongadores al sitio P (Ringquist et al. 1993).

Además, la posición adyacente a la *C1401*, la *C1400*, se sitúa justo en la posición 34 del sitio P para el RNAt (Carter et al. 2000), por lo que cambios en su estructura modifican de manera significativa el proceso de traducción inhibiendo hasta en un 80% el proceso cuando en dicha posición se sustituye la C por la A (Hui et al. 1988). Nuevamente estos datos concuerdan con los obtenidos en el estudio de la base pareja C919 (m.C1566) por método HIA en el modelo bacteriano (Smith et al. 2014). Es por ello que se clasifica dicha mutación como “C, ciertamente disruptiva”, pudiendo incluso resultar patogénica a los bajos niveles de heteroplasma detectados.

Conclusiones

En este estudio hemos identificado 250 mutaciones somáticas (Apéndice secciones I y II) que afectan a los genes de los RNAs mitocondriales y que presentan una posible asociación a procesos cancerosos. De estas mutaciones hemos asignado 109 al gen que codifica el RNAr-mt 12S y hemos identificado sus posiciones en la estructura secundaria y en la tridimensional de alta resolución del mitorribosoma (Tabla Apéndice sección I). Finalmente hemos realizado un análisis exhaustivo de HIA de un subgrupo de residuos cuya localización los hacía altamente interesantes.

De estos residuos hemos clasificado 1 como “seguramente no disruptivo”, 1 como NEE, 1 como “presuntamente disruptivos” y 6 como “ciertamente disruptiva”. Este tipo de mutaciones altamente nocivas, así como otras del mismo tipo ya analizadas por nuestro grupo (Smith et al. 2014; Elson et al. 2015), sugieren la posibilidad de que se hallen sometidas a algún tipo de selección genética en tejidos cancerosos. Para el resto de las mutaciones ciertamente disruptivas, cuya heteroplasmia no permite su asignación como patogénicas, hemos de indicar que su presencia en cánceres es altamente sugerente. La idea de que estas mutaciones puedan hallarse en proceso de selección en tumores, de modo que su presencia relativa pueda aumentar al crecer éstos no puede descartarse.

Anexo

I. Listado de mutaciones de la subunidad pequeña sujetas a análisis estructural

| POS. REAL | POS. RELAT. | BASE ORIG | MUTACION | HOMÓL. BACT. | BASE EN PROCARIOT. | INDICE CONSERV. |
|-----------|-------------|-----------|----------|--------------------|--------------------|-----------------|
| 657 | 10 | G | A | 15 | G | 1,686 |
| 659 | 12 | U | C | 17 | U | 1,919 |
| 664 | 17 | G | A | 22 | G | 0,88 |
| 667 | 20 | U | C | 25 | C | 0,643 |
| 721 | 74 | U | A | 120 | A | 0,921 |
| 727 | 80 | U | C | 129 | U | 0,26 |
| 730 | 83 | A | U | 131 | C | 0,507 |
| 737 | 90 | C | U | FALTA EN SECUENCIA | | |
| 749 | 102 | G | A | 235 | C | 0,335 |
| 751 | 104 | A | U | 237 | C | 0,438 |
| 758 | 111 | U | C | 244 | U | 1,882 |
| 759 | 112 | C | A | 245 | C | 0,926 |
| 766 | 119 | G | A | 252 | U | 1,023 |
| 770 | 123 | C | A | 256 | U | 0,85 |
| 777 | 130 | G | A | 275 | G | 1,815 |
| 791 | 144 | G | A | 289 | G | 0,965 |
| 791 | 144 | G | U | 289 | G | 0,965 |
| 822 | 175 | G | A | 359 | U | 0,515 |
| 831 | 184 | U | C | 368 | U | 1,959 |
| 831 | 184 | U | A | 368 | U | 1,959 |
| 854 | 207 | U | C | 391 | G | 0,572 |
| 857 | 210 | G | C | 394 | G | 1,856 |
| 879 | 232 | U | C | 507 | C | 1,513 |
| 887 | 240 | G | A | 515 | G | 1,951 |
| 888 | 241 | U | C | 516 | U | 1,964 |
| 902 | 255 | G | A | 530 | G | 1,931 |
| 903 | 256 | U | C | 532 | A | 1,293 |
| 933 | 286 | G | A | 567 | G | 1,33 |
| 947 | 300 | U | C | 582 | U | 0,793 |
| 955 | 308 | IN C | DEL C | FALTA EN SECUENCIA | | |
| 989 | 342 | U | C | 689 | C | 0,594 |
| 991 | 344 | G | A | 691 | U | 1,863 |
| 992 | 345 | U | C | 692 | U | 1,918 |
| 1000 | 353 | U | C | 700 | G | 0,529 |
| 1010 | 363 | A | C | 712 | A | 1,266 |
| 1016 | 369 | U | C | 719 | C | 0,839 |
| 1019 | 372 | IN U | IN U | 722 | A | 0,688 |
| 1024 | 377 | DEL A | DEL A | 730 | G | 0,992 |
| 1028 | 381 | G | A | 731 | G | 1,651 |
| 1031 | 384 | G | A | 734 | G | 0,329 |
| 1045 | 398 | G | A | 759 | A | 1,557 |
| 1046 | 399 | IN AC | IN AC | 760 | G | 0,493 |

