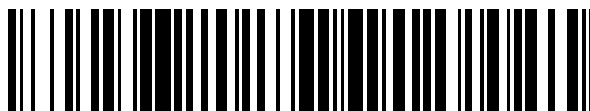


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 771**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.05.2006** **E 06761969 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015** **EP 1880008**

54 Título: **Expresión de una proteína mitocondrial mediante un enfoque alotópico mejorado**

30 Prioridad:

03.05.2005 US 676933 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.07.2015

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (100.0%)
101, RUE DE TOLBIAC
75654 PARIS CEDEX 13, FR**

72 Inventor/es:

**CORRAL-DEBRINSKI, MARISOL;
SAHEL, JOSÉ-ALAIN;
KALTIMBACHER, VALÉRIE y
BONNET, CRYSTEL**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el
folleto original publicado por la Oficina
Europea de Patentes**

ES 2 541 771 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Expresión de una proteína mitocondrial mediante un enfoque alotópico mejorado

5 **CAMPO DE LA INVENCIÓN:**

[0001] La presente invención se refiere al campo de la biología celular, la genética molecular y la medicina. La presente invención se refiere, más particularmente, a la importación de proteínas al interior de la mitocondria de células animales y humanas.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN:

[0002] Las mitocondrias ocupan una posición central en el metabolismo global de células eucariotas; por lo tanto la fosforilación oxidativa (OXPHOS), el ciclo de Krebs, el ciclo de la urea, la biosíntesis del grupo hemo y la oxidación de ácidos grasos tienen lugar dentro del orgánulo. Recientemente, se estableció otro papel fundamental para las mitocondrias en la determinación del periodo de vida celular, dado que se ha reconocido que son un mediador temprano fundamental en la cascada apoptótica. Las mitocondrias también son un productor fundamental de especies reactivas de oxígeno (ROS) que causan estrés oxidativo y, por lo tanto, inductoras de muerte celular.

20 Los defectos primarios en la función mitocondrial están implicados en más de 120 enfermedades y la lista sigue creciendo, éstas abarcan una extraordinaria colección de problemas clínicos, que habitualmente implican tejidos que tienen elevados requisitos energéticos, tales como la retina, el corazón, el músculo, el riñón, el páncreas y el hígado. Su incidencia se estima en 1 de cada 5.000 nacimientos vivos. De hecho, la combinación de datos epidemiológicos en enfermedades mitocondriales infantiles y adultas sugiere esta prevalencia como mínima, y podría ser mucho mayor. Por lo tanto, las patologías mitocondriales están consideradas entre las enfermedades determinadas genéticamente más comunes, y son un problema de salud fundamental dado que siguen siendo inaccesibles a terapias tanto curativas como paliativas.

La mitocondria está ensamblada con proteínas codificadas por genes distribuidos entre los genomas mitocondrial y nuclear. Estos genes incluyen los que codifican las proteínas estructurales de los complejos I-V de la cadena respiratoria, sus sustratos y productos asociados, las proteínas necesarias para la biogénesis mitocondrial, el aparato para importar precursores sintetizados en el citoplasma y las proteínas necesarias para el ensamblaje y la renovación mitocondrial. Los estudios que conducen a la identificación de genes implicados en trastornos mitocondriales han realizado avances considerables en la última década. De hecho, se han descrito numerosas mutaciones tanto en ADN mitocondrial como en una serie de genes nucleares relacionadas con una llamativa diversidad de cuadros clínicos.

Aproximadamente la mitad de los trastornos mitocondriales humanos son causados por mutaciones puntuales patógenas del ADNmt, un tercio de las cuales están ubicadas en genes codificantes. Actualmente no existe ningún tratamiento para ninguno de estos trastornos, un posible enfoque terapéutico es introducir en el núcleo una copia de tipo silvestre del gen mutado en el genoma mitocondrial e importar copias normales del producto génico en las mitocondrias desde el citosol. Este enfoque se ha denominado "expresión alotópica".

Ya ha habido algunos informes que describen que la versión localizada en el núcleo manipulada de algunos genes del ADNmt podía expresarse en células de mamífero. Por ejemplo, en un caso de enfermedad de Leigh, se construyó un plásmido en el que la señal de direccionamiento mitocondrial del gen COX8 codificado en el núcleo se añadió a un gen *ATP6* mitocondrial recodificado, mutado en pacientes. Células transfectadas de forma estable de pacientes presentan una mejora del crecimiento en medio con galactosa y un incremento leve de la síntesis de ATP, sin embargo la cantidad de proteína Atp6 importada en las mitocondrias era relativamente baja (18,5%), lo que implicaba que el precursor no era importado de forma eficiente (Manfredi, G., et al., Rescue of a deficiency in ATP synthesis by transfer of MTATP6, a mitochondrial DNA-encoded gene to the nucleus. Nature Genet., 2002. 30: p. 394-399).

Oca-Cassio y colaboradores han demostrado que la expresión alotópica de apocitocromo b y ND4 en células Cos-7 y HeLa, no causaba una importación mitocondrial eficiente de estas proteínas (Oca-Cossio, J., et al., Limitations of allotopic expression of mitochondrial genes in mammalian cells. Genetics, 2003. 165: p. 707-720).

Por lo tanto, hoy en día aún se encuentran importantes limitaciones a la expresión alotópica como enfoque terapéutico y requieren optimización para superar las significativas trabas antes de que ésta pueda ser aplicada en

terapia genética.

Una hipótesis que puede explicar la mala capacidad de importación de la proteína mitocondrial es su elevada hidrofobicidad. Por lo tanto, el precursor sintetizado en el citoplasma se queda pegado a la membrana mitocondrial externa.

El ensamblaje de las mitocondrias depende de la síntesis equilibrada de 13 proteínas codificadas por el ADNmt con más de otras mil codificadas por el ADN nuclear. Dado que la gran mayoría de los polipéptidos mitocondriales se sintetizan en el citoplasma, existe el requisito de un sistema de direccionamiento de proteínas eficiente y específico. Este proceso implica el transporte de ARNm desde el núcleo hasta la superficie de las mitocondrias.

Los inventores examinaron la posibilidad de que la expresión alotópica de ADN tal como ADNmt pudiera optimizarse mediante una localización dirigida del ARNm en la superficie mitocondrial.

15 **RESUMEN DE LA INVENCION:**

[0003] Las proteínas mitocondriales son codificadas por ácidos nucleicos que están ubicados en la mitocondria, es decir ácidos nucleicos mitocondriales (ADNmt, ARNm), así como por ácidos nucleicos que se originan a partir del núcleo, es decir ácidos nucleicos nucleares (ADNn, ARNn).

[0004] Los inventores describen un enfoque alotópico mejorado para importación de proteínas al interior de la mitocondria. La presente invención proporciona medios, incluyendo composiciones, que permiten la importación mitocondrial con una eficiencia y estabilidad mejoradas en comparación con técnicas de la técnica anterior. Los medios de la invención permiten una localización dirigida del ARNm en la superficie mitocondrial.

En comparación con técnicas de la técnica anterior, los medios de la invención permiten la importación eficiente y estable de una proteína al interior de la mitocondria de un animal o ser humano que la necesita, tal como un animal o ser humano que tiene una disfunción celular causada por una o varias mutaciones en un gen que codifica una proteína mitocondrial.

[0005] Los inventores demuestran que la distribución de ARNm en la superficie mitocondrial es una manera eficiente de proceder a dicha expresión alotópica, y que esta distribución de ARNm puede controlarse seleccionando una secuencia de direccionamiento a la mitocondria (MTS) apropiada y secuencias 3'UTR apropiadas. La secuencia CDS que codifica la proteína a suministrar al interior de la mitocondria es guiada por estas secuencias MTS y 3'UTR apropiadas desde el compartimento nuclear a los polisomas unidos a la mitocondria (donde la CDS se traduce), y ayuda a una eficiente translocación de una proteína funcional madura al interior de las mitocondrias.

[0006] Los inventores demuestran que, para obtener una importación terapéuticamente eficaz estable, preferentemente deben usarse tanto una MTS apropiada como una 3'UTR apropiada.

[0007] Las secuencias MTS y 3'UTR apropiadas corresponden a las de ARNm transcritos en el núcleo y dirigidos a mitocondrias. Si se usa un vector, se prefiere que éste no contenga ninguna 3'UTR que correspondería a la 3'UTR de ARNm transcritos en el núcleo pero no dirigidos a mitocondrias. Al mejor saber y entender de los inventores, todos los vectores disponibles en el mercado contienen dicho ARNm no dirigido a mitocondrias; se prefiere entonces borrar esta 3'UTR inapropiada del vector antes de usarlo como importador mitocondrial.

[0008] Los medios de la invención están especialmente adaptados a células animales y humanas y, más particularmente, a células de mamífero. Estos proporcionan acceso a medios terapéuticamente eficaces para dichas células.

[0009] La invención es tal como se define en las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS:

[0010]

Figuras 1A y 1 B: Mapa y secuencia de COX10 MTS- nATP6, SOD2MTS-nATP6, COX10 MTS- nATP6 COX10 3'UTR, SOD2MTS- nATP6- SOD2 3'UTR obtenidos en el vector pCMV-Tag 4A.

Figura 1A. Las cuatro construcciones se representan esquemáticamente.

Figura 1B. Los *COX10* MTS- *nATP6* y *SOD2*MTS- *nATP6* se introducen en el sitio de restricción de *EcoRI* del vector pCMV-tag4A. Los sitios de restricción de *EcoRI* están enmarcados. Los ATG de la MTS de *SOD2*, la MTS de *COX10* y *nATP6*, están en negrita y subrayados. La 3'UTR de *COX10* y la 3'UTR de *SOD2* se insertan en los sitios de restricción de *PvuI* y *MluI*, representados en negrita. El epítopo marcador FLAG está en cursiva.

Figura 2: Análisis por RT-PCR de ARN purificados a partir de células HeLa transfectadas 100 ng de ARN totales se transcribieron de forma inversa y se sometieron a 30 ciclos de amplificación por PCR, el 10% del producto amplificado se sometió a electroforesis en agarosa.

10

1: Células transfectadas transitoriamente con el vector *COX10* MTS- *nATP6* (3'UTR de SV40).

2: Células transfectadas transitoriamente con el vector *COX10* MTS- *nATP6*- *COX10* 3'UTR.

En 3 y 4 se examinaron ARN del mismo experimento de transfección pero, en este caso, éste representa las células transfectadas de forma estable.

15

5: Células HeLa transfectadas con el vector pCMV-tag4A vacío.

6: Células HeLa.

20 Se usaron cebadores oligonucleotídicos específicos para detectar ARNm de *ATP6* híbrido en células transfectadas, para el producto MTS *COX10*-*ATP6*, se usaron MTS de *COX10* y ORF 3' de *ATP6* (véase la tabla 2 que comprende, en el ejemplo 1). Para la amplificación del ORF de *ATP6* completo y toda la 3'UTR de *COX10*, se usaron el cebador ORF 5' de *ATP6* y el cebador 3' UTR de *COX10* 3' (véase la tabla 2 a continuación, en el ejemplo 1). Como control interno, los niveles en estado de equilibrio de ARNm de *COX6c* se examinaron en todas las preparaciones de ARN usando ambos cebadores *COX6* mostrados en dicha tabla 2.

25

Figura 3: Localización subcelular de la proteína *Atp6* recodificada en células HeLa Células transfectadas de forma estable con el vector *COX10* MTS- *nATP6* (3'UTR de SV40) o *COX10* MTS- *nATP6*- *COX10* 3'UTR se visualizaron mediante inmunofluorescencia indirecta usando anticuerpos para Flag y la subunidad beta de ATP sintasa. El patrón punteado de tinción del anticuerpo Flag indica que la proteína de fusión *Atp6* es transportada eficientemente a mitocondrias *in vivo*, dado que el mismo patrón de marcado de mitocondrias se observó con la subunidad beta de ATP sintasa.

30

Figuras 4A y 4B: las proteínas *nATP6* son importadas eficientemente al interior de las mitocondrias *in vivo*.

35 Figura 4A: Se extrajeron proteínas de células HeLa y células HeLa transfectadas (vectores *COX10* MTS-*nATP6*-SV40 3'UTR o *COX10* MTS-*nATP6*-*COX10* 3'UTR) y se ensayaron para importación en ausencia y presencia de proteinasa K (PK). Las proteínas se trataron con 200 µg/ml de proteinasa K a 0°C durante 30 minutos. A continuación, se separaron en gel de poliacrilamida con SDS al 4-12% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La transferencia resultante se sondeó con anticuerpos anti-subunidad alfa de ATP-sintasa monoclonal de ratón o MS anti-Flag monoclonal de ratón.

40

Figura 4B: Histogramas de la cantidad de *COX10* MTS-*nATP6*-Flag y subunidad alfa de Atp sintasa con o sin proteinasa K. Las señales de inmunotransferencias se exploraron y cuantificaron mediante el sistema MultiAnalyst (Bio-Rad). La cantidad de la proteína *ATP6* madura insensible a proteólisis por proteinasa K es aproximadamente el 185% más elevada en células transfectadas con el vector *COX10* MTS-*nATP6*-*COX10* 3'UTR en comparación con células que expresan el *COX10* MTS-*nATP6* sin 3'UTR de *COX10* pero con la señal PoliA de SV40. Además, la cantidad de la forma madura de la proteína *ATP6* recodificada dentro de las mitocondrias es muy similar a la medida para la subunidad alfa de ATP sintasa importada de forma natural, confirmando que las proteínas *ATP6* registradas son translocadas eficientemente al interior del orgánulo.

50

Figuras 5A y 5B: Mapa y secuencia de *COX10* MTS- *nND1*, *COX10*MTS-*nND4*, *COX10* MTS- *nND1*- *COX10* 3'UTR, *COX10*MTS- *nND4*- *COX10* 3'UTR obtenidos en el vector pCMV-Tag 4A.

Figura 5A. Las cuatro construcciones se representan esquemáticamente.

55

Figure 5B. Los *COX10* MTS- *nND1* y *COX10*MTS- *nND4* se introducen en los sitios de restricción de *XhoI*/*Sall* del vector pCMV-tag4A. Los sitios de restricción de *XhoI* y *Sall* están enmarcados. La ATG de la MTS de *COX10*, *nND1* y *nND4*, están en negrita y subrayadas. La 3'UTR de *COX10* se inserta en los sitios de restricción de *PvuI* y *MluI*, representados en negrita. El marcador FLAG está en negrita.

Figura 6: Inmunocitoquímica de fibroblastos con NOHL con G3460A

La proteína de fusión se visualizó mediante inmunofluorescencia indirecta usando anticuerpos para Flag. Indicativas de importación mitocondrial, las células transfectadas con vectores *COX10 MTS-nND1-SV40 3'UTR* o *COX10 MTS-nND1-COX10 3'UTR* mostraban un patrón de tinción típicamente punteado, también observado con la subunidad beta de ATP sintasa, que se localizan *in vivo* en la membrana mitocondrial interna. En contraste, las células transfectadas con el vector pCMV-Tag 4A vacío mostraban una intensidad muy baja y tinción citoplasmática difusa cuando se usaron anticuerpos para Flag.

Figura 7: Inmunocitoquímica de fibroblastos con NOHL con G11778A

La proteína de fusión se visualizó mediante inmunofluorescencia indirecta usando anticuerpos para Flag. Las células transfectadas con vectores *COX10 MTS-nND4-SV40 3'UTR* o *COX10 MTS-nND4-COX10 3'UTR* mostraban un patrón de tinción típicamente punteado, también observado con la subunidad beta de ATP sintasa, que se localiza *in vivo* en la membrana mitocondrial interna. Estos datos indican que ND4 es importado eficientemente al interior de mitocondrias. En contraste, células transfectadas con el vector pCMV-Tag 4A vacío mostraban una intensidad muy baja y tinción citoplasmática difusa cuando se usaron anticuerpos para Flag.

Figura 8: Crecimiento en medio libre de glucosa de fibroblastos no transfectados con la mutación G3460A y fibroblastos transfectados con el vector MTS COX10-nND1-COX10 3'UTR

Fibroblastos de pacientes de NOHL que presentaban la mutación G3460A se transfectaron de forma estable con el vector *MTS COX10-nND1-COX10 3'UTR* y fueron examinados en busca de su capacidad para crecer en medio DMEM suplementado con galactosa 10 mM. Los fibroblastos no transfectados (NOHL G3460A ND1) muestran un grave defecto de crecimiento en medio con galactosa, la capacidad de crecer en galactosa mejoró significativamente cuando la proteína *nND1* recodificada es expresada en células transfectadas de forma estable (NOHL G3460A ND1 + *MTSCOX10-nND1*). Las células fueron fotografiadas después de un cultivo de 6 días.

Figura 9: CDS recodificadas de ADNmt (SEQ ID NO: 27-29)

La figura 9 muestra la secuencia codificante de ácido nucleico humano de la ATP6, ND1, ND4, mitocondriales recodificada según el código genético universal (nATP6, nND1, nND4 de la SEQ ID NO: 27, 28 y 29, respectivamente). Los ND1 y ND4 recodificados que se muestran en la figura 9 también tienen en cuenta el uso de codones humanos preferidos (véase el ejemplo 2 a continuación).

Figura 10: MTS y 3'UTR co-traduccionales humanas representativas (SEQ ID NO: 30; 59; 31; 60)

La figura 10 muestra la secuencia de la MTS de COX10 humana (SEQ ID NO: 30), la 3'UTR de COX10 humana (SEQ ID NO: 59), la MTS de SOD2 humana (SEQ ID NO: 31) y la 3'NTR de SOD2 humana (SEQ ID NO: 60).

Tabla 5:

	MTS del ácido nucleico	3'UTR del ácido nucleico
COX10	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 59
SOD2	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 60

Las figuras 11A-11I muestran la secuencia de la proteína codificada por ARNm dirigido a la mitocondria humano ilustrativo, así como sus respectivas secuencias peptídicas MTS y sus respectivas secuencias 3'UTR. Se indica el número de entrada ATCC para cada una de estas secuencias de proteína.

ACO2= Aconitasa;

SOD2= Superóxido dismutasa mitocondrial;

ATP5b= Subunidad beta de la P sintasa;

UQCRFS1= Ubiquinol-citocromo c reductasa, polipéptido 1 hierro-azufre de Rieske;

NDUFV1= subunidad de 51 kDa de la NADH-ubiquinona oxidoreductasa, precursor mitocondrial (Complejo I-51 KD) (CI-51 KD) (flavoproteína 1 de NADH deshidrogenasa);

NDUFV2= flavoproteína 2 de NADH deshidrogenasa (ubiquinona), 24 kDa;

ALDH2= Precursor de aldehído deshidrogenasa 2 mitocondrial;

COX10 = Hemo A:farnesiltransferasa;

AK2 = Adenilato quinasa 2.

Las SEQ ID NO son las siguientes:

5

Tabla 6:

	Péptido de MTS	3'UTR	Proteína
ACO2	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 48
SOD2	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 49
ATP5b	SEQ ID NO: 36	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 50
UQCRCF1	SEQ ID NO: 38	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 51
NDUFV1	SEQ ID NO: 40	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 52
NDUFV2	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 53
ALDH2	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 54
COX10	SEQ ID NO: 46	SEQ ID NO: 47	SEQ ID NO: 55
AK2		SEQ ID NO: 57	SEQ ID NO: 56

Figuras 12A, 12B, 12C: Distribución subcelular de ARNm de ATP6 híbrido en células HeLa

- 10 A. ARN totales extraídos de células que expresan los vectores *SOD2*^{MTS} *ATP6-3'UTR*^{SV40} (S.T 1 y S.T 2) o *SOD2*^{MTS} *ATP6-3'UTR*^{SOD2} (S.T 3 y S.T 4) se sometieron a análisis por RT-PCR para revelar cantidades de ARNm de *ATP6* (*SOD2*^{MTS} *ATP6*) híbridos y ARNm de *SOD2*, *ATP6* y *COX6c* endógenos. La cantidad de ARN usados para la transcripción inversa, las condiciones de PCR y los oligonucleótidos específicos usados para cada gen se resumen en la tabla 9.
- 15 B. Los ARN se purificaron de polisomas unidos a la mitocondria (M-P) y polisomas citoplasmáticos libres (F-P) de líneas celulares transfectadas de forma estable con vectores *SOD2*^{MTS} *ATP6-3'UTR*^{SV40} (S.T 1 y S.T 2) o *SOD2*^{MTS} *ATP6-3'UTR*^{SOD2} (S.T 3 y S.T 4) y sometidas a análisis por RT-PCR. La abundancia de ARNm de *ATP6*, *SOD2* y *COX6c* endógenos se determinó en cada población polisomal usando las condiciones mostradas en la tabla 9.
- 20 C. Se realizaron análisis densitométricos usando el sistema de software Quantity One de Biorad.

La diferencia entre las cantidades de ARNm de *ATP6* híbridos en células que expresan respectivamente construcciones *SOD2*^{MTS} *ATP6-3'UTR*^{SV40} o *SOD2*^{MTS} *ATP6-3'UTR*^{SOD2} era significativa según la prueba de la t de Student para datos emparejados ($P < 0,0034$, $n=6$).

25

- Figura 13: Localización **subcelular** de la proteína *Atp6* recodificada *in vivo* Células transfectadas de forma estable con el vector pCMV-tag4A vacío, los plásmidos *SOD2*^{MTS} *ATP6-3'UTR*^{SV40} o *SOD2*^{MTS} *ATP6-3'UTR*^{SOD2} se visualizaron mediante inmunofluorescencia indirecta usando anticuerpos para Flag y subunidad α de ATP sintasa. Para cada tipo de célula visualizada, una imagen fusionada en asociación con tinción DAPI se muestra en el panel derecho. Indicativa de la localización mitocondrial de proteínas *ATP6* recodificadas, las células transfectadas con plásmidos *SOD2*^{MTS} *ATP6-3'UTR*^{SV40} o *SOD2*^{MTS} *ATP6-3'UTR*^{SOD2} mostraban una colocalización significativa de señales de tanto Flag como ATP sintasa α . En contraste, las células transfectadas con el vector vacío mostraban una tinción citoplasmática difusa y baja.

- 35 **Figuras 14A, 14B, 14C: Las proteínas *ATP6* recodificadas son importadas eficientemente al interior de mitocondrias *in vivo*.**

- A. Se realizaron seis purificaciones de mitocondrias independientes con células transfectadas de forma estable con plásmidos *SOD2*^{MTS} *ATP6-3'UTR*^{SV40} o *SOD2*^{MTS} *ATP6-3'UTR*^{SOD2} y se sometieron a análisis por transferencia de Western. Las señales para los precursores y las formas maduras de *ATP6* se exploraron y cuantificaron mediante el sistema Quantity One System (Bio-Rad). No se observaron diferencias significativas entre las cantidades del precursor y la forma madura de las proteínas *ATP6* recodificadas en cada línea celular examinada.

- B. Panel superior: Representación esquemática de intermedios de importación mitocondrial. La proteína pasajera hidrófoba puede ser atrapada de camino hacia la matriz. En esta etapa, la proteína puede estar bloqueada o representaba un intermedio de translocación. Esto no impide la escisión de la MTS por una peptidasa de procesamiento mitocondrial, el resto de la proteína sigue siendo accesible a digestión por PK y, por lo tanto, si es digerida se vuelve indetectable en el ensayo de transferencia de Western. La fracción de la proteína completamente

translocada se convierte en una proteína madura insensible a PK ubicada en la membrana mitocondrial interna. MM: matriz mitocondrial; OM: membrana externa; MIS: espacio intermembrana mitocondrial, TOM: Translocasa de la membrana externa, TIM: Translocasa de la membrana interna.

- 5 Panel medio: Mitocondrias extraídas de células transfectadas con el vector pCMV-Tag 4A vacío, o los plásmidos *SOD2^{MTS} ATP6-3'UTR^{SV40}* o *SOD2^{MTS} ATP6-3'UTR^{SOD2}* se sometieron a ensayos de transferencia de Western. 20 µg de proteínas se trataron con 150 µg/ml de PK a 0°C durante 30 minutos y se sometieron a análisis por inmunotransferencia usando anticuerpos anti-subunidad α de ATP sintasa y anti-Flag M2. Los análisis densitométricos de experimentos realizados con seis purificaciones mitocondriales independientes se representaron en el panel inferior. Se normalizaron valores medidos para la señal de la forma madura de ATP6 resistente a PK con señal de ATPα revelada después de la digestión con PK. A continuación se comparó el valor obtenido para células que expresan los plásmidos *SOD2^{MTS} ATP6-3'UTR^{SV40}* o *SOD2^{MTS} ATP6-3'UTR^{SOD2}*. Las señales de transferencias de Western se exploraron y se cuantificaron mediante el sistema Quantity One System (Bio-Rad). La diferencia entre las cantidades de proteína ATP6 mitocondrial translocada completamente en células que expresan respectivamente construcciones *SOD2^{MTS} ATP6-3'UTR^{SV40}* o *SOD2^{MTS} ATP6-3'UTR^{SOD2}* era significativa según la prueba de la t de Student para datos emparejados (P < 0,0022, n=6).

- C. 20 µg de mitocondrias aisladas de células transfectadas de forma estable con el vector *SOD2^{MTS} ATP6-3'UTR^{SOD2}* tratadas con 150 µg/ml de PK y Triton X100 al 1% a 0°C durante 30 minutos y posteriormente sometidas a análisis de Western.

Figura 15: Capacidad de importación mitocondrial de proteínas ATP6 en base al índice de mesohidrofobicidad

- 25 Un gráfico desarrollado por Claros y Vincens se usó para medir la capacidad de importación mitocondrial de proteínas ATP6 de fusión. Mediante este enfoque, la proteína *SOD2^{MTS}ATP6* de fusión no sería importable. La mesohidrofobicidad, que es la hidrofobicidad regional promedio en una región de 69 aminoácidos, se calculó usando Mito-Protil. Los valores obtenidos son los siguientes: ATP6: 1,41; *SOD2^{MTS}ATP6*: 1,41; *COX8^{MTS}ATP6*: 1,41; *SOD2*: -1,26; *COX8*: -1,63.

- 30 **Figura 16:** rescate de células NARP; tasa de supervivencia en medio con galactosa de células NARP (ATP6 mutado), y de células NARP transfectadas mediante un vector *SOD2^{MTS} - ATP (SOD2^{MTS} - ATP6 - SV40 3'UTR)*, o mediante un vector de la invención (*SOD2^{MTS} - ATP6 - SOD2 3'UTR*); véase también el ejemplo 3, tabla 11.

- 35 **Figura 17:** rescate de fibroblastos con NOHL; tasa de supervivencia en medio con galactosa de fibroblastos con NOHL (ND1 mutado), y de fibroblastos con NOHL transfectados mediante un vector *COX10^{MTS} - ND1 - SV40 3'UTR*, o mediante un vector de la invención (*COX10^{MTS} - ND1 - COX10 3'UTR*); véase también el ejemplo 4, tabla 12.

- 40 **Figura 18:** distribución mitocondrial en células ganglionares retinianas (CGR) transfectadas con la versión mutada de ND1.

- Figura 19:** rescate de células NARP; tinción anti-Flag, Mito-tracker y fusionada+DAPI de células NARP transfectadas con *SOD2^{MTS} - ATP6 - SV40 3' UTR*, o con *SOD2^{MTS} - ATP6 - SOD2 3'UTR*.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION:

- 50 **[0011]** En el presente documento se describe el uso y el control de la distribución del ARNm en la superficie de mitocondrias.

- En el presente documento también se describe el uso de secuencias de ácido nucleico correspondientes a una MTS co-traducciona y de una 3'UTR co-traducciona, para guiar a un ARNm deseado (que codifica una proteína mitocondrial deseada) desde el núcleo a los polisomas unidos a la mitocondria, y para inducir la translocación eficaz de la proteína traducida en la mitocondria.

Por "co-traducciona", se denomina en el presente documento a una vía dirigida a mitocondrias codificada en el núcleo.

Secuencias de direccionamiento a la mitocondria (MTS):

[0012] Secuencias conocidas como señal de direccionamiento a la mitocondria o señal de direccionamiento mitocondrial se denominan como MTS por el experto en la materia.

- 5 Una secuencia MTS puede ser identificada dentro de una secuencia de proteína o ácido nucleico por un experto en la materia.

La mayoría de los péptidos de direccionamiento a la mitocondria constan de una pre-secuencia N-terminal de aproximadamente 15 a 100 residuos, preferentemente de aproximadamente 20 a 80 residuos. Éstas están enriquecidas en arginina, leucina, serina y alanina. Las pre-secuencias mitocondriales muestran un sesgo estadístico de residuos de aminoácidos cargados positivamente, proporcionado principalmente a través de residuos de arginina; muy pocas secuencias contienen aminoácidos cargados negativamente. Los péptidos de direccionamiento a la mitocondria también comparten una capacidad de formar una hélice alfa anfífila.

- 15 **[0013]** Una descripción completa de un procedimiento para identificar una MTS está disponible en el documento: M.G. Claros, P. Vincens, 1996 (Eur. J. Biochem. 241, 779-786 (1996), "Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences").

- [0014]** Ha disponible software para el experto en la materia para identificar la MTS de una secuencia dada. El software ilustrativo comprende en particular el software MitoProt®, que está disponible por ejemplo en el sitio web del *Institut für Humangenetik, Technische Universität München, Alemania*, <http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html> (véase también <ftp://ftp.ens.fr/pub/molbio>). El software MitoProt® calcula la región de la proteína N-terminal que puede soportar una secuencia de direccionamiento mitocondrial y el sitio de escisión. La identificación del péptido de direccionamiento mitocondrial N-terminal que está presente dentro de una proteína proporciona un acceso directo a la secuencia de ácido nucleico, es decir a la MTS (por ejemplo leyendo las posiciones correspondientes en la secuencia de ácido nucleico que codifica dicha proteína).

- [0015]** Secuencias peptídicas MTS humanas y 3'UTR humanas ilustrativas que se originan a partir de ARNm dirigido a mitocondrias codificado en el núcleo humano se dan en las figuras 11A, 11B, 11C, 11D, 11E, 11F, 11G, 11H y 11I.

Las SEQ ID NO son las siguientes:

Tabla 7:

ARNm humanos ilustrativos que son codificados en el núcleo pero dirigidos a la mitocondria	Péptido de MTS	Figura
ACO2	SEQ ID NO: 32	11A
SOD2	SEQ ID NO: 34	11B
ATP5b	SEQ ID NO: 36	11C
UQCRC1	SEQ ID NO: 48	11D
NDUFB1	SEQ ID NO: 40	11E
NDUFB2	SEQ ID NO: 42	11F
ALDH2	SEQ ID NO: 44	11G
COX10	SEQ ID NO: 46	11H

- 35 3'UTR:

[0016] La 3'UTR de una molécula de ARN se define como el fragmento de esta molécula de ARN que se extiende desde el codón de terminación hasta el final de la molécula. Según el código genético universal, hay tres posibles codones de terminación: TGA, TAA, TAG.

- 40 **[0017]** Una base de datos en línea proporciona acceso directo a secuencias 3'UTR: <http://bighost.area.ba.cnr.it/BIG/UTRHome/>.

