

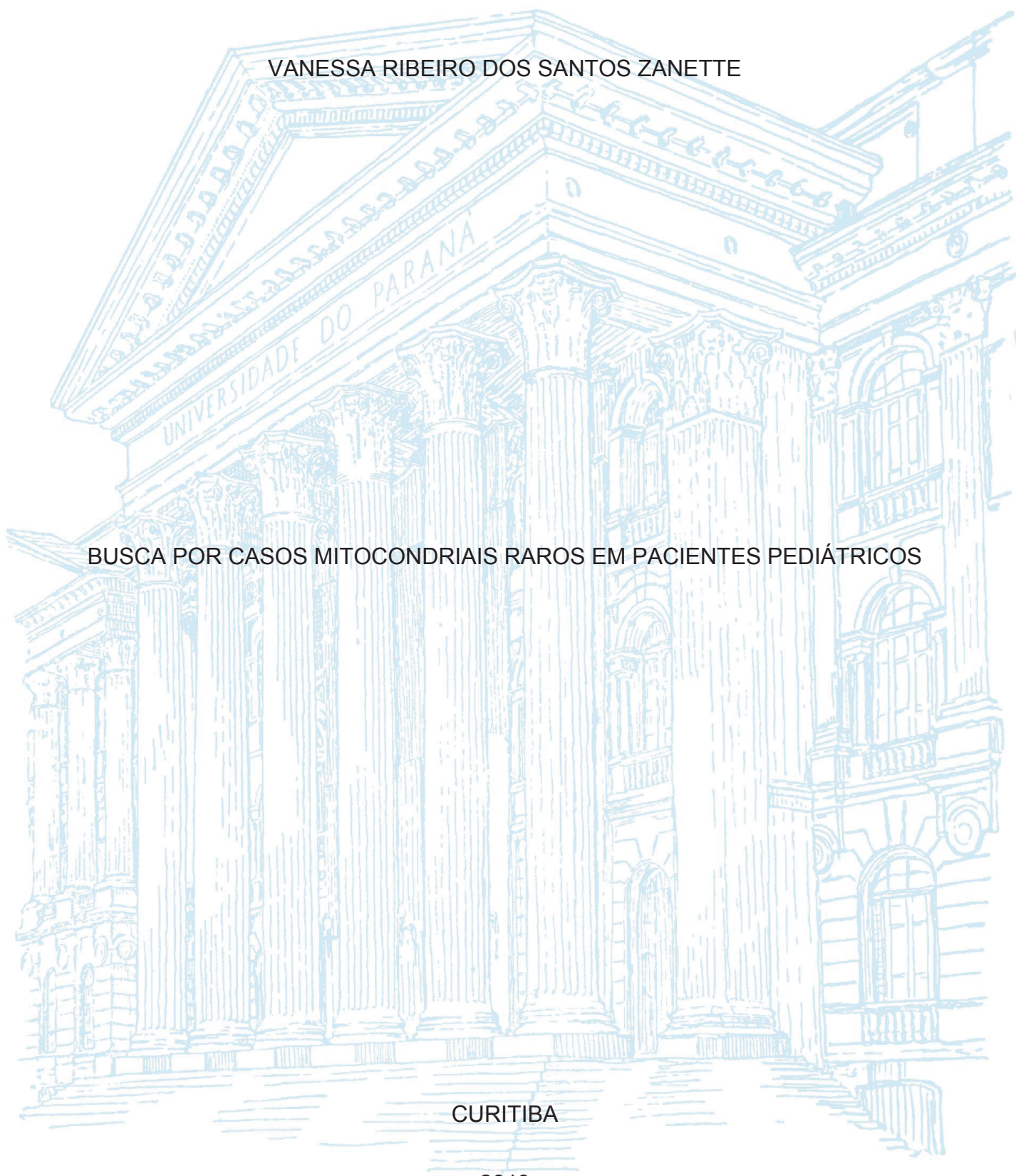
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VANESSA RIBEIRO DOS SANTOS ZANETTE

BUSCA POR CASOS MITOCONDRIAIS RAROS EM PACIENTES PEDIÁTRICOS

CURITIBA

2019



VANESSA RIBEIRO DOS SANTOS ZANETTE

BUSCA POR CASOS MITOCONDRIAIS RAROS EM PACIENTES PEDIÁTRICOS

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Genética.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ricardo Lehtonen R. de Souza

COORIENTADORA: Dra. Cristiane Benincá

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Zanette, Vanessa Ribeiro dos Santos
Busca por casos mitocondriais raros em pacientes pediátricos. /
Vanessa Ribeiro dos Santos Zanette. – Curitiba, 2019.
173 p. : il.

Orientador: Ricardo Lehtonen R. de Souza
Coorientadores: Cristiane Benincá

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Doenças mitocondriais 2. Exoma 3. Técnicas de diagnóstico
molecular I. Título II. Souza, Ricardo Lehtonen Rodrigues de, 1970- III.
Benincá, Cristiane IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (22. ed.) 572.880



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO GENÉTICA -
40001016006P1

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **VANESSA RIBEIRO DOS SANTOS ZANETTE** intitulada: **Busca por casos mitocondriais raros em indivíduos pediátricos**, sob orientação do Prof. Dr. RICARDO LEHTONEN RODRIGUES DE SOUZA, que após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 31 de Julho de 2019.

RICARDO LEHTONEN RODRIGUES DE SOUZA

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

ÁTILA FERNANDO VISINONI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE POSITIVO)

MARA LÚCIA CORDEIRO

Avaliador Externo (FACULDADES PEQUENO PRÍNCIPE)

NINA AMÁLIA BRÂNCIA PAGNAN

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

ADECIMENTOS

Quero começar agradecendo aos meus orientadores, Prof. Dr. Ricardo Lehtonen R. de Souza, por aceitar me orientar em um projeto fora de sua linha de pesquisa e principalmente à Dra. Cristiane Benincá, por me apresentar ao mundo das mitocôndrias e suas doenças, pelo voto de confiança e parceria nos altos e baixos destes anos e por, mesmo estando a 9868 km de distância, ser absurdamente presente.

Obrigada à Dra. Mara Lúcia S. Schimitz, por ir além da rotina médica e buscar tão arduamente ajudar seus pacientes, sem seu interesse na busca pelo diagnóstico genético este projeto não teria acontecido.

Obrigada ao Departamento de Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Paraná, em especial ao professor Dr. Edvaldo da Silva Trindade e seus orientandos, por disponibilizar o laboratório de cultivo celular e por serem tão dispostos a ajudar quando necessário.

Obrigada a minha família, em especial ao meu marido, Davidson L. Z. Xavier, pelo apoio, presença e por acreditar em mim, sem sua participação eu não estaria onde estou hoje, e à minha pequena Luiza, por ter trazido sorrisos e alegrias para contrapor as tensões de lidar com crianças em situações tão debilitantes. Obrigada por me ajudarem a ser alguém melhor a cada dia, amo vocês!

Sou grata à vida, por ter usado o doutorado para colocar no meu caminho uma amiga tão especial chamada Lorena. Obrigada “Tia Lô” por ser parte da minha vida e me ouvir (as coisas boas e ruins), sem você esse caminho teria sido muito menos divertido.

Aos colegas do Laboratório de polimorfismos, em especial a técnica de laboratório Amanda, obrigada pelas risadas, pelos papos sérios e por toda ajuda nesta caminhada.

RESUMO

Mitocôndrias são organelas celulares complexas envolvidas em diversos processos celulares e principalmente na produção energética, em forma de ATP, o que ocorre através do sistema de fosforilação oxidativa (OXPHOS) localizado nas cristas mitocondriais (CM). Alterações em proteínas mitocondriais podem levar a deficiência energética e doenças mitocondriais (DM), expressando sintomas como atraso no desenvolvimento físico e cognitivo, fraqueza muscular, epilepsias, perda de visão ou audição, problemas gastrointestinais e falha de órgãos específicos em qualquer fase da vida. A exata prevalência de DM é difícil de se estabelecer devido sua heterogeneidade genética e clínica, porém, sugere-se uma prevalência infantil de aproximadamente 1/16000 pacientes na Europa. A classificação clínica tende a ser mais complexa que a genética, tendo em vista que a relação entre genótipo e fenótipo não é bem estabelecida. Esta complexidade muitas vezes torna o diagnóstico clínico impreciso e com variabilidade nas abordagens médicas, limitando o aconselhamento genético e impactam na busca por um diagnóstico adequado. Como opção para o diagnóstico genético, a realização de análise de sequenciamento de exoma (WES) tem ganhado cada vez mais espaço entre as DMs devido a sua maior abrangência, porém, no Brasil, a portaria 199/2014 do Ministério da Saúde, denominada “Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras”, não prevê diagnóstico a partir de WES para pacientes com DM e o acesso comercial a este exame não é viável para grande parte da população devido seu alto custo. Portanto, apesar dos avanços científicos, muitos casos de DM ainda deixam de ser diagnosticados geneticamente, sendo o objetivo deste trabalho o de realizar o diagnóstico genético de mutações em pacientes com DM, além de estudar as mutações encontradas, contribuindo assim, para o entendimento da fisiopatologia destas doenças. Foram revisados WES de 30 pacientes, dentre os quais 8 possuem mutações nunca descritas. Além disso, identificar novas proteínas com função mitocondrial e novos genes e mutações

associados ao desenvolvimento de DM é uma forma de somar conhecimento à área genética, facilitando o diagnóstico destas doenças no futuro.

PALAVRAS-CHAVES: Mitocondriopatias, exoma, diagnóstico molecular.

ABSTRACT

Mitochondria are complex cellular organelles involved in several cellular processes but mainly the energy production as ATP using the oxidative phosphorylation system (OXPHOS), localized in the mitochondrial cristae (CM). Deficiency in mitochondrial function leads to energy depletion and mitochondrial disease (DM), characterized by physical and cognitive developmental delay, muscle weakness, epilepsy, vision or hearing loss, gastrointestinal problems and even organ failure with any age of onset. The exact prevalence of DM is difficult to establish due to genetic and clinical heterogeneity, however, it is calculated to approximately 1/16000 individuals born in Europe. Clinical classification tends to be more complex than genetics, since the relationship between genotype and phenotype can be highly variable. This complexity often makes the clinical diagnosis inaccurate and with variability in medical approaches, limiting genetic counseling and impacting in the search for an adequate diagnosis. For genetic diagnosis, the chosen option is the whole exome sequencing analysis (WES), due to its high coverage and accuracy. However, in Brazil, the enforcement 199/2014 from the Ministry of Health, called the "National Policy for the Comprehensive Care of Persons with Rare Diseases", does not provide a diagnosis from WES for individuals with DM, and commercial access is still unviable for a large part of the population due to its high cost, therefore this work proposes to make the genetic diagnosis of mutations in individuals with DM, as well as studying the mutations found, contributing to the understanding of the pathophysiology of these diseases. It was review WES from 30 individuals, with 8 cases of mutations never described elsewhere. The identification of new proteins with mitochondrial function and new mutations associated with the development of DM is a way of adding knowledge to this genetic field, making possible the molecular diagnosis of these diseases in the future.

KEYWORDS: Mitochondriopathies, exome, molecular diagnostic.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	— MORFOLOGIA DAS MEMBRANAS MITOCONDRIAIS.....	20
FIGURA 2	— ESTRUTURA E GENES DO DNAm.....	22
FIGURA 3	— OVULOGÊNESE COM DISTRIBUIÇÃO DE MITOCÔNDRIAS MUTANTES GERANDO DIFERENTES NÍVEIS DE HETEROPLASMIA.....	23
FIGURA 4	— ESQUEMA REPRESENTANDO O SISTEMA DE FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA. EM AMARELO O COMPLEXO I, EM VERMELHO O COMPLEXO II, EM VERDE COMPLEXO III, EM ROXO O COMPLEXO IV E EM AZUL CLARO O COMPLEXO V, LOCALIZADOS NA CRISTA MITOCONDRIAL (CM) ENTRE A MATRIZ MITOCONDRIAL (MM) E O ESPAÇO INTERMEMBRANAR (EIM), EM AZUL ESCURO ENCONTRA-SE O CITOCROMO C, EM Q O UBIQUINOL E A SETA VERMELHA REPRESENTA A PASSAGEM DE ELÉTRONS.....	24
FIGURA 5	— PRINCIPAIS SINTOMAS ASSOCIADOS A DOENÇAS MITOCONDRIAS.....	29
QUADRO 1	— DESCRIÇÃO DOS GENES MUTADOS, CONSTITUINTES DE SUBUNIDADES PRESENTES NOS RAMOS	32

PERIFÉRICOS OU NO DOMÍNIO DE MEMBRANA DO COMPLEXO I.....

QUADRO 2	— APRESENTAÇÃO DOS CASOS DE DOENÇAS MITOCONDRIAIS IDENTIFICADAS DURANTE A REALIZAÇÃO DESTE TRABALHO, ONDE CONSTA IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE AFETADO, O FENÓTIPO, O GENE E MUTAÇÕES CANDIDATAS.....	47
FIGURA 6	— RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DE CRÂNIO COM ESPECTROSCOPIA REALIZADA NO PACIENTE I.....	49
FIGURA 7	— MUTAÇÕES NM_015058:c.2132_2135delTCAG (p.T711fs) E c.3517C>T NO GENE VWA8, IDENTIFICADAS NO PACIENTE I (I), MÃE (M) E PAI (P).....	49
FIGURA 8	— ALINHAMENTO APRESENTANDO A CONSERVAÇÃO DO RESÍDUO P.Pro1173 NO GENE VWA8 EM <i>HOMO SAPIENS</i> (HUMAN), <i>MUS MUSCULUS</i> (MOUSE), <i>XENOPUS TROPICALIS</i> (<i>XENTR</i>), <i>GALUS GALUS</i> (<i>CHICK</i>).....	50
FIGURA 9	— ISOFORMA LONGA (VWA8-L) E CURTA (VWA8-S) DA PROTEÍNA VWA8, COM A LOCALIZAÇÃO DAS MUTAÇÕES IDENTIFICADAS NO PACIENTE I.....	50
FIGURA 10	— WESTERN BLOT MOSTRANDO UMA DIMINUIÇÃO NA QUANTIDADE DA PROTEÍNA VWA8-L E VWA8-S EM FIBROBLASTOS DO PACIENTE I (P) EM RELAÇÃO AOS CONTROLES (C1 E C2).....	51

FIGURA 11	—	<p>IMAGEM DE MICROSCOPIA CONFOCAL MOSTRANDO MAIOR FRAGMENTAÇÃO MITOCONDRIAL NOS FIBROBLASTOS DO PACIENTE I (P) CULTIVADAS EM GALACTOSE EM COMPARAÇÃO A GLICOSE E CONTROLE (C) EM GLICOSE E GALACTOSE B) PORCENTAGEM DE CÉLULAS FRAGMENTADAS, INTERMEDIÁRIAS E FUSIONADAS (n=10 – 3 REPLICAS). ANOVA (p*<0.01, p***<0.001).....</p>	53
FIGURA 12	—	<p>ALTERAÇÃO DA BIOGÊNESE DEMONSTRADO PELA VARIAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DE DNAmT EM AMOSTRA CONTROLE EM GLICOSE (C Glu) E GALACTOSE (C Gal) E PACIENTE I EM GLICOSE (P Glu) E GALACTOSE (P Gal) – (N=3) ANOVA (p*<0.01 e p**<0.001).....</p>	54
FIGURA 13	—	<p>AVALIACAO DA QUANTIDADE E MONTAGEM DOS COMPLEXOS RESPIRATÓRIOS (CI-V) EM CONDIÇÕES NÃO DESNATURANTES (BN-PAGE).....</p>	54
FIGURA 14	—	<p>WESTERN BLOT REALIZADO PARA QUANTIFICAÇÃO DE SUBUNIDADES DO COMPLEXO RESPIRATÓRIO (SDHA, NDUFS3, NDUFB6, GAPDH, MTCO2), TUBULINA (CONTROLE DE CARGA) E VWA8-L.....</p>	55
FIGURA 15	—	<p>ELETROFORESE PARA AVALIAÇÃO DE VWA8 EM CONDIÇÕES NÃO DESNATURANTES.....</p>	56

FIGURA 16	— LOCALIZAÇÃO DO PACIENTE II EM GRÁFICO ANTROPOMÉTICO DE PESO E IDADE (Z-SCORE 2,44)....	58
FIGURA 17	— RESSONÂNCIA MAGNÉTICA REALIZADA NO PACIENTE II.....	59
FIGURA 18	— SEGREGAÇÃO DAS MUTAÇÕES ENCONTRADAS NO GENE <i>POLR3A</i> DO PACIENTE II.....	60
FIGURA 19	— GEL DE AGAROSE FEITO A PARTIR DE CDNA EXTRAÍDO E AMPLIFICADO POR PCR DE FIBROBLASTOS CONTROLE (C) E DO INDIVÍDUO II (I-1) E SEQUENCIAMENTO DEMONSTRANDO A DELEÇÃO DO EXON 14 (E14del) E DOS EXONS 13+14 (E13+14del) DO GENE <i>POLR3A</i>	61
FIGURA 20	— PERFIL DE INTENSIDADE DE <i>POLR3A</i> EM AMOSTRA CONTROLE (Ctrl) E PACIENTE II (H).....	62
FIGURA 21	— ANÁLISE DE MICROSCOPIA CONFOCAL MOSTRANDO A LOCALIZAÇÃO DE <i>POLR3A</i> . AS CORES INDICAM O NÚCLEO (AZUL), A LOCALIZAÇÃO DAS MITOCÔNDRIAS (VERMELHO) E <i>POLR3A</i> -HA E ANTI-HA (VERDE) EM AMOSTRA CONTROLE (CTRL) E PACIENTE II (H).....	63
FIGURA 22	— PERFIL DE INTENSIDADE DE <i>POLR3A</i> EM AMOSTRA CONTROLE (Ctrl) E PACIENTE II (H).....	64

FIGURA 23	— WESTERN BLOT DE SUBUNIDADES DOS COMPLEXOS MITOCÔNDRIAIS E POLR3A EM AMOSTRA CONTROLE (Ctrl) E PACIENTE II (H).....	65
FIGURA 24	— GRÁFICO DE CONSUMO DE OXIGÊNIO DEMONSTRANDO A REDUÇÃO SIGNIFICATIVA NA ATIVIDADE BASAL (BASAL) E PRODUÇÃO DE ATP (ATP) DO PACIENTE II (H) EM RELAÇÃO AO CONTROLE (Ctrl), N = 3 RÉPLICAS BIOLÓGICAS, ANOVA **p<0.001 e ***p<0.0001.....	66
FIGURA 25	— ALINHAMENTO APRESENTANDO A CONSERVAÇÃO DO AMINOÁCIDO LEUCINA NA POSIÇÃO 162 DO GENE <i>Adprhl2</i>	69
FIGURA 26	— SEGREGAÇÃO DO GENE <i>FLII</i> NOS MEMBROS DA FAMÍLIA DOS PACIENTE I-A e I-B.....	71
QUADRO 3	— APRESENTAÇÃO DOS CASOS DE PACIENTES COM UMA MUTAÇÃO IDENTIFICADA, PORÉM, QUE CONTINUAM SOB REVISÃO DE WES, ONDE CONSTA IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE AFETADO, O FENÓTIPO DO PACIENTE, O GENE E MUTAÇÕES CANDIDATAS, FENÓTIPO DESCRITO NO OMIM E A SEGREGAÇÃO.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

ACMG — American College of Medical Genetics and Genomics

ADP — Adenosina difosfato

APOOP1 — Pseudogene de *Mic26*

ASLO — Anticorpo contra estreptomicina O

ATP — Adenosina tri fosfato

CI — Complexo I

CII — Complexo II

CIII — Complexo III

CIV — Complexo IV

CM	—	Cristas (CM)
CV	—	Complexo V
DM	—	Doenças mitocondriais
DMEM	—	Meio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco
DNAmt	—	DNA mitocondrial
DNA _n	—	DNA nuclear
ECG	—	Eletrocardiograma
EDTA _{k3}	—	Ácido etilenodiamino tetra acético
EEG	—	Eletroencefalograma
EROs	—	Espécies reativas de oxigênio
EVS	—	Exome Variant Server
EXAC	—	Exome Aggregation Consortium
FIA	—	Fator indutor de apoptose
FBS	—	Soro fetal bovino
GATK	—	Genome analysis toolkit

HGMD	—	Human Gene Mutation Database
HGVS	—	Human Genome Variation Society
HLD7	—	Leucodistrofia hipomielinizante 7, com ou sem oligodontia ou hipogonadismo hipogonadotrófico
JC	—	Junções das cristas
KSS	—	Síndrome de Kearns Sayres
LDL	—	lipoproteína de baixa densidade
LHON	—	Neuropatia óptica hereditária de Leber
MELAS	—	Encefalomiopatia mitocondrial, acidose láctica e episódios semelhantes a acidente vascular cerebral
MEM	—	Membrana externa mitocondrial
MERRF	—	Epilepsia mioclônica e fibras vermelhas rajadas irregulares
MICOS	—	Complexo de sítio de contato mitocondria
MIM	—	Membrana interna mitocondrial
MINOS	—	Sistema de organização mitocondrial da membrana interna
MM	—	Matriz mitocondrial

MMS	—	Sociedade internacional de Medicina Mitocondrial
MNGIE	—	Síndrome da encefalomiopatia neurogastrointestinal mitocondrial
MON	—	Metabólitos do ON
N	—	Módulo de entrada de elétrons
NADH	—	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NARP	—	Fraqueza neurogênica, ataxia e retinite pigmentosa
NCBI	—	National Center for Biotechnology Information
NGS	—	Sequenciamento de nova (ou segunda) geração
OMIM	—	Online Mendelian Inheritance in Man
ON	—	Óxido nítrico
OXPPOS	—	Sistema de fosforilação oxidativa
P	—	Módulo de translocações de prótons
PB	—	Pares de base
PBS	—	Tampão fosfato salino

PCR	—	Reação em cadeia da polimerase
PEO	—	Oftalmoplegia externa progressiva esporádica
PTPM	—	Poros de transição de permeabilidade mitocondrial
Q	—	Módulo de saída de elétrons
RE	—	Retículo endoplasmático
RM	—	Ressonância magnética
RNA _r	—	RNAs ribossômicos
RNA _t	—	RNA transportadores
SMAC	—	Segundo ativador de caspases derivado de mitocôndrias
TCA	—	Ciclo do ácido tricarboxílico
TCLE	—	Termo de consentimento livre e esclarecido
TNF	—	Fator de necrose tumoral alfa α
VWA8	—	Proteína 8 contendo o domínio Von Willebrand
WES	—	Sequenciamento de exoma

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	28
1.1 MITOCÔNDRIAS	28
1.1.1 Morfologia Mitocondrial	28
1.1.1.1 Membranas mitocondriais e complexo MICOS.....	28
1.1.1.2 Nucleóide e DNA mitocondrial	30
1.1.1.3 Sistema de Fosforilação Oxidativa.....	33
1.1.1.4 Mitocôndrias e Morte Celular	35
1.2 DOENÇAS MITOCONDRIAIS.....	36
1.2.1 Doenças mitocondriais associadas à deficiência de complexo I.....	40
1.2.2 Outras Doenças Mitocondriais Associadas a Mutações no DNAn	41
1.3 DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS MITOCONDRIAS	43
1.3.1 SEQUENCIAMENTO DE EXOMA.....	46
2 OBJETIVOS	47
2.1 OBJETIVO GERAL	47
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	47
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
3.1 COMITÊ DE ÉTICA E SELEÇÃO DOS PACIENTES	48
3.2 COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO	48
3.3 EXTRAÇÃO DE DNA E PURIFICAÇÃO	48

3.4 COLETA DE DADOS CLÍNICOS.....	48
3.5 SEQUENCIAMENTO DE EXOMA	49
3.6 ANÁLISE DE DADOS DE SEQUENCIAMENTO DE EXOMA	49
3.7 ANÁLISE GENÉTICA FAMILIAR POR SEQUENCIAMENTO DE SANGER.....	51
3.8 ANÁLISES POSTERIORES EM CÉLULAS.....	51
3.8.1 Cultivo celular	51
3.8.1.1 Cultivo e imortalização de fibroblastos	51
3.8.1.2 Curva de crescimento.....	52
3.8.2 Western blot	53
3.8.3 Microscopia confocal	54
3.8.4 Extração de RNA	54
4 CAPÍTULO 1.....	55
4.1 CASO CLÍNICO: <i>VWA8</i>	58
4.2 CASO CLÍNICO: <i>POLR3A</i>	68
4.3 CASO CLÍNICO: <i>NDUFA12</i>	77
4.4 CASO CLÍNICO: <i>ADPRHL2</i>	78
4.5 CASO CLÍNICO: <i>FLII</i>	80
4.6 OUTROS CASOS	82
5 CAPÍTULO 2.....	85
INTRODUCTION	86

METHODS.....	87
RESULTS.....	88
LITERATURE REVIEW.....	93
DISCUSSION.....	93
CONCLUSION.....	95
ACKNOWLEDGMENTS.....	96
CONFLICT OF INTEREST	96
REFERENCES	96
6 CAPÍTULO 3.....	100
MUTATION IN THE MICOS SUBUNIT GENE <i>APOO</i> (MIC26) ASSOCIATED TO AN X-LINKED MITOCHONDRIAL MYOPATHY, COGNITIVE IMPAIRMENT AND LACTIC ACIDOSIS.....	100
INTRODUCTION	102
RESULTS.....	104
CASE REPORT.....	104
ANIMAL MODEL.....	109
DISCUSSION.....	111
MATERIAL AND METHODS.....	115

ETHICS STATEMENT	115
GENETICS ANALYSIS AND CLONING	115
CELLS PREPARATION	116
WESTERN BLOT ANALYSIS.....	117
IMMUNOFLUORESCENCE AND MICROSCOPY	118
O ₂ CONSUMPTION MEASUREMENTS.....	119
FLY STOCKS AND MAINTENANCE	120
RNA ISOLATION, REVERSE TRANSCRIPTION AND QRT-PCR	120
CLIMBING TEST.....	121
ISOLATION OF MITOCHONDRIA FROM FLIES' TISSUE.....	121
BLUE-NATIVE GEL ELECTROPHORESIS (BN-PAGE) AND IN-GEL ACTIVITY (IGA).....	121
REFERENCES	123
FIGURES AND LEGENDS	130
S1. SUBJECT AND METHODS.....	138
S1.1 ANTIBODIES LIST	138
6 CONCLUSÃO	142
REFERENCIAS.....	143

1. INTRODUÇÃO

1.1 MITOCÔNDRIAS

As mitocôndrias são organelas celulares complexas envolvidas em diversos processos celulares, tais como, o metabolismo celular, a homeostase de cálcio e sobretudo a produção energética (RINTOUL; REYNOLDS, 2010). O processo de obtenção de energia em forma de ATP se dá através do sistema de fosforilação oxidativa (OXPHOS) localizado nas invaginações da membrana interna da organela, conhecidas como cristas mitocondriais (CM) (COGLIATI et al., 2013). Conforme a demanda energética celular, um maior número de mitocôndrias é esperado em determinados tecidos, como cérebro e músculo que podem chegar a ter mais de 1000 mitocôndrias por célula. A regulação da quantidade de mitocôndrias ocorre através dos eventos de biogênese, mitofagia, fusão e fissão mitocondriais (VAN HAUTE et al., 2015).

Acredita-se que as mitocôndrias tenham sido originadas a partir da endocitose de uma α -proteobactéria por uma célula pré eucariótica, mantendo-se viva devido a vantagem seletiva ao produzir energia extra. Com a evolução, essas organelas demonstraram-se essenciais para o funcionamento celular e estão presentes em quase todas as células humanas (GRAY; BURGER; LANG, 1999; MAI; CHRZANOWSKA-LIGHTOWLERS; LIGHTOWLERS, 2017; TUPPEN et al., 2010).

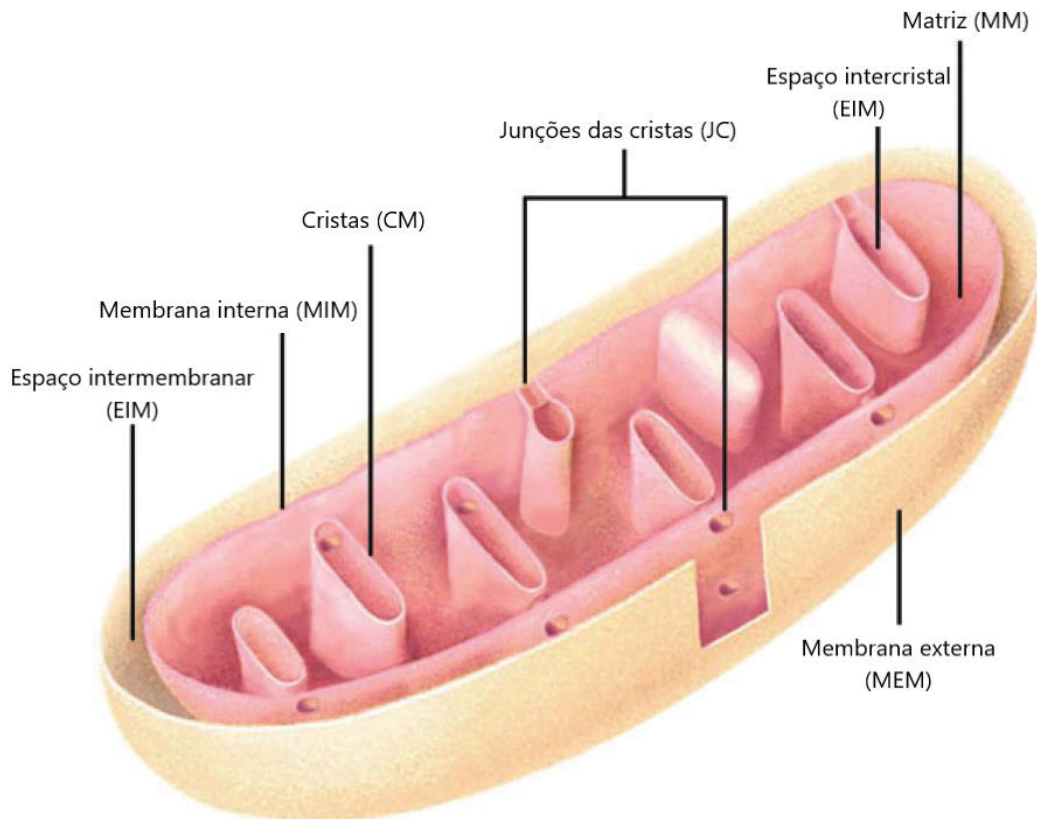
1.1.1 Morfologia Mitocondrial

1.1.1.1 Membranas mitocondriais e complexo MICOS

A mitocôndria possui duas membranas (figura 1), sendo a interna dividida em dois domínios, a membrana interna (MIM), localizada frente a frente com a membrana externa (MEM) e as CM, que são invaginações tubulares da MIM.

Essas invaginações são necessárias para permitir uma área adequada para os complexos proteicos do OXPHOS atuarem, além de fornecer espaço para outras proteínas necessárias à atividade mitocondrial (HUYNEN et al., 2016). Ambos os domínios são conectados por aberturas tubulares, denominados junções das cristas (JC) (FREYA; MANNELLAB, 2000).

FIGURA 1 - MORFOLOGIA DAS MEMBRANAS MITOCONDRIAIS



FONTE: Adaptado de LOGAN (2006).

Nas JC está presente o sistema de organização mitocondrial da membrana interna ou complexo de sítio de contato mitocondrial (MINOS / MICOS) (HARNER et al., 2011; VON DER MALSBERG et al., 2011). Este complexo interage com translocases da membrana externa e é uma parte crítica de uma rede de conexão entre retículo endoplasmático (ER) e mitocôndria, tendo sido associado à biogênese de proteínas, metabolismo lipídico, transporte iônico, organização de DNA mitocondrial (DNAm_t) (ZERBES et al., 2012) e estrutura mitocondrial (HARNER et al., 2011). A perda de subunidades do complexo

MICOS causa diminuição da competência do sistema respiratório mitocondrial (HARNER et al., 2011).

As proteínas de MICOS atuam em conjunto, por isso, algumas delas tem a capacidade de regulação de expressão recíproca, como as proteínas MIC26 (ApoO / MIC23) e MIC27 (APOOL / ApoO-Like) (KOOB et al., 2015). MIC26 é uma proteína que se apresenta em duas isoformas, uma glicosilada de 55 kDa (MIC26_{55kDa}) ativa no espaço extracelular onde está associada ao efluxo de colesterol (LAMANT et al., 2006) e outra não glicosilada de 22 kDa (MIC26_{22kDa}), exclusivamente encontrada nas mitocôndrias (KOOB et al., 2015). Apesar de se apresentar em duas isoformas, apenas a disfunção de MIC26_{22kDa} leva a alterações mitocondriais como diminuição do consumo de oxigênio e redução significativa no número de JC (KOOB et al., 2015).

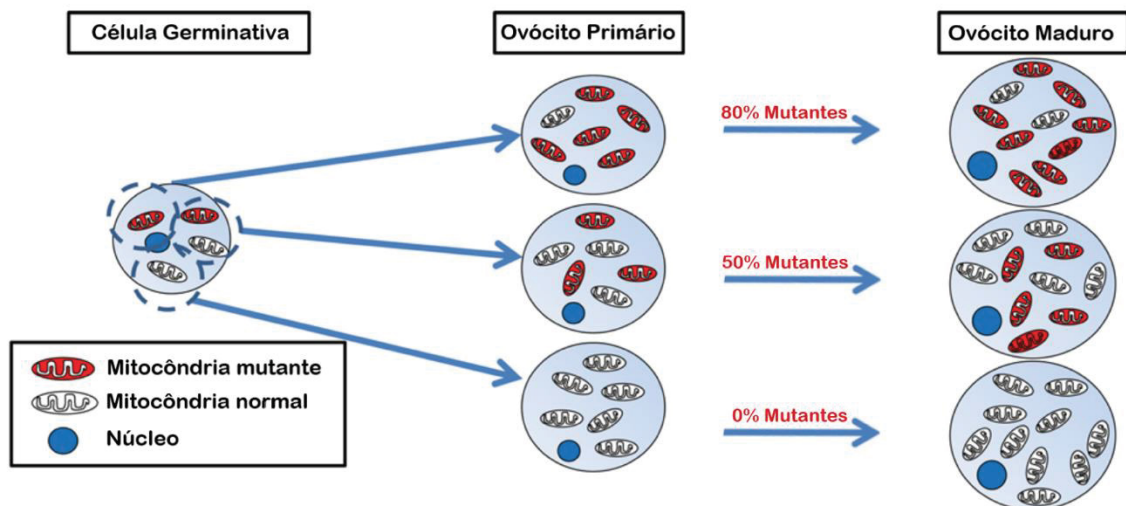
O gene *Mic26* é expresso pelo genoma nuclear e está localizado na região Xp.22.11, possuindo aproximadamente 81593 pares de base (pb) e nove éxons. Sua expressão ocorre em diferentes tecidos, principalmente no cérebro e coração (CARITHERS et al., 2015; LAMANT et al., 2006). Além do gene *Mic26*, localizado no cromossomo X, um pseudogene de *Mic26* (APOOP1) foi localizado no cromossomo 5 e descrito como regulador dos níveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL) em humanos (MONTASSER et al., 2018).

1.1.1.2 Nucleóide e DNA mitocondrial

As mitocôndrias são as únicas organelas citoplasmáticas com DNA próprio, o DNAm_t; que juntamente com proteínas essenciais para processos mitocondriais, apresenta-se como uma estrutura circular ou levemente ovalada denominada nucleóide. O nucleóide possui um diâmetro que varia entre 50 e 100 nm, localizando-se na matriz mitocondrial (MM) em contato direto com a superfície da MIM. Os nucleóides irão atuar estabilizando o DNAm_t e como centro de comando para a biogênese mitocondrial (KANG; KIM; HAMASAKI, 2007; PRACHAŘ, 2016).

diferentes concentrações de DNAMt mutado em cada ovócito gerado, criando diversos cenários possíveis. Tendo em vista que é necessário um nível mínimo de heteroplasmia para que os sintomas das doenças mitocondriais se manifestem, variando de <10% a 100%, e que estes níveis e a demanda energética variam conforme o tecido, órgãos com maior demanda energética são mais afetados por mutações no DNAMt (DIOT et al., 2016). Estas mutações no DNAMt podem alterar também a harmonia entre a expressão gênica do DNAn e DNAMt, que deve acontecer de forma precisa para suprir corretamente a demanda energética de cada tecido (VAN HAUTE et al., 2015).