| | | | | | | |
|------|-----|---|---|------|---|-------|
| 1073 | 426 | G | A | 785 | G | 1,231 |
| 1079 | 432 | G | A | 791 | G | 1,947 |
| 1082 | 435 | A | G | 794 | A | 1,935 |
| 1097 | 450 | G | A | 809 | G | 1,251 |
| 1113 | 466 | G | A | 825 | G | 0,519 |
| 1134 | 487 | G | A | 881 | G | 1,023 |
| 1147 | 500 | G | A | 894 | G | 1,454 |
| 1154 | 507 | A | C | 901 | A | 1,696 |
| 1169 | 522 | G | A | 916 | G | 1,411 |
| 1175 | 528 | G | A | 922 | G | 1,944 |
| 1178 | 531 | G | U | 925 | G | 1,901 |
| 1180 | 533 | U | G | 927 | G | 0,763 |
| 1180 | 533 | U | C | 927 | G | 0,763 |
| 1196 | 549 | A | G | 941 | G | 0,687 |
| 1202 | 555 | G | A | 947 | G | 1,425 |
| 1207 | 560 | U | C | 952 | U | 1,175 |
| 1215 | 568 | U | C | 961 | U | 1,725 |
| 1217 | 570 | G | A | 963 | G | 1,959 |
| 1226 | 579 | C | G | 972 | C | 1,957 |
| 1227 | 580 | G | A | 973 | G | 1,708 |
| 1248 | 601 | C | T | 994 | A | 0,284 |
| 1249 | 602 | U | C | 995 | C | 0,253 |
| 1282 | 635 | G | A | 1076 | C | 0,64 |
| 1285 | 638 | G | A | 1079 | G | 1,224 |
| 1301 | 654 | G | A | 1106 | G | 1,314 |
| 1320 | 673 | G | A | 1190 | G | 0,726 |
| 1323 | 676 | G | A | 1193 | G | 1,316 |
| 1327 | 680 | G | A | 1197 | G | 1,056 |
| 1332 | 685 | A | U | 1201 | A | 0,684 |
| 1333 | 686 | G | A | 1202 | G | 0,673 |
| 1336 | 689 | G | A | 1206 | G | 1,746 |
| 1339 | 692 | G | A | 1209 | C | 1,192 |
| 1348 | 701 | G | A | 1218 | C | 0,436 |
| 1350 | 703 | G | A | 1220 | G | 1,833 |
| 1362 | 715 | G | A | 1233 | G | 1,447 |
| 1397 | 750 | U | C | 1312 | G | 0,626 |
| 1401 | 754 | G | A | 1316 | G | 1,928 |
| 1403 | 756 | G | ? | 1319 | A | 1,939 |
| 1415 | 768 | G | A | 1331 | G | 1,334 |
| 1418 | 771 | G | A | 1335 | C | 0,399 |
| 1419 | 772 | G | A | 1336 | C | 0,468 |
| 1422 | 775 | G | A | 1338 | G | 1,944 |
| 1424 | 777 | U | C | 1340 | A | 0,736 |
| 1428 | 781 | G | A | 1344 | C | 1,254 |
| 1434 | 787 | A | G | 1350 | G | 1,761 |