- [0018]** Secuencias 3'UTR ilustrativas que pueden usarse según la invención se muestran en las figuras 11A, 11B, 11C, 11D, 11E, 11F, 11G, 11H y 11I (también se indican los números de entrada de estas secuencias). Las SEQ ID NO son las siguientes:

Tabla 8:

ARNm humanos ilustrativos que son codificados en el núcleo pero dirigidos a la mitocondria	3'UTR	Figura
ACO2	SEQ ID NO: 33	11A
SOD2	SEQ ID NO: 35	11B
ATP5b	SEQ ID NO: 37	11C
UQCRRFS1	SEQ ID NO: 39	11D
NDUFV1	SEQ ID NO: 41	11E
NDUFV2	SEQ ID NO: 43	11F
ALDH2	SEQ ID NO: 45	11G
COX10	SEQ ID NO: 47	11H
AK2	SEQ ID NO: 57	11I

Vectores de la invención:

- [0019]** La presente invención se refiere a un vector que está adaptado al suministro eficiente y estable de una proteína al interior de la mitocondria de una célula animal o humana, preferentemente una célula de mamífero, de la forma más preferente una célula humana.
- El vector de la invención puede producirse en forma de un vector recombinante. Ventajosamente, el vector de la invención es un vector de expresión.
- 10 **[0020]** Un vector de la invención es tal como se define en la reivindicación 1 y comprende:
- al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica una señal de direccionamiento a la mitocondria (también denominada como: secuencia de ácido nucleico MTS),
- 15 - al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica dicha proteína a suministrar, según el código genético universal (también denominado como: CDS), y
- al menos una secuencia de ácido nucleico 3'.
- 20 Dicha al menos una secuencia de ácido nucleico MTS es una secuencia de ácido nucleico MTS co-traducciona, o un fragmento o variante conservativa de la misma.
- Dicha al menos una secuencia de ácido nucleico 3' es una secuencia de ácido nucleico 3'UTR co-traducciona o la secuencia de ADN de dicha 3'UTR co-traducciona, o un fragmento o variante conservativa de la misma.
- 25 Preferentemente, dicho vector no comprende una 3'UTR no co-traducciona.
- Dicho vector no usa una vía de importación postraducciona, sino que usa una vía de importación por co-traducción desde el núcleo a dicha mitocondria.
- 30 El suministro de una proteína según la invención no solamente comprende la translocación del ácido nucleico que codifica la proteína desde el núcleo hacia la mitocondria, sino que también comprende la traducción de la proteína codificada en el citosol pero en las inmediaciones de la mitocondria (en polisomas unidos a la mitocondria), y la importación eficaz de la proteína traducida al interior de dicha mitocondria. La invención proporciona un mecanismo de importación muy ventajoso en comparación con técnicas de la técnica anterior, que proporcionaban a la
- 35 mitocondria proteínas maduras a un nivel de eficiencia insatisfactorio.
- La presente invención proporciona, además, una importación estable de dicha proteína al interior de la mitocondria. Esto significa que el rescate de proteínas obtenido mediante la invención es un rescate que es estable a lo largo del tiempo: los fibroblastos de un paciente de NOHL transfectados mediante un vector de la invención (que expresa
- 40 ND1) se han cultivado in vitro durante al menos 20 días en un medio de cultivo con galactosa. Al mejor saber y entender de los inventores, ésta es la primera vez que un cultivo de fibroblastos de paciente de NOHL puede mantenerse en crecimiento durante un periodo tan largo en un medio con galactosa.
- [0021]** En el presente documento se describe un vector adaptado al suministro eficiente y estable de una
- 45 proteína al interior de la mitocondria de una célula animal o humana, preferentemente una célula de mamífero, de la forma más preferente una célula humana, que comprende:

- al menos una secuencia de ácido nucleico de direccionamiento a la mitocondria (secuencia de ácido nucleico MTS),

- al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica dicha proteína según el código genético universal (CDS), y

5

- al menos una secuencia de ácido nucleico 3', que está ubicada en 3' de dicha al menos una secuencia de ácido nucleico MTS y dicha al menos una CDS.

Preferentemente, dicha al menos una secuencia de ácido nucleico MTS está en posición 5' en comparación con dicha al menos una secuencia CDS, con lo que el vector tiene la siguiente estructura (de 5' a 3'): al menos una secuencia de ácido nucleico MTS - al menos una CDS- al menos una 3'UTR.

10

[0022] Dicha al menos una secuencia de ácido nucleico MTS es:

15 - la secuencia de ARN de MTS de un ARNm codificado en el núcleo y dirigido a la mitocondria, preferentemente la secuencia de ARN de MTS de un ARNm codificado en el núcleo y dirigido a la mitocondria de origen natural, o

- la secuencia de ADNc de dicha secuencia de ARN de MTS, o

20 - una secuencia de ADN que codifica dicha secuencia de ARN de MTS según el código genético universal, o

- una variante o fragmento conservativo de dicha secuencia de ARN o ADNc o ADN de MTS, que se deriva de ella mediante delección y/o sustitución y/o adición de uno o varios nucleótidos, pero ha conservado una función de direccionamiento a la mitocondria.

25

En otras palabras, dicha al menos una secuencia de ácido nucleico MTS es:

- la secuencia de ARN de una MTS que dirige un ARNm transcrito en el núcleo (preferentemente de origen natural) a la superficie de una mitocondria en una célula recogida de un animal o ser humano sano, o en una célula animal o humana normal, o

30

- la secuencia de ADNc de dicha secuencia de ARN de MTS, o

- una secuencia de ADN que codifica dicha secuencia de ARN de MTS según el código genético universal, o

35

- una variante o fragmento conservativo de dicha secuencia de ARN o ADNc o ADN de MTS, que se deriva de ella mediante delección y/o sustitución y/o adición de uno o varios nucleótidos, pero ha conservado una función de direccionamiento a la mitocondria.

40 Preferentemente, dicha al menos una secuencia de ácido nucleico MTS es:

- la secuencia de ADNc de una MTS de un ARNm codificado en el núcleo y dirigido a la mitocondria, o

- una variante o fragmento conservativo de dicha secuencia de ADNc, que se deriva de ella mediante delección y/o sustitución y/o adición de uno o varios nucleótidos, pero ha conservado una función de direccionamiento a la mitocondria.

45

[0023] Dicha al menos una secuencia de ácido nucleico 3' es:

50 - la secuencia 3'UTR de un ARNm codificado en el núcleo y dirigido a la mitocondria, preferentemente la secuencia 3'UTR de un ARNm codificado en el núcleo y dirigido a la mitocondria de origen natural, o

- la secuencia de ADNc de dicha secuencia 3'UTR, o

55 - una secuencia de ADN que codifica dicha secuencia 3'UTR según el código genético universal, o

- una variante o fragmento conservativo de dicha secuencia de ARN o ADNc o ADN de 3'UTR, que se deriva de ella mediante delección y/o sustitución y/o adición de uno o varios nucleótidos, y que, cuando sustituye a la 3'UTR de tipo silvestre de dicho ARNm codificado en el núcleo y dirigido a la mitocondria, sigue permitiendo el direccionamiento

mitocondrial del ARNm resultante.

En otras palabras, dicha al menos una secuencia de ácido nucleico 3' es:

- 5 - la secuencia de ARN de la 3'UTR de ARNm transcrito en el núcleo y dirigido a la mitocondria, es decir la secuencia de ARN de la 3'UTR de un ARN transcrito en el núcleo (preferentemente de origen natural) que está dirigido a la superficie de una mitocondria en una célula recogida de un animal o ser humano sano, o en una célula animal o humana normal, o
- 10 - la secuencia de ADNc de dicha secuencia 3'UTR, o
 - una secuencia de ADN que codifica dicha secuencia 3'UTR según el código genético universal, o
 - una variante o fragmento conservativo de dicha secuencia de ARN o ADNc o ADN de 3'UTR, que se deriva de ella mediante delección y/o sustitución y/o adición de uno o varios nucleótidos, y que, cuando sustituye a la 3'UTR de tipo silvestre de dicho ARNm codificado en el núcleo y dirigido a la mitocondria, sigue permitiendo el direccionamiento mitocondrial del ARNm resultante.

Preferentemente, dicha al menos una secuencia de ácido nucleico 3' es:

- 20 - la secuencia de ADNc de la secuencia 3'UTR de un ARNm codificado en el núcleo y dirigido a la mitocondria, o
 - una variante o fragmento conservativo de dicha secuencia de ADNc, que se deriva de ella mediante delección y/o sustitución y/o adición de uno o varios nucleótidos, y que, cuando sustituye a la 3'UTR de tipo silvestre de dicho ARNm codificado en el núcleo y dirigido a la mitocondria, sigue permitiendo el direccionamiento mitocondrial del ARNm resultante.

[0024] El vector resultante no usa una vía de importación postraducciona, sino que usa una vía de importación por co-traducción desde el núcleo a dicha mitocondria.

- 30 **[0025]** Preferentemente, dicho vector (construcción de ácido nucleico insertada incluida) no comprende ninguna secuencia que sería idéntica a:
 - la 3'UTR de un ARNm de origen natural que es un ARNm transcrito en el núcleo pero no dirigido a la mitocondria (preferentemente de origen natural), o
 - la secuencia de ADNc de dicha secuencia 3'UTR, o
 - una secuencia de ADN que codifica dicha 3'UTR según el código genético universal.

Preferentemente, dicho vector (construcción de ácido nucleico insertada incluida) no comprende ninguna secuencia que sería idéntica a:

- 40 - la 3'UTR de un ARNm que no está dirigido a la superficie de una mitocondria, y preferentemente la 3'UTR de un ARNm de origen natural que no está dirigido a la superficie de una mitocondria, o
- la secuencia de ADNc de dicha secuencia 3'UTR, o
- una secuencia de ADN que codifica dicha 3'UTR de ARNm de origen natural según el código genético universal.

[0026] En el presente documento se describe más particularmente un vector adaptado al suministro eficiente y estable de una proteína al interior de la mitocondria de una célula de mamífero, que comprende:

- 55 - al menos una secuencia de ácido nucleico de direccionamiento a la mitocondria (denominada como secuencia de ácido nucleico MTS),
 - al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica dicha proteína según el código genético universal (denominada como secuencia CDS), y

- al menos una secuencia de ácido nucleico 3', que está ubicada en 3' de dicha al menos una secuencia de ácido nucleico MTS y de dicha al menos una CDS,

5 en la que dicha al menos una secuencia de ácido nucleico MTS es:

- la secuencia de ADNc de una MTS de un ARNm codificado en el núcleo y dirigido a la mitocondria, o
- una variante o fragmento conservativo de dicha secuencia de ADNc, que se deriva de ella mediante delección y/o
sustitución y/o adición de uno o varios nucleótidos, pero ha conservado una función de direccionamiento a la
10 mitocondria,

en la que dicha al menos una secuencia de ácido nucleico 3' es:

- la secuencia de ADNc de la secuencia 3'UTR de un ARNm codificado en el núcleo y dirigido a la mitocondria, o
15 - una variante o fragmento conservativo de dicha secuencia de ADNc, que se deriva de ella mediante delección y/o
sustitución y/o adición de uno o varios nucleótidos, y que, cuando sustituye a la 3'UTR de tipo silvestre de dicho
ARNm de origen natural, sigue permitiendo el direccionamiento mitocondrial del ARNm resultante,

20 en la que dicho vector no comprende ninguna secuencia que sería idéntica a:

- la 3'UTR de un ARNm de origen natural que es un ARNm transcrito en el núcleo pero no dirigido a la mitocondria, o

- la secuencia de ADNc de dicha secuencia 3'UTR, o

25 - una secuencia de ADN que codifica dicha 3'UTR de ARNm de origen natural según el código genético universal,

con lo que dicho vector no usa una vía de importación postraducciona, sino que usa una vía de importación por co-
traducción desde el núcleo a dicha mitocondria.

30 **[0027]** Dicha al menos una secuencia de ácido nucleico MTS puede ser, por ejemplo, la secuencia de ácido
nucleico MTS de ACO2, o de SOD2, o de ATP5b, o de *UQCERS1, o de NDUFV1, o de NDUFV2, o de ALDH2 o de
COX10.

35 Dicha al menos una secuencia de ácido nucleico MTS puede codificar, de este modo, una secuencia de la SEQ ID
NO: 32, o la SEQ ID NO: 34, o la SEQ ID NO: 36, o la SEQ ID NO: 38, o la SEQ ID NO: 40, o la SEQ ID NO: 42, o la
SEQ ID NO: 44, o la SEQ ID NO: 46 (= la secuencia peptídica o polipeptídica MTS de ACO2, SOD2, ATP5b,
UQCERS1, NDUFV1, NDUFV2, ALDH2, COX10, humanos respectivamente; véase las figuras 11A-11H).

40 **[0028]** Preferentemente, dicha al menos una secuencia de ácido nucleico MTS es la secuencia de ácido
nucleico MTS de ACO2, o de SOD2, o de ATP5b o de COX10.

Dicha al menos una secuencia de ácido nucleico MTS puede codificar, de este modo, una secuencia de la SEQ ID
NO: 32, o la SEQ ID NO: 34, o la SEQ ID NO: 36 o la SEQ ID NO: 46 (= la secuencia peptídica o polipeptídica MTS
de ACO2, SOD2, ATP5b, COX10 humanos, respectivamente).

45 **[0029]** Preferentemente, dicha al menos una secuencia de ácido nucleico MTS es la SEQ ID NO: 30, o la
SEQ ID NO: 31 (secuencia de ácido nucleico MTS de COX10 y SOD2 humanos, respectivamente; véase la figura
10).

50 **[0030]** Dicha al menos una secuencia de ácido nucleico 3' puede ser por ejemplo:

- la secuencia 3'UTR de ACO2, o de SOD2, o de ATP5b, o de UQCERS1, o de NDUFV1, o de NDUFV2, o de
ALDH2, o de COX10 o de AK2, o

55 - la secuencia de ADNc de dicha secuencia 3'UTR, o

- una secuencia de ADN que codifica dicha secuencia 3'UTR según el código genético universal.

Dicha al menos una secuencia de ácido nucleico 3' puede, de este modo, comprender o constar de las de la SEQ ID

NO: 33, o la SEQ ID NO: 35, o la SEQ ID NO: 37, o la SEQ ID NO: 39, o la SEQ ID NO: 41, o la SEQ ID NO: 43, o la SEQ ID NO: 45, o la SEQ ID NO: 47 o la SEQ ID NO: 57 (= las secuencias que corresponden a la 3'UTR humana de ACO2, SOD2, ATP5b, UQCRFS1, NDUFV1, NDUFV2, ALDH2, COX10, AK2, respectivamente; véase las figuras 11A-11I).

5

[0031] Preferentemente, dicha al menos una secuencia de ácido nucleico 3' es:

- la secuencia 3'UTR de ACO2, o de SOD2, o de ATP5b, o de COX10 o de AK2, o
- la secuencia de ADNc de dicha 3'UTR, o

10 - una secuencia de ADN que codifica dicha secuencia 3'UTR.

Dicha al menos una secuencia de ácido nucleico 3' puede, de este modo, comprender o constar de la SEQ ID NO: 33, o la SEQ ID NO: 35, o la SEQ ID NO: 37, o la SEQ ID NO: 47 o la SEQ ID NO: 57 (= las secuencias que corresponden a la 3'UTR humana de ACO2, SOD2, ATP5b, COX10, AK2, respectivamente; véase las figuras 11A-11I).

15

[0032] Preferentemente, dicha al menos una secuencia de ácido nucleico 3' es la SEQ ID NO: 35 (3'UTR de SOD2 humano), o la SEQ ID NO: 47 (3'UTR de COX10 humano).

20 **[0033]** Dicha al menos una secuencia de ácido nucleico CDS puede ser una secuencia de ARN, de ADNc o ADN. Preferentemente, dicho al menos una secuencia CDS es una secuencia de ADNc.

Según un aspecto muy ventajoso de la invención, dicha al menos una CDS puede ser cualquier ácido nucleico que codifica una proteína que puede haberse descubierto que es útil para una mitocondria. Al contrario que las técnicas de la técnica anterior, la tecnología de la invención no está, de hecho, limitada por el nivel de hidrofobicidad de la

25

proteína codificada.
Dicha al menos una CDS puede ser, de este modo, cualquier ácido nucleico que codifica una proteína mitocondrial. Este ácido nucleico puede ser un ácido nucleico mitocondrial, o un ácido nucleico nuclear que codifica una proteína mitocondrial.

30 **[0034]** De la forma más preferente dicha al menos una secuencia CDS codifica una proteína mitocondrial funcional de origen natural, tal como Cox1, Cox2, Cox3, Atp6, Atp8, Cytb, Nd1, Nd2, Nd3, Nd4, Nd41, Nd5, Nd6.

[0035] Preferentemente, dicha al menos una secuencia CDS es la secuencia de un ácido nucleico mitocondrial de origen natural, recodificado según el código genético universal.

35

[0036] Los ácidos nucleicos mitocondriales usan un código genético mitocondrial que es ligeramente diferente del código genético universal que es usado por los ácidos nucleicos nucleares.

Cuando la proteína a importar al interior de dicha mitocondria corresponde a una proteína mitocondrial de origen natural, la forma de origen natural de su secuencia de ácido nucleico sigue el código genético mitocondrial.

40 Cuando dicho ácido nucleico mitocondrial tiene que ser insertado en el vector de la invención, la secuencia de ácido nucleico mitocondrial tiene que ser recodificada según el código genético universal, dado que el vector dirige un proceso de importación co-traducciona desde el núcleo a la mitocondria. Por lo tanto, se ha de crear una versión codificada en el núcleo de la secuencia de ácido nucleico mitocondrial. Esta versión codificada en el núcleo puede ser producida mediante sustitución de codones en los ácidos nucleicos mitocondriales, para sustituir aquellos
45 codones que son leídos por el sistema genético mitocondrial con codones del código genético universal. Por ejemplo, el codón UGA de mamífero dirige la inserción de un triptófano en la mitocondria, pero es un codón de terminación en el código genético nuclear. Por lo tanto, el codón UGA de un ácido nucleico mitocondrial tiene que ser sustituido por UGG que codifica triptófano en el código genético universal.

50

Tabla 4: código genético universal frente a mitocondrial

codón	Código universal	Código mitocondrial humano
UGA	Terminación	Trp
AGA	Arg	Terminación
AGG	Arg	Terminación
AUA	lie	Met

[0037] El uso de codones en las mitocondrias frente al código genético universal se describe en el documento Lewin, Genes V, Oxford University Press; Nueva York 1994.

Las sustituciones de codones incluyen en particular:

- UGA a UGG,
- AGA a UAA, UAG o UGA,
- AGG a UAA, UAG o UGA,
- 5 - AUA a AUG, CUG o GUG,
- AUU a AUG, CUG o GUG.

[0038] Dicha al menos una secuencia CDS puede ser, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que codifica Atp6, o Nd1 o Nd4, tal como una secuencia de ácido nucleico de ATP6, o de ND1 o de ND4, recodificada según el código genético universal (por ejemplo una secuencia de la SEQ ID NO: 27, NO: 28 o NO: 29, véase la figura 9).

[0039] Dicha al menos una secuencia CDS puede ser, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico una secuencia de ácido nucleico que codifica Cox1, Cox2, Cox3, Atp8, Cytb, Nd2, Nd3, Nd41, Nd5, Nd6, tal como una secuencia de ácido nucleico de COX1, COX2, COX3, ATP8, Cytb, ND2, ND3, ND41, ND5, ND6. La descripción de los trece ácidos nucleicos mitocondriales de origen natural puede encontrarse en el documento Andrew et al. 1999 (Nat Genet. Octubre de 1999; 23(2): 147); véase también en el siguiente sitio web: <http://www.mitomap.org/cgi-bin/mitomap/tbl2gen.pl>.

[0040] Preferentemente, dicha recodificación se realiza teniendo en cuenta el codón de uso preferido de dicha célula de mamífero, y de la forma más preferente teniendo en cuenta el codón de uso preferido humano.

[0041] Cuando se recodifica ácido nucleico mitocondrial según el código genético universal, según la presente invención es muy ventajoso tener en cuenta el uso del codón preferido del sujeto o paciente, al que se le administrará el vector de la invención.

Los principios de uso del codón preferido, así como ejemplos de uso del codón preferido para diversos organismos pueden encontrarse por ejemplo en el documento de Klump y Maeder, 1991 (Pure & Appl. Chem., vol. 63, No. 10, págs. 1357-1366 "the thermodynamic basis of the genetic code"). Un uso del codón preferido ilustrativo para seres humanos se muestra en la tabla 3 a continuación (véase el ejemplo 2).

[0042] Dicha al menos una secuencia CDS puede ser, por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 28 o de la SEQ ID NO: 29 (es decir una secuencia de ácido nucleico de ND1 o de ND4, recodificada según el código genético universal, y teniendo en cuenta el codón de uso preferido humano).

[0043] El vector de la invención puede comprender, por ejemplo:

- al menos una secuencia de ácido nucleico MTS de SOD2 y al menos una 3'UTR de SOD2, o
- al menos una secuencia de ácido nucleico MTS de COX10 y al menos una 3'UTR de COX10, o
- cualquier combinación de estas secuencias de ácido nucleico MTS y 3'UTR que el experto en la materia pueda encontrar apropiada. Dicho vector puede comprender, por ejemplo, una ATP6, ND1 o ND4 recodificada como CDS.

[0044] El vector de la invención puede comprender, por ejemplo, al menos una secuencia de SEQ ID NO: 21 (MTS de COX10 - ATP6 recodificado - 3'UTR de COX10), SEQ ID NO: 22 (MTS de SOD2 - ATP6 recodificado - 3'UTR de SOD2), SEQ ID NO: 25 (MTS de COX10 - ND1 recodificado - 3'UTR de COX10), SEQ ID NO: 26 (MTS de COX10 - ND4 recodificado - 3'UTR de COX10).

[0045] Como alternativa, dicha al menos una secuencia CDS puede ser la secuencia de ácido nucleico de un ácido nucleico nuclear que codifica una proteína mitocondrial funcional, por ejemplo, un ácido nucleico nuclear de origen natural que codifica una proteína mitocondrial funcional.

Más particularmente, dicho al menos un ácido nucleico nuclear puede ser un ARNm transcrito en el núcleo y dirigido a la mitocondria, o la secuencia de ADNc dicho ARNm, o la secuencia de ADN que codifica dicho ARNm.

Más particularmente, dicho al menos un ácido nucleico nuclear puede ser un ARNm transcrito en el núcleo que no está dirigido a la mitocondria, o la secuencia de ADNc de dicho ARNm, o la secuencia de ADN que codifica dicho ARNm.

[0046] Dicho vector puede comprender además una o varias secuencias de control de la expresión. La selección de secuencias de control de la expresión adecuadas, tales como promotores es bien conocida en la técnica, al igual que la selección de vectores de expresión apropiados (véase, por ejemplo, el documento de

Sambrook et al. "Molecular Cloning: A laboratory Manual", 2ª ed., vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989).
Dicho vector puede, de este modo, comprender además al menos un promotor unido de forma operativa a dicha al menos una secuencia MTS, dicha al menos una secuencia CDS, dicha al menos una secuencia 3':

- 5 Dicho promotor puede ser por ejemplo un promotor constitutivo, tal como por ejemplo un promotor de CMV.
Dicho vector puede comprender además un sitio de terminación.

[0047] Dicho vector puede comprender además una de varias de las siguientes secuencias de control de la expresión: aisladores, silenciadores, IRES, potenciadores, sitios de iniciación, señales de terminación.

- 10 Dicho vector puede comprender además un origen de replicación. Preferentemente, dicho promotor y dicho origen de replicación están adaptados a la transducción o infección de células animales o humanas, preferentemente a la transducción o infección de células humanas.

- [0048]** Dicho vector puede ser, por ejemplo, un plásmido, o un virus, tal como un vector viral integrador, por ejemplo un retrovirus, un virus adenoasociado (VAA) o un lentivirus, o es un vector viral no integrador, tal como un adenovirus, un alfavirus, un virus de Herpes Simplex (VHS).

- [0049]** Dicho vector puede comprender además un ácido nucleico que codifica un marcador detectable, tal como un epítipo FLAG o proteína verde fluorescente (GFP)

- 20 **[0050]** En el presente documento también se describe un proceso para la producción de un vector de la invención, que comprende:

- proporcionar un vector, y privarle de su 3'UTR original, si hubiera alguna,
- 25 - insertar en este vector al menos una secuencia de ácido nucleico MTS, al menos una secuencia CDS y al menos una secuencia 3', tal como se ha descrito anteriormente.

- Tal como ya se hay mencionado, dicho vector preferentemente no debe comprender ninguna secuencia que corresponda a la 3'UTR de un ARNm codificado en el núcleo pero no dirigido a la mitocondria. Al mejor saber y entender de los inventores, todos los vectores disponibles en el mercado contienen dicha 3'UTR inapropiada; según la presente invención, dicha 3'UTR debe ser, por lo tanto, eliminada del vector. Puede ser por ejemplo sustituida por una secuencia 3' apropiada que corresponda a un ARNm codificado en el núcleo y dirigido a la mitocondria.

- 35 Construcción de ácido nucleico:

[0051] Una construcción de ácido nucleico puede ser portada por el vector de la invención. En el presente documento se describe más particularmente una construcción de ácido nucleico no de origen natural.

- 40 **[0052]** Una construcción de ácido nucleico no de origen natural puede comprender:

- al menos una secuencia de ácido nucleico de direccionamiento a la mitocondria (denominada como secuencia de ácido nucleico MTS),
- 45 - al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica dicha proteína según el código genético universal (denominada como secuencia CDS), y
- al menos una secuencia de ácido nucleico 3', que está ubicada en 3' de dicha al menos una secuencia de ácido nucleico MTS y de dicha al menos una secuencia CDS.

- 50 **[0053]** Dicha al menos una secuencia de ácido nucleico MTS es:

- la secuencia de ARN de MTS de un ARNm codificado en el núcleo y dirigido a la mitocondria, tal como la secuencia de ARN de MTS de un ARNm codificado en el núcleo y dirigido a la mitocondria de origen natural, o
- 55 - la secuencia de ADNc de dicho ARN, o
- una secuencia de ADN que codifica dicha secuencia de ARN de MTS, o

- una variante o fragmento conservativo de dicha secuencia MTS de ARN o ADN, que se deriva de ella mediante delección y/o sustitución y/o adición de uno o varios nucleótidos, pero ha conservado una función de direccionamiento a la mitocondria.

5 **[0054]** Dicha al menos una secuencia de ácido nucleico 3' es:

- la secuencia 3'UTR de un ARNm codificado en el núcleo y dirigido a la mitocondria tal como la secuencia 3'UTR de un ARNm codificado en el núcleo y dirigido a la mitocondria de origen natural, o

10 - la secuencia de ADNc de dicho ARN, o

- una secuencia de ADN que codifica dicha secuencia 3'UTR, o

- una variante o fragmento conservativo de dicha secuencia 3'UTR de ARN o ADN, que se deriva de ella mediante delección y/o sustitución y/o adición de uno o varios nucleótidos, y que, cuando sustituye a la 3'UTR de tipo silvestre de dicho ARNm codificado en el núcleo y dirigido a la mitocondria, sigue permitiendo el direccionamiento mitocondrial del ARNm resultante.

15 **[0055]** Puede estar previsto que, cuando dicha al menos una secuencia de ácido nucleico MTS es la secuencia de ARN de MTS de un ARNm codificado en el núcleo y dirigido a la mitocondria de origen natural, o la secuencia de ADNc de dicho ARNm, o una secuencia de ADN que codifica dicha secuencia de ARN de MTS según el código genético universal, dicha al menos una secuencia CDS de ácido nucleico no sea la CDS de este ARNm codificado en el núcleo y dirigido a la mitocondria de origen natural.

25 **[0056]** Puede estar previsto que, cuando dicha al menos una secuencia de ácido nucleico 3' es la secuencia 3'UTR de un ARNm codificado en el núcleo y dirigido a la mitocondria de origen natural, o la secuencia de ADNc de dicho ARNm, o una secuencia de ADN que codifica dicha secuencia 3'UTR, dicha al menos una secuencia CDS no sea la CDS de este ARNm codificado en el núcleo y dirigido a la mitocondria de origen natural.

30 **[0057]** Puede estar previsto que, cuando dicha al menos una secuencia de ácido nucleico MTS y dicha secuencia de ácido nucleico 3', respectivamente, son las secuencias MTS y 3'UTR de un ARNm codificado en el núcleo y dirigido a la mitocondria de origen natural, o las secuencias de ADNc de dicho ARNm, o una secuencia de ADN que codifica dicha secuencia de ARNm, entonces dicha al menos una secuencia CDS no sea la CDS de este ARNm codificado en el núcleo y dirigido a la mitocondria de origen natural.

35 **[0058]** Preferentemente, dicha construcción de ácido nucleico no comprende ninguna secuencia que sería idéntica a:

- la 3'UTR de un ARNm de origen natural que es un ARNm transcrito en el núcleo pero no dirigido a la mitocondria, o

40 - la secuencia de ADNc de dicha secuencia 3'UTR, o

- una secuencia de ADN que codifica dicha 3'UTR de ARNm de origen natural según el código genético universal.

45 **[0059]** La construcción de ácido nucleico resultante no usa una vía de importación postraduccional, sino que usa una vía de importación por co-traducción desde el núcleo a dicha mitocondria.

[0060] Se describe más particularmente una construcción de ácido nucleico no de origen natural que comprende:

50 - al menos una secuencia de ácido nucleico de direccionamiento a la mitocondria (denominada como secuencia de ácido nucleico MTS),

- al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica dicha proteína según el código genético universal (denominada como secuencia CDS), y

55 - al menos una secuencia de ácido nucleico 3', que está ubicada en 3' de dicha al menos una secuencia de ácido nucleico MTS y de dicha al menos una secuencia CDS,

en la que dicha al menos una secuencia de ácido nucleico MTS es:

- la secuencia de ADNc de la secuencia de ARN de MTS de un ARNm codificado en el núcleo y dirigido a la mitocondria, o

5

- una variante o fragmento conservativo de dicha secuencia de ADNc, que se deriva de ella mediante delección y/o sustitución y/o adición de uno o varios nucleótidos, pero ha conservado una función de direccionamiento a la mitocondria,

10 en la que dicho al menos una secuencia de ácido nucleico 3' es:

- la secuencia de ADNc de la secuencia 3'UTR de un ARNm codificado en el núcleo y dirigido a la mitocondria, o

15 - una variante o fragmento conservativo de dicha secuencia 3'UTR de ADNc, que se deriva de ella mediante delección y/o sustitución y/o adición de uno o varios nucleótidos, y que, cuando sustituye a la 3'UTR de tipo silvestre de dicho ARNm codificado en el núcleo y dirigido a la mitocondria, sigue permitiendo el direccionamiento mitocondrial del ARNm resultante,

20 a condición de que, cuando dicha al menos una secuencia de ácido nucleico MTS y dicha al menos una secuencia de ácido nucleico 3', respectivamente, son las secuencias MTS y 3'UTR de un ARNm codificado en el núcleo y dirigido a la mitocondria de origen natural, o las secuencias de ADNc de dicho ARNm, o una secuencia de ADN que codifica dicha secuencia de ARNm, entonces dicha al menos una secuencia CDS no sea la CDS de este ARNm codificado en el núcleo y dirigido a la mitocondria de origen natural, y

en la que dicha construcción de ácido nucleico no comprende ninguna secuencia que sería idéntica a:

25

- la 3'UTR de un ARNm de origen natural que es un ARNm transcrito en el núcleo pero no dirigido a la mitocondria, o

- la secuencia de ADNc de dicha secuencia 3'UTR, o

30 - una secuencia de ADN que codifica dicha 3'UTR de ARNm de origen natural según el código genético universal.

[0061] Todas y cada una de las características, descritas en el presente documento y anteriormente para las secuencias de ácido nucleico MTS, CDS, 3' en relación con el vector de la invención, y en particular aquellas características que se refieren a las secuencias de ácido nucleico MTS, CDS, 3', por supuesto se aplican *mutatis*
35 *mutandis* a la construcción de ácido nucleico y, más particularmente, a la construcción de ácido nucleico no de origen natural

Por lo tanto, en particular se entiende que:

40 - una secuencia de ácido nucleico MTS de dicha construcción de ácido nucleico puede ser la secuencia de ácido nucleico MTS de ACO2, o de SOD2, o de ATP5b, o de UQCRFS1, o de NDUFV1, o de NDUFV2, o de ALDH2 o de COX10;

- una secuencia de ácido nucleico 3' de dicha construcción de ácido nucleico puede ser:

45

• la secuencia 3'UTR de ACO2, o de SOD2, o de ATP5b, o de UQCRFS1, o de NDUFV1, o de NDUFV2, o de ALDH2, o de COX10 o de AK2, o

• la secuencia de ADNc de dicha secuencia 3'UTR, o

50

• una secuencia de ADN que codifica dicha secuencia 3'UTR según el código genético universal; y que

- construcciones de ácido nucleico ilustrativas comprenden o constan de una secuencia de la SEQ ID NO: 21 (MTS de COX10 - ATP6 recodificado - 3'UTR de COX10), y/o de la SEQ ID NO: 22 (MTS de SOD2 - ATP6 recodificado - 3'UTR de SOD2), y/o de la SEQ ID NO: 25 (MTS de COX10 - ND1 recodificado - 3'UTR de COX10), y/o de la SEQ ID NO: 26 (MTS de COX10 - ND4 recodificado - 3'UTR de COX10).

55

[0062] Dicha construcción de ácido nucleico no de origen natural puede ser transfectada en una célula en forma de ADN desnudo, o en forma de un plásmido. Cualquier tecnología de transfección que es encontrada

conveniente por el experto en la materia es conveniente. El experto en la materia puede proceder, por ejemplo, mediante electroporación, transfección con DEAE Dextrano, transfección con fosfato cálcico, fusión de liposomas catiónicos, creación de un campo eléctrico in vivo, bombardeo con microproyectiles recubiertos de ADN, terapia génica ex vivo, y similares.

