



Universidad
Zaragoza

La proteína AOX como terapia génica para enfermedades mitocondriales.

Autor: Cristina Blan Sanmartin
Master en Biología Molecular y Celular
Curso 2011-12

Directores:

Dr. Patricio Fernández Silva

Dra. Patricia Meade Huerta

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular
Universidad de Zaragoza



Departamento de
Bioquímica y Biología
Molecular y Celular
Universidad Zaragoza



I. Presentación y Objetivos	4
II. Introducción	7
2.1 Origen de la mitocondria	8
2.2 El DNA mitocondrial de mamíferos	10
2.3 Rutas metabólicas que tienen lugar en la mitocondria	12
2.4 Sistema de fosforilación oxidativa	13
2.4.1 El complejo I: NADH deshidrogenasa	14
2.4.2 El complejo II: Succinato deshidrogenasa	14
2.4.3 El complejo III: Ubiquinol:citocromo c oxidorreductasa	15
2.4.4 El complejo IV: Citocromo c oxidasa	15
2.4.5 El complejo V: ATP sintasa	15
2.5 Vías alternativas en otros organismos	16
2.5.1 AOX: Oxidasa Alternativa	16
2.5.2 NDI 1	17
2.6 Modelos de organización de la cadena de transporte electrónico	18
2.7 Patología Mitocondrial	19
2.8 Terapia génica para enfermedades mitocondriales	21
III. Material y Métodos	24
1. Materiales	25
1.1 Reactivos	25
1.2 Kits comerciales	25
1.3 Oligonucleótidos	25
1.4 Membranas	25
1.5 Anticuerpos	25
1.6 Animales	26
1.7 Líneas celulares eucariotas	26
2. Metodología	26
2.1. Cultivos Celulares	26
2.1.1 Medios de cultivo	27
2.1.2 Siembra y mantenimiento celular	27
2.1.3 Descongelación y congelación de líneas celulares	28
2.1.4 Contaje celular	29
2.1.5 Curva de crecimiento	29
2.1.6 Ensayos de viabilidad celular y citotoxicidad de drogas	30
2.2. Purificación de mitocondrias	31
2.2.1 Purificación de mitocondrias de células en cultivo	31
2.2.2 Purificación de mitocondrias procedentes de tejidos	32
2.3 Actividad de la cadena de transporte electrónico	34
2.3.1 Medida del consumo de oxígeno	34
2.3.2 Medida de la actividad de los complejos por polarografía en células permeabilizadas con digitonina	35

2.3.2.1 Preparación de los reactivos	35
2.3.2.2 Procedimiento experimental	36
2.3.2.3 Cálculo de actividades	36
2.4 Metodología con ácidos nucleico	37
2.4.1 Extracción y purificación de DNA	37
2.4.1.1 Extracción de DNA a partir de cola, oreja o dedo de ratón	37
2.4.1.2 Extracción de DNA a partir de células en cultivos celulares	37
2.4.2 Cuantificación de ácidos nucleicos	38
2.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa	38
2.4.4 Electroforesis de DNA en gel de agarosa	40
2.5 Metodología de proteínas	40
2.5.1 Extracción de proteínas totales de células en cultivo	40
2.5.2 Preparación de homogenados tisulares	40
2.5.3 Cuantificación de proteínas por el método Bradford	41
2.5.4 Electroforesis de proteínas desnaturizante en SDS-PAGE	41
2.5.5 Transferencia de proteínas a membrana	43
2.5.6 Visualización de proteínas: Tinción con Ponceau S	44
2.5.7 Inmunodetección de proteínas por Western-Blot	44
2.5.7.1 Incubación con los anticuerpos	44
2.5.7.2 Detección de las proteínas	45
2.5.7.3 Reutilización de las membranas	45
IV. Resultados y Discusión	46
1. Análisis de la función de la proteína AOX	47
1.1 Ensayos de resistencia a azida de sodio y antimicina A	47
1.2 Ensayos de respiración en células	51
1.3 Determinación del tiempo de duplicación	53
2. Análisis de la expresión de la proteína AOX	55
2.1 Análisis de la expresión de AOX en ratones jóvenes y adultos	55
2.2 Análisis de la expresión de AOX en fibroblastos inmortalizados de ratón	59
2.3 Genotipado de las líneas celulares y de los ratones	60
V. Conclusiones y Perspectivas	62
VI. Bibliografía	66

Quiero aprovechar estas líneas para agradecer a todas las personas que me han ayudado a lo largo de este año,
A los compañeros del máster y amigos, que han hecho que los días de clase fueran más amenos.
A todos los miembros del grupo GENOXPHOS y los que ya no están (Nuria, Raquel, Pilar, Nieves y Esther) que me han ayudado en todo lo posible, resolviéndome dudas y dándome buenos consejos, y con los que he pasado buenos ratos de trabajo y que desde el principio me acogieron muy bien, como a uno más. Y una mención especial para mis tutores, Dr. Patricio Fernández Silva y Dra. Patricia Meade Huerta, que me ofrecieron la posibilidad de trabajar en este proyecto que creo es tan fascinante y bonito y de los que he aprendido tanto. Por todo esto quiero daros las gracias.

I. PRESENTACIÓN Y OBJETIVOS.

1. Presentación y Objetivos

Las mitocondrias son orgánulos subcelulares dinámicos cuya función principal es la generación de ATP a través del sistema de fosforilación oxidativa OXPHOS. Sin embargo, éste no es el único papel de las mitocondrias, ya que participan en numerosas rutas metabólicas, como por ejemplo la síntesis de nucleótidos, además, generan como subproducto la mayor parte de las especies reactivas de oxígeno (ROS) e intervienen en diversos procesos intracelulares, como la generación y modulación de las señales de Ca^{2+} , o el control de la vida o la muerte a través de la apoptosis.

Las enfermedades causadas por defectos en los genes del sistema OXPHOS, tanto nucleares como mitocondriales, se presentan principalmente como disfunciones neurológicas, musculares, cardíacas o endocrinas. Están catalogadas como enfermedades raras, debido a su baja prevalencia en la población (1/5000). Actualmente no existen tratamientos eficaces para tratar estas enfermedades, por lo que entre los posibles tratamientos que se están investigando está el uso de terapia génica para tratar las enfermedades mitocondriales.

La oxidasa monoapéptídica AOX, presente en plantas y algunos eucariotas inferiores pero ausente en mamíferos, permite transferir electrones de la ubiquinona al oxígeno. Su expresión en células en cultivo mutantes en el complejo III y complejo IV, rescata parcialmente el fenotipo y es capaz de regular la producción de ROS en células con defectos mitocondriales. Como AOX es capaz de revertir en células en cultivo un fenotipo defectuoso causado por fallos OXPHOS, su expresión en modelos animales con mutaciones en los complejos III y IV de la cadena de transporte electrónico mitocondrial podría paliar los efectos fenotípicos de la mutación en los descendientes.

El grupo GENOXPHOS, en el cual he realizado el proyecto Máster, entre las diferentes líneas de investigación que lleva a cabo está ensayando la terapia génica mediante la xenoexpresión en células de mamíferos de la oxidasa alternativa AOX. Para ello, han desarrollado un modelo de ratón *knock-in* que integra dicha proteína, cuyo cDNA recodificado e integrado en el genoma procede del hongo *Emericella nidulans*, bajo la influencia del promotor *Rosa26* que hace que su expresión sea constitutiva y ubicua. También se le añadió el epítipo de la Hemaglutinina del virus de la gripe al extremo carboxilo terminal para facilitar su inmunodetección. En este proyecto se ha propuesto completar el análisis de los ratones transgénicos que expresan AOX y ensayar in vivo la terapia génica basada en la xenoexpresión. En trabajos anteriores se demostró que AOX se expresa en distintos tejidos de los ratones *knock-in* y que se localiza en la mitocondria.

Los objetivos del proyecto Máster en el cual he participado han sido:

1. Obtención de evidencias de que la proteína AOX es funcional:
 - 1.1 Ensayos de resistencia a azida de sodio y antimicina A en líneas celulares de fibroblastos inmortalizados provenientes de ratones AOX.
 - 1.2 Ensayos de respiración en líneas celulares de fibroblastos inmortalizados provenientes de ratones AOX.
 - 1.3 Determinación del tiempo de duplicación en distintas condiciones de las líneas celulares de fibroblastos inmortalizados provenientes de ratones AOX.

2. Completar la caracterización de la expresión de la proteína AOX:
 - 2.1 Ensayos para medir la expresión de la proteína AOX en diferentes tejidos de ratones jóvenes y adultos.
 - 2.2 Ensayos para medir la expresión de la proteína AOX en líneas celulares de fibroblastos inmortalizados provenientes de ratones AOX.

II. INTRODUCCIÓN

2. Introducción

2.1 Origen de la mitocondria

Según la Teoría de la Endosimbiosis Seriada, “Las mitocondrias son orgánulos intracelulares derivados de la endosimbiosis de un organismo del grupo de las α -proteobacterias con un ancestro de las células eucariotas que contenía un núcleo” (Lynn Margulis 1967) (Figura 1A).

Una característica importante en la que se basa la teoría endosimbiótica, es el sistema de doble membrana que poseen las mitocondrias (Figura 1C), constituido por una membrana mitocondrial externa y otra interna separadas por un espacio intermembrana. La membrana externa la separa del citoplasma y permite el paso de moléculas pequeñas (hasta 10 kDa), mientras que la membrana interna es una barrera muy selectiva, lo que permite el mantenimiento del gradiente de protones para la síntesis de ATP y presenta una serie de pliegues denominados crestas que le proporcionan una gran superficie (Figura 1B).

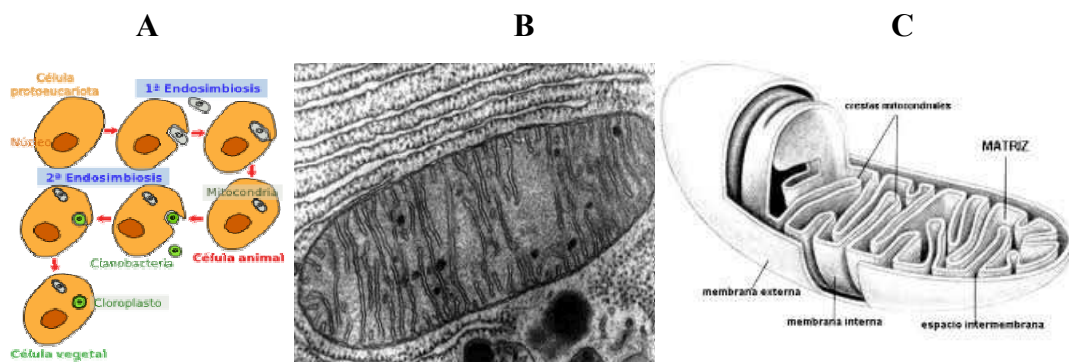


Figura 1. (A) Esquema representativo de la Teoría de la Endosimbiosis Seriada. (B) Imagen de una mitocondria mediante microscopía electrónica. (C) Esquema de las partes de la mitocondria.

Otra característica importante de las mitocondrias, clave en esta hipótesis, es que estos orgánulos subcelulares poseen su propio genoma, denominado DNA mitocondrial (mtDNA). Se trata de una molécula circular de doble cadena que se replica y transcribe en la matriz mitocondrial (Clayton 1992). En mamíferos, cada célula contiene entre 10^3 y 10^4 copias de mtDNA, dependiendo de las necesidades energéticas de la célula y del tejido.

Las mitocondrias contienen alrededor de 800 (en levaduras) ó 1500 (en humanos) proteínas diferentes, de las cuales tan sólo aproximadamente el 1% de las mismas son codificadas en el mtDNA. Casi todas las proteínas

mitocondriales están codificadas por genes nucleares y sintetizadas por los ribosomas citosólicos como proteínas precursoras. Debido a la estructura de doble membrana de las mitocondrias, el importe de proteínas es considerablemente más complejo que la transferencia de un polipéptido a través de una bicapa fosfolipídica sencilla. Las proteínas dirigidas a la matriz deben cruzar tanto la membrana mitocondrial externa como la interna, y las situadas en el espacio intermembrana únicamente la membrana mitocondrial externa. Para poder internalizarlas hasta la matriz mitocondrial es necesario un sistema de translocadores mitocondriales (TIM translocasa de la membrana interna mitocondrial y TOM translocasa de la membrana externa mitocondrial) que reconocen señales de importe en las proteínas específicas para cada espacio del orgánulo.

Las proteínas codificadas por el mtDNA se ensamblan con proteínas codificadas en el DNA nuclear (nDNA) que son selectivamente importadas a la mitocondria, formándose los complejos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (mtCTE), complejos I, III y IV, siendo el complejo II codificado exclusivamente por el núcleo. La mtCTE junto con la ATPsintasa (Complejo V) son las encargadas de llevar a cabo una de las funciones más importantes de la mitocondria, la fosforilación oxidativa (OXPHOS) (Wallace 2005), a través de la cual, la célula obtiene el 90% de su energía en forma de ATP. Existen otros muchos procesos metabólicos que tienen lugar en el interior de la mitocondria, como por ejemplo, el ciclo de Krebs, la β -oxidación de los ácidos grasos, el ciclo de la urea o la biosíntesis de pirimidinas (Attardi and Schatz 1988). La mayoría de las proteínas implicadas en estos procesos que suceden en el interior de la matriz mitocondrial, están codificadas en el genoma nuclear. Así pues, la biogénesis de las mitocondrias constituye un caso único en la célula animal por encontrarse bajo el control de los dos sistemas genéticos celulares que deben actuar de forma coordinada (Goffart and Wiesner 2003; Kelly and Scarpulla 2004).

En los últimos años la investigación sobre mitocondrias y mtDNA ha experimentado un gran impulso debido a descubrimientos como las enfermedades provocadas por mutaciones en el mtDNA (Holt, Harding et al. 1988; Wallace, Singh et al. 1988; Zeviani and Antozzi 1997; Wallace 1999; DiMauro and Schon 2003; Borisov 2004), el posible papel del mtDNA en el proceso de envejecimiento (Chomyn and Attardi 2003; Hofhaus, Berneburg et al. 2003; Trifunovic, Wredenberg et al. 2004; Hance, Ekstrand et al. 2005; Trifunovic, Hansson et al. 2005; Trifunovic 2006), la carcinogénesis (Carew and Huang 2002; Cuezva, Krajewska et al. 2002; Petros, Baumann et al. 2005; Gallardo, Moreno-LosHuertos et al. 2006), así como la implicación de la mitocondria en el proceso de apoptosis (Kroemer and Reed 2000; Green and Kroemer 2004).

2.2 El DNA mitocondrial de mamíferos

El mtDNA se descubrió en 1960 (Nass and Nass 1963), pero hasta el año 1981 no se describió la secuencia completa en humanos y ratón (Anderson, Bankier et al. 1981; Bibb, Van Etten et al. 1981). Su secuencia se ha ido revisando y completando para diversas especies con el paso de los años (Ingman, Kaessmann et al. 2000; Bayona-Bafaluy, Acin-Perez et al. 2003).

Actualmente se sabe que el genoma mitocondrial de mamíferos es una molécula circular cerrada de doble cadena de alrededor de 16 kb (humanos 16569 pb, ratón 16299 pb, etc.) con una organización genética muy compacta. Este genoma carece de intrones y los genes se suceden unos a otros sin la existencia de regiones no codificantes. La excepción es una pequeña región denominada bucle de desplazamiento (D-loop) de unas 1000 pb que contiene la mayoría de los elementos de control de la replicación y la transcripción (Montoya, Ojala et al. 1981).

El mtDNA de mamíferos (Figura 2) codifica para 37 genes, de los cuales 13 dan lugar a proteínas integrantes del sistema OXPHOS, y 24 son RNAs de los cuales 2 son RNAs ribosómicos (12S y 16S) y los otros 22 son los tRNAs necesarios para su expresión (Anderson, Bankier et al. 1981). De estos polipéptidos siete forman parte del complejo I (subunidades ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 y ND6), uno corresponde al apocitocromo b del complejo III, tres corresponden a las subunidades COXI, COXII, COXIII del complejo IV, y dos son las subunidades 6 y 8 de la ATPasa (complejo V). Los genes de los tRNAs se localizan separando los rRNAs y los mRNAs siendo esta disposición muy importante para el procesamiento de los transcritos (Ojala, Montoya et al. 1981). El resto de genes que codifican para las aproximadamente 1500 proteínas que se estima que posee la mitocondria se encuentran codificados en el DNA nuclear.

