



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

IV. IKERGAZTE NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2021eko ekainaren 9, 10 eta 11a
Gasteiz, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

**ATAD3 gene-familian de novo
duplikazioek Harel-Yoon
sindromea sortzen dute, eta
kolesterolaren eta mitokondrien
metabolismoan kalteak eragiten
dituzte**

*Mikel Muñoz-Oreja, Adam Gunning,
Uxo Fernandez-Pelayo, Romina
Durigon, Antonella Spinazzolla,
Sian Ellard eta Ian Holt*

273-280 or.
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iv.05.36>



ATAD3 gene-familian *de novo* duplikazioek Harel-Yoon sindromea sortzen dute, eta kolesterolaren eta mitokondrien metabolismoan kalteak eragiten dituzte

Muñoz-Oreja, M.^{1,2}, Gunning, A.^{3,4}, Fernandez-Pelayo, U.¹, Durigon, R.⁵, Spinazzola, A.⁵, Ellard, S.^{3,4}, Holt, I.^{1,5,6,7}

(1) Neurozientziak arloa, Biodonostia Osasun Ikerketa Institutua, Donostia, Espainia., (2) Pediatria saila, Donostiako Irakasgunea, Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea, EHU, Donostia, Espainia., (3) Exeter Laborategi Genomikoa, Royal Devon eta Exeter NHS Foundation Trust, Exeter, Erresuma Batua., (4) Zientzia Biomediko eta Klinikoen Institutua, Medikuntza eta Osasun Fakultatea, Exeter Unibertsitatea, Exeter, Erresuma Batua., (5) Mugimendu-neurozientzien eta klinikoen departamentua, UCL Queen Square Neurologia Institutua, Royal Free Kanpua, Londres, Erresuma Batua., (6) Ikerbasque, Basque Foundation for Science, Bilbo, Espainia., (7) Cibernet, Centro Investigación Biomédica en Red Enfermedades Neurodegenerativas, Zientzia eta Berrikuntza Ministeritza, Carlos III Osasun-Institutua, Madril, Espainia.

mikel.munoz@biodonostia.org

Laburpena

Lan honetan ATAD3 lokusean *de novo* duplikazio berri bat identifikatu da Harel-Yoon sindromea sortzen duena. Duplikatutako sekuentziak analizatuz ikusi dugu duplikazioa ziurrenik errekonbinazio homologo ez-aleliko bidez gertatu zela. Hori dela eta sortutako sekuentziak ATAD3A-C gene-fusio bat sortzen du, zeinaren proteinak funtzio egokirako aminoazido gako batzuk falta dituen. Gaixoen zeluletan ikusi ahal izan dugu proteina-fusioa adierazi egiten dela eta zelula-barneko kokapen egokia duela. Gainera, baieztatu dugu zelulek kolesterolean eta mitokondrietako DNA alterazioak dituztela, ATAD3n bestelako aldaketa genetikoak dituzten gaixoen antzera. Beraz, gure emaitzek gaixotasun horren diagnosi molekular baterako hastapenak markatzen dizkigute, eta Harel-Yoon sindromearen espektrua genotipiko eta fenotipikoa zabaltzen dute.

Hitz gakoak: ATAD3, duplikazio, mtDNA, Harel-Yoon sindromea, kolesterola.

Abstract

In this work a new de novo duplication at the ATAD3 locus was identified which causes Harel-Yoon syndrome. Analysis of the duplicated sequences indicate that they were likely mediated by non-allelic homologous recombination. The duplicated sequence produces an ATAD3A-C fusion gene whose protein product lacks key functional amino acids. Analysis of patients' cells shows that the fusion gene product is expressed and maintains its native subcellular location. Furthermore, these cells display perturbed cholesterol and mitochondrial DNA organization similar to that observed for individuals with other ATAD3 rearrangements. Therefore, our data delineate a molecular diagnosis for this disorder and extend the genotypical and phenotypical spectrum associated with Harel-Yoon syndrome.

Keywords: ATAD3, duplication, mtDNA, Harel-Yoon syndrome, cholesterol.

1. Sarrera eta motibazioa

Mitokondriak giza zelula guztietan daude eta zelulen “zentral energetiko” bezala ere ezagutzen dira. Hala da euren funtzio behinenetako bat delako zelula behar duen energiaren hornitzea; horretarako, funtsean, elikagaien liseriketaren produktuez eta arnasten dugun oxigenoaz baliatuz. Prozesu horri zelulen arnasketa esaten zaio. Mitokondriak bi mintzez inguraturiko egitura biribil edo obalatuak dira, eta mintz horiek berebiziko garrantzia dute, besteak beste, barne-mintzean gertatzen delako energiaren sintesia. (Becker et al., 2006; Sastre et al., 2009).