- 5 Dicha construcción de ácido nucleico no de origen natural puede por supuesto, como alternativa y/o de forma complementaria, insertarse en un vector, tal como un vector viral.

[0063] El vector y la construcción de ácido nucleico son útiles para terapia con ácido nucleico, por ejemplo para invertir una disfunción celular causada por una mutación en el ácido nucleico que codifica una proteína mitocondrial. Estos permiten restaurar una función de la proteína en una célula.

Célula manipulada:

[0064] La presente invención también se refiere a una célula manipulada que ha sido transducida o infectada por un vector según la invención.

Preferentemente, dicha célula manipulada es una célula animal o humana manipulada, de la forma más preferente a una célula manipulada de mamífero, aún más preferentemente a una célula humana manipulada.

- 20 Dicha célula manipulada puede ser, por ejemplo, una célula de médula ósea, una célula clonal, una línea celular germinal, una célula post-mitótica, tal como una célula del sistema nervioso central; una célula neuronal, una célula ganglionar retiniana, una célula progenitora; o una célula madre, una célula madre hematopoyética, una célula madre mesenquimática. Preferentemente, dicha célula manipulada es una célula neuronal, una célula ganglionar retiniana.

[0065] Dicha transducción, infección o transfección puede implementarse mediante cualquier medio disponible para el experto en la materia, por ejemplo mediante electroporación, transfección con DEAE Dextrano, transfección con fosfato cálcico, fusión de liposomas catiónicos, creación de un campo eléctrico in vivo, Bombardeo con microproyectiles recubiertos de ADN, inyección con un virus recombinante de replicación defectuosa, 30 recombinación homóloga, terapia génica ex vivo, un vector viral, transferencia de ADN desnudo, y similares.

[0066] Dicha célula manipulada puede ser, por ejemplo, una célula, tal como una célula neuronal, recogida de un paciente que padece una enfermedad relacionada con una disfunción mitocondrial. El vector y la construcción de ácido nucleico pueden usarse, de hecho, para terapia celular ex vivo.

Composiciones farmacéuticas y aplicaciones:

[0067] La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un vector según la invención, o al menos una célula de mamífero manipulada según la invención.

[0068] En el presente documento también se describe un fármaco que comprende al menos un vector según la invención, o al menos una construcción de ácido nucleico, o al menos una célula de mamífero manipulada según la invención.

- 45 **[0069]** Las composiciones de la presente invención pueden comprender además al menos un vehículo farmacéutica y/o fisiológicamente aceptable (diluyente, excipiente, aditivo, regulador del pH, agente emulsionante o dispersante, conservante, tensioactivo, agente gelificante, así como tamponante y otro agente estabilizante y solubilizante, etc.).

50 **[0070]** Los vehículos y formulaciones farmacéuticamente aceptables incluyen todos los vehículos y formulaciones farmacéuticamente aceptables, tales como los descritos en los documentos "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 20ª edición; y "Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems". Ansel, Popovich y Allen Jr., Lippincott Williams y Wilkins.

- 55 En general, la naturaleza del vehículo dependerá de la vía de administración particular que es empleada. Por ejemplo, las formulaciones parenterales habitualmente comprenden, además uno o más agentes de contraste, fluidos inyectables que incluyen fluidos farmacéutica y fisiológicamente aceptables, incluyendo agua, solución salina fisiológica, soluciones de sales equilibradas, tampones, dextrosa acuosa, glicerol, etanol, aceite de sésamo, combinaciones de los mismos, o similares como vehículo. El medio también puede comprender materiales añadidos

farmacéuticos convencionales tales como, por ejemplo, sales farmacéuticamente aceptables para ajustar la presión osmótica, tampones, conservantes y similares. El vehículo y la composición pueden ser estériles, y la formulación se adecúa a la vía de administración.

5 **[0071]** La composición puede estar por ejemplo, en forma de una solución líquido, suspensión, emulsión, cápsula, formulación de liberación prolongada, o polvo.

[0072] La composición farmacéutica y el fármaco son útiles para el tratamiento terapéutico y/o paliativo y/o preventivo de una enfermedad, afección, o trastorno relacionado con un defecto de actividad o función de
10 mitocondrias.

Un mapa del ADN mitocondrial (*mitomap*) está disponible en la página <http://www.mitomap.org/>; este sitio proporciona en particular una lista de mutaciones asociadas con enfermedades mitocondriales.

Una revisión de publicaciones científicas relacionada con la enfermedad, afección o trastorno mitocondrial
15 comprende en particular Carelli et al. 2004 (Progress in Retinal and Eye Research 23: 53-89), DiMauro 2004 (Biochimica et Biophysica Acta 1659:107-114), Zeviani y Carelli 2003 (Curr Opin Neurol 16:585-594) y Schaefer et al. 2004 (Biochimica et Biophysica Acta 1659: 115-120).

Enfermedades, afecciones o trastornos relacionados con un defecto en la actividad o función de las mitocondrias
20 comprenden en particular miopatías y neuropatías, tales como neuropatías ópticas.

Los ejemplos de enfermedades, afecciones o trastornos mitocondriales comprenden: envejecimiento, sordera inducida por aminoglucósido, cardiomiopatía, OEPC (oftalmoplejía externa progresiva crónica), encefalomiopatía, NEBF (necrosis estriatal bilateral familiar), síndrome KS (de Kearns-Sayre), NOHL (neuropatía óptica hereditaria de
25 Leber), MELAS (miopatía mitocondrial, encefalopatía, acidosis láctica, y episodios similares a apoplejía), EMFRR (epilepsia mioclónica con episodios similares a apoplejía), SLHM (síndrome de Leigh heredado por vía materna), miopatía mitocondrial, NARP (neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa), OEP, ENS (encefalopatía necrotizante subaguda).

30 **[0073]** Las neuropatías ópticas en particular comprenden:

- Neuropatía óptica hereditaria de Leber (NOHL), que implica una o varias mutaciones puntuales en el ADN mitocondrial, más particularmente mutaciones puntuales en los genes ND1 y/o ND4 y/o ND6, tales como G3460A (mutación de ND1), G11778A (mutación de ND4), T14484C (mutación de ND6),
35

- atrofia óptica dominante (AOD), también conocida como neuropatía óptica de Kjer, que implica un defecto del gen nuclear OPA1,

- NEBF, SLHM y NARP, que son el resultado de una mutación en el gen MTATP6 (síntesis de ATP defectuosa), que
40 puede corregirse restaurando la actividad de la función de ATP6.

[0074] La neuropatía óptica hereditaria de Leber (NOHL) fue la primera enfermedad hereditaria por vía materna en asociarse con las mutaciones puntuales en el ADN mitocondrial y está considerada actualmente el trastorno mitocondrial más prevalente. La patología se caracteriza por la pérdida selectiva de células ganglionares retinianas
45 que causa pérdida de la visión central y atrofia óptica, de forma prevalente en machos jóvenes. Se trata de un trastorno devastador con la mayoría de los pacientes no mostrando ninguna mejoría funcional y permaneciendo dentro del requisito legal para registro como ciegos. Otras anomalías clínicas también se han notificado en pacientes de NOHL. Estas incluyen temblor postural, neuropatía periférica, miopatía no específica, trastornos de movimiento y arritmias cardíacas [8]. Las tres mutaciones patógenas más comunes de NOHL afectan a los genes del complejo I
50 ND1 y/o ND4 y/o ND6 con el doble efecto de rebajar la síntesis de ATP e incrementar el estrés oxidativo de forma crónica.

[0075] Cada una de dicha enfermedad, afección o trastorno podría corregirse restaurando la actividad o función del ADN mutado.
55

[0076] El ejemplo 1 a continuación ilustra el rescate de una actividad o función de ATP6 con un vector y ácido nucleico de la invención. El ejemplo 2 a continuación ilustra el rescate de una actividad o función de ND1 y ND4 con un vector y un ácido nucleico (fibroblastos recogidos de pacientes de NOHL).

[0077] Las composiciones farmacéuticas o fármacos están destinadas más particularmente al tratamiento terapéutico y/o paliativo y/o preventivo de una miopatía o de una neuropatía óptica, tal como NOHL, AOD, NEBF, SLHM o NARP.

5 **[0078]** Se describe el uso de al menos un vector o construcción de ácido nucleico para terapia in vivo o ex vivo de un sujeto o paciente que necesita un tratamiento terapéutico, paliativo o preventivo de una enfermedad, afección o trastorno relacionado con un defecto en la actividad o función de mitocondrias.

10 **[0079]** También se describe el uso de al menos un vector o construcción de ácido nucleico de la invención, o de al menos una célula manipulada para el tratamiento de una enfermedad, afección o trastorno relacionado con un defecto en la actividad o función de mitocondrias y, más particularmente, para la producción de una composición, composición farmacéutica o fármaco destinado al tratamiento de dicha enfermedad, afección o trastorno.

15 En el presente documento también se describe un procedimiento para el tratamiento terapéutico y/o paliativo y/o preventivo de una enfermedad, afección o trastorno relacionado con un defecto en actividad o función de mitocondrias, que comprende:

- administrar a un sujeto o paciente que lo necesita un vector y/o una construcción de ácido nucleico y/o una célula manipulada, en una cantidad eficaz para el tratamiento terapéutico y/o paliativo y/o preventivo de dicho sujeto o paciente,

20 - tratar ex vivo células recogidas de un sujeto o paciente que lo necesita, y devolver las células tratadas al sujeto o paciente.

[0080] La expresión "que comprende", que es sinónima de "que incluye" o "que contiene", es abierta, y no excluye un elemento o elementos, ingrediente o ingredientes o etapa o etapas del procedimiento adicionales no mencionadas, mientras que la expresión "que consta de" es una expresión cerrada, que excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente adicional que no se mencione explícitamente.

30 La expresión "que consta esencialmente de" es una expresión parcialmente abierta, que no excluye elemento o elementos, etapa o etapas o ingrediente o ingredientes adicionales no mencionados, siempre que estos elemento o elementos, etapa o etapas o ingrediente o ingredientes adicionales no afecten materialmente a las propiedades básicas y novedosas de la invención.

35 La expresión "que comprende" (o "comprenden o comprende") incluye, por lo tanto, la expresión "que consta de" ("constan o consta de"), así como la expresión "que consta esencialmente de" ("constan o consta esencialmente de"). Por consiguiente, la expresión "que comprende" (o "comprenden o comprende") se entiende, en la presente solicitud, más particularmente que abarca la expresión que consta de ("constan o consta de"), y la expresión "que consta esencialmente de" ("constan o consta esencialmente de").

40 La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos, que se proporcionan para fines ilustrativos solamente.

EJEMPLOS:

45 **EJEMPLO 1:** La expresión alotópica del gen mitocondrial *ATP6* mejora significativamente por la localización de sus ARNm en la superficie de mitocondrias, que causa una eficiente importación del precursor

Resumen:

50 **[0081]** Está claro que la alteración del metabolismo energético mitocondrial es el factor patógeno clave en un número creciente de trastornos neurodegenerativos. Con el descubrimiento de las mutaciones del ADNmt, la sustitución de genes defectuosos se convirtió en una meta importante para genetistas mitocondriales en todo el mundo. Desafortunadamente, antes de la presente invención, aún no era posible introducir genes extraños en las mitocondrias de células de mamífero.

55 **[0082]** Para sortear este problema, la expresión alotópica en el núcleo de genes codificados por ADN mitocondrial (ADNmt), se convirtió en una idea atractiva. Sin embargo, para la mayoría de los genes mitocondriales puestos a prueba, existían importantes limitaciones relacionadas con la elevada hidrofobicidad de las proteínas correspondientes, lo que impide su translocación mitocondrial.

En el presente documento se dilucidan los mecanismos que permiten el suministro de ARNm que codifican proteínas mitocondriales a la superficie del orgánulo, y demuestran que este suministro depende de dos secuencias: la región que codifica la secuencia de direccionamiento mitocondrial (MTS) y la 3'UTR. La distribución del ARNm en la superficie mitocondrial permite optimizar el enfoque alotópico, mejorando la eficiencia de importación mitocondrial del precursor sintetizado en el citosol. Como una ilustración de este mecanismo, se decidió utilizar la secuencia que codifica la MTS y la 3'UTR de dos genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales: *COX10* y *SOD2* asociados a un gen *ATP6* mitocondrial recodificado. De hecho, los ARNm de *COX10* y *SOD2* se localizan en la superficie mitocondrial en células HeLa. Las células HeLa transfectadas con estas construcciones expresan una proteína Atp6 que es suministrada con éxito a las mitocondrias. Por lo tanto, se pudo optimizar el enfoque alotópico para Atp6, y el procedimiento se intentará a continuación para rescatar disfunción mitocondrial en pacientes que presentan mutaciones de *ATP6*.

Introducción:

[0083] Para examinar la posibilidad de que la expresión alotópica de genes del ADNmt pudiera optimizarse mediante una localización dirigida del ARNm a la superficie mitocondrial, se decidió utilizar las secuencias que codifican la MTS y la 3'UTR de dos genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales: *COX10* y *SOD2* asociados a un gen *ATP6* localizado en el núcleo manipulado de nuevo. *COX10* codifica una proteína altamente hidrófoba de la membrana mitocondrial interna, sus ARNm se localizan en la superficie mitocondrial [5]. *SOD2* codifica una proteína mitocondrial implicada en la desintoxicación, su ARNm, como el ARNm de *COX10*, se localiza en la superficie mitocondrial [5] y un informe reciente describió que en células HeLa, su 3'UTR está asociada a la superficie mitocondrial mediante la proteína Akap121 [6]. La capacidad de sintetizar y dirigir la proteína Atp6 a mitocondrias se examinó en células HeLa para 4 plásmidos: dos de ellos solamente contienen la mts de *COX10* o *SOD2*, y las otras dos poseen tanto la MTS como la 3'UTR de cada gen. Se detectaron ARNm híbridos para cada construcción en células transfectadas tanto de forma transitoria como de forma estable. Además, la proteína Atp6 también se visualizó mediante inmunofluorescencia indirecta asociada a la superficie de mitocondrias. Mitocondrias aisladas de células transfectadas se examinaron en busca de la presencia de la proteína Atp6. De forma destacable, ARNm híbridos que poseen tanto la MTS como la 3'UTR de *COX10* y *SOD2* permiten la síntesis de un polipéptido que es importado de manera altamente eficiente desde el citosol al interior de las mitocondrias. Por lo tanto, la estrategia de dirigir un ARNm híbrido a la superficie mitocondrial mejora significativamente la viabilidad del enfoque alotópico para genes mitocondriales.

Material y procedimientos:

[0084] **Construcción del plásmido:** el gen mitocondrial *ATP6* de longitud completa fue manipulado de nuevo después de la producción del producto de 677 pb mediante RT-PCR (Superscript III one step RT-PCR Platinum Taq HiFi, Invitrogen), usando ARN total de células HeLa. El producto de PCR obtenido se clonó en el vector PCR 2.1-Topo (Invitrogen, Life technologies). En este vector, se registraron 11 codones no universales en el gen *ATP6* mediante cuatro rondas de mutagénesis *in vitro* (kit Quik change Multi site-directed mutagenesis kit; Stratagene, La Jolla, CA). Se diseñaron seis cebadores oligonucleotídicos para alterar codones AUA a AUG y UGA a UGG (Tabla 1).

Tabla 1: Mutagénesis *in vitro* del gen mitocondrial *ATP6*

Nombre	secuencia	Longitud (pb)
ATP6.1	CAATGGCTAATCAAACCTCAAAACAAATGATGAC CATGCACAACACTAAAGGACGAACCTGGTCTCTTATG CTA (SEQ ID NO: 1)	78
ATP6.2	TCTATGAACCTAGCCATGGCCATCCCTTATGGGCGG GCACAGTGATTATGGGC (SEQ ID NO: 2)	54
ATP6.3	CCCATGCTAGTTATTATCGAAACCATCAGCCTACTCAT TCAACCAATGGCC (SEQ ID NO: 3)	51
ATP6.4	ACCCTAGCAATGTCAACCATTAAAC (SEQ ID NO: 4)	24
ATP6.5	ACTAAAGGACGAACCTGGTCTCTTATGCTAGTATCCTT AATC (SEQ ID NO: 5)	42
ATP6.6	ACACCAACCACCAACTATCTATGAACCTAGCCATGG CCATC (SEQ ID NO: 6)	42

[0085] La construcción intermedia se secuenció para exactitud. A este *ATP6* registrado, se añadió en marco la MTS de *COX10* o *SOD2*, obtenida mediante RT-PCR usando ARN total de células HeLa (Superscript III one step RT-PCR Platinum Taq HiFi; Invitrogen, Life technologies). Para *COX10*, se amplificó la secuencia correspondiente a los primeros 28 aminoácidos, para *SOD2* la secuencia que codifica los primeros 30 aminoácidos. Los cebadores

oligonucleotídicos usados para la amplificación incluyen en su extremo 3' un sitio de restricción de *Sal1* para la posterior clonación en marco con el gen *ATP6* manipulado de nuevo que posee un sitio de restricción de *Sal1* en su extremo 5' (tabla 2).

5 **Tabla 2: Cebadores oligonucleotídicos para análisis por RT-PCR**

Nombre	Cebador 5' (5'-3')	Cebador 3' (5'-3')	Longitud del producto de RT-PCR (pb)
ATP6 ORF	GTCGACCGCATGA ACGAAAATCTGTTC GCTTCATTCATT (SEQ ID NO: 7)	CCGGGCGGCCGCTGT GTTGTCGTGCAGGTA GAGGCTTAC (SEQ ID NO: 8)	677
MTS COX10	CGCTCTAGAATGG CCGCATCTCCGCA CACTCTC (SEQ ID NO: 9)	GCGGTCGACTTCAAG ATACCAGACAGAGCC TCC (SEQ ID NO: 10)	84
3'UTR COX10	CCCGATCGGAGCA CTGGGACGCCCAC CGCCCCCTTCCC (SEQ ID NO: 11)	CGCACGCGTAAAGCT TCTACAAATGTGAAGG CTGTAACA (SEQ ID NO: 12)	1429
MTS SOD2	CGCTCTAGAATGTT GAGCCGGGCAGTG TGCGGC (SEQ ID NO: 13)	GTCGACCGCGTCGGG GAGGCTGTGCTTCTG CCT (SEQ ID NO: 14)	90
3'UTR SOD2	ACCACGATCGTTAT GCTGAGTATGTTAA GCTCTTTA (SEQ ID NO: 15)	CGCACGCGTCAATCA CACAAAGCATTTACTA TTTTC (SEQ ID NO: 16)	215
COX6c	ATGGCTCCCGAAG TTTTGCCAAAACCT (SEQ ID NO: 17)	CTGAAAGATACCAGC CTTCCTCATCTC (SEQ ID NO: 18)	250
SOD2	CGACTACGGCGCC CTGGAACCTCACA TCAACGC (SEQ ID NO: 58)		

[0086] Las secuencias finales de los genes *ATP6* de fusión se comprobaron para exactitud, y se insertaron en el vector pCMV-Tag 4A (Stratagene, La Jolla CA), que dirigirá la síntesis de la proteína mediante el promotor de CMV y su detección mediante la presencia de un marcador epitópico FLAG añadido a la región C-terminal de *Atp6*.

10 Para obtener ARNm híbridos que también contendrán la 3'UTR de los genes *COX10* o *SOD2* se sustituyó la señal poliA de SV40 presente en el vector pCMV-Tag 4A (posiciones 1373-1679) usando enzimas de restricción *Pvu1* y *Mlu1*, por los 1429 pb de la 3'UTR de *COX10* de longitud completa o los 215 pb de la 3'UTR de *SOD2*. Ambas 3'UTR se obtuvieron en primer lugar mediante RT-PCR usando ARN purificados de células HeLa y cebadores oligonucleotídicos específicos que contenían sitios de restricción de *Pvu1* y *Mlu1* en cada extremo (véase la tabla 2

15 anteriormente). Los fragmentos de PCR se clonaron en primer lugar en el vector PCR 2.1-Topo (Invitrogen, Life technologies) y se secuenciaron para verificar que no se generaron errores antes de subclonar en el vector pCMV-Tag 4A. Las cuatro construcciones finales se secuenciaron completamente para exactitud usando cebadores oligonucleotídicos específicos para verificar las secuencias de longitud completa de los genes *ATP6* de fusión o las regiones 3'UTR añadidas a ellos. Las secuencias finales insertadas en los vectores pCMV-Tag 4A se muestran en la

20 figura 1B.

La secuencia de *ATP6* recodificado (SEQ ID NO: 27) se muestra en la figura 9. Las secuencias MTS y 3'UTR de *COX10* y *SOD2* se muestran en la figura 10 (SEQ ID NO: 30; 59; 31; 60).

Cultivo y transfección celulares:

25 **[0087]** Se cultivaron células HeLa con medio RPMI complementado con el 10% de suero fetal bovino (Gibco, Invitrogen), gentamicina (0,01%), glutamina 2 mM, opcionalmente con piruvato (por ejemplo, 2,5 mM), opcionalmente con antibióticos (tales como 100 µ/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin). Éstas se transfectaron con el reactivo de transfección FuGENE 6 según las recomendaciones del fabricante (Roche Biochemicals, Indianápolis). En resumen, células HeLa monocapa se sembraron un día antes de la transfección al

30 50% de confluencia, de modo que al día siguiente estarán a aproximadamente el 80% de confluencia, las células se sembraron en un medio sin antibióticos. Se usaron 2 microgramos de diferentes plásmidos purificados con el kit Quiagen plasmid midi kit (Quiagen; Valencia, CA). Entre 48 y 60 h después, el 80% de las células transfectadas se

usaron para análisis inmunoquímicos o extracciones de ARN y mitocondrias. El 20% de células restantes se seleccionaron para resistencia a neomicina, G418, (marcador seleccionable presente en el vector pCMV-Tag 4A) a una concentración final de 1 mg/ml. Se expandieron clones estables durante varias semanas, se realizaron análisis de inmunohistoquímica. Las mitocondrias también se aislaron para determinar la capacidad de importación de la

5 [0088] **Inmunocitoquímica:** Se colocaron cubreobjetos en el fondo de placas de 24 pocillos y se sembraron células HeLa a aproximadamente el 50% de confluencia (80000 células). 60 horas después de la transfección, las células se fijaron con paraformaldehído al 2% en PBS durante 15 minutos y se procesaron para inmunofluorescencia indirecta. Después de la permeabilización de las células durante 5 minutos con Triton al 1% en PBS, las células se incubaron durante una hora en PBS con BSA al 1% antes de la adición de los anticuerpos primarios: anticuerpos monoclonales de ratón M2 anti-Flag (Stratagene, La Jolla CA) o monoclonales de ratón anti-subunidad beta de ATP sintasa (Molecular Probes, Invitrogen). Ambos anticuerpos se usaron a una concentración final de 1 microgramo/ml. La incubación con anticuerpos primarios se realizó durante 2 h a temperatura ambiente o durante una noche a 4°C. Después de lavar el anticuerpo primario tres veces cinco minutos con PBS, las células se incubaron con el anticuerpo secundario: IgG marcada de cabra anti-ratón Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Invitrogen). Este anticuerpo se usó en BSA al 1%-PBS a dilución a 1:600 y se colocó encima de los cubreobjetos durante dos h. Las células se lavaron, posteriormente, una vez en PBS durante 5 minutos. Para tinción de ADN y de mitocondrias, se realizó un segundo lavado con 0,3 microgramos/ml de DAPI (Sigma, Saint Louis, MI) y 100 nM de colorante MitoTracker Deep Red 633 (Molecular probes, Invitrogen) durante 20 minutos. Se realizó un último lavado de 10 minutos en PBS y los cubreobjetos se montaron usando Gel/Mount de Biomed. La inmunofluorescencia se visualizó en un microscopio digital Leica DM 5000 B. Las imágenes digitales se adquirieron y se procesaron con el software del sistema de imagenología MetaVue.

25 [0089] **Aislamiento de mitocondrias y análisis por transferencia de western:** Entre 20 y 40 millones o 100 millones de células HeLa transfectadas de forma transitoria o de forma estable se trataron con tripsina (Gifco, Invitrogen) durante 5 minutos y se centrifugaron. Se realizó un lavado en PBS. Los sedimentos se resuspendieron en 10 ml de tampón de homogeneización: 0,6 Manitol, Tris-HCl 30 mM PH 7,6, MgAc 5 mM y KCl 100 mM, albúmina de suero bovino libre de ácidos grasos (BSA) al 0,1%, beta-mercaptoetanol 5 mM y PMFS 1 mM. A las células resuspendidas se añadió el 0,01% de digitonina. Después de una incubación de 4 minutos en hielo la homogeneización se realizó con 15 golpes en un homogeneizador de vidrio Dounce con una mano de mortero accionada manualmente de tipo B. Los homogenizados se centrifugan durante 8 minutos a 1000 g a 4°C para sedimentar las células sin romper y los núcleos. Dado que muchas mitocondrias permanecen atrapadas en este sedimento, éste se resuspendió y se rehomoogeneizó de nuevo con 5 ml de tampón de homogeneización y 25 golpes adicionales. A continuación, se realizó una segunda ronda de centrifugación en las mismas condiciones. Ambos sobrenadantes se ensamblaron y se centrifugaron de nuevo para desechar cualquier contaminante nuclear o celular. El sobrenadante obtenido se centrifugó a 12000 g a 4°C durante 30 minutos para sedimentar mitocondrias. Se realizaron cuatro lavados en tampón de homogeneización para liberar la fracción mitocondrial de partículas que contienen membranas, retículo endoplasmático y proteasas. Los dos últimos lavados se realizaron en un tampón de homogeneización desprovisto de BSA y PMFS para permitir una mejor estimación de la concentración de proteínas en la fracción mitocondrial final y su posterior análisis mediante digestión con proteinasa K. Las concentraciones de proteínas en los extractos se midieron usando en ensayo de unión a colorante de Bradford. Para determinar si Atp6 estaba translocada en el interior del orgánulo, 15 microgramos de proteínas mitocondriales se trataron con 200 microgramos/ml de proteinasa K (PK) a 0°C durante 30 minutos. Las muestras se resolvieron a continuación en un gradiente 4-12 o SDS-PAGE con poliacrilamida al 12%, y se transfirieron a nitrocelulosa. Los filtros se sondearon con los siguientes anticuerpos: anticuerpos monoclonales de ratón M2 anti-Flag (Stratagene, La Jolla CA) que reconoce la proteína nuclear Atp6 recodificada en la que un epítipo flag se añadió en su extremo C o monoclonal de ratón anti-subunidad alfa de ATP sintasa (Molecular Probes, Invitrogen), que reconoce la subunidad alfa codificada en el núcleo de 65 kDa de la ATP sintasa, Complejo V. Las bandas inmunorreactivas se visualizaron con anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano picante (1:10000) seguido por detección con ECL Plus (Amersham International) según las instrucciones del fabricante.

Se realizaron cinco purificaciones mitocondrias independientes de células transfectadas de forma estable con vectores *SOD2^{MTS} ATP6-3'UTR^{SV40}* o *SOD2^{MTS} ATP6- 3UTR^{SOD2}*. La cantidad de formas precursora y madura de ATP6 en mitocondrias, así como las cantidades de tanto la forma madura de ATP6 como ATP $\square$ resistente a proteólisis por PK se compararon mediante análisis densitométricos (Quantity One, Biorad software system). La significación de las diferencias observadas se validó con una prueba de la t de Student con datos emparejados.

Extracción de ARN y análisis por RT-PCR:

- [0090]** Las extracciones de mitocondrias se realizaron tal como se ha descrito en la sección anterior, con las siguientes modificaciones: 400 millones de células se trataron con 250 µg/ml de cicloheximida durante 20 minutos a 37°C. A HB se le añadieron 200 mg/ml de cicloheximida, 500 µg/ml de heparina y 1/1000 de inhibidor de ARNasa (rRNasin, Promega). El último sedimento de mitocondrias impuras asociado con polisomas (M-P) se almacenó a -80°C hasta la extracción del ARN. Liposomas citoplasmáticos libres (F-P) se obtuvieron de la fracción sobrenadante post-mitocondrial mediante sedimentación a través de un gradiente por etapas de sacarosa 2 M y 0,5 M. Los ARN de estas dos fracciones, así como los ARN totales de cada línea celular transfectada de forma estable, se obtuvieron usando el kit RNeasy Protect Mini kit (Qiagen). Generalmente, 10 millones de células son suficientes para obtener aproximadamente 30 microgramos de ARN total. La presencia del ARNm de *ATP6* híbrido se examinó usando cebadores que reconocen los primeros 27 nt de MTS de *COX10* o *SOD2* y un cebador que reconoce los últimos 27 nt del ORF de *ATP6*. Para el vector pCMV-Tag 4A que contiene tanto la MTS como la 3'UTR de *COX10* o *SOD2*, se usó un cebador que reconoce los últimos 27 nt de cada 3'UTR. 100 ng de ARN se usaron para transcripción inversa (véase la tabla 1 anterior). Los productos se sometieron a continuación a 25 ciclos de PCR usando el kit Superscript III one step RT-PCR Platinum Taq kit (Invitrogen). Como control interno, un fragmento de 250 nt dentro del ORF del gen *COX6c*, que codifica una proteína mitocondrial, también se amplificó. El diez por ciento de los productos amplificados se migraron en geles de agarosa, y las cantidades de productos amplificados que reflejan la cantidad de ARNm de *ATP6* híbrido en cada preparación se estimó usando el software Photocap (Vilber Lourmat; Torcy, Francia).
- Las tablas 1 y 2 anteriores, y la tabla 9 a continuación, muestran secuencias de cebadores, los tamaños esperados de los productos de PCR, la cantidad de ARN usada para transcripción inversa y el número de ciclos de PCR realizados.
- Se realizaron análisis densitométricos (Quantity One, Bio-Rad software) de la cantidad de transcritos de tanto *ATP6* como *SOD2* híbridos en polisomas unidos a la mitocondria o polisomas citoplasmáticos libres. Las preparaciones de ARN independientes a partir de fracciones de M-P y F-P se sometieron tres veces a análisis por RT-PCR.

Tabla 9:

ARNm	Longitud del producto de RT-PCR (pb)	Cebadores		ARN totales		ARN polisomal (M-P/F-P)	
		Cebador 5'	Cebador 3'	Cantidad (ng)	Número de ciclos	Cantidad (ng)	Número de ciclos
<i>SOD2</i> ^{MTS} <i>ATP6</i>	780	MTS <i>SOD2</i> 5'	<i>ATP6</i> ORF3'	200	28	250	28
<i>ATP6</i>	677	<i>ATP6</i> ORF 5'	<i>ATP6</i> ORF 3'	50	28	150	20
<i>SOD2</i>	785	<i>SOD2</i> 5'	3'UTR <i>SOD2</i> 3'	100	28	20	20
<i>COX6c</i>	250	<i>COX6c</i> 5'	<i>COX6c</i> 3'	200	28	250	20

Resultados:

Construcción del gen *ATP6* mitocondrial manipulado de nuevo para expresión alotópica

- [0091]** Para conseguir la expresión alotópica, se sintetizó la versión de longitud completa del gen mitocondrial *ATP6* codificado en el núcleo, convirtiendo los codones AUA en AUG y los codones UGA en UGG. De hecho, AUA en el sistema genético mitocondrial causa la inserción de una metionina, pero según el código universal, es una isoleucina. Adicionalmente, UGA en las mitocondrias codifica un triptófano, mientras que en el citosol representa un codón de terminación. Se recodificaron, por lo tanto, los 11 codones mitocondriales presentes en *ATP6* garantizando la traducción exacta del transcrito mediante ribosomas citoplasmáticos. Estas alteraciones se realizaron mediante cuatro rondas de mutagénesis *in vitro* usando seis cebadores oligonucleotídicos independientes (tabla 1) y el kit Quik change Multi site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA).