Las dos cadenas del mtDNA se pueden separar por gradientes alcalinos de CsCl dado que poseen un contenido diferente de bases G+T, lo que proporciona a cada cadena una densidad distinta y así se puede distinguir la cadena pesada (H, heavy) de la ligera (L, light) (Kasamatsu and Vinograd 1974). Ambas cadenas son codificantes y cada una posee su propio origen de replicación. La cadena H, por su mayor contenido de G, alberga la información necesaria para la síntesis de los 2 rRNAs, 14 de los tRNAs y 12 polipéptidos. Mientras que la cadena L, por su mayor contenido en C, contiene la información para los 8 tRNAs y el polipéptido restante (subunidad ND6 del complejo I). La disposición de los tRNAs en las cadenas es muy particular ya que separan los distintos polipéptidos y rRNAs (Montoya, Christianson et al. 1982) siendo importantes en el procesamiento de los transcritos mitocondriales que son inicialmente policistrónicos (Enriquez, Martinez-Azorin et al. 1998)

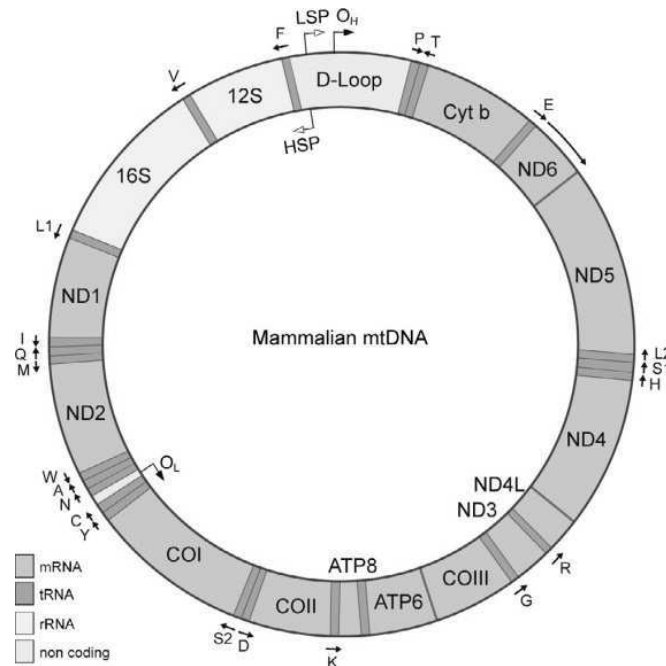


Figura 2. DNA mitocondrial de mamíferos. Esquema que muestra el mtDNA y donde aparecen marcadas la posición de los distintos genes, tRNAs, rRNAs, secuencias reguladoras y de inicio de la replicación

El mtDNA difiere del nDNA debido, entre otras, a las siguientes características, el código genético mitocondrial difiere ligeramente del código genético universal (Barrel, Bankier et al. 1979). Tiene una alta tasa de mutación (al menos 10 veces superior a la del nDNA) que se atribuye a la exposición del mtDNA a las especies reactivas de oxígeno generadas en el interior de la mitocondria y a la ausencia de sistemas eficientes para su reparación (Gray 1989). Se transmite por herencia materna en lugar de mendeliana. Presenta una particular organización y expresión de sus genes puesto que no existen regiones intrónicas. Es posible la existencia de varias formas alélicas del mtDNA en un mismo individuo, pudiendo diferir su proporción relativa según el tejido. La presencia de más de un tipo de mtDNA en una célula o tejido se denomina heteroplasmia frente al término homoplasmia que se utiliza cuando todas las moléculas del mtDNA de una célula u organismo son idénticas.

El mtDNA es altamente polimórfico, ya que presenta numerosas diferencias en la secuencia entre individuos del mismo grupo étnico, que se ven incrementadas entre individuos de grupos distintos. Los haplotipos de mtDNA se basan en patrones específicos de polimorfismos, y algunos de ellos, parecen estar relacionados con diversos procesos como la motilidad espermática (Ruiz-Pesini, Lapena et al. 2000), el envejecimiento, la susceptibilidad a diversas enfermedades (Wallace, Brown et al. 1999) o la expresión de algunas mutaciones del mtDNA (Torroni, Petrozzi et al. 1997).

Otra característica de los genes codificados en el mtDNA es que la mayoría carecen de codón de parada, presentando una T o TA justo después del último triplete y estas bases van seguidas del extremo 5' del gen adyacente por lo que el codón de terminación se genera mediante la poliadenilación del extremo 3' del mRNA correspondiente (Anderson, Bankier et al. 1981; Montoya, Ojala et al. 1981)

Las moléculas de mtDNA se organizan en nucleoides, estructuras génicas estables formadas por un número variable de copias de mtDNA (entre 5-7) y un grupo de proteínas entre las que se encuentran, el factor de transcripción mitocondrial A (TFAM), la proteína mitocondrial de unión a DNA de cadena sencilla (mtSSBP) y la helicasa Twinkle (Garrido, Griparic et al. 2003; Wang and Bogenhagen 2006). Se ha descrito que la organización del mtDNA en los nucleoides es importante durante la segregación y afecta al grado de heteroplasmia.

2.3 Rutas metabólicas que tienen lugar en la mitocondria

Las células utilizan la oxidación de la glucosa, ácidos grasos y otros sustratos como aminoácidos para la obtención de ATP. El primer paso de este proceso en el caso de la glucosa es la glucólisis, que consiste en un conjunto de reacciones que tienen lugar en el citoplasma celular, con independencia de la mitocondria. Sin embargo, con este proceso sólo se obtienen 2 moléculas de ATP frente a las 32-34 que se logran mediante la oxidación completa de la glucosa a CO₂ y H₂O en la fosforilación oxidativa, llevada a cabo en la mitocondria.

El piruvato obtenido en la etapa final de la glucólisis y el metabolismo de 6 aminoácidos es importado a la matriz mitocondrial donde se oxida a acetil-coenzima A. Así mismo los ácidos grasos, tras una serie de reacciones de oxidación, también se transforman en acetil-coenzima A. La oxidación de este grupo mediante las reacciones que constituyen el ciclo de Krebs (Krebs 1970), genera NADH+H⁺ y FADH₂ que serán utilizados por la cadena de transporte electrónico como equivalentes de reducción. Los electrones de dichas moléculas son movilizados a través de los distintos complejos que forman la cadena respiratoria mitocondrial hasta llegar al complejo IV, donde son cedidos al oxígeno, para formar agua, generando un gradiente de protones que es utilizado por el complejo V para la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi. Finalmente, el ATP generado es liberado al citosol celular, intercambiado por ADP a través de la translocasa de nucleótidos de adenina (ANT).

Como se ha citado anteriormente, las mitocondrias no sólo se encargan de la bioenergética celular, sino que también cumplen otras funciones muy importantes en el metabolismo de aminoácidos y lípidos, en la biosíntesis de pirimidinas, del grupo hemo y de los clusters de Fe-S, así como en la apoptosis

celular (Lill and Kispal 2000; Newmeyer and Ferguson-Miller 2003; Taylor, Fahy et al. 2003) (Figura 3).

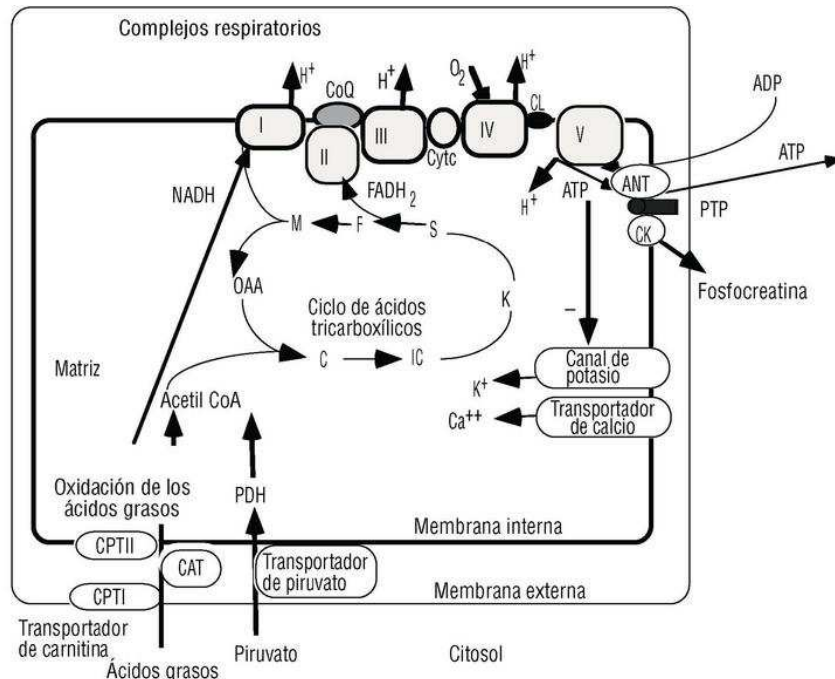


Figura 3. Vías bioenergéticas mitocondriales. Complejos respiratorios I-V localizados en la membrana mitocondrial interna con los componentes asociados de la transferencia electrónica, coenzima Q (CoQ) y citocromo C (cytc). Las vías de la oxidación del piruvato asociadas a la matriz, β -oxidación de los ácidos grasos y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. El poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP) asociado a la apoptosis se expone con dos de las muchas proteínas descritas: la translocasa de los nucleótidos de adenina (ANT) y la creatinasa mitocondrial (CK).

2.4 El sistema de fosforilación oxidativa.

El sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) está formado conjuntamente por la mtCTE (complejos I-IV) y la síntesis de ATP (complejo V). Los electrones procedentes del $\text{NADH} + \text{H}^+$ van pasando ordenadamente a través del complejo I, la ubiquinona, el complejo III y el citocromo c para finalmente llegar al complejo IV, el cual los cede al oxígeno molecular para formar H_2O . De forma alternativa, los electrones del FADH_2 , producto final del complejo II, pasan a la ubiquinona y son canalizados sucesivamente por el complejo III, el citocromo c y el complejo IV para finalmente reducir al oxígeno molecular.

Los complejos I, III y IV, son los puntos de la mtCTE en los que se produce un bombeo de protones desde la matriz mitocondrial hasta el espacio intermembrana. Dicho bombeo de protones genera un potencial de membrana

o gradiente electroquímico (de pH o electrogénico) que es aprovechado por el complejo V para la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi, y así completar el proceso de la fosforilación oxidativa (Mitchell and Moyle 1967). El ATP que se obtiene a través de este proceso, es utilizado en los distintos tejidos para mantener las necesidades energéticas celulares.

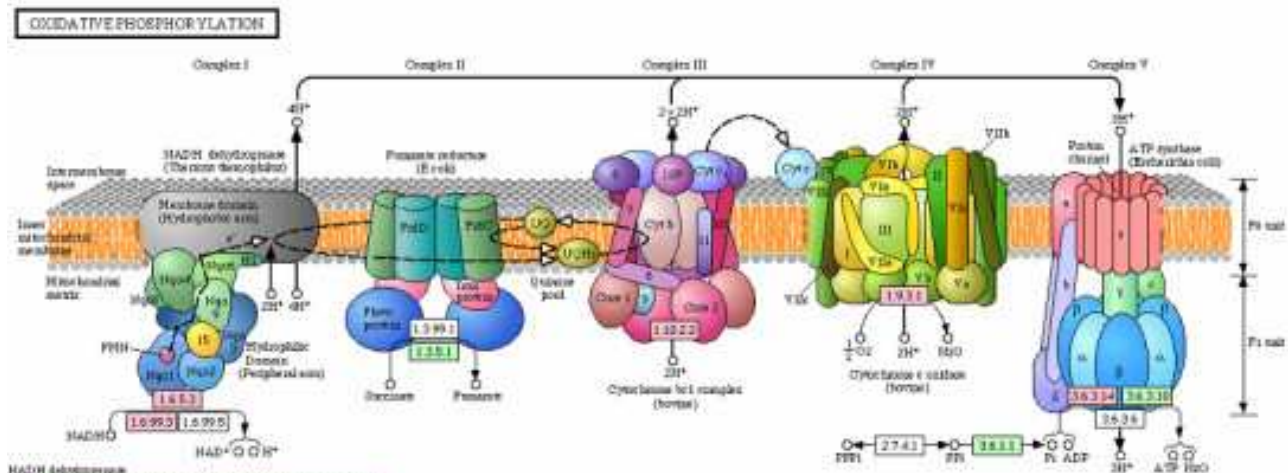


Figura 4. Esquema representativo del sistema OXPHOS. En la figura se muestran los cinco complejos de la mtCTE. Así como los puntos en los que se produce el bombeo de protones.

2.4.1. El complejo I: NADH deshidrogenasa.

El complejo I, también llamado NADH deshidrogenasa o NADH:ubiquinona oxidorreductasa, es el principal punto de entrada de los electrones a la cadena respiratoria, catalizando el paso de los electrones desde el NADH a la ubiquinona mediante un cofactor FMN y al menos ocho centros Fe-S. Este proceso está acoplado al bombeo de cuatro protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana.

Es el complejo más grande del sistema OXPHOS, cuyo peso estimado es de más de 1MDa. En humanos está formado por 45 subunidades, de las cuales 7 están codificadas en el mtDNA (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 y ND6) mientras que las 38 restantes están codificadas en el nDNA.

2.4.2. El complejo II: Succinato deshidrogenasa.

El complejo II o succinato deshidrogenasa, está compuesto por cuatro subunidades codificadas todas en el genoma nuclear (Hagerhall 1997) y como

grupos prostéticos contiene tres centros Fe-S, un grupo citocromo b_{558} y una molécula de FAD unida de forma covalente. Este complejo tiene una función doble, en el ciclo de Krebs transforma el succinato en fumarato y en la mtCTE transfiere los electrones desde el $FADH_2$ hasta la ubiquinona. Este complejo no tiene actividad de bombeo de protones al espacio intermembrana.

2.4.3. El complejo III: Ubiquinol:citocromo c oxidorreductasa.

El complejo III, ubiquinol:citocromo c oxidorreductasa o complejo bc_1 mitocondrial, es un complejo dimérico y cada monómero está compuesto por 11 subunidades estructurales (sólo una está codificada en el mtDNA, la subunidad III o CYT b, que contiene los citocromos de tipo b), que se encuentran en la membrana interna mitocondrial, y varios grupos redox entre los que se encuentran, los citocromos b_{566} , b_{562} y c_1 y un centro binuclear Fe-S conocido como centro Rieske. La función de este complejo es la de catalizar el paso de dos electrones desde el ubiquinol (forma reducida de la ubiquinona) hasta el citocromo c. El complejo III lleva acoplado el bombeo de cuatro protones al espacio intermembrana mediante un proceso cíclico denominado ciclo Q, donde el citocromo b tiene un papel fundamental.

2.4.4. El complejo IV: Citocromo c oxidasa.

El complejo IV o citocromo c oxidasa es el último de los complejos de la mtCTE y su función es la de catalizar la oxidación del citocromo c con la consiguiente reducción del O_2 a H_2O . El complejo es sólo funcional cuando está en forma de dímero. Este proceso lleva acoplado el bombeo de dos protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana por cada molécula de H_2O formada.

En mamíferos, el complejo IV tiene un peso molecular de 200 kDa y se localiza en la membrana interna mitocondrial. Está formado por 13 proteínas, de las cuales sólo tres están codificadas en el mtDNA (COX 1, COX2 y COX3). Como grupos prostéticos contiene dos citocromos, hemo-a y hemo- a_3 , así como dos centros de cobre Cu_A y Cu_B . Las tres proteínas codificadas por el mtDNA son las que forman el núcleo catalítico y contienen los grupos prostéticos (COX1 y COX2).

2.4.5. El complejo V: ATP sintasa.

El complejo V, también llamado ATP sintasa o F_1F_0 -ATPasa, es el quinto complejo enzimático del sistema OXPHOS, cuya función es la de catalizar la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i , para ello utiliza la energía del gradiente electroquímico de protones creado en el proceso de respiración mitocondrial.

Este complejo está formado por 16 proteínas distintas, que forman dos dominios funcionales, F_1 y F_0 , conectados entre sí por un tallo. La región F_1 está localizada en la matriz mitocondrial y forma el dominio catalítico de la ATP sintasa. La región F_0 se encuentra anclada en la membrana interna mitocondrial actuando de poro proteico y permitiendo la conducción de la energía liberada por el paso de protones al romper el gradiente electroquímico hacia la subunidad catalítica. Solamente dos proteínas que forman parte del dominio F_0 están codificadas en el mtDNA, en los genes *Mt-Atp6* y *Mt-Atp8* (mt-Atp6 y A6L).

2.5 Vías alternativas en otros organismos

Al contrario que los mamíferos, las plantas y algunos eucariotas inferiores como protozoos y hongos contienen otras enzimas redox mitocondriales que proporcionan vías alternativas al flujo de electrones. Estas incluyen, por ejemplo, las NADH deshidrogenasas alternativas (NADH-DH), capaces de catalizar la oxidación del NADH de la matriz mitocondrial o del NADH citosólico directamente, y las oxidasas alternativas (AOX) capaces de aceptar los electrones desde el ubiquinol y cedérselos al oxígeno. Estas enzimas alternativas no bombean protones al espacio intermembrana mitocondrial, pero su organización dentro de la cadena hace posible la transferencia de los electrones desde el NADH hasta el O_2 acoplada a la transferencia de protones, al menos por un complejo.