Mitokondrietan gertatzen den energiaren sintesia funtsezkoa da zelulako prozesu ia guztiak bete ahal izateko energia behar delako. Hortaz, ezgaitasun mitokondrialak energiaren krisi larriak dakartza eta hainbat giza gaixotasunen sorrera, bereziki, gaixotasun neurologikoa (Di

Mauro eta Schon, 2008). Gaixotasun mitokondrialen azpitalde garrantzitsu bat DNA mitokondrialean (mtDNA) gertatzen diren akatsen ondoriozko gaixotasunek osatzen dute. mtDNA nukleotik fisikoki bereizita badago ere, nukleoaren beharra du bertako material genetikoak kodetzen dituen 200 produktu geniko baino gehiago mitokondrien mantenu eta adierazpenerako behar direlako. Beraz, nukleoko zenbait genetan gertatzen diren aldaketa genetikoek ere mtDNA-n anomaliak sor ditzakete (Gorman et al., 2016).

Nukleoan kodetzen den baina mitokondrioetan eragina duen proteina horietako bat, ATAD3 da. Gene-familia horretan aldaketa eta birkonbinazio genetiko askotarikoak deskribatu diren arren, horien ondorioz sortzen diren fenotipo zelularrak antzekoak dira, eta fenotipo klinikoak aterki zabal baten barruan biltzen dira, Harel-Yoon sindrome izenpean (Harel et al., 2016).

ATAD3 gene-familia elkarren artean oso antzekoak diren hiru genez osatua dago: ATAD3A, ATAD3B eta ATAD3C. ATAD3A eta ATAD3B geneen sekuentziak ia identikoak dira, baina duten desberdintasun bakanetariko baten ondorioz, sekuentzia horietatik sortzen diren proteinetan ATAD3B 62 aminoazido luzeagoa da. ATAD3C-ren sekuentziak, ostera, ez da ikusi proteinarik kodetzen duenik (Harel et al., 2016; Desai et al., 2017). Badakigu, ATAD3 proteinak sintetizatzean, euren artean batzen direla eta hexamero izeneko sei ATAD3-zko proteina-talde handiagoak osatzen dituztela, zeluletako mitokondrien bi mintzak zeharkatuz kokatzen direnak (Gilquin et al., 2010). Mitokondrien mintzetan, ikusi da ATAD3-k harremana duela mtDNA-rekin eta bere erreplikazio eta transkripzio prozesuetan parte hartzen duten hainbat proteinekin, mitokondrien zatiketan diharduten zenbait proteinekin, eta baita kolesterolaren metabolismoarekin erlazionaturiko mitokondrietako proteina batzuekin ere. Gainera, ikusi izan da ATAD3 proteinan akatsek edo gabeziek askotariko aldaketak dakartzatela mitokondrien egiturari eta funtzioari, esaterako, *Drosophila melanogaster* eulian bor ATAD3A-ren gene homologoa da eta bor-en aldaketa genetikoak mitokondria kopuruaren gutxitzearekin eta mitokondrien aldaketa estrukturalekin erlazionatu dira (Harel et al., 2016; Desai et al., 2017; Cooper et al., 2017). Hala ere, ez dago argi ATAD3-ren ondorio diren, zuzenean (Baudier, 2018; Peralta et al., 2018), ala kolesterol-aldaketek mitokondrien mintzetan sortzen dituzten gora beheren ondorio (Issop et al., 2015; Desai et al., 2017), edo bien arteko zeozer.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Duela gutxi deskribatu da ATAD3 gene-familian alterazio genetikoak giza gaixotasunen sortzaile direla (Harel et al., 2016), eta, ordutik, geroz eta kasu gehiago deskribatu dira, mutazio eta fenotipo berriekin. ATAD3An nukleotido bakarrean aldatzen diren baina aminoazido ezberdin bat kodetzen duten mutazioak deskribatu dira hipotonia, atrofia optikoa, axoien neuropatia, kardiomiopatia hipertrofikoa eta paraparesia espastiko hereditarioa duten gaixoetan (Harel et al., 2016; Cooper et al., 2017). ATAD3 gene-familian delezio bialelikoak dituzten gaixoei, ordea, hipoplasia pontozerebelar larriago bat izaten dute eta ohikoa izaten da jaio eta lehen egunetan hiltzea (Desai et al., 2017; Peeters-Scholte et al., 2017; Frazier et al., 2017). Harel-Yoon sindrome bezala izendatu diren gaixotasunen oinarri genetikoan, orain arte, gehienbat azken horiek izan dira gehien deskribatu direnak, eta delezio horiek ATAD3A eta ATAD3B sekuentzien arteko zati handi bat galtzea dakarte, eta, ondorioz, ATAD3B-A gene-fusio bat sortzen da (Desai et al., 2017).

Harel-Yoon sindromea diagnostikatzea ez da erraza izaten, diagnosirako material genetikoaren sekuentziazio zehatzak egin behar baitira, eta, kasu askotan, ohiko sekuentziazio tekniketarik haratago joan behar da eta. Gainera, sintoma kliniko batzuk gaixotasun mitokondrial klasikoek ematen dituztenak izaten dira, baina mtDNA-n mutazio edo aldaketa ezagunak detektatzen saiatzean, negatibo izaten dira, noski. Hortaz, ATAD3 kasu berriak deskubritzeak interes handia du, bai ikuspegi medikotik, baita biozientzietan ikertzen dugunontzat ere.