| | | | | | | |
|------|-----|---|---|--------------------|---|-------|
| 1435 | 788 | A | G | 1351 | U | 0,753 |
| 1443 | 796 | U | C | 1359 | C | 1,319 |
| 1457 | 810 | G | A | 1363 | G | 1,276 |
| 1458 | 811 | A | G | 1374 | A | 1,923 |
| 1464 | 817 | G | A | 1379 | G | 1,719 |
| 1474 | 827 | G | A | 1390 | U | 1,246 |
| 1485 | 838 | G | A | 1401 | G | 1,885 |
| 1494 | 847 | C | U | 1410 | G | 0,24 |
| 1496 | 849 | U | C | 1412 | C | 1,245 |
| 1499 | 852 | U | C | 1415 | G | 0,669 |
| 1549 | 902 | G | A | 1484 | C | 0,302 |
| 1551 | 904 | G | A | 1486 | G | 0,817 |
| 1552 | 905 | G | A | 1490 | C | 0,201 |
| 1555 | 908 | A | G | 1487 | G | 1,204 |
| 1557 | 910 | A | C | FALTA EN SECUENCIA | | |
| 1562 | 915 | G | A | 1497 | G | 1,954 |
| 1566 | 919 | C | U | 1501 | C | 1,864 |
| 1574 | 927 | G | A | 1509 | C | 1,097 |
| 1581 | 934 | G | A | 1516 | G | 0,847 |
| 1586 | 939 | G | A | 1521 | G | 0,824 |
| 1592 | 945 | U | C | 1527 | C | 0,263 |
| 1597 | 950 | C | A | FALTA EN SECUENCIA | | |

II. Listado de mutaciones identificadas de la subunidad grande del ribosoma mitocondrial susceptibles de estar relacionadas con procesos tumorales.

| POS. REAL | POS. RELAT. | BASE ORIG | MUTACION | POS. REAL | POS. RELAT. | BASE ORIG | MUTACION |
|-----------|-------------|-----------|----------|-----------|-------------|-----------|---------------------|
| 1681 | 11 | G | A | 2492 | 822 | G | T |
| 1704 | 34 | T | C | 2492 | 822 | G | A |
| 1730 | 60 | T | C | 2510 | 840 | T | C |
| 1742 | 72 | G | C | 2521 | 851 | A | G |
| 1748 | 78 | G | A | 2537 | 867 | G | A |
| 1758 | 88 | T | C | 2542 | 872 | G | A |
| 1770 | 100 | G | A | 2552 | 882 | T | C |
| 1786 | 116 | C | T | 2571 | 901 | G | A |
| 1787 | 117 | G | A | 2573 | 903 | G | A |
| 1791 | 121 | G | A | 2574 | 904 | G | T |
| 1792 | 122 | G | A | 2584 | 914 | C | A |
| 1806 | 136 | T | C | 2585 | 915 | G | A |
| 1858 | 188 | G | A | 2602 | 932 | T | C |
| 1870 | 200 | A | G | 2607 | 937 | T | C |
| 1900 | 230 | A | +C | 2618 | 948 | T | C |
| 1906 | 236 | G | A | 2621 | 951 | G | A |
| 1906 | 236 | G | C | 2627 | 957 | G | A |
| 1913 | 243 | G | A | 2635 | 965 | G | A |
| 1927 | 257 | G | A | 2656 | 986 | T | C |
| 1932 | 262 | G | A | 2658 | 988 | T | C |
| 1945 | 275 | A | T | 2675 | 1005 | G | A |
| 1949 | 279 | G | C | 2686 | 1016 | G | A |
| 1955 | 285 | G | A | 2699 | 1029 | C | G |
| 1969 | 299 | G | A | 2716 | 1046 | G | A |
| 1975 | 305 | T | C | 2732 | 1062 | G | A |
| 1980 | 310 | A | G | 2776 | 1106 | G | A |
| 1981 | 311 | G | A | 2777 | 1107 | G | A |
| 1985 | 315 | G | +T | 2781 | 1111 | T | C |
| 1986 | 316 | A | G | 2810 | 1140 | G | A |
| 1987 | 317 | G | A | 2814 | 1144 | G | A |
| 1988 | 318 | G | A | 2816 | 1146 | G | A |
| 1999 | 329 | A | G | 2819 | 1149 | G | A |
| 2024 | 354 | C | T | 2819 | 1149 | G | -ACCTCGGAGCAGAACCCA |
| 2037 | 367 | T | C | 2825 | 1155 | G | A |
| 2069 | 399 | T | C | 2828 | 1158 | G | A |
| 2082 | 412 | G | A | 2876 | 1206 | G | A |
| 2085 | 415 | A | G | 2890 | 1220 | T | C |
| 2121 | 451 | G | A | 2896 | 1226 | G | A |
| 2129 | 459 | G | +A | 2909 | 1239 | G | A |
| 2132 | 462 | A | +T | 2914 | 1244 | A | G |