FIGURA 3 — OVULOGÊNESE COM DISTRIBUIÇÃO DE MITOCÔNDRIAS MUTANTES GERANDO DIFERENTES NÍVEIS DE HETEROPLASMIA



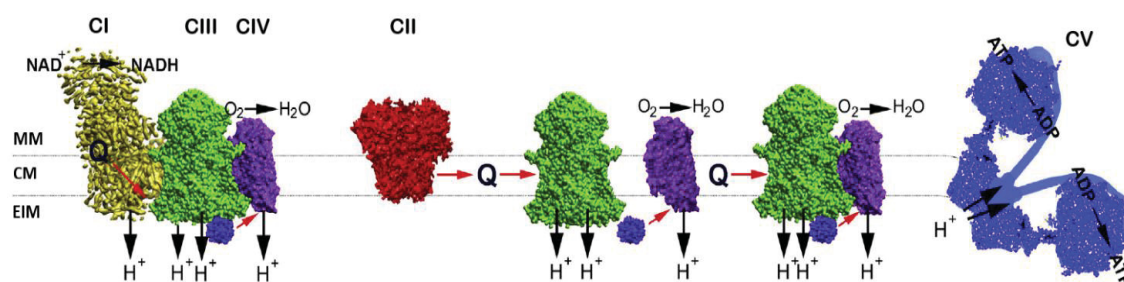
FONTE: Adaptado de DIOT (2016).

O acúmulo de mutações no DNAMt e o aumento na heteroplasmia, está descrito em doenças relacionadas ao envelhecimento celular, como a Doença de Alzheimer (POIRIER et al., 2019). A explicação seria a alta exposição do DNAMt às espécies reativas de oxigênio (EROs) liberadas no interior da mitocôndria durante a produção de adenosina tri fosfato (ATP), e a ausência de mecanismos de reparo tão eficiente quanto os encontrados para o DNAn (FERNÁNDEZ-SILVA; ENRIQUEZ; MONTTOYA, 2003).

1.1.1.3 Sistema de Fosforilação Oxidativa

O processo de obtenção de energia se dá durante a respiração celular mitocondrial, através do OXPHOS atuante na MIM, mais precisamente nas CM. Este sistema é composto por cinco multicomplexos proteicos (nomeados de I à V) (figura 4) e dois transportadores de elétrons, ubiquinona e citocromo C (COGLIATI et al., 2013; HATEFI, 1985; SAZANOV, 2015; SCHAGGER; PFEIFFER, 2000). CI, CIII e CIV são chamados de respirossomos e bombeiam prótons da MM para o EIM, gerando um gradiente eletroquímico que acompanha o transporte de elétrons entre os complexos, fornecendo assim a energia necessária para a síntese de ATP (SOUSA; D'IMPRIMA; VONCK, 2018).

FIGURA 4 — ESQUEMA REPRESENTANDO O SISTEMA DE FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA. EM AMARELO O COMPLEXO I, EM VERMELHO O COMPLEXO II, EM VERDE COMPLEXO III, EM ROXO O COMPLEXO IV E EM AZUL CLARO O COMPLEXO V, LOCALIZADOS NA CRISTA MITOCONDRIAL (CM) ENTRE A MATRIZ MITOCONDRIAL (MM) E O ESPAÇO INTERMEMBRANAR (EIM), EM AZUL ESCURO ENCONTRA-SE O CITOCROMO C, EM Q O UBIQUINOL E A SETA VERMELHA REPRESENTA A PASSAGEM DE ELÉTRONS



FONTE: Adaptado de CHABAN; BOEKEMA; DUDKINA (2014).

CI ou NADH-ubiquinona oxidoreductase é um complexo proteico composto por 44 subunidades que catalisa a oxidação de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), produzido no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), fornecendo elétrons ao CIII via redução da ubiquinona. O fluxo de elétrons através do CI permite a translocação de quatro prótons por NADH através da MIM, contribuindo assim para o potencial eletroquímico mitocondrial. CI é subdividido em três módulos: o módulo de entrada de elétrons (N), o módulo de saída de elétrons (Q) e o módulo de translocações de prótons (P). O módulo N é composto por subunidades codificadas pelos genes *Ndufv1*, *Ndufv2* e *Ndufs1* (BRANDT, 2006).

O gene *Ndufv1* (NG_013353.1) está localizado em 11q13.2 e codifica a flavoproteína NADH-ubiquinona oxidoreductase, um polipeptídeo hidrofílico de 51 kDa (HIRST, 2013) que oxida NADH e é um dos principais sítios de produção de EROs (VARGHESE et al., 2015). Quando em desequilíbrio, o acúmulo de EROs gera estresse oxidativo e toxicidade celular (MURPHY, 2009).

CII ou succinato oxidoreductase não atua como bomba de prótons através da MIM, mas sim como segunda forma de conexão entre o ciclo do TCA e OXPHOS, contribuindo com elétrons adicionais à ubiquinona que se oxida gerando ubiquinol, que é substrato para o CIII (DUDKINA et al., 2009; SOUSA; D'IMPRIMA; VONCK, 2018). Esta capacidade de adição de elétrons de CII ocorre devido a homologia com a fumerato redutase, que realiza a reação reversa do succinato, atuando como acceptor terminal de elétrons durante a respiração aeróbica. CII é formado por duas proteínas hidrofílicas, a flavoproteína e um ligante com três grupamentos de ferro e enxofre, além de duas proteínas transmembranares, Cyb1 e CybS, que formam um complexo responsável pela ancoragem de CII à MIM (HÄGERHÄLL, 1997).

O CIII ou ubiquinona citocromo C oxidoreductase medeia a transferência de elétrons até CIV e o bombeamento de prótons. Das 10 subunidades que compõem o CIII apenas três (MT-CYB, CYC1 e UQCRFS1) atuam efetivamente como bomba de prótons (FERNANDEZ-VIZARRA; ZEVIANI, 2018; SIGNES; FERNANDEZ-VIZARRA, 2018; SOUSA; D'IMPRIMA; VONCK, 2018).

O CIV ou citocromo C oxidase é composto por 14 subunidades e é responsável pela redução de O_2 em H_2O , que se dá pela liberação de elétrons do citocromo C, que serão transferidos pelo CIV para uma molécula do oxigênio. Neste processo ocorrerá a liberação de 4 prótons que serão bombeados através da membrana mitocondrial interna até o CV (SOUSA; D'IMPRIMA; VONCK, 2018; STOLDT et al., 2018).

O gradiente de prótons gerado pelo respirossomo chega ao CV ou ATP sintase, que irá utilizar suas frações F_0 e F_1 para gerar ATP a partir de adenosina di fosfato (ADP) e fósforo. A fração F_0 de CV está localizada na MIM e consiste

em 9 subunidades atuantes na translocação dos prótons gerados pelo respirossomo transmitindo-os à fração F_1 , inserida de frente à MM. F_1 é a fração catalítica, composta por três subunidades α e três β , todas se ligando a subunidade γ , atuante como rotor na geração do ATP (DUDKINA et al., 2009; NEUPANE et al., 2019; SOUSA; D'IMPRIMA; VONCK, 2018).

1.1.1.4 Mitocôndrias e Morte Celular

Mitocôndrias formam uma rede dinâmica que é moldada pelo equilíbrio entre eventos de fissão e fusão, onde o excesso de um desses eventos leva a um desequilíbrio na rede gerando fragmentações ou alteração da estrutura mitocondrial (XIE et al., 2018).

Células com mais eventos de fissão irão apresentar mitocôndrias pequenas, em formatos esféricos ou de bastonetes (fragmentadas), que contribuem para a disfunção mitocondrial (VAN DER BLIEK; SHEN; KAWAJIRI, 2013). Enquanto isso, o aumento nos eventos de fusão leva a uma diminuição no número de mitocôndrias, porém, sua forma longa e altamente interconectada permite a manutenção do suplemento nutricional celular necessário (CHEN; CHAN, 2005).

As mitocôndrias entram em processo de autofagia quando lesionadas, sendo por não conseguirem manter a produção energética, por receberem pouca glicose, por produção excessiva de EROs ou biogênese anormal, o que culmina na destruição mitocondrial (GRAEF; NUNNARI, 2011; WU et al., 2013). O processo de autofagia mitocondrial é conhecido como mitofagia e funciona como proteção contra a morte celular (apoptose) por remoção de organelas disfuncionais (DING; YIN, 2012).

O início dos eventos apoptóticos se dá pelo aumento na permeabilidade da membrana mitocondrial, abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM) e liberação de moléculas como citocromo C, segundo ativador de caspases derivado de mitocôndrias (SMAC), fator indutor de apoptose (FIA) e endonuclease G, que irão ativar as caspases ou inativar

proteínas inibidoras de apoptose, resultando na clivagem do DNAn (ADRAIN; CREAGH; MARTIN, 2001; NAOI et al., 2019; VANLANGENAKKER et al., 2008).

1.2 DOENÇAS MITOCONDRIAIS

Doenças mitocondriais (DM) são síndromes crônicas de origem genética, com apresentação no nascimento ou de desenvolvimento durante a vida adulta. Podem causar atraso no desenvolvimento físico e cognitivo, fraqueza muscular, epilepsias, perda de visão ou audição, problemas gastrointestinais e até mesmo falha de órgãos específicos (PARIKH et al., 2017)

A exata prevalência de DM é difícil de se estabelecer devido sua heterogeneidade genética e clínica (RAI et al., 2015). Sugere-se uma prevalência infantil de aproximadamente 1/16000 pacientes na Europa, no entanto, a frequência se torna maior em casos de consanguinidade (SKLADAL; HALLIDAY; THORBURN, 2003). A prevalência européia total de DM em adultos, seja por mutações no DNAm ou nuclear é de aproximadamente 1/4300 pacientes (GORMAN et al., 2015a), sendo que o número médio de nascimentos por ano, com risco de transmissão de DM graves associadas a cadeia respiratória, a partir de mães afetadas, é de 152 no Reino Unido e 778 nos EUA (GORMAN et al., 2015b).

Mutações em genes que codificam proteínas mitocondriais podem afetar o nível de expressão da proteína mutada, sua função, ou em alguns casos, nível de expressão e função ao mesmo tempo, gerando um desequilíbrio na produção energética (WALLACE; FAN; PROCACCIO, 2010). Quando estas mutações causam alterações diretas elas são chamadas de DM primárias, e como consequência destas mutações há o acúmulo de EROs e alteração na dinâmica mitocondrial. Em muitos casos, disfunções secundárias podem resultar das DM primárias, pois é esperado que ocorra a tentativa de adaptação mitocondrial

devido a intensidade dos danos causados pelas mutações, o que leva a consequências em outros níveis celulares e a uma variedade de sintomas clínicos (BLANCHET et al., 2012; KOOPMAN et al., 2009; KOOPMAN; WILLEMS; SMEITINK, 2012).

A classificação genética de DM primárias é dividida em dois grupos, herança mitocondrial ou mendeliana (LIGHTOWLERS; TAYLOR; TURNBULL, 2015), porém, a classificação clínica tende a ser mais complexa, tendo em vista que diferentes mutações podem causar a mesma DM, assim como, diferentes DM podem ser causadas pela mesma mutação (WALLACE et al., 1988).

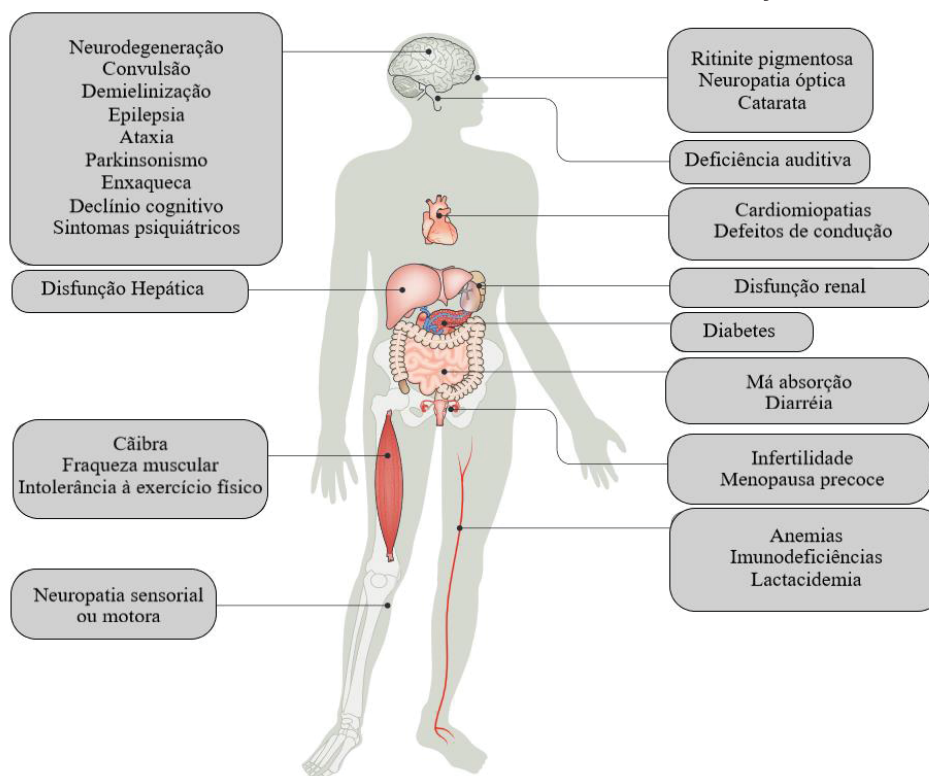
Mutações no DNAm_t incluem alterações pontuais ou rearranjos. Mutações pontuais hetoplasmáticas já foram descritas em todos os genes mitocondriais e levam aos fenótipos das DM clássicas, como encefalomiopatia mitocondrial, acidose láctica e episódios semelhantes a acidente vascular cerebral (MELAS) (GOTO; NONAKA; HORAI, 1990; PAVLAKIS et al., 1984), epilepsia mioclônica e fibras vermelhas rajadas irregulares (MERRF) (SHOFFNER et al., 1990), fraqueza neurogênica, ataxia e retinite pigmentosa (NARP) (HOLT et al., 1990) ou Síndrome de Leigh (RAHMAN et al., 1996). Já o fenótipo característico de mutações homoplasmáticas do mtDNA se dá com a neuropatia óptica hereditária de Leber (LHON) (WALLACE et al., 1988), e o de reorganizações de DNAm_t com oftalmoplegia externa progressiva esporádica (PEO), Síndrome de Kearns-Sayres (KSS) (MORAES et al., 2010) e Síndrome de Pearson (CORMIER et al., 1990).

No grupo de defeitos no DNAn estão presentes mutações associadas a genes estruturais do OXPHOS, os que farão a manutenção do DNAm_t, os atuantes em tradução, metabolismo e homeostase, além dos codificadores de proteínas associadas ao processo de montagem dos complexos respiratórios (LIGHTOWLERS; TAYLOR; TURNBULL, 2015).

Os sintomas clínicos de DM (figura 5) podem aparecer na infância ou na vida adulta, afetar um órgão ou ser multisistêmica (LIGHTOWLERS; TAYLOR; TURNBULL, 2015), e nem todos os pacientes com DM apresentam evidências

de alteração na cadeia respiratória, porém, alguns indícios podem ser vistos na maioria dos casos de DM como: elevação nos níveis de lactato; mudanças sugestivas em ressonância magnética (RM) de regiões cerebrais e comprometimento multisistêmico (ALSTON et al., 2017).

FIGURA 5 – PRINCIPAIS SINTOMAS ASSOCIADOS A DOENÇAS MITOCONDRIAS.



FONTE: Adaptado de SUOMALAINEN; BATTERSBY (2018).

As manifestações cerebrais associadas a DM possuem diferentes classificações, podendo ser permanentes, como a demência, ou transiente, como convulsões ou dores de cabeça, sendo resultado direto de defeitos do metabolismo ou resultado de danos secundários a partir do envolvimento de outros órgãos (FINSTERER; DE CARVALHO, 2017).

Embora tenha se evoluído muito na compreensão dos mecanismos genéticos e bioquímicos que levam à DM, ainda não há abordagens terapêuticas viáveis. Apesar de algumas abordagens apresentarem eficácia potencial em nível pré-clínico, o alvo de intervenção nos casos de DM ainda permanece sendo o suporte que visa aliviar sintomas e complicações (KOOPMAN; WILLEMS; SMEITINK, 2012; PFEFFER et al., 2012; VISCOMI; BOTTANI; ZEVIANI, 2015).

Os principais suplementos utilizados como estratégias terapêuticas de suporte para DM são os agentes que melhoram a função do OXPHOS (coenzima Q10, riboflavina, dicloroacetato e tiamina), tampões energéticos (creatina), antioxidantes (ácido ascórbico, tocoferol, ácido lipóico), restauradores da produção de óxido nítrico (arginina e citrulina) e estimulantes de biogênese mitocondrial (bezafibrato, epicatequina) (EL-HATTAB et al., 2017).

O uso de suplementos que atuam sobre o OXPHOS visa melhorar a função do complexo respiratório, aumentando seus componentes, a transferência de elétrons ou a disponibilidade de substrato para o OXPHOS (GLOVER et al., 2010; POTGIETER; PRETORIUS; PEPPER, 2013), enquanto tampões energéticos, como a creatinina, se ligam ao fosfato para formar a fosfocreatina, servindo como fonte de energia durante a respiração anaeróbica. A redução de fosfocreatina e creatinina foi demonstrada no tecido muscular e cerebral de pacientes com DM, sugerindo que a suplementação com creatinina pode ser benéfica por aumentar a fonte de fosfato (MORONI et al., 2002; TARNOPOLSKY; PARISE, 1999).

Em condições normais, EROs são facilmente eliminadas por diversas enzimas, como a superóxido dismutase mitocondrial e a glutathione peroxidase, porém com o funcionamento incorreto de OXPHOS, a geração de EROs aumenta, sendo tóxica para a célula, podendo resultar em danos às proteínas e lipídios. Para diminuir este efeito tóxico causado pelo excesso de EROs podem ser utilizados agentes antioxidantes, como o ácido ascórbico e o tocoferol (BALABAN; NEMOTO; FINKEL, 2005).

Deficiência de óxido nítrico (ON) ocorre em várias DM, incluindo miopatia e acidose láctica (EL-HATTAB et al., 2012; TENGAN et al., 2007). Foi demonstrado que pacientes com síndrome MELAS e PEO apresentam concentrações reduzidas de metabólitos do ON (MON) durante episódios semelhantes a acidente vascular cerebral (KOGA et al., 2005, 2007) ou em fibras deficientes de citocromo C oxidase. Frente a isso, a suplementação com precursores de ON é utilizada com o objetivo de restaurar a produção de ON,

que parece atuar como inibidor de CIV, auxiliando na regulação da respiração celular mitocondrial (TENGAN et al., 2007).

Agentes que promovem a biogênese mitocondrial, como o bezafibrato também podem ser utilizados como suplementos em pacientes com DM por atuarem como ativadores do *Pcg-1 α* que pode potencialmente aliviar a deficiência de ATP. O gene *Pcg-1 α* é ativado em resposta ao aumento da demanda energética (diminuição nos níveis de ATP) que ocorre em DM, impulsionando a biogênese mitocondrial, que irá aumentar a quantidade de mitocôndrias, e conseqüentemente, a quantidade de ATP produzida (EL-HATTAB et al., 2017; LIANG; WARD, 2006; RAI et al., 2015).

1.2.1 Doenças mitocondriais associadas à deficiência de complexo I

As disfunções em CI representam um terço de todos os distúrbios mitocondriais de início precoce e são genética e clinicamente diversas. São causadas por mutações nos genes mitocondriais e nucleares, com fenótipos clínicos variando de fraqueza muscular em adultos até acidose láctica grave e morte em lactentes. Aproximadamente 50% dos pacientes diagnosticados com deficiência de CI morrem antes dos 2 anos e apenas 25% atingem 10 anos de idade (HIRST, 2013; KOENE et al., 2012). Os primeiros sinais podem ser observados logo após o nascimento, ou ainda nos primeiros meses de vida, sendo o sistema nervoso central o primeiro afetado. Os achados clínicos mais comuns são: LHON, Síndrome de Leigh, leucoencefalopatia progressiva, cardiomiopatia neonatal, acidose láctica infantil grave, encefalomiopatias não especificadas e MELAS (BAERTLING et al., 2018; FASSONE; RAHMAN, 2012; FIEDORCZUK; SAZANOV, 2018).

Defeitos primários em CI são aqueles associados a subunidades estruturais ou a fatores de montagem. Entretanto, há situações que podem levar a deficiência de CI de forma secundária, como alterações em genes relacionados a tradução do DNAm_t ou à biossíntese da ubiquinona (FIEDORCZUK; SAZANOV, 2018; RODENBURG, 2016).

Alguns genes mutados, pertencentes a subunidades básicas ou supernumerárias dos ramos periféricos ou do domínio de membrana de CI, previamente descritos como causa de deficiências energéticas, estão descritos no quadro 1.

QUADRO 1 — DESCRIÇÃO DOS GENES MUTADOS, CONSTITUINTES DE SUBUNIDADES PRESENTES NOS RAMOS PERIFÉRICOS OU NO DOMÍNIO DE MEMBRANA DO COMPLEXO I.

LOCALIZAÇÃO EM CI	SUBUNIDADES	GENES
Ramos Periféricos	Básicas	<i>Ndufv1, Ndufv2, Ndufs1, Ndufs2, Ndufs3, Ndufs7 e Ndufs8</i>
	Supernumerárias	<i>Ndufs4, Ndufs6 e Ndufa9</i>
Domínios de Membrana	Básicas	<i>Nd1, Nd2, Nd3, Nd4, Nd5 e Nd6</i>
	Supernumerárias	<i>Ndufa10, Ndufb9, Ndufa1, Ndufa8 e Ndufa13</i>

FONTE: Adaptado de KOOPMAN; WILLEMS; SMEITINK (2012).

1.2.2 Outras Doenças Mitocondriais Associadas a Mutações no DNAn

Genes do DNAn são responsáveis pela expressão de proteínas importantes à atividade mitocondrial, entre elas, subunidades da cadeia transportadora de elétrons e proteínas auxiliares que controlam a expressão do DNAm, o processo de fusão e fissão, replicação ou manutenção da atividade mitocondrial. Quando alteradas, estas proteínas causam depleção do DNAm com consequente diminuição da produção energética ou alteração na via de salvamento de nucleosídeos (ANGELINI et al., 2009; EL-HATTAB; SCAGLIA, 2013).

Síndromes de depleção de DNAm são tipicamente agrupadas em quatro categorias clínicas: miopática, encefalomiopática, hepatocerebral e neurogastrointestinal, sendo que a forma neurogastrointestinal é referenciada como síndrome da encefalomiopatia neurogastrointestinal mitocondrial (MNGIE) (HIRANO; NISHIGAKI; MARTÍ, 2004; KANUNGO et al., 2018).

MNGIE é uma DM autossômica recessiva associada a mutações no gene *Tymp*, localizado no cromossomo 22, que afeta o catabolismo de timidina em timina e 2-desoxiribose 1-fosfato, alterando a comunicação entre o genoma mitocondrial e nuclear, necessário para a síntese de DNAm. O fenótipo é de dismotilidade gastrointestinal grave, disfagia e dor abdominal, ptose, oftalmoplegia, neuropatia periférica e leucoencefalopatia. O cuidado prestado ao paciente afetado envolve o manejo dos sintomas gastrointestinais, nutrição e uso de antibióticos para o hipercrecimento de bactérias intestinais (HIRANO; DÍAZ, 2015; HIRANO; NISHIGAKI; MARTÍ, 2004).

Já as DM miopáticas resultam de mutações autossômicas recessivas no gene *Tk2*, localizado no cromossomo 16 e codifica a timidina quinase 2, que resgata nucleosídeos pirimídicos. Alterações nesta proteína causam prejuízo à síntese de DNAm, sendo o fenótipo caracterizado por hipotonia, fraqueza muscular e bulbar, além do aumento na creatina quinase sérica. A miopatia causa insuficiência respiratória de forma progressiva, levando o paciente afetado à morte em poucos anos (WANG; EL-HATTAB; WONG, 2019).

As DM encefalomiopáticas, por sua vez, resultam de mutações em genes com herança autossômica recessiva ou variável, que causam alterações na síntese do DNAm. Algumas, como as associadas aos genes *Sucla2* e *Suclg1*, apresentam comprometimento miopático, atraso psicomotor, complicações auditivas neurosensoriais, convulsões e disfunção hepática, entre outras manifestações. Os sintomas costumam iniciar ainda na infância resultando em morte precoce (SPINAZZOLA et al., 2009).

A última categoria de síndromes de depleção é a DM hepatocerebral, que está associada a mutações nos genes *Dguok*, *Mpv17*, *Polg* e *C10orf2*, que estão

envolvidos em processos de manutenção da síntese e replicação do DNAm, embora a função exata do *Mpv17* ainda seja desconhecida. Os sintomas incluem disfunção hepática, hiperbilirrubinemia, manifestações oculares, neurológicas e atróficas. Os genes associados a DM hepatocerebral são fundamentais para a atividade mitocondrial. Alterações nestes genes podem levar a manifestações muito diversas, levando esta doença a apresentar uma grande variedade de fenótipos. Um exemplo desta variedade fenotípica é a proteína POLG, que está associada à subunidade da DNA polimerase gama, conhecida como a única DNA polimerase atuante na replicação e reparo do DNAm (ZULLO et al., 1997).

1.3 DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS MITOCONDRIAS

Em 2015 a Sociedade internacional de Medicina Mitocondrial (MMS) publicou um guia consenso com critérios para avaliação e diagnóstico de pacientes, potenciais portadores de DM, com o objetivo de diminuir a variabilidade existente nas abordagens médicas. Deve-se suspeitar de DM quando há envolvimento multissistêmico ou a presença das chamadas "bandeiras vermelhas", como por exemplo, episódios semelhantes a acidente vascular cerebral, lesões simétricas bilaterais hiperintensas ponderadas em gânglios da base ou tronco cerebral identificadas em RM, picos de lactato em espectroscopia de RM, acidose láctica, mioclonia, ataxia ou fraqueza muscular de início precoce (HAAS et al., 2007). Frente a estes sinais, são solicitados exames bioquímicos de sangue periférico, urina e líquido cefalorraquidiano, seguidos de sequenciamento de nova (ou segunda) geração (NGS) de DNAm e DNAn, com estudos genéticos adicionais quando necessário (PARIKH et al., 2014).

A caracterização completa da sequência nucleotídica do DNAm humano (ANDERSON et al., 1981) possibilitou novos estudos, até então escassos, que associaram alterações bioquímicas, estruturais e histopatológicas com mutações no genoma mitocondrial, porém, muitos casos de DM ainda deixam de ser diagnosticados, devido a alta complexidade dessas doenças, do conhecimento limitado sobre a relação entre genótipo e fenótipo e das limitações dos métodos de testes utilizados rotineiramente (LIGHTOWLERS; TAYLOR; TURNBULL,

2015; PARIKH et al., 2019). Estes obstáculos no diagnóstico de DM contribuem para uma classificação subjetiva da doença, feita pelos profissionais de saúde que acompanham o paciente (PARIKH et al., 2014).

A utilização de termos como "improvável", "possível" ou "DM provável", faz parte desta classificação subjetiva. Estes termos foram introduzidos na prática clínica antes dos avanços na área de NGS, porém, atualmente eles resultam em termos imprecisos, que limitam o aconselhamento genético e impactam na busca por um diagnóstico adequado (MORAVA et al., 2006; PARIKH et al., 2019; THORBURN et al., 2004).

É importante garantir que mesmo os achados classificados como "bandeira vermelha" estejam de acordo com a evolução da doença e inseridos no contexto do paciente e no histórico familiar (PARIKH et al., 2019), além disso, testes bioquímicos apresentam algumas limitações como a variação de sensibilidade e especificidade, além de variabilidade interlaboratorial de métodos e intervalos de referência, por isso, apesar de não ser perfeita, a análise de sequenciamento de exoma (WES) tem ganhado cada vez mais espaço no diagnóstico de DM devido a sua maior exatidão (PARIKH et al., 2019; RAHMAN; RAHMAN, 2018).

Mesmo sendo preconizado pela MMS, realizar WES não é uma garantia de diagnóstico, pois uma das limitações da técnica é que novos genes ainda estão sendo identificados ou associados a doença, portanto, WES feitos de forma comercial podem resultar em laudos negativos. Porém, isso não quer dizer que as variantes patogênicas não existam. Levando em consideração a necessidade de constantes atualizações dos bancos de dados utilizados para comparar as variantes e o desenvolvimento de novos sintomas no paciente, que colaboram para fechar um quadro clínico característico e preciso, faz-se necessário uma revisão periódica dos dados obtidos com o WES que tenha resultados em laudo negativo (PARIKH et al., 2014, 2019; RAHMAN; RAHMAN, 2018).

No Brasil, a portaria 199/2014 do Ministério da Saúde, “Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras”, não prevê diagnóstico a partir da realização de WES para pacientes com DM e o acesso comercial a este exame não é viável para grande parte da população devido seu alto custo. Por esse motivo o diagnóstico de DM é feito a partir de exames bioquímicos associados ao fenótipo clínico e eventualmente o sequenciamento de alguns genes comumente associados a DM (BRASIL, 2014).

Buscando auxiliar nesta identificação das variantes patogênicas, para que se pudesse realizar um manejo adequado dos pacientes e, conseqüentemente, melhorar sua qualidade de vida, iniciou-se uma parceria entre o Complexo Pequeno Príncipe (que é formado pelo Hospital Pequeno Príncipe, as Faculdades Pequeno Príncipe e o Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe), Universidade de Cambridge (Inglaterra) e o Departamento de Genética da UFPR e alguns resultados desta parceria compõem esta tese de doutorado.

Sem a disponibilização de WES pelo Ministério da Saúde e com valores elevados para o acesso de forma particular, oferecer à comunidade a possibilidade de diagnóstico de DM, de forma gratuita, traz a este projeto uma função social direta de auxílio no diagnóstico genético desses pacientes. Sendo assim, atende-se uma demanda específica, possibilitando a adequação do tratamento individualizado e aumentando a qualidade e expectativa de vida de cada paciente. Além disto, estudar mutações associadas a DM, avaliando aspectos clínicos, genéticos e metabólicos, contribui para o entendimento da fisiopatologia destas doenças que ainda não contam com diagnóstico facilitado devido a sua alta complexidade e conhecimento limitado sobre a relação entre fenótipo e genótipo. O conhecimento do mecanismo associado às mutações e vias de sinalização na patologia mitocondrial contribui, também, para o desenvolvimento de mecanismos de remediação generalistas, já que são doenças ainda incuráveis, possibilitando assim a criação de protocolos de manejo específicos para cada grupo de mutações.

1.3.1 Sequenciamento de Exoma

O dogma central da biologia descreve a formação de proteínas a partir da transcrição de DNA em RNA. Este RNA transcrito passa por etapas de processamento onde são retiradas sequências chamadas de íntrons e conectadas as sequências adjacentes, chamadas de éxons. O ser humano possui aproximadamente 180.000 exons, o que corresponde a 1% do genoma humano. Apenas os éxons codificam proteínas e por isso, apresentam um importante papel no desenvolvimento de doenças genéticas com padrão de herança mendeliana (ALBERTS et al., 2008).

O sequenciamento de exoma apresenta algumas limitações na detecção de doenças já que não é capaz de identificar alterações no número de cópias de genes, como microdeleções ou microduplicações, ou ainda alterações cromossômicas estruturais ou alterações epigenéticas. Além disso, a cobertura de captura de sequências também não é de 100%, aproximadamente 8% dos exons não são cobertos pelo sequenciamento (SINGLETON, 2011). Porém, apesar das limitações, o sequenciamento de exoma é recomendado mundialmente como rotina no diagnóstico de doenças raras por se tratar de um método com alta capacidade diagnóstica e não ser específico apenas para um grupo de genes (PARIKH et al., 2015).

O sequenciamento consiste na preparação da amostra, construção de uma biblioteca de ácidos nucleicos a partir da amostra, formação de fragmentos que serão amplificados e gravados computacionalmente em ordem seqüencial como sequência. Após o sequenciamento os dados passam por etapas de processamento e análise que envolvem pipelines de tratamento de dados brutos, onde será feita a remoção de sequências de adaptadores e leituras com baixa qualidade, seguido de mapeamento dos dados para um genoma de referência, alinhamento e análise da sequência compilada (GRADA; WEINBRECHT, 2013).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar e descrever casos de mutações raras em crianças com doenças mitocondriais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar os participantes de acordo com o diagnóstico clínico de doença mitocondrial;
- Revisar os exomas comerciais com laudos negativos;
- Comprovar as mutações encontradas por sequenciamento de Sanger;
- Realizar análise de segregação;
- Determinar a necessidade de testes posteriores para comprovação de patogenicidade das mutações encontradas;
- Descrever os casos clínicos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COMITÊ DE ÉTICA E SELEÇÃO DOS PACIENTES

Os pacientes foram encaminhados pela Dra. Mara Lúcia Schmitz Ferreira Santos, após passarem por consulta no ambulatório de erros inatos do metabolismo do Hospital Pequeno Príncipe, receberem informações sobre o projeto de pesquisa e o responsável pelo paciente assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) previamente aprovado pelo comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos da UFPR, sob o número CAAE: 84773818.2.0000.0102.

3.2 COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Durante a coleta de sangue para exames de rotina no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Pequeno Príncipe, os pacientes e seus genitores coletaram aproximadamente 5 ml de sangue periférico, em tubo contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA_{k3}), destinado à realização deste projeto de pesquisa.

3.3 EXTRAÇÃO DE DNA E PURIFICAÇÃO

A extração de DNA e a purificação foram realizadas com kit da marca QUIAGEN, seguindo as recomendações do fabricante, a partir dos leucócitos obtidos da amostra de sangue coletada no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Pequeno Príncipe.

3.4 COLETA DE DADOS CLÍNICOS

Todos os dados clínicos como fenótipo, período de início dos sintomas, resultados de exames bioquímicos, de imagem e eletrofisiológicos, bem como

histórico e quadro familiar foram obtidos com a equipe da Dra. Mara Lúcia Schmitz Ferreira Santos ou diretamente com o responsável pelo paciente afetado. Estes dados foram estudados e correlacionados, quando possível, com as mutações identificadas e informações obtidas nos bancos de dados ClinVar, OMIM, MitoMap.

3.5 SEQUENCIAMENTO DE EXOMA

WES foram realizados por empresas de diagnóstico molecular usando Illumina® 2000 HiSeq e tendo como referência a versão GRCh37 do genoma humano, gerando arquivos em formato FASTQ ou BAM posteriormente alinhados e rodados pelo Dr. Alan J. Robinson da Universidade de Cambridge. Para identificar, filtrar e anotar as variantes foram utilizados os protocolos baseados em “genome analysis toolkit (GATK) best practices” (VAN DER AUWERA et al., 2013), gerando arquivos em formato xls que foram analisados como descrito a seguir.

3.6 ANÁLISE DE DADOS DE SEQUENCIAMENTO DE EXOMA

A partir do painel de exoma, obtido com a identificação das variantes, iniciou-se a revisão dos dados com retirada das variantes comuns na população, mantendo apenas as com frequência inferior a 1%, seguido da retirada de mutações sinônimas ou que não apresentem efeito deletério, sendo mantidas as responsáveis por inserções ou deleções com ou sem mudanças na matriz de leitura, adições ou perdas de códons de parada, *missenses*, alterações em *splicing*, regiões 3'UTR ou 5'UTR.

Dentre as variantes que restaram iniciou-se a busca individual, de acordo com os sintomas do paciente, levando em consideração o histórico familiar e a existência de padrão de herança sugestivo.

As mutações identificadas foram estudadas de acordo com “*Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Association for Molecular Pathology*” (RICHARDS et al., 2015).

Para a pesquisa de cada variante candidata, utilizamos a descrição dos sintomas do paciente bem como os resultados dos exames de sangue e imagens para relacionar o fenótipo com as mutações candidatas, presentes no exoma. Esta busca pela relação genótipo e fenótipo foi feita utilizando bases de dados como ClinVar (LANDRUM et al., 2018) e Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)(MCKUSICK, 2007). Uma lista de genes que codificam as proteínas conhecida ou provavelmente mitocondriais também é utilizada para classificar a lista por ordem de importância, utilizando as bases de dados MitoMap e MitoCarta (CALVO; CLAUSER; MOOTHA, 2016; LOTT et al., 2013).