Hala, gure helburuak dira ATAD3 kasu berriak identifikatzea, eta sakon aztertzea, ikerketa-maila guztietan, arlo genetikotik hasi, zelula-mailan jarraitu eta ondorio klinikoak ulertzeraino. Gure ikerketa-taldearen kasuan, zehazki, gaixoen azaletik lortutako fibroblastoetan ikertzen ditugu gaixotasunaren nondik norakoak, eta fenotipo zelularrak identifikatzen saiatzen gara, gerora diagnosi eta tratamenduetarako balio dakiguketak. Ikusirik barne mintzeko kolesterola gakoa dela mtDNA-ren antolakuntzan (Desai et al., 2017), gure lan-hipotesia da mtDNA-ren antolakuntzak bere produktuetan, zelulen funtzioan eta gaixo/osasun egoeretan eragina duela,

eta mtDNA-ren antolaketa hori mitokondrietako kolesterol-maila parametro jakin batzuen barnean mantentzearen araberkoa dela, neurri handi batean.

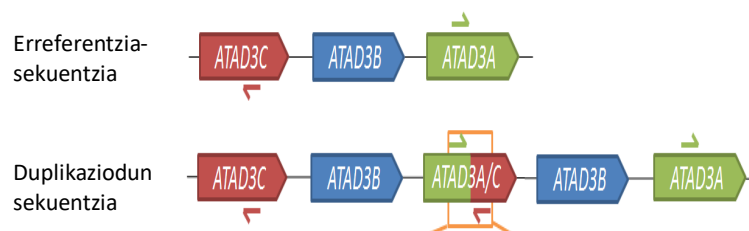
3. Ikerketaren muina

Lan honetan, ATAD3 gene-familian *de novo* duplikazio bat identifikatu dugu, elkarren artean ahaideak ez diren eta beren fenotipo klinikoek sindrome metaboliko bat iradokitzen duten bost indibiduotan. Horietako fenotipo kliniko batzuk bat datoz aurretiaz lokus horretan deskribatutako beste mutazio patogenikoek sortzen dituzten fenotipoekin: kardiomiopatia, hipotonia, substantzia txuriaren aldaketa, akinesia fetala, batzuk aipatzearen. Duplikaziodun gaixo guztiak jaio ondorengo lehen sei asteetan hil ziren, delezioa duten gaixoen antzera (Desai et al., 2017).

ATAD3 gene-familian deskribatu ditugun *de novo* duplikazioak exomen sekuentziazio bidez identifikatu dira. Gerora, duplikazio horien presentzia arrayCGH bidez baieztatu dugu, baita PCR eta Sanger sekuentziazio bidez. Azken proba horietan, 1,2 kilobaseko sekuentzia bat detektatu dugu (duplikazioei dagokiena) gaixoetan, baina ez da inongo sekuentziarik anplifikatu guraso osasuntsuetan. Horrek, beraz, *de novo* gertaera bat detektatu dugula baieztatzen du. Sekuentziazioen emaitzak analizatuz, ikus daiteke duplikazio berri hori ATAD3C-ko 8-12 exoiek, ATAD3B-k eta ATAD3A-ko 1-11 exoiek osatzen dutela, eta hipotesizatu liteke ATAD3C eta ATAD3A geneetako sekuentzia oso homologoen arteko errekonbinazio homologo ez-aleliko bidez (NAHR) gertatu zela.

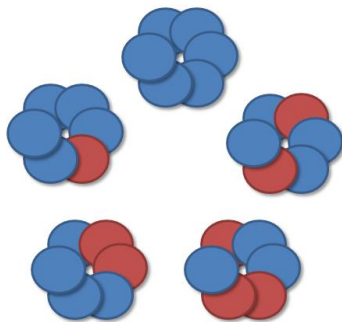
Duplikazioren ondoriozko sekuentziak analizatuta, ikus daiteke duplikaziodun gaixoetan mantentzen dela ATAD3A eta ATAD3C-ren kopia kopurua, ATAD3B duplikatzen dela eta ATAD3A-C gene-fusio bat sortzen dela (1. irudia)(ATAD3A 1-405 aminoazidoetatik ATAD3C 231-411 aminoazidoetara doan proteina sortzen duena). ATAD3A eta ATAD3A-C peptido-sekuentziak *in silico* konparatuz gero, ikus daiteke luzera berekoak direla eta 29 aminoazidotan soilik bereizten direla. Horietatik zazpi, sekuentziaren ATPasa domeinuari dagokion zatian daude eta gainontzeko 22ak domeinu funtzional ezagun batetik kanpo daude.