2.5.1. AOX: Oxidasa Alternativa

El cianuro es capaz de inhibir la respiración de mamíferos, ya que actúa bloqueando el transporte de electrones desde el citocromo c hasta el O_2 , actuando a nivel del complejo IV. Muchos microorganismos y plantas sintetizan gran variedad de compuestos cianogénicos para su defensa, de igual forma que muchos depredadores han evolucionado para resistir a este mecanismo de defensa. Muchos parásitos también son capaces de sobrevivir en sus huéspedes pese a la producción de otros inhibidores del complejo IV por parte de estos, como por ejemplo el óxido nítrico (NO) (Chaudhuri, Ott et al. 2006).

Dicha resistencia al cianuro, se basa en la existencia de una “oxidasa alternativa” (AOX), proteína que siempre se localiza anclada a la membrana interna mitocondrial y posee un doble núcleo de Fe que actúa como centro catalítico de la enzima. La función de AOX es transportar los electrones desde el ubiquinol hasta el O_2 , permitiendo saltar desde el complejo I hasta el aceptor final de electrones sin pasar por la parte de la mtCTE dependiente de citocromos (complejos III y IV) (Figura 5).

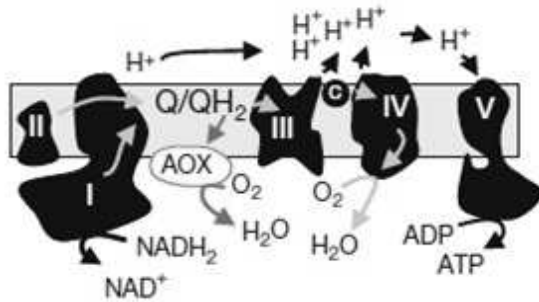


Figura 5. Esquema simplificado de la mtCTE y AOX. En la figura se representa la vía alternativa en la respiración que se puede llevar a cabo con la enzima Oxidasa Alternativa (AOX).

La proteína AOX se había localizado codificada en el genoma nuclear de plantas, la mayoría de hongos y protistas, aunque recientemente se ha ampliado esta lista gracias al análisis bioinformático de genomas, lo que ha permitido detectar la presencia de AOX en 28 especies animales de nueve *phyla* diferentes: *Porifera*, *Placozoa*, *Cnidaria*, *Mollusca*, *Annelida*, *Nematoda*, *Echinodermata*, *Hemichordata* y *Chordata* (McDonald and Vanlerberghe 2004; McDonald, Vanlerberghe et al. 2009).

En plantas AOX es un homodímero, mientras que en hongos y animales parece ser un monómero. En los animales el extremo carboxilo de AOX posee una secuencia común y carecen de una cisteína importante para la regulación en plantas, lo que ha facilitado su identificación por análisis bioinformáticos (McDonald 2009).

En las plantas, AOX parece tener un papel protector frente al estrés oxidativo, ya que reduce la acumulación de ubiquinol que favorece la formación de radicales libres.

La proteína AOX también es capaz de orientar la respiración hacia una menor generación de energía, pues al sortear los dos pasos dependientes de citocromo también se evitan dos translocaciones de protones que contribuyen a la generación del gradiente electroquímico. Debido a la incapacidad de AOX de bombear protones al espacio intermembrana, la energía que se produce en la transferencia de electrones se disipa en forma de calor y esta característica le permite realizar una de sus funciones principales en plantas, la regulación de la termogénesis (Juszczuk and Rychter 2003).

2.5.2. NDI 1

Las enzimas NADH deshidrogenasas, también llamadas NADH-quinona oxidorreductasas, tienen como función catalizar la transferencia de electrones desde el NADH a la quinona, y en algunos casos, llevan acoplado el bombeo de protones y/o Na^+ a través de las membranas. Se pueden clasificar en tres grupos diferentes: las NADH deshidrogenasas capaces de translocar H^+ (complejo I mitocondrial o la enzima bacteriana NDH1); las NADH deshidrogenasas que no pueden translocar iones (NDH2) y las NADH deshidrogenasas capaces de translocar Na^+ (Na^+ -NDH).

Las NDH2 se han identificado en el genoma de arqueas, bacterias, hongos y mitocondrias de plantas, pero no en las de mamíferos. Se trata de un polipéptido cuyo peso molecular es de unos 50 kDa con una molécula FAD como cofactor y ningún cluster de Fe-S. Se pueden clasificar en tres grupos en base a su estructura, NDH-2A con dos motivos de unión a nucleótidos, NDH-2B con motivos de unión a Ca^{2+} , a parte de los dos motivos de unión a nucleótidos y NDH-2C con un único sitio de unión a nucleótidos.

Las mitocondrias de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* carecen de complejo I, y en su lugar contienen tres tipos de NDH-2A asociadas a la membrana interna mitocondrial, dos orientadas hacia el espacio intermembrana (NDE1 y NDE2) y otra hacia la matriz (NDI1) (Figura 6). Realizan el papel de complejo I en mamíferos pero sin contribuir a la generación de gradiente electroquímico ya que no llevan acoplado el bombeo de protones (Bai, Hajek et al. 2001; Yagi, Seo et al. 2006).

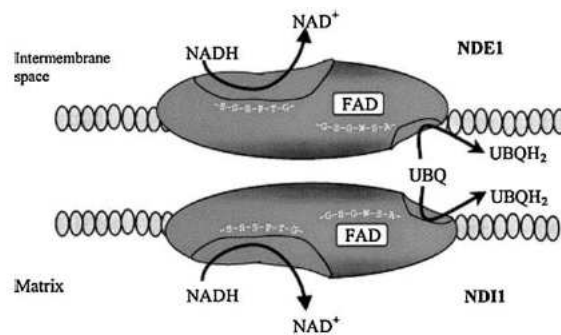


Figura 6. Esquema de NDH de *Saccharomyces cerevisiae*. Representa la capacidad de transferir electrones desde el NADH mitocondrial o citosólico a la ubiquinona.

2.6 Modelos de organización de la cadena de transporte electrónico.

Tradicionalmente, se había considerado que el “modelo fluido” o “random collision model” era la forma en la que los complejos y transportadores de la mtCTE permanecían libres y difundían en la membrana interna, siendo las interacciones entre los distintos elementos el resultado de colisiones más o menos casuales. Estudios recientes han aportado datos que apoyan una organización de los complejos respiratorios a un nivel superior. De manera que los complejos estarían unidos entre sí en la membrana con unas condiciones y estequiometrías determinadas, formando unas unidades funcionales llamadas “supercomplejos o respirosomas” en un modelo denominado “modelo sólido”. Estos supercomplejos, así como su capacidad respiratoria, fueron analizados en un proyecto del grupo GENOXPHOS donde se demostró que su formación es dependiente de la presencia de los complejos constituyentes y su ensamblaje es posterior al de los complejos individuales que los componen. También se demostró que la ubiquinona y el citocromo c estaban presentes en los supercomplejos y que mantenían su capacidad de transferir los electrones desde el NADH hasta el oxígeno.

Debido a estos resultados, el grupo GENOXPHOS ha propuesto un modelo intermedio conocido como "modelo de plasticidad", en el cual los supercomplejos, con varios tipos de asociaciones (I+III, I+III+IV, III+IV, etc.), conviven en un equilibrio dinámico de formación y reconstrucción con los complejos libres que difunden por la membrana (Acín-Pérez, Fernández-Silva et al.2008).

2.7 Patología Mitocondrial.

Las enfermedades mitocondriales, también denominadas encefalopatías mitocondriales, constituyen un amplio grupo de desórdenes clínicos que pueden causar alteraciones en músculo, corazón, hígado, riñones, ojos, médula ósea, páncreas y sistema nervioso periférico. Las primeras observaciones realizadas fueron a principios de 1960, ya que al introducir técnicas morfológicas se pudo realizar el estudio ultraestructural e histoquímico del tejido muscular de pacientes que presentaban trastornos neuromusculares e intolerancia a la actividad física, observándose una proliferación excesiva de mitocondrias de aspecto normal o anormal. Pero no fue hasta 1988 cuando se relacionó una alteración en el mtDNA con una patología mitocondrial (Holt, Harding et al. 1988; Wallace, Singh et al. 1988) y desde ese momento, se han encontrado numerosos defectos en el mtDNA asociados con múltiples desórdenes que suelen tener implicación neuromuscular (Brandon, Lott et al.2005).

Como ya se ha comentado anteriormente, las enfermedades mitocondriales se consideran raras, debido al bajo nivel de prevalencia que presentan entre la población, además tienen un diagnóstico muy complejo ya que son muy variables, tanto desde el punto de vista clínico como genético, pues un mismo defecto genético puede cursar con una gran variedad de presentaciones fenotípicas (Chinnery and Schon 2003).

Debido a la transmisión materna del mtDNA, cuando se produce una mutación en heteroplasmia, dicha mutación es segregada aleatoriamente entre las células hijas debido a un fenómeno denominado segregación replicativa (Gerbitz and Jaksch 1994) que puede dar lugar a todos los grados de heteroplasmia posibles, desde la homoplasmia para la mutación hasta la homoplasmia para el mtDNA silvestre. Como el porcentaje de mtDNA mutado que las células pueden soportar sin observarse efectos fenotípicos es variable, se puede definir un factor umbral de heteroplasmia que dependerá de las demandas energéticas de cada tejido, de manera que la mutación será mucho más grave cuando se manifieste en tejidos que precisen de un alto consumo energético e inapreciable en tejidos con un bajo consumo energético.

Por lo tanto, la segregación replicativa junto con el factor umbral, podrían explicar las diferencias fenotípicas observadas en familias de pacientes con una mutación en el mtDNA, así como la manifestación de una misma mutación que puede afectar a distintos órganos o tejidos dependiendo del individuo.

Actualmente no existe una terapia efectiva para las patologías mitocondriales, sino que la mayoría de tratamientos son paliativos cuya base es la administración de vitaminas, cofactores y aceptores de electrones para paliar los daños en la mtCTE.

Las patologías mitocondriales pueden clasificarse en cuatro categorías dependiendo del tipo de mutación que las provoca:

I. Grandes reorganizaciones del mtDNA

Principalmente son deleciones o duplicaciones espontáneas en el mtDNA, presentándose en heteroplasmia aunque la proporción de mtDNA mutado varía dependiendo del tejido.

Estas mutaciones están asociadas a diferentes patologías como: el Síndrome de oftalmoplejia externa progresiva crónica (CPEO), el Síndrome de Kearns-Sayre y el Síndrome de Pearson.

Todas estas patologías tienen en común grandes deleciones de entre 1 y 9 kb que se localizan en el arco comprendido entre los dos orígenes de replicación pero sin incluirlos, aunque implican la eliminación completa de algún tRNA. Las deleciones no suelen heredarse pero las duplicaciones pueden transmitirse genéticamente vía materna. Las duplicaciones forman dímeros de mtDNA normal y delecionado, que son menos frecuentes pero heredables.

II. Mutaciones puntuales en tRNAs o rRNAs

Las mutaciones descritas en el mtDNA están recogidas en MITOMAP (<http://www.mitomap.org>) y casi la mitad se localizan en los genes codificantes de tRNAs.

Se ha observado que mutaciones en los genes de tRNAs producen gran variedad de defectos (Jacobs 2003) que se asocian con síndromes como el MERRF o el MELAS, mientras que las mutaciones en los genes de rRNAs se han asociado principalmente a fenotipos de sordera, sobretodo tras el tratamiento con aminoglicósidos. También se han descrito mutaciones responsables de la intolerancia al ejercicio y de la aparición de CPEO.

III. Mutaciones en genes que codifican proteínas mitocondriales

Suelen ser pequeñas deleciones puntuales en las proteínas que codifican las subunidades que forman los complejos de la mtCTE, provocando una deficiencia de la mtCTE en el complejo del que forman parte. Algunas patologías causadas por estas mutaciones son la neuropatía óptica hereditaria de Leber, el Síndrome de Leigh y la retinitis pigmentosa (NARP).

IV. Mutaciones en genes nucleares

Las patologías a las que dan lugar suelen ser análogas a las producidas por los genes mitocondriales y se caracterizan por tener un patrón de herencia mendeliano. Muchos genes pueden verse afectados, desde subunidades estructurales de los complejos de la mtCTE, factores de ensamblaje, chaperonas, hasta genes implicados en el mantenimiento, replicación y traducción del mtDNA.

2.8 Terapia génica para enfermedades mitocondriales.

Con el descubrimiento de los enzimas de restricción en 1970, surgió la idea de introducir un DNA exógeno que reemplazara a un DNA original defectuoso en individuos que parecieran enfermedades genéticas, que se denominó terapia génica (Friedmann and Roblin 1972). Con este tipo de estrategias se pretende tratar normalmente enfermedades monogénicas, originadas por la alteración de un único gen recesivo anómalo y en las que basta la mera presencia del producto génico para corregir el efecto.

Como ya se ha mencionado anteriormente, las enfermedades mitocondriales están causadas por alteraciones en el mtDNA y/o nDNA, son difíciles de diagnosticar debido a que presentan una gran variabilidad sintomática y a día de hoy carecen de tratamientos efectivos.

El estudio de patologías derivadas de mutaciones en el mtDNA presenta una serie de dificultades particulares. Así, el mtDNA de mamíferos no se puede manipular a voluntad, existe una barrera interespecífica estricta ya que no se pueden usar mitocondrias humanas en células de otras especies y las mutaciones descritas en el mtDNA de ratón son mucho menos frecuentes que en el caso de los humanos. Por lo tanto, la creación de nuevos modelos animales de estas patologías ha avanzado muy lentamente y resultaría muy útil para poder desarrollar la terapia génica así como otras estrategias.

El uso de la xenoexpresión de proteínas, como NDI1 y AOX, que no están presentes en mamíferos, podría mitigar los fallos de la mtCTE debidos a alteraciones en el mtDNA ya que dichas proteínas pueden realizar en parte las funciones de los complejos de la mtCTE. La xenoexpresión de AOX se ha realizado en células de diferentes tejidos en cultivo, de ratón y humanas, sin observar efectos citotóxicos y se ha localizado en la mitocondria con el uso de secuencias específicas de importe. Asimismo, se ha demostrado que AOX es funcional en aquellos organismos que la expresan de manera natural, ya que las células presentan una respiración resistente al cianuro (Figura 7) (Hakkaart, Dassa et al. 2006; Perales-Clemente, Bayona Bafaluy et al. 2008).

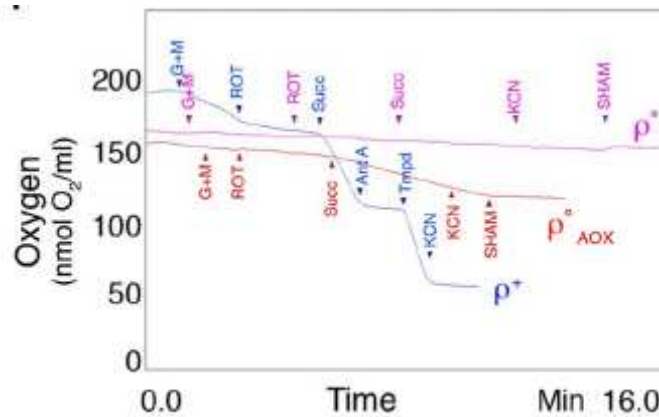


Figura 7. Polarografía que muestra la actividad respiratoria de las líneas celulares (p^0 , p_{AOX}^0 , p^+), en presencia de diferentes sustratos e inhibidores.

La expresión de AOX en células humanas con defectos en la citocromo c oxidasa permite que éstas sean capaces de crecer en condiciones restrictivas (bajo nivel de glucosa) de manera similar a las células salvajes, mientras que las células que no expresan AOX y tienen la mutación no crecen en dichas condiciones. Esta característica es aportada por AOX, ya que es capaz de transferir los electrones desde la ubiquinona al oxígeno, sustituyendo el papel de la citocromo c oxidasa y restableciendo el flujo de electrones a través del complejo I. También se ha demostrado que frente a un estrés oxidativo, las células que expresan AOX tienen una mejor supervivencia al daño oxidativo que las células que no la expresan (Dassa, Dufour et al. 2009).

En un trabajo reciente del grupo, se demostró que las proteínas NDI1 y AOX restauran el flujo de electrones desde el NADH hasta el oxígeno en células p^0 de ratón (células que no tienen mtCTE ya que carecen de mtDNA) sin translocación de protones (Perales-Clemente, Bayona-Bafaluy et al. 2008).

También se ha demostrado la viabilidad de la expresión de AOX en organismos superiores, usando como modelo animal *Drosophila melanogaster*, confiriéndoles resistencia a ciertos inhibidores de la mtCTE, como el cianuro y la antimicina A, y sin observarse alteraciones debido a la expresión de dicha proteína (Fernandez-Ayala, Sanz et al. 2009).

Gracias a la expresión de AOX, en un modelo semiletal del desarrollo debido al silenciamiento parcial del factor de ensamblaje *Surf1* que reduce la actividad de la citocromo c oxidasa en más de un 50% y de los genes *cyclope* (COXVIc), se pudo rescatar de la letalidad a los individuos. En el modelo de *Drosophila dj-1 β* para la enfermedad de Parkinson, AOX ejerce un papel protector frente al estrés oxidativo (Fernandez-Ayala, Sanz et al. 2009).