| | | | | | | | |
|------|-----|---|-----|------|------|---|---|
| 2141 | 471 | T | +AG | 2917 | 1247 | G | A |
| 2141 | 471 | T | -AG | 2932 | 1262 | G | A |
| 2143 | 473 | G | A | 2943 | 1273 | G | A |
| 2170 | 500 | G | A | 2957 | 1287 | G | A |
| 2188 | 518 | A | C | 2975 | 1305 | G | A |
| 2203 | 533 | G | A | 2988 | 1318 | C | A |
| 2233 | 563 | T | C | 2992 | 1322 | G | A |
| 2256 | 586 | T | C | 2996 | 1326 | G | A |
| 2269 | 599 | G | A | 2997 | 1327 | A | G |
| 2299 | 629 | T | C | 3001 | 1331 | G | A |
| 2300 | 630 | G | A | 3022 | 1352 | G | A |
| 2302 | 632 | T | C | 3034 | 1364 | T | C |
| 2313 | 643 | A | G | 3036 | 1366 | G | A |
| 2339 | 669 | G | A | 3041 | 1371 | T | C |
| 2343 | 673 | G | A | 3066 | 1396 | C | A |
| 2360 | 690 | T | C | 3068 | 1398 | G | A |
| 2372 | 702 | T | -A | 3068 | 1398 | G | T |
| 2377 | 707 | G | A | 3079 | 1409 | G | A |
| 2400 | 730 | C | A | 3080 | 1410 | G | A |
| 2408 | 738 | T | C | 3086 | 1416 | T | C |
| 2410 | 740 | T | C | | | | |
| 2411 | 741 | T | C | | | | |
| 2421 | 751 | G | A | | | | |
| 2445 | 775 | T | C | | | | |
| 2449 | 779 | G | A | | | | |
| 2456 | 786 | T | +A | | | | |
| 2465 | 795 | T | C | | | | |
| 2465 | 795 | T | +A | | | | |
| 2476 | 806 | C | -G | | | | |
| 2478 | 808 | G | A | | | | |
| 2491 | 821 | C | T | | | | |

Bibliografía

- Amunts, A. et al., 2015. Ribosome. The structure of the human mitochondrial ribosome. *Science (New York, N.Y.)*, 348(6230), pp.95–8.
- Amunts, A. et al., 2014. Structure of the yeast mitochondrial large ribosomal subunit. *Science*, 343, pp.1485–1489.
- Anderson, S. et al., 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290(5806), pp.457–65.
- Andersson, G.E. & Kurland, C.G., 1991. An extreme codon preference strategy: codon reassignment. *Molecular biology and evolution*, 8(4), pp.530–44.
- Astuti, D. et al., 2001. Gene Mutations in the Succinate Dehydrogenase Subunit SDHB Cause Susceptibility to Familial Pheochromocytoma and to Familial Paraganglioma. *The American Journal of Human Genetics*, 69(1), pp.49–54.
- Bai, X., McMullan, G. & Scheres, S.H., 2014. How cryo-EM is revolutionizing structural biology. *Trends in Biochemical Sciences*, 40(1), pp.49–57.
- Baysal, B.E. et al., 2000. Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5454), pp.848–51.
- Becker, T., Böttinger, L. & Pfanner, N., 2012. Mitochondrial protein import: from transport pathways to an integrated network. *Trends in biochemical sciences*, 37(3), pp.85–91.
- Berk, V. et al., 2006. Structural basis for mRNA and tRNA positioning on the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(43), pp.15830–4.
- Bilgin, N. et al., 1990. Ribosomal RNA and protein mutants resistant to spectinomycin. *The EMBO journal*, 9(3), pp.735–9.
- Bogenhagen, D.F., Rousseau, D. & Burke, S., 2008. The layered structure of human mitochondrial DNA nucleoids. *The Journal of biological chemistry*, 283(6), pp.3665–75.
- Böttger, E.C., 2010. Mutant A1555G mitochondrial 12S rRNA and aminoglycoside susceptibility. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(7), pp.3073–4; author reply 3074–5.
- Brandon, M., Baldi, P. & Wallace, D.C., 2006. Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene*, 25(34), pp.4647–62.
- Brown, A. et al., 2014. Structure of the large ribosomal subunit from human mitochondria. *Science (New York, N.Y.)*, 346(6210), pp.718–22.
- Bunner, A.E. et al., 2010. *The Effect of Ribosome Assembly Cofactors on In Vitro 30S Subunit Reconstitution*,
- Bylund, G.O. et al., 1997. A novel ribosome-associated protein is important for efficient translation in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 179(14), pp.4567–74.
- Bylund, G.O. et al., 1998. RimM and RbfA are essential for efficient processing of 16S rRNA in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 180(1), pp.73–82.
- Cannone, J.J. et al., 2002. The comparative RNA web (CRW) site: an online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron, and other RNAs. *BMC bioinformatics*, 3, p.2.
- Carter, A.P. et al., 2000. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature*, 407(6802), pp.340–8.
- Cavdar Koc, E. et al., 2001. The small subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. Identification of the full complement of ribosomal proteins present. *The Journal of biological chemistry*, 276(22), pp.19363–74.
- Coller, H.A. et al., 2001. High frequency of homoplasmic mitochondrial DNA mutations in human tumors can be explained without selection. *Nature genetics*, 28(2), pp.147–50.