1. irudia. Duplikazioak sortutako sekuentziaren eskema ATAD3 lokusean. Erreferentzia-sekuentzia (goian) ATAD3 lokusak duen ohiko antolaketarekin, eta duplikazioa pairatu duen gaixobaten sekuentziaren eskema (behean), non ATAD3B-ren bi kopia ikus daitezkeen eta ATAD3A-C gene-fusioa (lauki horian).



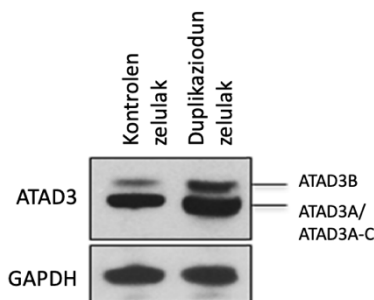
ATAD3 proteinak itzultzen direnean hexameroak osatzen dituzte euren artean batuz, eta 6 ATAD3 proteinaz osatutako egitura multimeriko hori da funtzionala dena eta mitokondrian kokatzen dena (Baudier et al., 2018). Sekuentziek ere ematen digute hexameroen egituraren predikzioa eta honakoa litzateke: ATAD3A-ren bi kopia eta ATAD3A-C fusioaren kopia bakarra egonez gero, hexameroen %8,8-a ATAD3A monomeroz bakarrik osatuta legoke eta gainontzeko %92,1-ak gutxienez ATAD3A-C monomero bat luke bere egituran (2. irudia). Sekuentziek adierazten digute, baita ere, gene-fusioa ziurrenik behar bezala transkribatu eta itzultzen dela, eta berezko kokapen subzellularerako beharrezko seinale-sekuentziak mantentzen dituela.

2. irudia. ATAD3 proteinek hexameroak osatzen dituzte eta gutxienez ATAD3A-C monomero baten (gorriz) txertaketa hexameroan %92,1 kasutan gertatzen da.



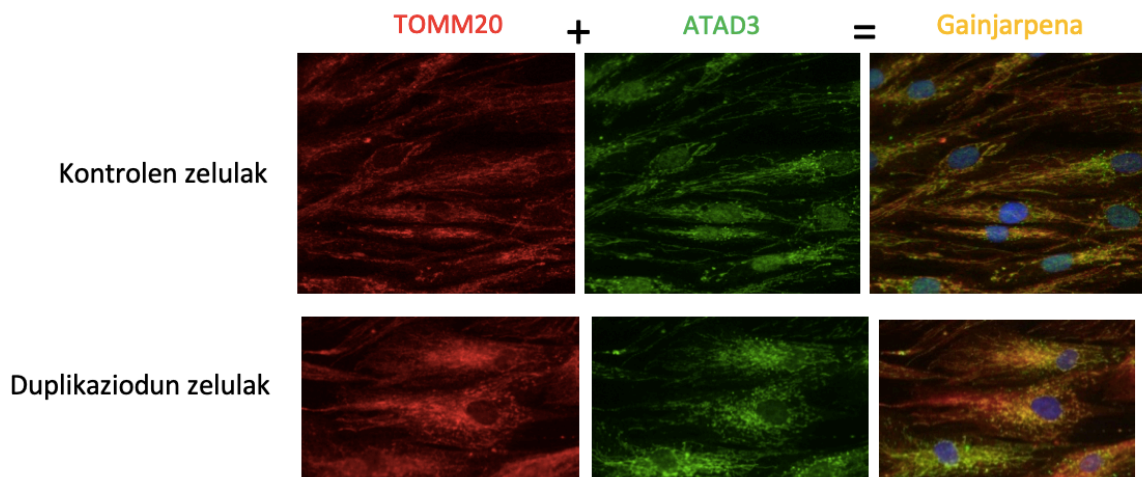
Laborategian egiaztatzen badugu exomen sekuentziei buruzko informazioa gaixoetatik eratorritako fibroblasto zeluletan, euren proteinak kuantifikatuz Western Blot analisiak (WB) erakusten digu duplikazioa pairatu duten fibroblastoek ATAD3 proteina kontrol osasuntsuek baino gehiago adierazten dutela (3. irudia). Goiko banda ATAD3B-ri dagokio, eta beraz, banda horren seinalea handiagoa izatea ATAD3B-ren beste kopia bat izateak azalduko luke. ATAD3A ez denez guztiz duplikatzen, WB-aren beheko bandaren seinalea areagotzeak esaten digu ATAD3A-C proteina fusionatua adierazi egiten dela eta egonkorra dela.

3. irudia. Anti-ATAD3-ren aurkako antigorputzak erabiliz lortutako WBa. Duplikaziodun zeluletan ATAD3B-ren banda intentsuagoa da, ATAD3B duplikatu denaren seinale, eta ATAD3A eta ATAD3A-C proteinek tamaina bera dutenez, bien banda nabarmen da intentsuagoa, proteina-fusioa adierazten delaren seinale. GAPDH proteina WBean kargatutako proteinaren indikatzaile da.