Estudios recientes en un modelo *in vivo* de *Drosophila*, han demostrado que la expresión de AOX es capaz de compensar la letalidad mediada por el *knockdown* de la subunidad catalítica de la mt-DNA polimerasa γ (POLG- α), la disminución de los niveles de ATP y la neurodegeneración específica de células dopaminérgicas (Humphrey, Hirth et al. 2012).

Recientemente, se ha prestado especial interés a la obtención de líneas de ratones que presenten mutaciones que den lugar a fenotipos equivalentes a los de las enfermedades humanas mitocondriales (Wallace 2001), de esta forma se podría disponer de modelos animales para poder avanzar en el estudio de estas patologías y poder obtener tratamientos más efectivos. Hasta ahora, los modelos más usados han estado basados en cultivos celulares derivados de tejidos de pacientes y algunos organismos recombinantes, los cuales están alejados filogenéticamente de los mamíferos, y por lo tanto, también del ser humano.

Los modelos animales que están en estudio actualmente son estirpes de ratones *knock-out*, creados por recombinación homóloga, para proteínas estructurales de los complejos de la cadena de transporte y para genes importantes en el mantenimiento del mtDNA. Se han utilizado genes homólogos a los que aparecían mutados en pacientes humanos. También se han desarrollado modelos transgénicos basados en la sobreexpresión o eliminación de genes implicados en la biogénesis mitocondrial o en la detoxificación de ROS, entre otros (Torrado, Díaz et al 2009).

Con las técnicas clásicas aún no ha sido posible la generación de ratones *knock-out* para genes codificados en el mtDNA. Sin embargo, lo que sí se ha conseguido ha sido la introducción de mutaciones en el mtDNA con el uso de estrategias de fusión entre células enucleadas (citoplastos) que presentan la mutación y células madre embrionarias (Sligh, Levy et al. 2000) o cigotos (Inoue, Nakada et al.2000). Estas mutaciones son hereditarias y afectan a las subunidades del complejo IV. Defectos en el complejo IV han sido asociados con varias enfermedades mitocondriales y neurodegenerativas (Comi, Strazzer et al. 2002; Darin, Moslemi et al. 2003).

La expresión de AOX, tanto en organismos como *Drosophila* o en cultivos celulares inmortalizados, permite el estudio del potencial terapéutico que puede tener dicha proteína, pero dicha expresión aún está bastante lejos de lo que sería la expresión constitutiva en un mamífero como el hombre. Por ello se abordó la generación de un modelo de ratón *knock-in* que exprese AOX, en el que se encuadra el presente proyecto Máster.

III. MATERIAL Y MÉDOTOS.

1. **Materiales**

1.1 **Reactivos**

Todos los reactivos químicos usados en este proyecto fueron de grado analítico o de grado apto para biología molecular y en su caso, aptos para cultivo celular. Procedían principalmente de las casas comerciales: Bio-Rad, SIGMA-ALDRICH, Panreac, Invitrogen, ROCHE, PROMEGA, MERCK, GIBCO, DIFCO, Amersham y SERVA.

La enzima Taq polimerasa que se utilizó para la reacción de PCR fue “SuperHot Taq BioRon” (Ibion Technologies).

Los medios empleados en el cultivo celular, así como el suero fetal bovino y los antibióticos, fueron de la marca GIBCO®.

1.2 **Kits comerciales**

El kit comercial, para la inmunodetección de proteínas por el método de Western-Blot, que se utilizó fue “EZ-ECL, Chemiluminiscence detection kit for HRP” de la casa comercial Biological Industries.

1.3 **Oligonucleótidos**

Los oligonucleótidos utilizados en este proyecto para el genotipado de los ratones eran de origen comercial y sus secuencias se recogen en el apartado de metodología.

1.4 **Membranas**

Las membranas de PVDF utilizadas para la fijación de las proteínas fueron membranas Hybond™-P de Amersham.

1.5 **Anticuerpos**

Los anticuerpos utilizados durante el desarrollo del proyecto para las inmunodetecciones por Western-Blot se resumen en la siguiente tabla (Tabla 1), detallando la dilución de los mismos en PBS con Tween 20 al 0.1% (PBS-T) y con leche desnatada en polvo al 0.5% y/o 12%.

Anticuerpo primario (Dilución)	Proteína (Diana)	Anticuerpo secundario (Dilución)	Casa comercial
α -HA peroxidasa (1:5000)	Epítipo de la hemaglutinina (HA) conjugado con la peroxidasa de rábano		Roche
α -Actina (1:500)	β - Actina	α - Rabbit IgG (1:6000)	SIGMA
α - C.II 30 kDa (1:5000)	SDHB	α - Mouse (1:5000)	Molecular Probes
α - C.II 70 kDa (1:15000)	SDHA	α - Mouse (1:20000)	Molecular Probes

Tabla 1. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en la inmunodetección de proteínas mediante Wester-blot.

1.6 Animales

Los ratones utilizados en este trabajo fueron de la estirpe C57BL/6J. Suministrados por Harlan Ibérica y criados en el animalario de la Unidad Mixta de Investigación de la Universidad de Zaragoza.

1.7 Líneas celulares eucariotas

Las líneas celulares con las que se trabajó derivan de fibroblastos inmortalizados de ratones AOX y de ratones C57AOX.

2. Metodología

2.1. Cultivos Celulares

Todo el trabajo con cultivos celulares se llevó a cabo en campanas de esterilización de flujo laminar. Todo el material se limpió con etanol al 70%, antes y después de cada sesión de trabajo, dejando conectado el UV al finalizar la misma. Los conductos empleados para la aspiración de los medios de cultivo, mediante bomba de vacío, se lavaron con lejía al 20% tras cada uso y al finalizar la sesión de trabajo, para evitar posibles contaminaciones con agentes patógenos.

Los cultivos se crecieron en incubadores a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5%. Los reactivos se calentaron en un baño a 37°C antes de ser añadidos a los cultivos. Para la aspiración del medio de cultivo y residuos líquidos que habían estado en contacto con las células, se utilizaron pipetas Pasteur estériles y se aspiraron con una bomba de vacío. Todo el material que

estuvo en contacto directo con el cultivo celular se recogió en contenedores especiales para material biológico para su eliminación posterior por empresas especializadas.

Una vez al mes se limpió todo el equipamiento, baño, campanas e incubadores, con etanol al 70%.

2.1.1 Medios de cultivo

Para el crecimiento y mantenimiento de las distintas líneas fibroblásticas de ratón usadas en este trabajo, se utilizó un medio de cultivo preparado a partir del medio comercial DMEM (GIBCO™) con alto contenido en glucosa (4.5 g/l), piruvato de sodio (0.11 g/l) y glutamina (584 mg/l), al que se le añadió un 5% de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO™), el cual aporta proteínas y factores de crecimiento, y un 1% de una mezcla de antibióticos, para prevenir contaminaciones por bacterias (compuesta por 10000 unidades/ml de penicilina G sódica y 10000 µg/ml de sulfato de estreptomina) de Invitrogen.

El medio de galactosa, usado con el fin de que las células obtuvieran su energía principalmente del sistema de fosforilación oxidativa, en los experimentos de citotoxicidad, polarografía y curvas de crecimiento, se preparó partiendo del medio comercial DMEM sin glucosa ni piruvato (GIBCO™) al que se le añadió un 5% de SFB, 0.9 g/l de galactosa, 0.11 g/l de piruvato de sodio (ambos de SIGMA) y un 1% de la mezcla de antibióticos (GIBCO™).

2.1.2 Siembra y mantenimiento celular

Las células se sembraron en placas de Petri aptas para cultivo celular, de 100 ó 150 mm de diámetro o en placas estériles de 6, 12 ó 96 pocillos, a una densidad entre 7500-100000 células/ml de medio de cultivo, y se les añadió un volumen aproximado de 0.2 ml de medio de cultivo/cm² de superficie de la placa.

Los cultivos se conservaron durante su crecimiento y mantenimiento en incubador a 37°C en atmósfera húmeda y con un 5% de CO₂, cambiándoles el medio de forma periódica cada 48-72 horas o cuando se observaba a simple vista la acidificación del medio. Cuando se sometió a los cultivos celulares a la acción de inhibidores de la cadena de transporte electrónico, el medio se renovó cada 24h.

Como todas las líneas celulares usadas en este trabajo fueron adherentes y crecían en monocapa, la resiembra se realizó por tripsinización, cuando éstas alcanzaron el 90% de confluencia aproximadamente en la placa de cultivo. El protocolo seguido en este proceso fue la eliminación del medio por succión con la bomba de vacío, a continuación se lavaron las células con

PBS (0.05 ml/ cm²) (GIBCO™) con el fin de eliminar las proteínas del suero que inhiben el efecto de la tripsina. Una vez eliminado el PBS de las placas se añadió tripsina (0.033 ml/ cm² de una mezcla de tripsina 0.05% (SIGMA) y 0.02% EDTA, en PBS y esterilizada por filtración) y se dejó actuar durante 2-3 minutos en el incubador a 37°C. Transcurrido este tiempo, se comprobó en el microscopio invertido que las células se habían despegado de la placa. La inhibición de la tripsina se realizó mediante adición de suero (SFB) 10% en PBS o con medio de cultivo normal suplementado con SFB 5% obteniendo las células en suspensión y se trasvasaron a un tubo falcon de 15 o 50 ml. A continuación, se centrifugaron las células 5 minutos a 1500 rpm para sedimentarlas, el pellet que se obtuvo se almacenó directamente a -20°C o se resuspendió en 1-2 ml de medio de cultivo para su posterior división, conteo o congelación, dependiendo del uso que se les quisiera dar.

Todos los medios usados para lavar, tripsinizar, centrifugar y cultivar las células, se precalentaron en un baño de agua a 37°C.

2.1.3 Descongelación y congelación de líneas celulares

Para evitar la pérdida accidental de una línea celular por muerte o contaminación y minimizar la acumulación de cambios genéticos, es importante disponer de alícuotas congeladas de las líneas celulares de trabajo.

Para descongelar los stocks de las líneas celulares almacenadas, se cogió el vial de interés del tanque de N₂ (l) y se descongeló directamente en un baño a 37°C para sembrar las células directamente en una placa de cultivo. Para eliminar cualquier traza del Dimetilsulfóxido (DMSO, compuesto crioprotector) que pudiese quedar y afectar negativamente al crecimiento de las células, se cambió el medio de cultivo una vez que las células estuvieron adheridas a la placa.

Para la congelación de las líneas celulares se utilizaron viales criogénicos resistentes al N₂ (l). Las placas de cultivo se crecieron hasta un 80-90% de confluencia, se tripsinizaron y recogieron las células por centrifugación, tal y como se detalla en el apartado (3.2.1.2). El pellet celular obtenido, se resuspendió en 600 µl de medio de cultivo DMEM, pasándolo a un vial criogénico y se añadieron 300 µl de SFB y 100 µl de DMSO. El vial se colocó en un tanque de isopropanol en el -80°C, que permite una congelación paulatina y uniforme (la temperatura va disminuyendo 1°C/minuto). Al día siguiente, se pasaron a un contenedor de N₂ (l) a -200°C, que permite conservar las células durante largos periodos de tiempo (años) sin deterioro celular apreciable.

2.1.4 Contaje celular

Para determinar la densidad celular se utilizó la cámara de Neubauer (Figura 8A) de 0.1 mm de profundidad adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases.

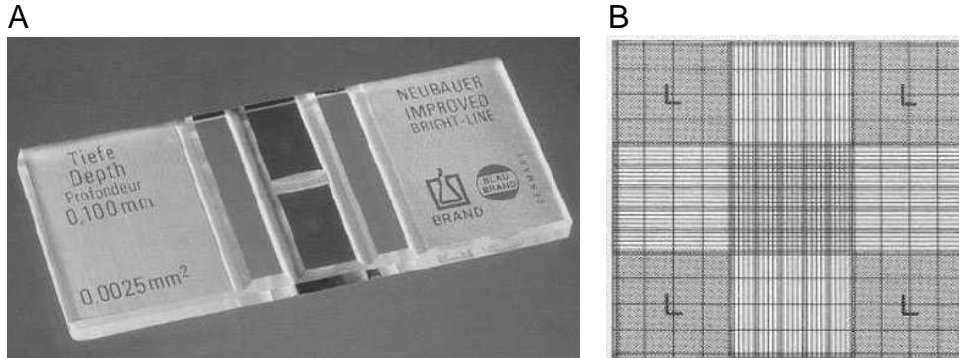


Figura 8. A) Cámara de Neubauer. B) Esquema de la cuadrícula marcada en la cámara.

Una vez se tripsinizaron y sedimentaron las células por centrifugación, se resuspendieron en 1 ó 2 ml de medio de cultivo, hasta conseguir una suspensión celular homogénea. Se tomó una alícuota de 50 μ l en un tubo eppendorf y se diluyó a la mitad con una solución del colorante Azul Tripán (0.4% en NaCl 0.15 M), este colorante permite distinguir las células muertas de las vivas, ya que sólo es capaz de entrar en las células si la membrana plasmática está dañada, tiñéndolas de azul.

Sobre la cámara de Neubauer se colocó un cubreobjetos de cristal y con la ayuda de una micropipeta se depositó una gota de la muestra diluída de células y colorante, de manera que el líquido entró hasta llenar el espacio disponible entre la cámara y el cubre, por capilaridad. Por último, se contaron las células blancas presentes en los cuatro cuadrantes (Figura 8B) y se calculó el número de células por unidad de volumen (ml) presente en la suspensión inicial utilizando la siguiente fórmula:

$$N^{\circ} \text{ de células/ml} = \frac{n^{\circ} \text{ de células totales contadas} \times 10000 \times 2 \text{ (factor de dilución)}}{n^{\circ} \text{ de cuadrantes contados}}$$

2.1.5 Curva de crecimiento

Para determinar la velocidad de crecimiento celular de las distintas líneas celulares utilizadas en este proyecto, se realizaron curvas de crecimiento en las que se calculó el tiempo que tarda una población celular en duplicarse (DT, tiempo de duplicación), en diferentes medios de cultivo.

Se utilizaron placas de microcultivo de 6 y 12 pocillos y el experimento se realizó durante 5 días, sembrando un pocillo para cada día y para cada

condición, con 25000 células/ pocillo de cada una de las líneas celulares sujetas a estudio, en medio glucosa. Una vez adheridas las células a la placa (2h aproximadamente), se realizó el conteo correspondiente de las células de los pocillos a tiempo cero horas, estimándose así la eficiencia del plaqueo. Al resto de pocillos se les puso nuevo medio, correspondiente a cada experimento (glucosa o galactosa, Tabla 2). Cada 24 horas se realizó el proceso de tripsinización y conteo celular de los pocillos correspondientes, así como al cambio de medio de los pocillos restantes.

Para calcular el tiempo de duplicación celular, se representó en una gráfica el número de células frente al tiempo transcurrido y se ajustó a una curva exponencial del tipo:

$$N = a \times e^{bt}, \text{ donde } a \text{ es el } n^{\circ} \text{ de células a tiempo } 0 \text{ y } b \text{ es la velocidad específica de crecimiento.}$$

El tiempo de duplicación (DT) se obtuvo utilizando la fórmula:

$$DT = \ln 2/b.$$

Tipo de curva	Duración	Cambio de medio
Glu (4.5 g/l)	96 h	Cada 48 h
Gal (0.9 g/l)	96 h	Cada 48 h

Tabla 2. Condiciones empleadas en los ensayos de curvas de crecimiento.

2.1.6 Ensayos de viabilidad celular y citotoxicidad de drogas

Para evaluar la supervivencia de nuestras líneas celulares de trabajo en presencia de determinadas drogas como la azida de sodio o la antimicina A que inhiben el complejo IV y el complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial respectivamente, se llevaron a cabo ensayos de citotoxicidad indirectos basados en el MTT (Mosmann, 1983).

Estos se basan en un método colorimétrico sencillo que consiste en medir la formación de un compuesto coloreado, debido a una reacción que tiene lugar en las mitocondrias de las células viables. El MTT es captado por las células y reducido por la enzima succínico deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble, formazán. La capacidad de las células para reducir al MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular. Además la determinación de la capacidad de las células de reducir al MTT a formazán después de su exposición a una droga permite obtener información acerca de la toxicidad del compuesto que se evalúa.

Se partió de células que se encontraban en la fase exponencial de crecimiento y se expusieron a diferentes concentraciones de la droga a evaluar durante 48h. Una vez eliminada la droga, se dejó que las células se recuperaran durante otras 48h y así poder distinguir las células viables que podían proliferar de las que podían vivir pero no dividirse. Las células supervivientes se determinaron indirectamente mediante la reducción del colorante MTT a formazán, ya que la cantidad de MTT-formazán producido es proporcional a las células vivas y puede medirse espectrofotométricamente una vez solubilizado en el disolvente adecuado.