- Craigien, W.J., 2012. Mitochondrial DNA mutations: an overview of clinical and molecular aspects. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 837, pp.3–15.
- Cunningham, P.R., Nurse, K., Weitzmann, C.J., et al., 1992. G1401: a keystone nucleotide at the decoding site of Escherichia coli 30S ribosomes. *Biochemistry*, 31(33), pp.7629–37.
- Cunningham, P.R., Nurse, K., Bakin, A., et al., 1992. Interaction between the two conserved single-stranded regions at the decoding site of small subunit ribosomal RNA is essential for ribosome function. *Biochemistry*, 31(48), pp.12012–22.
- Dammel, C.S. & Noller, H.F., 1995. Suppression of a cold-sensitive mutation in 16S rRNA by overexpression of a novel ribosome-binding factor, RbfA. *Genes & development*, 9(5), pp.626–37.
- Davis, C.F. et al., 2014. The somatic genomic landscape of chromophobe renal cell carcinoma. *Cancer cell*, 26(3), pp.319–30.
- Dunning, A., 2016. *Effects of mutations in helix h28 of 16S rRNA on translation initiation in E. coli*. The Ohio State University.
- Elson, J.L., Smith, P.M. & Vila-Sanjurjo, A., 2015. Heterologous inferential analysis (HIA) as a method to understand the role of mitochondrial rRNA mutations in pathogenesis. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1264, pp.369–83.
- Ericson, G., Minchew, P. & Wollenzien, P., 1995. Structural changes in base-paired region 28 in 16 S rRNA close to the decoding region of the 30 S ribosomal subunit are correlated to changes in tRNA binding. *Journal of molecular biology*, 250(4), pp.407–19.
- Fliss, M.S. et al., 2000. Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5460), pp.2017–9.
- Gaspari, M., Larsson, N.-G. & Gustafsson, C.M., 2004. The transcription machinery in mammalian mitochondria. *Biochimica et biophysica acta*, 1659(2-3), pp.148–52.
- George, J., 1997. *An Introduction to Hydrogen Bonding*, Oxford University Press.
- Gray, M.W., Burger, G. & Lang, B.F., 2001. The origin and early evolution of mitochondria. *Genome biology*, 2(6), p.REVIEWS1018.
- Greber, B. et al., 2014. Architecture of the Large Subunit of the Mammalian Mitochondrial Ribosome. *Nature*, 505, p.515.
- Greber, B.J. et al., 2015. Ribosome. The complete structure of the 55S mammalian mitochondrial ribosome. *Science (New York, N.Y.)*, 348(6232), pp.303–8.
- Greber, B.J. et al., 2014. The complete structure of the large subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. *Nature*, 515(7526), pp.283–6.
- Hickerson, R. et al., 2005. Measurement of internal movements within the 30 S ribosomal subunit using Forster resonance energy transfer. *Journal of Molecular Biology*, 354(2), pp.459–472.
- Hui, A.S., Eaton, D.H. & de Boer, H.A., 1988. Mutagenesis at the mRNA decoding site in the 16S ribosomal RNA using the specialized ribosome system in Escherichia coli. *The EMBO journal*, 7(13), pp.4383–8.
- Ju, Y.S. et al., 2014. Origins and functional consequences of somatic mitochondrial DNA mutations in human cancer. *eLife*, 3, pp.1–28.
- Kasamatsu, H. & Vinograd, J., 1974. Replication of circular DNA in eukaryotic cells. *Annual review of biochemistry*, 43, pp.695–719.
- Kaushal, P. et al., 2014. Cryo-EM structure of the small subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 111, pp.7284–7289.
- Kleywegt, G.J. & Jones, T.A., 1997. Model building and refinement practice. *Methods in enzymology*, 277, pp.208–30.