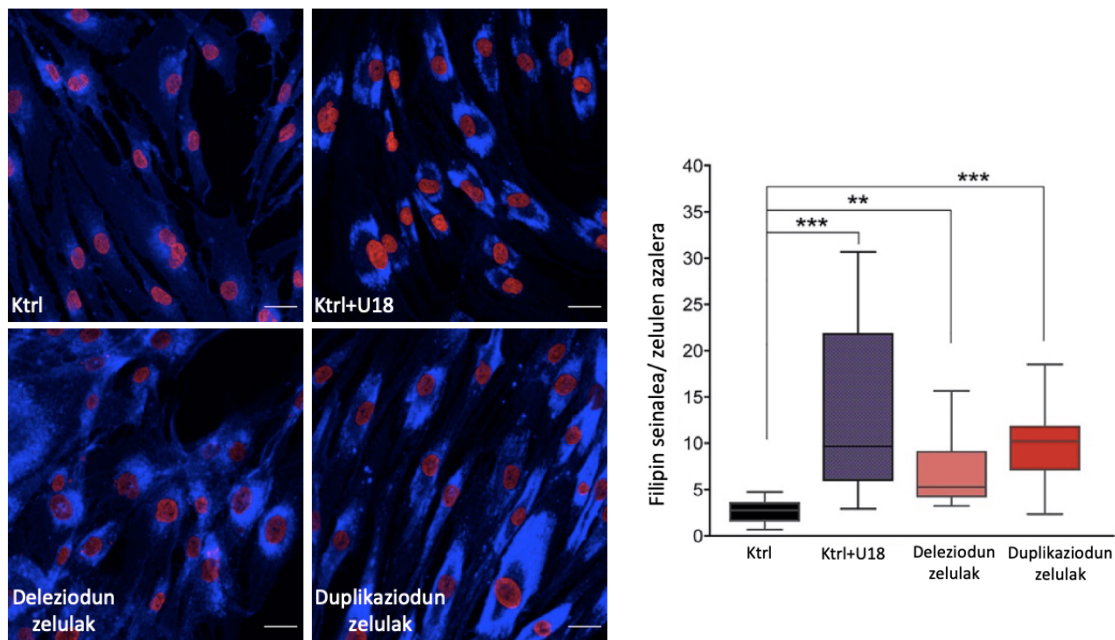
Badakigu ATAD3 proteina mitokondriala dela (Gilquin et al., 2010), eta antigorputz-bidezko ATAD3 proteinaren markaketak erakusten digu gaixoen fibroblastoetan kontroltan dutenaren antzeko banaketa duela, baita mitokondrien kanpo-mintzeko TOMM20 proteinarekikoa ere (4. irudia). Hortaz, badirudi bai ATAD3B duplikazioak eta ATAD3A-C gene fusionatuaren proteina-produktuak mitokondrian kokatuta ageri direla.

4. irudia. Zelulak ATAD3-rekiko (berdez) eta mitokondrietako TOMM20-rekiko antigorputzekin (gorriz) markatuz, ikus daiteke kontroltan bezalaxe (goiko irudiak), gaixoen zeluletan ere (beheko irudiak) ATAD3 adierazi egiten dela eta TOMM20-rekin kolokalizatzen duela (esku-biko irudiak, aurreko bi irudiak gainjarrita).



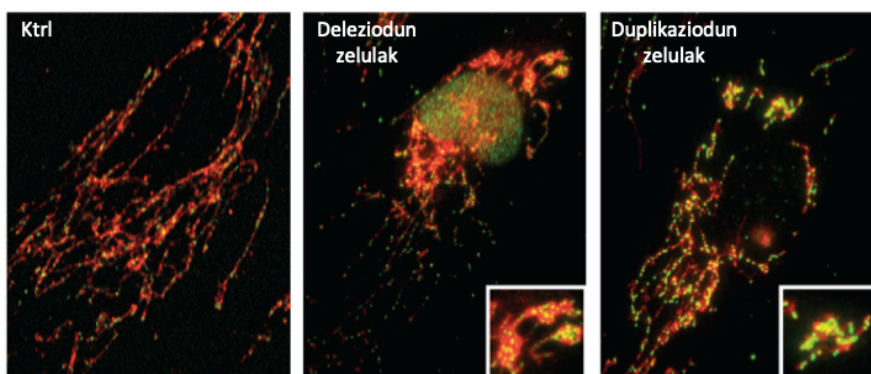
Arestian aipatu bezala, mitokondrien morfologian eta kolesterol-mailan aldaketak deskribatu dira ATAD3n delezioak dituzten gaixoetatik eskuratutako fibroblastoetan (Desai et al., 2017). Hortaz, deleziodun gaixoetan ikusitako fenotipo zelularrak duplikazioak dituzten fibroblastoetan ere agertzen diren begiratzea litzateke hurrengo urratsa. Filipin tindatzaile fluoreszentearen bidez markatutako kolesterol librea edo esterifikatu gabea nabarmen handiagoa da fibroblasto kontrolak dutenarekin alderatuz, eta ATAD3 deleziodun gaixoen zelulenen antzekoa. U18666A izeneko zelula-barneko kolesterolaren mugimendua eragozten duen molekula erabiliz, ikus dezakegu zelula kontroletan antzeko kolesterol librearen mailak lor daitezkeela, eta, beraz, ondoriozta dezakegu deleziodun gaixoetan ere kolesterol librearen metabolismoan akatsen bat dagoela (5. irudia).