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 7500 y 15000 células/ ml (200 µl de medio/ pocillo). Las células se sembraron en todos los pocillos a excepción de las filas 1 y 12 que se usaron como blancos. Tras 48-72 horas de cultivo, se cambió el medio, añadiendo el que contenía las drogas (filas 2-10), la fila 11 se dejó como control de crecimiento con el medio fresco sin droga. Transcurridas 48 horas se eliminaron las drogas (filas 2-10) y, se añadió medio fresco a todos los pocillos para permitir la recuperación de las células que no estaban muertas durante otras 48 horas, o se procedió a determinar la citotoxicidad. Para ello el medio se reemplazó por 200 µl de medio fresco y se añadieron 50 µl de MTT (5 mg/ ml H₂O destilada). Las placas se taparon con papel de aluminio y se incubaron 3-4 horas a 37°C, transcurrido este tiempo, se eliminó el medio de los pocillos y los cristales de MTT-formazán se solubilizaron mediante la adición de 200 µl de DMSO y 25 µl de tampón glicina (0.1 M glicina, 0.1 M NaCl, pH 10.5, ajustado con 1 M NaOH), a continuación se midió la absorbancia a 550 nm en un lector de placas ELISA.

Para calcular la viabilidad celular para cada concentración de droga se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad } C_1 = (\text{Abs}_{C_1} - \text{Abs}_{\text{Blanco}}) / (\text{Abs}_{C_0} - \text{Abs}_{\text{Blanco}})$$

Para el cálculo de la dosis letal 50 (LD50: dosis de droga necesaria para que la supervivencia celular sea reducida a la mitad), se representó gráficamente la viabilidad celular frente a la dosis de droga ensayada y se ajustó la gráfica a una ecuación exponencial de pendiente negativa.

2.2. Purificación de mitocondrias

2.2.1 Purificación de mitocondrias de células en cultivo

La extracción y purificación de mitocondrias para la polarografía se realizó partiendo de 15 placas de 150 mm al 80% de confluencia, de cada línea celular. Las células se recogieron por tripsinización (apartado 2.1.2) y se mantuvieron en hielo a partir de ese momento.

Tras la centrifugación a 1750 rpm durante 5 minutos, el pellet celular resultante fue lavado 2 veces con PBS frío mediante resuspensión y posterior

centrifugación. El pellet lavado se congeló a -80°C para facilitar la ruptura celular.

Para la extracción de mitocondrias, se descongeló el pellet en un baño de hielo y la ruptura celular se realizó mediante choque hipotónico. Para ello, se resuspendió el pellet en tampón Hipotónico (sacarosa 83mM, MOPS 10mM, pH 7.2) en una proporción tampón:pellet celular de 7:1 (volumen:volumen) aproximadamente. La suspensión de células se mantuvo en hielo durante 2 minutos para permitir el aumento de volumen celular debido al medio hipotónico y así facilitar la ruptura por homogeneización mecánica. Se utilizó un homogeneizador de tejidos de teflón tipo Potter, previamente lavado con medio hipotónico y unido a un taladro BOSCH rotando a unas 600 rpm. Se realizaron entre 8-10 pases, para romper las membranas celulares ya tensas debido al aumento de volumen sufrido. A continuación, el homogeneizado se diluyó a la mitad con tampón Hipertónico (Sacarosa 250mM, MOPS 30mM, pH 7.2), se mezcló bien y se mantuvo en un baño de hielo.

Para separar las mitocondrias de otros componentes celulares se realizó una centrifugación diferencial, mezclando el homogeneizado por inversión y centrifugando a 3000 rpm durante 5 minutos a 4°C , quedando en el sedimento los núcleos y células que no se hubieran roto. Opcionalmente se puede rehomogeneizar el sedimento en las mismas condiciones descritas anteriormente, con el fin de obtener un mayor rendimiento en la extracción mitocondrial. Los sobrenadantes se centrifugaron a 9000 rpm durante 10 minutos a 4°C y el pellet obtenido, enriquecido en mitocondrias, se resuspendió en medio A (sacarosa 0.32 M, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) y dicha suspensión se transfirió a tubos eppendorf, que se centrifugaron a 12000 rpm durante 2 minutos a 4°C en una microcentrífuga. Los pellets resultantes se resuspendieron en medio A, juntando los pellets mitocondriales de 2 tubos en uno y volviendo a centrifugar en las mismas condiciones. Este paso de lavado y centrifugación se repitió hasta tener todas las mitocondrias en un único tubo eppendorf, ya que estos lavados aumentan la pureza de la fracción mitocondrial al eliminar parte de los microsomas y otros contaminantes más ligeros (Fernandez-Vizarra, Lopez-Perez et al. 2002). Por último, las mitocondrias se resuspendieron en medio A, dividiéndolas en dos tubos eppendorf que se centrifugaron en las condiciones anteriores. Uno de los tubos se resuspendió en medio A y se almacenó como alícuota de reserva y el otro tubo se resuspendió en tampón RIPA (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM NaCl, Triton (100x) 1% (detergente no iónico), desoxicolato de sodio 0.5% (detergente iónico) y 5mM EDTA) del cual se determinó la concentración proteica por el método Bradford (Apartado 2.5.3). A ambos tubos se les añadió 5 μl de un cocktail de inhibidores de proteasas (SIGMA) y se almacenaron en el -80°C hasta su uso posterior.

2.2.2 Purificación de mitocondrias procedentes de tejidos

Para la inmunodecección de AOX y la medida de la actividad de la cadena de transporte electrónico mediante determinación de consumo de oxígeno en

ensayos in organello, se realizó la extracción de mitocondrias procedentes de cerebro, hígado, riñón, corazón y músculo esquelético de ratón.

Para preparar los homogenados tisulares, se procedió al sacrificio del animal por dislocación cervical, extrayéndose los distintos órganos: corazón, cerebro, hígado, riñones y músculo esquelético (vaso lateral e intermedio, gastrocnemio y soleo) que se colocaron en tubos falcon de 50 ml que contenían medio A frío (0.32 M sacarosa, 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.4) y se pesaron. Después se trocearon finamente con unas tijeras y se lavaron varias veces (3-5) con el medio A frío para eliminar la mayor cantidad de sangre posible, filtrando con la ayuda de un colador estéril (con el cerebro, este paso se realiza con medio AT frío: 0.075M sacarosa, 0.225M sorbitol, 1mM EDTA, 0.1% BSA, 10mM Tris-HCl, pH 7.4). A continuación las muestras de tejido fueron transferidas a un homogeneizador tipo Potter-Elvehjem de volumen adecuado con un émbolo de teflón unido a un taladro BOSCH rotando a 600 rpm utilizando distintas cantidades de medio A según el tejido y peso del mismo (Tabla 3).

Tejido	Volumen de medio A (ml/g tejido)	Nº de pases
Hígado	4	4
Cerebro	5	8-12
Riñón	5	4
Músculo cardíaco	10	10-15
Músculo esquelético	10	10-15

Tabla 3. Volumen de medio A (ml) por gramo de tejido.

Cada muestra de tejido se homogeneizó realizando varios pases por muestra (dependiendo del tejido), hasta que se observó un homogenado uniforme, el cual se transfirió a tubos Vortex (de plástico) y se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos a 4°C en un rotor basculante. Parte del sobrenadante resultante fue transferido a varios tubos eppendorf, tomándolo de la parte central con ayuda de pipetas Pasteur estériles y procurando no apoyar la pipeta en las paredes del tubo para no tomar grasa que pudiera contaminar las mitocondrias. Los tubos eppendorf se centrifugaron a 12000 rpm durante 2 minutos a 4°C, eliminando posteriormente los sobrenadantes, los pellets mitocondriales obtenidos se lavaron en medio A juntándolos de dos en dos. Este proceso se repitió hasta tener todas las mitocondrias en un mismo tubo.

Finalmente, la fracción mitocondrial obtenida se resuspendió en medio MAITE (25 mM sacarosa, 75 mM sorbitol, 100 mM KCl, 0.05mM Na-EDTA, 1mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, 10 mM H₃PO₄, pH 7.4) y se dividió en 2 tubos eppendorf centrifugando de nuevo a 12000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Uno de los tubos se resuspendió en medio MAITE, para guardarlo como alícuota de reserva y el otro en tampón RIPA, del cual se obtuvo la concentración proteica total a través del método Bradford (Apartado 2.5.3). A las muestras se les añadió 200-400µl de RIPA con un cocktail de inhibidores de proteasas (SIGMA) para su conservación (el volumen a añadir dependía del volumen de muestra obtenido), almacenándolos en el congelador a -80°C.

2.3 Actividad de la cadena de transporte electrónico

2.3.1 Medida del consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno se midió en un electrodo tipo Clark termostatzado Oxytherm, Hansatech Instruments, (Figura 9 y 10) compuesto por un cátodo de platino (Pt) y un ánodo de plata-cloruro de plata (Ag-AgCl), montados en un disco de resina epoxi y que están en contacto a través de un papel espaciador empapado de una solución de KCl saturado al 50% (electrolito), se encuentran separados de la mezcla de reacción por una membrana de teflón permeable al oxígeno. Sobre la pieza que contiene los electrodos se coloca una pieza que incluye la cámara de reacción termostatzada que mantiene la reacción a la temperatura deseada, en nuestro caso 37°C. La cámara se cierra con un émbolo provisto de una abertura capilar en su centro para permitir la salida de aire y la adición de los reactivos durante el experimento. El contenido de la cámara de reacción se mantiene en constante agitación magnética mediante un agitador magnético. Los datos obtenidos en cada ensayo se registraron en un PC con el programa Oxygraph Plus V1.00 de Hansatech Instruments.



Figura 9. Electrodo de oxígeno tipo Clark, termostatzado, de Hansatech Instruments.

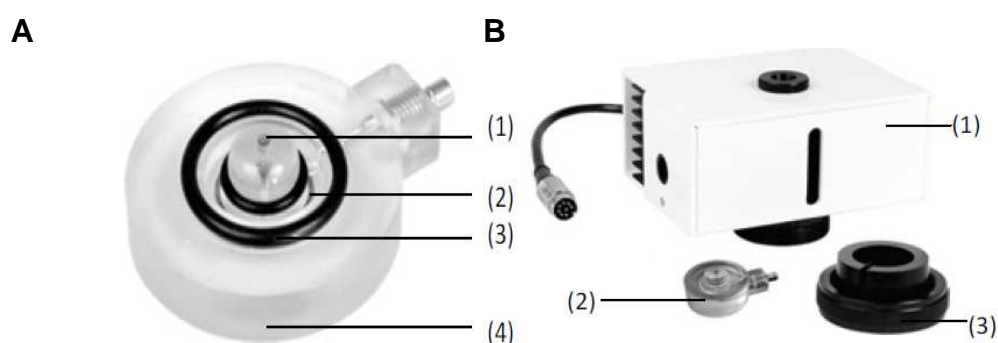


Figura 10. A) 1. Cátodo de Pt, 2. Ánodo de Ag. 3. Anillo de goma que sostiene el papel espaciador empapado en el electrolito y la membrana de teflón que separa los electrodos de la mezcla de reacción. 4. Disco de resina epoxy. B) 1. Cámara termostatzada o de Peltier, 2. Electrodo, 3. Pieza de fijación entre el electrodo y la cámara.

La aplicación de un voltaje polarizante de 700mV ioniza al electrolito que inicia un flujo de corriente a través de distintas reacciones electroquímicas:

Ecuación 1 (Cátodo de Pt): $O_2 + 4 e^- + 2H_2O \rightarrow 4OH^-$

Ecuación 2 (Ánodo de Ag): $2Ag^+ + 2Cl^- \rightarrow 2AgCl + 2e^-$

Reacción Global: $O_2 + 4e^- + 2H_2O + 4Ag^+ + 4Cl^- \rightarrow 4OH^- + 4AgCl + 4e^-$

La corriente que se genera está estequiométricamente relacionada con el oxígeno consumido en el cátodo. Este tipo de electrodo lo desarrolló Clark en 1956 para medir la concentración de oxígeno en sangre.

Antes de empezar cada sesión de trabajo con el electrodo, se fijó la temperatura del Oxyterm a 37°C y se calibró el aparato estableciendo el cero mediante la adición de ditionito de sodio (agente oxidante). Y la adición de sustratos e inhibidores de la cadena de transporte electrónico se realizó utilizando jeringas Hamilton de 10 o 25 µl. Después de cada medida, se lavó la cámara de reacción con agua y albúmina sérica (BSA) al 10%, para eliminar posibles restos de inhibidores, especialmente antimicina A, ya que tras su uso se hace imprescindible la limpieza.

2.3.2 Medida de la actividad de los complejos por polarografía en células permeabilizadas con digitonina

2.3.2.1 Preparación de los reactivos:

Las células se lavaron y resuspendieron en medio A de respiración (20 mM HEPES ajustado a pH 7.1 con NaOH o KOH, 250 mM sacarosa, 10 mM MgCl₂). El medio se preparó, alicuotó y conservó a -20°C. Las medidas se realizaron en medio de respiración que se preparó el mismo día del experimento a partir de medio A de respiración al que se le añadió ADP 1mM y fosfato potásico 2mM.

Las células se permeabilizaron con digitonina al 1% que se preparó por dilución en DMSO de una disolución madre de digitonina al 10% en etanol (teniendo en cuenta que la pureza del producto era del 80%) y luego se recristalizó a 4°C. Finalmente, se centrifugó (5 minutos a 13000 rpm en la microfuga) y se eliminó el etanol, resuspendiendo el sedimento en DMSO. Cada vez que se preparó una nueva disolución stock de digitonina se testó, siguiendo el protocolo de Hofhaus (Hofhaus et al. 1996).

Todos los sustratos para la actividad de los complejos, excepto el TMPD se prepararon en agua a una concentración 1M y pH 7, se alicuotaron y guardaron a -20°C. El TMPD se preparó diariamente a una concentración 120mM en medio A y se protegió de la luz para evitar la autooxidación del producto.

Las disoluciones concentradas de inhibidores también fueron almacenadas a -20°C : Rotenona $500\mu\text{M}$ y Antimicina A $100\mu\text{M}$, ambas en etanol y KCN 200mM en H_2O . Como inhibidor de AOX se utilizó una dilución de SHAM 25mM (ácido salicilhidroxiamílico).

2.3.2.2 Procedimiento experimental

El primer paso del experimento consistió en la permeabilización de las células. Para ello se partió de placas de 150mm de diámetro al 80-90% de confluencia. Las células se recogieron por tripsinización y se contaron. Una alícuota de $5 \cdot 10^6$ células se resuspendió en medio de respiración y se introdujo en la cámara del electrodo, a continuación se añadieron $50\mu\text{g}$ de digitonina ($10\mu\text{g}$ de digitonina por cada millón de células) y se dejó equilibrar durante 10 minutos, con la cámara abierta para favorecer el consumo de los sustratos endógenos de las células. Tras el proceso de permeabilización de la membrana exterior de las células por acción de la digitonina, se añadieron los sustratos e inhibidores que actúan en los distintos puntos de la mtCTE con ayuda de jeringas Hamilton.

- Medida de Complejo I+III+IV:

Sustratos: $10\mu\text{l}$ de una disolución 0.5M de glutamato y 0.5M de malato.
Inhibidor: $10\mu\text{l}$ de la disolución $100\mu\text{l}$ de rotenona.

- Medida de Complejos II+III+IV:

Sustratos: $10\mu\text{l}$ de disolución 0.5M de glicerol-3-fosfato y 0.5M de succinato.
Inhibidor: $10\mu\text{l}$ de $10\mu\text{M}$ de antimicina A.

- Medida de Complejo IV y de AOX :

Sustrato: $10\mu\text{l}$ de una disolución 120mM de TMPD (N,N,N',N'-tetrametil-p-fenildiamina).
Inhibidor: $20\mu\text{l}$ de una disolución 200mM KCN y $10\mu\text{l}$ de una disolución 25mM SHAM.

2.3.2.3 Cálculo de actividades

La actividad de cada uno de los complejos se obtuvo calculando la diferencia entre las pendientes de consumo de oxígeno obtenido al añadir el sustrato específico de cada uno de ellos y la obtenida cuando se añade el inhibidor específico correspondiente (Figura 11).