- El concepto de enfoque alotópico tiene importantes implicaciones para el desarrollo de terapias para pacientes con mutaciones del ADN mitocondrial. Sin embargo, hasta hoy un obstáculo fundamental sigue por superar y es el direccionamiento de la proteína recodificada a las mitocondrias. Se decidió entonces forzar la localización del ARNm de *ATP6* recodificado en la superficie mitocondrial. La base lógica detrás de este direccionamiento de ARNm

específico es permitir un mecanismo de importación co-traducciona que mantendrá al precursor en una conformación competente para importación que impide su agregación antes de o durante la translocación a través de los complejos de importación TOM (Translocasa de la membrana externa) y TIM (Translocasas de la membrana interna). Se cree que dos secuencias dentro de los ARNm están implicadas en su localización en la membrana mitocondrial: la secuencia que codifica la MTS y la 3'UTR. Se seleccionaron dos genes mitocondriales codificados en el núcleo, ARNm que están preferentemente localizados en la superficie de mitocondrias en células HeLa: *COX10* y *SOD2* [5]. Curiosamente, el ARNm de *SOD2* ha mostrado estar asociado a la superficie mitocondrial mediante su 3'UTR y la proteína Akap121.

10 Se obtuvieron por lo tanto, cuatro plásmidos diferentes.

Dos contienen la MTS de *COX10* o la secuencia que codifica los primeros 30 aminoácidos de *SOD2* (= los 20 aminoácidos de la secuencia MTS de *SOD2*, y los diez aminoácidos consecutivos que siguen dentro de la secuencia *SOD2*, es decir, el fragmento 1-30 de la SEQ ID NO: 49), en marco con el codón AUG del *ATP6* recodificado (MTS de *COX10* - *ATP6* recodificado - 3' UTR de SV40; MTS de *SOD2* - *ATP6* recodificado - 3' UTR de SV40). En estos plásmidos, la señal poliA de SV40 funciona como la 3'UTR.

Los otros dos combinan tanto la MTS como la 3'UTR de *COX10* y *SOD2* respectivamente, y no comprenden la 3'UTR citosólica de SV40 (MTS de *COX10* - *ATP6* recodificado - 3' UTR de *COX10*; MTS de *SOD2* - *ATP6* recodificado - 3' UTR de *SOD2*). Las figuras 1A y 1B ilustran las construcciones obtenidas y las secuencias de longitud completa insertadas en el vector pCMV-Tag 4A que denominamos respectivamente: *COX10 MTS-nATP6*, *SOD2 MTS-nATP6* y *COX10 MTS-nATP6-COX10 3'UTR* y *SOD2 MTS-nATP6-SOD2 3'UTR*.

Detección de ARNm de *ATP6* híbridos en células HeLa transfectadas de forma transitoria y de forma estable

25 [0092] Para determinar si las células transfectadas expresan ARNm de *ATP6* híbridos, se midieron niveles en situación de equilibrio de los transcritos en células transfectadas tanto de forma transitoria como de forma estable después del aislamiento de ARN totales. 100 ng de ARN totales se sometieron a análisis por RT-PCR usando oligonucleótidos cebadores específicos para ARNm de *ATP6* híbrido. El gen *COX6c* que codifica una proteína mitocondrial se usó como control interno, con cebadores específicos permitían la amplificación de un fragmento de 250 pb (figura 2). Los ARN de células HeLa no transfectadas así como células HeLa transfectadas con el vector pCMV-Tag 4A vacío se pusieron también a prueba como controles negativos. La figura 2 muestra un producto de PCR de 780 pb correspondiente a la amplificación de los primeros 27 nt del ORF de *COX10* y los últimos 27 nt del ORF de *ATP6* en células transfectadas con los vectores tanto *COX10 MTS-nATP6* como *COX10 MTS-nATP6-COX10 3'UTR*. Adicionalmente, ARN aislados de células transfectadas con el vector *COX10 MTS-nATP6-COX10 3'UTR* amplificaban un producto de 2374 pb correspondiente a todo el ORF de *ATP6* y la 3'UTR de *COX10* de longitud completa.

[0093] Los resultados obtenidos con ARN purificados a partir de células transfectadas con los vectores *SOD2 MTS-nATP6* y *SOD2 MTS-nATP6-SOD2 3'UTR* muestran que el transcrito de *ATP6* híbrido se detectó como un producto amplificado de 780 nt. Además, la región de *SOD2 MTS-nATP6-SOD2 3'UTR* amplificaba un fragmento de 1060 pb, correspondiente a todo el ORF de *ATP6* y la 3'UTR de *SOD2* de longitud completa. Estos resultados indican que las células HeLa expresan el gen *ATP6* manipulado de nuevo. Además, no se descubrieron diferencias significativas en los niveles en estado de equilibrio de ARNm híbridos mediante la adición de la 3'UTR de *COX10* o la 3'UTR de *SOD2*.

[0094] Para examinar la capacidad de señales de *SOD2* asociadas con el gen *ATP6* recodificado para dirigir ARNm híbridos a la superficie mitocondrial, se determinó su localización subcelular en las cuatro líneas celulares de forma estable obtenidas. Con este propósito, se aislaron ARN de polisomas unidos a la mitocondria (M-P) y polisomas citoplasmáticos libres (F-P) y se determinaron por RT-PCR los niveles en estado de equilibrio de ARNm híbridos en ambas poblaciones polisomales (figura 12B). Como controles internos, se determinó la distribución subcelular de ARNm de *ATP6*, *SOD2* y *COX6c* mitocondriales endógenos. El ARNm de *ATP6* endógeno se localizaba exclusivamente en el compartimento mitocondrial tal como se esperaba. Además, el ARNm de *SOD2* endógeno está enriquecido en polisomas unidos a la mitocondria (M-P), mientras que el ARNm de *COX6c* es preferentemente detectado en polisomas citoplasmáticos libres (F-P) tal como se ha observado previamente. El vector *SOD2MTSATP6-3'UTRSOD2* dirigía la síntesis de un ARNm híbrido que era casi indetectable en polisomas citoplasmáticos libres. El ARNm híbrido producido a partir del plásmido *SOD2MTSATP6-3'UTRSV40* se detectó también preferentemente en polisomas unidos a la mitocondria. Sin embargo, también estaba presente en polisomas citoplasmáticos libres (figura 12B). Se realizaron análisis densitométricos para determinar la cantidad de ARNm tanto

de SOD2 endógenos como de ATP6 híbridos en cada población polisomal examinada. La señal del ARNm de SOD2 en polisomas unidos a la mitocondria era el $85,6\% \pm 6,15$ en líneas celulares que expresan el plásmido SOD2MTSATP6-3'UTRSV40 y el $82,5\% \pm 4,87$ en células que expresan el vector SOD2MTSATP6-3'UTRSOD2. Curiosamente, se descubrió para el ARNm híbrido de ATP6 que solamente el $72,4\% \pm 5,2$ se localizaba en la superficie mitocondrial en células que expresan el vector SOD2MTSATP6-3'UTRSV40. En su lugar, en células que expresan el vector SOD2MTSATP6-3'UTRSOD2, el $84,6\% \pm 4,7$ del ARNm híbrido se localizaba en la superficie mitocondrial (figura 12C). Estos valores eran significativamente diferentes según la prueba de la t de Student para datos emparejados ($P < 0,0034$, $n=6$). Por lo tanto, la combinación de tanto la MTS como la 3'UTR de SOD2 con el gen ATP6 manipulado de nuevo causa la síntesis en el núcleo de un transcrito que era casi exclusivamente distribuido en la superficie mitocondrial. De hecho, su distribución subcelular no es significativamente diferente de la del ARNm de SOD2 endógeno.

Tabla 10:

Células HeLa	Señal de ARNm de ATP6 localizada en la superficie mitocondrial	ARNm de ATP6 dentro de la mitocondria
Con una 3'UTR citosólica (3' UTR de SV40)	$72,4\% \pm 5$	$0,71 \pm 0,12$
Con una 3'UTR mitocondrial (3'UTR de SOD2), y sin 3'UTR citosólica alguna	$82,5 \pm 4,8$	$1,28 \pm 0,24$

15 Detección de la expresión alotópica de ATP6 en células HeLa mediante inmunofluorescencia indirecta

[0095] Se analizó la capacidad del producto de ATP6 manipulado de nuevo para localizarse en mitocondrias *in vivo*.

Para esto, se añadió un epítipo Flag en marco al extremo C del ORF de ATP6 y se examinaron células transfectadas de forma estable mediante inmunofluorescencia indirecta (figura 13). Células HeLa transfectadas con el vector pCMV-Tag 4A vacío se usaron como controles negativos y mostraban una señal difusa baja en el citoplasma cuando se usaron anticuerpos para Flag (figura 13, panel izquierdo). Células transfectadas de forma estable con vectores SOD2^{MTS} ATP6-3UTR^{SV40} o SOD2^{MTS} ATP6-3'UTR^{SOD2} se visualizaron mediante inmunofluorescencia indirecta usando anticuerpos para Flag (figura 14, panel derecho) y para la subunidad α de ATP sintasa (figura 13 panel medio). Para cada tipo de célula visualizado, una imagen fusionada en asociación con tinción con DAPI se muestra en el panel derecho. Un patrón mitocondrial punteado típico se observó en células que expresan los polipéptidos de ATP6 recodificado, cuando se usó el anticuerpo para Flag. Esto indica que las proteínas de ATP6 de fusión se localizaban en las mitocondrias.

La inmunohistoquímica para detectar el epítipo flag en células HeLa transfectadas de forma transitoria o estable con los cuatro vectores pCMV-Tag 4A mostraba un patrón mitocondrial punteado típico, que sugiere que la proteína Atp6 de fusión había estado localizada dentro de las mitocondrias (figura 3). De hecho, esta patrón mitocondrial punteado típico también se observó usando el colorante específico de la mitocondria Mito Tracker Red o anticuerpos específicos anti-subunidad beta de ATP sintasa. Células HeLa transfectadas con el vector pCMV-Tag 4A vacío se usaron como controles negativos y mostraban una distribución citoplasmática difusa pero con una intensidad baja (figura 3). Los patrones de localización de los diferentes péptidos de Atp6 cuyas síntesis fueron dirigidos por los cuatro vectores pCMV-Tag 4A eran esencialmente idénticos confirmando que las secuencias tanto de COX10 como de SOD2 permitían con éxito que la proteína Atp6 manipulada de nuevo se localice en las mitocondrias *in vivo*.

Translocación de la proteína Atp6 de fusión al interior de las mitocondrias de células HeLa

[0096] Para determinar si los productos del gen ATP6 manipulado de nuevo son importados de forma eficiente al interior de mitocondrias *in vivo*, mitocondrias aisladas de células HeLa transfectadas de forma estable se sometieron a análisis por transferencia de western (figura 4). Se visualizaron dos formas con anticuerpos anti-flag de aproximadamente 30 y 20 kDa, que representan las formas precursora y madura de la proteína de ATP6 recodificada.

Los pesos moleculares predichos de ambas proteínas son respectivamente 34 y 30 kDa, mayores que los insinuados por los marcadores de peso molecular. Esta discrepancia se ha observado a menudo cuando proteínas extremadamente hidrófobas se migraron en SDS-PAGE. En general, la movilidad electroforética en SDS-PAGE de proteínas codificadas por ADNmt es mayor que la esperada para sus pesos moleculares teóricos.

Los niveles en estado de equilibrio de ambos polipéptidos son similares en las dos líneas celulares examinadas: células transfectadas con el vector MTS *COX10-nATP6* (MTS *COX10-nATP6*), y células transfectadas con MTS *COX90-nATP6-COX10 3'UTR* (MTS *COX10-nATP6-3'UTR*).

5

Para determinar las cantidades de los polipéptidos ATP6 recodificados producidos en células HeLa que expresan vectores *SOD2^{MTS} ATP6-3'UTR^{SV40}* o *SOD2^{MTS} ATP6- 3'UTR^{SOD2}*, se compararon seis extracciones mitocondriales independientes (figura 14A). Polipéptidos tanto precursores como maduros fueron igualmente abundantes en mitocondrias de cada línea celular, de hecho la expresión del vector *SOD2^{MTS} ATP6-3'UTR^{SV40}* causa una acumulación del $61,4\% \pm 6$ de la forma precursora. En su lugar, el vector *SOD2^{MTS} ATP6- 3'UTR^{SOD2}* dirigía la síntesis del $64,4\% \pm 6,5$ del precursor. Estos valores no fueron significativamente diferentes según la prueba de la t de Student para datos emparejados. Se obtuvieron resultados similares cuando se examinaron extractos totales de cada línea celular mediante inmunofluorescencia indirecta (figura 3), sino que también fue translocado eficientemente al interior del orgánulo y procesado correctamente. Además, la figura 4 muestra que la cantidad de la forma madura de la proteína Atp6 y la proteína ATPalfa de 65 kDa dentro de las mitocondrias eran bastante similares después de la digestión con proteinasa K. Por lo tanto, el uso de MTS de *COX10* permite una eficiente translocación mitocondrial de la proteína de ATP6 recodificada, y cuando se combina MTS de *COX10* con la 3'UTR de *COX10*, se obtiene una traducción/importación *in vivo* significativa más eficiente del ATP6 expresado de forma alotópica.

20

[0097] Cuando se trataron mitocondrias con 150 o 200 microgramos/ml de proteinasa K (PK) las formas precursoras de la proteína ATP6 de fusión eran sensibles a la proteólisis en ambas líneas celulares. En contraste, la forma madura de ATP6 es resistente a digestión por PK, especialmente en células que expresan el transcrito MTS *COX10-nATP6-COX10 3'UTR*. De hecho, en estas células la cantidad de la proteína ATP6 madura es aproximadamente el 185% mayor que en células que expresan el ARNm de MTS *COX10-nATP6*. Estos datos indican fuertemente que no solamente el polipéptido precursor está dirigido correctamente a la superficie de mitocondrias, tal como se observa mediante inmunofluorescencia indirecta (figura 3), sino que también fue translocado eficientemente al interior del orgánulo y procesado correctamente. Además, la figura 4 muestra que la cantidad de la forma madura de la proteína Atp6 y la proteína ATPalfa de 65 kDa dentro de las mitocondrias eran bastante similares después de la digestión con proteinasa K. Por lo tanto, el uso de MTS de *COX10* permite una eficiente translocación mitocondrial de la proteína de ATP6 recodificada, y cuando se combina MTS de *COX10* con la 3'UTR de *COX10*, se obtiene una traducción/importación *in vivo* significativa más eficiente del ATP6 expresado de forma alotópica.

El panel superior de la figura 14B muestra una representación esquemática del intermedio de importación de ATP6 esperado teóricamente. El precursor de ATP6 pasajero hidrófobo puede quedar atrapado de camino hacia la matriz y una peptidasa de procesamiento mitocondrial puede escindir la MTS. No obstante, el resto de la proteína seguía siendo accesible a la acción de PK y, por lo tanto, se volvía indetectable en transferencia de Western. En su lugar, la fracción de la proteína de ATP6 que puede ser completamente translocada es insensible a proteólisis inducida por PK y puede integrarse, por lo tanto, en la membrana mitocondrial interna, por tanto, permaneciendo detectable en inmunotransferencia.

La figura 14B muestra que las formas precursoras de las proteínas de fusión eran sensibles a proteólisis en ambas líneas celulares examinadas. Casi toda la señal del precursor de ATP6 desaparecía después de la digestión con PK, así que los precursores que estaban implicados en el proceso de translocación o unidos libremente a la membrana mitocondrial externa pero no translocados completamente, fueron enteramente digeridos (figura 14B, panel medio). En contraste, una cantidad significativa de la forma madura de ATP6 es resistente a la digestión por PK, indicando su ubicación dentro del orgánulo. Para examinar los niveles de otras proteínas del complejo V en estas células, se realizaron inmunotransferencias usando anticuerpo anti-ATP sintasa α . Esta proteína mitocondrial importada de forma natural estaba presente en medidas similares en todas las células puestas a prueba. Solamente una banda de aproximadamente 65 kDa se visualizó, lo que sugería que no se pudieron discriminar las formas precursora y madura de esta proteína en las condiciones electroforéticas usadas o los polipéptidos precursores eran translocados de forma muy rápida y eficiente. Adicionalmente, no se detectaron diferencias fundamentales de las señales de ATP sintasa α después del tratamiento con PK, confirmando la integridad de los aislamientos mitocondriales (figura 14B, panel medio). Para comparar la eficiencia de importación de las proteínas de ATP6 recodificadas en células transfectadas con vectores *SOD2^{MTS} ATP6-3'UTR^{SV40}* o *SOD2^{MTS} ATP6- 3'UTR^{SOD2}*, se midió la cantidad de la forma madura de ATP6 insensible a la digestión por PK en cada línea celular, después de la normalización con la cantidad de ATP sintasa α resistente a proteólisis con PK. Los resultados para seis extracciones mitocondriales independientes sometidas a análisis por inmunotransferencia se mostraron en la figura 15B, panel inferior. Los

resultados globales muestran que ambas señales de *SOD2* causan una importación muy eficiente del precursor de ATP6 recodificado. De forma destacable, el nivel de la forma madura insensible a proteólisis por PK en células transfectadas con *SOD2^{MTS} ATP6-3'UTR^{SOD2}* ($1,28 \pm 0,24$) era 1,8 veces superior que en células que expresan el *SOD2^{MTS} ATP6-3'UTR^{SV40}* ($0,71 \pm 0,12$). La diferencia medida era significativa según la prueba de la t de Student para datos emparejados ($P < 0,0022$, $n = 6$). Esta observación podría estar relacionada con el mayor enriquecimiento en los polisomas unidos a la mitocondria del ARNm correspondiente (figura 12B). Surge la pregunta de si proteínas de ATP6 manipuladas de nuevo importadas se ensamblaban en el complejo de ATP sintasa. El complejo está organizado en dominios F0-F1, el sector F1 es una unidad soluble en agua ubicada en la matriz y que tiene la capacidad de hidrolizar ATP. El dominio F0 está embebido en la membrana interna y está compuesto por subunidades hidrófobas que forman una vía para protones. ATP6 es una proteína intrínseca de F0, compuesta por cinco supuestas hélices α transmembranas. En contraste, la ATP sintasa α está ubicada en el dominio F1 de la matriz. Estudios realizados con mitocondrias de corazón bovino demostraron que ATP6 se degradaba a una velocidad muy lenta cuando las subunidades F0 se sometieron a tratamiento con tripsina. Por lo tanto, se trataron mitocondrias tanto con PK como con Triton X-100 (1%). El detergente altera ambas membranas mitocondriales y teóricamente causa la proteólisis completa de proteínas mitocondriales, demostrando su localización en algún lugar dentro del orgánulo en una forma sensible a proteasa. La figura 3C muestra que, de hecho, la ATP sintasa α era digerida completamente por PK; en su lugar una cantidad significativa de ATP6 seguía siendo insensible a proteólisis por PK. Este resultado sugiere que la ATP6 recodificada se ensamblaba en el complejo V.

20 **Discusión:**

[0098] Recientes estudios epidemiológicos demostraron que como grupo, los trastornos de la función mitocondrial afectan a al menos 1 de cada 5000 miembros de la población, situándolos entre los trastornos determinados genéticamente más comunes. A pesar de que durante la última década, las bases genéticas subyacentes de varias enfermedades mitocondriales que implican degeneración del sistema nervioso central, no está disponible ninguna terapia eficaz para trastornos mitocondriales. Mutaciones puntuales patógenas de genes codificados por el genoma mitocondrial han sido descritas como la causa de muchos trastornos mitocondriales. Un posible enfoque terapéutico es, por lo tanto, aprovechar la vía natural de importación de proteínas mitocondriales. El concepto básico es introducir una copia de tipo silvestre del gen mitocondrial mutado en el núcleo e importar copias normales del producto génico al interior de las mitocondrias desde el citosol. Este concepto se ha denominado expresión alotópica y varios informes en levadura describieron que una serie de polipéptidos no mitocondriales pueden ser reubicados en la matriz mitocondrial simplemente conjugando una secuencia de direccionamiento con su extremo N. Sin embargo, cuando este enfoque se ha probado en células de mamífero usando diferentes MTS y genes codificados por ADNmt, los precursores no fueron importados eficientemente al interior de las mitocondrias. En consecuencia, el rescate de un defecto mitocondrial en células de pacientes era no solamente parcial sino también temporal [7]. Por lo tanto, hasta hoy el espectro de polipéptidos codificados por ADNmt que pueden expresarse e integrarse con éxito en complejos de la cadena respiratoria mitocondrial es muy limitado. Se cree que esta limitación es la consecuencia de la naturaleza de elevada hidrofobicidad de las proteínas codificadas por ADNmt, que poseen dominios transmembrana refractivos a la importación mitocondrial. El precursor sintetizado en el citosol podría carecer de la estructura competente para importación requerida para una translocación en la membrana mitocondrial eficiente.

Es probable que el concepto de mesohidrofobicidad sea un importante factor para la competencia en importación mitocondrial. La mesohidrofobicidad describe la hidrofobicidad promedio en una ventana de 60-80 aminoácidos, junto con el cálculo del segmento de 17 aminoácidos más hidrófobo. Este cálculo podría predecir la importabilidad de péptidos hidrófobos. Usando su algoritmo, se analizó esta correlación para evaluar la importabilidad mitocondrial del producto génico *SOD2^{MTS}ATP6* y se comparó con polipéptidos ATP6, COX8 y *SOD2* así como la proteína de fusión puesta a prueba previamente *COX8^{MTS}ATP6*: como ATP6 de tipo silvestre, ambas proteínas de fusión examinadas no pueden translocarse al interior de mitocondrias, principalmente debido a la elevada hidrofobicidad de ATP6. Por lo tanto, una posibilidad que puede permitir la importación de una proteína ATP6 recodificada al interior del orgánulo es que el precursor esté implicado en una vía co-traducciona de importación. De este modo, el precursor se mantendría en una conformación no agregada plegada de forma libre requerida para translocación a través del aparato de importación mitocondrial.

Para superar esta limitación e intentar desarrollar un rescate más duradero y definitivo de mutaciones del ADNmt mediante expresión alotópica que conduzca a su aplicación en terapia génica, se decidió construir versiones nucleares del gen *ATP6* codificado por el ADNmt en las que se añadieron las señales destinadas a forzar al ARNm híbrido a localizarse en la superficie mitocondrial. Se seleccionaron los genes *COX10* y *SOD2*, cuyos transcritos están enriquecidos en la superficie mitocondrial.

Se pudo demostrar que la asociación a un gen *ATP6* recodificado de las señales tanto MTS como 3'UTR que causa un suministro de ARNm en la superficie mitocondrial mejora de forma inequívoca la viabilidad del enfoque alotópico para genes mitocondriales. De hecho, no solamente se pudo visualizar la proteína en las mitocondrias mediante inmunofluorescencia indirecta sino, y lo más importante, que las cantidades del polipéptido Atp6 procesado dentro del orgánulo eran bastante similares a la proteína *ATP6* importada de forma natural. Este resultado indica fuertemente que el precursor de Atp6 recodificado era importado eficientemente, la mejora que se pudo producir en comparación con otros informes recientes [1], [2], [3], [4] se debe ciertamente a que el ARNm híbrido era dirigido a la superficie mitocondrial, mejorando por lo tanto el acoplamiento entre los procesos de traducción e importación mitocondrial.

De la forma más curiosa, se obtuvo una mejora gradual, de hecho el uso de MTS de *COX10* o *SOD2* en solitario, dio un buen resultado en el que aproximadamente el 50% de la proteína *ATP6* madura es translocado dentro de las mitocondrias. Cuando cada MTS se combinó con la 3'UTR correspondiente, al menos el 85% de la proteína *ATP6* madura es insensible a la digestión por proteinasa K, indicando que casi toda la proteína sintetizada en el citoplasma es translocada con éxito dentro de las mitocondrias.

Para conseguir la expresión alotópica, la localización de un ARNm en la superficie mitocondrial no se ha intentado nunca antes. En los enfoques alotópicos notificados, incluso aunque se añadieron diferentes MTS a genes mitocondriales recodificados, todas las construcciones examinadas contenían en sus extremos 3' la señal políA de SV40 que no causa ninguna localización subcelular específica del transcrito. Los datos demuestran claramente que la asociación a un gen *ATP6* recodificado de las señales de tanto MTS como 3'UTR del gen *SOD2* causa un suministro altamente eficiente del ARNm híbrido a la superficie mitocondrial. Esto mejora inequívocamente la viabilidad del enfoque alotópico para este gen mitocondrial. De hecho, no solamente se pudo visualizar la proteína *ATP6* en las mitocondrias mediante inmunofluorescencia indirecta sino que definitivamente la cantidad del polipéptido *ATP6* procesado dentro del orgánulo era bastante similar a la subunidad α de ATP sintasa importada de forma natural, un componente del Complejo V, tal como es *ATP6*. Estos datos indican fuertemente que los precursores de *ATP6* recodificados fueron importados con éxito. La mejora que se obtuvo en comparación con un informe reciente, que midió el 18,5% del precursor translocado, se debe ciertamente a la localización de ARNm híbridos en la superficie mitocondrial. Esta localización específica obviamente mejora el acoplamiento entre los procesos de traducción e importación, por lo tanto, disminuyendo el bloqueo del precursor durante su translocación a través de los complejos TOM y TIM. Cabe mencionar que se obtuvo una mejora gradual en la importación mitocondrial del precursor de *ATP6*. Cuanto tanto la MTS como la 3'UTR de *SOD2* se combinaron, la cantidad de proteína *ATP6* completamente translocada era 1,8 veces mayor que cuando solamente la MTS estaba presente. Esto está probablemente relacionado con la mejora de la distribución de ARNm en la superficie mitocondrial cuando ambos elementos que actúan en cis de *SOD2* se asociaron al gen *ATP6* recodificado. De manera destacable, la insensibilidad a la proteólisis de la proteína *ATP6* translocada en presencia de tanto PK como Triton X-100 sugería que la proteína podría ensamblarse correctamente en el dominio F0 del Complejo V de la cadena respiratoria. En particular, combinando los elementos que actúan en cis del gen *COX10* con el gen *ATP6* recodificado, se obtuvo una muy eficiente capacidad de importación mitocondrial de la proteína de fusión. De hecho, el ARNm de *COX10* codifica una proteína altamente hidrófoba implicada en la biogénesis del Complejo IV, y el ARNm de *SOD2* está enriquecido en la superficie mitocondrial en células humanas.

Se demostró claramente que la asociación a un gen *ATP6* recodificado de las señales tanto de MTS como de 3'UTR de los genes *SOD2* o *COX10* causa un suministro altamente eficiente de ARNm de *ATP6* híbridos a la superficie mitocondrial, especialmente cuando tanto la MTS como la 3'UTR de *SOD2* o *COX10* se asociaron al gen *ATP6* manipulado de nuevo. Esta localización subcelular específica de ARNm híbridos causa una elevada eficiencia en la translocación mitocondrial de las proteínas *ATP6* recodificadas. De manera destacable, cuando tanto la MTS como la 3'UTR de *SOD2* o *COX10* se combinaron, la cantidad de proteína *ATP6* translocada completamente era 1,8 veces más alta que cuando la MTS estaba asociada a la 3'UTR de SV40 citosólica. Por lo tanto, la mejora de la distribución de ARNm en la superficie mitocondrial cuando ambos elementos que actúan en cis de *SOD2* o *COX10* estaban asociados al gen *ATP6* recodificado incrementa definitivamente la cantidad del polipéptido *ATP6* procesado dentro del orgánulo que se volvió bastante similar a la subunidad α de ATP sintasa importada de forma natural, un componente del Complejo V, tal como es *ATP6*. Por lo tanto, dirigiendo un ARNm híbrido a la superficie mitocondrial se mejoró significativamente la viabilidad del enfoque alotópico para el gen mitocondrial *ATP6*.

En conclusión, se optimiza el enfoque de expresión alotópica para *ATP6*, mediante el uso de señales de direccionamiento de ARNm sin ningún cambio de aminoácidos en la proteína que pudiera afectar a la actividad biológica.

Este enfoque se vuelve en adelante disponible para rescatar deficiencias mitocondriales causadas por mutaciones en genes del ADNmt.

5 **EJEMPLO 2: Correcta localización mitocondrial de los genes *ND1* y *ND4* mitocondriales recodificados en fibroblastos de pacientes de NOHL**

[0099] Las tres mutaciones patógenas más habituales procedentes de NOHL afectan a los genes *ND1*, *ND4* y *ND6* del complejo I con el doble efecto de rebajar la síntesis de ATP e incrementar el estrés oxidativo de forma crónica.

Dado que se ha demostrado que las proteínas Atp6 mitocondriales manipuladas de nuevo eran translocadas con éxito dentro de las mitocondrias en células HeLa (véase el ejemplo 1 anteriormente), se decidió sintetizar genes mitocondriales recodificados *ND1* y *ND4*. Para garantizar la eficiente importación de las proteínas expresadas alotópicamente, se les añadieron señales que dirigirán los ARNm correspondientes a la superficie mitocondrial. Se decidió usar la MTS del gen *COX10* en solitario o en combinación con su 3'UTR completa. Las figuras 5A y 5B ilustran las construcciones obtenidas y las secuencias de longitud completa insertadas en el vector pCMV-Tag 4A.

Material y procedimientos:

[0100] Cultivo y transfección celulares: Se obtuvieron fibroblastos de pacientes de NOHL del Hôpital Necker Enfants Malades, París, Francia (Département de Génétique). Se cultivaron estas células con medio D-MEM complementado con el 10% de suero fetal bovino, piruvato, gentamicina (0,01%) y glutamina 2 mM. Cuando se indicaba, las células se cultivaron en medio libre de glucosa suplementado con galactosa 10 mM.

Los fibroblastos se transfectaron con reactivo de transfección FuGENE 6 según las recomendaciones del fabricante (Roche Biochemicals, Indianápolis). En resumen, células de fibroblastos en monocapa se sembraron un día antes de la transfección al 50% de confluencia, de modo que al día siguiente estarán a aproximadamente el 80% de confluencia, las células se colocaron en un medio sin antibióticos. Se usaron 2 microgramos de diferentes plásmidos purificados con el kit Quiagen plasmid midi kit (Quiagen; Valencia, CA). Entre 48 y 60 h más tarde, el 80% de las células transfectadas se usaron para análisis por inmunohistoquímica. El 20% restante de células se seleccionaron para resistencia a neomicina, G418, (marcador seleccionable presente en el vector pCMV-Tag 4A) a una concentración final de 0,25 mg/ml. Los clones estables se expandieron durante varias semanas.

35 **Recodificación optimizada en el código genético humano**

[0101] Se ha recodificado ADNmt según el código genético humano, teniendo en cuenta el uso del codón preferido en ser humano:

Tabla 3: uso del codón preferido en ser humano

Fuente		Uso del codón preferido en ser humano
ARG	CGA	-
	CGC	-
	CGG	-
	CGU	-
	AGA	-
	AGG	AGG
LEU	CUA	-
	CUC	-
	CUG	CUG
	CUU	-
	UUA	-
	UUG	-
SER	UCA	-
	UCC	UCC
	UCG	-
	UCU	-
	AGC	-

	AGU	-
THR	ACA	-
	ACC	ACC
	ACG	-
	ACU	-
PRO	CCA	-
	CCC	CCC
	CCG	-
	CCU	-
ALA	GCA	-
	GCC	GCC
	GCG	-
	GCU	-
GLY	GGA	-
	GGC	GGC
	GGG	-
	GGU	-
VAL	GUA	-
	GUC	-
	GUG	GUG
	GUU	-
LYS	AAA	-
	AAG	AAG
ASN	AAC	AAC
	AAU	-
GLN	CAA	-
	CAG	CAG
HIS	CAC	CAC
	CAU	-
GLU	GAA	-
	GAG	GAG
ASP	GAC	GAC
	GAU	-
TYR	UAC	UAC
	UAU	-
CYS	UGC	UGC
	UGU	-
PHE	UUC	UUC
	UUU	-
ILE	AUA	-
	AUC	AUC
	AUU	-
MET	AUG	AUG
TRP	UGG	UGG
% GC		63/42

Construcciones de ND1 y ND4:

[0102] Se produjeron COX10 MTS-nND1-SV40 3' UTR, COX10 MTS-nND4-SV40 3' UTR, COX10 MTS-nND1-COX10 3'UTR y COX10 MTS-nND4-COX10 3'UTR tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 1 para ATP6. Las secuencias resultantes se muestran en la figura 5B (SEQ ID NO: 23, 24, 25, 26, respectivamente).