5. irudia. Fibroblasto kontroletan (Ktrl), U18666A-z trataturiko kontroletan (Ktrl+U18) eta deleziodun nahiz duplikaziodun zeluletan kolesterol esterifikatu gabea markatzen duen Filipin konposatua erabiliz lortutako irudiak eta dagokien kuantifikazioa.



Antigorputzen bidezko markaketa fluoreszenteak eginez, mtDNA eta mitokondrietako TOMM20 proteina markatu ditzakegu, eta ikus dezakegu zelula kontrolen ohiko sare-morfologia galdu egiten dela duplikazioa duten gaixoen zeluletan (4. irudia eta 6. irudia) eta mtDNAREN pilaketak ere agertzen direla, askotan deleziodun gaixoetan ikus daitezkeenak baino handiagoak (6. irudia).

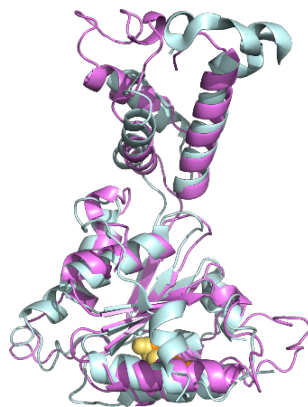
6. irudia. TOMM20 (gorriz) eta DNA (berdez) markatutako zeluletan, deleziodun eta duplikaziodun fibroblastoetan mitokondriaren ohiko sare-morfologia galtzen da, eta mtDNAREN pilaketak ikus daitezke, bereziki duplikaziodun zeluletan.



Ezaugarri horiek guztiak ATAD3 deleziodunek dituzten antzekoak direnez (Desai et al., 2017), nahiz eta ATAD3A-C proteina-fusioak zelulan kokapen egokia hartzen duen eta behar bezala adierazten den, ondoriozta dezakegu ez duela bere funtzioa behar bezala betetzen, eta, hartara, mitokondrien ohiko sare-morfologia kaltetzen duela, baita mtDNA-ren antolaketa ere, eta zelulako kolesterolaren metabolismoan ondorio negatiboak sortzen dituela.

ATAD3A-C ATAD3A proteinarengandik C-terminaleko 29 aminoazidotan bereizten da, eta horien artean dago ebolutiboki oso kontserbatua dagoen aminoazido bat (p.Arg466Cys) ATPasa domeinuan kokatua (7. irudia). Aminoazido hori ATPasa duten domeinu guztietan dago eta arginina-behatz bat bezala funtzionatzen du, alegia, inguruko monomeroen ATP-aren g-fosfatoari lotzen zaion aminoazido bat da (Ogura et al., 2004). Hala, SPAST proteinak duen arginina-behatz baliokidean deskribaturiko hainbat mutaziok SPAST proteinaren ATPasa aktibitatea guztiz galtzea eragiten dute eta paraparesia espastiko hereditarioa sortzen dute (SPG4)(Evans et al., 2005). SPAST eta ATAD3 proteinak gainjarrita egitura ia identikoa dutela ikus daiteke (7.irudia). Beraz, gure ustez, artikulua honetan deskribatutako ATAD3 duplikazioek SPAST-en era berean funtzionatu lezakete fusio-proteinak sortzen dituen monomero ez-funtzionalak hexameroen %90ean baino gehiagotan pilatzen direnean.

7. irudia. SPAST (grisa) eta ATAD3A (morea) proteinen ATPasa domeinuaren egituraren errepresentazioa bata bestearekiko gainjarrita. Horiz arginina-behatza.



Aipatu beharra dago, deleziodun gaixotarikoa batek ere ez zuela mitokondrietan aparteko akats edo kalterik iradoki zezakeen sintomarik erakusten, baina demostratu dugu, jada, zein inplikaturik dagoen mitokondria gaixo hauetan, bai gaixotasuna bera sortzen duen proteina akastuna (ATAD3) mitokondrioetan dagoelako eta baita gaixoen fibroblastoetan deskribatu ditugun mitokondrioetako alterazioengatik ere. Horrek erakusten digu, ATAD3 bezalako kasu arraroetan mitokondrietan dauden proteinak kontuan hartzeak duen garrantzia, proteina horiek nukleoan kodetuak izan arren.