- Koc, E.C. & Koc, H., 2013. Translation in Mitochondria and Other Organelles. In A.-M. Duchêne, ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 29–53.
- Kubarenko, A. et al., 2006. Involvement of helix 34 of 16 S rRNA in decoding and translocation on the ribosome. *The Journal of biological chemistry*, 281(46), pp.35235–44.
- Kühlbrandt, W., 2014. Biochemistry. The resolution revolution. *Science (New York, N.Y.)*, 343(6178), pp.1443–4.
- Larman, T.C. et al., 2012. Spectrum of somatic mitochondrial mutations in five cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(35), pp.14087–91.
- Lehtonen, R. et al., 2004. Biallelic Inactivation of Fumarate Hydratase (FH) Occurs in Nonsyndromic Uterine Leiomyomas but Is Rare in Other Tumors. *The American Journal of Pathology*, 164(1), pp.17–22.
- Li, M. et al., 2010. Detecting heteroplasmy from high-throughput sequencing of complete human mitochondrial DNA genomes. *American journal of human genetics*, 87(2), pp.237–49.
- Matassova, A.B., Rodnina, M. V & Wintermeyer, W., 2001. Elongation factor G-induced structural change in helix 34 of 16S rRNA related to translocation on the ribosome. *RNA (New York, N.Y.)*, 7(12), pp.1879–85.
- McMahon, S. & LaFramboise, T., 2014. Mutational patterns in the breast cancer mitochondrial genome, with clinical correlates. *Carcinogenesis*, 35(5), pp.1046–54.
- Mears, J.A. et al., 2006. A structural model for the large subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. *J Mol Biol.*, 358(1), pp.193–212.
- Mohan, S., Donohue, J.P. & Noller, H.F., 2014. Molecular mechanics of 30S subunit head rotation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(37), pp.13325–30.
- Moine, H. & Dahlberg, A.E., 1994. Mutations in Helix 34 of Escherichia coli 16 S Ribosomal RNA Have Multiple Effects on Ribosome Function and Synthesis. *Journal of Molecular Biology*, 243(3), pp.402–412.
- Nass, M.M., 1966. The circularity of mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 56(4), pp.1215–22.
- Niemann, S. & Müller, U., 2000. Mutations in SDHC cause autosomal dominant paraganglioma, type 3. *Nature genetics*, 26(3), pp.268–70.
- Noller, H.F., 1991. Ribosomal RNA and translation. *Annual review of biochemistry*, 60, pp.191–227.
- O'Connor, M. et al., 1997. Decoding fidelity at the ribosomal A and P sites: influence of mutations in three different regions of the decoding domain in 16S rRNA. *Nucleic acids research*, 25(6), pp.1185–93.
- Ogle, J.M. et al., 2001. Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5518), pp.897–902.
- Pagliarini, D.J. et al., 2008. A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell*, 134(1), pp.112–23.
- Peske, F. et al., 2004. Conformational Changes of the Small Ribosomal Subunit During Elongation Factor G-dependent tRNA–mRNA Translocation. *Journal of Molecular Biology*, 343(5), pp.1183–1194.
- Pettersen, E.F. et al., 2004. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, 25(13), pp.1605–12.
- Polyak, K. et al., 1998. Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours. *Nature genetics*, 20(3), pp.291–3.
- Poot, R.A. et al., 1998. Base complementarity in helix 2 of the central pseudoknot in 16S rRNA is essential for ribosome functioning. *Nucleic acids research*, 26(2), pp.549–53.