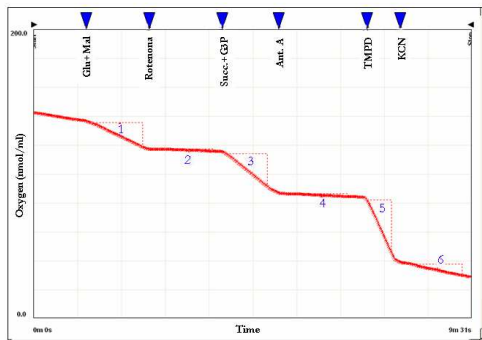


Figura 11. Medida de actividad de complejos por polarografía. En la figura se muestra un ejemplo de gráfica de polarografía obtenida en un experimento con 5×10^6 células de ratón control. En la figura observamos los cambios de pendiente que se producen tras la adición de cada uno de los sustratos e inhibidores. Así, calculamos las actividades de los complejos según las fórmulas:

$$CI+III+IV = \text{pte 1-pte 2}$$

$$CII+III+IV = \text{pte 3-pte 4}$$

$$CIV = \text{pte 5-pte 6}$$

2.4 Metodología con ácidos nucleico

2.4.1 Extracción y purificación de DNA

2.4.1.1 Extracción de DNA a partir de cola, oreja o dedo de ratón

El genotipado de los ratones utilizados en nuestro trabajo, se realizó siguiendo el protocolo de extracción de DNA cedido por Mark Strunk, técnico superior del servicio de genómica del I+CS. Las muestras llegaron en tubos eppendorf perfectamente etiquetados procedentes del animalario de la Unidad mixta de Investigación de la Universidad de Zaragoza. A cada muestra se le añadió 50 μ l de solución de lisis alcalina (25 mM NaOH y 0.2 mM EDTA) y se agitó en un vortex, seguidamente se centrifugaron todas las muestras unos segundos en microcentrífuga y se incubaron en un *thermomixer* primero a 65 °C durante 30 minutos y después a 98°C durante otros 15 minutos. A continuación, se dejaron en un baño de hielo durante 5 minutos, se volvieron a centrifugar unos segundos y a cada muestra se añadió 50 μ l del reactivo de neutralización (40 mM de Tris-HCl a pH 4) agitando en un vortex, seguidamente se centrifugaron durante un minuto en microcentrífuga a 14000 rpm. El último paso es extraer el DNA que se encuentra en la fase superior de cada tubo, para ello se recogieron 80 μ l con mucho cuidado de no arrastrar nada de la fase inferior en la que quedaban los restos procedentes de la digestión y el tejido biopsiado, y se pasaron a nuevos tubos eppendorf correctamente etiquetados y estériles que se almacenaron a -80°C hasta su uso.

2.4.1.2 Extracción de DNA a partir de células en cultivos celulares

Para extraer el DNA de células en cultivo, se tripsinizó y recogió una placa de 100 mm de diámetro al 90% de confluencia, con SFB 10% y se centrifugó 5 minutos a 1500 rpm, se aspiró el sobrenadante y se almacenó el pellet a -20°C hasta su uso posterior.

El pellet obtenido de las células se resuspendió en 250 μ l de TE pH 7.5 (Tris 10 mM / EDTA 1mM) y se digirió con 1.25 μ l de proteinasa K (20 mg/ml), para degradar las proteínas y 5 μ l de SDS al 25% para solubilizar las membranas celulares y se dejó incubando de 12 a 16 h (overnight) a 37 °C. Al día siguiente se añadió 10 μ l de Ribonucleasa A (stock 0.25 mg/ml) para eliminar el RNA presente en la preparación y se dejó incubando entre 15-60 minutos a 60°C, transcurrido ese tiempo se extrajo dos veces con 1,5 V de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó en el vortex 15 segundos y se centrifugó a 13000 rpm 5 minutos. La fase acuosa (superior) se pasó a otro tubo y se extrajo con 1 V de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) agitando en el vortex 15 segundos, se volvió a centrifugar a 13000 rpm 5 minutos y se pasó la fase acuosa a otro tubo. El DNA se precipitó con 0.5 V de acetato de amonio 7.5 M y 1.5 V de isopropanol frío, mezclando por inversión e incubando a -80° C durante 15 minutos. Seguidamente se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos a 4° C, se lavó el pellet con 500 μ l de etanol 70% y se centrifugó de nuevo como antes, y a continuación se eliminó el sobrenadante con la ayuda de una pipeta y se dejó secar a temperatura ambiente o en speed-vac a 45° C. Por último se resuspendió el pellet en 200 μ l de Tris-HCl 10 mM pH 8 y se almacenó a -20° C hasta su uso posterior.

2.4.2 Cuantificación de ácidos nucleicos

La concentración de los ácidos nucleicos obtenidos a partir de los métodos anteriormente citados, se determinó mediante espectrofotometría visible ultravioleta (VIS-UV) con ayuda de un sistema NanovueR Plus (Figura 12).

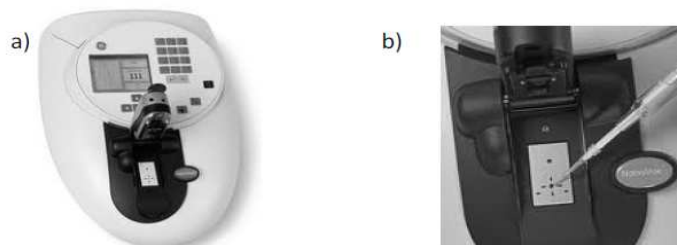


Figura 12. a) Espectrofotómetro Nanovue®. b) Detalle de la zona de carga de la muestra.

Antes de su uso se debe calibrar el aparato, para ello se cargaron 2 μ l de agua destilada repitiéndose la operación dos veces, para verificar el valor cero de absorbancia. Una vez calibrado el aparato, se cargaron 2 μ l de muestra a cuantificar en la zona de carga y el aparato determina la concentración en ng/ μ l y las relaciones de pureza.

2.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó con el fin de obtener gran cantidad de un fragmento de DNA determinado en un termociclador (Figura 13), con la ayuda de una DNA polimerasa termoestable, y así poder

2.4.4 Electroforesis de DNA en gel de agarosa

Los geles se prepararon disolviendo agarosa en tampón de electroforesis TAE (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM), a unos 60–70° C. La concentración de trabajo fue 1.8% (p/v). Posteriormente, y con el gel aún caliente, se añadió bromuro de etidio (10 mg/ ml) hasta una concentración final de 0.5 µg/ml, se mezcló cuidadosamente y se vertió en el molde del gel, se colocó el peine y se dejó gelificar por enfriamiento. Para cargar las muestras en el gel, estas se mezclaron con 1/3 del volumen de colorante (Ficoll 400 al 30% y azul de bromofenol al 0.1% (p/v) en TAE1x). Como marcador de pesos moleculares se utilizó “Low Mass” de invitrogen. La electroforesis se desarrolló en tampón TAE, aplicando un voltaje de 90 V, durante 30 minutos aproximadamente. El gel, tras la electroforesis, se visualizó en un transiluminador de geles GelDoc de BioRad.

2.5 Metodología de proteínas

2.5.1 Extracción de proteínas totales de células en cultivo

La extracción de proteínas totales a partir células en cultivo, se llevó a cabo a partir de placas de 100 mm de diámetro, al 80-90% de confluencia.

Tras eliminar el medio de cultivo, las células se recogieron por tripsinización y posterior centrifugación. El pellet celular resultante se lavó 2 veces con PBS frío, y se procedió al lisado celular añadiendo 200µl de tampón RIPA a 4°C (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 50 mM, Triton X-100 1%, deoxicolato de sodio 0.5%, EDTA 5 mM, esterilizado mediante autoclave), que contenía una mezcla de inhibidores de proteasas (pepstatina 1 µg /ml, leupeptina 1 µg /ml, aprotinina 1 µg /ml, PMSF 1mM), añadidas al tampón de extracción en el momento de su utilización. Los inhibidores de proteasas, a excepción del PMSF, se prepararon en etanol 1000 veces concentrados y se guardaron a -20°C. El PMSF se preparó en isopropanol a una concentración de 200 mM y se conservó a 4°C.

Las células se resuspendieron en tampón RIPA y fueron recogidas en tubos eppendorf. A continuación, se incubaron 15 minutos a 4°C en una rueda giratoria para facilitar la lisis celular completa, y se centrifugaron a 13000 rpm durante otros 15 minutos a 4°C. Finalmente, se recuperó el sobrenadante y se procedió a la medida de la concentración de proteínas en las muestras que se conservaron a -80°C hasta su uso.

2.5.2 Preparación de homogenados tisulares

Para preparar homogenados tisulares, los órganos recién extraídos tras el sacrificio de los animales o congelados en N₂ (l), se colocaron en vasos de vidrio que contenían medio de homogeneización frío (medio A: Sacarosa 0.32 M; Tris-HCl 10 mM (pH = 7.4); EDTA-Na 1 mM) y se pesaron. Después, se trocearon finamente con unas tijeras y se lavaron varias veces (3-5) con el medio de homogeneización para eliminar la mayor cantidad posible de sangre

y pelos. A continuación, los distintos órganos se homogeneizaron, tal y como se ha descrito anteriormente (ver apartado 2.2.2, tabla 3). De cada uno de los homogeneizados se tomaron distintas alícuotas y se congelaron inmediatamente a -80°C . Cada una de esas alícuotas se utilizó para un fin distinto (medida de actividades espectrofotométricas, extracción de DNA, medida de la producción de ROS, etc). Las alícuotas destinadas a medidas de actividades, se sometieron a “*freeze-thawing*” antes de su uso, método muy usado para lisar células, consiste en congelar rápidamente la suspensión celular en hielo seco-etanol y descongelarla rápidamente en un baño muy caliente ($80-90^{\circ}\text{C}$). Este método de lisis hace que las células se hinchen y se encojan, hasta que se rompan debido a los cristales que se forman durante el proceso de congelación. Se necesitan varios ciclos de congelación/descongelación para facilitar la rotura de la membrana celular.

2.5.3 Cuantificación de proteínas por el método Bradford

La cuantificación de la concentración proteica de extractos celulares totales o de mitocondrias aisladas se llevó a cabo por espectrofotometría, utilizando el método de Bradford (Bradford 1976).

Para ello, se elaboró una curva de calibrado, formada por 6 diluciones patrón que contenían: 1, 3, 5, 10, 15 y 20 μg de BSA respectivamente. Las muestras, diluidas o no, se midieron por triplicado. Tanto las muestras, como los patrones y blancos, se llevaron a un volumen final de 800 μl en agua mili-Q y se les añadieron 200 μl del reactivo Bradford concentrado (Bio-Rad Protein assay). Se dejó desarrollar el color durante al menos 5 minutos (máximo una hora) y, finalmente, se procedió a la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm.

Con estos valores de absorbancia de las diluciones patrón, se construyó una recta de calibrado en la que se interpolaron las absorbancias obtenidas con cada una de las muestras, para calcular la concentración proteica presente en las mismas.

2.5.4 Electroforesis de proteínas desnaturante en SDS-PAGE

La separación electroforética de las proteínas que componen los extractos celulares obtenidos se llevó a cabo mediante geles desnaturantes de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).

El sistema que se utilizó para realizar este experimento fue Mini Protean III de BioRad (Figura 13) y las disoluciones necesarias para preparar los geles fueron las siguientes:

- **Disolución stock de acrilamida-bisacrilamida:** acrilamida 30%: bisacrilamida 0.8% (p/v), se filtró y almacenó protegida de la luz a 4°C .
- **Tampón de electroforesis 10x:** Tris-HCl 250 mM, glicina 1.92M, SDS 1%(p/v).

- **Tampón gel separador 4x:** Tris-HCl 1.5M pH 8.8, SDS 0.4%, EDTA 8mM.
- **Tampón gel concentrador 4x:** Tris-HCl 0.5M pH 6.8, SDS 0.4%, EDTA 8mM.
- **Tampón de carga 4x:** Glicerol 10%, Tris-HCl 50mM pH 6.8, SDS 2%(p/v), azul de bromofenol 0.02% (p/v), β -mercaptoetanol 1% (v/v).

El porcentaje del gel concentrador fue siempre del 5% y el del gel separador del 12.5%. Para preparar 5 ml de gel separador del 12.5% de acrilamida:bisacrilamida y 2 ml de gel concentrador, se mezclaron los compuestos que se recogen en la siguiente tabla (Tabla 6).

Disolución	Gel separador (12.5%)	Gel concentrador (5%)
Acrilamida :Bisacrilamida (30%)	2.125 ml	0.33 ml
Tampón 4x	1.25 ml	0.5 ml
H ₂ O destilada	1.5 ml	1.1 ml
10% persulfato amónico (APS)	30 μ l	20 μ l
TEMED	5 μ l	5 μ l

Tabla 6. Reactivos para preparar el gel de la electroforesis SDS-PAGE.

El gel separador se vertió entre los cristales que forman el soporte, dejando unos 2 cm para el gel concentrador. A continuación se añadió una fina capa de isopropanol para favorecer la formación del frente y evitar la posible entrada de oxígeno, que dificultaría la polimerización. Una vez polimerizado el gel, se eliminó el exceso de isopropanol y se lavó su superficie con agua destilada. Tras retirar el exceso de agua con un papel secante, se vertió el gel concentrador. Finalmente, se insertó el peine con cuidado y se esperó la polimerización del gel concentrador. Cuando polimerizó, se quitó el peine y antes de cargar las muestras, se limpiaron los pocillos para retirar los restos de acrilamida y SDS. La cubeta se llenó de tampón de electroforesis 1x y se procedió a cargar las muestras, mezcladas con tampón de carga y el marcador de pesos moleculares "Precision Plus Protein Dual Color" de Bio-Rad. La electroforesis se desarrolló a una intensidad de corriente constante de 10 mA hasta que las muestras alcanzaron el gel separador, momento en el que se subió la intensidad de corriente a 20 mA hasta que las muestras llegaron a la altura deseada, lo que se pudo controlar gracias a la posición de las bandas del marcador.



Figura 14. Sistema Mini Protean III Bio-Rad

2.5.5 Transferencia de proteínas a membrana

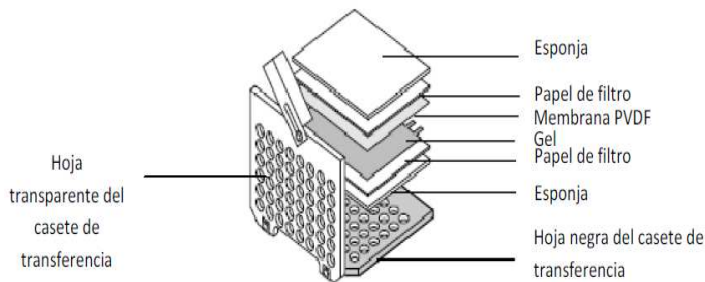
La transferencia de las proteínas separadas electroforéticamente a membranas de PVDF se realizó mediante electrotransferencia utilizando el sistema Mini Trans-Blot Cell de Bio-Rad (Figura 15B).

Para ello se cortó un trozo de membrana de PVDF (Hybond-P de Amersham) adecuado al tamaño del gel a transferir, se incubó en metanol durante 10 segundos, se lavó con agua destilada durante 5 minutos y finalmente se equilibró durante 10 minutos, en el tampón de transferencia (BSN: Tris 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20% (v/v)). Simultáneamente, el gel se sumergió en el mismo tampón durante 20 minutos.

El “sándwich” del aparato de transferencia se montó sumergido en tampón de transferencia, siguiendo las indicaciones del fabricante (Figura 15A). Las esponjas y papeles de filtro se humedecieron en BSN antes de colocarse y la transferencia se realizó a 4°C a 100V durante 2 horas o a 30V durante toda la noche.

Una vez terminada la transferencia, se dejó secar la membrana a temperatura ambiente y seguidamente las proteínas se fijaron a la misma sumergiéndola en metanol durante 10 segundos. La membrana se lavó con PBS y se utilizó inmediatamente para la detección o se conservó envuelta en film de plástico y papel Whatman 3MM a 4°C hasta su uso.

A



B



Figura 15. A) Esquema del montaje del sándwich. B) sistema Mini Trans-Blot Cell de Bio-Rad

2.5.6 Visualización de proteínas: Tinción con Ponceau S

La eficiencia de la transferencia se comprobó tiñendo las proteínas de la membrana de forma reversible con una solución de Rojo Ponceau-S (SIGMA) durante 5 minutos, se retiró el exceso de colorante y se aclaró con agua para permitir su visualización. Las membranas se decoloraron lavando dos veces durante 5 minutos en agua y PBS-T (PBS: NaCl 137mM, K_2HPO_4 1.76mM con Tween 20 0.05% (SIGMA)).

2.5.7 Inmunodetección de proteínas por Western-Blot

2.5.7.1 Incubación con los anticuerpos

Antes de empezar la primera incubación, la membrana se lavó con PBS-T (Tween 20 al 0,1% en PBS) durante el tiempo necesario para su rehidratación y todas las incubaciones y lavados para la inmunodetección de proteínas mediante Western-Blot se realizaron con agitación.

Lo primero que se hizo fue bloquear la membrana para eliminar los posibles sitios de unión inespecíficos de la misma. Para ello, se incubó la membrana en una disolución de leche desnatada en polvo al 12% en PBS-T y 4 mg/ ml de BSA durante al menos una hora a temperatura ambiente o a 4°C toda la noche. Seguidamente, se eliminó el exceso de agente bloqueante mediante un lavado con PBS-T de 5 minutos.

El primer anticuerpo, HA-peroxidasa que no precisa de anticuerpo secundario, se diluyó en la proporción adecuada (ver tabla1) en una disolución de PBS-T con 1.5% de leche desnatada en polvo y 2.5 mg/ ml BSA. La incubación de dicho anticuerpo se dejó 2 horas a temperatura ambiente, o a 4°C durante toda la noche. Pasado este tiempo, se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBS-T, y la membrana ya estaba lista para la detección de proteínas (ver apartado 2.5.7.2) y su posterior reutilización (ver apartado 2.5.7.3).