Resultados:

- 10 **Detección de expresión alotópica de ND1 en fibroblastos de pacientes de NOHL que presentan la mutación de ND1 G3460A**

[0103] Se analizó la capacidad del producto de *ND1* manipulado de nuevo de localizarse en mitocondrias *in vivo*. Se realizaron análisis por inmunohistoquímica para detectar el epítipo flag en fibroblastos, de un paciente que presenta el gen *ND1* mutado, transfectados transitoriamente con *COX10 MTS-nND1-SV40 3' UTR* o *COX10 MTS-nND1-COX10 3'UTR* mostraban un patrón mitocondrial punteado típico, sugiriendo que la proteína de fusión Nd1 había estado localizada dentro de las mitocondrias (figura 6). De hecho, este patrón mitocondrial punteado típico se observó también usando anticuerpos específicos anti-subunidad beta de ATP sintasa. Las células transfectadas con el vector pCMV-Tag 4A vacío se usaron como controles negativos y mostraban una distribución citoplasmática difusa pero con una baja intensidad (figura 6). Los patrones de localización de péptidos Nd1 cuya síntesis estaban dirigidas por los dos vectores examinados eran esencialmente idénticos confirmando que las secuencias de *COX10* permitían con éxito que la proteína Nd1 manipulada de nuevo fuera dirigida dentro de las mitocondrias.

Detección de expresión alotópica de *ND4* en fibroblastos de pacientes de NOHL que presentan la mutación de *ND4* G11778A

[0104] Se obtuvieron dos plásmidos que dirigen la síntesis en el citosol de un gen *ND4* de tipo silvestre recodificado. Uno de ellos, *COX10 MTS-nND4-SV40 3' UTR*, posee añadida al extremo N de la proteína la secuencia correspondiente a los primeros 28 aminoácidos de Cox10. El segundo, *COX10 MTS-nND4-COX10 3'UTR*, tiene además al final del ORF la 3'UTR de longitud completa de *COX10*. Fibroblastos de un paciente que presentaba el 100% de moléculas de ADNmt con la mutación de *ND4* G11778A se transfectaron transitoriamente con uno cualquiera de estos plásmidos. 60 h más tarde, las células se fijaron y se visualizaron para determinar la capacidad de las secuencias *COX10* para dirigir la proteína recodificada a las mitocondrias. La figura 7 muestra que, en ambos casos, la proteína de fusión MTS Cox10ND4Flag tenía un patrón de tinción punteado, que es muy similar al observado para las mismas células con la subunidad beta de ATP sintasa proteína mitocondrial importada de forma natural. Por lo tanto, insinuando que la proteína de fusión Nd4 recodificada era importada al interior de las mitocondrias.

En conclusión, como para el gen *ATP6* mitocondrial, se pudo optimizar el enfoque de expresión alotópica para los genes *ND1* y *ND4*, mediante el simple uso de señales de direccionamiento de ARNm sin ningún cambio de aminoácidos en la proteína que pudiera afectar a la actividad biológica.

Capacidad de crecimiento de fibroblastos con NOHL en medio con galactosa

[0105] Fibroblastos que presentaban la mutación de *ND1* G3460A se cultivaron con galactosa, que entra lentamente en glucólisis en comparación con glucosa. La figura 8 muestra diferencias fundamentales en el crecimiento celular después de seis días de cultivo: los fibroblastos presentaban un grave defecto de crecimiento, menos del 10% de las células sobrevivían en medio que contenía galactosa en comparación con células sembradas en medio rico en glucosa. Los fibroblastos transfectados de forma estable con el vector *COX10-nND1-COX10 3'UTR* de MTS tenía una tasa de crecimiento en galactosa marcadamente mejorada en comparación con la de células no transfectadas. Este resultado insinúa que la proteína *ND1* recodificada importada en las mitocondrias se había ensamblado con éxito en el complejo funcional I permitiendo, por lo tanto, un rescate de la disfunción mitocondrial en estas células.

EJEMPLO 3: rescate de deficiencia mitocondrial que causa enfermedades humanas (transfección de fibroblastos de un paciente de NARP)

[0106] También se determinó si la proteína ATP6 manipulada de nuevo sería capaz de rescatar una deficiencia mitocondrial en células que tenían un gen *ATP6* mutado.

Se obtuvieron fibroblastos de un paciente que presentaba enfermedad NARP causada por la mutación T8993G en el gen *ATP6*.

Los fibroblastos se cultivaron en medios que contenían piruvato sódico y cantidades relativamente altas de FBS, más particularmente:

- en un medio que contenía glucosa (D-MEM con L-glutamina, 4500 mg/l de D-glucosa, 110 mg/l de piruvato sódico 2,5 mM, FBS al 15%, uridina 28 microM), o

- en un medio, que no contiene glucosa, sino que contiene galactosa (D-MEM líquido (1X), con L-Glutamina son Glucosa, piruvato sódico 2,5 mM, galactosa 10 mM, FBS al 15%, uridina 28 microM).

Se obtuvieron células transfectadas de forma estable que expresan la versión nuclear de *ATP6* asociadas con la MTS de *SOD2* en solitario, o en combinación con la 3'UTR de *SOD2*. La actividad de la cadena respiratoria se ha examinado mediante la capacidad de estas células para crecer en un medio en el que la glucosa ha sido sustituida por galactosa durante 10 ó 20 días. Las células con NARP que expresaban el vector vacío tenían una baja tasa de supervivencia (30%). Las células que expresan *ATP6* con la MTS de *SOD2* o tanto la MTS como la 3'UTR de *SOD2* presentan una supervivencia en cultivo de aproximadamente el 60%. Si la selección se mantuvo durante 20 días, la tasa de supervivencia en cultivo de células que expresan los vectores optimizados era superior al 80% (figura 16). Solamente se observaron sutiles diferencias de tasa de supervivencia para fibroblastos que expresan el vector con tanto la MTS como la 3'UTR del gen *SOD2* o el vector con la MTS de *SOD2* asociada a la 3'UTR de SV40. Esto se debe, ciertamente, a que estas células son heteroplasmáticas para la mutación T8993G, de hecho poseen aproximadamente el 10% del gen de tipo silvestre. Por lo tanto, en sus mitocondrias probablemente el 10% de una proteína *ATP6* funcional podría estar ensamblada en el Complejo V.

15 Puede concebirse que la expresión del vector con la MTS de *SOD2* asociada a la 3'UTR de SV40, causará la importación mitocondrial de suficiente proteína *ATP6* para permitir a las células crecer a buen ritmo en medio con galactosa.

Mediciones preliminares de la cantidad real de ATP producido *in vitro* por fibroblastos que expresan uno cualquiera de los cuatro vectores muestran claramente una diferencia en la actividad del Complejo V relacionada con la presencia de la 3'UTR de *SOD2* o la 3'UTR de SV40. Por lo tanto, cuando se comparaba con fibroblastos de control (el 100% de la síntesis de ATP en medio con galactosa) los fibroblastos con NARP que expresan el vector con MTS de *SOD2* asociada a la 3'UTR de SV40 presentaban un 50%, representando un incremento en comparación con células con NARP no transfectadas (30%) pero era menos importante cuando se comparaba con la cantidad descubierta en células que expresan el vector que combina con el gen *ATP6* recodificado tanto la MTS como la 3'UTR del gen *SOD2* (aproximadamente el 85%); véase la figura 19. En consecuencia, se obtiene un rescate más completo y eficiente de disfunción mitocondrial cuando el enfoque alotópico insinúa la presencia de las señales de direccionamiento tanto MTS como 3'UTR.

30 Tabla 11:

Fibroblastos	Tasa de supervivencia en galactosa	Tasa de síntesis de ATP en galactosa
Control	100%	100%
NARP (<i>ATP6</i> mutado)	30%	30%
NARP + 3'UTR citosólica (3'UTR de SV40)	60%	50%
NARP + 3'UTR mitocondrial (3'UTR de <i>SOD2</i>)	60%	85%

EJEMPLO 4: rescate de deficiencia mitocondrial que causa enfermedades humanas (transfección de fibroblastos de pacientes de NOHL)

35 **[0107]** El potencial de aplicabilidad del enfoque de expresión alotópica mejorado de los inventores ha sido confirmado adicionalmente examinando otros dos genes de ADNmt implicados en NOHL. Los fibroblastos obtenidos presentaban una homoplasmia total de la mutación; de hecho todas las moléculas de ADN mitocondrial están mutadas. Los fibroblastos se cultivaron en medios que contenían piruvato sódico y cantidades relativamente altas de FBS. Más particularmente:

- en un medio que contenía glucosa (D-MEM con L-glutamina, 4500 mg/l de D-glucosa, 110 mg/l de piruvato sódico 2,5 mM, FBS al 15%, uridina 28 microM), o

45 - en un medio, que no contiene glucosa, pero contiene galactosa (D-MEM líquido (1X), con L-Glutamina sin Glucosa, piruvato sódico 2,5 mM, galactosa 10 mM, FBS al 15%, uridina 28 microM).

Se obtuvieron las versiones localizadas en el núcleo manipuladas de *ND1* y *ND4*; los transcritos de *ND1* y *ND4* poseen en sus extremos tanto 5' como 3' secuencias de dirección de ARNm de *COX10*. Se realizaron las transfecciones estables de estas construcciones en fibroblastos de pacientes de NOHL con mutaciones *ND1* o *ND4*. La inmunofluorescencia indirecta mostraba que ambas proteínas se localizan en la superficie de mitocondrias *in*

vivo. La actividad OXPHOS de estas células también ha sido examinada cultivando en un medio rico en galactosa. Curiosamente, células de fibroblastos que expresan de forma alotópica la proteína ND4 de tipo silvestre mostraban una tasa marcadamente mejorada de crecimiento en medio con galactosa. Esta mejora es mayor cuando tanto la MTS como la 3'UTR de *COX10* estaban asociadas al gen *ND4* (54,3%) en comparación con la de células transfectedas de forma simulada (8%) o con las células transfectedas con el gen *ND4* asociado a la MTS de *COX10* y la 3'UTR de SV40 citosólica (12,7%) (figura 17, MTS: *ND4* asociado a la MTS de *COX10* y la 3'UTR de SV40, 3'UTR: *ND4* asociado a tanto la MTS como la 3'UTR de *COX10*). Estos datos implican que, a pesar de la presencia en estas células del polipéptido mutado de ND4, la proteína de tipo silvestre fue importada con éxito al interior del orgánulo y se ensambló en el Complejo I. Experimentos preliminares, de mediciones *in vitro* de síntesis de ATP confirman estos resultados, de hecho en células no transfectedas muy poco ATP se sintetizó en medio con galactosa (14% del nivel de control medido en fibroblastos sanos), cuando las células expresan el gen *ND4* asociado a la MTS de *COX10* y la 3'UTR de SV40 citosólica, se observa un incremento (56%). De manera destacable, este incremento es más importante cuando las células expresan el gen *ND4* asociado a tanto la MTS como la 3'UTR de *COX10* (84%).

Por lo tanto, los resultados confirman de forma innegable que se ha optimizado el enfoque alotópico para tres genes codificados por ADNmt mediante el uso de señales de direccionamiento de ARNm, sin ningún cambio de aminoácidos en las proteínas. Éste es particularmente el caso cuando los vectores presentaban las señales de direccionamiento tanto MTS como 3'UTR de un ARNm que se localizaban exclusivamente en la superficie mitocondrial.

Tabla 12:

Fibroblastos	Tasa de supervivencia en galactosa	Tasa de síntesis de ATP en galactosa
Control	100%	100%
NOHL (ND4 mutado)	8%	14%
NOHL + 3'UTR citosólica (3'UTR de SV40)	12,7%	56%
NOHL + 3'UTR mitocondrial (3'UTR de COX10)	54,3%	84%

EJEMPLO 5: transducción de células ganglionares retinianas

Los inventores obtuvieron, mediante mutagénesis *in vitro*, genes *ND1*, *ND4*, *ND6* y *ATP6* manipulados de nuevo, que poseen las mutaciones más comunes descubiertas en pacientes de NOHL y NARP: G3460A, G11778A, T14484C y T8993G respectivamente. Genes tanto de tipo silvestre como mutados se habían integrado en el vector p-AAV-IRES-hrGFP, lo que permitirá la producción de viriones del Virus Adenoasociado de Tipo 2 (VAA2) humano recombinante infeccioso. Para todas las construcciones, cada versión nuclear de genes de ADNmt está asociada con las dos secuencias de direccionamiento de ARNm del gen *COX10*, lo que permite el enriquecimiento de ARNm correspondientes en la superficie de mitocondrias. Según la presente invención, esto garantizará el suministro eficiente de los polipéptidos dentro del orgánulo.

Las células ganglionares retinianas (CGR) representan la diana celular primaria del proceso patógeno de la enfermedad NOHL.

Los inventores purificaron CGR de retina de rata adulta, obteniendo de este modo poblaciones de CGR enriquecidas, y las mantuvieron en cultivo durante dos semanas. Las mitocondrias se distribuyen a lo largo de filamentos de actina y se concentraban específicamente en los extremos de prolongaciones neuronales. Los inventores transfecaron estas células con la versión mutada del gen *ND1*. Los resultados preliminares mostraban que la expresión a niveles elevados de la proteína mutada durante 8 días causa una distribución anormal de mitocondrias a lo largo de las prolongaciones de neurita y cono (figura 18).

Referencias bibliográficas mencionadas en los ejemplos:

[0109]

- Owen, R., et al., Recombinant Adeno-associated virus vector-based gene transfer for defects in oxidative metabolism. Hum. Gene Ther., 2000. 11: p. 2067-2078.
- Guy, J., et al., Rescue of a mitochondrial deficiency causing Leber Hereditary Optic Neuropathy. Ann. Neurol.,

2002. 52: p. 534-542.
3. Manfredi, G., et al., Rescue of a deficiency in ATP synthesis by transfer of MTATP6, a mitochondrial DNA-encoded gene to the nucleus. *Nature Genet.*, 2002. 30: p. 394-399.
4. Oca-Cossio, J., et al., Limitations of allotopic expression of mitochondrial genes in mammalian cells. *Genetics*, 5 2003. 165: p. 707-720.
5. Sylvestre, J., et al., The role of the 3'UTR in mRNA sorting to the vicinity of mitochondria is conserved from yeast to human cells. *Mol. Biol. Cell*, 2003. 14: p. 3848-3856.
6. Ginsberg, M.D., et al., PKA-dependent binding of mRNA to the mitochondrial AKAP121 protein. *J. Mol. Biol.*, 2003. 327(4): p. 885-897.
- 10 7. Smith, P.M., et al., Strategies for treating disorders of the mitochondrial genome. *Biochem. Biophys. Acta*, 2004. 1659: p. 232-239.
8. Carelli et al., *Progress in Retinal and Eye Research*, 2004. 23: p. 53-89

REIVINDICACIONES

1. Un vector de expresión adaptado al suministro eficiente y estable de una proteína al interior de la mitocondria de una célula de mamífero,
5 en el que dicho vector comprende:
 - una secuencia de ácido nucleico de direccionamiento a la mitocondria (secuencia de ácido nucleico MTS),
 - una secuencia de ácido nucleico que codifica dicha proteína según el código genético universal (secuencia CDS), y10 - una secuencia de ácido nucleico 3', que está ubicada en 3' de dicha secuencia de ácido nucleico MTS y de dicha CDS,

en el que dicha secuencia de ácido nucleico MTS es:
15 - la secuencia de ADNc de una MTS de un ARNm codificado en el núcleo y dirigido a la mitocondria, o
- un fragmento conservativo de dicha secuencia de ADNc, que se deriva de ésta mediante delección de uno o varios nucleótidos, pero ha conservado una función de direccionamiento a la mitocondria,
en el que dicha secuencia de ácido nucleico 3' es:
- la secuencia de ADNc de la secuencia 3'UTR de un ARNm codificado en el núcleo y dirigido a la mitocondria, o
20 - un fragmento conservativo de dicha secuencia de ADNc, que se deriva de ésta mediante delección de uno o varios nucleótidos y que, cuando sustituye a la 3'UTR de tipo silvestre de dicho ARNm codificado en el núcleo y dirigido a la mitocondria, sigue permitiendo el direccionamiento mitocondrial del ARNm resultante,

en el que dicha CDS es un ácido nucleico que codifica una proteína mitocondrial y
25 en el que dicho vector no comprende ninguna secuencia que sería idéntica a:
 - la 3'UTR de un ARNm de origen natural que es un ARNm transcrito en el núcleo pero no dirigido a la mitocondria, o
 - la secuencia de ADNc de dicha secuencia 3'UTR, o30 - una secuencia de ADN transcrita en dicha 3'UTR de ARNm de origen natural,

con lo que dicho vector no usa una vía de importación postraducciona, sino que usa una vía de importación por co-traducción desde el núcleo hasta dicha mitocondria.
35 2. El vector de expresión de la reivindicación 1, en el que dicha secuencia de ácido nucleico MTS es la secuencia de ácido nucleico MTS de SOD2, o de COX 10, o de ACO2, o de ATP5b, o de UQCRFS1, o de NDUFV1, o de NDUFV2 o de ALDH2.
3. El vector de expresión de las reivindicaciones 1-2, en el que dicha secuencia de ácido nucleico MTS
40 codifica una secuencia de la SEQ ID NO: 34, o la SEQ ID NO: 46, o la SEQ ID NO: 32, o la SEQ ID NO: 36, o la SEQ ID NO: 38, o la SEQ ID NO: 40, o la SEQ ID NO: 42 o la SEQ ID NO: 44.
4. El vector de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicha secuencia de ácido nucleico MTS es la SEQ ID NO: 31 o la SEQ ID NO: 30.
45 5. El vector de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicha secuencia de ácido nucleico 3' es:
 - la secuencia 3'UTR de SOD2, o de COX10, o de ACO2, o de ATP5b, o de UQCRFS1, o de NDUFV1, o de50 NDUFV2, o de ALDH2 o de AK2, o
- la secuencia de ADNc de dicha secuencia 3'UTR, o
- una secuencia de ADN que codifica dicha secuencia 3'UTR según el código genético universal.
6. El vector de expresión de la reivindicación 5, en el que dicha secuencia de ácido nucleico 3' es la SEQ
55 ID NO: 35, o la SEQ ID NO: 47, o la SEQ ID NO: 33, o la SEQ ID NO: 37, o la SEQ ID NO: 39, o la SEQ ID NO: 41, o la SEQ ID NO: 43, o la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 57.
7. El vector de expresión de la reivindicación 5 ó 6, en el que dicha secuencia de ácido nucleico 3' es la SEQ ID NO: 35 o la SEQ ID NO: 47.

8. El vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que dicha secuencia de ácido nucleico MTS es la secuencia de ácido nucleico MTS de SOD2, y dicha secuencia 3' UTR es la secuencia 3' UTR de SOD2.
- 5 9. El vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que dicha secuencia de ácido nucleico MTS es la secuencia de ácido nucleico MTS de COX10, y dicha secuencia 3' UTR es la secuencia 3' UTR de COX10.
10. El vector de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que dicha secuencia CDS es la secuencia de un ácido nucleico mitocondrial de origen natural, recodificada según el código genético universal.
11. El vector de expresión de la reivindicación 10, en el que dicha secuencia CDS es una secuencia de ácido nucleico de ATP6, o de ND1, o de ND4, recodificada según el código genético universal.
- 15 12. El vector de expresión de la reivindicación 11, en el que dicha secuencia CDS es la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 29 (ND4 recodificado), la SEQ ID NO: 28 (ND1 recodificado) o la SEQ ID NO: 27 (ATP6 recodificado).
13. El vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, que comprende al menos una secuencia de la SEQ ID NO: 25 (MTS de COX10 - ND1 recodificado - 3'UTR de COX10), la SEQ ID NO: 26 (MTS de COX10 - ND4 recodificado - 3'UTR de COX10), la SEQ ID NO: 21 (MTS la COX10 - ATP6 recodificado - 3'UTR de COX10), SEQ ID NO: 22 (MTS de SOD2 - ATP6 recodificado - 3'UTR de SOD2).
- 20 14. El vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 y 9-11, en el que dicho vector es un virus adenoasociado (VAA), en el que dicha secuencia de ácido nucleico MTS es la secuencia de ácido nucleico MTS de COX10, dicha secuencia 3' UTR es la secuencia 3' UTR de COX10, y dicha secuencia CDS es una secuencia de ácido nucleico de ND4 recodificada según el código genético universal.
- 25 15. El vector de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que dicha secuencia CDS es la secuencia de ácido nucleico de un ácido nucleico nuclear de origen natural que codifica una proteína mitocondrial funcional.
- 30 16. El vector de expresión de la reivindicación 15, en el que dicho ácido nucleico nuclear de origen natural es ARNm transcrito en el núcleo y dirigido a la mitocondria, o la secuencia de ADN de dicho ARNm.
- 35 17. El vector de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en el que dicha célula de mamífero es una célula humana.
18. Una célula de mamífero manipulada que comprende al menos un vector según una cualquiera de las reivindicaciones 1-17.
- 40 19. Una composición farmacéutica que comprende al menos un vector según una cualquiera de las reivindicaciones 1-17, o al menos una célula de mamífero manipulada según la reivindicación 18.
- 45 20. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento terapéutico, paliativo y/o preventivo de una miopatía, o de una neuropatía óptica en la que dicha composición comprende al menos un vector según una cualquiera de las reivindicaciones 1-17, o al menos una célula de mamífero manipulada según la reivindicación 18.
- 50 21. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento terapéutico, paliativo y/o preventivo de una neuropatía óptica según la reivindicación 20, en el que dicha neuropatía óptica es NOHL, AOD, NEBF, SLHM o NARP.

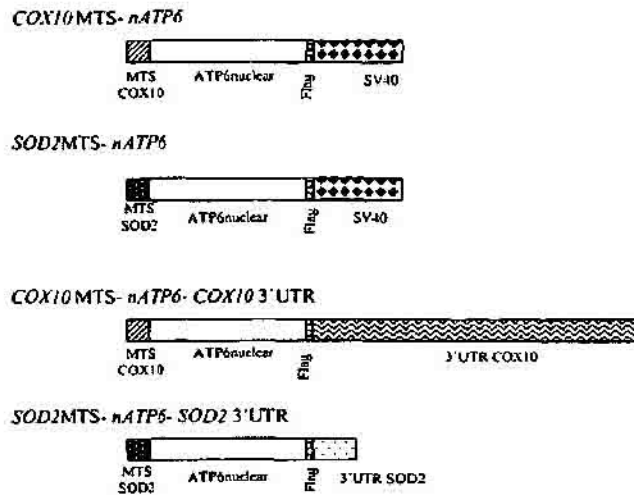


FIGURA 1A

COX10 MTS- *nATP6* (SEQ ID NO :19)

GAATTCGCCCTTCGCTCTAGAAATGGCCGCATCTCCGCACACTCTCTCCTCACGCCTCCTGACAGGTTGCGTAGGA
 GGCTCTGTCTGGTATCTTGAAGTCGACCGCATGAACGAAAATCTGTTGCTTCATTATTGCCCCACAATCCTA
 GGCTACCCGCCGAGTACTGATCATTCTATTTCCCCCTCTATTGATCCCCACCTCCAAATATCTCATCAACAAC
 CGACTAATCACCACCCCAACAATGGCTAATCAAACCTAACCTCAAAACAAATGATGACCATGCACAACACTAAAGGA
 CGAACCTGGTCTCTTATGCTAGTATCCTTAATCATTTTTATTGCCACAACCTAACCTCCTCGGACTCCTGCCTCAC
 TCATTTACACCAACCACCCAACTATCTATGAACCTAGCCATGGCCATCCCCCTATGGGCGGGCACAGTGATTATG
 GGCTTTGCTCTAAGATTAAAAATGCCCTAGCCCACTTCTTACCACAAGGCACACCTACACCCCTTATCCCCATG
 CTAGTTATTATCGAAACCATCAGCCTACTCATTCAACCAATGGCCCTGGCCGTACGCCTAACCGCTAACATTACT
 GCAGGCCACCTACTCATGCACCTAATTGGAAGCGCCACCTAGCAATGTCAACCATTAACTTCCCTCTACACTT
 ATCATCTTCACAATTCTAATTCTACTGACTATCCTAGAAATCGCTGTGCTTAAATCCAAGCCTACGTTTTTACA
 CTTCTAGTAAGCCTCTACCTGCACGACAACACAGCGGCCGCCGGAAGGGCGAATTCGATATCAAGCTTATCGAT
 ACCGTCGACCTCGAGGATTACAAGGATGACGACGATAAGTAGGGCCCGGTACCTTAATTAATTAAGGTACCAGGT
 AAGTGTACCCAATTGCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATCACTCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCT
 GAATGGCGAATGGAGATCCAATTTTTAAGTGTATAATGTGTTAACTACTGATTCTAATTGTTTGTGATTTTAG
 ATTCACAGTCCCAAGGCTCATTTTCAGGCCCTCAGTCCTCACAGTCTGTTTCATGATCATAATCAGCCATACCACA
 TTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATT
 GTTGTGTTAACTTGTATTATGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAAATAAA
 GCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTAACGCGT

FIGURA 1B (Inicio)

SOD2MTS- *nATP6* (SEQ ID NO :20)

GAATTCGCCCTTCGCTCTAGAAATGTTGAGCCGGGCAGTGTGCGGCACCAGCAGGCAGCTGGCTCCGGTTTTGGGG
TATCTGGGCTCCAGGCAGAAAGCAGCCTCCCGCAGCGGTGACCGCATGAACGAAAATCTGTTCTGCTTCATTC
ATTGCCCCACAATCCTAGGCCCTACCCGCCGAGTACTGATCATTTCTATTTCCCTCTATTGATCCCCACCTCC
AAATATCTCATCAACAACCGACTAATCACCACCCAACAATGGCTAATCAAACCTAACCTCAAAACAAATGATGACC
ATGCACAACACTAAAGGACGAACCTGGTCTCTTATGCTAGTATCCTTAATCATTITTTATTGCCACAACCTAACCTC
CTCGGACTCCTGCCCTCACTCATTTACACCAACCACCACTATCTATGAACCTAGCCATGGCCATCCCTTATGG
GCGGGCACAGTGATTATGGGCTTTCGCTCTAAGATTAAAAATGCCCTAGCCCACTTCTTACCACAAGGCACACCT
ACACCCCTTATCCCCATGCTAGTTATTATCGAAACCATCAGCCTACTCATTCAACCAATGGCCCTGGCCGTACGC
CTAACCGCTAACATTACTGCAGGCCACCTACTCATGCACCTAATTGGAAGCGCCACCTAGCAATGTCAACCATT
AACCTTCCCTCTACACTTATCATCTTCACAATTCTAATTTCTACTGACTATCCTAGAAATCGCTGTGCGCTTAATC
CAAGCCTACGTTTTTCACACTTCTAGTAAGCCTCTACCTGCACGACAACACAGCGGCCGCCCGGTAAGGGGGAATTC
GATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGGATTACAAGGATGACGACGATAAGTAGGGCCCGGTACCTTA
ATTAATTAAGGTACAGGTAAGTGTACCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCATCGATCGCCCTT
CCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGAGATCCAATTTTTAAGTGTATAATGTGTTAAACTACTGATTCT
AATIGTTTGTGTATTTTAGATTACAGTCCCAAGGCTCATTTCAAGGCCCTCAGTCTCACAGTCTGTTTCATGAT
CATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTAAAAAACCTCCACACCTCCCTGAACTGAA
ACATAAATGAATGCAATTTGTTGTTGTTAACTTGTATTGTCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCAT
CACAAATTCACAAATAAAGCATTTTTTCTACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTA
ACGCGT

COX10 MTS- *nATP6*- COX10 3'UTR (SEQ ID NO :21)

GAATTCGCCCTTCGCTCTAGAAATGCGCCGATCTCCGCACACTCTCTCCTCAGCCTCCTGACAGGTTGCGTAGGA
GGCTCTGTCTGGTATCTTGAAGTCGACCGCATGAACGAAAATCTGTTCTGCTTCATTCATTGCCCCACAATCCTA
GGCCTACCCGCCGAGTACTGATCATTTCTATTTCCCTCTATTGATCCCCACCTCCAAATATCTCATCAACAAC
CGACTAATCACCACCCAACAATGGCTAATCAAACCTAACCTCAAAACAAATGATGACCATGCACAACACTAAAGGA
CGAACCTGGTCTCTTATGCTAGTATCCTTAATCATTITTTATTGCCACAACCTAACCTCCTCGGACTCCTGCTCAC
TCATTTACACCAACCACCAACTATCTATGAACCTAGCCATGGCCATCCCTTATGGGCGGGCACAGTGATTATG
GGCTTTCGCTCTAAGATTAAAAATGCCCTAGCCCACTTCTTACCACAAGGCACACCTACACCCCTTATCCCCATG
CTAGTTATTATCGAAACCATCAGCCTACTCATTCAACCAATGGCCCTGGCCGTACGCCTAACCGCTAACATTACT
GCAGGCCACCTACTCATGCACCTAATTGGAAGCGCCACCTAGCAATGTCAACCATTAACTTCCCTCTACACTT
ATCATCTTCACAATTTCTAATTTCTACTGACTATCCTAGAAATCGCTGTGCGCTTAATCCAAAGCCTACGTTTTTCACA
CTTCTAGTAAGCCTCTACCTGCACGACAACACAGCGGCCGCCCGGAAGGGGGAATTCGATATCAAGCTTATCGAT
ACCGTCGACCTCGAGGATTACAAGGATGACGACGATAAGTAGGGCCCGGTACCTTAATTAATTAAGGTACCAGGT
AAGTGTACCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCATCGATCGGAGCAGTGGGACGCCACCGCCCC
TTTCCCTCCGCTGCCAGGCGAGCATGTTGTGGTAATTCGGAACACAAGAAGAGAAATGCTGGGTTTAGAACAA
GATTATAAACGAATTCGGTGGCCAGTGATCACTTGACAGTTTTTTTTTTTTTAAATATTACCCAAAATGCTCCC
CAAATAAGAAATGCATCAGCTCAGTCAGTGAATACAAAAAGGAATTATTTTTCCCTTTGAGGGTCTTTATACAT
CTCTCTCCAACCCACCTCTATTCTGTTTCTTCTCTCTCATATGGGGGTACACATACACAGCTTCTCTTTTG
GTTCCATCCTTACCACCACACCACCGCACACTCCACATGCCAGCAGAGTGGCACTTGGTGGCCAGAAAGTGTG
AGCCTCATGATCTGCTGTCTGTAGTTCTGTGAGCTCAGGTCCCTCAAAGGCCTCGGAGCACCCCTTCTGTTGA
CTGAGCCAGGGCCTGCATTTTTGGTTTTCCCCACCCACACATTTCTCAACCATAGTCTTCTAACAATACCAATA
GCTAGGACCCGGCTGCTGTGCACTGGGACTGGGGATTCCACATGTTTGCCTTGGGAGTCTCAAGCTGGACTGCCA
GCCCCTGTCTCCCTTACCCCATTTGCGTATGAGCATTTCAGAACTCCAAGGAGTCACAGGCATCTTTATAGTT
CACGTTAACATATAGACACTGTTGGAAGCAGTTCCTTCTAAAAGGGTAGCCCTGGACTTAATACCAGCCGGATAC
CTCTGGCCCCACCCCATTTACTGTACCTCTGGAGTCACTACTGTGGGTGCGCACTCCTCTGTACACAGCACGGC
TTTTTCAAGGCTGTATTGAGAAGGGAAGTTAGGAAGAAGGGTGTGCTGGGCTAACAGCCACAGAGCTCACATT
CCTGTCCCTTGGGTGAAAAATACATGTCCATCCTGATATCTCTGAATTCAGAAATTAGCCTCCACATGTGCAAT
GGCTTTAAGAGCCAGAAGCAGGTTCTGGGAATTTTGCAAGTTATCCTGTGGCCAGGTGTGGTCTCGGTTACCAA
ATACGGTTACCTGCAGCTTTTTAGTCTTTGTGCTCCACGGGTCTGCAGAGTCCCATCTGCCCAAAGCTCTTGA
AGCTTGACAGGATGTTTTCTATTACTCAGTCTCCAGGGCAGTGTGGTCCGTAGGGATTATTGGTGGGGTGGG
AGAGTTAAACAACATTTAAACAGAGTTCTCTCAAAAATGTCTAAAGGGATTGTAGGTAGATAACATCCAATCACT
GTTTGCATTTATCTGAAATCTTCCCTCTTGGCTGCCCCACAGTATTTACTGTGGAGAACATTGCATAGGAATGTC
TGAAAAAGCTCCTACAACCTGTTACAGCCTTCACATTTGTAGAAGCTTTACGCGT

FIGURA 1B (Continuación)

*SOD2*MTS- *nATP6*- *SOD2* 3'UTR (SEQ ID NO :22)