- Popot, J.L. & de Vitry, C., 1990. On the microassembly of integral membrane proteins. *Annual review of biophysics and biophysical chemistry*, 19, pp.369–403.
- Powers, T. & Noller, H.F., 1990. Dominant lethal mutations in a conserved loop in 16S rRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(3), pp.1042–6.
- Prescott, C., Krabben, L. & Nierhaus, K., 1991. Ribosomes containing the C1054-deletion mutation in *E.coli* 16S rRNA act as suppressors at all three nonsense codons. *Nucleic Acids Research*, 19(19), pp.5281–5283.
- Prescott, C.D. & Kornau, H.-C., 1992. Mutations in *E.Coli* 16S rRNA that enhance and decrease the activity of a Suppressor tRNA. *Nucleic Acids Research*, 20(7), pp.1567–1571.
- Ringquist, S. et al., 1993. Nature of the ribosomal mRNA track: analysis of ribosome-binding sites containing different sequences and secondary structures. *Biochemistry*, 32(38), pp.10254–62.
- Santer, M. et al., 2002. Functional effects of a G to U base change at position 530 in a highly conserved loop of *Escherichia coli* 16S RNA.
- Sekhar, G. & Malik, S.C., 2015. Understanding the Role of Point Mutations in RbfA of *Escherichia coli*: Insights from In silico Modeling and Docking Studies. , 3(2).
- Sharma, M.R. et al., 2003. Structure of the mammalian mitochondrial ribosome reveals an expanded functional role for its component proteins. *Cell*, 115(1), pp.97–108.
- Sharma, M.R. et al., 2003. Structure of the mammalian mitochondrial ribosome reveals an expanded functional role for its component proteins. *Cell*, 115(1), pp.97–108.
- Sharma, M.R. et al., 2013. Translation in Mitochondria and Other Organelles. In A.-M. Duchêne, ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 1–28.
- Smith, P.M. et al., 2014. The role of the mitochondrial ribosome in human disease: searching for mutations in 12S mitochondrial rRNA with high disruptive potential. *Human molecular genetics*, 23(4), pp.949–67.
- Sutovsky, P. et al., 1997. Mitochondrial sheath movement and detachment in mammalian, but not nonmammalian, sperm induced by disulfide bond reduction. *Molecular reproduction and development*, 47(1), pp.79–86.
- Suzuki, T. et al., 2001. Structural compensation for the deficit of rRNA with proteins in the mammalian mitochondrial ribosome. Systematic analysis of protein components of the large ribosomal subunit from mammalian mitochondria. *The Journal of biological chemistry*, 276(24), pp.21724–36.
- Tapprich, W.E., Goss, D.J. & Dahlberg, A.E., 1989. Mutation at position 791 in *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA affects processes involved in the initiation of protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(13), pp.4927–31.
- Taylor, S.D. et al., 2005. The conserved Mec1/Rad53 nuclear checkpoint pathway regulates mitochondrial DNA copy number in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*, 16(6), pp.3010–8.
- Temperley, R.J. et al., 2010. Human mitochondrial mRNAs-like members of all families, similar but different. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1797(6-7), pp.1081–1085.
- Triman, K.L., 2007. Mutational analysis of the ribosome. *Advances in genetics*, 58(06), pp.89–119.
- Vanharanta, S. et al., 2004. Early-Onset Renal Cell Carcinoma as a Novel Extraparaganglial Component of SDHB-Associated Heritable Paraganglioma. *The American Journal of Human Genetics*, 74(1), pp.153–159.
- Wallace, D.C., 2007. Why do we still have a maternally inherited mitochondrial DNA? Insights from evolutionary medicine. *Annual review of biochemistry*, 76, pp.781–821.

- Wang, J. et al., 2012. An integrated approach for classifying mitochondrial DNA variants: one clinical diagnostic laboratory's experience. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 14(6), pp.620–6.
- Woodson, S.A., 2008. RNA folding and ribosome assembly. *Current opinion in chemical biology*, 12(6), pp.667–73.
- Yassin, A., Fredrick, K. & Mankin, A.S., 2005. Deleterious mutations in small subunit ribosomal RNA identify functional sites and potential targets for antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(46), pp.16620–16625.