Cuando se usó anticuerpo primario y secundario, el protocolo que se utilizó fue el siguiente. Se incubó la membrana en una disolución de leche desnatada en

polvo al 5% en PBS-T al menos 1 hora, o a 4°C toda la noche. Transcurrido ese tiempo, se eliminó el exceso de agente bloqueante con un lavado de 5 minutos de PBS-T. El anticuerpo primario comercial se diluyó en la proporción adecuada (ver tabla1) en una disolución de PBS-T con 0.5% de leche desnatada en polvo. La incubación se dejó 2 horas a temperatura ambiente o a 4°C toda la noche. Pasado ese tiempo, la membrana se lavó con PBS-T tres veces durante 10 minutos. El anticuerpo secundario (anti IgG de ratón o de conejo conjugado con peroxidasa de rábano) se diluyó a la proporción adecuada (ver tabla 1) en 0.5% de leche desnatada en polvo disuelta en PBS-T y se incubó la membrana con él durante 1 hora. Finalmente, se eliminó esta última disolución y se procedió a los tres últimos lavados de 10 minutos con PBS-T.

2.5.7.2 Detección de las proteínas

La detección de la proteína de interés se realizó mediante la reacción de la enzima peroxidasa de rábano, conjugada al anticuerpo secundario, al entrar en contacto con el luminol como sustrato quimioluminiscente, para ello se utilizó el kit comercial “EZ-ECL” de Biological Industries.

La membrana, incubada con los anticuerpos correspondientes, se incubó durante un minuto con el sustrato quimioluminiscente y la luz emitida en dicha reacción se detectó, tras envolver la membrana en un film transparente de plástico, al exponerla en un cassette con una película fotográfica, durante el tiempo adecuado. Pasado el tiempo de exposición, dicha película se reveló usando el líquido de revelado de Kodak® durante no más de 2 minutos (controlando la aparición de señal), se fijó sumergiéndola 1 minuto en el fijador Kodak® y finalmente se lavó con agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente. Cabe destacar, que todo este proceso se realizó en cuarto oscuro.

2.5.7.3 Reutilización de las membranas

Con el fin de eliminar los anticuerpos unidos a las proteínas fijadas en la membrana y poder volver a reutilizarla en otra inmunodetección, la membrana se sumergió en una solución *stripping* (2-mercaptoetanol 100mM, SDS 2%, Tris-HCl 1M, pH 6.7) y se incubó durante 30 minutos a 58°C, con agitación ocasional, lo que permite la desnaturalización de los anticuerpos.

A continuación, se realizaron tres lavados de 10 minutos a temperatura ambiente con PBS-T y a partir de ese momento, la membrana estaba lista para ser reutilizada.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados se dividen en dos secciones concordantes con los objetivos del presente proyecto, y forman parte de la caracterización del modelo de ratón *knock-in* que expresa la proteína oxidasa alternativa AOX.

1. Análisis de la función de la proteína AOX

Con el fin de determinar la funcionalidad de la proteína AOX, se realizaron diversos ensayos con líneas celulares inmortalizadas derivadas de fibroblastos de ratones AOX. Estas líneas celulares habían sido obtenidas previamente en el laboratorio, a partir de muestras de tejido provenientes de cada una de las tres variantes genóticas del ratón AOX (+/+, +/-, -/-), e inmortalizadas con el vector lentiviral pLOX-Ttag-iresTK.

1.1 Ensayos de resistencia a azida de sodio y antimicina A

En trabajos anteriores, se había descrito que la xenoexpresión de AOX confiere, a las células en cultivo y a los organismos, resistencia a la toxicidad del cianuro. Asimismo, se ha demostrado que AOX permite transferir electrones de la ubiquinona al oxígeno, rescatando parcialmente mutantes del complejo III y IV, y regulando la producción de ROS en células con defectos mitocondriales.

Con el objetivo de determinar si dicha proteína confiere resistencia a diferentes inhibidores de la cadena de transporte electrónico y, así, poder concluir que la proteína AOX no solo se expresa y se dirige a la mitocondria, sino que además es capaz de mantener su funcionalidad en nuestro modelo, realizamos ensayos de resistencia a cianuro potásico, azida de sodio y antimicina A.

La citotoxicidad fue evaluada con el método MTT, tal y como se detalló anteriormente (ver apartado 2.1.6 de materiales y métodos). Se utilizaron las líneas celulares de fibroblastos inmortalizados provenientes de los ratones AOX +/+ y AOX -/- para calcular la dosis letal 50 (LD₅₀), y comprobar si la expresión de AOX confería resistencia a la toxicidad para cada una de los compuestos empleados.

Después de consultar la bibliografía, determinamos las diferentes concentraciones que fueron evaluadas en cada uno de los ensayos realizados (Tabla 7), y así se pudo poner a punto el protocolo para la determinación de la LD₅₀.

Inhibidor	Rango Concentraciones
cianuro potásico	0.075 - 10 mM
azida de sodio	0.15 - 20 mM
antimicina A	2.5 - 50 nM

Tabla 7. Inhibidores y rango de concentraciones utilizadas en los ensayos de citotoxicidad.

Los resultados obtenidos para el cianuro potásico no permitieron establecer una diferencia significativa entre los dos tipos celulares, debido a que los vapores del KCN se distribuían entre todos los pocillos y provocaban la muerte de todas las células de la placa, por lo que se descartó seguir trabajando con este compuesto.

Sin embargo, las diferencias encontradas en los experimentos realizados con azida de sodio (inhibidor del complejo IV) y con antimicina A (inhibidor del complejo III) fueron evidentes e incluso detectables a simple vista en las placas analizadas, mediante la aparición de formazán, compuesto de color morado producido en las células vivas (Figura 16). Se observó una mayor viabilidad en las células AOX $+/+$ frente a las AOX $-/-$, lo que parecía indicar que la proteína de interés AOX, expresada en las células AOX $+/+$, aporta resistencia frente al efecto tóxico de la azida de sodio (Figura 15A) y de la antimicina A (Figura 16B) a dichas células, en comparación con las células AOX $-/-$ que no expresan la proteína AOX.

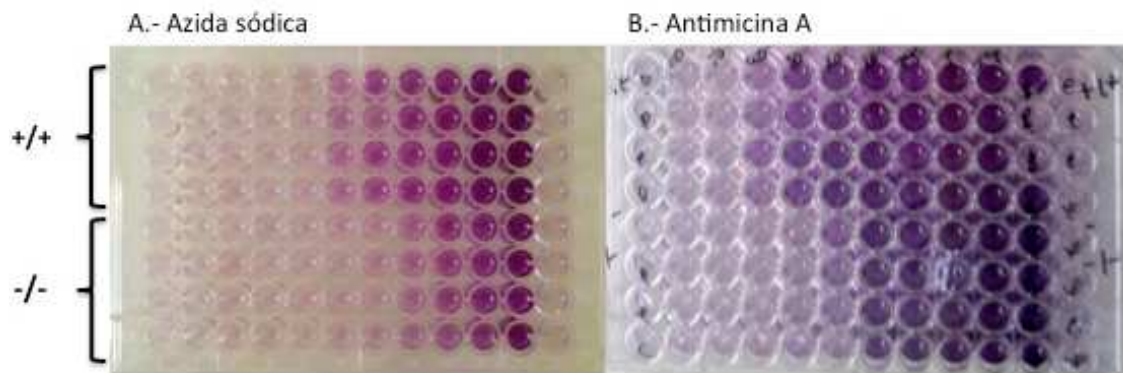
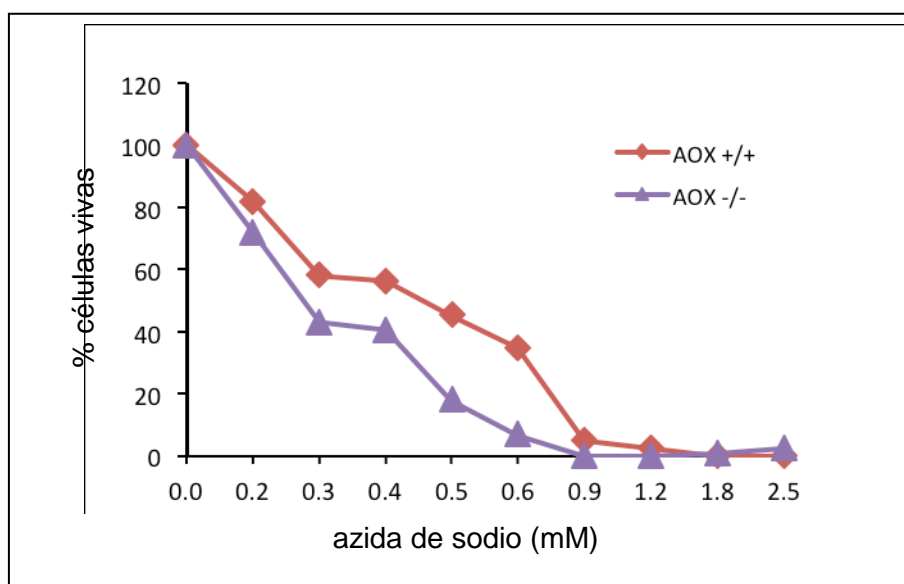


Figura 16. Placas de 96 pocillos de los ensayos de citotoxicidad por MTT, para la azida de sodio (A) y para la antimicina A (B). En ambas placas, las 4 filas superiores corresponden a la línea celular AOX $+/+$ y las 4 inferiores a la línea celular AOX $-/-$.

Para los ensayos de citotoxicidad por azida de sodio se utilizaron las siguientes concentraciones: 0.15 mM, 0.2 mM, 0.3 mM, 0.4 mM, 0.5 mM, 0.6 mM, 0.9 mM, 1.25 mM, 1.8 mM, 2.5 mM, 5 mM, 10 mM y 20 mM. En la Figura 17A se muestra la gráfica de los datos obtenidos en uno de los experimentos realizados, a partir de los cuales se calcularon los valores de LD_{50} para azida de sodio en las dos líneas celulares analizadas (AOX $+/+$ y AOX $-/-$). En la Figura 17B y en la Tabla 8 se muestran los resultados obtenidos después de diez experimentos con azida de sodio, la diferencia entre las dos líneas celulares estudiadas fue estadísticamente significativa.

A



B

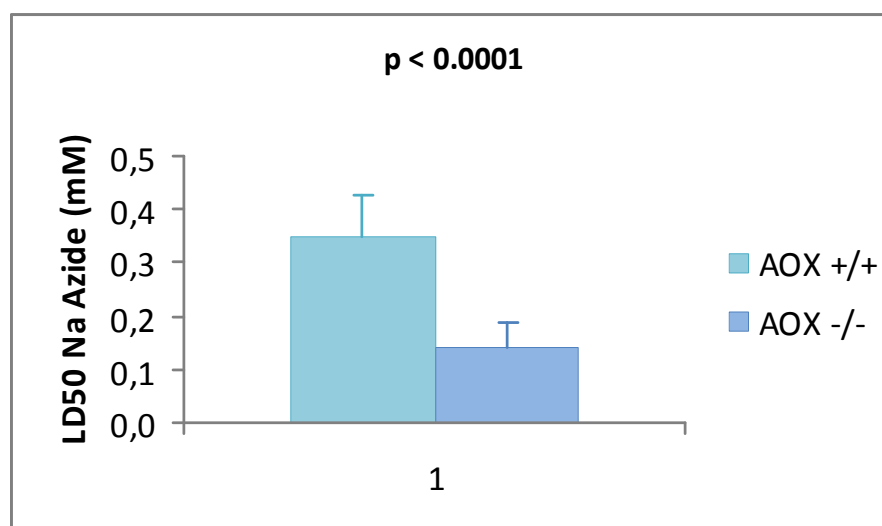


Figura 17. A. Gráfica que representa la viabilidad de la células frente a diferentes concentraciones de azida de sodio, para las líneas celulares AOX +/+ y AOX -/-. B. Gráfica de la LD₅₀ para la azida de sodio de células AOX +/+ y AOX -/-. $p < 0.0001$

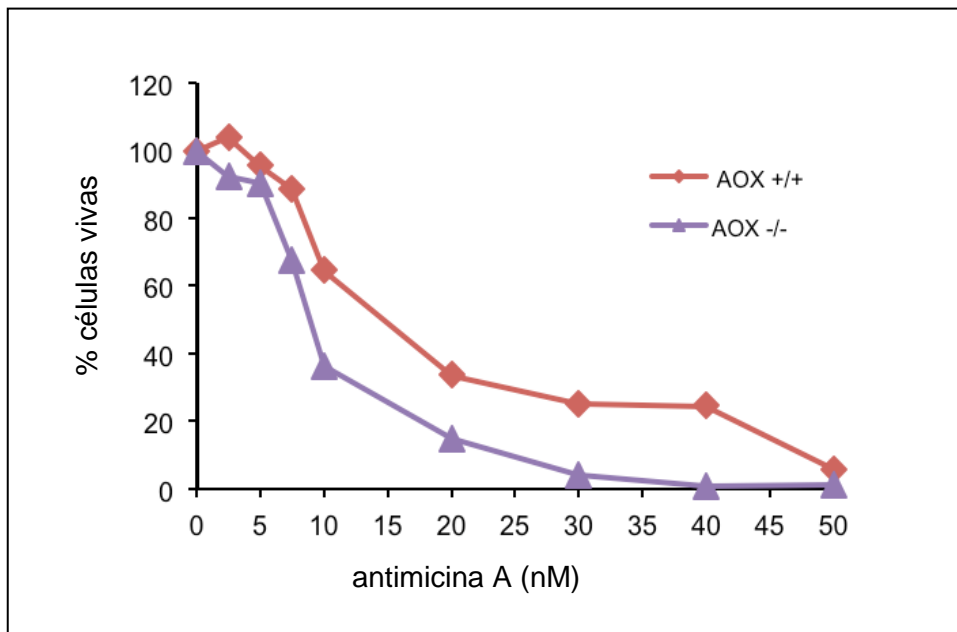
Línea Celular	Azida de sodio LD ₅₀	Antimicina A LD ₅₀
AOX +/+	0.350 mM	13.208 nM
AOX -/-	0.141 mM	8.321 nM

Tabla 8. Valores obtenidos de la LD₅₀ para cada línea celular y droga utilizadas.

Para los ensayos de citotoxicidad por antimicina A se utilizaron las siguientes concentraciones: 2.5 nM, 5 nM, 7.5 nM, 10 nM, 15 nM, 20 nM, 25 nM, 30 nM,

40 nM y 50 nM. En la Figura 18A se muestra la gráfica de los datos obtenidos en uno de los experimentos realizados, a partir de los cuales se calcularon los valores de LD₅₀ para antimicina A en las dos líneas celulares analizadas (AOX +/+ y AOX -/-). En la Figura 18B y en la Tabla 8 se muestran los resultados obtenidos después de diez experimentos con antimicina A, la diferencia entre las dos líneas celulares estudiadas fue estadísticamente significativa.

A



B

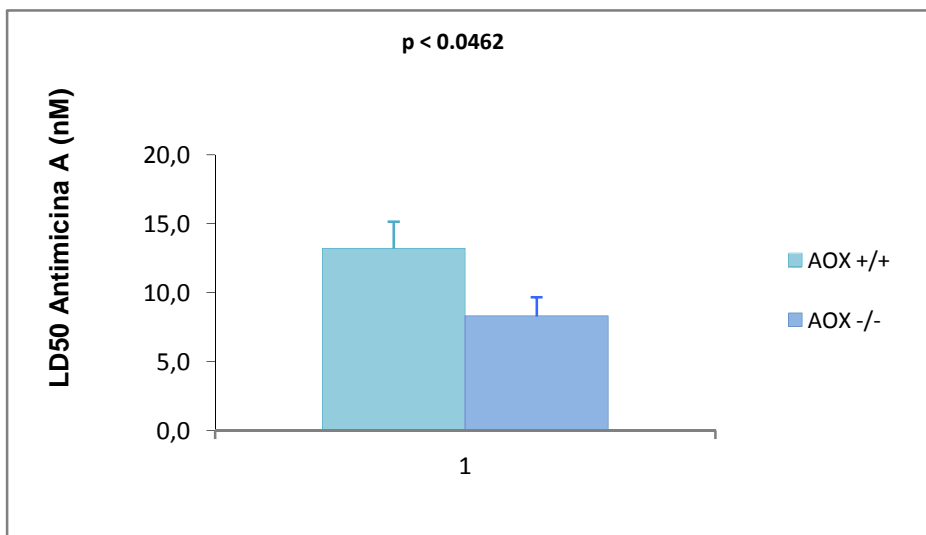


Figura 18. A. Gráfica que representa la viabilidad de las células frente a diferentes concentraciones de antimicina A, para las líneas celulares AOX +/+ y AOX -/-. B. Gráfica de la LD₅₀ para la antimicina A de células AOX+/+ y AOX -/-.