4. Ondorioak

Artikulu honetan deskribatutako ATAD3 duplikazioa duten gaixoei zabaldu egiten dute ATAD3-rekin erlazionatutako gaixotasunen espektro genetikoak. Artikulu honetako gaixoetan ATAD3 duplikazioak hain maiztasun altuetan deskribatu direnez, gure ustez kontuan izan beharko litzateke ATAD3 lokusa, eta arretaz aztertu, ba ote den nukleotido bakarreko mutaziorik edo kopia kopuruaren aldaketarik jaioberrietan jatorri ezezaguneko gaixotasun larriren baten susmoa dagoenean, eta mutazio mitokondrial ezagunetarako eta panel genomiko nuklearretarako negatibo direnean.

Gure datuek erakusten dute proteina-fusioak gaixotasun neurologiko larri hori sortzen duela kolesterolaren eta mitokondrien metabolismoan eraginez (5. eta 6. irudiak). Horrek ATAD3-ren, kolesterolaren eta mtDNA-ren arteko lotura estutzen du. Kontuan badugu mitokondrien mintzetako kolesterolaren gehiengoak mtDNA-rekin kopurifikatzen duela, eta kolesterolaren eskuragarritasuna handitzeak edo txikitzeak nabarmen aldatzen duela mtDNA-ren antolaketa (Desai et al., 2017), argi dago, kolesterolaren homeostasia era hertsian kontrolatzea ezinbestekoa dela mtDNA-ren metabolismoan era egokian mantentzeko. Gainera, badakigu ATAD3 proteina kolesterolaren metabolismoarekin erlazionatu daitekeela TSPO, CYP11A1 eta

SPTLC bere proteina-kideen bitartez (Rone et al., 2012). Beraz, kolesterol-alterazioak dituzten mintzeko mikrodomeinu fisikoak izan litezke ATAD3 mutazio patologikoen faktore komuna.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Gure datuen arabera, ATAD3-n birkonbinazio genetikoek zerebeloaren garapena endekatzen dute jaioberrietan, kolesterolaren metabolismoan eta mitokondrian gertatzen diren hainbat akats direla eta. Antzeko akatsak ikusi izan direnez zenbait gaixotasun mitokondrial nahiz neurologikotan (Di Mauro eta Schon, 2008; Cooper et al., 2017), uste dugu ATAD3 gaixoen ezagutzan sakontzeak lagun lezakeela giza gaixotasun askoren tratamenduaren garapenean. Hori dela eta, Harel-Yoon sindromea hobeto ulertzen saiatzeaz gainera, eta gaixotasunaren pronostikoa hobetzeko egin ditzakegun ekarpenez gainera, gure ikerketan gaixoen zelulak modelo gisa erabiltzeak mtDNAren eta kolesterolaren ardatza hobeto ulertzen lagun diezaguke, eta ATAD3 proteinak ardatz horretan duen partehartzea erakutsi. Horrez gainera, mitokondrietako kolesterolaren metabolismoak giza osasunean duen paper garrantzitsua ulertzen lagun diezaguke, eta uste dugu kolesterolaren mailak modulatu dituzten ohiko farmako asko baliagarriak izan litezkeela hainbat gaixotasun neurologikoren sintomak tratatzeko.

Ondorioztatzen dugu ATAD3 proteinak baldintzatzen duela zelularen gaitasuna kolesterola mitokondriaren barne mintzaren beharrezko guneetara eramateko. Gune horietan mtDNA dago, baina, baita ere espero dugu erretikulu endoplasmaticoarekin kontaktu-guneak agertzea (MAM, mitokondriekin asoziatuak), mtDNA bikoizten eta kopiak banatzen diren toki horietan erretikulu endoplasmaticoa egon ohi dela deskribatu delako (Lewis et al., 2016). Modelo horrek, beraz, erretikulu endoplasmaticoak kontakizun honetan betetzen duen papera ikertzeko atak zabaltzen dizkigu.

6. Erreferentziak

Baudier, J. (2018), ATAD3 proteins: brokers of a mitochondria-endoplasmic reticulum connection in mammalian cells. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 93, 827–844.

Becker, W.M., Kleinsmith, L.J., Hardin, J. (2006): *El mundo de la célula*. Pearson Education.

Cooper, H.M., Yang, Y., Ylikallio, E., Khairullin, R., Woldegebriel, R., Lin, K., Euro, L., Palin, E., Wolf, A., Trokovic, R., et al. (2017), ATPase deficient mitochondrial inner membrane protein ATAD3A disturbs mitochondrial dynamics in dominant hereditary spastic paraplegia. *Hum. Mol. Genet.* 26, 1432–1443.

Desai, R., Frazier, A.E., Durigon, R., Patel, H., Jones, A.W., Dalla Rosa, I., Lake, N.J., Compton, A.G., Mountford, H.S., Tucker, E.J., et al. (2017), ATAD3 gene cluster deletions cause cerebellar dysfunction associated with altered mitochondrial DNA and cholesterol metabolism. *Brain.* 140, 1595–1610.

Di Mauro, S. eta Schon, E. (2008), Mitochondrial disorders in the nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 31, 91-123.