GAATTGGCCCTTCGCTCTAGAAATGTTGAGCCGGGCAGTGTGCGGCACCAGCAGGCAGCTGGCTCCGGTTTTGGGG
TATCTGGGCTCCAGGCAGAAGCACAGCCTCCCCGACGCGGTGACCGCATGAACGAAAATCTGTTTCGCTTCATTTC
ATTGCCCCACAATCCTAGGCCTACCCGCGCAGTACTGATCATTCTATTTCCTCCCTCTATTGATCCCCACCTCC
AAATATCTCATCAACAACCGACTAATCACCACCCAACAATGGCTAATCAAACCTCAAAACAAATGATGACC
ATGCACAACACTAAAGGACGAACCTGGTCTCTTATGCTAGTATCCTTAATCATTTTTATTGCCACAACCTAACCTC
CTCGGACTCCTGCCTCACTCATTTACACCAACCACCCAACCTATCTATGAACCTAGCCATGGCCATCCCCCTTATGG
GCGGGCACAGTGATTATGGGCTTTCGCTCTAAGATTAAAAATGCCCTAGCCCACTTCTTACCACAAGGCACACCT
ACACCCCTTATCCCATGCTAGTTATTATCGAAACCATCAGCCTACTCATTCAACCAATGGCCCTGGCCGTACGC
CTAACCGCTAACATTACTGCAGGCCACCTACTCATGCACCTAATTGGAAGCGCCACCCCTAGCAATGTCAACCAAT
AACCTTCCCTCTACACTTATCATCTTCACAATTCTAATTCTACTGACTATCCTAGAAATCGCTGTTCGCCCTTAATC
CAAGCCTACGTTTTTACACTTCTAGTAAGCCTCTACCTGCACGACAACACAGCGGCCCGCCCGGTAAGGGCGAATT
GATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGGATTACAAGGATGACGACGATAAGTAGGGCCCGGTACCTTA
ATTAATTAAGGTACCAGGTAAGTGTAACCAATTTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACTCGATCGTTATG
CTGAGTATGTTAAGCTCTTTATGACTGTTTTTGTAGTGGTATAGAGTACTGCAGAATACAGTAAGCTGCTCTATT
GTAGCATTTCTGATGTTGCTTAGTCACTTATTTTATAACAACCTTAATGTTCTGAATAATTTCTTACTAAACAT
TTTGTTATTGGGCAAGTGATTGAAAATAGTAAATGCTTTGTGTGATTGACGCGT

FIGURA 1B (fin)

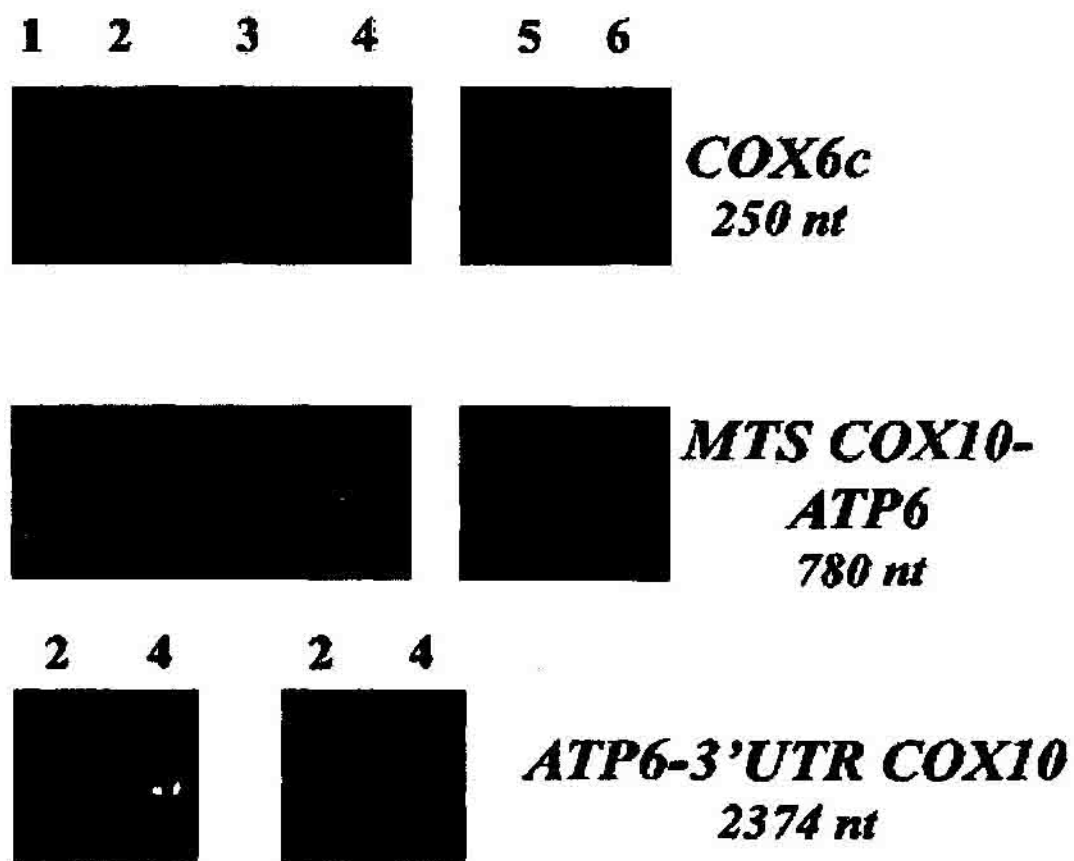


FIGURA 2

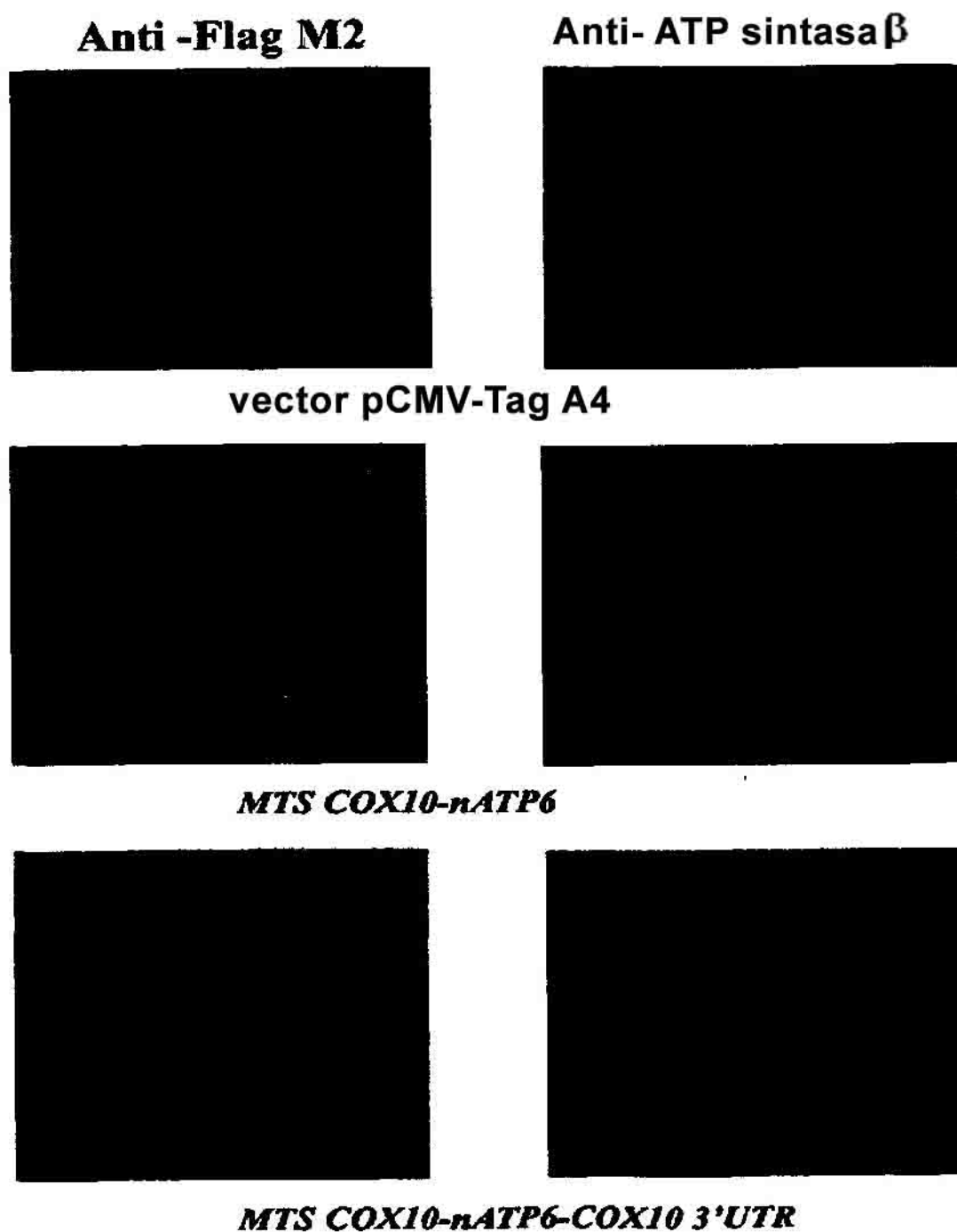


FIGURA 3

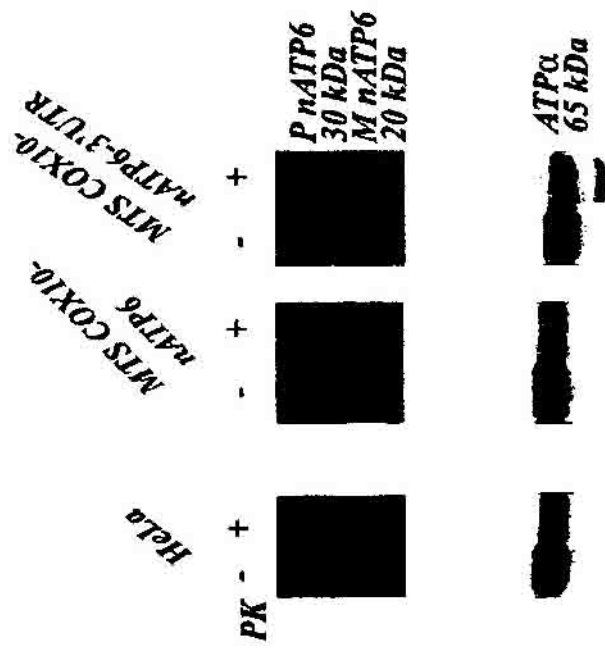


FIGURA 4A

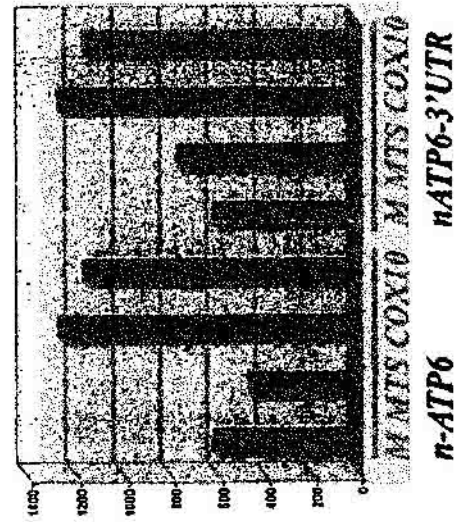


FIGURA 4B

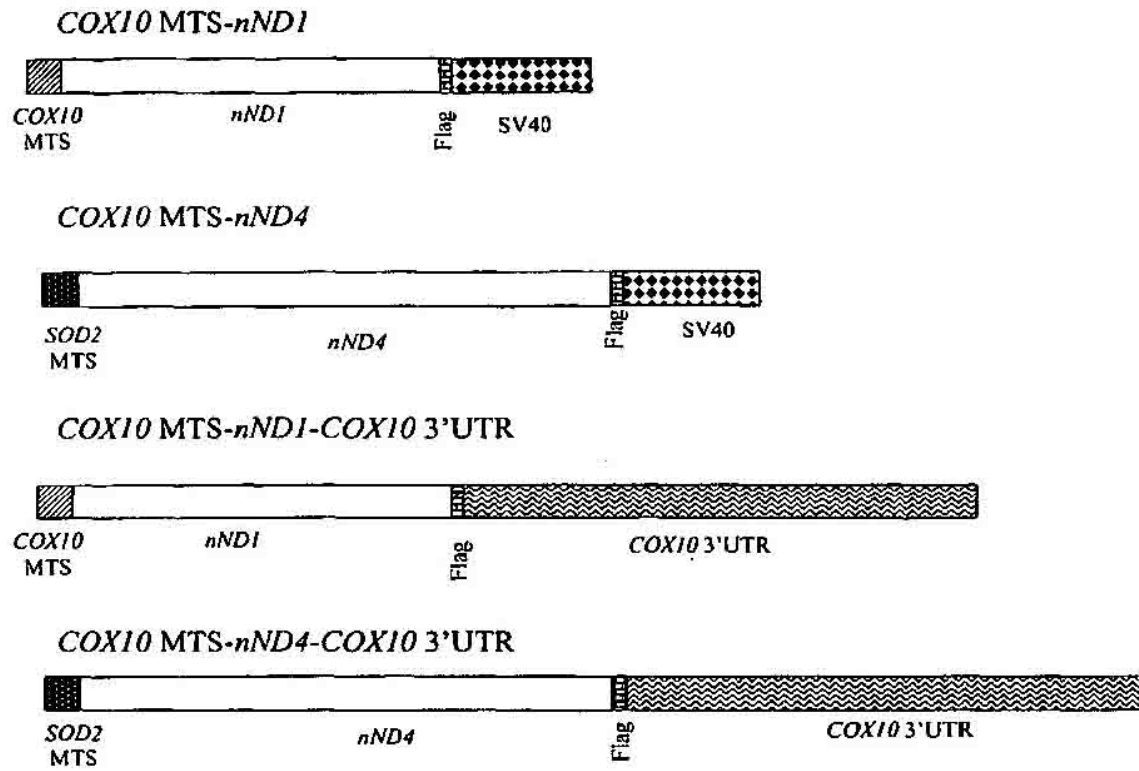


FIGURA 5A

COX10 MTS-*nND1* (SEQ ID NO :23)

CTCGACATGGCTGCTAGCCCCACACTCTGAGCAGCCGCTGCTGACCGGTTGCGTGGGCGGCTCTGTGTGGTAT
 CTGGAGAGGAGAACCATGCCAATGGCAAATCTGCTGCTCCTCATCGTGCCAATCCTGATCGCCATGGCCTTCCTC
 ATGCTGACTGAAAGAAAATTCTGGGATACATGCAGCTCAGGAAGGGCCCTAACGTGGTGGGACCTTATGGACTG
 CTCCAGCCCTTTGCTGATGCTATGAAGCTGTTACAAAAGAGCCCTGAAACCAGCCACCTCTACAATCACCTG
 TACATTACCGCTCCTACCCTGGCTCTGACAATTGCCCTGCTGCTGTGGACCCCTCTCCCTATGCCAAATCCTCTG
 GTGAACCTGAATCTGGGCTCCTCTTTATCCTGGCCACCAGCAGCCTGGCCGTGTAATCCTGTGGAGCGGA
 TGGGCTTCTAACAGCAATTACGCCCTGATCGGTGCCCTGAGGGCCGTGGCCAGACCATTTCTTACGAGGTGACC
 CTCGCCATTATCCTGCTCTCAACCCTGCTGATGAGCGGCTCTTTCAACCTCTCAACCCTGATTACAACCAGGAG
 CACCTCTGGCTGCTCCTCCCAGCTGGCCACTGGCCATGATGTGGTTTATCAGCACCCTGGCTGAGACAAACCGG
 ACCCCCTTTGATCTGGCTGAGGGCGAGTCTGAGCTGGTCTCCGATTCAATATTGAGTACGCAGCAGGGCCATTC
 GCTCTGTTCTTCATGGCCGAGTATACAAATATTATTATGATGAACACACTGACTACTACTATCTTCCTGGGTAAT
 ACATACGATGCTCTGAGTCCCGAACTCTACACCCTTACTTCCTGACCAAAACCCTGCTGCTGACTAGCCTGTTC
 CTGTGGATCAGGACCGCCTATCCACGATTCCGATACGCAAGCTGATGCATCTGCTGTGGAAGAATCTCTGCCA
 CTCACCCCTGGCTCTGCTCATGTGGTACGTGAGTATGCCAATCACTATCAGCTCTATCCCTCCACAGACCTACTCG
AGGAGGATTACAAGGATGACGACGATAAGTAGGGCCCGGTACCTTAATTAATTAAGGTACCAGGTAAGTGTACCC
 AATTGCCCCATAGTGAGTCTGATTACAAATTCACCTCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAA
 TGGAGATCCAATTTTAAAGTGATAATGTGTTAAACTACTGATTCTAATTGTTTGTGTATTTAGATTACAGTC
 CCAAGGCTCATTTTACGGCCCTCAGTCCTCACAGTCTGTTTATGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGG
 TTTTACTTGCTTTAAAAACCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTTGTGTTGTTA
 ACTTGTATTATGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTT
 CACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTAACGCGT

COX10 MTS-*nND4* (SEQ ID NO :24)

CTCGACATGGCCGCTCACCCACACCCCTGAGTAGCAGGCTGCTGACCGGCTGTGTGGGAGGAAGCGTGTGGTAT
 CTGGAGCGGAGAACCATGCTGAAGCTGATCGTGCCACCATTATGCTGCTGCCTCTGACATGGCTGTCTAAGAAG
 CACATGATCTGGATTAAACACAACCACCCACAGCCTGATTATCTCCATCATTCCCCTCCTGTTCTTCAACCAGATC
 AACAAACACCTGTTCTCCTGCTCACCTACTTTTAGCAGCGATCCACTGACAACCCCACTGCTGATGCTGACAACC
 TGGCTCCTCCCCCTGACAATCATGGCTTCCAGAGGCACCTGAGCAGCGAGCCACTGTCCCGCAAAAAGCTGTAC
 CTGTCCATGCTGATTCTCTCCAGATCTCACTCATCATGACCTTCACTGCCACCGAGCTGATTATGTTCTATATC
 TTCTTCGAGACTACTCTGATCCCTACACTCGCCATTATCACCCGGTGGGGCAACCAGCCTGAGAGACTGAATGCC
 GGGACTTATTTTCTGTTCTACACCCTGGTGGGGTCACTGCCCTGCTGATTGCCCTGATCTACACCATAACACA
 CTGGGCTCTCTCAATATCCTGCTGCTCACACTGACAGCCAGGAGCTGTCCAATTTCTTGGGCTAACAAATCTGATG
 TGGCTCGCATACACTATGGCCTTCATGGTGAAGATGCCACTCTATGGGCTCCACCTCTGGCTCCCTAAGGCCCCAC
 GTCGAAGCCCCAATTGCAGGGTCCATGGTGCTGGCAGCTGTGCTCCTGAAGCTGGGTGGCTATGGGATGATGCGC
 CTGACCCTGATCCTGAATCCTCTCACAAAGCATATGGCTTACCCCTTTCTGGTGCTGTCCCTGTGGGAATGATT
 ATGACAAGCTCTATTGCTGCGCCAGACAGACCTGAAAAGCCTGATTGCCTACAGCAGTATCAGTCATATGGCC
 CTGGTGGTGACCGCTATTCTGATTACACACCATGGTCTTTTACAGGGGCCGTATTCTGATGATCGCCACCGGA
 CTGACCTCATCACTCCTCTTCTGTCTGGCCAACCTCAAACCTACGAAAGGACACACTCAAGAATTATGATTCTGAGC
 CAGGGACTCCAGACTCTGCTCCCCCTCATGGCCTTCTGGTGGCTGCTCGCCTCTCTCGCCAACCTGGCCCTCCCT
 CCCACAATCAATCTGCTGGGCGAGCTCAGCGTGCTGGTGACCACTTTTAGTTGGTCCAACATCACACTGCTGCTC
 ACCGACTCAATATGCTGGTCACCGCCCTGTACAGTCTGTACATGTTACCCACAACACAGTGGGGTAGCCCTCACT
 CATCACATTAATAACATGAAGCCTTCTTTTACTAGGGAAAATACTCTGATGTTTATGCATCTCTCCCCAATCCTC
 CTCCTGAGTCTGAACCCCGACATCATACCGGCTTTAGCTCTCTCGAGGAGGATTACAAGGATGACGACGATAAG
 TAGGGCCCGGTACCTTAATTAATTAAGGTACCAGGTAAGTGTACCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAA
 TTCACTCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGAGATCCAATTTTAAAGTGATAATGT
 GTTAAACTACTGATTCTAATTGTTTGTGTATTTAGATTACAGTCCCAAGGCTCATTTACGGCCCTCAGTCCT
 CACAGCTGTGTTCTATGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTACTTGCTTTAAAAACCTCCACAC
 CTCCCTGAACCTGAACATGAATGAATGAATGTTGTTGTTAAGTTGTTTATTGAGCTTATATGTTTAC
 AAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAA
 CTCATCAATGTATCTTAACGCGT

FIGURA 5B (Inicio)

COX10 MTS-*nND1*- *COX10* 3'UTR (SEQ ID NO :25)

CTCGACATGGCTGCTAGCCCCACACTCTGAGCAGCCGCTGCTGACCGGTTGCGTGGGCGGCTCTGTGTGGTAT
 CTGGAGAGGAGAACCATGCCAATGGCAAACTGCTGCTCCTCATCGTGCCAATCCTGATCGCCATGGCCTTCCTC
 ATGCTGACTGAAAGAAAAATTCTGGGATACATGCAGCTCAGGAAGGGGCTAACGTGGTGGGACCTTATGGACTG
 CTCCAGCCCTTTGCTGATGCTATGAAGCTGTTACAAAAGAGCCCTGAAACCAGCCACCTCTACAATCACCCCTG
 TACATTACCGCTCCTACCCTGGCTCTGACAATTGCCCTGCTGCTGTGGACCCCTCTCCCTATGCCAAATCCTCTG
 GTGAACCTGAATCTGGGCCCTCCTCTTTATCCTGGCCACCAGCAGCCTGGCCGTGTACTCCATCCTGTGGAGCGGA
 TGGGCTTCTAACAGCAATTACGCCCTGATCGGTGCCCTGAGGGCGGTGGCCAGACCAATTTCTTACGAGGTGACC
 CTCGCCATTATCCTGCTCTCAACCCCTGCTGATGAGCGGCTCTTTCAACCTCTCAACCCCTGATTACAACCCAGGAG
 CACCTCTGGCTGCTCCTCCCCAGCTGGCCACTGGCCATGATGTGGTTTATCAGCACCCCTGGCTGAGACAAACCGG
 ACCCCCTTTGATCTGGCTGAGGGCGAGTCTGAGCTGGTCTCCGGATTCAATATTGAGTACGCAGCAGGGCCATTC
 GCTCTGTTCTTCATGGCCGAGTATACAAATATTATTATGATGAACACACTGACTACTACTATCTTCCTGGGTACT
 ACATACGATGCTCTGAGTCCCCGAACCTACACCACTTACTTCGTGACCAAAACCCGTGCTGCTGACTAGCCTGTTC
 CTGTGGATCAGGACCGCTATCCACGATTCCGATACGACCAGTGATGCATCTGCTGTGGAAGAAGCTTCCTGCCA
 CTCACCCCTGGCTCTGCTCATGTGGTACGTGAGTATGCCAATCACTATCAGCTCTATCCCTCCACAGACCTACTCG
AGGAGGATTACAAGGATGACGACGATAAGTAGGGCCCCGTACCTTAATTAATTAAGGTACCAGGTAAGGTGTACCC
 AATTGCCCCATAGTGAGTCGTATTACAATTCACTCGATCGGAGCACTGGGACGCCACCGCCCCCTTTCCCTCCG
 CTGCCAGGCGAGCATGTTGTGTAATTCTGGAACACAAGAAGAGAAATTGCTGGGTTTAGAACAAGATTATAAAC
 GAATTCCGGTGCTCAGTGATCACTTGACAGTTTTTTTTTTTTTAAATATTACCCAAAATGCTCCCCAAATAAGAA
 ATGCATCAGCTCAGTCAGTGAATACAAAAAGGAATTATTTTTCCCTTTGAGGGTCTTTATACATCTCTCCTCCA
 ACCCCACCCCTCTATTCTGTTTCTTCCTCCTCACATGGGGGTACACATACACAGCTTCCTCTTTTGGTTCCATCCT
 TACCACCACACCACACGACACTCCACATGCCCCAGCAGAGTGCCACTTGGTGGCCAGAAAGTGTGAGCCTCATGA
 TCTGCTGTCTGTAGTTCTGTGAGCTCAGGTCCCTCAAAGGCCTCGGAGCACCCCTTCTGTTGACTGAGCCAGG
 GCCTGCATTTTTGGTTTTCCCCACCCACACATTCTCAACCATAGTCCTTCTAACAATACCAATAGCTAGGACCC
 GGCTGCTGTGCACTGGGACTGGGATTCCACATGTTTGCCCTTGGGAGTCTCAAGCTGGACTGCCAGCCCTGTCC
 TCCCTTCACCCCATTTGCGTATGAGCATTTTCAGAACTCCAAGGAGTACAGGCATCTTTATAGTTACAGTTAAACA
 TATAGACACTGTTGGAAGCAGTTCCTTCTAAAAGGGTAGCCCTGGACTTAATACCAGCCGGATACCTCTGGCCCC
 CACCCCATTTACTGTACCTCTGGAGTCACTACTGTGGGTGCGCACTCCTCTGCTACACAGCACGGCTTTTTCAAGG
 CTGTATTGAGAAGGGAAGTTAGGAAGAAGGGTGTGCTGGGCTAACCAGCCACAGAGCTCACATTCCTGTCCCTT
 GGGTGAAAAATACATGTCCATCCTGATATCTCCTGAATTCAGAAATTAGCCTCCACATGTGCAATGGCTTTAAGA
 GCCAGAAGCAGGGTTCTGGGAATTTGCAAGTTATCCTGTGGCCAGGTGTGGTCTCGGTTACCAAATACGGTTAC
 CTGCAGCTTTTTAGTCCCTTTGTGCTCCACGGGTCTGCAGAGTCCCATCTGCCAAAGGTCTTGAAGCTTGACAG
 GATGTTTTCACTTCACTCTCTCCAGGGCACTGCTGGTCCGTAGGGATTCAATTGGTCTGGGGTGGGAGAGTTAAAC
 AACATTTAAACAGAGTTCTCTCAAAAATGTCTAAAGGGATTGTAGGTAGATAACATCCAATCACTGTTTGCACTT
 ATCTGAAATCTTCCTCTTGGCTGCCCCCAGGTATTTACTGTGGAGAACATTGCATAGGAATGTCTGAAAAAGCT
 TCTACAACCTTGTACAGCCTTCACATTTGTAGAAGCTTTACGCGT

FIGURA 5B (Continuación)

COX10 MTS-*nND4*- *COX10* 3'UTR (SEQ ID NO :26)

GTGACATGGCCGCCTCACCCACACCCTGAGTAGCAGGCTGCTGACCGGCTGTGTGGGAGGAAGCGTGTGGTAT
 CTGGAGCGGAGAACCATGCTGAAGCTGATCGTGCCACCATTATGCTGCTGCCCTGACATGGCTGTCTAAGAAG
 CACATGATCTGGATTAAACACAACCACCCACAGCCTGATTATCTCCATCATTCCCCCTCTGTTCTTCAACCAGATC
 AACACAACCTGTTCTCCTGCTCACCTACTTTTAGCAGCGATCCACTGACAACCCCACTGCTGATGCTGACAACC
 TGGCTCCTCCCCCTGACAATCATGGCTTCCCAGAGGCACCTGAGCAGCGAGCCACTGTCCCGCAAAAAGCTGTAC
 CTGTCCATGCTGATTCTCTCCAGATCTCACTCATCATGACCTTCACTGCCACCGAGCTGATTATGTTCTATATC
 TTCTTCGAGACTACTCTGATCCCTACACTCGCCATTATCACCCGGTGGGGCAACCAGCCTGAGAGACTGAATGCC
 GGGACTTATTTTCTGTTCTACACCCTGGTGGGGTCACTGCCCCCTGCTGATTGCCCTGATCTACACCATAACACA
 CTGGGCTCTCTCAATATCCTGCTGCTCACACTGACAGCCCAGGAGCTGTCCAATTCTTGGGCTAACAATCTGATG
 TGGCTCGCATACACTATGGCCTTCATGGTGAAGATGCCACTCTATGGGCTCCACCTCTGGCTCCCTAAGGCCAC
 GTCGAAGCCCCAATTGCAGGGTCCATGGTGTGGCAGCTGTGCTCCTGAAGCTGGGTGGCTATGGGATGATGCGC
 CTGACCCTGATCCTGAATCCTCTCACAAGCATATGGCTTACCCTTTTCTGGTGTGTCCCTGTGGGGAATGATT
 ATGACAAGCTCTATTTCCTGGCCAGACAGACTGAAAAGCCTGATTGCCCTACAGCATCATGCTATGGCC
 CTGGTGGTGACCGCTATTCTGATTGAGACACCATGGTCTTTTACAGGGGCCGTCATTCTGATGATCGCCACGGA
 CTGACCTCATCACTCCTCTCTGTCTGGCCAACTCAAACACGAAAGGACACACTCAAGAATTATGATTCTGAGC
 CAGGGACTCCAGACTCTGCTCCCCCTCATGGCCTTCTGGTGGCTGCTCGCTCTCTCGCCAACCTGGCCCTCCCT
 CCCACAATCAATCTGCTGGGCGAGCTCAGCGTGTGGTGACCACTTTTAGTTGGTCCAACATCACACTGCTGCTC
 ACCGGACTCAATATGCTGGTCAACCGCCCTGTACAGTCTGTACATGTTCAACACAACACAGTGGGGTAGCCTCACT
 CATCACATTAAATAACATGAAGCCTTCTTTTACTAGGGAAAATACTCTGATGTTTATGCATCTCTCCCCAATCCTC
 CTCTGAGTCTGAACCCCGACATCATCACCGCTTTAGCTCTCTCGAGGAGGATTACAAGGATGACGACGATAAG
 TAGGGCCCGGTACCTTAATTAATTAAGGTACCAGGTAAAGTGACCCCAATTGCCCCCTATAGTGAGTCGTATTACAA
 TTCCTCGATCGGAGCACTGGGACGCCCCACCGCCCTTTCCCTCCGCTGCCAGGCGAGCATGTTGTGGTAATTCT
 GGAACACAAGAAGAGAAATTGCTGGGTTTAGAACAAGATTATAAACGAATTCGGTGTCTAGTGATCACTTGACAG
 TTTTTTTTTTTTTTAAATATTACCCAAAATGCTCCCCAAATAAGAAATGCATCAGCTCAGTCAGTGAATACAAA
 AAGGAATTATTTTCCCTTTGAGGGTCTTTATACATCTCTCCTCCAACCCACCCCTCTATTCTGTTTCTTCTCTC
 TCACATGGGGGTACACATACACAGCTTCCTCTTTTGGTTCCATCCTTACCACCACACCACACGCACACTCCACAT
 GCCAGCAGAGTGCCACTTGGTGGCCAGAAAGTGTGAGCCTCATGATCTGCTGTCTGTAGTTCTGTGAGCTCAGG
 TCCCTCAAAGGCCCTCEGAGCACCCCTTCTGCTGACTGAGCCAGGGCCTGCATTTTGGTTTTCCCCACCCAC
 ACATTCTCAACCATAGTCCTTCTAACAATACCAATAGCTAGGACCCGGCTGCTGTGCACTGGGACTGGGGATTCC
 ACATGTTTGCCTTGGGAGTCTCAAGCTGGACTGCCAGCCCTGTCTCCTCCCTCACCCCCATTGCGTATGAGCATT
 TCAGAACTCCAAGGAGTCACAGGCATCTTTATAGTTACGTTAACATATAGACACTGTTGGAAGCAGTTCCTTCT
 AAAAGGGTAGCCCTGGACTTAATACCAGCCGGATACCTCTGGCCCCCACCCTTACTGTACCTCTGGAGTCACT
 ACTGTGGGTGCGCACTCCTCTGCTACACAGCACGGCTTTTCAAGGCTGTATTGAGAAGGGAAGTTAGGAAGAAG
 GGTGTGCTGGGCTAACCCAGCCACAGAGCTCACATTCCTGTCCCTTGGGTGAAAAATACATGTCCATCCTGATAT
 CTCCTGAATTCAGAAATTAGCCTCCACATGTGCAATGGCTTTAAGAGCCAGAAGCAGGGTCTGGGAATTTTGCA
 AGTTATCCTGTGGCCAGGTGTGGTCTCGGTTACCAAATACGGTTACCTGCAGCTTTTAGTCTTTGTGCTCCCA
 CGGGTCTGCAGAGTCCCATCTGCCCCAAAGGTCTTGAAGCTTGACAGGATGTTTTCATTACTCAGTCTCCAGGGC
 ACTGCTGGTCCGTAGGGATTCAATTGGTGGGGTGGGAGAGTTAAACAACATTTAAACAGAGTCTCTCAAAAATG
 TCTAAAGGGATTGTAGGTAGATAACATCCAATCACTGTTTGCATTATCTGAAATCTTCCCTCTGGCTGCCCCC
 AGGTATTTACTGTGGAGAACATTGCATAGGAATGTCTGAAAAGCTTCTACAACCTGTTACAGCCTTCACATTTG
 TAGAAGCTTTACCGGT