A predição de patogenicidade foi realizada nos programas SNPs&GO (CALABRESE et al., 2009), PolyPhen-2 (ADZHUBEI et al., 2010) e MutationTaster (SCHWARZ et al., 2014), utilizando sequências referências obtidas das bases de dados National Center for Biotechnology Information (NCBI)(SAYERS et al., 2019), Human Gene Mutation Database (HGMD)(STENSON et al., 2014), Ensembl (CUNNINGHAM et al., 2019) e MitoMap (LOTT et al., 2013), que também foram utilizadas no alinhamento de genes, identificação de isoformas e pseudogenes.

A frequência alélica foi rastreada a partir das bases Exome Aggregation Consortium (EXAC) (LEK et al., 2016), 1000genomes (CONSORTIUM, 2015), gnomAD (KARCZEWSKI et al., 2019), ABraOM (NASLAVSKY et al., 2017), Kaviar (GLUSMAN et al., 2011) e MitoMap (LOTT et al., 2013). A expressão dos genes estudados foi investigada na base de dados GTEx (CARITHERS et al., 2015) e as descrições das mutações seguiram as recomendações da Human Genome Variation Society (HGVS) (DEN DUNNEN et al., 2016).

3.7 ANÁLISE GENÉTICA FAMILIAR POR SEQUENCIAMENTO DE SANGER

A partir da identificação de genes candidatos, portando mutações com potencial patogênico, foi realizada a comprovação da segregação familiar por sequenciamento de Sanger, utilizando o primer específico para cada gene estudado. Os dados gerados foram analisados pelo programa bioedit (PHILLIPS; GNANAKARAN, 2015) e os heredogramas foram construídos a partir do programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM; R CORE TEAM, 2017).

3.8 ANÁLISES POSTERIORES EM CÉLULAS

Após comprovação das mutações, realizada pela análise de segregação familiar, cada caso foi avaliado individualmente para decidir sobre a necessidade de análises adicionais para caracterização da etiologia da DM. Estas análises estão descritas a seguir:

3.8.1 Cultivo celular

Em casos onde as mutações encontradas precisam ser avaliadas diretamente para determinação de sua patogenicidade, foram realizados cultivos de fibroblastos derivados de biopsia de pele dos pacientes.

3.8.1.1 Cultivo e imortalização de fibroblastos

A biopsia de pele foi realizada em condições de esterilidade por profissional habilitado no Hospital Pequeno Príncipe, utilizando um “punch” dermatológico de 1 a 5 mm, com extração do fragmento superficial de pele. A região escolhida para a realização da biopsia foi a face interna do antebraço, devido a maior capacidade de crescimento celular em cultivo. O fragmento foi colocado imediatamente em meio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) rico em glicose, suplementado com 15% de soro fetal bovino (FBS) e

1% de penicilina, estreptomicina, anfotericina B e uridina (10 mg/ml), mantidos a temperatura ambiente até o processamento.

Após a biopsia, o pequeno pedaço de pele, foi processado em cabine de fluxo laminar, sendo lavado com tampão fosfato salino (PBS), cortado em fragmentos menores e tratados com tripsina suplementada com 0,05% de EDTA_{K3} por 3 min a 37°C e 5% de saturação de CO₂, sendo inibida a reação adicionando-se meio de cultivo. Os fragmentos foram aderidos a placa de petri e mantidos em meio DMEM completo, até que os fibroblastos migrassem para a placa (BOGDANOWICZ, DANIELLE; LU, HELEN, 2014; RITTIÉ; FISHER, 2005).

As células geradas na UFPR foram então enviadas vivas em frascos completados com DMEM para a Universidade de Cambridge, onde seguiram em avaliação funcional.

Para que seja viável a realização de análises posteriores nos fibroblastos obtidos é fundamental que eles sejam imortalizados. Este processo foi realizado a partir da infecção por lentivírus contendo o plasmídeo pLOX-Ttag-iresTK (SALMON et al., 2000).

As células foram recuperadas utilizando as partículas lentivirais geradas com o plasmídeo pWpXL contendo o cDNA para o gene estudado. Meios seletivos foram preparados adicionando 1 µg/ml de puromicina (Invivo-Gen).

3.8.1.2 Curva de crescimento

As curvas de crescimento em glicose e galactose foram avaliadas usando o equipamento de análise celular denominado Incucyte HD (ESSEN BIOSCIENCE) usando um algoritmo para calcular a confluência celular com base nas imagens microscópicas das placas, geradas a cada 4 horas por um período de sete dias. O crescimento em meio com galactose é usado com o objetivo de forçar o uso da oxidação fosforilativa, onde normalmente são observadas alterações em modelos de deficiências mitocondriais. O crescimento de células em galactose é comumente utilizado para avaliação de disfunções em OXPHOS, já que a quebra de galactose é mais lenta que a da glicose, e como

consequência as células são forçadas a usar glutamina e o metabolismo anaeróbico, aumentando a utilização de OXPHOS para manutenção energética (AGUER et al., 2011).

3.8.2 Western blot

As amostras foram lisadas em tampão RIPA (NaCl 0,3 M, SDS a 0,1%, Tris 50 mM, pH 7,4, desoxicolato a 0,5%, Na₃VO₄ 1 mM, NaF 10 mM, pirofosfato de sódio 30 mM, MgCl₂ 10 mM, n-dodecil 1% -D-maltosido, 1 mM de PMSF) com a adição de inibidores de protease (coquetel inibidor de protease cOmpleteTM Mini EDTA-free). Os lisados foram centrifugados a 16.900 × g por 10 min, sendo o sobrenadante misturado com tampão de carga e separados por SDS-PAGE antes da imunotransferência. Amostras para eletroforese em gel nativo-azul (BN-PAGE) foram preparadas como descrito anteriormente (NIJTMANS; HENDERSON; HOLT, 2002; WITTIG; BRAUN; SCHÄGGER, 2006). As amostras nativas foram analisadas através de géis Bis-Tris NativePAGE pré-moldados, enquanto os Géis Bis-Tris NuPAGE da Novex (Life Technologies) foram usados para condições de desnaturação. Para Western blot, as amostras foram eletrotransferidas para membranas de PVDF e as intensidades do sinal de imunodeteção foram quantificadas usando ImageJ (ABRÀMOFF; MAGALHÃES; RAM, 2004).

Os anticorpos utilizados foram: Policlonal de coelho anti-MIC19 / CHCHD3 (1: 3.000; # A8584; Abclonal), anticorpo monoclonal de coelho anti-MIC60 / Mitofilina (1: 1.000; # ab137057; Abcam), anti-policlonal de coelho. MIC10 (1: 1.000; # ARP44801; Aviva), MIC26 / APOO Policlonal de Coelho (1: 1.000; # HPA003187; Atlas), MIC27 / APOOL Policlonal de Coelho (1: 1.000; # HPA000612, Atlas) IgG monoclonal de camundongo anti-OPA1 (1 : 1.000; # 612607; BD Biosciences), anti-GAPDH monoclonal de camundongo (1: 2.000; # ab8245; Abcam), monoclonal de camundongo anti-TUBULIN (1: 2.000; # T5201; Sigma),

3.8.3 Microscopia confocal

A análise de microscopia confocal foi realizada utilizando-se TOMM20 ou Mitotracker CMXRos Red como marcadores mitocondrial e formaldeído 3,7% para fixação. Após a fixação as células foram permeabilizadas com 0,1% de PBS com 0,1% de triton X-100 e 0,05% de deoxicolato de sódio seguido de lavagem e bloqueio com 2 ml de PBS acrescidos de 200 ul de FBS ou soro de cabra. O anticorpo primário foi incubado por no mínimo 1 hora, a 4°C, seguido de lavagem, incubação do anticorpo secundário por 1 hora em temperatura ambiente e fixação de lamínula sobre a lâmina com ou sem DAPI.

A aquisição de imagens foi realizada usando um sistema confocal Zeiss LSM880 com objetiva Zeiss Plan-Apochromat 100x / 1.4 NA, um sistema de microscópio N-SIM (Nikon) equipado com uma objetiva SR Apo TIRF 100 x 1.49 NA e uma câmara DU897 Ixon (Andor Technologies), ou ainda, em sistema confocal Nikon A1RSiMP (NIKON, Tokyo, Japan), utilizando objetivas de 100X, imersas em óleo (com abertura numérica de 1.40). Para o DAPI foi utilizado laser com 405 nm para excitação e filtro de intervalo de 425 - 475 nm. O programa Imaging Software Nis Elements 4.20 (NIKON, Tokyo, Japan) foi utilizado para a visualização das imagens e produção de animações em 3D pelo uso das fatias ópticas (Z slices).

3.8.4 Extração de RNA

A extração de RNA para a análise de expressão das proteínas se deu pelo KIT Invitrogen™ TRIzol™ Plus RNA Purification, seguindo as instruções do fabricante. O cDNA foi preparado por incubação com transcriptase reversa (Invitrogen) a 37°C por 1h e sua amplificação feita por reação em cadeia da polimerase (PCR), preparado em volume final de 50 uL, utilizando-se 1µL de cada iniciador que flanqueia uma região da seqüência de interesse e gene constitutivo (GAPDH) como controle da reação, 5 µL de tampão de PCR

(Tris/HCl a 75 mM, pH 9; KCl a 50 mM; MgCl₂ a 2 mM, (NH₄)₂SO₄ a 20 mM), 2 μL de desoxinucleotídeos a 0,4 mM (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e 1 μL de Taq DNA polimerase (1 U/μL).

Como resultado parcial desta parceria entre a UFPR, o Complexo Pequeno Príncipe e a Universidade de Cambridge, foram identificados 113 casos de “provável DM”, destes, 50 pacientes tiveram amostras de sangue coletadas para a realização de WES. 33 pacientes aguardam a coleta de amostra de sangue e 30 WES com laudos negativos pelas empresas de diagnóstico foram revisados. Dos 30 WES revisados, 9 casos (quadro 2) com prováveis genes causais foram selecionados para estudos posteriores sendo 5 em fase de processamento de dados (capítulo 1) e 4 (pacientes VI-IX) correspondentes aos capítulos 2 e 3 desta tese. Dentre os 9 casos foram identificadas 14 mutações em 7 genes, sendo 8 *missenses*, 2 nonsense, 3 com mudança de fase de leitura e 1 em região de splicing. 11 das 14 mutações identificadas não foram descritas previamente. Dos 9 pacientes analisados, 6 eram do gênero masculino e 3 feminino.

A prática multidisciplinar em diagnóstico genético de DM é necessária e recomendada pela *Mitochondrial Medicine Society* (PARIKH et al., 2017) e é comum em países da Europa, USA, Austrália e Nova Zelândia. No Brasil, a prática foi iniciada recentemente pela portaria 199/2014 do Ministério da Saúde, “Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras”, porém ela não oferece cobertura à pesquisa científica e exames de altos custo genético como o WES. Nesse caso o responsável pelo paciente necessita arcar com o valor do exame, que pode ainda resultar em laudo negativo. Por outro lado, para a pesquisa científica este exame possui alto valor agregado, já que novos genes e mutações podem ser identificados, contribuindo para o enriquecimento dos bancos de dados genéticos e o conhecimento sobre estas doenças. Além disso, caracterizar novas mutações possibilita o diagnóstico de outros casos no futuro, já que em exomas comerciais, os laudos só podem conter informações sobre mutações previamente caracterizadas e relatadas na literatura, portanto, mesmo sendo patogênica, se uma mutação não estiver relatada, o laudo do exoma será negativo, deixando o paciente sem o diagnóstico.

QUADRO 2 — APRESENTAÇÃO DOS CASOS DE DOENÇAS MITOCONDRIAIS IDENTIFICADAS DURANTE A REALIZAÇÃO DESTE TRABALHO, ONDE CONSTA IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE AFETADO, O FENÓTIPO, O GENE E MUTAÇÕES CANDIDATAS.

ID	FENÓTIPO	GENE	LOC	MUTAÇÃO
1	Deficít cognitivo Autismo Macrocrania Acidose láctica Fraqueza muscular Infecções recorrentes Disautonomia	VWA8	13q	NM_015058:c.2132_2135delTCAG (p.Thr711fs) c.3517C>T (p.Pro1173Leu)
2	Distonia Fraqueza muscular Déficit cognitivo Acidose láctica Irritabilidade Hipotonia Regressão motora Redução no ganho de peso	POLR3A	10q	c.1771-6C>G (região de splicing) c.3721G>A (p.Val1241Met)
3	Atrofia óptica Arritmia cardíaca	NDUFA12	12q	c.253C>A (p.Glu85X)
4	Ataxia Crises convulsivas Ptose Sonolência Apneia	ADPRHL2	1p	c.316C>T (p.Gln106X) c.485T>C (p.Leu162Pro)
5	Déficit cognitivo Autismo Atraso de desenvolvimento Epilepsia Imunodeficiência secundária com hipoplasia de medula óssea	FLII	17p	NM_002018:c.2099_2100insTCTG (p.Cys700fs) c.A2329C (p.Ile777Leu)
6	Atraso no desenvolvimento, comportamento autista, vômito, apneia	NDUFV1	11q	c.640G>A (p.Glu214Lys) c.1207dupG (p.Asp403Gly*fs)
7	Hipotonia, apneia, atrofia óptica, surdez neurosensorial, ptose, Hiperreflexia e disfagia	NDUFV1	11q	c.1268C>T (p.Thr423Met) (Homozigose)
8	Hipotonia, letargia, regressão motora, disfagia e estrabismo	NDUFV1	11q	c.1268C>T (p.Thr423Met) c.766C>T (p.Arg256Cys)
9	Vômitos, febre, diarreia, irritabilidade, fadiga, hipotonia, perda de peso, disautonomia gastrointestinal e da temperatura corporal, infecções repetitivas e comprometimento cognitivo	MIC26	Xp	c.350T>C (p.Ile117Thr)

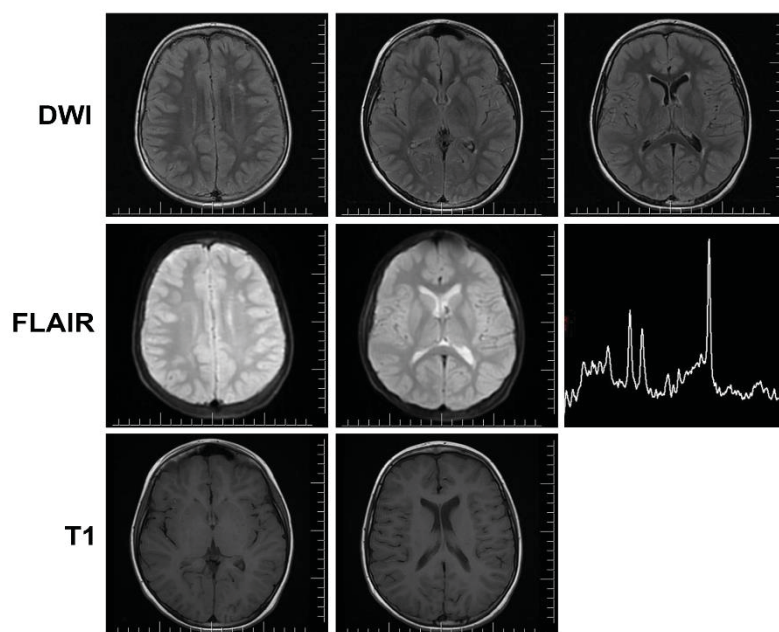
FONTE: A Autora (2019).

4.1 CASO CLÍNICO: VWA8

Paciente I, masculino, 11 anos de idade, hypersinal em T2/FLAIR na região peritrigonal da substância branca identificado na RM (figura 7), sugestivo de gliose, aumento constante de lactato e acidose láctica urinária (4.066, faixa de referência: 21-285 mmol/mol), quadro de infecções de repetição e resposta inflamatória exacerbada sob investigação, com baixa relação CD4/CD8, IgE elevada, microcitose e eosinofilia.

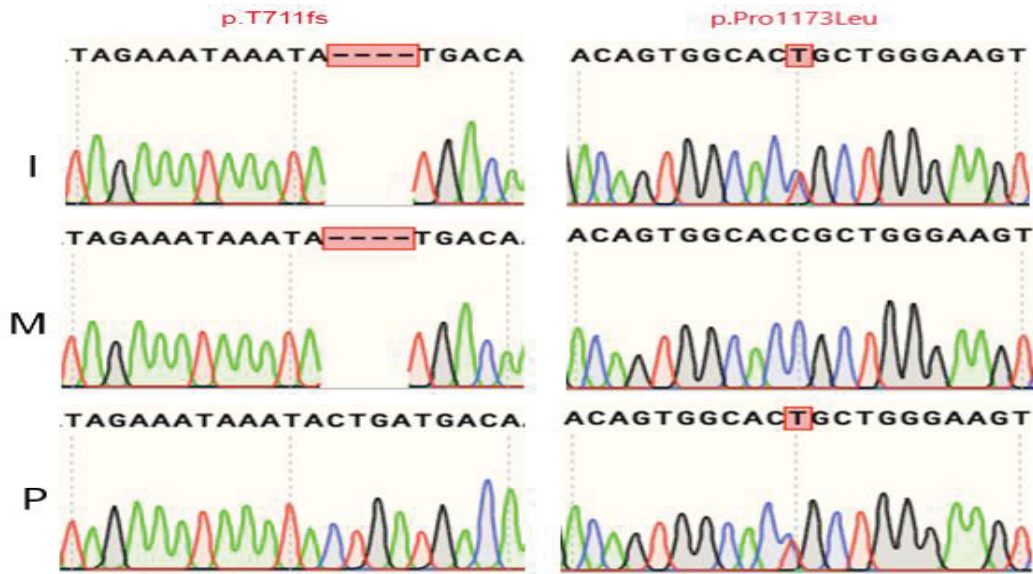
Após revisão de exoma trio (paciente, pai e mãe) foram identificadas no probando duas mutações em heterozigose composta, NM_015058:c.2132_2135delTCAG (p.Thr711fs) no exon 18 e c.3518C>T (p.Pro1173Leu) no exon 29 do gene VWA8, localizado em 13q14.11 (figura 8).

FIGURA 6 – RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DE CRÂNIO COM ESPECTROSCOPIA REALIZADA NO PACIENTE I.



FONTE: A Autora (2019).

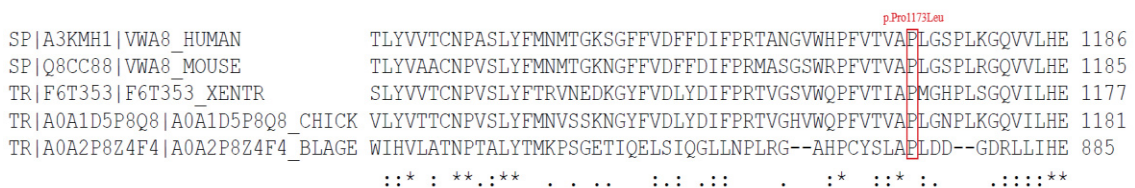
FIGURA 7 — MUTAÇÕES NM_015058:c.2132_2135delTCAG (p.T711fs) E c.3517C>T NO GENE VWA8, IDENTIFICADAS NO PACIENTE I (I), MÃE (M) E PAI (P).



FONTE: A Autora (2019).

A mutação p.Thr711fs causa o término precoce da tradução proteica no aminoácido 718, substituindo um ácido glutâmico por um códon de parada. Já a mutação p.Pro1173Leu possui frequência alélica inferior a 0,001 e causa a substituição entre aminoácidos apolares. A análise de conservação do resíduo p.Pro1173 (figura 9) demonstrou que o aminoácido prolina na posição 1173 é altamente conservado entre metazoários com simetria bilateral, sendo a mutação classificada como possivelmente patogênica pelo MutationTaster (score 1), PROVEAN (-2.66) e FATHMM (0.978) (SHIHAB et al., 2014), porém, como neutra pelo SNP&GO (score 0,253) e benigna pelo Polyphen2 (score 0,005). Nenhuma das mutações foi previamente descrita associada a condições patológicas.

FIGURA 8 — ALINHAMENTO APRESENTANDO A CONSERVAÇÃO DO RESÍDUO P.PRO1173 NO GENE VWA8 EM *HOMO SAPIENS* (HUMAN), *MUS MUSCULUS* (MOUSE), *XENOPUS TROPICALIS* (XENTR), *GALUS GALUS* (CHICK)



FONTE: A Autora (2019).

VWA8 codifica a proteína 8 contendo o domínio Von Willebrand (VWA8 ou KIAA0564), a função desta proteína ainda não foi caracterizada, mas sabe-se que ela apresenta duas isoformas, uma longa (VWA8-L) e uma curta (VWA8-S) (figura 10) e que VWA8 tem uma sequência alvo direcionada à mitocôndria (MitoProtII: 0.9724) onde sua função ainda não está definida (LUO et al., 2017).

FIGURA 9 — ISOFORMA LONGA (VWA8-L) E CURTA (VWA8-S) DA PROTEÍNA VWA8, COM A LOCALIZAÇÃO DAS MUTAÇÕES IDENTIFICADAS NO PACIENTE I

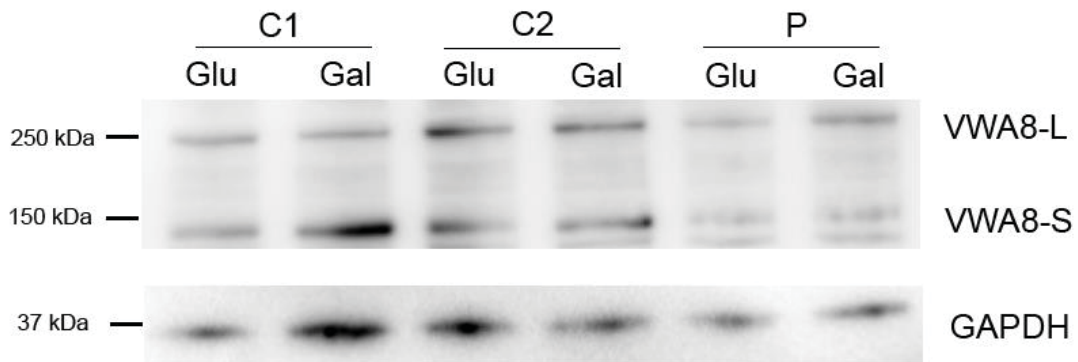


FONTE: A Autora (2019).

VWA8-L possui dois domínios (Walker A e B) que quando ativados alteram o funcionamento do CV, conferindo a VWA8-L um importante papel na produção energética mitocondrial. Esta isoforma é altamente expressada em fígado, rim, pâncreas, coração e músculo esquelético e durante a embriogênese se expressa em maior quantidade que VWA8-S, que apresenta expressão ectópica com atividade ATPase. Em estudo de análise proteica utilizando espectrometria de massas identificou-se VWA8-S como uma proteína peroxisomal localizada em rim de camundongo, associada à PEX7, receptor para proteínas de matriz peroxisomais, sintetizado em ribossomos livres no citosol (GREWE; RICHMOND; FEATHERSTONE, 2018; LUO et al., 2017).

A avaliação dos fibroblastos derivados de biópsia de pele do paciente I apresentou uma diminuição na quantidade da proteína VWA8-L e VWA8-S (Figura 11), porém, não foram observadas diferenças na quantidade de proteína quando se comparou o crescimento celular em glicose versus galactose.

FIGURA 10 — WESTERN BLOT MOSTRANDO UMA DIMINUIÇÃO NA QUANTIDADE DA PROTEÍNA VWA8-L E VWA8-S EM FIBROBLASTOS DO PACIENTE I (P) EM RELAÇÃO AOS CONTROLES (C1 E C2).



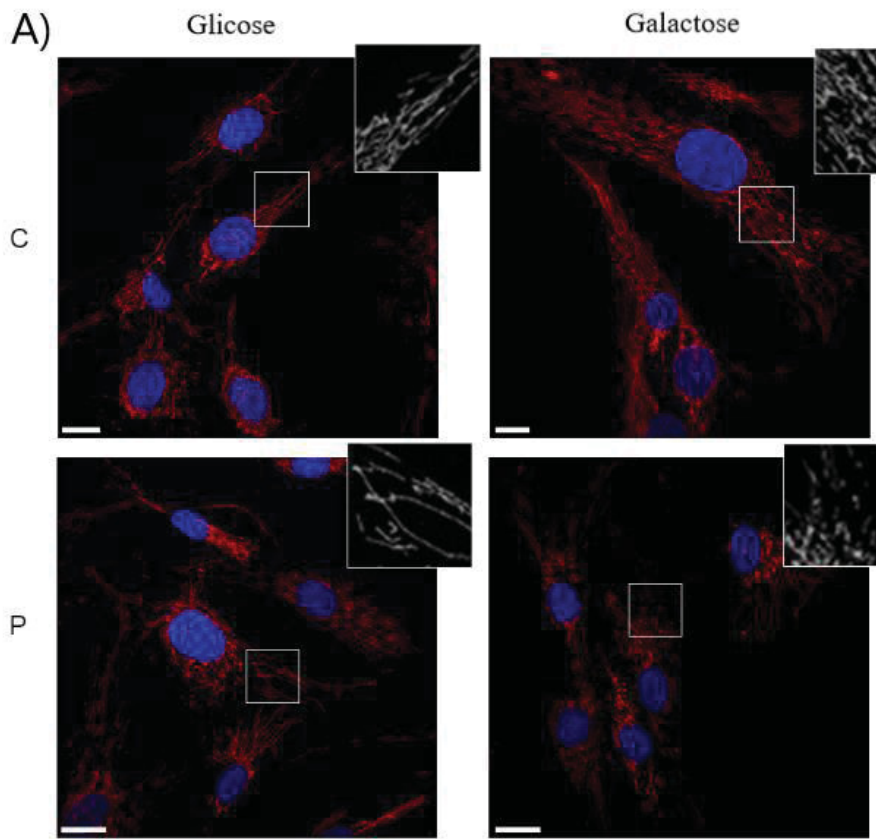
FONTE: C. BENINCA (2019).

A análise de morfologia mitocondrial, realizada utilizando microscopia confocal dos fibroblastos do paciente I (Figura 12), demonstrou que as células utilizadas como controle em galactose possuem uma rede hiperfusionada, que está relacionado ao aumento da biogênese mitocondrial e eficiência de OXPHOS. Já as células do paciente apresentaram fragmentação mitocondrial quando crescidas em galactose, o que pode ser decorrente de uma deficiência em OXPHOS, alterando assim os mecanismos de fusão.

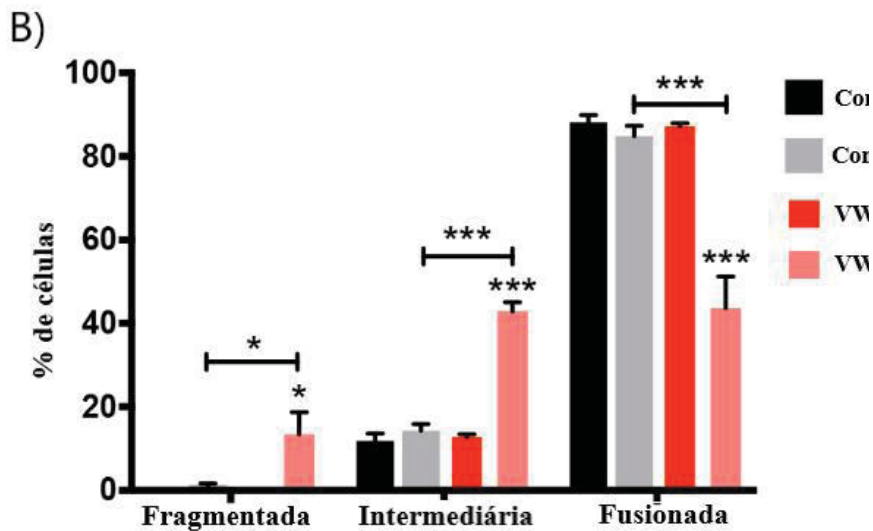
O aumento na biogênese mitocondrial foi verificado a partir da avaliação do número de cópias de DNAm (Figura 13), sendo este aumento observado nas células controle em galactose em relação à glicose, fato que não é observado nas células do paciente I, onde há uma diminuição no número de cópias em glicose e ainda mais pronunciada em galactose, em relação ao controle, sugerindo uma adaptação deficiente de biogênese quando cultivadas em galactose e uma depleção de DNAm em glicose que pode afetar a eficiência energética da célula.

Para avaliar os possíveis efeitos das mutações em OXPHOS, foram avaliados a quantidade e montagem dos complexos mitocondriais em condições não desnaturantes (BN-PAGE) (figura 14). Foi observada uma redução de subcomplexos III+IV e de supercomplexos contendo CI, porém esses dados devem ser repetidos para comprovação.

FIGURA 11

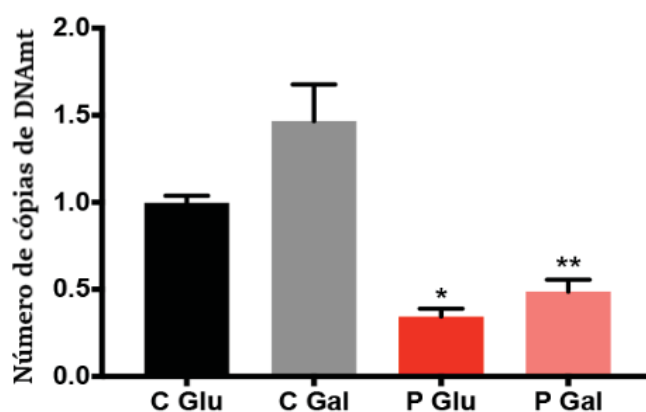


— A) IMAGEM DE MICROSCOPIA CONFOCAL MOSTRANDO MAIOR FRAGMENTAÇÃO MITOCONDRIAL NOS FIBROBLASTOS DO PACIENTE I (P) CULTIVADAS EM GALACTOSE EM COMPARAÇÃO A GLICOSE E CONTROLE (C) EM GLICOSE E GALACTOSE B) PORCENTAGEM DE CÉLULAS FRAGMENTADAS, INTERMEDIÁRIAS E FUSIONADAS (n=10 - 3 REPLICAS). ANOVA (p* < 0.01, p*** < 0.001)



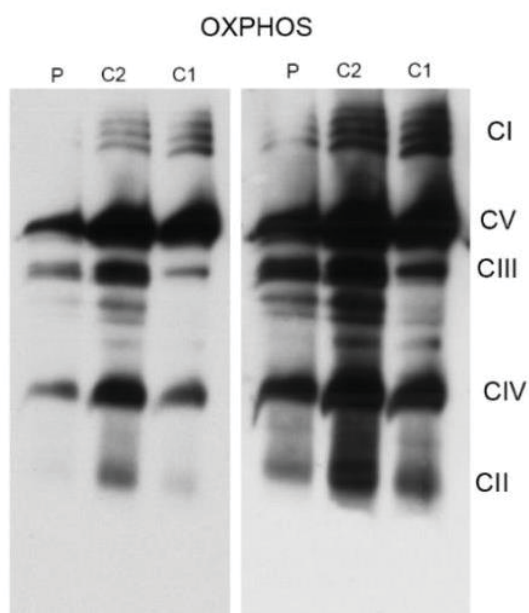
FONTE: Adaptado de C. BENINCA (2019)

FIGURA 12 — ALTERAÇÃO DA BIOGÊNESE DEMONSTRADO PELA VARIAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DE DNAmT EM AMOSTRA CONTRÓLE EM GLICOSE (C Glu) E GALACTOSE (C Gal) E PACIENTE I EM GLICOSE (P Glu) E GALACTOSE (P Gal) – (N=3) ANOVA ($p^* < 0.01$ e $p^{**} < 0.001$)



FONTE: Adaptado de A. REYES (2019)

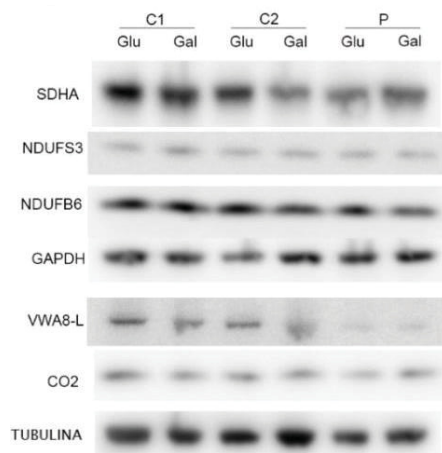
FIGURA 13 — AVALIAÇÃO DA QUANTIDADE E MONTAGEM DOS COMPLEXOS RESPIRATÓRIOS (CI-V) EM CONDIÇÕES NÃO DESNATURANTES (BN-PAGE).



FONTE: C. BENINCA (2019).

Não foram observadas diferenças nos níveis das subunidades analisadas (CII – SDHA, CI- NDUFS3 e NDUFB8, CIII – MTCO2) em condições desnaturantes (SDS-PAGE) (figura 15), porém outras subunidades devem ser avaliadas não somente por SDS-PAGE mas também por eletroforese bidimensional a partir de BN-PAGE para definir se apesar dos níveis não estarem alterados o posicionamento dessas subunidades nos complexos respiratórios esta afetado, alterando a composição final dos complexos montados.

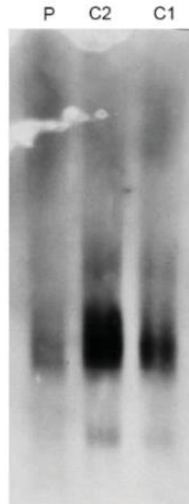
FIGURA 14 — WESTERN BLOT REALIZADO PARA QUANTIFICAÇÃO DE SUBUNIDADES DO COMPLEXO RESPIRATÓRIO (SDHA, NDUFS3, NDUFB6, GAPDH, MTCO2), TUBULINA (CONTROLE DE CARGA) E VWA8-L



FONTE: C. BENINCA (2019).

BN-PAGE de VWA8 (figura 16) também foi analisado para verificar a participação da proteína em complexos proteicos na mitocôndria, sendo encontrada apenas uma banda correspondente ao peso da proteína (230 kDa), o que sugere que em sua maioria a proteína não se une às membranas mitocondriais. Nota-se algumas bandas fracas de maior peso molecular, porém esse resultado deverá ser repetido com maior quantidade de material ou diferente permeabilização de membranas durante o preparo dos fragmentos mitocondriais.

FIGURA 15 — ELETROFORESE PARA AVALIAÇÃO DE VWA8 EM CONDIÇÕES NÃO DESNATURANTES.



FONTE: C. BENINCA (2019).

Estudos de associação são encontrados para *VWA8* onde o polimorfismo rs9532931 foi associado a pacientes com autismo, rs9566845 e rs9566867 associados a pré-disposição à enxaqueca em pacientes com transtorno bipolar ou transtorno de déficit de atenção com hiperatividade (OEDEGAARD et al., 2010) e rs73464952, rs370112959 e rs138075452 à fenda palatina não sindrômica (AYLWARD et al., 2016). Além disso, são encontradas variações em ganho de número de cópias (CNV) do gene *VWA8* associados a autismo (CUSCÓ et al., 2009). Em nenhum dos casos foram feitos estudos funcionais comprovando o efeito deletério das alterações encontradas. O camundongo *knockout* para *VWA8* é viável e apresenta somente alterações metabólicas como aumento nos níveis de potássio sanguíneo, diminuição na quantidade de amilase sanguínea e aumento nos níveis de glicose durante jejum prolongado (DICKINSON et al., 2016). Nosso trabalho é o primeiro caso descrito e com estudos funcionais associado a uma DM de herança autossômica recessiva de mutações em *VWA8*.

O quadro apresentado pelo paciente I se mostra condizente com os descritos para DM (KOOPMAN; WILLEMS; SMEITINK, 2012), sendo confirmado pelo diagnóstico genético, que identificou duas mutações, uma *missense* e uma com mudança de fase de leitura no gene *VWA8*, codificante para a recentemente

descoberta proteína mitocondrial VWA8-L (LUO et al., 2017). A mutação p.Thr711fs, gera um códon de parada no aminoácido 718 e devido a sua localização, esta mutação afeta tanto a isoforma longa, VWA8-L, quanto a curta, VWA8-S, impedindo o funcionamento adequado dessas proteínas. Já a mutação *missense*, p.Pro1173Leu, em resíduo altamente conservado, apresenta scores de patogenicidade variáveis, sendo classificada como possivelmente patogênica pelo MutationTaster, PROVEAN e FATHMM, porém, como neutra pelo SNP&GO e benigna pelo Polyphen2, o que demonstra a importância da caracterização das mutações em fibroblastos dos afetados. A variante p.Pro1173Leu está presente apenas na isoforma longa VWA8-L, localizada na mitocôndria e sem função descrita até o presente momento (GREWE; RICHMOND; FEATHERSTONE, 2018; LUO et al., 2017).