Evans, K.J., Gomes, E.R., Reisenweber, S.M., Gundersen, G.G., and Lauring, B.P. (2005), Linking axonal degeneration to microtubule remodeling by Spastin-mediated microtubule severing. *J. Cell Biol.* 168, 599–606.

Frazier, A.E., Holt, I.J., Spinazzola, A. eta Thorburn, D.R. (2017), Reply: Genotype-phenotype correlation in ATAD3A deletions: not just of scientific relevance. *Brain.* 140, e67.

Harel, T., Yoon, W.H., Garone, C., Gu, S., Coban-Akdemir, Z., Eldomery, M.K., Posey, J.E., Jhangiani, S.N., Rosenfeld, J.A., Cho, M.T., et al.; Baylor-Hopkins Center for Mendelian Genomics; and University of Washington Center for Mendelian Genomics (2016), Recurrent de novo and biallelic variation of ATAD3A, encoding a mitochondrial membrane protein, results in distinct neurological syndromes. *Am. J. Hum. Genet.* 99, 831–845.

Issop, L., Fan, J., Lee, S., Rone, M.B., Basu, K., Mui, J. eta Papadopoulos, V. (2015), Mitochondria associated membrane formation in hormone stimulated Leydig cell steroidogenesis: role of ATAD3. *Endocrinology.* 156, 334–345.

Gilquin, B., Taillebourg, E., Cherradi, N., Hubstenberger, A., Gay, O., Merle, N., Assard, N., Fauvarque, M.O., Tomohiro, S., Kuge, O. eta Baudier, J. (2010), The AAA β ATPase ATAD3A controls mitochondrial dynamics at the interface of the inner and outer membranes. *Mol. Cell. Biol.* 30, 1984–1996.

Gorman, G., Chinnery, P., Di Mauro, S., Hirano, M., Koga, Y., McFarland, R., Suomalainen, A., Thorburn, D., Zeviani, M. eta Turnbull, D. (2016), Mitochondrial diseases. *Nat Rev Dis Primers* 2: 16080.

Gunning, A. C., Strucinska, K., Muñoz-Oreja, M., Parrish, A., Caswell, R., Stals, K. L., Durigon, R., Durlacher-Betzer, K., Cunningham, H., Grochowski, C., Baptista, J., Tysoe, C., Baple, E., Lahiri, N., et al. (2020), Recurrent de novo NAHR reciprocal duplications in the ATAD3 gene cluster cause a neurogenetic trait with perturbed cholesterol and mitochondrial metabolism. *The American Journal of Human Genetics*, 106(2), 272-279.

Lewis, S., Uchiyama, L. eta Nunnari, J. (2016), ER-mitochondria contacts couple mtDNA synthesis with mitochondrial division in human cells. *Science*. 353, 6296, aaf5549.

Ogura, T., Whiteheart, S.W., eta Wilkinson, A.J. (2004), Conserved arginine residues implicated in ATP hydrolysis, nucleotide-sensing, and intersubunit interactions in AAA and AAA β ATPases. *J. Struct. Biol.* 146, 106–112.

Peeters-Scholte, C.M.P.C.D., Adama van Scheltema, P.N., Klumper, F.J.C.M., Everwijn, S.M.P., Koopmans, M., Hoffer, M.J.V., Koopmann, T.T., Ruivenkamp, C.A.L., Steggerda, S.J., van der Knaap, M.S. eta Santen, G.W.E. (2017), Genotype-phenotype correlation in ATAD3A deletions: not just of scientific relevance. *Brain*. 140, e66.

Peralta, S., Goffart, S., Williams, S.L., Diaz, F., Garcia, S., Nissanka, N., Area-Gomez, E., Pohjoisma 'ki, J. eta Moraes, C.T. (2018), ATAD3 controls mitochondrial cristae structure in mouse muscle, influencing mtDNA replication and cholesterol levels. *J. Cell Sci.* 131, jcs217075.

Rone, M.B., Midzak, A.S., Issop, L., Rammouz, G., Jagannathan, S., Fan, J., Ye, X., Blonder, J., Veenstra, T. eta Papadopoulos, V. (2012), Identification of a dynamic mitochondrial protein complex driving cholesterol import, trafficking, and metabolism to steroid hormones. *Mol. Endocrinol.* 26, 1868–1882.

Sastre, J., Pamplona, R., Ramón, J.R. (2009): *Biogerontología médica*. Ergon.

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau 2020an American Journal of Human Genetics aldizkarian Gunning et al., 2019 bezala argitaratua dagoenaren moldaketa bat da, era ulerterrazago eta sinplifikatua idatzia, eta, nola ez, euskaraz. Gainera, mezua hobeto ulertzeko edukiak eta irudiak aldatu dira, eta lehen autoreak propio egindakoak gailendu dira.

Mila esker lan hau aurrera atera dadin lagundu duten guztiei. Bereziki, eskerrak nire tesi zuzendariei (Ian eta Itxaso), taldeko kideei (Uxoa batez ere), eta, nola ez, gaixotasun bortitz hau duten gaixoei eta beren familiei.