FIGURA 5B (fin)

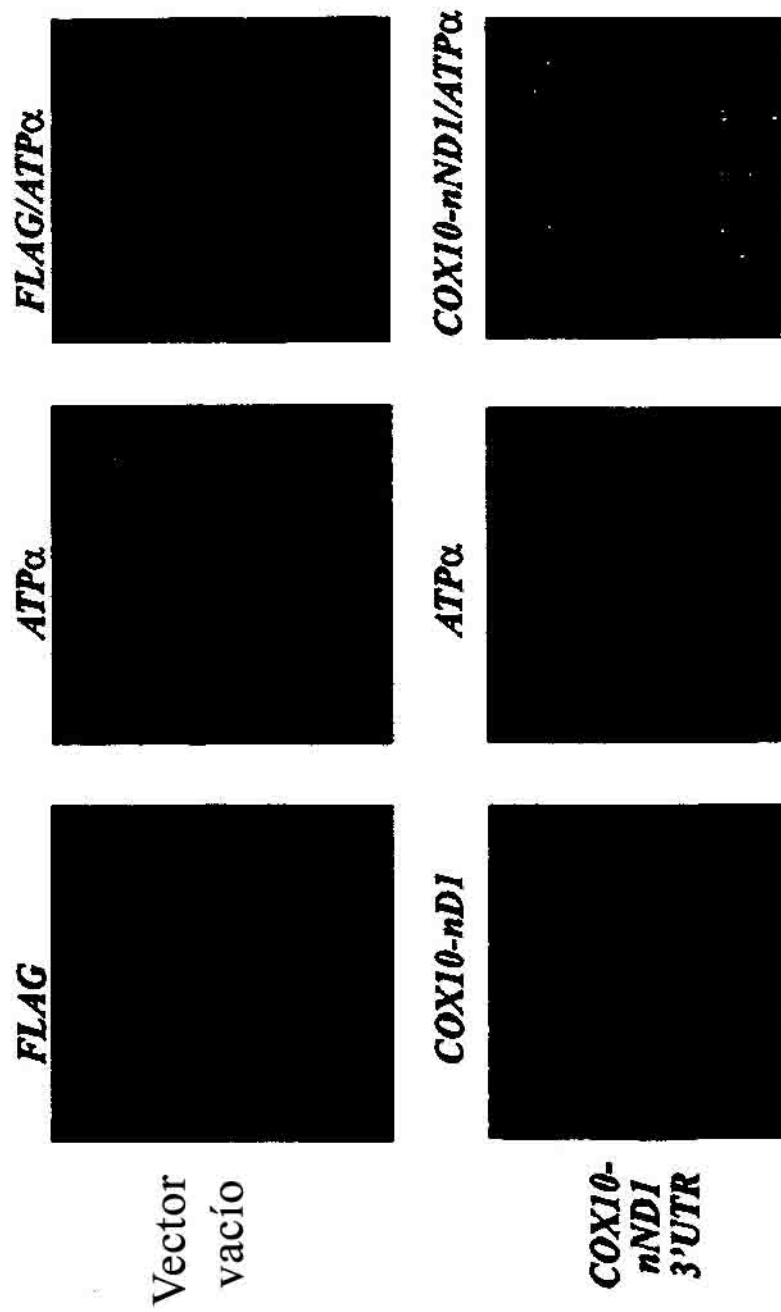


FIGURA 6

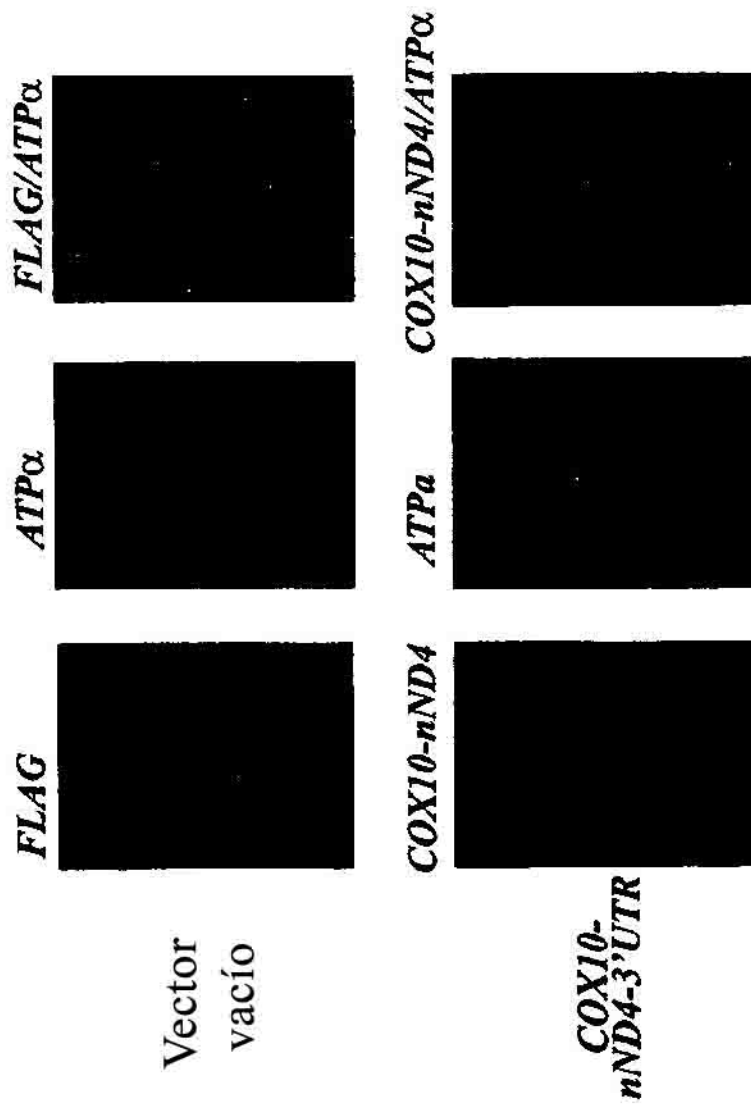


FIGURA 7

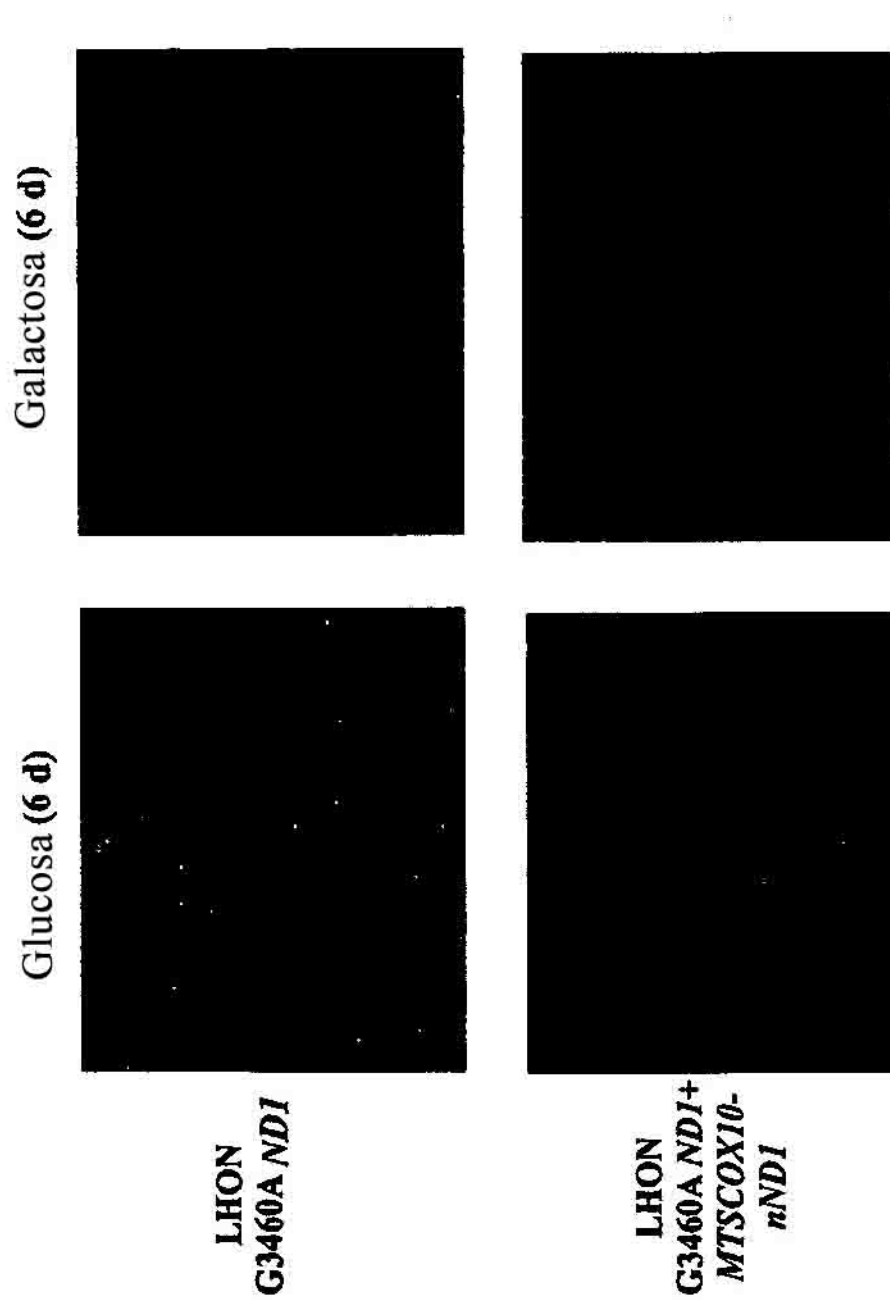


FIGURA 8

nATP6 - SEQ ID NO:27

ATGAACGAAAATCTGTTGCTTCATTCAATTGCCCCACAATCCTAGGCCTACCC
GCCGCAGTACTGATCATTCTATTTCCCCCTCTATTGATCCCCACCTCCAAATATC
TCATCAACAACCGACTAATCACCACCCAACAATGGCTAATCAAACCTAACCTCAAA
ACAAATGATGACCATGCACAACACTAAAGGACGAACCTGGTCTCTTATGCTAGT
ATCCTTAATCATTTTTATTGCCACAACCTAACCTCCTCGGACTCCTGCCTCACTCA
TTTACACCAACCACCCAACCTATCTATGAACCTAGCCATGGCCATCCCCCTTATGG
GCGGGCACAGTGATTATGGGCTTTTCGCTCTAAGATTAAAAATGCCCTAGCCAC
TTCTTACCACAAGGCACACCTACACCCCTTATCCCCATGCTAGTTATTATCGAAA
CCATCAGCCTACTCATTCAACCAATGGCCCTGGCCGTACGCCTAACCGCTAACA
TTACTGCAGGCCACCTACTCATGCACCTAATTGGAAGCGCCACCCTAGCAATGT
CAACCATTAAACCTTCCCTCTACACTTATCATCTTCACAATTCTAATTCTACTGACT
ATCCTAGAAATCGCTGTGCGCTTAATCCAAGCCTACGTTTTACACTTCTAGTAA
GCCTCTACCTGCACGACAACACAGCGGCGCCGCCGGAAGGGC

nND1- SEQ ID NO:28

ATGCCAATGGCAAATCTGCTGCTCCTCATCGTGCCAATCCTGATCGCCATGGCC
TTCTCATGCTGACTGAAAGAAAAATTCTGGGATACATGCAGCTCAGGAAGGGG
CCTAACGTGGTGGGACCTTATGGACTGCTCCAGCCCTTTGCTGATGCTATGAAG
CTGTTCAAAAAGAGCCCCTGAAACCAGCCACCTCTACAATCACCTGTACATT
ACCGCTCCTACCCTGGCTCTGACAATTGCCCTGCTGCTGTGGACCCCTCTCCCT
ATGCCAATCCTCTGGTGAACCTGAATCTGGGCCTCCTCTTTATCCTGGCCACC
AGCAGCCTGGCCGTGTAATCCTGTGGAGCGGATGGGCTTCTAACAGCAA
TTACGCCCTGATCGGTGCCCTGAGGGCCGTGGCCCAGACCATTTCTTACGAGG
TGACCCTCGCCATTATCCTGCTCTCAACCCTGCTGATGAGCGGCTCTTCAACC
TCTCAACCCTGATTACAACCCAGGAGCACCTCTGGCTGCTCCTCCCCAGCTGGC
CACTGGCCATGATGTGGTTTATCAGCACCCCTGGCTGAGACAAACCGGACCCCC
TTTGATCTGGCTGAGGGCGAGTCTGAGCTGGTCTCCGGATTCAATATTGAGTAC
GCAGCAGGGCCATTGCTCTGTTCTTCATGGCCGAGTATACAAATATTATTATGA
TGAACACACTGACTACTACTATCTTCCTGGGTACTACATACGATGCTCTGAGTCC
CGAACTCTACACCACTTACTTCGTGACCAAAACCCTGCTGCTGACTAGCCTGTT
CCTGTGGATCAGGACCGCCTATCCACGATTCCGATACGACCAGCTGATGCATCT
GCTGTGGAAGAACTTCCTGCCACTCACCTGGCTCTGCTCATGTGGTACGTGAG
TATGCCAATCACTATCAGCTCTATCCCTCCACAGACCTA

FIGURA 9

nND4- SEQ ID NO:29

ATGCTGAAGCTGATCGTGCCCACCATTATGCTGCTGCCTCTGACATGGCTGTCT
 AAGAAGCACATGATCTGGATTAAACACAACCACCCACAGCCTGATTATCTCCATCA
 TTCCCCTCCTGTTCTTCAACCAGATCAACAACAACCTGTTCTCCTGCTCACCTAC
 TTTTAGCAGCGATCCACTGACAACCCCACTGCTGATGCTGACAACCTGGCTCCT
 CCCCCTGACAATCATGGCTTCCCAGAGGCACCTGAGCAGCGAGCCACTGTCCC
 GCAAAAAGCTGTACCTGTCCATGCTGATTTCTCTCCAGATCTCACTCATCATGAC
 CTTCACTGCCACCGAGCTGATTATGTTCTATATCTTCTTCGAGACTACTCTGATC
 CCTACACTCGCCATTATCACCCGGTGGGGCAACCAGCCTGAGAGACTGAATGC
 CGGGACTTATTTTCTGTTCTACACCCTGGTGGGGTCACTGCCCTGCTGATTGC
 CCTGATCTACACCCATAACACACTGGGCTCTCTCAATATCCTGCTGCTCACACT
 GACAGCCCAGGAGCTGTCCAATTCTTGGGCTAACAATCTGATGTGGCTCGCATA
 CACTATGGCCTTCATGGTGAAGATGCCACTCTATGGGCTCCACCTCTGGCTCCC
 TAAGGCCACGTCGAAGCCCCAATTGCAGGGTCCATGGTGCTGGCAGCTGTGC
 TCCTGAAGCTGGGTGGCTATGGGATGATGCGCCTGACCCTGATCCTGAATCCT
 CTCACAAAGCATATGGCTTACCCTTTTCTGGTGCTGTCCCTGTGGGGGAATGATT
 ATGACAAGCTCTATTTGCCTGCGCCAGACAGACCTGAAAAGCCTGATTGCCTAC
 AGCAGTATCAGTCATATGGCCCTGGTGGTGACCGCTATTCTGATTCAGACACCA
 TGGTCTTTTACAGGGGGCCGTCATTCTGATGATCGCCACGGACTGACCTCATCA
 CTCCTCTTCTGTCTGGCCAACTCAAACCTACGAAAGGACACACTCAAGAATTATGA
 TTCTGAGCCAGGGACTCCAGACTCTGCTCCCCCTCATGGCCTTCTGGTGGCTG
 CTCGCCTCTCTCGCCAACCTGGCCCTCCCTCCCAACATCAATCTGCTGGGCGA
 GCTCAGCGTGCTGGTGACCACTTTTAGTTGGTCCAACATCACACTGCTGCTCAC
 CGGACTCAATATGCTGGTCACCGCCCTGTACAGTCTGTACATGTTCAACACAAC
 ACAGTGGGGTAGCCTCACTCATCACATTAATAACATGAAGCCTTCTTTTACTAGG
 GAAAATACTCTGATGTTTATGCATCTCTCCCAATCCTCCTCCTGAGTCTGAACC
 CCGACATCATCACCGGCTTTAGCTCT

FIGURA 9 (fin)

COX10 MTS- SEQ ID NO: 30

ATGGCCGCATCTCCGCACACTCTCTCCTCACGCCTCCTGACAGGTTGCGTAGG
AGGCTCTGTCTGGTATCTTGAAGTCGACCGC

COX10 3'UTR- SEQ ID NO: 59

GAGCACTGGGACGCCCACCGCCCCTTTCCCTCCGCTGCCAGGCGAGCATGTTG
TGGTAATTCTGGAACACAAGAAGAGAAATTGCTGGGTTTAGAACAAGATTATAAA
CGAATTCGGTGCCCAAGTGATCACTTGACAGTTTTTTTTTTTTTAAATATTACCCA
AAATGCTCCCCAAATAAGAAATGCATCAGCTCAGTCAGTGAATACAAAAAAGGAA
TTATTTTCCCTTTGAGGGTCTTTATACATCTCTCCTCCAACCCACCCCTCTATT
TGTTTCTTCTCCTCACATGGGGGTACACATACACAGCTTCTCTTTTGGTTCCA
TCCTTACCACCACACCACACGCACACTCCACATGCCAGCAGAGTGGCACTTG
GTGGCCAGAAAGTGTGAGCCTCATGATCTGCTGTCTGTAGTTCTGTGAGCTCAG
GTCCCTCAAAGGCCTCGGAGCACCCCTTCTGGTGACTGAGCCAGGGCCTGC
ATTTTTGGTTTTCCCCACCCACACATTCTCAACCATAGTCCTTCTAACAAATACCA
ATAGCTAGGACCCGGCTGCTGTGCACTGGGACTGGGGATTCCACATGTTTGCC
TTGGGAGTCTCAAGCTGGACTGCCAGCCCTGTCTCCTTCCCTTCAACCCATTGC
GTATGAGCATTTTCAAGACTCCAAGGAGTCACAGGCATCTTTATAGTTCAGTTAA
CATATAGACACTGTTGGAAGCAGTTCCTTCTAAAAGGGTAGCCCTGGACTTAATA
CCAGCCGGATACCTCTGGCCCCACCCATTACTGTACCTCTGGAGTCACTACT
GTGGGTCGCCACTCCTCTGCTACACAGCACGGCTTTTTCAAGGCTGTATTGAGA
AGGGAAGTTAGGAAGAAGGGTGTGCTGGGCTAACCAGCCACAGAGCTCACAT
TCCTGTCCCTTGGGTGAAAAATACATGTCCATCCTGATATCTCCTGAATTCAGAA
ATTAGCCTCCACATGTGCAATGGCTTTAAGAGCCAGAAGCAGGGTTCTGGGAAT
TTTGCAAGTTATCCTGTGGCCAGGTGTGGTCTCGGTTACCAAATACGGTTACCT
GCAGCTTTTTAGTCCTTTGTGCTCCACGGGTCTGCAGAGTCCCATCTGCCCAA
AGGTCTTGAAGCTTGACAGGATGTTTTCACTACTCAGTCTCCAGGGCACTGCT
GGTCCGTAGGGATTCAATTGGTCGGGGTGGGAGAGTTAAACAACATTTAAACAGA
GTTCTCTCAAAAATGTCTAAAGGGATTGTAGGTAGATAACATCCAATCACTGTTT
GCACTTATCTGAAATCTTCCCTCTTGGCTGCCCCCAGGTATTTACTGTGGAGAA
CATTGCATAGGAATGTCTGGAAAAAGCTCCTACAACCTTGTTACAGCCTTCACATT
TGTAGAAGCTTT

SOD2MTS- SEQ ID NO: 31

ATGTTGAGCCGGGCAGTGTGCGGCACCAGCAGGCAGCTGGCTCCGGTTTTGG
GGTATCTGGGCTCCAGGCAGAAGCACAGCCTCCCCGACGCGGTTCGACCGC

SOD2 3'UTR- SEQ ID NO: 60

TTATGCTGAGTATGTTAAGCTCTTTATGACTGTTTTTGTAGTGGTATAGAGTACTG
CAGAATACAGTAAGCTGCTCTATTGTAGCATTTCTGATGTTGCTTAGTCACTTA
TTTCATAAACAACTTAATGTTCTGAATAATTTCTTACTAACATTTTGTATTGGGC
AAGTGATTGAAAATAGTAAATGCTTTGTGTGATT

FIGURA 10

Aconitasa (ACO2)

Número de entrada: NP_001089

Secuencia de la proteína: 780 aa (SEQ ID NO: 4B)

mapysllvtr lqkalgvryq hvasvlcqra kvamshfepn eyihydlek ninivrkrln
 rptllsekiv yghlddpasq eiergksylr lrpdrvamqd ataqmamlqf issglskvav
 pstihcdhli eaqvvggedl rrakdindev ynflatagak ygvqfwkpgs giihqilen
 yaypgvllig tdshtpnggg lggicigvgg adavdvmmagi pwelkcpgvi gvkltgslsg
 wsspkdvilk vagiltvkkg tgaiveyhgq gvdsisctgm aticnmgaei gattsvfpyn
 hrmkkylskt gredianlad efkdhlvpdp gchydqli ei nlselkphin gpftpdlahp
 vaevgkvaek egwpldirvg ligscntssy edmgrsaava kqalahglkc ksqftitpgs
 eqiratierd gyaqilrdlg givlanacgp cigqwdrkdi kkgckntivt synrntfgrn
 danpethafv tspeivtala iagtlkfne tdytgdgk kfrleapdad elpkgefddp
 qdtyqhppkd ssgqhvdvsp tsqrlqlep fdkwdgkde diqilikvkg kcttdhisaa
 gpwlkfrghl dnisnllig ainiengkan svnavtqef gpvpdtaryy kkhgrwvvi
 gdenygegss rehaaleprh lggraiitks farhetnik kqglplitfa dpadynkihp
 vdkltiqlk dftpgkplk iikhpngtqe tillnhtfne tqiewfrags alnmkelq
 //

Secuencia MTS

Carga neta de secuencia problema

+0

Región analizada

37

Número de residuos básicos en la secuencia de direccionamiento:

5

Número de residuos ácidos en la secuencia de direccionamiento:

0

Sitio de escisión:

31

Secuencia escindida: **MAPYSLLVTRLQKALGVRQYHVASVLCQRA (SEQ ID NO: 32)****Secuencia 3'UTR (Nº de entrada # CC373828; SEQ ID NO: 33)**

gggcagtgcc	tccccgcccc	gccgctggcg	tcaagttcag	ctccacgtgt	gccatcagtg	60
gatccgatcc	gtccagccat	ggcttcttat	tccaagatgg	tgtgaccaga	catgcttctt	120
gtccccgct	tagccccag	agtgactgtg	gttggtgtgg	gggggttctt	aaaataactt	180
tttagcccc	gtcttcttat	tttgagtttg	gttcagatct	taagcagctc	catgcaactg	240
tatttatctt	tgatgacaag	actcccatct	aaagtttttc	tctgcctga	tcatttcatt	300
ggtggctgaa	ggattctaga	gaaccttttg	ttcttgcaag	gaaaacaaga	atccaaaacc	360
agaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aa				382

//

FIGURA 11A

Superóxido dismutasa mitocondrial (SOD2)**Número de entrada: P04179**

Secuencia de la proteína: 222 aa (SEQ ID NO: 49)
 mlsravcgts rqlapalgyl gsrqkhsldp lpydygalep hinaqimqlh hskhhaayvn
 nlnvteekyq ealakgdvta qialqpaikf nggghinhsi fwtnlspngg gepkgellea
 ikrdfgsfdk fkektaasv gvqgsgwgl gfnkerghlq iaacpnqdpI qgttgliplI
 gidvwehayy lqyknvrpdY lkaiwnvinw envterymac kK

Secuencia MTS

Carga neta de secuencia problema: +2
 Región analizada: 29
 Número de residuos básicos en la secuencia de direccionamiento: 4
 Número de residuos ácidos en la secuencia de direccionamiento: 0
 Sitio de escisión: 21
 Secuencia escindida: **MLSRVCGTSRQLAPALGYL (SEQ ID NO: 34)**

Secuencia 3'UTR (Nº de entrada # CC263966; SEQ ID NO: 35)

accacgatog	ttatgctgat	cataccctaa	tgatcccagc	aagataacgt	cctgtcttct	60
aagatgtgca	tcaagcctgg	tacatactga	aaaccctata	aggtcctgga	taatttttgt	120
ttgattattc	attgaagaaa	catttatatt	ccaattgtgt	gaagtttttg	actgttaata	180
aaagaatctg	tcaaccatca	aaaaaaaaaa	aaaa			214
//						

FIGURA 11B

Subunidad beta de ATP sintasa (ATP5b)

Número de entrada: NP_001677

Secuencia de la proteína: 529 aa (SEQ ID NO: 50)

mlgfvgrvaa apasgalrrl tpsaslppaq llraaptav hpvrdayaaqt spspkagaat
grivavigav vdvqfdeglp pilnalevqg retrivleva qhlgestvrt iamdgteglv
rgqkvldsga pikipvgpet lgrimnvige pidergpikt kqfapihaea pefmemsveq
eilvtgikvv dllapyakgg kiglfggagv gktvlimeli nnvakahggy svfagvgert
regndlyhem iesgvinkd atskvalvyg qmneppgara rvaltgitva eyfrddegqd
vllfidnifr ftqagsevsal lgripsavg yqptlatdmg tmqerittk kgsitsvqai
yvpaddltdp apattfahld attvlrsraia elgiypavdp ldstrimdp nivgsehydv
argvqkilqd ykskdiiai lgmdelseed kltvsrarki qrlsqpfqv aevftghmgk
lvplketikg fqqilageyd hpeqafymv gpieeavaka dklaeeshs

Secuencia MTS

Carga neta de secuencia problema: -15

Región analizada: 71

Número de residuos básicos en la secuencia de direccionamiento: 7

Número de residuos ácidos en la secuencia de direccionamiento: 1

Sitio de escisión: 64

Secuencia escindida

**MLGFVGRVAAAPASGALRRLTPSASLPPAQLLLRAAPTAVHPVRDYAAQTSPSP
KAGAATGRI (SEQ ID NO: 36)**

Secuencia 3'UTR (Nº de entrada # CC313884; SEQ ID NO: 37)

gggggtctttg tctctgtac tgtctctctc cttgccccta acccaaaaag cttcattttt	60
ctgtgtaggc tgcacaagag ccttgattga agatatattc tttctgaaca gtattttaagg	120
tttccaataa aatgtacacc cctcagaaaa aaaaaaaaaa aa	162

FIGURA 11C

Ubiquinol-citocromo c reductasa, polipéptido 1 hierro-azufre de Rieske (UQCRFS1)

Número de entrada: NP_005994

Secuencia de la proteína: 274 aa (SEQ ID NO: 51)

mlsvaarsgp fapvltsatr gvaglrplv qatvpatpeq pvlldkrpfl sreslsgqav
rrplvasvgl nvpasvcysh tdikvpdfse yrrlevldst kssressear kgfsylvtg
ttvgvayaak navtqfvssm sasadvlala kieiklsdip egknmafkwr gkplfvrht
qkeiegeaav elsqldpqh dldrvkkpew viligvcthl gcvpianagd fggyycpchg
shydasgrir lgpaplnlev ptyeftsddm vivg

Secuencia MTS

Carga neta de secuencia problema: +3

Región analizada: 38

Número de residuos básicos en la secuencia de direccionamiento: 3

Número de residuos ácidos en la secuencia de direccionamiento: 0

Sitio de escisión: 37

Secuencia escindida:

MLSVAARSGPFAPVLSATSRGVAGALRPLVQATVPA (SEQ ID NO: 38)

Secuencia 3'UTR (Nº de entrada # CC310484; SEQ ID NO: 39)

gagacttgga ctcaagtcac aggettcctt cagtctttat gtcacctcag gagacttatt	60
tgagagggaag ccttctgtac ttgaagttga ttgaaatat gtaagaattg atgatgtatt	120
tgcaaacatt aatgtgaaat aaattgaatt taatgttgaa tactttcagg cattcactta	180
ataaagacac tgtaagcac tggtatgctc agtcaaaaaa aaaaaaaaaa aaa	233

FIGURA 11D

Subunidad de 51 kDa de la NADH-ubiquinona oxidorreductasa, precursor mitocondrial (Complejo I-51KD) (CI-51 KD) (flavoproteína 1 de NADH deshidrogenasa); NDUFV1

Número de entrada: **P49821**

Secuencia de la proteína: 464 aa (SEQ ID NO: 52)
 mlatrllgw slparvsvrf sgdttapkkf sfgslkdedr iftnlygrhd wrkgsisrg
 dwyktkeill kgpdwilgei ktsgrlrggg agfptglkws fmnkpsdgrp kylvvnadeg
 epgtckdreil lrhdpkhle gclvggramg araayiyirg efyneasnlq vaireayeag
 ligknacgsg ydfdvfvrg agayicgeet aliesiegkq gkprlkppfp advgvfgcpt
 tvanvetvav spticrrgt wfagfgrern sgtklfnisg hvnhpctvee emsvplkeli
 ekhaggvtgg wdnllavipg gsstplipks vcetvlmdfd alvqaqtglg taavivmdrs
 tdvkaialr iefykhescg qctpcregvd wmnkvmarfv rgdarpaeid slweiskqie
 ghticalgdg aawpvqglir hfrpeleerm qrfaqhqar qaas

Secuencia MTS

Carga neta de secuencia problema:	+5
Región analizada:	36
Número de residuos básicos en la secuencia de direccionamiento:	7
Número de residuos ácidos en la secuencia de direccionamiento:	1
Sitio de escisión:	21

Secuencia escindida: **MLATRLLGWSLPARVSVRF (SEQ ID NO: 40)**

Secuencia 3'UTR (Nº de entrada # CR041510; SEQ ID NO: 41)

cccaccaccc tggcctgctg tctgctgtct atccatgtgg aatgctggac aataaagcga
 gtgctgccca cctccaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa

60
 102

FIGURA 11E

Flavoproteína 2 de NADH deshidrogenasa (ubiquinona), 24kDa; NDUFV2

Número de entrada: **NP_066552**

Secuencia de la proteína: 249 aa (SEQ ID NO: 53)

mffsaalar aagltahwgr hvmlhktam qngaggalfv hrdtpennpd tpfdfpeny
krieaivkny peghkaaavl pvlalaqrqn gwlpisamnk vaevlqvppm rvevatfyt
mynrkpvgy hiqvcttptc mlmsdsile aiqkklgikv gettpdklft lieveclgac
vnapmvqind nyedltakd ieeidelka gkipkpgprs grfscepagg ltslteppkg
pgfgvqagl

Secuencia MTS

Carga neta de secuencia problema: +2

Región analizada: 42

Número de residuos básicos en la secuencia de direccionamiento: 6

Número de residuos ácidos en la secuencia de direccionamiento: 0

Sitio de escisión: 44

Secuencia escindida:

MFFSAALRARAAGLTAHWGRHVRNLHKTAMQNGAGGALFVHRD (SEQ ID NO: 42)

Secuencia 3'UTR (Nº de entrada # CC385433; SEQ ID NO: 43)

tttatattga actgtaaata tgcactaga gaaataaaat atggacttcc aatctacgta
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa

60

97

FIGURA 11F

Precursor de aldehído deshidrogenasa 2 mitocondrial (ALDH2)