Recentemente, a colaboração com outro grupo de pesquisa trabalhando na caracterização de VWA8 sugere a localização dessa proteína no EIM (dados não apresentados na tese), o que indica um efeito secundário sobre OXPHOS quando verificamos fragmentação mitocondrial nas células do paciente I cultivadas em galactose (figura 12), com apresentação de possível deficiência na biogênese e consequente redução no número de cópias de DNAm (figura 13).

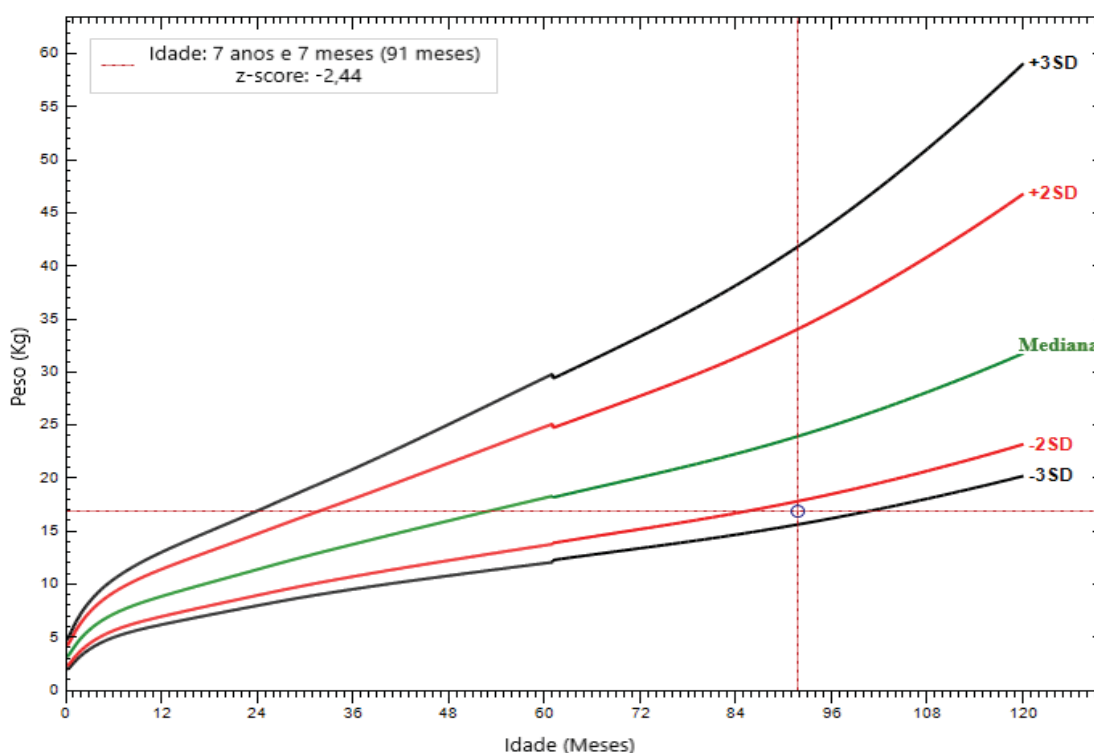
Este caso é particularmente interessante pois o paciente havia recebido um diagnóstico prévio de autismo além de apresentar um quadro com sintomas que facilmente se confundem com outras doenças não mitocondriais. Após a identificação das variantes ele recebeu orientação e manejo adequado levando a uma melhora significativa do quadro clínico geral, aumentando a qualidade e a expectativa de vida. Nos últimos anos, houve um aumento importante de evidências de disfunções mitocondriais no desenvolvimento de autismo (CASTORA, 2019), com diversas contribuições de mutações em DNAm (CRUZ et al., 2018; VARGA et al., 2018) ressaltando a importância do diagnóstico genético de DM em casos onde haja presença de características do espectro autistas no paciente.

A ausência de condições patológicas associadas às mutações p.Thr711fs e p.Pro1173Leu, bem como a relação das desordens associadas a VWA8 (ANNEY et al., 2010; AYLWARD et al., 2016; CUSCÓ et al., 2009; OEDEGAARD et al., 2010) torna este o primeiro caso de DM associada a VWA8.

4.2 CASO CLÍNICO: *POLR3A*

Paciente II, feminino, 7 anos de idade, apresenta distonia de difícil controle, fraqueza muscular e hipotonia, acidose láctica, irritabilidade, hipodontia, eletroencefalograma (EEG) com disfunção cerebral difusa e eletrocardiograma (ECG) com discreta hipertrofia ventricular esquerda. Sua análise antropométrica demonstra estatura normal, porém, peso abaixo da mediana (z-score: -2,44) (figura 17).

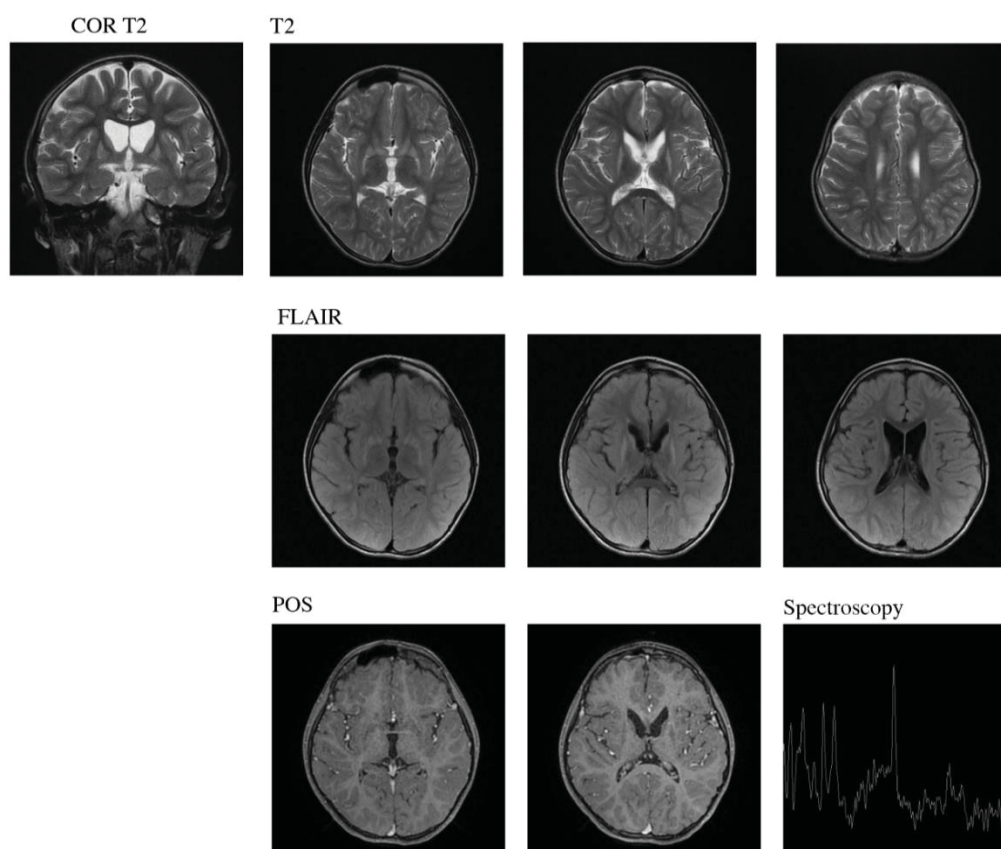
FIGURA 16 — LOCALIZAÇÃO DO PACIENTE II EM GRÁFICO ANTROPOMÉTICO DE PESO E IDADE (Z-SCORE 2,44).



FONTE: Adaptado de WHO (2006)

Exames bioquímicos demonstram alterações constantes nos níveis de lactato (2,8, 8,5 e 9,5, faixa de referência: 0.6-2.2 mmol/L), acidose metabólica (pH 7,23 e 7.26, faixa de referência: 7.32-7.43) e leucócitos (17.450 e 21.630, faixa de referência: 4000-7000/uL), enquanto RM (figura 18) indicou hiperintensidade de sinal em T2, redução de núcleo caudal e putamen, a espectroscopia por RM apontou picos de lactato, lipídios e N-acetil-aspartato.

FIGURA 17 – RESSONÂNCIA MAGNÉTICA REALIZADA NO PACIENTE II.



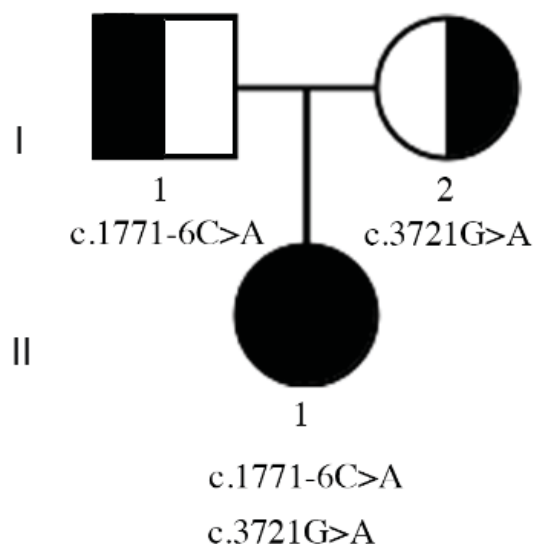
FONTE: A Autora (2019).

Paciente II faz uso de cannabidiol 99%, 200 mg/dia, Coenzima Q10 e L-carnitina, encontra-se em dieta enteral via gastrostomia com peptamen júnior (1311 Kcal/dia) e 32.9 g de proteína hidrolisada por dia. A introdução de dieta cetogênica apresentou boa resposta sobre o quadro geral, porém o uso de riboflavina e L-carnitina demonstrou aumento da irritabilidade.

A partir da análise de WES, as mutações missense c.3721G>A (p.Val1241Met - rs886141646) e em região de splicing c.1771-6C>G (rs115020338) foram encontradas no gene *POLR3A* em heterozigose composta,

sendo segregadas (figura 19) pela mãe (c.3721G>A) e pelo pai (c.1771-6C>G), que não apresentam sintomas.

FIGURA 18 — SEGREGAÇÃO DAS MUTAÇÕES ENCONTRADAS NO GENE *POLR3A* DO PACIENTE II



FONTE: A Autora (2019).

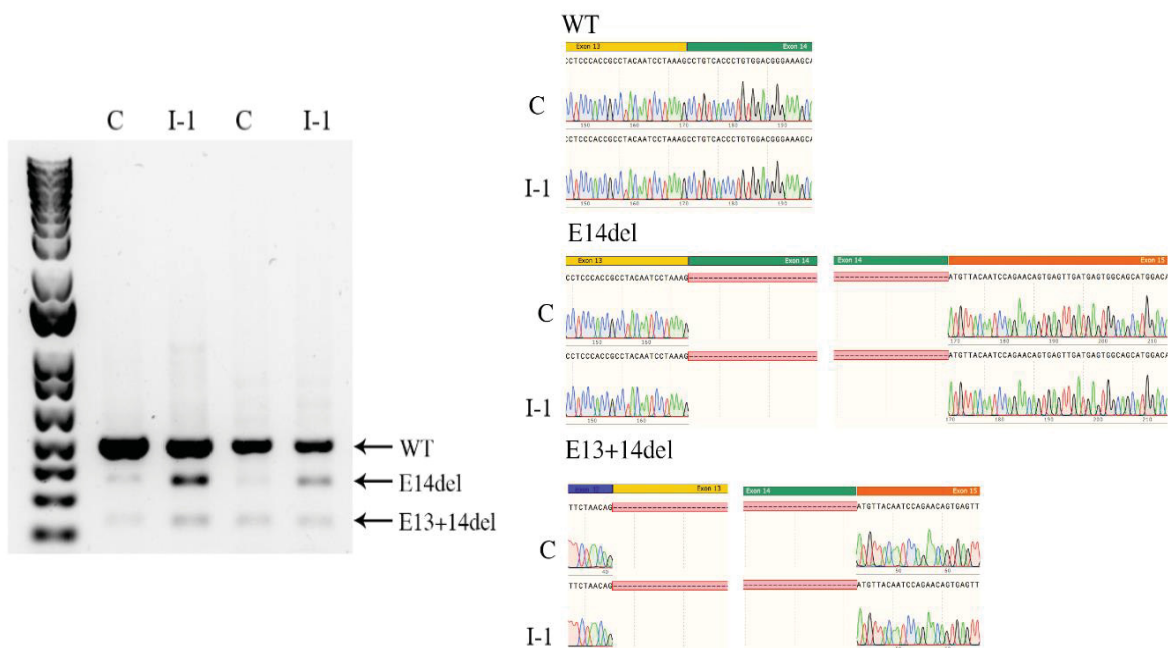
Mutações em *POLR3A* foram descritas previamente como responsável pela leucodistrofia hipomielinizante 7, com ou sem oligodontia ou hipogonadismo hipogonadotrófico (HLD7) (MIM: 607694), um distúrbio neurodegenerativo de caráter autossômico recessivo e início precoce, com fenótipo característico de espasticidade, ataxia, distonia, tremores e regressão cognitiva leve, onde os afetados frequentemente fazem uso de cadeiras de rodas a partir da segunda ou terceira década de vida (BERNARD et al., 2011).

POLR3A está localizado em 10q22.3 e codifica a subunidade A da RNA polimerase III, que catalisa a transcrição do DNA em RNA, sendo a subunidade A o componente catalítico da RNA polimerase III que sintetiza RNAr 5S e RNAt, entre outros (MINNEROP et al., 2017).

A mutação c.1771-6C>G está localizada a seis nucleotídeos a montante da junção do intron 13 com o exon 14 de *POLR3A* e está descrita com frequência alélica inferior a 0,0001% (LEK et al., 2016). A mutação c.1771-6C>G foi

associada a eliminação de região realçadora de splicing, sendo que a ausência desta região pode resultar em perda do exon 14 e a inserção de um códon de parada prematuro após oito resíduos de aminoácidos (AZMANOV et al., 2016). No paciente II foi detectada a perda do exon 14 e do intron 13 (figura 20).

FIGURA 19 — GEL DE AGAROSE FEITO A PARTIR DE CDNA EXTRAÍDO E AMPLIFICADO POR PCR DE FIBROBLASTOS CONTROLE (C) E DO INDIVÍDUO II (I-1) E SEQUENCIAMENTO DEMONSTRANDO A DELEÇÃO DO EXON 14 (E14del) E DOS EXONS 13+14 (E13+14del) DO GENE *POLR3A*.



FONTE: C. BENINCA (2019)

A mutação c.1771-6C>G está descrita na literatura médica em homozigose em paciente com alterações na região nigroestriatal, resultando em ataxia da marcha, rigidez nos membros inferiores, sinal bilateral de Babinsky, rigidez simétrica, distonia e disartria, com RM apresentando atrofia simétrica bilateral do núcleo temporal e putamen com substância branca normal (AZMANOV et al., 2016).

Como apresentado na figura 21, a análise de conservação demonstrou que o resíduo p.Val1241 do gene *POLR3A* é altamente conservado entre vertebrados. A mutação p.Val1241Met é classificada como possivelmente patogênica por algoritmos de predição como o MutationTaster (score 0.99),

Polyphen (0.961) e VEST3 (0.838). Esta mutação possui frequência descrita <0.0001 em TOPMED.

FIGURA 20 — ALINHAMENTO DO GENE *POLR3A* MOSTRANDO A CONSERVAÇÃO DO RESÍDUO P.Val1241 QUE ENCONTRA-SE MUTADO NO PACIENTE II.

```

SP|014802|RPC1_HUMAN      VQGIPEVSRRAVIHIDEQSGKEKYKLLVEGDNLRVAVMATHGKKGTRTTSNNTYEVEKTLGI 1260
TR|B2RXC6|B2RXC6_MOUSE  VQGIPEVSRRAVIHIDEQSGKEKFKLLVEGDNLRVAVMATHGKKGTRTTSNNTYEVEKTLGI 1260
SP|Q5ZL98|RPC1_CHICK     VQGIPEVSRRAVIHIDEQSGKEKYKLLVEGDNLRVAVMATHGKKGTKTSSNNTYEVEKTLGI 1260
TR|A0A0R4IV41|A0A0R4IV41_DANRE VQGIPEVSRRAVIHIDEQSGKQKFKLLVEGDNMRSVMATHGVNGSKTTSNNTYEVEKTLGI 1260
TR|A4IHM8|A4IHM8_XENTR  VQGIPEVARAVIHIDEQSGKEKYKLLVEGDNLRSVMATHGVKGSRTTSNNTYEVEKTLGI 1259
*****:*****:*.*****:*.*****:*.*****:*.*****:*.*****:*.*****:

```

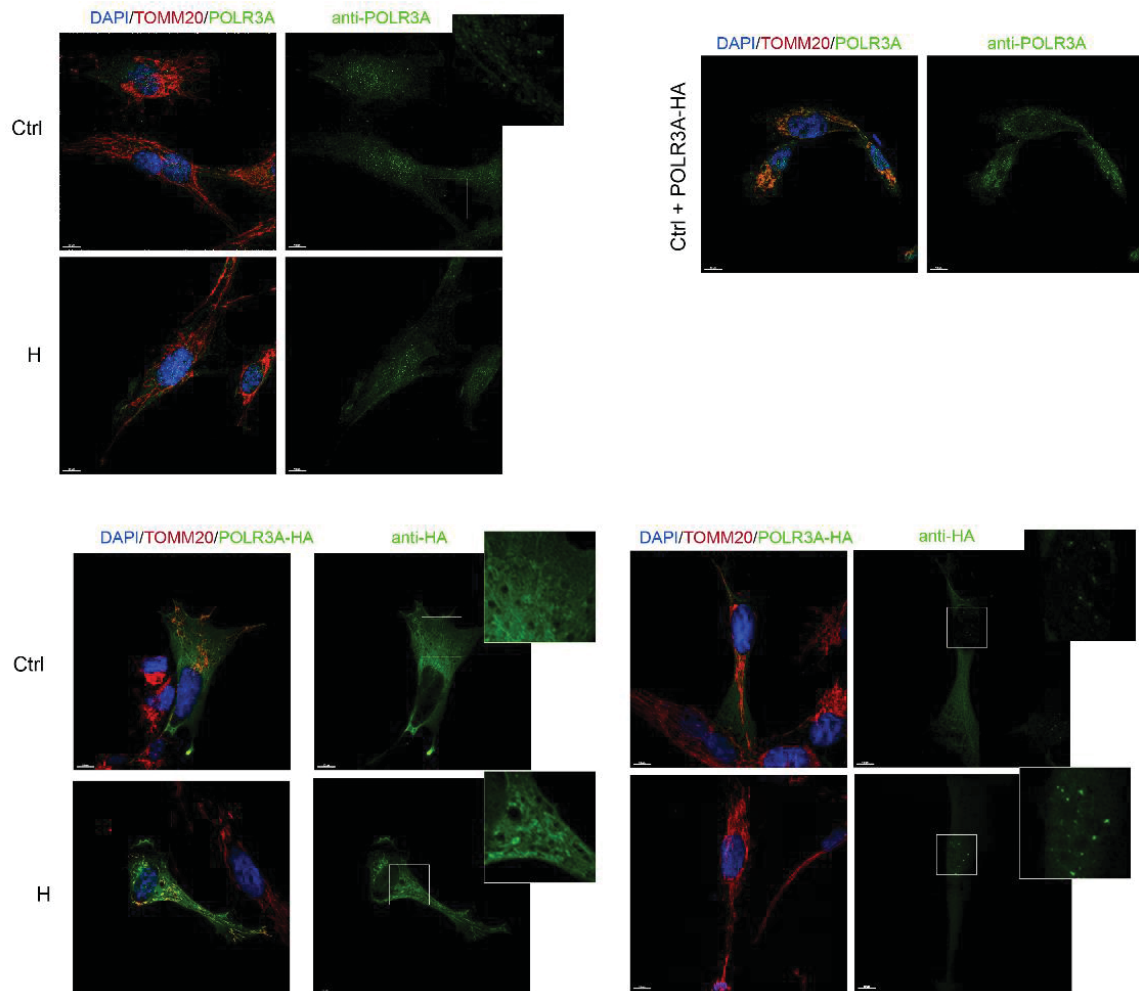
FONTE: A Autora (2019).

As análises de comprovação de patogenicidade da mutação p.Val1241 foram iniciadas nos fibroblastos do paciente, porém dados parciais deste trabalho indicam que pode haver uma dupla localização para POLR3A, previamente identificado apenas no núcleo. A partir de análises de microscopia confocal, realizadas utilizando anticorpos anti-POLR3A e da expressão de POLR3A-HA, verifica-se a localização mitocondrial de POLR3A além do seu posicionamento nuclear já conhecido (figura 22). Esta colocalização de POLR3A foi verificada por microscopia confocal e fracionamento celular (dados não mostrados na tese) em expressão endógena e sobre-expressão da versão POLR3A-HA e POLR3A somente, onde em todos os casos foram verificados a dupla localização. Casos de proteínas com localizações mitocondriais e em outros compartimentos celulares são comuns na literatura (SCANLON; SALTER, 2019).

Como pode ser visto na figura 23, as medidas de intensidade do sinal de POLR3A na região mitocondrial demonstraram a colocalização da proteína com o marcador mitocondrial TOMM20 (vermelho), o que acontece endogenamente ou mesmo quando a proteína é sobre-expressa. A sobre-expressão da proteína sem o uso do HA no seu extremo C-terminal apresenta a mesma localização (resultado não mostrado), indicando que independente da presença de um marcador para a proteína sua dupla localização é evidente. Nota-se

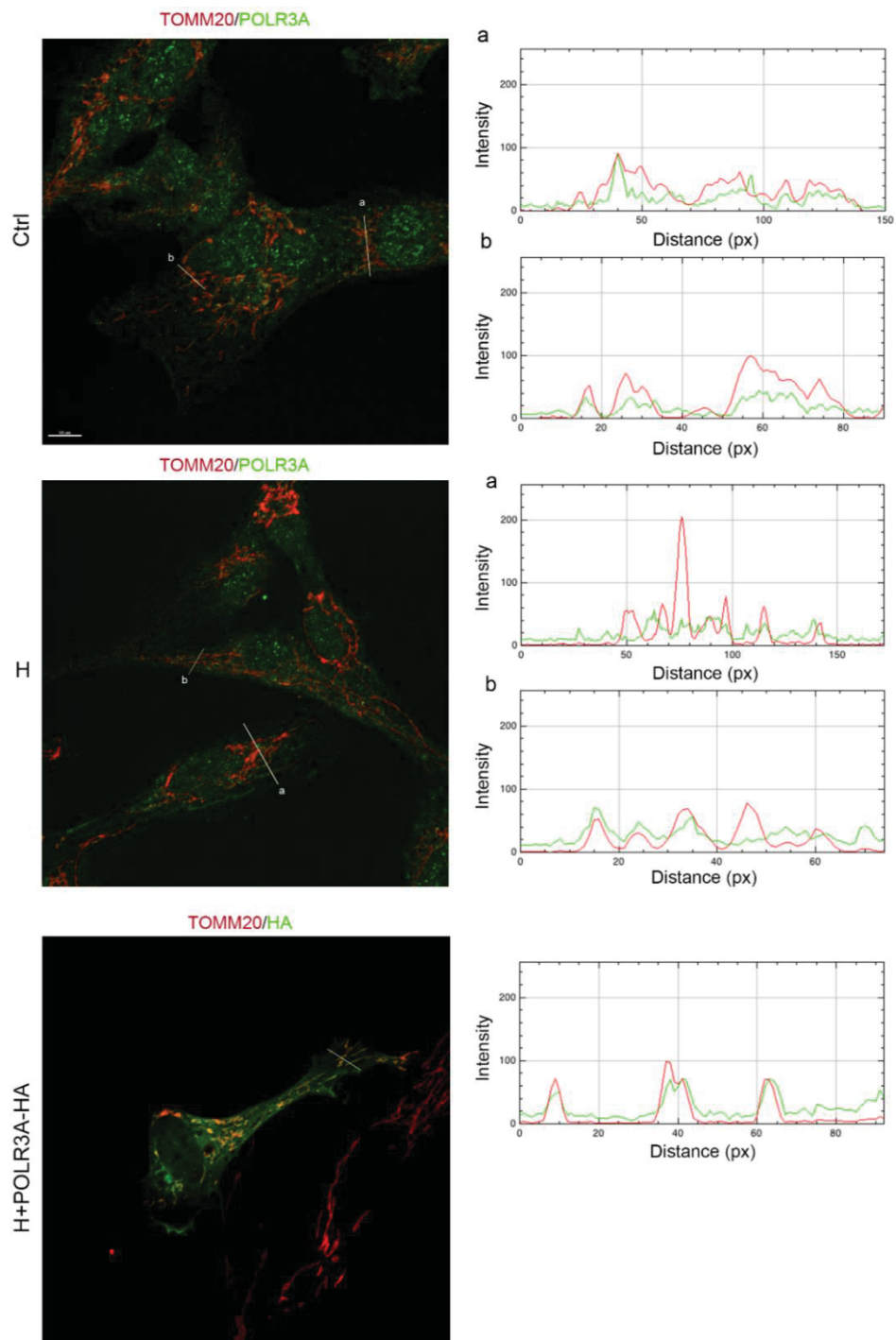
também no paciente II uma redução na intensidade do sinal de POLR3A compatível com a degradação da proteína não funcional.

FIGURA 21 — ANÁLISE DE MICROSCOPIA CONFOCAL MOSTRANDO A LOCALIZAÇÃO DE POLR3A. AS CORES INDICAM O NÚCLEO (AZUL), A LOCALIZAÇÃO DAS MITOCÔNDRIAS (VERMELHO) E POLR3A-HA E ANTI-HA (VERDE) EM AMOSTRA CONTROLE (CTRL) E PACIENTE II (H)



FONTE: C. BENINCÁ (2019).

FIGURA 22 — PERFIL DE INTENSIDADE DE POLR3A EM AMOSTRA CONTROLE (Ctrl) E PACIENTE II (H).

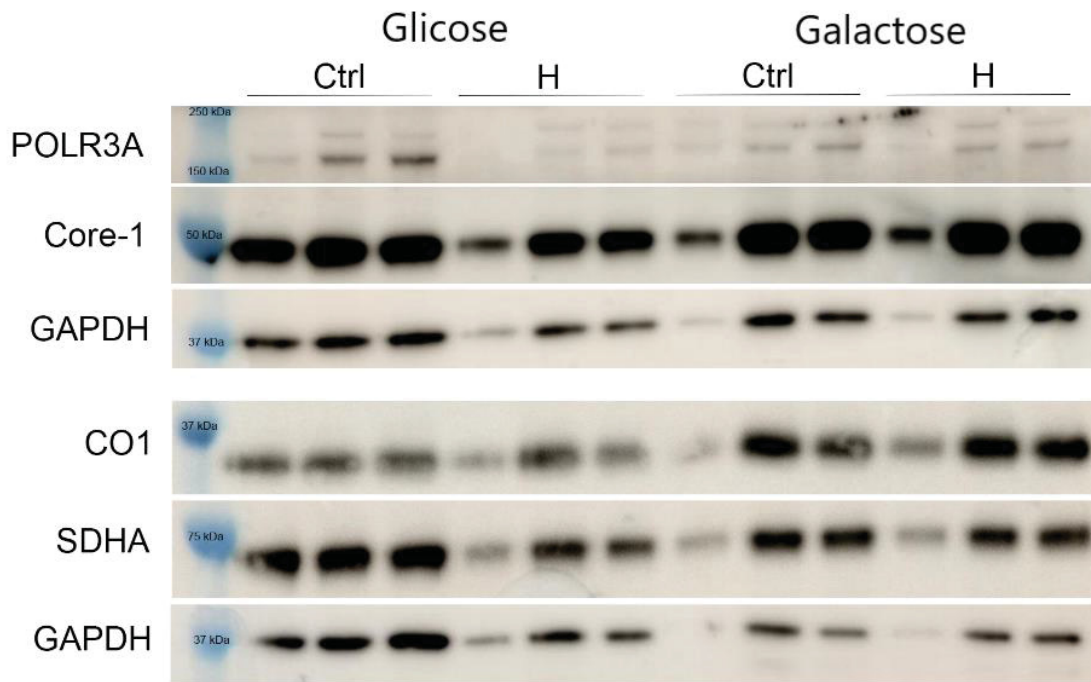


FONTE: C. BENINCÁ (2019).

O western blot de fibroblastos do paciente II crescidos em glicose versus galactose, demonstra redução na concentração de POLR3A com relação a GAPDH (figura 24) na amostra do paciente em ambos meios de cultura, o que

sugere uma instabilidade da proteína com maior degradação da mesma. Nota-se também uma redução de POLR3A em controles quando submetidos a meio suplementado com galactose, fato que deve ser investigado futuramente.

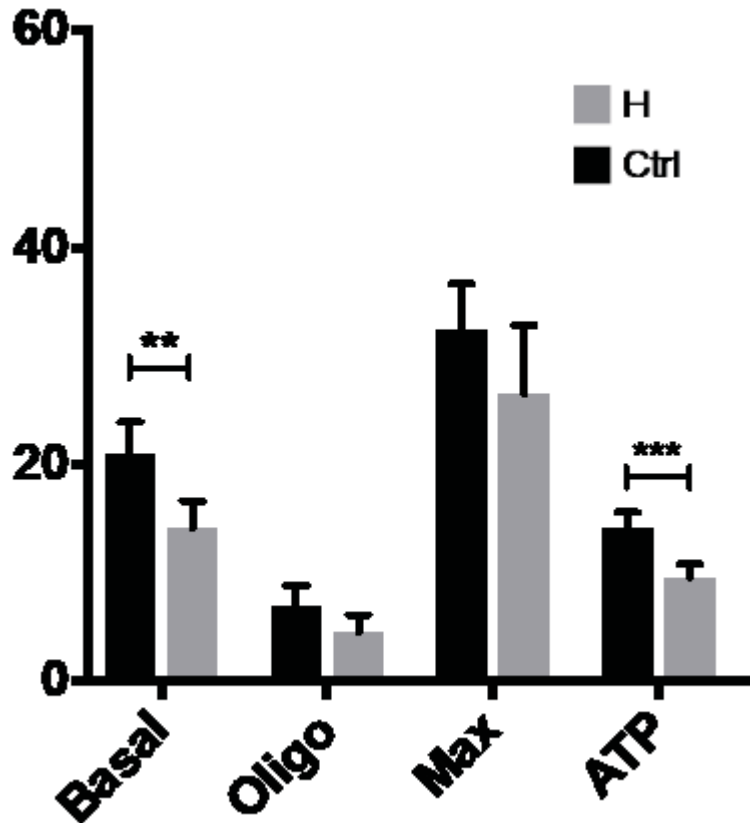
FIGURA 23 — WESTERN BLOT DE SUBUNIDADES DOS COMPLEXOS MITOCÔNDRIAIS E POLR3A EM AMOSTRA CONTROLE (Ctrl) E PACIENTE II (H).



FONTE: Adaptado de C. BENINCÁ (2019).

Apesar de não haver diferenças na quantidade das subunidades dos complexos respiratórios analisadas, as células da paciente II mostram uma diminuição no consumo de oxigênio basal e conseqüentemente menor geração de ATP (figura 25), demonstrando assim uma deficiência em OXPHOS que deve ser melhor avaliada.

FIGURA 24 — GRÁFICO DE CONSUMO DE OXIGÊNIO DEMONSTRANDO A REDUÇÃO SIGNIFICATIVA NA ATIVIDADE BASAL (BASAL) E PRODUÇÃO DE ATP (ATP) DO PACIENTE II (H) EM RELAÇÃO AO CONTROLE (Ctrl) N = 3 RÉPLICAS BIOLÓGICAS, ANOVA **p<0.001 e ***p<0.0001.



FONTE: Adaptado de C. BENINCÁ (2019).

Paciente II apresenta um quadro característico de DM, com melhora generalizada a partir da introdução de dieta cetogênica e cofatores, porém na revisão de exoma foram encontradas em heterozigose composta, as mutações *missense* c.3721G>A (p.Val1241Met) e c.1771-6C>G (rs115020338) em *POLR3A*, gene caracterizado como componente catalítico da RNA polimerase III, portanto com localização nucleolar (MINNEROP et al., 2017).

Esses achados trazem uma nova perspectiva às funções de *POLR3A* no desenvolvimento de DM, já que sua nova localização mitocondrial explicaria sintomas apresentados em HLD7, como o aumento significativo de lactato e

presença de pico de lactato em RM de crânio antes não correlacionadas a sua função nucleolar.

É importante ressaltar que a mutações c.1771-6C>G está descrita como definitivamente patogênica e não foi relatada no laudo do laboratório de diagnóstico. No caso desta variante patogênica, a prática recomendada pela ACMG é a de classificar a outra mutação p.Val1241Met como de significado incerto, para que o laudo possa ser liberado, já que o quadro clínico do paciente se enquadra com o descrito para o gene *POLR3A*, facilitando assim a conduta médica.

4.3 CASO CLÍNICO: *NDUFA12*

Paciente III, masculino, 16 anos, apresenta perda visual subaguda indolor por atrofia óptica e arritmia cardíaca. Filho de pais consanguíneos (primos de primeiro grau), com 3 irmãs e 1 irmão sem sintomas relatados. Após realização de exoma identificou-se como candidata a mutação c.253C>A (p.Glu85X) em homozigose, no gene *NDUFA12*, localizada em 12q22, ainda não associada a condições patológicas.

Biopsia de pele foi realizada para obtenção de fibroblastos, que se encontram em expansão e, logo após, serão encaminhados à Universidade de Cambridge para análises posteriores. A análise de segregação familiar também está em andamento.

A proteína *NDUFA12* é uma subunidade da fração hidrofílica do CI. Em estudo realizado com células humanas HEK293T demonstrou-se que a ausência de *NDUFA12* resulta na ausência do módulo N, com consequente falha na montagem de CI e deficiência respiratória (OSTERGAARD et al., 2011; STROUD et al., 2016).

Uma única família é reportada na literatura com mutações em *NDUFA12*, sendo associada ao desenvolvimento de Síndrome de Leigh de tipo 23, caracterizada por hipertricosse, atraso no desenvolvimento, atrofia muscular, hipotonia, distonia, dificuldades de aprendizado, anormalidades na substância

branca cerebral e deficiência de CI em vários tecidos (OSTERGAARD et al., 2011), com apresentação clínica diferente do paciente III, que apresenta perda visual subaguda indolor por atrofia óptica e arritmia cardíaca.

A mutação identificada p.Glu85X em homozigose por origem comum, se deve a consanguinidade dos pais, que resulta em maior risco para o desenvolvimento de doenças de caráter recessivo (KEYFI et al., 2018).

4.4 CASO CLÍNICO: *ADPRHL2*

Paciente IV, feminino, 4 anos de idade. Apatia e irritabilidade acompanhadas de ataxia foram os primeiros sintomas apresentados e se iniciaram aos 10 meses de idade. Filha de casal não consanguíneo, com uma irmã sem sintomas. EEG e RM de crânio sem alterações, porém com crises convulsivas de difícil controle. Apresenta piora na ataxia e desencadeamento de disfagia quando em uso de Gardenal. Atualmente apresenta ptose, dismotilidade intestinal, ataxia de difícil controle, sonolência e apneia. Frente a desconfiança de ataxia episódica de tipo II foi solicitado WES em 2016, resultando em laudo negativo. Em 2018, durante revisão de WES para pesquisa, foram encontradas como candidatas as seguintes mutações em heterozigose composta no gene *ADPRHL2*: c.316C>T (p.Gln106X) segregando do pai, com frequência alélica inferior a 0,00001%, e c.485T>C (p.Leu162Pro) segregando da mãe e sem frequência descrita. Nenhuma das mutações encontradas está associada a fenótipos patológicos previamente descritos, porém, outras mutações no gene *ADPRHL2* estão relatadas como responsáveis pelo desenvolvimento da Síndrome de Ataxia Epiléptica Degenerativa Induzida por Estresse Pediátrico, caracterizada por niastigmatismo, ptose, oftalmoplegia, atrofia muscular e cerebral, atraso no desenvolvimento, ataxia e convulsões (GHOSH et al., 2018).

A mutação p.Gln106X gera um códon de parada no aminoácido 106, localizado 40 resíduos de aminoácidos antes do domínio de ligação do substrato.

A mutação p.Leu162Pro, causa a substituição do aminoácido leucina por prolina, ambos apolares em uma posição altamente conservada em vertebrados (figura 26) . As análises de patogenicidade realizadas nos programas MutationTaster e Polyphen2 apresentaram o mesmo score de patogenicidade, igual a 1, classificando-a como possivelmente patogênica.

Identificar as mutações em *ADPRHL2*, 2 anos após seu laudo de WES ser descrito como negativo, ressalta a importância de revisões periódicas dos dados de WES segundo o avanço das informações na literatura científicas. Segundo a ACMG (RICHARDS et al., 2015), a mutação p.Gln106X deve ser classificada como variante definitivamente patogênica e a variante *missense* como de significado incerto, mesmo que seus scores de patogenicidade sejam altos, pois segundo a ACMG somente a caracterização direta da mutação permite a classificação como definitivamente patogênica em laudo de exoma. Para uso em pesquisa, utilizamos o termo possivelmente patogênica para escores elevados de mutações *missense* (RICHARDS et al., 2015).

FIGURA 25 — ALINHAMENTO APRESENTANDO A CONSERVAÇÃO DO AMINOÁCIDO LEUCINA NA POSIÇÃO 162 DO GENE *Adprhl2*.

```

SP|Q9NX46|ARHL2_HUMAN EYK KDPDRGYGAGVVTVF K KLLNPKCRDVFEPARAQFNGKGSYGNGGAMRVAGISLp.Leu162ProAYSS 166
SP|Q8CG72|ARHL2_MOUSE EYK KDPDRGYGAGVITVF K KLLNPKCRDVYEPARAQFNGKGSYGNGGAMRVAGISLp.Leu162ProAYSS 172
SP|Q5ZI51|ARHL2_CHICK EYKKEPNRGYGMVVNVF K KLLSPQCSDFEPAQAQFNGKGSYGNGGAMRVAGIPLp.Leu162ProITYSD 169
SP|Q28FQ6|ARHL2_XENTR EYNRDPDRGYGMAVVHVF E KLGSGEYKHVFS PAREQFDGKGSYGNGAAMRVVGIp.Leu162ProSLAYPR 147
SP|Q66HT8|ARHL2_DANRE EYSHSPGRGYGSGVVQVLRK L ASPHLKDVFPQAQAQFNGGRGSFNGGAMRAVPFALAFRS 155
**.:*.**** .*: *:.** . . .*:.*: **.*:***:****.***. . :*:

```

FONTE: A Autora (2019).

Biopsia de pele do paciente IV foi realizada para a obtenção de fibroblastos, porém, o paciente reside em outro estado e devido ao tempo em que a amostra permaneceu sendo transportada houve degradação do material, impossibilitando a realização do cultivo celular. Uma nova tentativa de coleta de biopsia de pele para cultivo de fibroblastos do paciente IV deverá ser feita, a partir de qual, esperamos que seja possível dar continuidade no estudo.

O acúmulo de proteínas com adição de grupamentos de ADP-ribose é um fator indutor de morte celular, porém, *ADPRHL2* atua como regulador negativo deste processo, expressando a enzima ADP ribosilhidrolase 2, que atua removendo mono-ADP-ribose ligada a resíduos de serina, mediando a

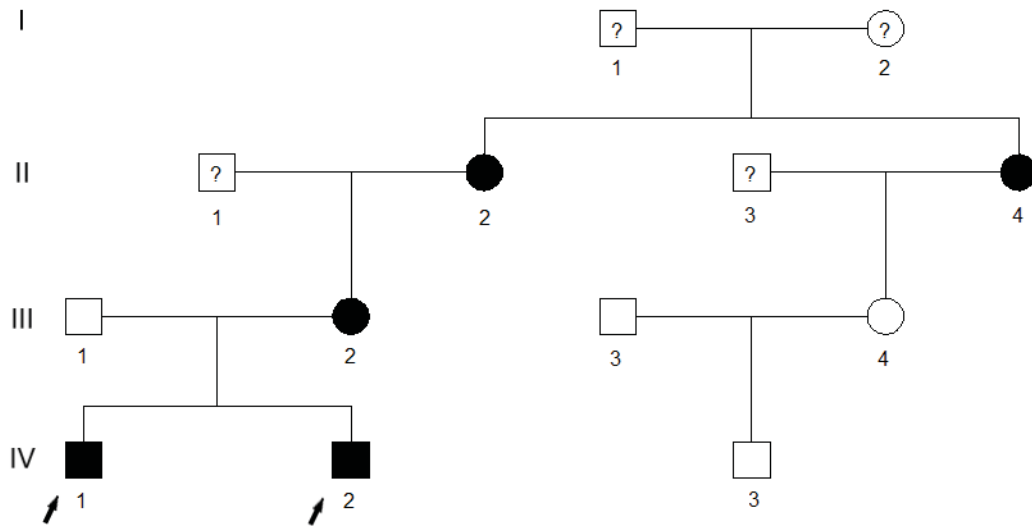
restauração da homeostase celular (PALAZZO et al., 2018). Um dos mecanismos propostos para explicar o desenvolvimento do fenótipo nos pacientes com mutação em *ADPRHL2* é a exposição das células ao estresse oxidativo, que induz um desequilíbrio incapaz de ser contrabalanceado por ADP ribosilhidrolase 2 devido a presença de mutações no gene *ADPRHL2*. O uso de minociclina como inibidor de enzimas responsáveis pela adição de poli-ADP-ribose a proteínas recuperou parcialmente o fenótipo de *Drosophila melanogaster* afetadas por mutações no gene *Parg*, homólogo de *ADPRHL2* em humanos, sugerindo um possível tratamento para os pacientes afetados (GHOSH et al., 2018).

4.5 CASO CLÍNICO: *FLII*

Pacientes I-A e I-B (IV-1 E IV-2, figura 27) são irmãos, 8 e 10 anos, consecutivamente, apresentam comprometimento cognitivo, autismo, retardo global do desenvolvimento, epilepsia e imunodeficiência com hipoplasia de medula óssea, quadro multisistêmico, porém, sem marcadores clássicos de DM como aumento de lactato e outros. Foi incluído na pesquisa por semelhança com outros casos aqui apresentados, porém seu diagnóstico clínico de DM é discutível. Análise de exoma revelou heterozigose em *cis* das mutações NM_002018:c.2099_2100insTCTG (p.Cys700fs) e c.A2329C (p.Ile777Leu) no gene *FLII*, localizado em 17p11.2, sem atividade mitocondrial. A frequência alélica de ambas é inferior a 0,0002%, porém não são relatadas juntas na população.

Além dos pacientes I-A e I-B, outros pacientes da família, portadores das mutações p.Cys700fs e p.Ile777Leu, apresentam sintomas como epilepsia na infância, atraso de desenvolvimento cognitivo na infância e demência na vida adulta, não relacionada a idade (II2); gliose em RM e anemia grave na infância, dificuldade de aprendizado, hiperdontia (III2); atraso de desenvolvimento cognitivo na infância e demência (II4). Em todos os adultos com presença das variantes nota-se problemas comportamentais e de socialização.

FIGURA 26 — SEGREGAÇÃO DO GENE *FLII* NOS MEMBROS DA FAMÍLIA DOS PACIENTE I-A e I-B



FONTE: A Autora (2019).

Sabe-se que *FLII* codifica uma proteína que possui um domínio de ligação a actina semelhante a gelsolina, parece atuar na sinalização hormonal de estrogênio e no desenvolvimento embrionário precoce, além de ter participação na regulação dos rearranjos do citoesqueleto, porém sua atividade exata ainda é desconhecida. Caracterização do gene demonstrou que mutações em *FLII* tornam *Drosophila melanogaster* incapazes de voar devido a problemas neurológicos (CAMPBELL et al., 1993). *FLII* foi associado a Sarcoma de Ewing e Síndrome de Smith-Magenis e os achados clínicos incluem baixa estatura, braquidactília, atraso no desenvolvimento, distúrbios do sono e problemas comportamentais (CHEN et al., 1995; GONZÁLEZ-LAMUÑO et al., 2002).

Apesar de não se tratar de uma DM, este caso foi incluído na etapa inicial de estudo devido a similaridade com outros casos apresentados, apesar disso, por não se tratar de um gene mitocondrial e a apresentação clínica não ser de DM, a colaboração com outro grupo de pesquisa em doenças

neurológicas está sendo arranjada para envio das células e procedimento da análise de patogenicidade das mutações encontradas.

4.6 OUTROS CASOS

Além disto, dentro dos 30 pacientes com WES analisados, outros 6 representam casos onde uma ou mais mutações foram identificadas (quadro 3), e em todos há correspondência dos genes encontrados com quadro clínico apresentado pelos afetados, porém, geneticamente alguns são casos onde o padrão de herança não se enquadra com o descrito na literatura. Casos de herança combinada de mutações (X, XI e XIV) em diferentes genes são descritos em DM, porém sua avaliação somente pode ser feita a partir dos fibroblastos dos pacientes, ainda não disponíveis para análise. Nesses casos e em XV, pode haver mutações nesses genes que não estão acessíveis ao WES, como deleções, duplicações ou transposições, além de alterações em regiões promotoras ou intrônicas profundas, que devem ser avaliadas futuramente. Os casos XII e XIII, enquadram-se no tipo de herança e relação fenótipo/genótipo, porém o falecimento dos pacientes antes da coleta da biopsia de pele para derivação dos fibroblastos impossibilitou a definição de patogenicidade das mutações encontradas.

QUADRO 3 — APRESENTAÇÃO DOS CASOS DE PACIENTES (ID) COM MUTAÇÃO IDENTIFICADA, PORÉM, QUE CONTINUAM SOB REVISÃO DE EXOMA, ONDE CONSTA IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE AFETADO, O FENÓTIPO, O GENE E MUTAÇÕES CANDIDATAS.

ID	FENÓTIPO	GENE: MUTAÇÃO	OMIM	SEGREGAÇÃO
X	Hipotonia, fraqueza muscular, hipoglicemia, episódios comatosos	<i>CPT2</i> p.Phe494Leu	Miopatia e deficiência de carnitina palmitotransferase II induzida por estresse, herança autossômica dominante.	Pai
		<i>MT-COX3</i> p.Ala200Thr	Fator de risco para LHON.	Mãe

XI	Hipoglicemia, irritabilidade, diarreia, vômito, convulsão, disfagia, dificuldade respiratória	COQ8A c.C1825G:p.Leu609V	Deficiência de COQ10	Mãe
		BCKDHB g.80837254 A>T (rs761132978) e g.80837259 C>T (splicing)	Doença do Xarope de Bordo Tipo Ib	A definir
		OGDH rs540461753	Deficiência de Alfa-cetoglutarato desidrogenase	A definir
XII	Disfagia, micrognatia, hipotonia, convulsão, imunodeficiência, hipodontia, palato alto, olhos fixos, artrogripose, hiperidrose, Falecido com 1 ano de idade	D2HGDH NC_000002.11 g.242695307G>A g.242684116G>A (splicing)	Acidúria D-2-hidroxi-glutarica	A definir
XIII	Ataxia, distonia, oftalmoplegia, imunodeficiência, Linfoma de Burkitt, Atrofia cerebral Falecida aos 9 anos de idade	DOCK8 c.C5077T:p.Q1693X c.T4816G:p.S1606A (rs901337751) c.5613_5614TC	Síndrome de hiper IgE e recorrentes infecções	Pai : p.Q1693X Mãe :p.S1606A e c.5613_5614TC
XIV	Surdez, anemia, hemocromatose, diabetes, epilepsia mioclônica, miopatia, imunodeficiência, regressão motora e neurológica	G6PD p.Asn156Asp p.Val98Met	Deficiência de G6PD moderada com hemólise por estresse celular	Pai: G6pd Outros: A definir
		IBA57 NM_001010867 c.521_525del c.533_535del	Disfunção mitocondrial múltipla de tipo 3 e paraplegia espástica 74, ambas de herança autossômica recessiva.	
		SCO1 p.Ala103Thr	Deficiência combinada da oxidação fosforilativa de tipo 16, herança autossômica recessiva.	
		BCS1L p.Arg33Thr	Deficiência mitocondrial de complexo IV, herança autossômica recessiva.	

		<i>MRPL44</i> p.Val272Ala	Deficiência mitocondrial de complexo III, Síndrome de Leigh, Síndrome de Gracile e Síndrome de Bjornstad	
XV	Irritabilidade, vômitos, disfagia. Hipotonia, não imunização após vacina, imunodeficiência, convulsão, anemia, lactato e alanina elevados	<i>TRMT10C:</i> c.384delA;p.A128fs	Deficiência combinada de OXPHOS tipo 30	A definir

FONTE: A Autora (2019).

Resumidamente, para os casos ainda em andamento, ressaltamos:

- X: Pai sob investigação clínica para efeitos de *CPT2* e em espera de coleta de biopsia de pele do paciente.
- XI: Sequenciamento de Sanger e segregação de genes candidatos, sendo realizado, a seguir, sequenciamento de áreas sem cobertura nos mesmos genes.
- XII: impossibilidade de seguir o caso devido a falta de biopsia.
- XIII: impossibilidade de seguir o caso devido a falta de biopsia.
- XIV: Sequenciamento de Sanger e segregação de genes candidatos, bem como coleta de biopsia de pele já solicitada.
- XV: Sequenciamento de Sanger e segregação de genes candidatos, sendo realizado, a seguir, sequenciamento de áreas sem cobertura nos mesmos genes.

No caso do paciente XIV, assim como no caso 2, havia mutações patogênicas descritas na literatura que não foram relatados nos laudos dos laboratórios de diagnóstico. As variantes descritas em *G6pd* são definitivamente patogênicas, e não relatadas no laudo de WES, provavelmente por não enquadrar completamente com o quadro clínico do paciente. Porém, sendo uma herança ligada ao X dominante, onde é necessário apenas uma cópia do gene

mutado para expressar a doença em mulheres (HAMOSH A, SCOTT AF, AMBERGER J, VALLE D, 2000), espera-se variabilidade no fenótipo em mulheres dependendo da inativação do cromossomo X. Para o paciente XIV, a conduta de evitar substâncias que desencadeiam a anemia hemolítica foi de grande importância na sua evolução clínica.

5 CAPÍTULO 2

***NDUFV1* mutations in complex I deficiency: Case reports and review of symptoms**

Vanessa Zanette¹, Daniel do Vale², Bruno Augusto Telles², Alan J Robinson³, Vaneisse Monteiro², Mara Lucia S. F. Santos², Ricardo Lehtonen R. Souza¹, Cristiane Benincá^{1,3}

Corresponding Author: Cristiane Benincá, e-mail: [cris.beninca@mrc-
mbu.cam.ac.uk](mailto:cris.beninca@mrc-
mbu.cam.ac.uk)

Affiliations:

1. Federal University of Paraná – Department of Genetics – Laboratory of Polymorphisms and Linkage, Av. Cel. Francisco H. dos Santos 100, 81530-000, Brazil
2. Hospital Pequeno Príncipe – Neuropediatric Division, R. Desembargador Motta 1070, 80250-060, Brazil
3. Mitochondrial Biology Unit, Medical Research Council, University of Cambridge, Hills Road, CB2 0XY, United Kingdom

WORD COUNT: 2791

NUMBER OF REFERENCES: 29

NUMBER OF FIGURES/TABLES: 3

Abstract

Mitochondrial complex I (CI) deficiency is the most common oxidative phosphorylation disorder described. It shows a wide range of phenotypes with poor correlation within genotypes. Herein we expand the clinics and genetics of CI deficiency in the Brazilian population by reporting three patients with pathogenic (c.640G>A, c.1268C>T, c.1207dupG) and likely pathogenic (c.766C>T) mutations in the *NDUFV1* gene. We show the mutation c.766C>T associated with a childhood onset phenotype of hypotonia, muscle weakness, psychomotor regression, lethargy, dysphagia and strabismus. Additionally, this mutation was found to be associated with headaches and exercise intolerance in adulthood. We also review reported pathogenic mutations in *NDUFV1* highlighting the wide phenotypic heterogeneity in CI deficiency.

Keywords: *Leigh Syndrome, mitochondrial diseases, metabolic acidosis, encephalomyopathies.*

Introduction

Dysfunctions in complex I (NADH ubiquinone dehydrogenase) (CI) represents a third of all early-onset mitochondrial disorders and are genetically and clinically diverse (HIRST, 2013). They are caused by mutations in mitochondrial and nuclear genes, with clinical phenotypes ranging from severe lactic acidosis and death in infants to muscle weakness in adults. Five clinical groups were associated with CI deficiency: Leigh syndrome, progressive leukoencephalopathy, neonatal cardiomyopathy, severe infantile lactic acidosis, and a miscellaneous group of unspecified encephalomyopathies¹. Correlations

between genotype and phenotype in mitochondrial diseases are not fully understood and need further exploration².

CI is a protein complex composed of 44 subunits, seven of which are encoded by mitochondrial DNA (mtDNA) and the remaining by nuclear DNA (nDNA)³. CI catalyzes the oxidation of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) in the mitochondrial matrix, supplying electrons to complex III via reduction of coenzyme Q. The electron flux through CI sustains the translocation of four protons across the inner mitochondrial membrane, thus contributing to the mitochondrial electrochemical potential. CI is also an important source of reactive oxygen species (ROS) in mitochondria, which causes cellular oxidative stress⁴. CI is subdivided into three modules: the electron input (N) module, the electron output (Q) module, and the proton translocations (P) module. The N module is composed of subunits encoded by the genes *NDUFV1*, *NDUFV2*, and *NDUFS1*⁵. The *NDUFV1* gene (NG_013353.1) is located on chromosome 11 and encodes the NADH-ubiquinone oxidoreductase flavoprotein, a hydrophilic polypeptide of 51 kDa, which oxidizes NADH and is a major site of ROS production^{3,6}.

In this report, we presented three patients with mutations in the *NDUFV1* gene. The first patient is a compound heterozygous for a missense mutation c.640G>A (p.Glu214Lys) and a frameshift mutation c.1207dupG (p.Asp403Gly*fs), the second is homozygous for a missense mutation c.1268C>T (p.Thr423Met), and the third, combining the c.1268C>T (p.Thr423Met) and a predicted pathogenic mutation c.766C>T (p.Arg256Cys) not described previously.

Methods

This work received the approval of the ethical standards committee of the Federal University of Paraná (CAAE: 84773818.2.0000.0102).

Total DNA was extracted from blood using the DNeasy Kit (Qiagen, Hilden, DE). Whole Exome Sequencing (WES) was carried out using Illumina® 2000 HiSeq with Agilent SureSelect Human All Exon V7 for the first two cases, and Nextera® Exome Capture to third, the GRCh37 reference genome and a GATK-based pipeline was used to call, filter and annotate variants⁷. After identification of relevant variants, the region containing each variant was re-sequenced and family segregation was performed by Sanger sequencing.

The position of the mutations was mapped to the corresponding amino acids in the protein structures of *Bos taurus* (NM_174808.1) and human (PDB ID: 5XTB). The impact of the mutated amino acids on CI was investigated by visualizing the mutations in the context of the CI structures (PMID: 27509854) by using the PyMOL structure viewer⁸.

MR imaging and MR spectroscopy of the brain were performed with a 1.5-T MR unit (GE Medical Systems, Milwaukee, WI). T1-weighted images [echo time (TE)/repetition time (TR) 11 ms/550 ms], T2-weighted images (TE/TR 93 ms/4000 ms), fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR) (TE/TR/inversion time 110 ms/10000 ms/2250 ms) and diffusion-weighted images (DWI) (TE/TR: 105 ms/5200 ms) were performed. Spectroscopic imaging was performed with long (144 ms) and short TE (35 ms).

The pathogenicity was predicted by SNPs&GO⁹, PolyPhen-2¹⁰, e MutationTaster¹¹ and allele frequency was searched in Exome Aggregation Consortium (EXAC)¹², 1000genomes¹³, gnomAD¹⁴, ABraOM¹⁵ and Kaviar¹⁶. Association between mutation c.766C>T and symptoms in family members of patient P3 were estimated by Chi-Square test with Monte Carlo simulations by using the R program¹⁷.

Results

Case reports

Patient P1

Patient 1 (P1), male, 4 years old, was born by cesarean delivery at 40 weeks of gestation with 3760 g. The mother presented three previous miscarriages (8-, 8- and 12-weeks' gestation) and placenta detachment during P1 pregnancy with indication of resting. The father presented childhood seizures and no consanguinity was reported. P1 had three healthy brothers, two of whom were maternal half-brothers.

P1 was 3 years old when he presented developmental delay and autistic spectrum disorder and was admitted to the hospital after episodic vomiting and dehydration associated with a cutaneous rash. After treatment P1 developed respiratory insufficiency needing orotracheal intubation. Viral encephalitis was evaluated with negative outcomes in cerebrospinal fluid (CSF), however empiric treatment with Acyclovir for 14 days showed complete recovery of neurological symptoms, with normal daily activities and no functional impairment. Brain MRI was performed after treatment and showed T2-weighted hyperintense and T1-weighted hypointense focal lesions in central portions of the upper segment of the cervical spinal cord, with additional symmetric lesions in midbrain, pons, and bulb.

One month later, P1 was admitted to the hospital with prostration, nausea, vomiting and absence seizures, developing a cutaneous rash and apnea after two days. Orotracheal intubation was performed and extubation failure occurred due to the persistency of apnea, therefore, tracheostomy and gastrostomy were performed. Metabolic and laboratory profiles were normal. The patient continued to have recurrent apneas, but no seizures. A new MRI showed increased hyperintense lesions in T2 and hypointense lesions in T1, affecting the central portions of the upper segment of the cervical spinal cord (Figure 1, P1: A-B). Symmetric lesions also increased when compared with the first MRI, mainly affecting the mesencephalon, pons, medulla oblongata, cerebellum and upper portions of the cervical spinal cord with an elevation of lactate detected by MR spectroscopy (Figure 1, P1: C).

Based on the hypothesis of mitochondrial disease, treatment was started with coenzyme Q10 (CoQ) (300 mg/day) and L-carnitine (100 mg/kg/day). At 4 years old, P1 presented slight clinical improvement with apnea stabilization, progressive drowsiness reduction and progress in wakefulness.

Patient P2

Patient 2 (P2), male, 11 years old, was born by cesarean delivery at 38 weeks of gestation with 2470 g, 45 cm height and 33.5 cm head circumference. Pregnancy was uneventful and no symptoms were reported in the first four months of life. The mother was 46 years old when pregnant and presented one previous miscarriage. P2 had a deceased 5 years old sister with a clinical history of seizures, and a healthy older sister. Parents were consanguineous (first degree cousins).

At 4 months old, P2 presented minor cervical hypotonia and mild right hemibody hypertonia. At 7 years of age, he started to present developmental delay, aggressive behavior, learning difficulties, and motor regression. An organic acid profile in urine showed 3-methylglutaconic aciduria. He was admitted to hospital in the same year due to lethargy alternated with irritability and needed orotracheal intubation with mechanical ventilation after apnea. Tracheostomy was performed due to the extubation failure.

When P2 was 11 years old, he presented optic atrophy, sensorineural deafness, ptosis, hypotonia, hyperreflexia with diplegic spasticity, dysphagia and hyperhidrosis. Similar brain MRI patterns were seen in P2 at the age of 7 (Figure 1, P2: A) and 10 (Figure 1, P2: B) years. The second MRI showed hyperintensity in T2/FLAIR/T2 in the thalamus, lentiform nucleus, frontal lobe, and a lactate peak at spectroscopy (Figure 1, P2: C). Current treatment includes CoQ (300 mg/day), L-carnitine (2 g/day), carbamazepine (17.5 mg/kg/day), biotin (20 mg/day), creatine (2 g/day), clobazam (0.4 mg/kg/day), baclofen (15 mg/day), vitamin C and B complex and P2 was in stable clinical condition.

Patient P3

Patient 3 (P3), female, 3 years old, the younger of two siblings from non-consanguineous parents. The mother had 4 pregnancies, with one miscarriage at 10 weeks. P3 had uneventful perinatal history, she was born at term, and had no clinical symptoms. Neurodevelopment milestones were normal up to 9 months old when she developed progressive hypotonia and somnolence, followed by a gradual loss of motor skills in the following month. Cerebrospinal fluid was negative for markers of viral infection. Her sister was healthy, however, her father presented epilepsy in infancy and frequent headaches in adulthood.

The first diagnostic hypothesis for P3 was acute disseminated encephalitis, showing normal electroencephalogram, diffuse white matter lesions by MRI and a lactate peak on spectroscopy (Figure 1, P3: A-C). Symptoms improved after treatment with methylprednisolone for three days, with an improvement of the symptoms. However, after a week, a gradual clinical decline was observed with lethargy, dysphagia and general hypotonia. After 13 months, a new MRI (not shown) showed increased white matter lesions, suggesting a mitochondrial disorder. An acylcarnitine profile in blood showed increased concentrations of 3-hydroxy-butyrylcarnitine and acetylcarnitine, amino acid chromatography showed increased alanine (656.1, normal 146 – 494 $\mu\text{mol/L}$). Lactate levels in plasma ranged from 2.7 to 7.6 (normal $<2.2\text{mmol/L}$) over one year. Lactic acid levels in cerebrospinal fluid were often increased, ranging from 3.5 to 5.3 (normal $<0.8\text{mmol/L}$). Levels of urinary organic acids were normal. Supplementation with CoQ and carnitine was started but with no significant improvement. At 3 years old, P3 lost neurodevelopmental milestones and developed hypotonia, strabismus and severe inappetence. She was submitted to an endoscopic gastrostomy and current treatment was based on supplementation with CoQ, creatine, sodium bicarbonate, acetyl L-carnitine, riboflavin, and biotin.

Genetic Analysis

P1 revealed the heterozygous mutations c.640G>A (p.Glu214Lys) of maternal inheritance and c.1207dupG (p.Asp403Glyfs*27) from paternal inheritance in *NDUFV1* gene. The allele frequency of p.Glu214Lys was not reported, whereas p.Asp403Glyfs*27 shows a frequency below 0.0001% in control population, the frameshift mutation causes the premature stop codon of the protein in Asp429.

The Glu214 residue was highly conserved among bilaterally symmetrical metazoans (Figure 2A) and was positioned in the interface with the subunit NDUF54 linked by a hydrogen-bonded (Figure 2B). The mutation p.Glu214Lys disrupted the hydrogen bond and likely destabilized the interface with the neighboring subunit, NDUF54.

P2 shows the c.1268C>T (p.Thr423Met) mutation in homozygosity in the *NDUFV1* gene. The highest allele frequency in control population was below 0.01%. The Thr423 residue was highly conserved among bilaterally symmetrical metazoans (Figure 2A) and faces the 4Fe-4S domain of NDUFV1 (Figure 2B). The mutation of threonine to a larger methionine was likely to disturb the assembly of the 4Fe-4S cluster into the protein or to cause dysfunction in the assembled protein.

WES analysis of P3 identified the compound heterozygous mutations in the *NDUFV1* gene, c.766C>T (p.Arg256Cys) and c.1268C>T (p.Thr423Met). Analysis of the mutations in the family members showed c.766C>T segregating from the father, and c.1268C>T from the mother (Figure 2C). Five members of the paternal lineage were carriers for c.766C>T. The mutation c.766C>T caused the missense change p.Arg256Cys with no associated clinical conditions. Allele frequency of this variant corresponded to one heterozygous individual (0.00001648%) only and bioinformatic tools predicted this alteration as pathogenic (score 0.99 and 0.87). The amino acid arginine in this position was highly conserved in bilaterally symmetrical metazoans (Figure 2A). Arg256 was localized in the tip of the hydrophilic arm of NDUFV1 subunit and this

sidechain was not resolved in the protein structure (Figure 2B). Family carriers for p.Arg256Cys presented frequent headaches and exercise intolerance (Figure 2C) with statistically significant (p-value 0.027) association between frequent headaches and the mutation was found.

Literature Review

Several studies described mutations in the *NDUFV1* gene associated with CI deficiency (Table 1). In this review we found 24 patients with mutations in the *NDUFV1* gene, of which 8 were homozygous and 15 were compound heterozygous. The most frequent mutations were c.1268C>T (p.Thr423Met) and c.1156C>T (p.Arg386Cys).

The onset of symptoms ranged from 5 months of age to adulthood. Several common symptoms were described, mainly neuromotor regression, with spasticity, tremors, ataxia, dystonia, seizures, hypotonia, apnea, dysphagia, vomiting, lethargy, ptosis, strabismus, nystagmus, optic atrophy, cognitive decline, autistic behaviors, progressive weakness and exercise intolerance.

The most common features in MRI were hyperintense lesions in T2 affecting several regions of the brain, white matter changes, brain atrophy, and presence of lactate peak in MR spectroscopy.

Discussion

This work presents three patients with clinical presentation of mitochondrial disease with mutations in the *NDUFV1* gene. The mutation p.Asp403Glyfs*27 was found in trans with p.Glu214Lys in P1, and the combination of p.Arg256Cys with p.Thr423Met was observed in P3. Both p.Glu214Lys and p.Thr423Met were described as pathogenic and cause CI

deficiency^{2,18-20}. The homozygous mutation p.Thr423Met in *NDUFV1* gene was found in P2.

The mutation p.Asp403Glyfs*27 leads to a truncated protein with likely functional consequences due to a stop codon preceding the 4Fe-4S domain³, and was not previously associated with mitochondrial disease. The mutation p.Glu214Lys was previously described as likely pathogenic in a patient with seizures, cerebellar ataxia, and psychomotor regression presenting CI deficiency¹⁸. The phenotype described was different from P1, which presented a mitochondrial disease phenotype characterized by developmental delay, autistic spectrum disorder, respiratory insufficiency, T1-weighted hypointense, symmetric lesions in white matter and presence of lactate peak at spectroscopy. The recurrent apneas, procrastination and vomiting led P1 to hospitalization several times, making artificial respiration necessary, despite this, metabolic and laboratory profiles were normal.

p.Glu214Lys changed a medium-sized acid residue to a large basic amino acid and may prevent hydrogen bonds, thus destabilizing the interface with the subunit NDUF54. Mutations in this position probably reduce electron transfer through the redox Fe-S centers of CI¹⁸. Modeling of the this reported mutation in *NDUFV1* suggested a disturbance of the assembly or function of the 4Fe-4S cluster²¹.

P2 was identified as homozygous for c.1268C>T (p.Thr423Met) mutation in *NDUFV1*. This mutation was described leading to myopathy, depression, fatigue, strabismus, progressive muscular hypotonia, myoclonic epilepsy and psychomotor regression. Another case of homozygosity for c.1268C>T was described leading to horizontal nystagmus, dysarthria, bilateral dysmetria and intention tremor, dysdiadochokinesia, and gait ataxia²⁰, a different presentation from P2, which presented hypotonia, developmental delay, learning difficulties and motor regression, nevertheless presenting a typical mitochondrial disease phenotype with presence of lactate peak in spectroscopy and 3-methylglutaconic aciduria.

P3 presented with two compound heterozygous missense mutations, c.1268C>T (p.Thr423Met), also found in P2, and c.766C>T (p.Arg256Cys) segregating from the father with a clinical history of infant seizures and exercise intolerance with frequent headaches in adulthood. An association of headaches and exercise intolerance was found for the paternal family carriers of c.766C>T, which was statistically significant. Arg256 residue was highly conserved in bilaterally symmetrical metazoans and was localized in the tip of the hydrophilic arm of NDUFV1 subunit, which unfortunately, was not structurally elucidated and further studies are needed for its functional characterization. Despite that c.766C>T (p.Arg256Cys) was not previously associated with clinical conditions, the Arg257 residue, neighboring Arg256, was associated with CI deficiency²² and it was shown to be essential for protein function and predicted to be post-translationally modified to an ω -N-methylarginine by similarity with the mouse protein²¹. The mutation c.766C>T (p.Arg256Cys) was predicted as pathogenic (score 0.99 and 0.87) and we propose that in combination with c.1268C>T (p.Thr423Met), they might be responsible for P3 phenotype, characterized by a childhood-onset development of hypotonia, muscle weakness, physical exercise intolerance, psychomotor regression, lethargy, dysphagia, and strabismus. The same phenotype was commonly associated with mild CI deficiency¹⁻³. This phenotype could be explained by a dominant-negative effect of the post-translational modification in the affected region, masking the effect of the wild-type version of the protein.

Conclusion

CI deficiency was associated with many nuclear and mitochondrial genes, and the understanding of the genetics of this mitochondrial disease has expanded significantly in recent years. Here we described three cases of mutations in the NDUFV1 subunit, associated with mitochondrial disease and possibly CI deficiency. The case reports and the review of *NDUFV1* mutations showed heterogeneous phenotypes and severity. We propose the association of p.Arg256Cys to frequent headaches in family members of P3. Combination of

p.Thr423Met and p.Arg256Cys mutations in heterozygosity were sufficient to cause the clinical features of an autosomal recessive CI deficiency, but confirmation of this deficiency by biochemical approaches were not possible and further studies are necessary.

The addition of new mutations to the literature contributes to a better understanding of the etiology of mitochondrial disease, as well as the potential of future correlations between genotype and phenotype, allowing the earlier implementation of mitochondrial dysfunction preventive therapies.

Acknowledgments

We thanks to the patient and all the family members for their participation, Davidson Xavier for helping with the images, Dr. Massimo Zeviani and Dr. Caterina Garone for scientific advice. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

Conflict of Interest

The authors have nothing to disclose.