Número de entrada: **NP_00681**

Secuencia de la proteína: 517 aa (SEQ ID NO: 54)

mlraaarfgp rlgrrllsaa atqavpapnq qpevfncqif innewhdavs rktftvnp
tgevicqvae gdkedvdkav kaaraafqlg spwrmdash rgrlnrlad lierdtyla
aletldngkp yvisylvld mlkclryya gwadkyhgkt ipidgdffsy trhepvvgc
qiipwnfppl mqawklgpal atgnvvvmkv aeqtpltaly vanlikeagf ppgvvni
vgpfgptagaia shedvdkvaf tgsteigrvi qvaagssnlk rvtelggks pni
msdadm dwaveqahfa lfnqggccc agsrtfvqed iydefversv araksvvgn
pfdskteqgp qvdetqfki lgyintgkqe galkcgggi aadrgyfiqp tvfgdvq
dgm tiakeeifgp vmqilkfkti eevvgranns tyglaaavft kdldkanyls
qalqagtvvv ncydvfgaqs pfggykmsgs grelgeyglq aytevkttv
kvpqkns

Secuencia MTS

Carga neta de secuencia problema: -1

Región analizada: 32

Número de residuos básicos en la secuencia de direccionamiento: 5

Número de residuos ácidos en la secuencia de direccionamiento: 0

Sitio de escisión: 25

Secuencia escindida: **MLRAAARFGPRLGRLLSAAATQA (SEQ ID NO: 44)**

Secuencia 3'UTR (Nº de entrada # CC369460; SEQ ID NO: 45)

gaatcatgca agcttctctc ctcagccatt gatggaaagt tcagcaagat cagcaacaaa	60
accaagaaaa atgatacctg cgtgctgaat atctgaaaag agaaattttt cctacaaaat	120
ctcttggttc aagaaagttc tagaatttga attgataaac atggtgggtt ggctgagggt	180
aagagtatat gaggaacctt ttaaaccgaca acaatactgc tagctttcag gatgattttt	240
aaaaaataga ttcaaatgtg ttatcctctc tctgaaacgc ttccataaac tcgagtttat	300
aggggaagaa aaagctattg ttacaatta taccctcatt aaggcaactg ctacaccctg	360
cttctgtattc tgggctaaga ttcatataaa actagctgct cttaaaaaaa aaaaaaaaaa	420
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	450

FIGURA 11G

Hemo A:farnesiltransferasa (COX10)Número de entrada: **NP_001294**

Secuencia de la proteína: 443 aa (SEQ ID NO: 55)

maasphtlss rlltgcvggs vwylerrtiq dsphkflhl mvnkqwif qhfsflkrmy
 vtqlnrshnq qvrpkpepva spflektssg qakaeiyemr plspplslls rkpnekelie
 lepdsvieds idvgketkee krwkemklqv ydlpgilarl skikltalvv sttaagfala
 ppgfdwpcfl ltsvgtglas caansinqff evpfdsnmnr tknrplvrgq ispllavsa
 tccavpgvai ltlgvnpltg alglfnifly tccytlpkri siantwvgav vgaippvmgw
 taatgsldag aflggilys wqlphfnals wglredysrg gycmmsvthp glcrrvalrh
 clallvlsaa apvldittwt fpimalpina yisylgrfy vdadrrssrr lffcsllwhlp
 llllmltck rpsgggdagp pps

Secuencia MTS

Carga neta de secuencia problema:

+15

Región analizada:

24

Número de residuos básicos en la secuencia de direccionamiento:

1

Número de residuos ácidos en la secuencia de direccionamiento:

0

Sitio de escisión:

21

Secuencia escindida: **MAASPHTLSSRLLTGCVGGS (SEQ ID NO: 46)****Secuencia 3'UTR (Nº de entrada # CC352261; SEQ ID NO: 47)**

gtgttgatgt	atcacctccc	caaaactgtt	ggtaaattgtc	agatttttttc	ctccaagagt	60
tgtgtttttg	tgttattttg	tttcaactcaa	atatttttgcc	tcattattctt	tgtttttaaaa	120
gaaagaaaac	agggcgggca	cagtgggtca	tgccctgtaat	cccagcactt	tgggaggtcg	180
aggtgggtgg	atcacttggg	gtcagggttt	gagaccagcc	tggecaacat	ggcgggaacc	240
tgtctctacc	aaaattacaa	aaatttagccg	agcatgggtgg	cgcattgctg	tagtcgcagc	300
tactcgcgag	gttgaggcag	gagaattgct	tgaacccagg	aagtggcagt	tgcagtgcgc	360
cgagacgaca	ccactgcact	ccagcctggg	tgacagaggg	agactctgtc	tcgaaaagaaa	420
gaaagaaaaa	aaggaaggaa	ggagaaggaa	ggaaggagaa	gaaaaggtac	ctgttctacg	480
tagaacacct	ttgggtggagt	tccatcaact	cgcaaagtag	aatccttacc	tactactctt	540
ctgataataa	ttttaaatatt	ttttatgttt	ggttgatgcg	agcagctgca	ctgctcatgc	600
agttagctag	catgtgacat	catgtgacaa	agttcatgta	attagatgga	agaaacctca	660
ctgattaatt	ttaagaacct	tttagggatg	caggaacaat	gaagtggcca	cagtatgtgc	720
tgtttttgaa	gcatttttaa	aaacgaattg	tagttgtttt	tcttcattta	aaatggatct	780
gttggagggt	atgtgtgtat	gttgtagtgt	tattgcagcc	acaataattt	taccaaagtt	840
ttcacatagg	cagttagcct	ttacttaata	tcaagacaag	tgaaaaaata	ttggcatcga	900
tgaacccgat	aacattggcc	tcattggatt	tctttaccca	ttcacagtgt	aaagaagtta	960
ccttcattgt	ttcattgtac	ctgcaggcct	gtgggcttgt	acagtagata	attaatttct	1020
aaaaagaaca	gctgcctatt	ttcttcctag	gttaggttat	atcttcataa	tcacaagaat	1080
tagtgatggc	aaaataaaaat	tttgccttat	aatcttttac	attgtttata	tatgattaat	1140
atcatcatat	atattttctg	tattaagctc	atttggtctc	atttaagctg	tatacttagt	1200
catatatctt	tcattagttc	tatggatatg	agcagatccc	tttactggag	cccagtatgt	1260
gctgtgtgag	ttagaagtca	ttcttgctga	gaaggtgaat	aggtagggat	ttgccttgtt	1320
ttgtaagtct	acaattttgcc	aagagtaaat	aacactggac	cagctgtaaa	agtaaacagt	1380
gtgtttatgc	attgagatac	taaagcattt	aagaaaaaat	taaaa		1425

//

FIGURA 11H

Adenilato quinasa 2 (AK2)Número de entrada: **P54819**

Secuencia de la proteína: 239 aa (SEQ ID NO: 56)

mapsvpaaep eykpgiravl lgppgagkgt qaprlaenfc vchlatgdml ramvasgsel

gkklkatmda gklvsdemvv elieknletp lckngfildg fprtvraem lddlmekrke

kldsviefsi pdsllirrit grlihpksgr syheefnppk epmkdditge plirrsddne

kalkirlqay htqtlpiey yrkrghsai dasqtpdvvf asilaafska tckdlvmfi

Secuencia MTS

Carga neta de secuencia problema: +1

Región analizada: 8

Número de residuos básicos en la secuencia de direccionamiento: 0

Número de residuos ácidos en la secuencia de direccionamiento: 0

Sitio de escisión:

Secuencia escindida:

Secuencia 3'UTR (Nº de entrada # CC221872; SEQ ID NO: 57)

tatcagaagg	ccaggcgaga	ctgcaacact	gctcatcacc	ccgcggcgtg	atccctgctc	60
ttaggtgctg	ggcagagggg	aagggtggtc	agggtgagga	tggtgagggg	gggctggtga	120
ggggctcaga	ggaatacttg	gaacaatagc	agtgttattg	tagtgtggca	gtttctttta	180
tacatagggtg	agagttttta	aagtgttaagg	gaaaaattaa	ttttttaaaa	aacaccatgc	240
ttggagggtg	ggggtagaaa	tagacacaa	attattttct	aggaatcggg	ttttcattta	300
ctctggactg	gtgaaaatat	tttttaaaagc	cagtgtctct	agacctcagc	ttttatctca	360
gaaccccatg	ggttccagac	caagagtaca	ggaaatcaaa	ttgttgtcct	gtctgtctat	420
agcttggaac	agggagcttt	gattactgac	tccggttcca	cacactgtaa	gatcaaaaac	480
catctccaca	tttgaaagag	atgtaagggt	tattcatagg	gatggtggct	caacaaatca	540
agcaaaactgg	aatcaagggg	agggggaagg	gaatgaaatg	gaaagggagg	ctgattccct	600
tcccctgact	taccactaat	ttactaggct	acctactttc	atgagtaacc	tctcacagct	660
accagcaca	tgccacaatc	ctatgctctt	gccttctttt	atctgcactg	tgtgaaggga	720
ctctttttaa	taaatgagca	agtgtcctaa	gctatgtcat	ccaaagattg	tcctttccat	780
tctcaaatcc	tgtgactggg	atcactcaac	agcaactgtg	tgtattattt	tcaatgaggt	840
gccttctaaa	actgaccaaa	tgctgccttg	tttggccctt	aaatcaataa	aatatgttaa	900
aatttgaaaa	aaaaaaaaaa	aa				922

FIGURA 11I

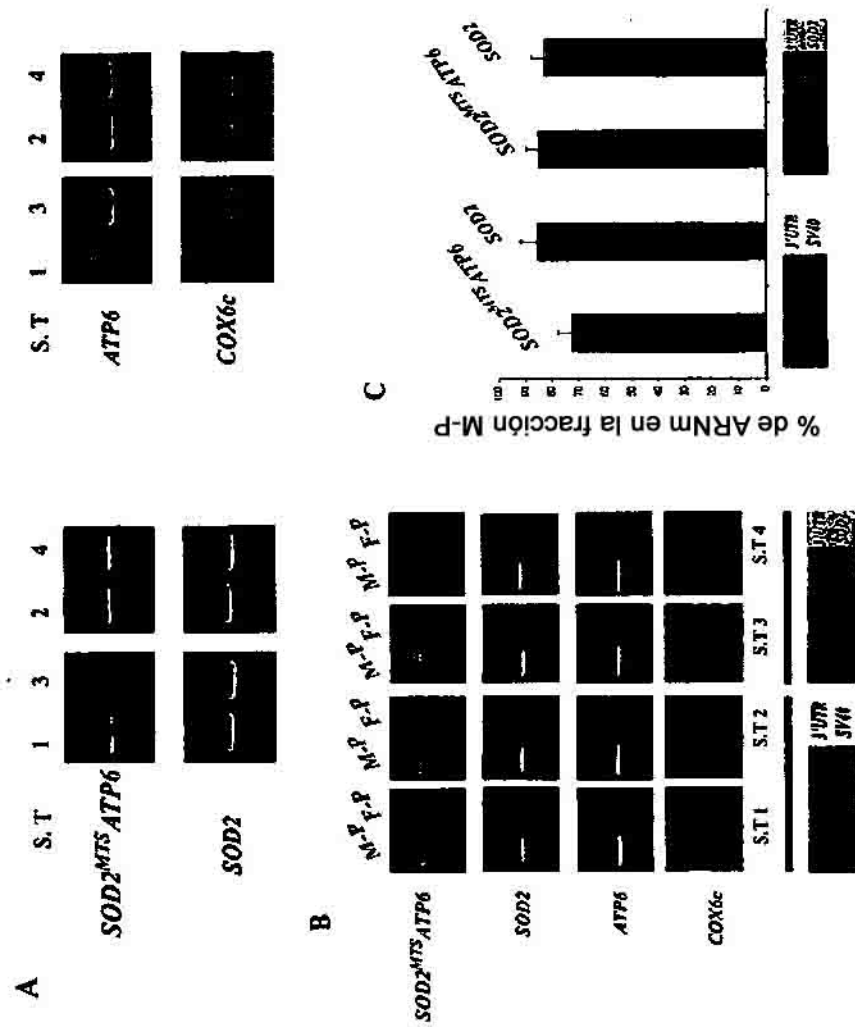


FIGURA 12

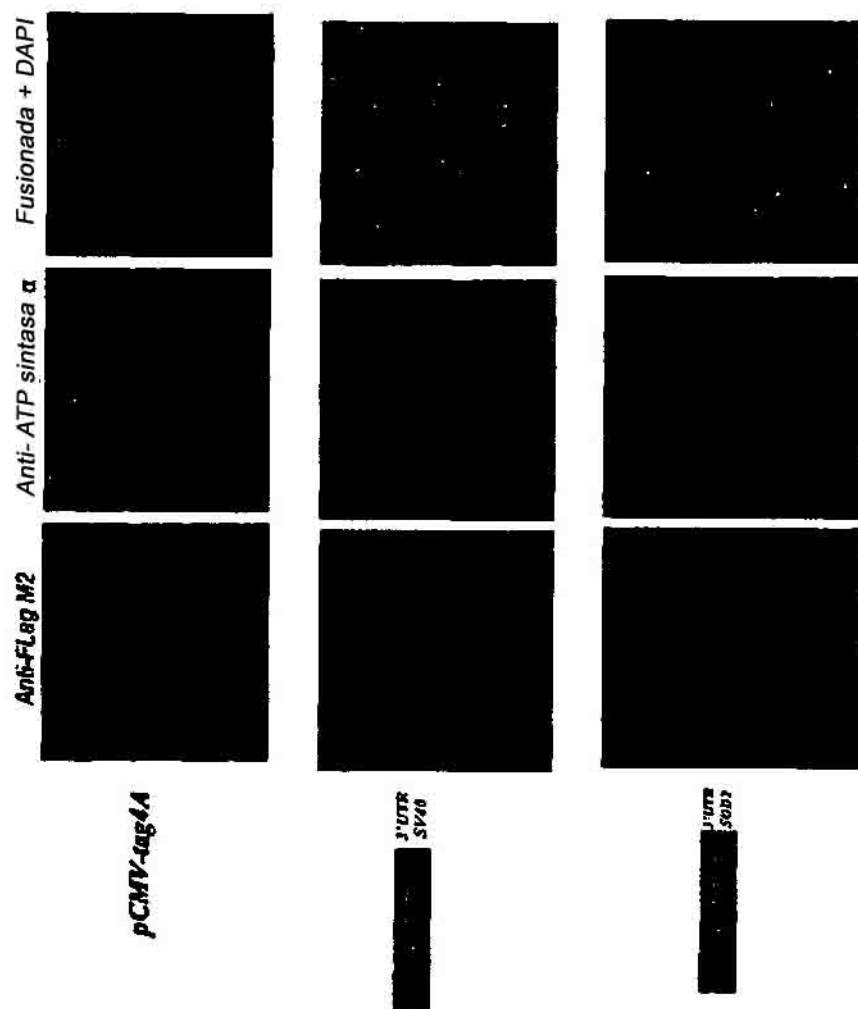


FIGURA 13

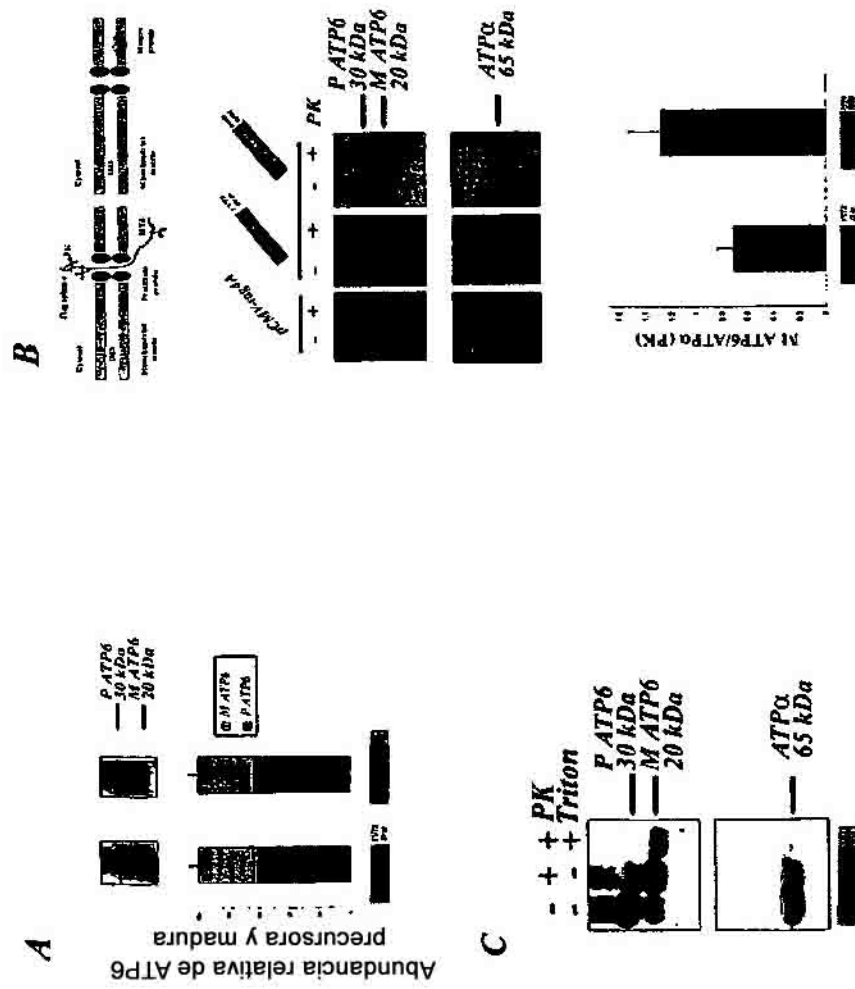


FIGURA 14

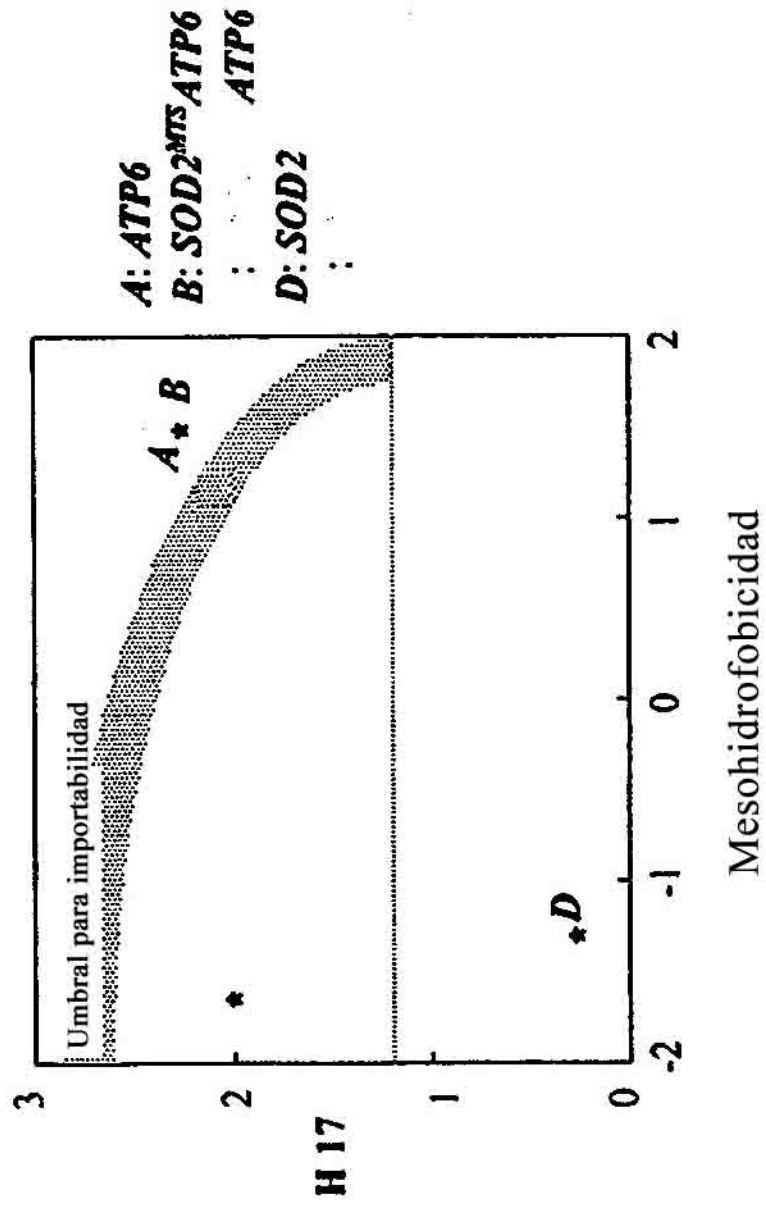


FIGURA 15

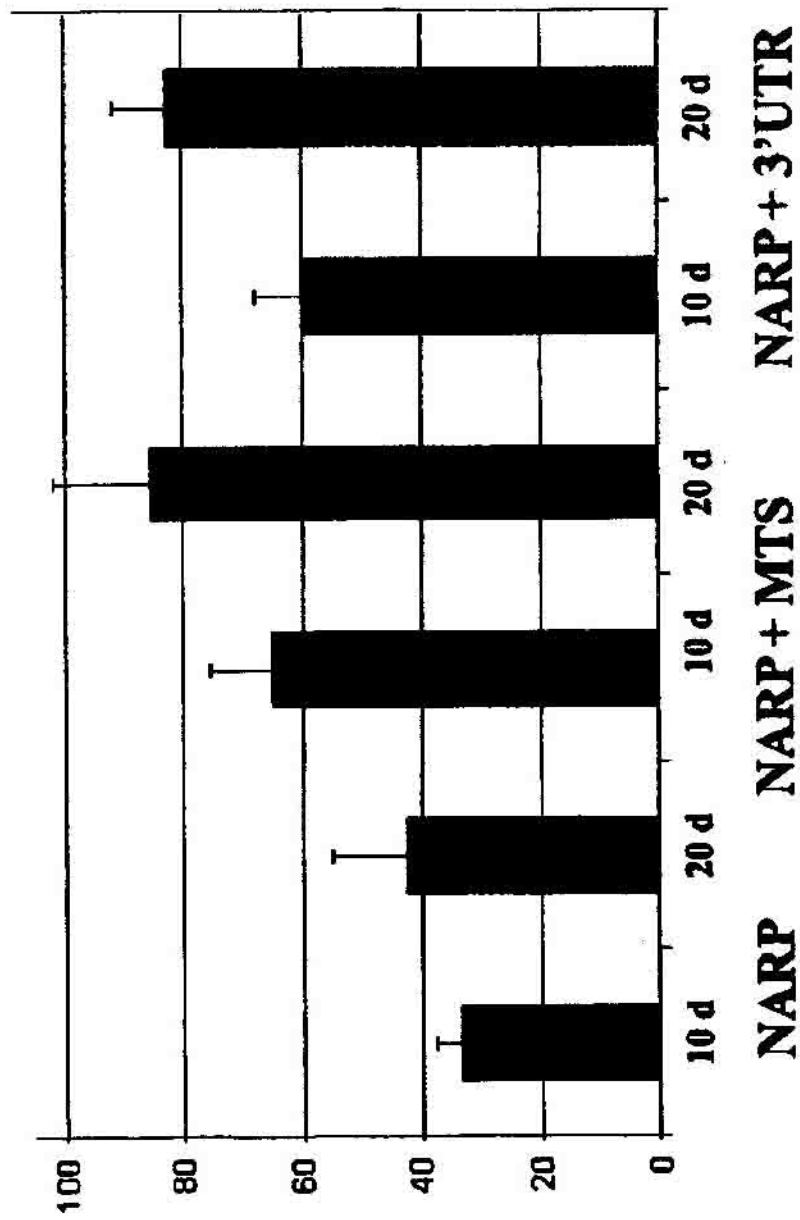


FIGURA 16

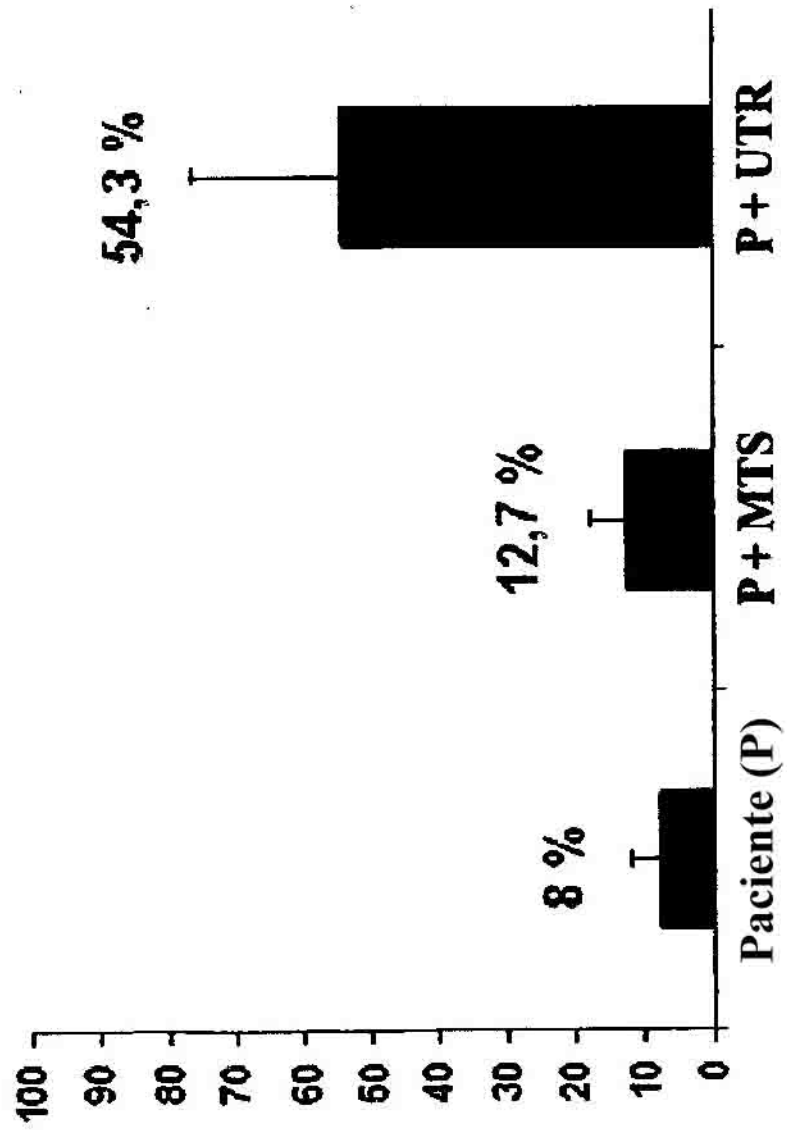


FIGURA 17

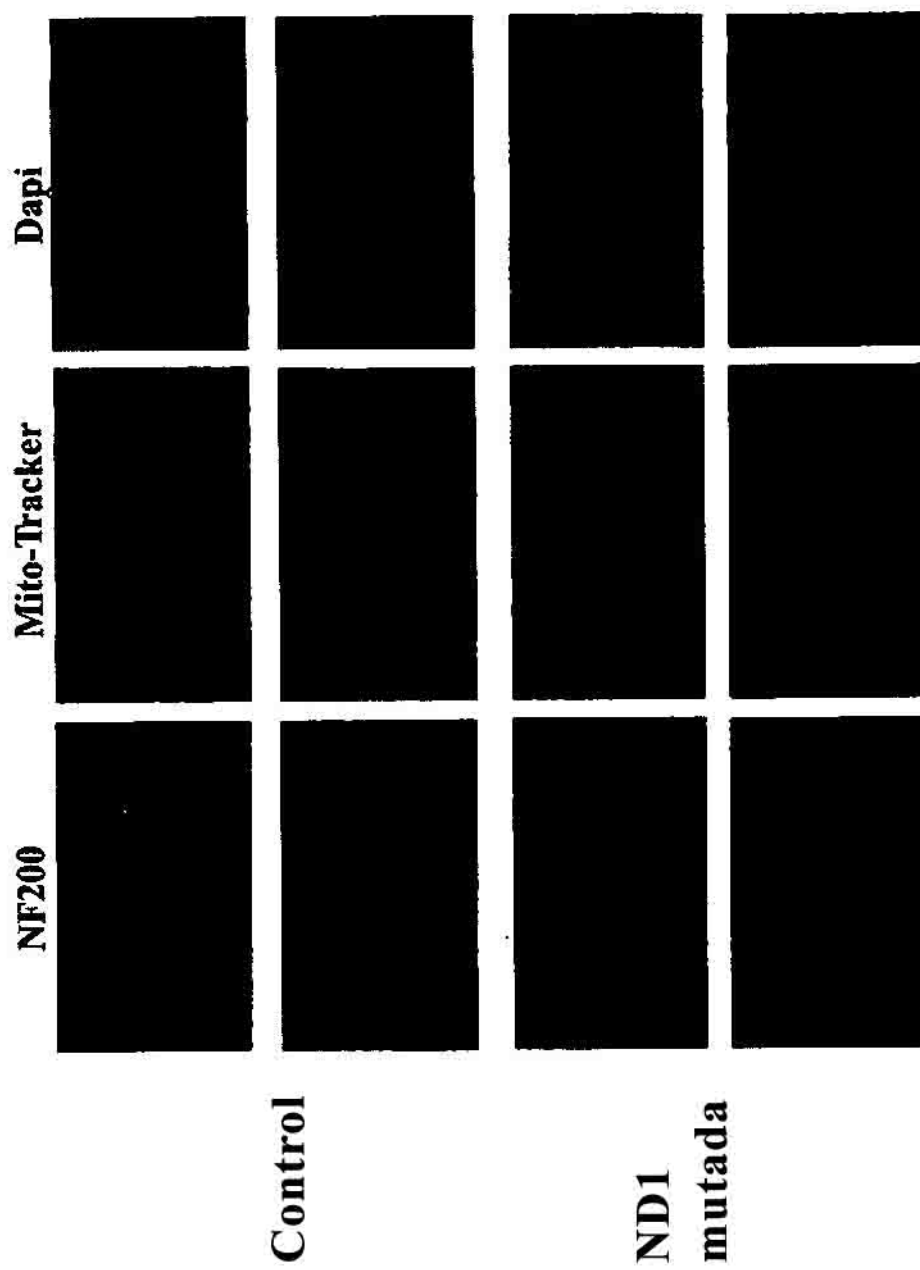


FIGURA 18

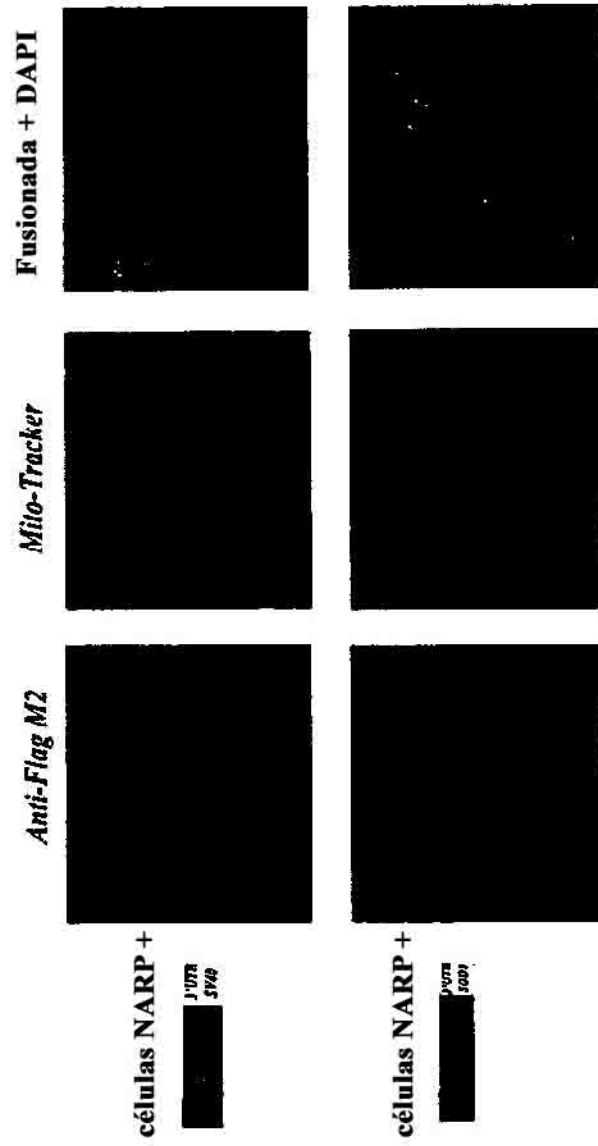


FIGURA 19