References

1. Fassone E, Rahman S. Complex I deficiency: Clinical features, biochemistry and molecular genetics. *J Med Genet.* 2012;49(9):578-590
2. Baertling F, Sánchez-Caballero L, van den Brand MAM, et al. A Heterozygous NDUFV1 Variant Aggravates Mitochondrial Complex I Deficiency in a Family with a Homoplasmic ND1 Variant. *J Pediatr.* 2018;196:309-313

3. Hirst J. Mitochondrial Complex I. *Annu Rev Biochem.* 2013;82(1):551-575
4. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.* 2009;417(1):1-13
5. Brandt U. Energy Converting NADH: Quinone Oxidoreductase (Complex I). *Annu Rev Biochem.* 2006;75(1):69-92
6. Varghese F, Atcheson E, Bridges HR, Hirst J. Characterization of clinically identified mutations in NDUFV1, the flavin-binding subunit of respiratory complex I, using a yeast model system. *Hum Mol Genet.* 2015;24(22):6350-6360
7. Van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, et al. From fastQ data to high-confidence variant calls: The genome analysis toolkit best practices pipeline. *Curr Protoc Bioinforma.* 2013;43(11.10):1-33
8. DeLano WL. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8. Schrödinger LLC. 2002
9. Calabrese R, Capriotti E, Fariselli P, Martelli PL, Casadio R. Functional annotations improve the predictive score of human disease-related mutations in proteins. *Hum Mutat.* 2009;30(8):1237-1244
10. Adzhubei I, Schmidt S, Peshkin L, et al. PolyPhen-2: prediction of functional effects of human nsSNPs. *Curr Protoc Hum Genet.* 2010;76(1):7.20.1-7.20.41
11. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. Mutationtaster2: Mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods.* 2014;11(4):361-362
12. Lek M, Karczewski KJ, Minikel E V., et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature.* 2016;536(7616):285-291
13. Consortium T 1000 GP. A global reference for human genetic variation The

1000 Genomes Project Consortium. *Nature*. 2015;526(7571):68-74

14. Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, et al. Variation across 141,456 human exomes and genomes reveals the spectrum of loss-of-function intolerance across human protein-coding genes. *bioRxiv*. 2019. Available at: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/531210v2>. Accessed July 05, 2019
15. Naslavsky MS, Yamamoto GL, de Almeida TF, et al. Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. *Hum Mutat*. 2017;38(7):751-763
16. Glusman G, Caballero J, Mauldin DE, Hood L, Roach JC. Kaviar: An accessible system for testing SNV novelty. *Bioinformatics*. 2011;22(2):3216-3217
17. R Development Core Team R, R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. *R A Lang Environ Stat Comput*. 2013;55:275-286
18. Incecik F, Herguner OM, Besen S, Bozdoğan ST, Mungan NO. Late-onset Leigh syndrome due to NDUFV1 mutation in a 10-year-old boy initially presenting with ataxia. *J Pediatr Neurosci*. 2018;13(2):205-207.
19. Srivastava A, Srivastava KR, Hebbar M, et al. Genetic diversity of NDUFV1-dependent mitochondrial complex I deficiency. *Eur J Hum Genet*. 2018:1-6
20. Wadhwa Y, Rohilla S, Kaushik JS. Cystic Leucoencephalopathy in NDUFV1 Mutation. *Indian J Pediatr*. 2018;85(12):128-1131.
21. Fang F, Liu Z, Fang H, et al. The clinical and genetic characteristics in children with mitochondrial disease in China. *Sci China Life Sci*. 2017;60(7):746-757
22. Nafisinia M, Guo Y, Dang X. Whole Exome Sequencing Identifies the

- Genetic Basis of Late-Onset Leigh Syndrome in a Patient with MRI but Little Biochemical Evidence of a Mitochondrial Disorder. *JIMD Rep.* 2016;32:117-124
23. Björkman K, Sofou K, Darin N, et al. Broad phenotypic variability in patients with complex I deficiency due to mutations in *NDUFS1* and *NDUFV1*. *Mitochondrion.* 2015;21:33-40
 24. Ortega-Recalde O, Fonseca DJ, Patiño LC, et al. A novel familial case of diffuse leukodystrophy related to *NDUFV1* compound heterozygous mutations. *Mitochondrion.* 2013;13(6):749-754.
 25. Marin SE, Mesterman R, Robinson B, Rodenburg RJ, Smeitink J, Tarnopolsky MA. Leigh syndrome associated with mitochondrial complex I deficiency due to novel mutations in *NDUFV1* and *NDUFS2*. *Gene.* 2013;516(1):162-1674
 26. Zafeiriou DI, Rodenburg RJT, Scheffer H, et al. MR spectroscopy and serial magnetic resonance imaging in a patient with mitochondrial cystic leukoencephalopathy due to complex I deficiency and *NDUFV1* mutations and mild clinical course. *Neuropediatrics.* 2008;39(3):172-175
 27. Bénit P, Chretien D, Kadhom N, et al. Large-Scale Deletion and Point Mutations of the Nuclear *NDUFV1* and *NDUFS1* Genes in Mitochondrial Complex I Deficiency. *Am J Hum Genet.* 2001;68(6):1344-1352.
 28. Schuelke M, Smeitink J, Mariman E, et al. Mutant *NDUFV1* subunit of mitochondrial complex I causes leukodystrophy and myoclonic epilepsy. *Nat Genet.* 1999;21(3):260-261
 29. Guo A, Gu H, Zhou J, et al. Immunoaffinity Enrichment and Mass Spectrometry Analysis of Protein Methylation. *Mol Cell Proteomics.* 2014;13(1):372-387

Figure 1: Clinical features of the patients. (A and B) MRI of patients P1, P2 and P3 showing white matter changes and symmetric lesions in different regions of the brain, red arrow indicated altered brain region. (C) Elevated lactate in each patient measured by MR spectroscopy, indicated by red arrow.

Figure 2: A) Sequence alignment of the NDUFV1 protein from different species. Mutated amino acids were indicated (patient 1:p.Glu214Lys; patient 2: p.Thr423Met; and patient 3: p.Arg256Cys); B) Representation of 3D structure of amino acid changes (p.Thr423Met , p.Arg256Cys and p.Glu214Lys); C) Pedigree of patient 3 (indicated by arrow) and family members affected by mutations c.766 C> T and c.1268C> T in the *NDUFV1* gene. Carriers of c.766 C> T present frequent headaches (#) and mild exercise intolerance (*).

Table 1: Clinical and molecular features of patients presenting NDUFV1 mutations.

Zyg (Zygoty); Het = Heterozygous; C.het. = Compound Heterozygous; Hom = Homozygous; Seg =Segregation; Ref =Reference, N/D = not described; N/A = Not analyzed; lines in blue: Cases of p.Thr423Met, lines in green: cases of p.Glu214Cys.

6 CAPÍTULO 3

Mutation in the MICOS subunit gene *APOO* (MIC26) associated to an X-linked mitochondrial myopathy, cognitive impairment and lactic acidosis.

Cristiane Benincá^{1,2*}, Vanessa Zanette^{2*}, Michele Brischiari⁴, Mark Johnson¹, Erika Fernandez-Vizarra¹, Alan J. Robinson¹, Daniel do Valle³, Bruno Augusto Telles³, Anna Yeates⁵, Aurelio Reyes¹, Bianca C. T. Pitanga³, Julien Prudent¹, Shaoxia Chen⁵, Carolina

Prando³, Ricardo Lehtonen R. de Souza², Mara Lucia S. F. Santos³, Alex Whitworth¹, Massimo Zeviani^{1,6**}.

Affiliations:

4. Medical Research Council, Mitochondrial Biology Unit, University of Cambridge, Cambridge, CB2 0XY, United Kingdom.

5. Department of Genetics, Federal University of Paraná, Curitiba, 81530-000, Brazil.

6. Neuropediatric Division, Hospital Pequeno Príncipe, Curitiba, 80250-060, Brazil.

7. Department of Biology, University of Padova, Padua, 35121, Italy.

8. Medical Research Council – Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, CB2 0QH, UK

9. Department of Neurosciences, University of Padova, Padua, 35121, Italy.

*These authors contributed equally to this work

**Correspondence: Massimo Zeviani e-mail: massimo.zeviani@unipd.it

KEYWORDS: *MINOS complex, cristae morphology, mitochondrial disease, metabolic acidosis*

ABSTRACT

Mitochondria are essential to provide the majority of the cellular ATP. In order to keep mitochondrial function, it is essential that the organelle membranes are finely organized. The Mitochondrial Contact Site and Organizing System (MICOS), known as the “mitoskeleton”, is especially important in keeping the mitochondrial inner membrane (MIM) architecture. Alterations in the composition and assembly of the MICOS complexes are known to cause mitochondrial dysfunction lowering energy production, the main feature of mitochondrial diseases. Here, we describe the first report of a patient with a MICOS deficiency caused by the mutation c.T350C (p.Ile117Thr) in the *APOO* gene encoding the MIC26 protein, causing progressive developmental delay, lactic acidosis, muscle weakness, hypotonia, weight loss, gastrointestinal and body temperature dysautonomia, repetitive infections and cognitive impairment. Our results show mislocalization of the mutated protein and alterations in MICOS assembly as well as alterations in number and width of cristae. The mutation was also associated to lower mitochondrial respiration in the patient cells growing in galactose. The *D. melanogaster* *APOO* ortholog *CG5903* (*dApoo*) was also shown to be localized in mitochondria and essential for mitochondrial function.

INTRODUCTION

Mitochondria are cellular organelles mostly responsible for ATP production but also essential for many other functions like calcium buffering, apoptosis or reactive oxygen system (ROS) signalling¹⁻³. All these essential functions require the proper organization of mitochondrial structures and composition. The organelle double membrane defines four distinct compartments: outer mitochondrial membrane (OMM), intermembrane space (IMS), inner membrane (IMM) and matrix (MM)⁴. Altered protein composition or function in any of these compartments can be the cause of complex, often multisystemic disorders, known as mitochondrial diseases⁵⁻⁷.

Mitochondrial diseases present with a great spectrum of phenotypes, age of onset and severity, being the clinical presentations deemed to be predominantly caused by the deficiency of energy production⁶. The energy producing machinery, the oxidative phosphorylation (OXPHOS) system, is localized in the IMM, which is divided into two domains, an inner boundary membrane (IBM) located opposite to outer membrane, and the cristae, forming tubular invaginations. The two membranes are connected by tubular openings, called cristae junctions (CJs)⁴. The correct organization of the cristae morphology is necessary for efficient OXPHOS function⁸.

The CJs contain the Mitochondrial Contact Site and Organizing System of the IMM (MICOS or MINOS)^{9,10}. The mammalian MICOS complex is composed of seven subunits: MIC60, MIC19, MIC10, MIC26, MIC27, MIC13, and MIC25. MIC60 and MIC19 in the mitochondrial intermembrane bridging (MIB) are in contact with the OMM by binding to SAM50, a key component of the SAM complex, interacting also with DNAJC11, MTX1 and MTX2. In the CJs, MIC60 and MIC10 play a key role in cristae structural and functional organization, including the import of mitochondrial carriers¹¹. MICOS is also involved in endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria tethering, biogenesis of proteins, lipid metabolism, ion transport, mtDNA organization and mitochondrial dynamics^{9,12}.

Two MICOS members belong to the APOO family both in mammals (APOOL/MOMA-1/MIC27 and APOO/MIC26) and in *S. cerevisiae* (Mic26 and Mic27). Based on examination of their phylogeny the two human members of this family resulted from a duplication at the root of vertebrates^{8,13}. The APOO gene encodes two isoforms of MIC26. The 55 kDa isoform (MIC26_{55kDa}) is deemed to be a glycosylated protein, found both in the extracellular space, where it should be associated with cholesterol efflux, as well as inside the cells. in the ER or Golgi apparatus¹⁴. The second isoform is non-glycosylated (MIC26_{22kDa}) and is present

only in mitochondria. Although both isoforms are expressed in cells, only MIC26_{22kDa} defects lead to mitochondrial morphology changes. Loss of MIC26_{22kDa} function by siRNA in HeLa cells is associated with both reduction in oxygen consumption and number of CJs¹⁵.

The *APOO* gene is located in the Xp.22.11 region and presents differential tissue-specific expression, being highly expressed in the brain and the heart^{14,16}. Dysfunction of MICOS components and interactors are suspected to be involved in a range of human diseases such as frontotemporal dementia-amyotrophic lateral sclerosis syndrome, epilepsy, Parkinson's disease, optic atrophy, cardiomyopathy and diabetes^{12,17,18}. Mutations in *QIL1* gene are described in autosomal recessive combined oxidative phosphorylation deficiency type 37¹⁹⁻²¹, however no disease has been associated with *APOO* mutations.

In this study we describe a family with MICOS deficiency caused by the mutation c.T350C (p.Ile117Thr) in the *APOO* gene encoding the MIC26 protein, causing a syndrome which includes developmental delay, lactic acidosis, muscle weakness, hypotonia and cognitive impairment. Patient-derived fibroblasts presented an aberrant localization of the mutated protein and alterations in the MICOS assembly associated with abnormalities of number and width of cristae. We also show for the first time the knockout characterization of the *dApoo* in *D. melanogaster* which presents partial lethality during development and neurological abnormalities due to mitochondrial impairment.

RESULTS

Case Report

Proband (Figure 1A: IV1) is a male child aged 8 years, the oldest of two siblings from non-consanguineous parents. His natural history includes uneventful perinatal development,

although he was born by caesarean delivery, weighing 3055 g and with a head circumference of 49 cm at birth, with no reported complications before or after birth. The mother (Figure 1A: III2) had 3 pregnancies with one previous miscarriage (at the 6th week). She presents tiredness, headaches and muscle weakness although brother and father are healthy. Several members of the family report muscle weakness and neurological problems.

The proband presented at 2 years with vomiting, fever and diarrhoea accompanied with a progressive developmental delay, irritability, fatigue, hypotonia, weight loss, gastrointestinal and body temperature dysautonomia, repetitive infections and cognitive impairment. Blood tests such as lactate and pyruvate were consistently elevated, venous blood examination showed severe metabolic acidosis (data not shown) and altered carnitines profile (increased C4, C5, C5:1, C5-OH) suggesting the possibility of a mitochondrial disease.

Brain MRI showed hyperintense signals in T2/FLAIR sequences in the white matter of the peritrigonal region, possibly corresponding to gliosis (Figure 1B). The mother also presents hyperintense signal in T2/FLAIR in the white matter of the subcortical parietal frontal lobe (Figure S1A).

Treatment was started on the proband with a combination of L-carnitine, biotin and CoQ10, and was associated with normalization of MRI, weight gain, decreased fatigue and irritability. The mother is also treated with good response with L-carnitine and CoQ10.

Genetic Analysis

WES analysis of the proband DNA revealed the presence of a c.T350C change in the *APOO* gene, located in the Xp.22.11 region, predicting a p.Ile117Thr missense change in the gene product. This variant was not found in control population databases^{22,23} and was predicted to be likely pathogenic with high scores for pathogenicity in mutation taster (score 1), provean (score -4.19) and vest3 (score 0.924). The amino acid change (p.I117T) is localized in the transmembrane region of the hydrophobic domain of the MIC26 protein (Figure 2C).

The c.T350C variant was found (Figure 2A) in heterozygosity in the mother (III:2) and hemizygoty in the proband (IV:1). Familial segregation of *APOO* p.Ile117Thr (*APOO*^{I117T}) (Figure 2A and S1B) shows variability in clinical presentation, ranging from asymptomatic (II8, II10, III4, III6) to neurological problems like learning difficulties and cognitive impairment (II2, II5, II6, IV1), fatigue and muscle weakness (II2, II5, II6, III2, III7, IV1) and increased blood lactate (IV7, IV1). Females presented a clinical phenotype depending on the X chromosome skewing pattern (Figure 2B and S1B). The proband's mother (III2) shows high skewing of the X chromosome containing the c.T350C mutation, while other females presented random skewing of both X chromosomes.

Fibroblast characterization

Primary fibroblasts were derived from a proband's skin biopsy and the culture was then immortalized by standard procedures (see M&M). Analysis of MIC26 levels (Figure 3A) showed a markedly slower electrophoretic mobility of the 22kDa mutated isoform in SDS-PAGE and significantly reduced steady-state levels compared to the control cells grown in galactose (Figure 3B). No differences were found in the 55kDa band detected by the anti-

MIC26 antibody. In addition, no difference was observed in the mitochondrial network analysed by confocal microscopy imaging after growing the cells in glucose or galactose media (Figure S1C). Levels of MICOS subunits MIC60, MIC27, MIC10 and MIC19 were analysed by SDS-PAGE of total lysates from cells grown in glucose or galactose (Figure 3B). No major differences were observed except for a decrease in MIC10 levels when cells were grown in galactose.

Next, proband's (P) fibroblasts were transfected with an HA-tagged WT version of MIC26 (MIC26^{WT}) (Figure 3C), that corrected the alterations observed in the mitochondrial network by confocal microscopy. Two rescued cell lines were generated, one with low MIC26^{WT} expression (P^{MIC26}) and another one with high overexpression (P^{MIC26+}) (Figure 3D). The rescue of MIC26 in P fibroblasts was associated with a second band at a higher molecular weight, most probably the MIC26 precursor before cleavage of the mitochondrial targeting sequence (MTS). Rescue of cells in P^{MIC26} and P^{MIC26+} by MIC26 showed no difference in the levels of MICOS components when cells were grown in glucose. To further determine the effects of MIC26 depletion on the rest of the MICOS complex subunits, HeLa cells were subjected to MIC26 knockdown by siRNA (Figure 3E). Again, no difference was observed in the levels of the analysed MICOS components.

Microscopy analysis of HeLa cells expressing MIC26^{WT} and mutant MIC26^{I117T} showed a partial accumulation of MIC26^{I117T} in the cytoplasm (Figure 4A), suggesting a defect in mitochondrial import of the mutant species. In order to test this hypothesis, we performed an in vitro import assay of the WT and mutant proteins (Figure 4B). Both MIC26^{WT} and MIC26^{I117T} were cleaved after translocation into the inner compartment of mitochondria. As expected, the cleavage was dependent on the membrane potential since the addition of CCCP blocked the processing. This experiment confirmed that MIC26 contains a

mitochondrial targeting sequencing (MTS) that is cleaved off when imported inside mitochondria. Interestingly, the cleavage product of the MIC26^{I177T} variant, produced a higher molecular weight than that of the MIC26^{WT}. This is consistent with the fact that the protein found in the P cells displayed slower electrophoretic mobility (Figure 3A and 3B).

To address as whether the MIC26^{I177T} variant disrupts the assembly of MICOS, we analyzed it by BN-PAGE followed by second dimension SDS-PAGE. BN-PAGE analysis of isolated mitochondria from fibroblasts (Figure 5A) showed the presence of two main MICOS complex bands as previously described²⁴, one corresponding to the MIB complex at approximately 2,000 kDa and the MICOS complex at ~700 kDa. An accumulation of MIC60, MIC27 and MIC10 was observed in a region close to or coincidental with the MIB complex (Figure 5B). In P fibroblasts, MIC60 accumulated in greater amounts in the MIB complex than in the controls. This uneven distribution of mutant MIC60 was also observed by super-resolution microscopy (Figure 5C) when MIC26^{WT} and MIC26^{I177T} were overexpressed in HeLa cells. Thus, the Inter-Punctae Distance (IPD) between two consecutive punctae of MIC60 in the IBM is altered when the mutant MIC26 is overexpressed. This may well explain the altered MICOS localization at the CJs.

Expression of MIC26^{WT} in P fibroblasts was associated to the restoration of the distribution of the subunits between MICOS and the MIB in a pattern similar to that of the control fibroblasts (Figure 5D and 5E), whereas its overexpression (P^{MIC26+}) keeps the subunits mislocalized. Likewise, the knockdown of MIC26 in HeLa cells by siRNA showed the same pattern of MICOS subunit accumulation towards the MIB (Figure S2). These results suggest that a finely tuned equilibrium among the subunits is necessary to maintain the structure of MICOS and that an excess or a reduction of MIC26 are in fact both detrimental.

The altered assembly of the MICOS complex in P cells is expected to result in abnormalities in the formation of CJs and possibly mitochondrial cristae as well. To test this hypothesis, we analysed mitochondria ultrastructure by TEM in fibroblasts (Figure 6A). P fibroblasts showed a smaller number and wider cristae than the controls or the rescue cells (Figure 6B).

To check for functional consequences of these alterations in cristae morphology, we measured the oxygen consumption rates (OCR) in the cells grown in glucose (Figure 6C) and galactose (Figure 6D). Differences were observed only when the cells were grown in galactose, where the basal and maximum OCR were decreased in P fibroblasts compared to the rescued cells.

In addition, mtDNA copy number was significantly reduced in the patient fibroblasts, especially when cells were grown in galactose (Figure 6E). However, this did neither produce a reduction in the steady-state levels of OXPHOS subunits (Figure 6F) nor in assembled respiratory chain complexes and supercomplexes (Figure 6G).

Animal Model

To investigate the role of MIC26 deficiency in mitochondrial physiology and pathology *in vivo*, we created a *Drosophila melanogaster* model, taking advantage of the easy genetic manipulation and short life span of the fruit fly. An *APOO* ortholog is present in the genome of *D. melanogaster* on the third chromosome (CG5903, hereafter named *dApoO* and *dMic26*). *dMic26* shares a relative high degree of similarity with both human MIC26 and MIC27 (encoded by *APOOL*), with a sequence identity of 32% and 28% respectively (Figure

S3A). This indicates that a duplication event of a unique ancestor occurred during the evolution. Indeed, higher eukaryotes including *H. sapiens*, *M. musculus* and *D. rerio* have two ApoO-domain family proteins, while lower eukaryotes as *D. melanogaster* and *C. elegans* have only one. Interestingly, also unicellular eukaryotes like *S. cerevisiae* have two proteins of the family (MIC26 and MIC27) (Figure S3B). Notably, the human *APOO* pathological variant c.T350C (p.I117T) found in the patients involves an isoleucine residue that is conserved in *D. melanogaster* dMic26 (Figure S3A). To test whether the fly protein is also localized in the mitochondria, we transiently expressed an HA- tagged form in *D. melanogaster* S2R+ embryonic cells. As shown in Figure 7A, immunofluorescence staining with anti-HA antibody and anti-Atp5a antibody (mitochondrial marker) confirmed that dApoO localizes to mitochondria in *Drosophila* cells.

To analyse the effects of *dApoO* deficiency in flies, we used a loss-of-function strain containing a >11,000 bp– long P{SUPor-P} element within the open reading frame of the first exon of *dApoO* (Figure S3C). In null homozygous flies, *dApoO* mRNA levels were severely reduced to 4% of the control strain (Figure 7B). Crossing of heterozygous *dApoO* KO flies produced slightly altered mendelian ratios in the progeny (Figure S3D), showing a mild effect of the lack of dApoO during the developmental stages. To test whether *dApoO* loss of function also leads to neuromotor alterations in the fly, we performed negative geotaxis climbing assays.

As shown in Figure 7C, compared to *w¹¹¹⁸*, both male and female KO flies display age-related neuromotor dysfunction, with a climbing index ranging between 53% and 70% of the control at 2 days post-eclosion and between 21% and 36% at 10 days post-eclosion. We then questioned whether the behavioural defects are associated to mitochondrial dysfunction. To address this question, we first analysed MRC complexes amount and

activity in isolated mitochondria via BN-PAGE (Figure 7D). Mitochondria from *dApoO* null flies showed a generalized, significant reduction in the amount of MRC complexes I, II, III, IV and IV normalized to the amount of the OMM protein porin. Moreover, in line with the quantitative reduction of the complexes, in-gel activity of complexes I, II and IV was significantly lower (Figure 7E). Oxygen consumption rates via CI and CII-linked substrates was also significantly lower in the defective fly mitochondria (Figure 7F), in accordance with the lower MRC complex amounts and activities.

DISCUSSION

WES analysis identified a c.T350C (p.Ile117Thr) variant in *APOO*, in DNA samples from a family, following an X-linked inheritance pattern. The different family members showed a range of clinical presentations, from asymptomatic to neurological impairment, fatigue, muscle weakness and increased blood lactate in. The female members presented a clinical phenotype which could be related to the pattern of X chromosome inactivation, although this should be further verified in each female family member. To our knowledge this is the first description of a pathological variant in *APOO*, encoding MIC26, a component of the MICOS complex.

Pathogenic variants in *MIC13* encoding the only other MICOS component described to date as associated with mitochondrial disease, cause the autosomal recessive oxidative phosphorylation deficiency type 37 (COXPD37, OMIM: 618329) characterized by severe multiple OXPHOS deficiency leading to death during early childhood^{19,20}. In addition,

pathogenic variants in *CHCHD10*, described to be an interactor of MIC60 in the intermembrane space²⁵, have been previously associated with clinical symptoms such as isolated myopathy, frontotemporal dementia and/or amyotrophic lateral sclerosis type 2, and spinal muscle atrophy, Jokela type²⁶, with autosomal dominant inheritance.

In female carriers of the MIC26^{I117T} variant, the X chromosome skewing pattern showed to play an important role in the presentation of the phenotypes, with presence of symptoms similar to those of the proband in his mother (III2), whom presented a highly skewed silenced wild-type chromosome (Figure 2B). This same effect was seen in other X-linked diseases like G6PD deficiency²⁷, Rett Syndrome²⁸ and Alport Syndrome²⁹.

The *APOO* variant found in the patient cause a missense change within the hydrophobic domain of MIC26, localized between 108 and 118 residues¹⁵ that is exposed to the intermembrane space¹⁰. Our data showed that MIC26^{I117T} alters the processing of MIC26 during its import inside mitochondria. First, the cleavage of the MTS produced an apparently larger mature protein than that of the WT (Figure 4B). Second, the steady state levels of the mutated protein were significantly reduced and the patient cells (Figure 3B). Lastly, we found significant amounts of MIC26 still located in the cytoplasm in the patient cells (Figure 4A). Interestingly, also the *in vitro* translation product of unprocessed MIC26 showed a slightly altered electrophoretic mobility in SDS-PAGE (Figure 4B). These data suggest that the T117 mutant protein has an altered (slower) electrophoretic mobility compared to the WT I117 protein.

The presence of the mutated MIC26 produced no major alterations in the total amount of MICOS and MIB components (Figure 3), this could be due to the fact that MIC26 is proposed to be a peripheral component of MICOS³⁰. However, we did observe an

accumulation of components towards the MIB complex in the patient (Figure 5E) and also in HeLa cells with downregulation of MIC26 (Figure S2). The MICOS complex is proposed to present two arrangements in the IMM, the first composed by MIC60, MIC25 and MIC19 called MIB (bridging the IMM to the OMM) and the second by MIC10, MIC13, MIC26 and MIC27 called MICOS (in the CJs)^{9,12}. In this last one, the loss of MIC10, MIC13 or MIC60 leads to a decrease in the number of CJs but the arrangement of MIC60 is kept as regularly spaced punctae, as observed by super-resolution microscopy²⁴. Interestingly, in our P cells a displacement of MIC27, MIC10 and, more pronounced, of MIC60, was observed towards the MIB complex (Figure 5B) and consequently an abnormal spacing of MIC60 in HeLa cells overexpressing MIC26^{117T} was observed by super-resolution microscopy (Figure 5C). This behaviour of MIC60 shows that probably the MIC26^{117T} variant promotes a wrong oligomerization of MIC60, which is critical to CJ formation³¹, and consequently the altered localization of the MICOS complex in relation to the CJs. This disruption in CJs formation can cause the observed decrease of the cristae number and the increase in cristae width (Figure 6A-B). This is further supported by the observation that the reexpression of MIC26^{WT} was able to rescue the cristae phenotype. Differences in basal and maximum oxygen consumption were observed only when cells were grown in galactose (Figure 6D), a condition that forces cells to rely on mitochondrial aerobic energy metabolism, and the lower respiration was also rescued by expression of the WT MIC26 in the patient cells.

Mitochondrial DNA (mtDNA) copy number (Figure 6E) was decreased in the P cells, but this did not result in alterations in either the steady-state levels of respiratory complex subunits or in supercomplex assembly. A series of compensatory mechanisms at different levels (transcriptional, translational or by stabilization of mRNA and/or the proteins) could be operating, to explain why a clear defect in MRC biogenesis was not observed. This

switch, allowing the organelles to regulate its copy number or elevate and/or stabilize transcription according to metabolic needs has been observed before^{32,33,34,35}.

It is known that MIC26 and MIC27 have similar functions in the cell because they were generated from a duplication event of the same ancestor gene^{8,15}. Similar to mammalian MIC26 orthologs, also yeast, *C. elegans*^{15,36,37}, and *D. melanogaster* Mic26 are mitochondrial proteins.

In *D. melanogaster*, the complete loss of *dApoO* leads to partial lethality during development, age-related decrease of climbing ability and severe mitochondrial dysfunction linked to reduced MRC complexes amount and consequent decreased respiratory capacity. Notably, the biochemical profile strongly supports the hypothesis that dMic26 is directly involved in mitochondrial function also in flies, but more studies are needed to determine the participation of *dMic26* in the cristae structure as part of an analogue of the MICOS complex in this animal model.

In this report we described the first mutation in *APOO* gene causing a human mitochondrial disease in a family with childhood onset of neurological impairment and muscle weakness in an X-linked recessive manner. The mutation p.Ile117Thr is found as a hemizygous mutation in males, and females present with heterogeneous phenotypes and severity due to random X chromosome skewing pattern. MICOS complex analysis in proband 's fibroblasts and its rescued phenotype confirms that this mutation is sufficient to cause the disease observed in the patient due to alterations in the formation and function of the MICOS complex.

These results contribute to a better understanding of the etiology of mitochondrial disease due to *APOO* mutations, as well as MICOS complex assembly and function.

Understanding the basis of disease is the first step to allow appropriate support and preventive or curative therapies to patients with similar mitochondrial diseases. In addition, we investigated a *Drosophila melanogaster* KO model for the ortholog of *APOO*. The protein loss caused behavioural alterations and mitochondrial dysfunction that resemble the clinical traits found in patients, demonstrating a phylogenetically essential role of Mic26 in mitochondrial function in eukaryotes.

MATERIAL AND METHODS

Ethics Statement

This work received the approval of the ethical standards committee of Federal University of Paraná, under CAAE: 84773818.2.0000.0102.

Genetics Analysis and cloning

Total DNA was extracted from blood using DNeasy Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Whole Exome Sequencing (WES) was carried out using Illumina® 2000 HiSeq, the GRCh37 reference genome and a GATK-based pipeline was used to call, filter and annotate variants³⁸. The region containing each relevant variant was re-sequenced and family segregation was performed by Sanger sequencing by Source BioScience (Cambridge, UK) and SnapGene 4.3.3 (GSL Biotech LLC) was used for chromatograms visualization and analysis. X chromosome inactivation using *HpaII* digestion was performed as previously described³⁹. Pedigree was mounted online using Pedigree Draw (Genial Genetic Solutions).

To clone WT and I117T APOO-HA into pWXLd-Ires puromycin, derived from pWPXLd, a gift from Didier Trono (Addgene plasmid #12258). Forward and reverse primers were

designed (SnapGene 4.3.3) with homology adapted ends to enable the use of Gibson Assembly Cloning Kit (New England Biolabs), of the PCR products into the *PmeI* site in the vector. CG5903 (dApoo) cDNA was cloned in pAc5-STABLE2-neo vector to generate a C-terminal HA tag as follows; pAc5-STABLE2-neo was digested EcoRI and HindIII and the vector backbone gel extracted. dApoo cDNA was used as template for Pfu PCR amplification. PCR product was column purified and cloned into pAc5-STABLE2-neo (EcoRI/HindIII) by In-Fusion cloning (Takara Clontech).

Brain MRI

MR imaging of the brain were performed with a 1.5-T MR unit (Signa Explorer, GE Medical Systems, Milwaukee, WI). T1-weighted images [echo time (TE)/repetition time (TR) 11 ms/550 ms], T2-weighted images (TE/TR 93 ms/4000 ms), fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR) (TE/TR/inversion time 110 ms/10000 ms/2250 ms) and diffusion weighted images (DWI) (TE/TR: 105 ms/5200 ms) were performed.

Cells Preparation

Primary and immortalized cultured fibroblasts were derived from patient skin and HeLa cells were obtained from ATCC (CCL-2TM), which were grown in high-glucose or galactose DMEM plus Glutamax and sodium pyruvate supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), penicillin and streptomycin (all from Gibco-Life Technologies) in humidified atmosphere at 37°C and 5% CO₂.

Immortalization was performed by infection of the cells with lentiviral particles containing the plasmid pLOX-Ttag-iresTK, a gift from Didier Trono (Addgene plasmid

#12246). Cells were rescued using the lentiviral particles generated with the plasmid pWpXL-APOO-HA and empty vector. Selective media were prepared adding 1 µg/ml puromycin (Invivo-Gen). Transient transfections were performed using Metafectene (Biontex) following manufacturer's instructions.

The *Drosophila* S2R+ cell line (*Drosophila* Genomics Resource Center stock ID 150) was derived from a primary culture of late stage (20–24 h old) *D. melanogaster* embryos. S2R+ cells were grown at 25°C in Schneider's medium (Thermo Fisher Scientific) with 10% heat-inactivated FBS (Gibco). S2R+ cells were transfected using Effectene Transfection Reagent (Qiagen) according to the manufacturer's instructions.

TnT *in vitro* Transcription/Translation and *in organello* import

Transcription/translation was performed using the Promega TnT Quick Coupled Transcription/translation System (kit L1170). Briefly, 1 µg of pcDNA3 APOO-HA (WT or I117T) was combined with either 1 µl of 'cold' L-methionine (1mM) or with L-[³⁵S]-methionine (Perkin Elmer), 40ul of TnT quick mastermix and adjusted to 50 µl with nuclease free water. TnT mixes were incubated for 90 minutes at 30°C, followed by dilution in SDS-PAGE sample buffer (4x) for analysis.

The radiolabelled MIC26 products were used for the *in organello* import assay in mitochondria isolated from HeLa cells as described⁴⁰.

Western Blot Analysis

Samples were lysed in RIPA buffer (0.3 M NaCl, 0.1% SDS, 50 mM Tris, pH 7.4, 0.5% deoxycholate, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF, 30 mM sodium pyrophosphate, 10 mM MgCl₂,

1% n-dodecyl β -D-maltoside, 1 mM PMSF) with the addition of protease inhibitors (cOmplete™ Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail). Lysates were centrifuged at $16,900 \times g$ for 10 min; supernatants were mixed with loading buffer and separated by SDS–PAGE prior to immunoblotting. Immunodetection signal intensities were quantified using ImageJ⁴¹. Antibodies list is show as Supplemental S1.1.

Immunofluorescence and Microscopy

HeLa or S2R+ cells were transiently transfected with the plasmids shown in figure legends and after 24 h fixed with 3.7% formaldehyde, permeabilised with 0.1% in PBS with 0.1% Triton X-100 and 0.05% sodium deoxycholate, before staining with primary and secondary Alexa Fluor antibodies (Invitrogen, CA, USA) in blocking solution (5% goat serum). Coverslips were mounted with ProLong Glass with or without DAPI (Invitrogen). Confocal image acquisition was performed using the systems as described in Supplemental S1.2, quantification of mitochondria interpunctae distance (IPD) was performed as previously described²⁴.

For transmission electron microscopy, fibroblasts were plated in two 10 cm \emptyset plates for each sample and fixed in 0.1 M PB buffer with 2.5% Glutaraldehyde, 2% Paraformaldehyde for 1 h at RT in agitation. Cells were scraped, centrifuged (2,500 RPM for 10 min at 4°C) and washed 3 times with PB buffer. Pelleted cells were sent to the Electron Microscopy Platform (Scientific and Technological Centers, University of Barcelona, Spain) for sample preparation. Ultrathin sections (55 nm) were cut and mounted with 200 mesh copper grids with supported film. Image acquisition was performed with a transmission electron microscope (FEI Tecnai G2 Spirit). Quantification of number and width of cristae was performed manually using ImageJ⁴¹, 20 cells were analysed and number of cristae was

counted per visible mitochondria area, maximum cristae width was determined by measuring randomly 3-4 cristae/mitochondria.

O₂ Consumption Measurements

Respiration in patient fibroblasts was measured in the OROBOROS Oxygraph-2k High Resolution Respirometer on one million cell/ml in a 2 ml chamber at 37°C. Basal respiration was measured without substrates and the proton leak state after the addition of oligomycin (100 nM). Oxygen consumption coupled to ATP production was calculated as the difference between basal respiration and proton leak. Maximal respiration was measured by stepwise 1.25 µM titration of carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP) and inhibition by 2 nM rotenone and 10 µM antimycin A for the final measurement of residual oxygen consumption. Spare capacity was calculated as the difference between maximal respiration and basal respiration.

Oxygen consumption was also measured in homogenates from whole flies. Briefly, six whole flies were homogenized on ice in respiration buffer (120 mM sucrose, 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, 4 mM KH₂PO₄, 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1% fatty acid-free BSA, pH 7.2). For state 3, complex I-linked respiration was measured at saturating concentrations of malate (2 mM), glutamate (10 mM), proline (10 mM) and ADP (2.5 mM). Afterwards, complex I + complex II-linked respiration was assessed adding 10 mM succinate to the reaction. LEAK-respiration was measured through the addition of 2.5 µM Oligomycin. Maximal respiratory capacity was assayed adding 1 µM of CCCP. Non-mitochondrial respiration was measured inhibiting the mitochondrial respiratory chain (MRC) through the addition of rotenone (1 µM) and antimycin A (1.25 µM). Respiration rates were normalized to the protein concentration (DC protein assay, Bio-Rad).

Fly Stocks and Maintenance

Flies were raised on medium made of agar, cornmeal, molasses, propionic acid and yeast extract, and maintained at 25°C, on a 12h-light and 12h-dark cycle. The following strains were obtained from the Bloomington *Drosophila* Stock Center w^{1118} (ID 6326), $y[1] P\{y[+mDint2] w[BR.E.BR]=SUPor-P\}amn[KG05433a] Hers[KG05433a]; ry[506] P\{SUPor-P\}CG5903[KG05433b]$ (ID 14005). Line 14005 was backcrossed with strain w^{1118} in order to replace the X chromosome, carrying the allele KG05433a. The resulting line's genotype is $w^{1118}; ry[506] P\{SUPor-P\}CG5903[KG05433b]$.

RNA Isolation, Reverse Transcription and qRT-PCR

Total RNA was extracted from 10 adults (1:1 males-females) using TRIzol reagent (Thermo Fischer Scientific), according to the manufacturer's instructions. Total RNA was used for first strand cDNA synthesis employing Omniscript RT kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. qRT-PCRs were performed in triplicate using a QuantStudio™ 3 system (Applied Biosystems) using Power SYBR™ Green chemistry (Thermo Fisher Scientific). The $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (RQ, relative quantification) method was used to calculate the relative expression ratio and Rp49 was used as endogenous control.

For mtDNA copy number, total DNA was extracted from whole cells using Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega). Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) analyses were performed with TaqMan assays (Applied Biosystems): MT-CO1 (Hs02596864_g1), MT-RNR1 (12S rRNA, Hs02596859_g1) and APP (Hs02339796_cn). Relative mtDNA copy number was calculated as average of MT-CO1 and 12S rRNA normalized to APP.

Climbing Test

Climbing test was performed using a modified version of the countercurrent apparatus originally designed by Seymour Benzer⁴². Twenty-two-day-old flies were placed into the first tube, tapped to the bottom and allowed to climb a 10 cm distance for 10 seconds. The flies that reached the 10 cm distance were shifted to a second tube, tapped again to the bottom and allowed to climb for further 10 seconds. The procedure was repeated for a total of five times. At the end, the number of flies in each tube was counted. Climbing indexes were calculated as the weighted average of flies in the different tubes, divided by five times the number of flies in the test. The test was performed one hour after the dark-light transition and a minimum number of 60 individuals per sex and genotype were analyzed.

Isolation of Mitochondria from flies' tissue

Mitochondria were prepared by differential centrifugation from 100 flies (1:1 males-females). Briefly, flies were homogenized 10 mL of isotonic isolation buffer (225 mM mannitol, 75 mM sucrose, 5 mM HEPES, 1 mM EGTA, pH 7.4) with 1% BSA. Samples were centrifuged at 1,000 X g at 4°C for 10 min. The supernatant was filtered through a fine mesh, and centrifuged at 6,000 X g at 4 °C for 10 min. The mitochondrial pellet was washed in 10 mL of isolation buffer and centrifuged at 6,000 X g for 10 min. The wash was repeated using 10 mL of isolation buffer without BSA and centrifuged at 7,000 X g for 10 min. The mitochondrial pellet was re-suspended in minimal volume of isolation buffer without BSA. Protein concentration was measured using the DC[™] protein assay (Bio-Rad).

Blue-Native Gel Electrophoresis (BN-PAGE) and In-Gel Activity (IGA)

Samples for blue-native gel electrophoresis (BN-PAGE) were prepared as described previously^{43,44}. Native samples were run through pre-cast NativePAGE Bis–Tris gels, while

Novex NuPAGE Bis–Tris Gels (Life Technologies) were used for denaturing conditions. For the detection of the in-gel activity of mitochondrial respiratory chain complexes, gels were stained with the following solutions. Complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase): NADH: 5 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.14 mg/mL NADH (Roche), 1 mg/mL nitrotetrazolium blue chloride (Sigma). Complex II (succinate dehydrogenase): 5 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.2 mM phenazine methosulfate (Sigma), 20 mM succinate, 1 mg/mL nitrotetrazolium blue chloride. Complex IV (cytochrome c oxidase): 50 mM potassium phosphate pH 7.4, 1 mg/mL 3',3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate (Sigma), 24 units/mL catalase from bovine liver (Sigma), 1 mg/mL cytochrome c from equine heart (Sigma), 75 mg/mL sucrose. Coomassie stained bands and in-gel activity intensities have been normalized to the immunodetected amount of the OMM marker evaluated in the same samples. Signal intensities were quantified using ImageJ²⁰.

Statistical analysis was performed with GraphPad Prism Software, version 7.00 for Windows (La Jolla California USA) and tests used as well as p-value are described in the figure legends.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the patients and all the family members for their participation, the Department of Biochemistry in the UFPR (Brazil) for allowing us to use their tissue culture facility, the staff from the Hospital Pequeno Principe for the organization of samples delivery and consultations. This study was financed in by the Core Grant from the MRC (Grant MC_UU_00015/5) and by the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)* - Finance Code 001. MB was supported by a doctoral fellowship

from the University of Padova (Padova, Italy) and an individual fellowship from “Aldo Gini” Foundation (Padova, Italy).

Author contributions

CB performed most of the biochemical, cell biology and microscopy experiments. VZ performed most of the genetics, established patient fibroblast cultures and clinical characterization of patients. MB performed all the animal model experiments. MJ performed most of the genetics, cloning, siRNA and TnT experiments. AJR performed the exome analysis. DV and BAT performed the MRI and clinic characterization of patients. AY performed the acquisition of TEM images. EFV performed the organelle import experiment and contributed with control fibroblasts. AR analysed the mtDNA copy number and contributed with control fibroblasts. BCTP helped to prepare the patient fibroblasts. EFV, AR and JP contributed with ideas for the experimental work. SC supervised the TEM imaging. CP and MLSFS supervised the clinic characterization and fibroblasts preparation. RLRS and CB supervised the genetics experiments. VZ and RLRS were responsible for ethical approval. AW supervised the animal model experiments. MZ and CB conceived the project, supervised the experimental workup and wrote the manuscript. All the authors contributed to the final version of the paper.

REFERENCES

1. Hatefi Y. The Mitochondrial Electron Transport and Oxidative Phosphorylation System. *Annu Rev Biochem.* 1985;54(1):1015-1069.

doi:10.1146/annurev.bi.54.070185.005055

2. Ferri KF, Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol.* 2001;3(11):E255-E263. doi:10.1038/ncb1101-e255
3. Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;460(1):72-81. doi:10.1016/j.bbrc.2015.01.137
4. Freya TG, Mannella CA. The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci.* 2000;25(7):319-324. doi:10.1016/S0968-0004(00)01609-1
5. Koopman WJH, Willems PHGM, Smeitink JAM. Monogenic Mitochondrial Disorders. *N Engl J Med.* 2012;366(12):1132-1141. doi:10.1056/NEJMra1012478
6. Gorman GS, Chinnery PF, Dimauro S, et al. Mitochondrial diseases. *Nat Publ Gr.* 2016;2:1-23. doi:10.1038/nrdp.2016.80
7. Ghezzi D, Zeviani M. Human diseases associated with defects in assembly of OXPHOS complexes. *Essays Biochem.* 2018;62(3):271-286. doi:10.1042/EBC20170099
8. Huynen MA, Mühlmeister M, Gotthardt K, Guerrero-Castillo S, Brandt U. Evolution and structural organization of the mitochondrial contact site (MICOS) complex and the mitochondrial intermembrane space bridging (MIB) complex. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2016;1863(1):91-101. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.10.009
9. Harner M, Körner C, Walther D, et al. The mitochondrial contact site complex, a

- determinant of mitochondrial architecture. *EMBO J.* 2011;30(21):4356-4370.
doi:10.1038/emboj.2011.379
10. von der Malsburg K, Müller JM, Bohnert M, et al. Dual Role of Mitofilin in Mitochondrial Membrane Organization and Protein Biogenesis. *Dev Cell.* 2011;21(4):694-707.
doi:10.1016/j.devcel.2011.08.026
 11. Callegari S, Müller T, Schulz C, et al. A MICOS–TIM22 Association Promotes Carrier Import into Human Mitochondria. *J Mol Biol.* 2019;431(15):2835-2851.
doi:10.1016/j.jmb.2019.05.015
 12. Zerbes RM, Bohnert M, Stroud DA, et al. Role of MINOS in mitochondrial membrane architecture: Cristae morphology and outer membrane interactions differentially depend on mitofilin domains. *J Mol Biol.* 2012;422(2):183-191.
doi:10.1016/j.jmb.2012.05.004
 13. Muñoz-Gómez SA, Slamovits CH, Dacks JB, Baier KA, Spencer KD, Wideman JG. Ancient homology of the mitochondrial contact site and cristae organizing system points to an endosymbiotic origin of mitochondrial cristae. *Curr Biol.* 2015;25(11):1489-1495. doi:10.1016/j.cub.2015.04.006
 14. Lamant M, Smih F, Harmancey R, et al. ApoO, a novel apolipoprotein, is an original glycoprotein up-regulated by diabetes in human heart. *J Biol Chem.* 2006;281(47):36289-36302. doi:10.1074/jbc.M510861200
 15. Koob S, Barrera M, Anand R, Reichert AS. The non-glycosylated isoform of MIC26 is a constituent of the mammalian MICOS complex and promotes formation of crista

- junctions. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2015;1853(7):1551-1563. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.03.004
16. GTEx Project. GTEx portal. GTEx Analysis Release V6p (dbGaP Accession phs000424.v6.p1). doi:10.1038/86850
 17. Abrams AJ, Hufnagel RB, Rebelo A, et al. Mutations in SLC25A46, encoding a UGO1-like protein, cause an optic atrophy spectrum disorder. *Nat Genet.* 2015;47(8):926-932. doi:10.1038/ng.3354
 18. Penttilä S, Jokela M, Bouquin H, Saukkonen AM, Toivanen J, Udd B. Late onset spinal motor neuronopathy is caused by mutation in CHCHD10. *Ann Neurol.* 2015;77(1):163-172. doi:10.1002/ana.24319
 19. Zeharia A, Friedman JR, Tobar A, et al. Mitochondrial hepato-encephalopathy due to deficiency of QIL1/MIC13 (C19orf70), a MICOS complex subunit. *Eur J Hum Genet.* 2016;24(12):1778-1782. doi:10.1038/ejhg.2016.83
 20. Guarani V, McNeill EM, Paulo JA, et al. QIL1 is a novel mitochondrial protein required for MICOS complex stability and cristae morphology. *Elife.* 2015;4:e06265. doi:10.7554/elife.06265
 21. Gödiker J, Grüneberg M, Duchesne I, et al. QIL1-dependent assembly of MICOS complex-lethal mutation in C19ORF70 resulting in liver disease and severe neurological retardation. *J Hum Genet.* 2018;63(6):707-716. doi:10.1038/s10038-018-0442-y
 22. Lek M, Karczewski KJ, Minikel E V., et al. Analysis of protein-coding genetic variation

in 60,706 humans. *Nature*. 2016;536(7616):285-291. doi:10.1038/nature19057

23. Consortium T 1000 GP. A global reference for human genetic variation The 1000 Genomes Project Consortium. *Nature*. 2015;526(7571):68-74. doi:10.1038/nature15393
24. Kondadi AK, Anand R, Hänsch S, et al. Cristae undergo continuous cycles of fusion and fission in a MICOS-dependent manner. *bioRxiv disponível em <https://doi.org/101101/654541>*. 2019.
25. Genin EC, Plutino M, Bannwarth S, et al. CHCHD10 mutations promote loss of mitochondrial cristae junctions with impaired mitochondrial genome maintenance and inhibition of apoptosis. *EMBO Mol Med*. 2016;8(1):58-72. doi:10.15252/emmm.201505496
26. McKusick VA. Mendelian Inheritance in Man and its online version, OMIM. *Am J Hum Genet*. 2007;80(4):588-604. doi:10.1086/514346
27. Puck JM, Willard HF. X Inactivation in Females with X-Linked Disease. *N Engl J Med*. 1998;338(5):325-328. doi:10.1056/nejm199801293380611
28. Villard L. Segregation of a totally skewed pattern of X chromosome inactivation in four familial cases of Rett syndrome without MECP2 mutation: implications for the disease. *J Med Genet*. 2001;38(7):435-442. doi:10.1136/jmg.38.7.435
29. Guo C, Van Damme B, Vanrenterghem Y, Devriendt K, Cassiman JJ, Marynen P. Severe Alport phenotype in a woman with two missense mutations in the same COL4A5 gene and preponderant inactivation of the X chromosome carrying the

normal allele. *J Clin Invest*. 1995;95(4):1832-1837. doi:10.1172/JCI117862

30. Ott C, Dorsch E, Fraunholz M, Straub S, Kozjak-Pavlovic V. Detailed analysis of the human mitochondrial contact site complex indicate a hierarchy of subunits. *PLoS One*. 2015;10(3):1-15. doi:10.1371/journal.pone.0120213
31. Tsai PI, Lin CH, Hsieh CH, et al. PINK1 Phosphorylates MIC60/Mitofilin to Control Structural Plasticity of Mitochondrial Crista Junctions. *Mol Cell*. 2018;69(5):744-756. doi:10.1016/j.molcel.2018.01.026
32. Agaronyan K, Morozov YI, Anikin M, Temiakov D. Replication-transcription switch in human mitochondria. *Science* (80-). 2015;347(6221):548-551. doi:10.1126/science.aaa0986
33. Dorado B, Area E, Akman HO, Hirano M. Onset and organ specificity of Tk2 deficiency depends on Tk1 down-regulation and transcriptional compensation. *Hum Mol Genet*. 2011;20(1):155-164. doi:10.1093/hmg/ddq453
34. Seidel-Rogol BL. Modulation of mitochondrial transcription in response to mtDNA depletion and repletion in HeLa cells. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(9):1929-1934. doi:10.1093/nar/30.9.1929
35. Peralta S, Wang X, Moraes CT. Mitochondrial transcription: Lessons from mouse models. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech*. 2012;1819(9-10):961-969. doi:10.1016/j.bbagrm.2011.11.001
36. Auton A, Abecasis GR, Altshuler DM, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015;526(7571):68-74. doi:10.1038/nature15393

37. McIlwain SJ, Peris D, Sardi M, et al. Genome sequence and analysis of a stress-tolerant, wild-derived strain of *Saccharomyces cerevisiae* used in biofuels research. *G3 Genes, Genomes, Genet.* 2016. doi:10.1534/g3.116.029389
38. Van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, et al. From fastQ data to high-confidence variant calls: The genome analysis toolkit best practices pipeline. *Curr Protoc Bioinforma.* 2013;43(11.10):1-33. doi:10.1002/0471250953.bi1110s43
39. Kiedrowski LA, Raca G, Laffin JJ, et al. DNA Methylation Assay for X-Chromosome Inactivation in Female Human iPS Cells. *Stem Cell Rev Reports.* 2011;7(4):969-975. doi:10.1007/s12015-011-9238-6
40. Fernández-Vizarra E, Ferrín G, Pérez-Martos A, Fernández-Silva P, Zeviani M, Enríquez JA. Isolation of mitochondria for biogenetical studies: An update. *Mitochondrion.* 2010;10(3):253-262. doi:10.1016/j.mito.2009.12.148
41. Abràmoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ. Image processing with imageJ. *Biophotonics Int.* 2004;11(7):36-42.
42. Benzer S. BEHAVIORAL MUTANTS OF *Drosophila* ISOLATED BY COUNTERCURRENT DISTRIBUTION. *Proc Natl Acad Sci.* 1967;58(3):1112-1119. doi:10.1073/pnas.58.3.1112
43. Nijtmans LGJ, Henderson NS, Holt IJ. Blue Native electrophoresis to study mitochondrial and other protein complexes. *Methods.* 2002;26(4):327-334. doi:10.1016/S1046-2023(02)00038-5
44. Wittig I, Braun HP, Schägger H. Blue native PAGE. *Nat Protoc.* 2006;1(1):418-428.

FIGURES AND LEGENDS

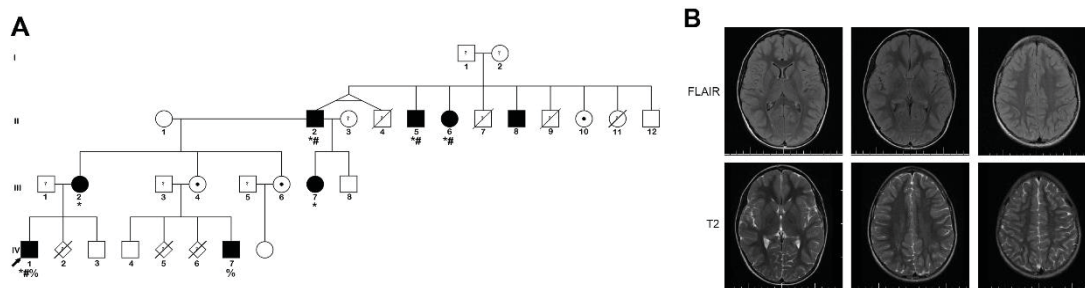


Figure 1: *APOO* mutation c.T350C shows an X-linked inheritance pattern causing a range of phenotypes (A) Pedigree showing segregation of the c.T350C mutation in *APOO* of the proband (indicated by arrow) family. Phenotypes are shown as: muscle weakness (*), neurological problems (#) and increased blood lactate (%). (B) Brain MRI of proband showing hyperintense signal in the white matter.

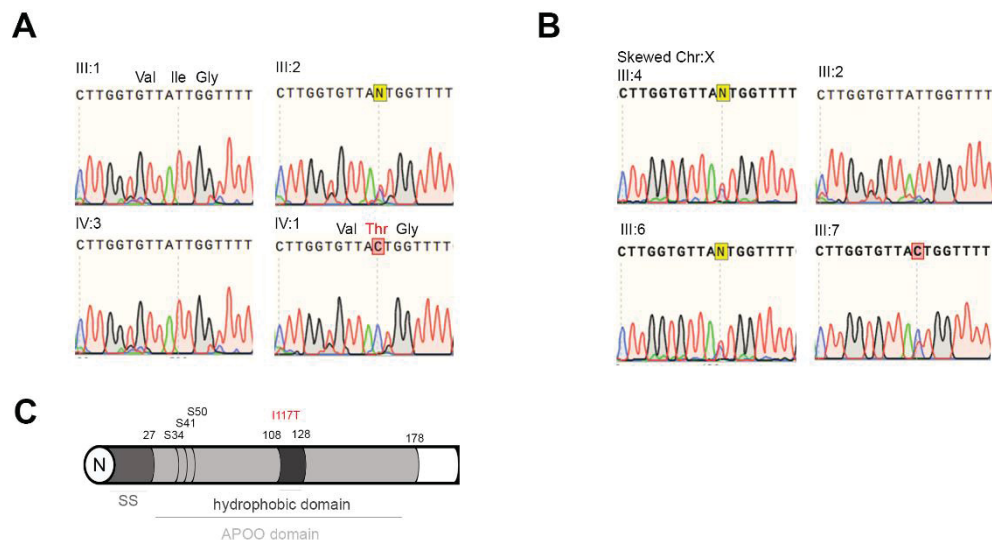


Figure 2: The mutation causes alterations in the hydrophobic domain of MIC26 and phenotype in females depend on X chromosome skewing. (A) Sequence chromatograms showing direct family members of proband with the mutation c.T350C in heterozygosity in the mother (III:2) and hemizyosity in the proband (IV:1). (B) Sequence chromatograms showing the presence of the mutation in the skewed X chromosome in the females (III:4, III:6, III:7) and the complete inactivation of the normal allele in the proband mother (III:2). (C) Schematic domains of MIC26 protein showing the position of the signal peptide (SS) in the N-terminus (N), APOO domain (light grey) including the hydrophobic domain where the mutation (I117T) is found.

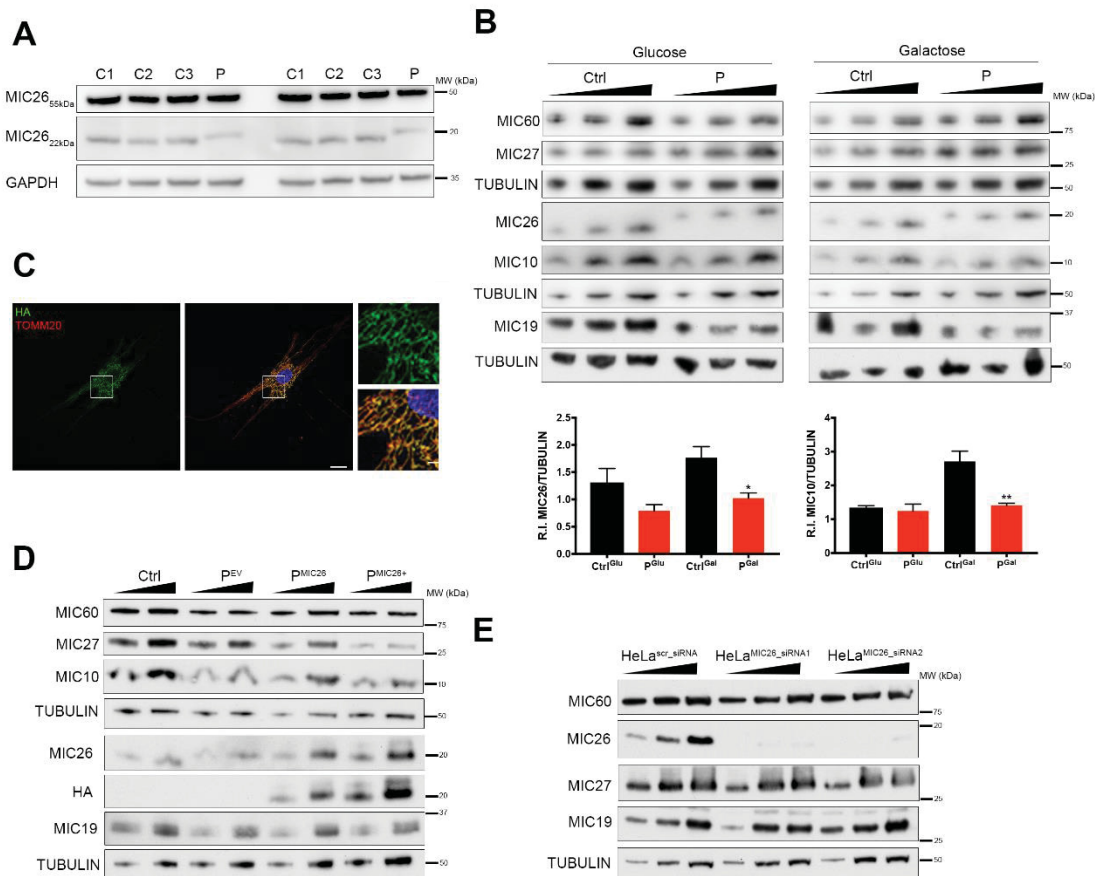
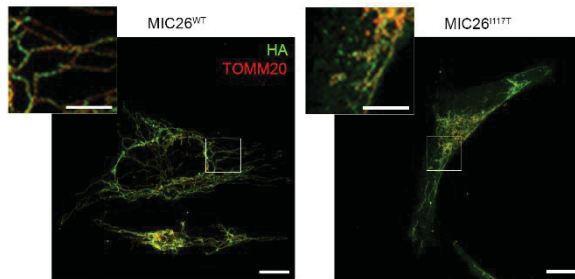


Figure 3: MIC26 in proband (P) fibroblasts shows altered migration pattern, but no differences in the levels of MICOS subunits are observed. (A) SDS-PAGE for MIC26 and GAPDH showing the cytosolic (55 kDa) and mitochondrial (22 kDa) MIC26 isoforms in controls (C1, C2, C3) and proband fibroblast (P). (B) SDS-PAGE for MICOS subunits MIC60, MIC27, MIC26, MIC19, MIC10 and TUBULIN in control (Ctrl) and proband (P) fibroblasts grown in glucose vs. galactose. Relative densitometric quantification of the bands normalized to the intensity of the loading control marker. Charts show mean \pm S.E.M. of five (MIC26) and three (MIC10) biological replicates (one-way ANOVA * $p=0.0447$ ** $p=0.0054$). (C) Confocal micrographs showing P fibroblast rescued by MIC26-HA (P^{MIC26}) overexpression labelled with anti-TOMM20 and anti-HA antibodies. Maximum intensity projection is shown. Scale bars: 20 μ m, inset 5 μ m. (D) SDS-PAGE for MIC60, MIC27, MIC26, MIC19, MIC10 and TUBULIN in Ctrl, P fibroblast expressing empty vector (P^{EV}) or

MIC26-HA (P^{MIC26} and P^{MIC26+}). (E) SDS-PAGE for MIC60, MIC27, MIC26, MIC19, and TUBULIN in HeLa cells after 72 h downregulation of MIC26 by siRNA (HeLa^{MIC26_siRNA1} and HeLa^{MIC26_siRNA2}). Scramble siRNA was used as control (HeLa^{scr_siRNA}).

A



B

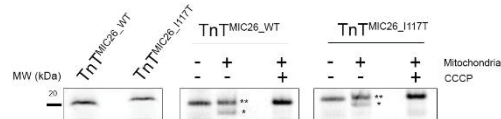


Figure 4: MIC26^{I117T} is not properly processed and accumulates partially in the cytoplasm. (A) Representative confocal micrographs of HeLa cells expressing MIC26^{WT}-HA or MIC26^{I117T}-HA labelled with anti-HA and anti-TOMM20 antibodies. Maximum intensity projection is shown. Scale bars: 10 μ m, inset 5 μ m (B) TnT and in vitro organelle import of MIC26 WT and mutant showing the non-imported precursor (**), and the imported processed form (*).

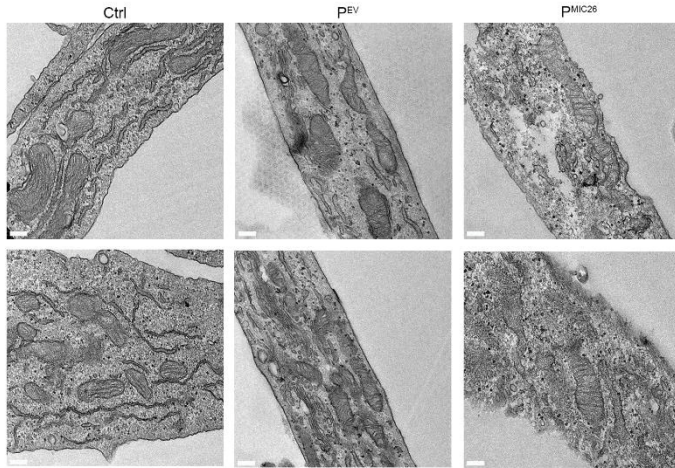
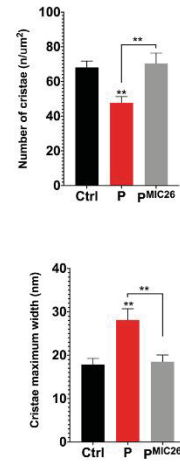
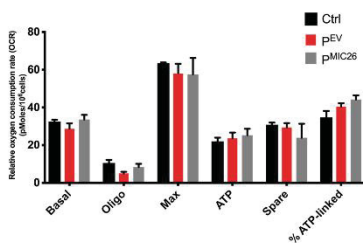
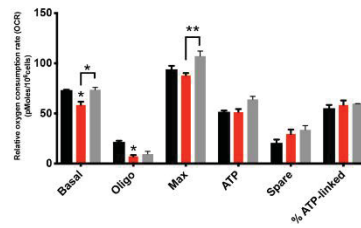
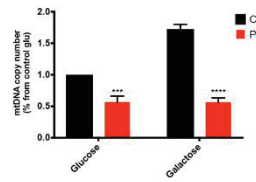
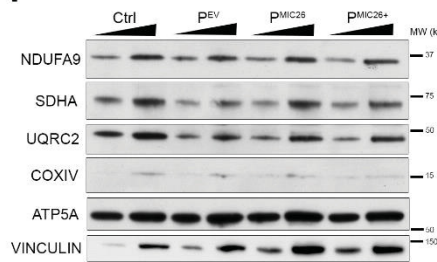
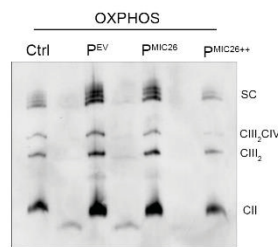
A**B****C****D****E****F****G**

Figure 6: Transmission Electron Microscopy (TEM) analysis of patient samples showing altered number and width of cristae. (A) Representative TEM micrographs from control (Ctrl) and proband fibroblasts (P^{EV} , P^{MIC26} and P^{MIC26+}) showing mitochondria ultrastructure. Scale bars: 0.2 μm . (B) Charts show mean \pm S.E.M (n=20) of number of cristae per mitochondrial area and cristae maximum width (n=20). One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison shows significant differences (Cristae number: Ctrl vs. P $p=0.0065^{**}$, P vs. P^{MIC26} $p=0.0022^{**}$; Cristae width: Ctrl vs. P $p=0.0011^{**}$, P vs. P^{MIC26} $p=0.0024^{**}$). (C) Charts show mean \pm S.E.M (n=3) OCR of cells grown in glucose and (D) galactose. Two-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparison shows significant differences in basal OCR (Ctrl vs. P^{EV} $p=0.0252^*$, P^{EV} vs. P^{MIC26} $p=0.0223^*$), Oligomycin OCR (Ctrl vs. P^{EV} $p=0.0348$), Maximum OCR (P^{EV} vs. P^{MIC26} $p=0.0015^{**}$) for cells grown in galactose. (E) mtDNA copy number in Ctrl and P fibroblasts grown in glucose or in galactose. Two-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparison shows significant differences ($^{***}p=0.0001$ and $^{****}p<0.0001$). (F) SDS-PAGE for OXPHOS subunits NDUFA9 (CI), SDHA (CII), UQRC2 (CIII), COXIV (CIV) and ATP5A (CV) and VINCULIN in control (Ctrl) and proband (P) fibroblasts grown in glucose. (G) BN-PAGE of Ctrl and P fibroblasts grown in glucose showing the distribution of OXPHOS supercomplexes immunoblotted sequentially for NDUFS3 (SC), UQRC2 (CIII and CIII+CIV), SDHB (CII).



Figure 7: Functional characterization of *dApoO* in *Drosophila melanogaster*. (A) Representative confocal micrographs of *Drosophila* S2R+ cells transiently expressing CG5903-HA. Cells have been labelled with anti-Atp5a (red) and anti-HA (green) antibodies. (B) qRT-PCR showing expression levels of CG5903 in *w¹¹¹⁸* and KO flies. Data plotted are mean \pm S.D. of three biological replicates (unpaired t-test, $p < 0.0001$ ****). (C) Climbing assay performed in *w¹¹¹⁸* and *dApoO* KO flies. Charts show mean \pm 95% CI, $n = 60$ animals (one-way ANOVA with Dunn's multiple comparisons test, $p < 0.0001$ ****). (D) BN-PAGE and IGA analysis of MRC complexes in *w¹¹¹⁸* and *dApoO* KO flies and (E) Relative densitometric quantification of the bands normalized to the intensity of the mitochondrial outer membrane marker porin. Charts show mean \pm S.D. of three biological replicates (unpaired t-test $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$). (F) OCR measured in fly homogenates from *w¹¹¹⁸* and *dApoO* KO strains. State 3 mitochondrial respiration was stimulated, in presence of ADP, by the addition of proline, malate and glutamate (PMG, complex I-linked substrates) and PMG+succinate (PMG+S, complex I- plus complex II-linked substrates). LEAK-respiration was measured through the enzymatic inhibition of ATP-synthase with oligomycin. Maximal respiration was achieved adding the uncoupler CCCP. Non-mitochondrial respiration was measured by inhibiting complex I (with rotenone) and complex III (with antimycin A). Data plotted represent mean \pm S.D. of four biological replicates, normalized by the protein concentration of the homogenates (unpaired t-test, $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$).

SUPPLEMENTAL DATA

S1. SUBJECT AND METHODS

S1.1 Antibodies List

Rabbit polyclonal anti-MIC19/CHCHD3 (1:3,000; #A8584; Abclonal), Rabbit monoclonal anti-IMMT/Mitofilin (1:1,000; #ab137057; Abcam), Rabbit polyclonal anti-MINOS1 (1:1,000; #ARP44801; Aviva), Rabbit polyclonal APOO/APOO (1:1,000; #HPA003187; Atlas), Rabbit polyclonal APOOL/APOOL (1:1,000; #HPA000612, Atlas), Mouse monoclonal anti-GAPDH (1:2,000; #ab8245; Abcam), Mouse monoclonal anti-TUBULIN (1:2,000; #T5201; Sigma), Rat monoclonal anti-HA (1:5,000; #11867423001; Roche), Mouse monoclonal anti-VDAC1/Porin (1:1000, #ab14734; Abcam), Rabbit monoclonal anti-VINCULIN (1:5000, #ab129002; Abcam), Mouse monoclonal anti-NDUFS3 (1:1000, #ab110246; Abcam), Mouse monoclonal anti-UQRC2 (1:1000, #ab14745; Abcam), Mouse monoclonal anti-SDHB (1:1000, #ab14714, Abcam), Mouse monoclonal anti-NDUFB6 (1:1000, #ab110244, Abcam), Mouse monoclonal anti-COXIV (1:1000, #ab14744, Abcam), Mouse monoclonal anti-OXPHOS Blue Native Cocktail (1:1000, #ab110412), Mouse monoclonal anti-ATP5A (1:300; #ab4748; Abcam), Rabbit monoclonal anti-TOMM20 Alexa Fluor 647 (1:500; #ab209606; Abcam), Abberior STAR 488 anti-rat (1:100; #2-0132-006-8; Abberior), Alexa Fluor 568 Goat Anti-mouse (1:300; #A11004; Invitrogen), Alexa Fluor 568 Goat Anti-rabbit (1:300; #A11036; Invitrogen).

S1.2 Primers

APOO sequencing Fw: 5'-GTCAGTAGGTTGTTGGACCAAAGG-3' and Rv: 5'-GTCATCACTGACTGAAGGCATGAC-3'.

APOO in pWXLd-Ires Fw: 5'-
CTAGCCTCGAGGTTTCGTTTAAACATGTTCAAGGTAATTCAGAGG-3' and Rv: 5'-
CGGATCCCGTAGTTTTCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGG-3'

CG5903 (dApoo) cDNA in pAc5-STABLE2-neo Fw: 5'-
TCCAGTGTGGTGGGAATTCCAAAATGCTGCGCAAACGGCA-3' and Rv: 5'-
TCTGCCCTCAAGCTTTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTACTTCTTTTTGGGG
AAGATTAG-3'

Rp49 Fw: 5'-ATCGGTTACGGATCGAACAA-3' and Rv: 5'-GACAATCTCCTTGCGCTTCT-
3'.

dAPOO Fw: 5'-GACAGAACCCAAGCCAGAAC-3' and *dAPOO*-Rv 5'-
GCCTTATATCCAGACTGCACCTC-3'.

S1.3 Image acquisition

Image acquisition was performed using either a Zeiss LSM880 confocal system equipped with a Zeiss Plan-Apochromat 100x/1.4 N. A. objective or a N-SIM Microscope system (Nikon) equipped with a SR Apo TIRF 100 x 1.49 N.A. objective and a DU897 Ixon camera (Andor Technologies). 3D-SIM image stacks were acquired with a Z-distance of 0.15 μm and all the raw images were computationally reconstructed using the reconstruction slice system from NIS-Elements software (Nikon) keeping the same parameters.

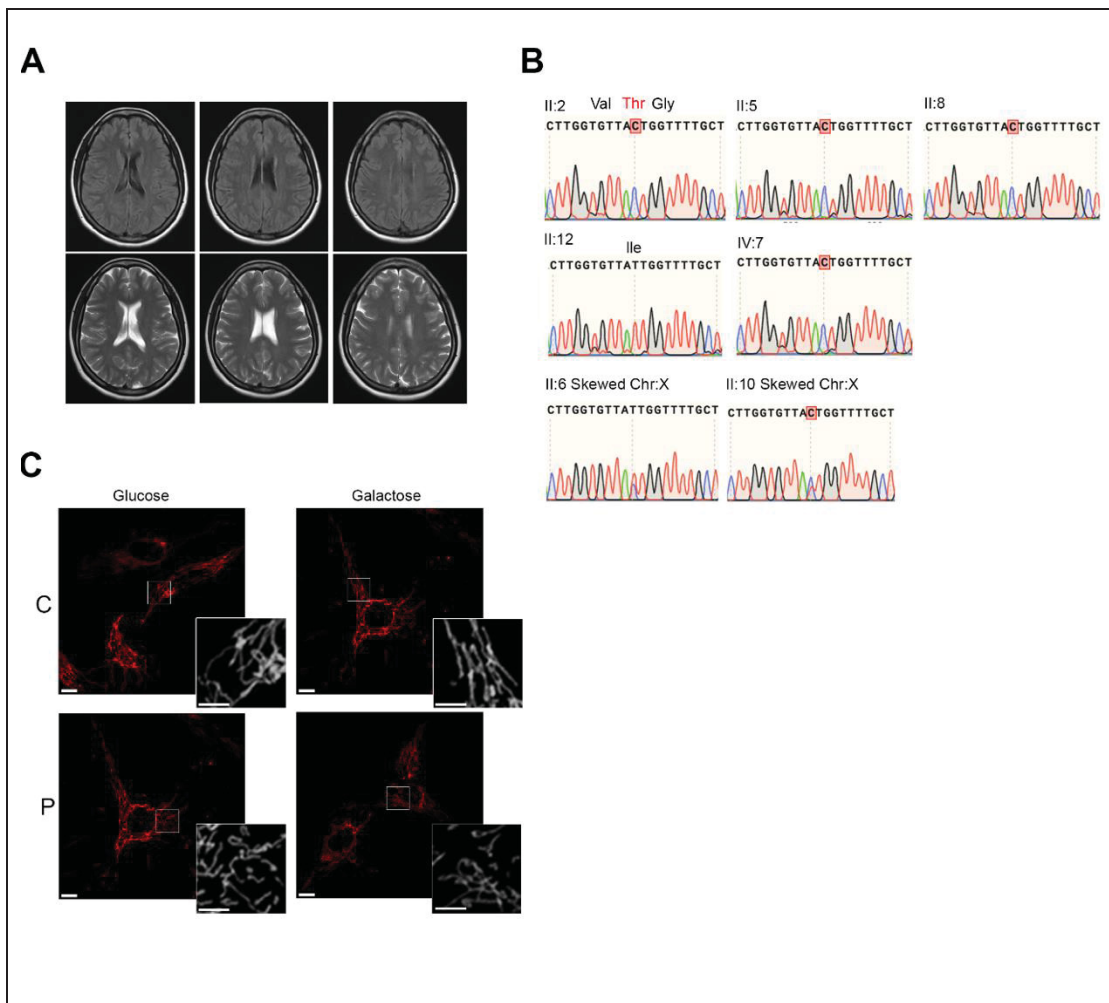


Figure S1: Brain MRI of proband mother showing hyperintense signal in the white matter, female presentation of phenotype is variable depending on skewed X-chromosome. (A) Brain MRI of proband mother showing hyperintense signal in white matter. (B) Sequence chromatograms showing family members of proband with the mutation c.T350C in males (II:2, II:5, II:8, II:12 and IV:8) and in the females skewed X-chromosome (II:6 and II:10). (C) Confocal micrographs showing mitochondrial morphology (TOMM20 in red) of control (C) and proband (P) fibroblasts growing in glucose or galactose. Scale bars: 5 μ m, inset 1 μ m.

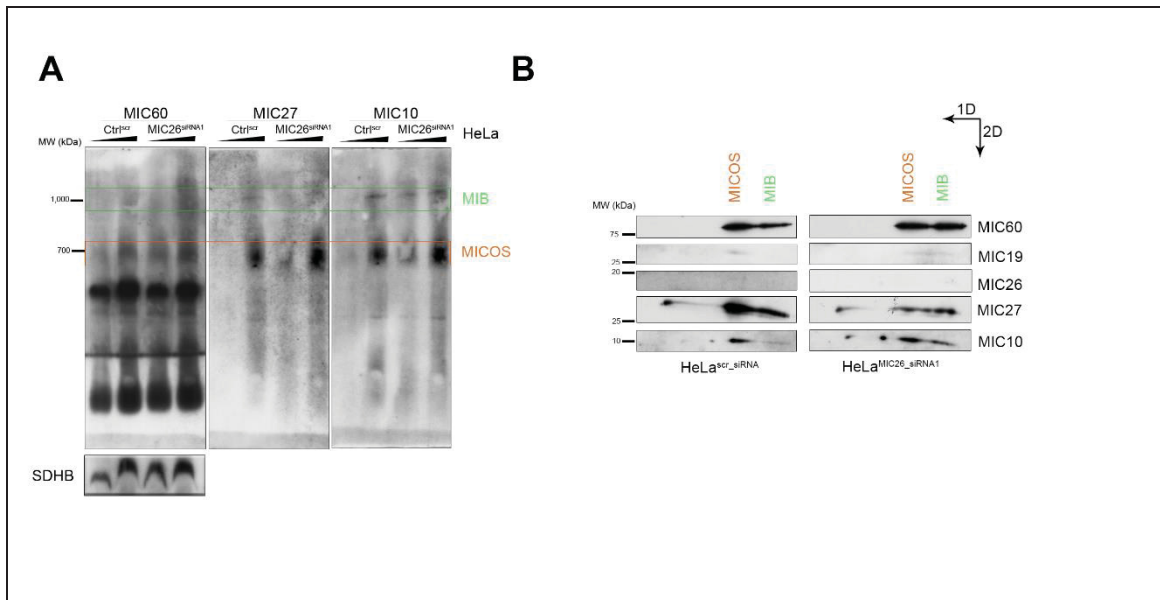


Figure S2: Distribution of MIB and MICOS components is altered in HeLa cells knocked down for MIC26. (A) BN-PAGE showing the distribution of MIB and MICOS complex immunoblotted for MIC60, MIC27 and MIC10 antibodies in HeLa cells treated with control (Ctr^{scr}-siRNA) and MIC26 (MIC26^{siRNA1}) siRNA for 72 h. (B) Second dimension PAGE from BN immunoblotted for MIC60, MIC26, MIC27 and MIC10 antibodies.

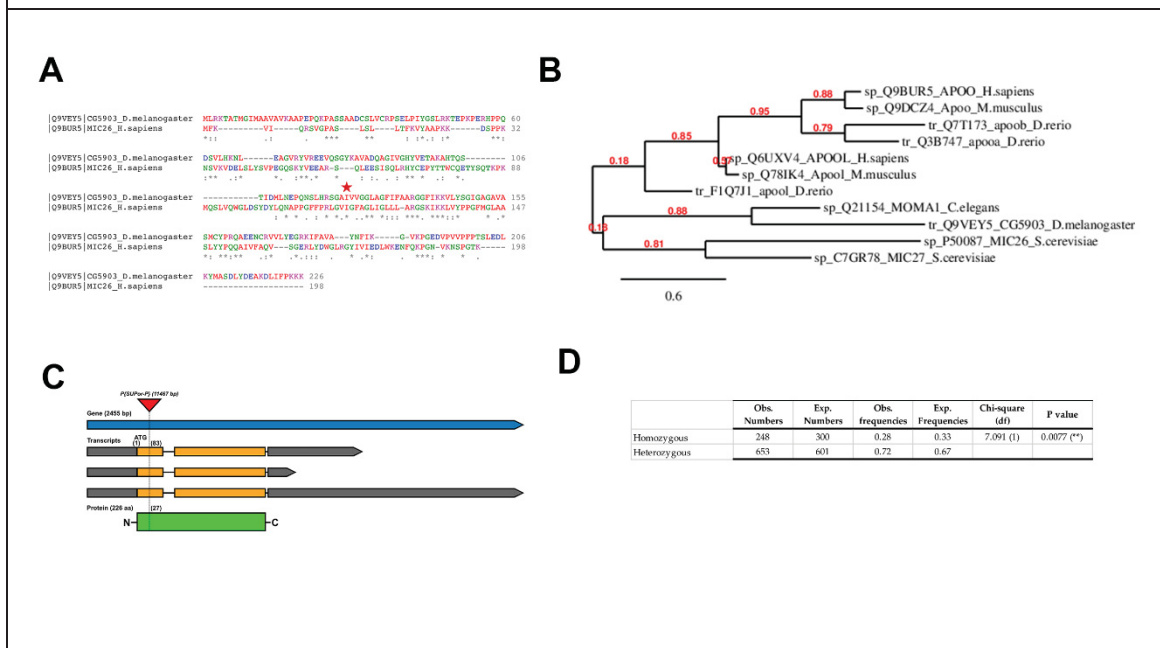


Figure S3: The knockout of the APOO ortholog CG5903 (dApoo) in Drosophila melanogaster shows partial lethality. (A) Alignment of dMic26 and MIC26 showing identical residues (*) and similar ones (. and :). The mutated residue found in patients p.I117 correspondent

to p.1124 in dMic26 has been highlighted with a red star. (B) Phylogenetic tree obtained through the analysis of *ApoO* genes from different species with the algorithm Phylogeny.fr. The tree shows that duplication into two proteins occurred in humans (*APOO* and *APOOL*), in mouse (*ApoO* and *Apool*), in zebrafish (*apooa*, *apooB* and *apool*) and independently in yeast (*Mic26* and *Mic27*). *D. melanogaster* and *C. elegans* have only one member of the family. Branch support values are displayed in red. (C) Scheme showing the deletion of *dApoO* performed in *D. melanogaster* (D) Mendelian frequencies observed in progeny obtained crossing *dApoO* heterozygous null flies. A total number of 901 flies has been counted (chi-square 7.091 df(1), $p=0.0077^{**}$).

6 CONCLUSÃO

Estudamos 30 pacientes com provável diagnóstico clínico de DM, sem diagnóstico molecular prévio ao estudo, com isso demonstra-se a importância de trabalhos acadêmicos unindo o diagnóstico hospitalar à pesquisa científica, já que esses pacientes ainda não tinham diagnóstico genético. Além disso, o diagnóstico de DM tem sido um desafio clínico no Brasil, dada a complexidade destas doenças e a ausência de centro especializado multidisciplinar para tal. Identificar as mutações nestes pacientes nos permite fornecer base para a busca da melhora de sua qualidade de vida, além de identificar novos genes com função mitocondrial, ou mesmo novas mutações em genes já associados à DM. Com isso, somamos conhecimento à área genética e contribuimos para o avanço científico, além de possibilitar o diagnóstico destas doenças através do aumento de informações nas bases de dados utilizados para tal.

REFERENCIAS

ABRÀMOFF, M. D.; MAGALHÃES, P. J.; RAM, S. J. Image processing with imageJ. **Biophotonics International**, v. 11, n. 7, p. 36–42, 2004.

ADRAIN, C.; CREAGH, E. M.; MARTIN, S. J. Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. **EMBO Journal**, v. 20, n. 23, p. 6627–6636, 2001.

ADZHUBEI, I. et al. PolyPhen-2 : prediction of functional effects of human nsSNPs. **Curr Protoc Hum Genet**, v. 76, n. 1, p. 7.20.1-7.20.41, 2010.

AGUER, C. et al. Galactose enhances oxidative metabolism and reveals mitochondrial dysfunction in human primary muscle cells. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, p. e2853, 2011.

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. [s.l: s.n.].

ALSTON, C. L. et al. The genetics and pathology of mitochondrial disease. **Journal of Pathology**, v. 241, n. 2, p. 236–250, 2017.

ANDERSON, S. et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. **Nature**, v. 290, n. 5806, p. 457–465, 1981.

ANGELINI, C. et al. Mitochondrial disorders of the nuclear genome. **Acta Myologica**, v. 28, n. 1, p. 16–23, 2009.

ANNEY, R. et al. A genome-wide scan for common alleles affecting risk for autism. **Human Molecular Genetics**, v. 19, n. 20, p. 4072–4082, 2010.

AYLWARD, A. et al. Using Whole Exome Sequencing to Identify Candidate Genes With Rare Variants In Nonsyndromic Cleft Lip and Palate. **Genetic Epidemiology**, v. 40, n. 5, p. 432–441, 2016.

AZMANOV, D. N. et al. Transcriptome-wide effects of a POLR3A gene mutation in patients with an unusual phenotype of striatal involvement. **Human molecular genetics**, v. 25, n. 19, p. 4302–4314, 2016.

BAERTLING, F. et al. A Heterozygous NDUFV1 Variant Aggravates Mitochondrial Complex I Deficiency in a Family with a Homoplasmic ND1 Variant. **Journal of Pediatrics**, v. 196, p. 309- 313.e3, 2018.

BALABAN, R. S.; NEMOTO, S.; FINKEL, T. Mitochondria, oxidants, and aging. **Cell**, v. 120, n. 4, p. 483–495, 2005.

BAYONA-BAFALUY, M. P. et al. Revisiting the mouse mitochondrial DNA sequence. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 18, p. 5349–5355, 2003.

BERNARD, G. et al. Mutations of POLR3A encoding a catalytic subunit of RNA polymerase pol III cause a recessive hypomyelinating leukodystrophy. **American Journal of Human Genetics**, v. 89, n. 3, p. 415–423, 2011.

BLANCHET, L. et al. Isolated Mitochondrial Complex I Deficiency: Explorative Data Analysis of Patient Cell Parameters. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 36, p. 4023–4033, 2012.

BOGDANOWICZ, DANIELLE, R.; LU, HELEN, H. Multifunction Co-culture Model for Evaluating Cell-Cell Interactions. **Methods in Molecular Biology**, n. 1202, p. 29–36, 2014.

BRANDT, U. Energy Converting NADH: Quinone Oxidoreductase (Complex I). **Annual Review of Biochemistry**, v. 75, n. 1, p. 69–92, 2006.

CALABRESE, R. et al. Functional annotations improve the predictive score of human disease-related mutations in proteins. **Human Mutation**, v. 30, n. 8, p. 1237–1244, 2009.

CALVO, S. et al. Systematic identification of human mitochondrial disease genes through integrative genomics. **Nature Genetics**, v. 38, n. 5, p. 576–582, 2006.

CALVO, S. E.; CLAUSER, K. R.; MOOTHA, V. K. MitoCarta2.0: An updated inventory of mammalian mitochondrial proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. 1251–1257, 2016.

CAMPBELL, H. D. et al. The *Drosophila melanogaster* flightless-I gene involved in gastrulation and muscle degeneration encodes gelsolin-like and leucine-rich repeat domains and is conserved in *Caenorhabditis elegans* and humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 23, p. 11386–11390, 1993.

CARITHERS, L. J. et al. A Novel Approach to High-Quality Postmortem Tissue Procurement: The GTEx Project. **Biopreservation and Biobanking**, v. 13, n. 5, p. 311–319, 2015.

CASTORA, F. J. Mitochondrial function and abnormalities implicated in the pathogenesis of ASD. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 8, n. 92, p. 83–108, 2019.

CHABAN, Y.; BOEKEMA, E. J.; DUDKINA, N. V. Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilisation. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1837, n. 4, p. 418–426, 2014.

CHEN, H.; CHAN, D. C. Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. **Human Molecular Genetics**, v. 14, n. 2, p. R283–R289, 2005.

CHEN, K. S. et al. The Human Homolog of the *Drosophila-Melanogaster* Flightless-I Gene

(Flii) Maps within the Smith-Magenis Microdeletion Critical Region in 17p11.2. **Am J Hum Genet**, v. 56, n. 175–182, 1995.

CHINNERY, P. F. Mitochondrial Disorders Overview. In: **Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2019.** [s.l: s.n.].

COGLIATI, S. et al. Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. **Cell**, v. 155, n. 1, p. 160–171, 2013.

CONSORTIUM, T. 1000 G. P. A global reference for human genetic variation The 1000 Genomes Project Consortium. **Nature**, v. 526, n. 7571, p. 68–74, 2015.

CORMIER, V. et al. Widespread multitissue deletions of the mitochondrial genome in the Pearson marrow-pancreas syndrome. **The Journal of Pediatrics**, v. 117, n. 4, p. 599–602, 1990.

CRUZ, A. C. P. et al. Frequency and association of mitochondrial genetic variants with neurological disorders. **Mitochondrion**, v. 46, p. 345–360, 2018.

CUNNINGHAM, F. et al. Ensembl 2019. **Nucleic Acids Research**, v. 8, n. 47(D1), p. D745–D751, 2019.

CUSCÓ, I. et al. Autism-specific copy number variants further implicate the phosphatidylinositol signaling pathway and the glutamatergic synapse in the etiology of the disorder. **Human Molecular Genetics**, v. 18, n. 10, p. 1795–1804, 2009.

DEN DUNNEN, J. T. et al. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. **Human mutation**, v. 37, n. 6, p. 564–569, 2016.

DICKINSON, M. E. et al. High-throughput discovery of novel developmental phenotypes. **Nature**, v. 537, n. 7621, p. 508–514, 2016.

DING, W. X.; YIN, X. M. Mitophagy: Mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. **Biological Chemistry**, v. 393, n. 7, p. 547–564, 2012.

DIOT, A. et al. Modulating mitochondrial quality in disease transmission: towards enabling mitochondrial DNA disease carriers to have healthy children. **Biochemical Society Transactions**, v. 44, n. 4, p. 1091–1100, 2016.

DUDKINA, N. V. et al. Structure and function of mitochondrial supercomplexes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1797, n. 6–7, p. 664–670, 2009.

EL-HATTAB, A. W. et al. Restoration of impaired nitric oxide production in MELAS syndrome with citrulline and arginine supplementation. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 105, n. 4, p. 607–614, 2012.

EL-HATTAB, A. W. et al. Therapies for mitochondrial diseases and current clinical trials. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 122, n. 3, p. 1–9, 2017.

EL-HATTAB, A. W.; SCAGLIA, F. Mitochondrial DNA Depletion Syndromes: Review and Updates of Genetic Basis, Manifestations, and Therapeutic Options. **Neurotherapeutics**, v. 10, n. 2, p. 186–198, 2013.

FASSONE, E.; RAHMAN, S. Complex I deficiency: Clinical features, biochemistry and molecular genetics. **Journal of Medical Genetics**, v. 49, n. 9, p. 578–590, 2012.

FERNÁNDEZ-SILVA, P.; ENRIQUEZ, J. A.; MONTOYA, J. Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. **Experimental Physiology**, v. 88, n. 1, p. 41–56, 2003.

FERNANDEZ-VIZARRA, E.; ZEVIANI, M. Mitochondrial complex III Rieske Fe-S protein processing and assembly. **Cell Cycle**, v. 17, n. 6, p. 681–687, 2018.

FIEDORCZUK, K.; SAZANOV, L. A. Mammalian Mitochondrial Complex I Structure and Disease-Causing Mutations. **Trends in Cell Biology**, v. 28, n. 10, p. 835–867, 2018.

FINSTERER, J.; DE CARVALHO, E. H. T. Cerebral manifestations of mitochondrial disorders. **Canadian Journal of Neurological Sciences**, v. 44, n. 6, p. 654–663, 2017.

FREYA, T. G.; MANNELLAB, C. A. The internal structure of mitochondria. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 25, n. 7, p. 319–324, 2000.

GHOSH, S. G. et al. Biallelic Mutations in ADPRHL2, Encoding ADP-Ribosylhydrolase 3, Lead to a Degenerative Pediatric Stress-Induced Epileptic Ataxia Syndrome. **American Journal of Human Genetics**, v. 103, p. 431–439, 2018.

GLOVER, E. I. et al. A randomized trial of coenzyme Q10 in mitochondrial disorders. **Muscle and Nerve**, v. 42, n. 5, p. 739–748, 2010.

GLUSMAN, G. et al. Kaviar: An accessible system for testing SNV novelty. **Bioinformatics**, v. 22, n. 2, p. 3216–3217, 2011.

GONZÁLEZ-LAMUÑO, D. et al. Expression and regulation of the transcriptional repressor ZNF43 in Ewing sarcoma cells. **Pediatric Pathology and Molecular Medicine**, v. 21, n. 6, p. 531–540, 2002.

GORMAN, G. S. et al. Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. **Annals of Neurology**, v. 77, n. 5, p. 753–759, 2015a.

GORMAN, G. S. et al. Mitochondrial Donation — How Many Women Could Benefit? **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 9, p. 885–887, 2015b.

GOTO, Y. I.; NONAKA, I.; HORAI, S. A mutation in the tRNA^{Leu}(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. **Nature**, v. 348, n. 6302, p. 651–653, 1990.

GRADA, A.; WEINBRECHT, K. Next-generation sequencing: Methodology and application. **Journal of Investigative Dermatology**, 2013.

GRAEF, M.; NUNNARI, J. Mitochondria regulate autophagy by conserved signalling pathways. **EMBO Journal**, v. 30, n. 11, p. 2101–2114, 2011.

GRAY, M. W.; BURGER, G.; LANG, B. F. Mitochondrial evolution. **Science**, v. 4, n. 9, p. a011403, 1999.

GREWE, B. S.; RICHMOND, J. E.; FEATHERSTONE, D. E. The spatial and developmental expression of mouse Vwa8 (von Willebrand domain-containing protein 8). **Gene**

Expression Patterns, v. 29, p. 39–46, 2018.

GTEX PROJECT. **GTE**x portal.

HAAS, R. H. et al. Mitochondrial Disease: A Practical Approach for Primary Care Physicians. **PEDIATRICS**, v. 120, n. 6, p. 1326–1333, 2007.

HÄGERHÄLL, C. Succinate: Quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1320, n. 2, p. 107–141, 1997.

HAMOSH A, SCOTT AF, AMBERGER J, VALLE D, M. V. OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man. **Human Mutation**, v. 15, n. 1, p. 57–61, 2000.

HARNER, M. et al. The mitochondrial contact site complex, a determinant of mitochondrial architecture. **EMBO Journal**, v. 30, n. 21, p. 4356–4370, 2011.

HATEFI, Y. The Mitochondrial Electron Transport and Oxidative Phosphorylation System. **Annual Review of Biochemistry**, v. 54, n. 1, p. 1015–1069, 1985.

HIRANO, M.; DÍAZ, B. G. Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy (MNGIE). **Mitochondrial Case Studies: Underlying Mechanisms and Diagnosis**, v. 7, n. 11, p. 389, 2015.

HIRANO, M.; NISHIGAKI, Y.; MARTÍ, R. Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy (MNGIE): A Disease of Two Genomes. **Neurologist**, v. 10, n. 1, p. 8–17, 2004.

HIRST, J. Mitochondrial Complex I. **Annual Review of Biochemistry**, v. 82, n. 1, p. 551–575, 2013.

HOLT, I. J. et al. A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. **American journal of human genetics**, v. 46, n. 3, p. 428–433, 1990.

HUYNEN, M. A. et al. Evolution and structural organization of the mitochondrial contact site (MICOS) complex and the mitochondrial intermembrane space bridging (MIB) complex. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 1, p. 91–101,

2016.

KANG, D.; KIM, S. H.; HAMASAKI, N. Mitochondrial transcription factor A (TFAM): Roles in maintenance of mtDNA and cellular functions. **Mitochondrion**, v. 7, n. 1–2, p. 39–44, 2007.

KANUNGO, S. et al. Mitochondrial disorders. **Annals of Translational Medicine**, v. 6, n. 24, p. 475–492, 2018.

KARCZEWSKI, K. J. et al. Variation across 141,456 human exomes and genomes reveals the spectrum of loss-of-function intolerance across human protein-coding genes. **bioRxiv disponível em: <https://doi.org/10.1101/531210>**, 2019.

KEYFI, F. et al. Frequency of Inborn Errors of Metabolism in a Northeastern Iranian Sample with High Consanguinity Rates. **Human Heredity**, v. 18, n. 83, p. 71–78, 2018.

KOENE, S. et al. Natural disease course and genotype-phenotype correlations in Complex I deficiency caused by nuclear gene defects: What we learned from 130 cases. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 35, n. 5, p. 737–747, 2012.

KOGA, Y. et al. L-arginine improves the symptoms of strokelike episodes in MELAS. **Neurology**, v. 64, n. 4, p. 710–712, 2005.

KOGA, Y. et al. MELAS and L-arginine therapy. **Mitochondrion**, v. 7, n. 1–2, p. 133–139, 2007.

KOOB, S. et al. The non-glycosylated isoform of MIC26 is a constituent of the mammalian MICOS complex and promotes formation of crista junctions. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1853, n. 7, p. 1551–1563, 2015.

KOOPMAN, W. J. H. et al. Mammalian Mitochondrial Complex I: Biogenesis, Regulation, and Reactive Oxygen Species Generation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 12, n. 12, p. 1431–1470, 2009.

KOOPMAN, W. J. H.; WILLEMS, P. H. G. M.; SMEITINK, J. A. M. Monogenic Mitochondrial Disorders. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 12, p. 1132–1141, 2012.

LAMANT, M. et al. ApoO, a novel apolipoprotein, is an original glycoprotein up-regulated by diabetes in human heart. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 47, p. 36289–36302, 2006.

LANDRUM, M. J. et al. ClinVar: Improving access to variant interpretations and supporting evidence. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D1062–D1067, 2018.

LEK, M. et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. **Nature**, v. 536, n. 7616, p. 285–291, 2016.

LIANG, H.; WARD, W. F. PGC-1 α : a key regulator of energy metabolism. **Advances in Physiology Education**, v. 30, n. 4, p. 145–151, 2006.

LIGHTOWLERS, R. N.; TAYLOR, R. W.; TURNBULL, D. M. Mutations causing mitochondrial disease: What is new and what challenges remain? **Science**, v. 349, n. 6255, p. 1494–1499, 2015.

LOGAN, D. C. The mitochondrial compartment. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 1, p. 1225–1243, 2006.

LOTT, M. T. et al. MtDNA variation and analysis using Mitomap and Mitomaster. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 44, p. 1.23.1-1.23.26, 2013.

LUO, M. et al. Characterization of the novel protein KIAA0564 (Von Willebrand Domain-containing Protein 8). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 487, n. 3, p. 545–551, 2017.

MAI, N.; CHRZANOWSKA-LIGHTOWLERS, Z. M. A.; LIGHTOWLERS, R. N. The process of mammalian mitochondrial protein synthesis. **Cell and Tissue Research**, v. 367, n. 1, p. 5–20, 2017.

MCKUSICK, V. A. Mendelian Inheritance in Man and its online version, OMIM. **American journal of human genetics**, v. 80, n. 4, p. 588–604, 2007.

MINNEROP, M. et al. Hypomorphic mutations in POLR3A are a frequent cause of sporadic

and recessive spastic ataxia. **Brain**, v. 140, n. 6, p. 1561–1578, 2017.

MONTASSER, M. E. et al. An APOO Pseudogene on Chromosome 5q is Associated with LDL-C Levels. **Circulation**, v. 138, n. 13, p. 1343–1355, 2018.

MORAES, C. T. et al. Mitochondrial DNA Deletions in Progressive External Ophthalmoplegia and Kearns-Sayre Syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 320, n. 20, p. 1293–1299, 2010.

MORAVA, E. et al. Mitochondrial disease criteria: Diagnostic applications in children. **Neurology**, v. 67, n. 10, p. 1823–1826, 2006.

MORONI, I. et al. Cerebral white matter involvement in children with mitochondrial encephalopathies. **Neuropediatrics**, v. 33, n. 2, p. 79–85, 2002.

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochemical Journal**, v. 417, n. 1, p. 1–13, 2009.

NAOI, M. et al. Mitochondria in Neuroprotection by Phytochemicals: Bioactive Polyphenols Modulate Mitochondrial Apoptosis System, Function and Structure. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 10, p. 2451, 2019.

NASLAVSKY, M. S. et al. Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. **Human Mutation**, v. 38, n. 7, p. 751–763, 2017.

NEUPANE, P. et al. ATP Synthase: Structure, Function and Inhibition. **Biomolecular Concepts**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2019.

NICHOLLS, T. J.; MINCZUK, M. In D-loop: 40 years of mitochondrial 7S DNA. **Experimental Gerontology**, v. 56, n. 175–181, 2014.

NIJTMANS, L. G. J.; HENDERSON, N. S.; HOLT, I. J. Blue Native electrophoresis to study mitochondrial and other protein complexes. **Methods**, v. 26, n. 4, p. 327–334, 2002.

OEDEGAARD, K. J. et al. A genome-wide association study of bipolar disorder and comorbid migraine. **Genes, Brain and Behavior**, v. 9, n. 7, p. 673–680, 2010.

OSTERGAARD, E. et al. Respiratory chain complex I deficiency due to NDUFA12 mutations as a new cause of Leigh syndrome. **Journal of medical genetics**, v. 48, n. 11, p. 737–740, 2011.

PALAZZO, L. et al. Serine is the major residue for ADP-ribosylation upon DNA damage. **eLife**, v. 7, p. e34334, 2018.

PARIKH, S. et al. Practice patterns of mitochondrial disease physicians in North America. Part 1: Diagnostic and clinical challenges. **Mitochondrion**, v. 14, p. 26–33, 2014.

PARIKH, S. et al. **Diagnosis and management of mitochondrial disease: A consensus statement from the Mitochondrial Medicine Society** **Genetics in Medicine**, 2015.

PARIKH, S. et al. Patient care standards for primary mitochondrial disease: A consensus statement from the mitochondrial medicine society. **Genetics in Medicine**, v. 19, n. 12, 2017.

PARIKH, S. et al. Diagnosis of ‘possible’ mitochondrial disease: an existential crisis. **Journal of Medical Genetics**, v. 0, p. 1–8, 2019.

PAVLAKIS, S. G. et al. Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: A distinctive clinical syndrome. **Annals of Neurology**, v. 16, n. 4, p. 481–488, 1984.

PFEFFER, G. et al. Treatment for mitochondrial disorders. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 18, n. 4, p. CD004426, 2012.

PHILLIPS, J. L.; GNANAKARAN, S. BioEdit: An important software for molecular biology. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 2, n. 1, p. 60–61, 2015.

POIRIER, Y. et al. Link between the unfolded protein response and dysregulation of mitochondrial bioenergetics in Alzheimer’s disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 76, n. 7, p. 1419–1431, 2019.

POTGIETER, M.; PRETORIUS, E.; PEPPER, M. S. Primary and secondary coenzyme Q10

deficiency: The role of therapeutic supplementation. **Nutrition Reviews**, v. 71, n. 3, p. 180–188, 2013.

PRACHAŘ, J. Ultrastructure of mitochondrial nucleoid and its surroundings. **General Physiology and Biophysics**, v. 35, n. 3, p. 273–286, 2016.

R DEVELOPMENT CORE TEAM, R.; R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing.R: A language and environment for statistical computing.**, 2017.

RAHMAN, J.; RAHMAN, S. Mitochondrial medicine in the omics era. **The Lancet**, v. 391, n. 10139, p. 2560–2574, 2018.

RAHMAN, S. et al. Leigh syndrome: Clinical features and biochemical and DNA abnormalities. **Annals of Neurology**, v. 39, n. 3, p. 343–351, 1996.

RAI, P. K. et al. Potential compounds for the treatment of mitochondrial disease. **British Medical Bulletin**, v. 116, p. 5–18, 2015.

RICHARDS, S. et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. **Genetics in Medicine**, v. 17, n. 5, p. 405–424, 2015.

RINTOUL, G. L.; REYNOLDS, I. J. Mitochondrial trafficking and morphology in neuronal injury. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1802, n. 1, p. 143–150, 2010.

RITTIÉ, L.; FISHER, G. J. Isolation and Culture of Skin Fibroblasts. **Fibrosis Research**, v. 117, p. 83–98, 2005.

RODENBURG, R. J. Mitochondrial complex I-linked disease. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1857, n. 7, p. 938–945, 2016.

SALMON, P. et al. Reversible immortalization of human primary cells by lentivector-

mediated transfer of specific genes. **Molecular Therapy**, v. 2, n. 4, p. 404–414, 2000.

SAYERS, E. W. et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic Acids Research**, v. 4, n. 44(D1), p. D7-19, 2019.

SAZANOV, L. A. A giant molecular proton pump: Structure and mechanism of respiratory complex I. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, n. 6, p. 375–388, 2015.

SCANLON, D. P.; SALTER, M. W. Strangers in strange lands: mitochondrial proteins found at extra-mitochondrial locations. **Biochemical Journal**, v. 476, n. 1, p. 25–37, 2019.

SCHAGGER, H.; PFEIFFER, K. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria [In Process Citation]. **Embo J**, v. 19, n. 8, p. 1777–1783, 2000.

SCHWARZ, J. M. et al. Mutationtaster2: Mutation prediction for the deep-sequencing age. **Nature Methods**, v. 11, n. 4, p. 361–362, 2014.

SHIHAB, H. A. et al. Ranking non-synonymous single nucleotide polymorphisms based on disease concepts. **Human Genomics**, v. 8, n. 11, 2014.

SHOFFNER, J. M. et al. Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA^{Lys} mutation. **Cell**, v. 15, n. 61, p. 931–937, 1990.

SIGNES, A.; FERNANDEZ-VIZARRA, E. Assembly of mammalian oxidative phosphorylation complexes I–V and supercomplexes. **Essays In Biochemistry**, v. 62, n. 3, p. 255–270, 2018.

SINGLETON, A. B. **Exome sequencing: making hay while the sun shines** *Lancet neurology*, 2011.

SKLADAL, D.; HALLIDAY, J.; THORBURN, D. R. Minimum birth prevalence of mitochondrial respiratory chain disorders in children. **Brain**, v. 126, n. Pt 8, p. 1905–1912, 2003.

SOUSA, J. S.; D'IMPRIMA, E.; VONCK, J. Mitochondrial respiratory chain complexes. **Subcellular Biochemistry**, v. 87, p. 167–227, 2018.

SPINAZZOLA, A. et al. Clinical and molecular features of mitochondrial DNA depletion syndromes. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 32, n. 2, p. 143–158, 2009.

STENSON, P. D. et al. The Human Gene Mutation Database: Building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine. **Human Genetics**, v. 133, n. 1, p. 1–9, 2014.

STOLDT, S. et al. Spatial orchestration of mitochondrial translation and OXPHOS complex assembly. **Nature Cell Biology**, v. 20, n. 5, p. 528–534, 2018.

STROUD, D. A. et al. Accessory subunits are integral for assembly and function of human mitochondrial complex i. **Nature**, v. 538, n. 7623, p. 123–126, 2016.

SUOMALAINEN, A.; BATTERSBY, B. J. Mitochondrial diseases: The contribution of organelle stress responses to pathology. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, n. 2, p. 77–92, 2018.

TARNOPOLSKY, M. A.; PARISE, G. Direct measurement of high-energy phosphate compounds in patients with neuromuscular disease. **Muscle and Nerve**, v. 22, n. 9, p. 1228–1233, 1999.

TENGAN, C. H. et al. The role of nitric oxide in muscle fibers with oxidative phosphorylation defects. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 359, n. 3, p. 771–777, 2007.

THORBURN, D. R. et al. Biochemical and molecular diagnosis of mitochondrial respiratory chain disorders. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1659, n. 2–3, p. 121–128, 2004.

TUPPEN, H. A. L. et al. Mitochondrial DNA mutations and human disease. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1797, n. 2, p. 113–128, 2010.

VAN DER AUWERA, G. A. et al. From fastQ data to high-confidence variant calls: The genome analysis toolkit best practices pipeline. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 43, n. 11.10, p. 1–33, 2013.

VAN DER BLIEK, A. M.; SHEN, Q.; KAWAJIRI, S. Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 6, p. a011072–a011072, 2013.

VAN HAUTE, L. et al. Mitochondrial transcript maturation and its disorders. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 38, n. 4, p. 655–680, 2015.

VANLANGENAKKER, N. et al. Molecular Mechanisms and Pathophysiology of Necrotic Cell Death. **Current Molecular Medicine**, v. 8, n. 3, p. 207–220, 2008.

VARGA, N. Á. et al. Mitochondrial dysfunction and autism: Comprehensive genetic analyses of children with autism and mtDNA deletion. **Behavioral and Brain Functions**, v. 14, n. 4, 2018.

VARGHESE, F. et al. Characterization of clinically identified mutations in NDUFV1, the flavin-binding subunit of respiratory complex I, using a yeast model system. **Human Molecular Genetics**, v. 24, n. 22, p. 6350–6360, 2015.

VISCOMI, C.; BOTTANI, E.; ZEVIANI, M. Emerging concepts in the therapy of mitochondrial disease. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1847, n. 6–7, p. 544–557, 2015.

VON DER MALSBURG, K. et al. Dual Role of Mitofilin in Mitochondrial Membrane Organization and Protein Biogenesis. **Developmental Cell**, v. 21, n. 4, p. 694–707, 2011.

WALLACE, D. C. et al. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. **Science**, v. 242, n. 4884, p. 1427–1430, 1988.

WALLACE, D. C.; FAN, W.; PROCACCIO, V. Mitochondrial Energetics and Therapeutics. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 5, p. 297–348, 2010.

WANG, J.; EL-HATTAB, A. W.; WONG, L.-J. C. **TK2-Related Mitochondrial DNA Maintenance Defect, Myopathic Form**. [s.l: s.n.].

WHO, G. M. G. R. S. WHO child growth standards: length/height-for-age, weight-for-age,

weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age: Methods and development. **World Health Organization**, 2006.

WITTIG, I.; BRAUN, H. P.; SCHÄGGER, H. Blue native PAGE. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 418–428, 2006.

WU, S. et al. Autophagy of cancer stem cells is involved with chemoresistance of colon cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 434, n. 4, p. 898–903, 2013.

XIE, L. LONG et al. Mitochondrial network structure homeostasis and cell death. **Cancer Science**, v. 109, n. 12, p. 3686–3694, 2018.

ZERBES, R. M. et al. Role of MINOS in mitochondrial membrane architecture: Cristae morphology and outer membrane interactions differentially depend on mitofilin domains. **Journal of Molecular Biology**, v. 422, n. 2, p. 183–191, 2012.

ZULLO, S. J. et al. Localization by fluorescence in situ hybridization (FISH) of human mitochondrial polymerase γ (POLG) to human chromosome band 15q24→q26, and of mouse mitochondrial polymerase γ (Polg) to mouse chromosome band 7E, with confirmation by direct sequence analy. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 78, n. 3–4, p. 281–284, 1997.