Las diferencias estadísticamente significativas observadas entre los fibroblastos immortalizados AOX +/+ y AOX -/- en los ensayos de citotoxicidad

descritos indican que la expresión de AOX confiere resistencia a las drogas analizadas, antimicina A y azida de sodio, inhibidores del complejo III y IV de la mtCTE, respectivamente, y confirman por tanto la funcionalidad de dicha proteína.

1.2 Ensayos de respiración en células

En un trabajo anterior del grupo, se generaron y caracterizaron células en cultivo de ratón que sobreexpresaban AOX (C57AOX). Se demostró que estas células seguían manteniendo un cierto consumo de oxígeno (respiración) en presencia de rotenona, antimicina A y cianuro, inhibidores de los complejos I, III y IV de la mtCTE, respectivamente, mientras que en presencia de ácido salicilhidroxiámico (SHAM, inhibidor específico de la actividad de AOX), el consumo residual de oxígeno se detenía. Del mismo modo, la sobreexpresión de AOX en líneas celulares ρ^0 (carentes de mtDNA) mostraron una respiración resistente a cianuro y sensible a SHAM (Figura 19).

El objetivo de estos ensayos fue comprobar si las líneas celulares derivadas de fibroblastos de los ratones AOX knock-in (+/+, +/- y -/-) presentaban esta misma característica. Para ello se analizó la funcionalidad de AOX en la mtCTE, mediante polarografía, midiendo el consumo de oxígeno con un electrodo tipo Clark, tal y como se describió anteriormente (ver apartado 2.3.1 de materiales y métodos).

Para estos ensayos, se siguieron las pautas detalladas en el apartado 2.3.2 de materiales y métodos.

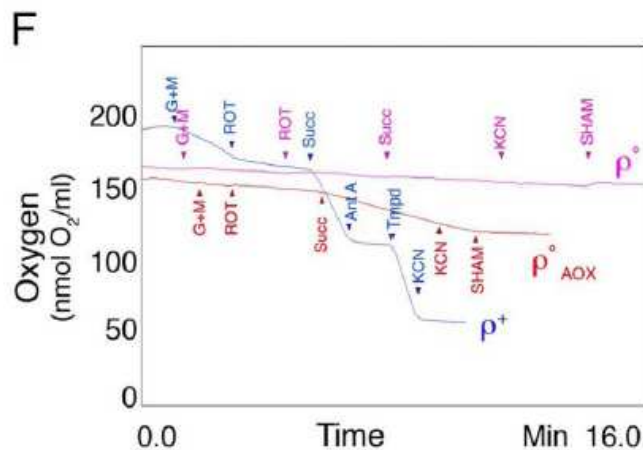


Figura 19. Polarografía que muestra la actividad respiratoria de las líneas celulares (ρ^0 , ρ_{AOX} , y control ó ρ^+), en presencia de diferentes sustratos e inhibidores.

En los ensayos de respiración, cabe destacar que las líneas celulares de trabajo se crecieron en medio con galactosa con el fin de que las células obtuvieran la energía principalmente del sistema de fosforilación oxidativa y de esta forma tratábamos de forzar la sobreexpresión de la proteína de interés

AOX. En dichos ensayos, se evaluó el consumo de oxígeno para las líneas celulares de AOX (+/+, +/- y -/-), utilizando diferentes secuencias de adición de sustratos e inhibidores, como se detalla seguidamente:

1. Glutamato+Malato (sustratos del complejo I), Rotenona (inhibidor del complejo I), Succinato (sustrato del complejo II), Antimicina A (inhibidor del complejo III), TMPD (sustrato del complejo IV), KCN (inhibidor del complejo IV y de toda la mtCTE) y SHAM (inhibidor específico de AOX).
2. Glutamato+Malato, Rotenona, Succinato, KCN y SHAM.
3. Glutamato+Malato, Rotenona, Succinato, Glicerol-3-fosfato (sustrato del complejo III), KCN y SHAM.
4. Glutamato+Malato, ADP, Succinato, KCN y SHAM.
5. Glutamato+Malato, ADP, Rotenona, Succinato, Antimicina A, TMPD, KCN y SHAM.
6. Succinato, Piruvato (10mM), ADP, KCN (100 μ M) y SHAM.

Los resultados mostraron que en todos los casos el KCN inhibía totalmente la respiración y no se observaba variación de la pendiente tras añadir SHAM, por lo tanto, no se detectaba actividad de la proteína AOX. También se probó a añadir SHAM antes que el KCN, ya que como la expresión de AOX por estas células es muy baja, si la pendiente cambiaba al añadir SHAM podía ser debido a que la actividad de AOX quedaba inhibida por SHAM y no enmascarada por la inhibición del cianuro. Pero tampoco en este caso se observaron resultados positivos.

Se realizó un experimento adicional, para el cual se extrajeron mitocondrias purificadas de cultivos celulares (siguiendo el protocolo 2.2.1 del apartado de materiales y métodos) de las líneas celulares de AOX +/+, +/- y -/- con el fin de aumentar la actividad específica con respecto a las preparaciones de células. Los sustratos e inhibidores que se añadieron fueron los indicados antes en el punto 4. Tampoco se detectó actividad de AOX, pues al añadir SHAM no se producían cambios en la pendiente. La respiración quedaba totalmente inhibida tras la adición de KCN.

Al no obtener resultados positivos, se concluyó que el nivel de expresión de AOX en las células AOX +/+ es muy bajo. Con el fin de tratar de aumentar los niveles de expresión de AOX, se crecieron las células en presencia de KCN (concentración final 0.5 mM) durante un periodo de 48 horas previo al experimento de respiración. Como control positivo se utilizó la línea celular C57AOX, que sobreexpresa la proteína AOX. Una vez digitonizadas las células se añadieron de manera consecutiva los sustratos e inhibidores nombrados anteriormente en el punto 3. En las células C57AOX sí fue posible detectar actividad de AOX, ya que al añadir SHAM se inhibía el consumo de oxígeno.

Pero los resultados obtenidos para las células AOX +/+ con 0.5 mM KCN volvieron a ser negativos, pues no se observaban cambios al añadir SHAM, y de nuevo el KCN inhibía el consumo de oxígeno por completo.

Finalmente, se diseñó un último experimento de respiración para intentar detectar actividad de AOX, en el cual se trataron las células AOX +/+ y AOX -/- con la dosis LD₅₀ obtenida en el ensayo de citotoxicidad para la azida de sodio (0.3 mM azida de sodio). Se esperaba, de este modo, forzar la selección de aquellas células que expresaran mayores niveles de AOX. Una vez digitonizadas las células se añadieron de manera consecutiva los sustratos e inhibidores indicados en el punto 6. Se utilizó una concentración de KCN menor (100 µM), para asegurarnos que el KCN no enmascaraba la posible actividad de AOX. Pero tampoco se obtuvieron en este caso resultados positivos ya que no se observó inhibición por parte de SHAM.

A la vista de estos resultados debemos concluir que la expresión de AOX en las líneas celulares de trabajo tiene un nivel muy bajo e insuficiente para detectar su actividad por este método, aunque la proteína sea funcional como demuestran los ensayos de citotoxicidad.

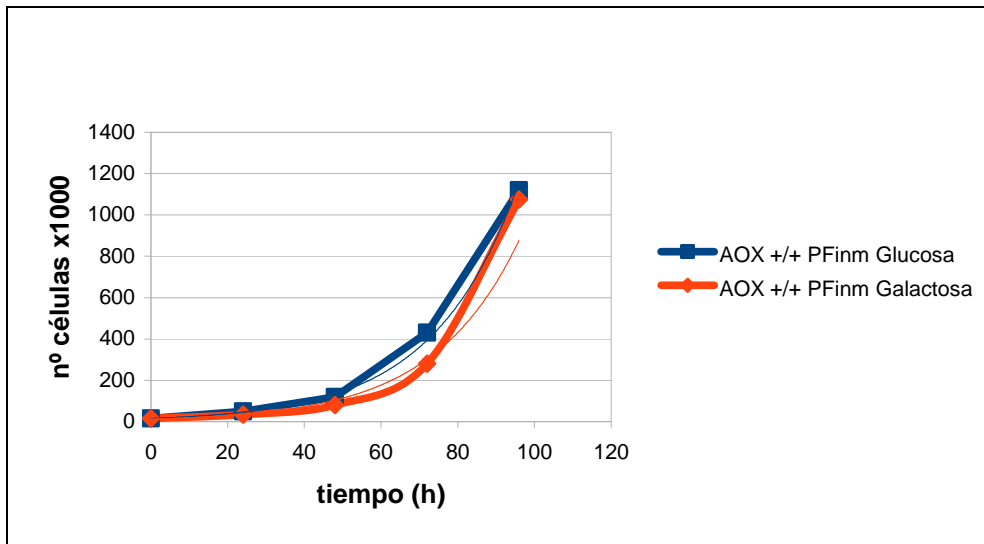
1.3 Determinación del tiempo de duplicación

Como parte del objetivo 1 se realizaron curvas de crecimiento de las líneas celulares de fibroblastos inmortalizados provenientes de las tres variantes genotípicas del ratón AOX (+/+, +/-, -/-), para así, determinar la velocidad de crecimiento celular en cada uno de los medios utilizados.

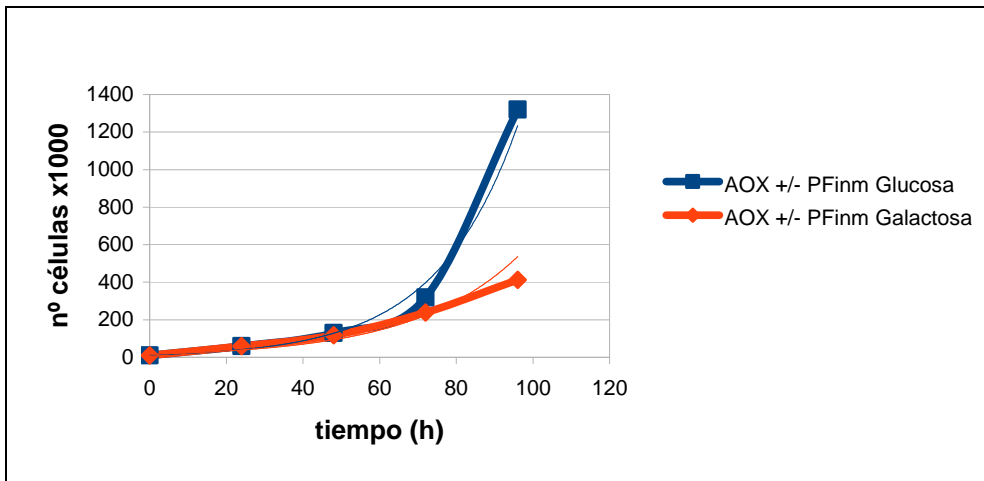
La curva de crecimiento se realizó mediante conteo diario de las células, tal y como se detalló anteriormente (ver apartado 2.1.5 de material y métodos) para cada línea celular. Los medios de cultivo empleados fueron glucosa (4.5 g/l) y galactosa (0.9 g/l).

Para calcular el tiempo de duplicación de cada línea celular, se representó gráficamente el número de células frente al tiempo transcurrido y se ajustó a una curva exponencial del tipo $N = a \times e^{bt}$. Las gráficas obtenidas se muestran a continuación (Figura 20).

A.



B.



C.

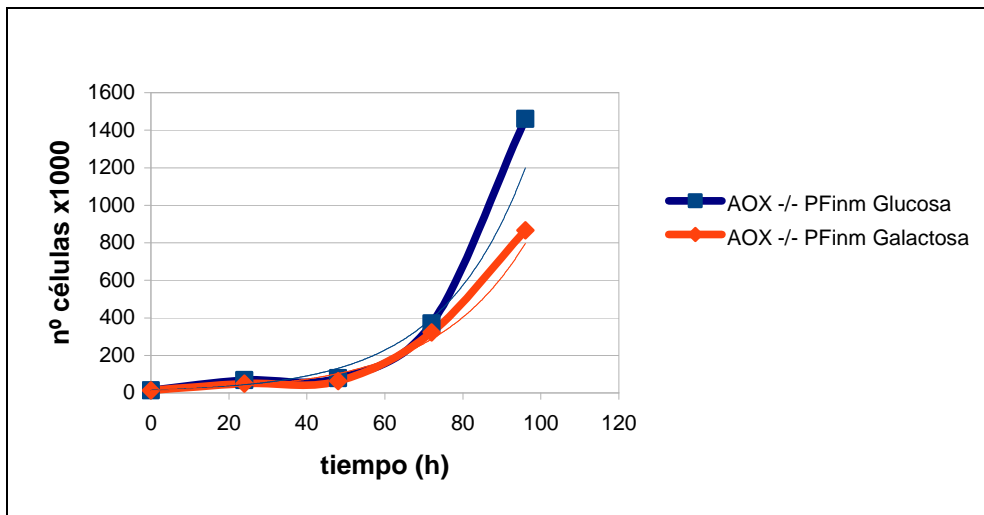


Figura 20.. Representación del número de células frente al tiempo para las líneas celulares: A) AOX +/+, B) AOX +/- y C) AOX -/-, en medio glucosa (azul) y medio galactosa (naranja).

Una vez ajustadas las gráficas, se aplicó la siguiente fórmula para calcular el tiempo de duplicación de cada línea celular:

DT: Ln 2/ b

Los valores del DT que se obtuvieron para cada línea celular se muestran en la siguiente tabla (Tabla 9).

Línea celular	DT (Glucosa)	DT (Galactosa)
AOX +/+	15.44	15.58
AOX +/-	14.68	19.09
AOX -/-	15.04	16.27

Tabla 9. Resultados del DT para cada línea celular de trabajo.

No se obtuvieron diferencias significativas en el crecimiento de las líneas celulares que expresan AOX (AOX +/+ y +/-) respecto de las que no la expresan (AOX -/-). Sin embargo, se concluyó que la galactosa afecta el crecimiento normal de estas líneas celulares, ya que hace que las células se despeguen cuando empiezan a estar confluentes. Esto puede deberse a que la conversión de galactosa en glucosa es un proceso muy lento, y la glucólisis y el sistema OXPHOS en este caso funcionan a un ritmo más reducido para producir la cantidad de ATP necesario para el crecimiento de las células.

2. Análisis de la expresión de la proteína AOX

2.1 Análisis de la expresión de AOX en ratones jóvenes y adultos

En esta segunda parte de los resultados se continuó y amplió el análisis de la expresión de la proteína AOX en el ratón. Los experimentos se centraron en la detección y localización en la mitocondria de la proteína AOX mediante la técnica de Western-Blot (apartado 2.5 de material y métodos). En un trabajo anterior realizado por el grupo se había detectado la expresión de AOX a nivel de mRNA mediante PCR a tiempo real.

Previamente, se había demostrado que la proteína AOX (42 kDa) es detectada como una triple banda en los análisis de Western-Blot realizados con muestras de extractos mitocondriales provenientes de ratón AOX +/+. La presencia de tres diferentes bandas puede ser explicada por el procesamiento que sufre la proteína al entrar en la mitocondria por parte del sistema de importe mitocondrial (TOM/TIM). Lo que indica que la proteína AOX es capaz de importarse a la mitocondria, integrándose con los sistemas de importe y localización a nivel celular.

Se analizaron extractos mitocondriales procedentes de tejido, tanto de crías (1-1.5 semanas de edad) como de adultos (más de 2.5 meses), de ratones AOX +/+ y -/-, independientemente del sexo, para observar si la expresión de AOX variaba respecto a la edad y madurez de los ratones. Como control positivo se utilizó proteína total de la línea de fibroblastos recombinantes de ratón

C57AOX, ya que expresan AOX a altos niveles de manera constitutiva, desarrollada y caracterizada previamente por el grupo. Como control negativo se utilizaron las muestras extraídas de los ratones AOX $-/-$, debido a que estos ratones no expresan la proteína AOX.

Se trabajó con fracciones mitocondriales de diferentes tejidos (cerebro, hígado, riñón, músculo esquelético y músculo cardíaco), obtenidas tal y como se detalla en el apartado 2.2.2 de materiales y métodos. Las muestras se sometieron a electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 12.5%, se transfirieron a membranas de PVDF para su posterior inmunodetección con anticuerpos específicos. Las condiciones de trabajo se detallan en el apartado 2.5.4 de materiales y métodos.

Se analizó la presencia de AOX en los tejidos de ratones AOX ($+/+$ y $-/-$), tanto de crías como de adultos. Para ello, se cargó en los geles 100 y 200 μ g de fracción mitocondrial por pocillo, y una cantidad 20 veces menor de proteína total de la línea celular C57AOX como control positivo. Los niveles de expresión de AOX se compararon con los de actina y los de la subunidad de 30 ó 70 KDa del complejo II, sometiendo a las membranas a *stripping* para eliminar el primer anticuerpo (HA-peroxidasa) y se reincubó secuencialmente con anticuerpos contra estas proteínas. Un ejemplo representativo de los resultados obtenidos se muestra en la Figura 21.

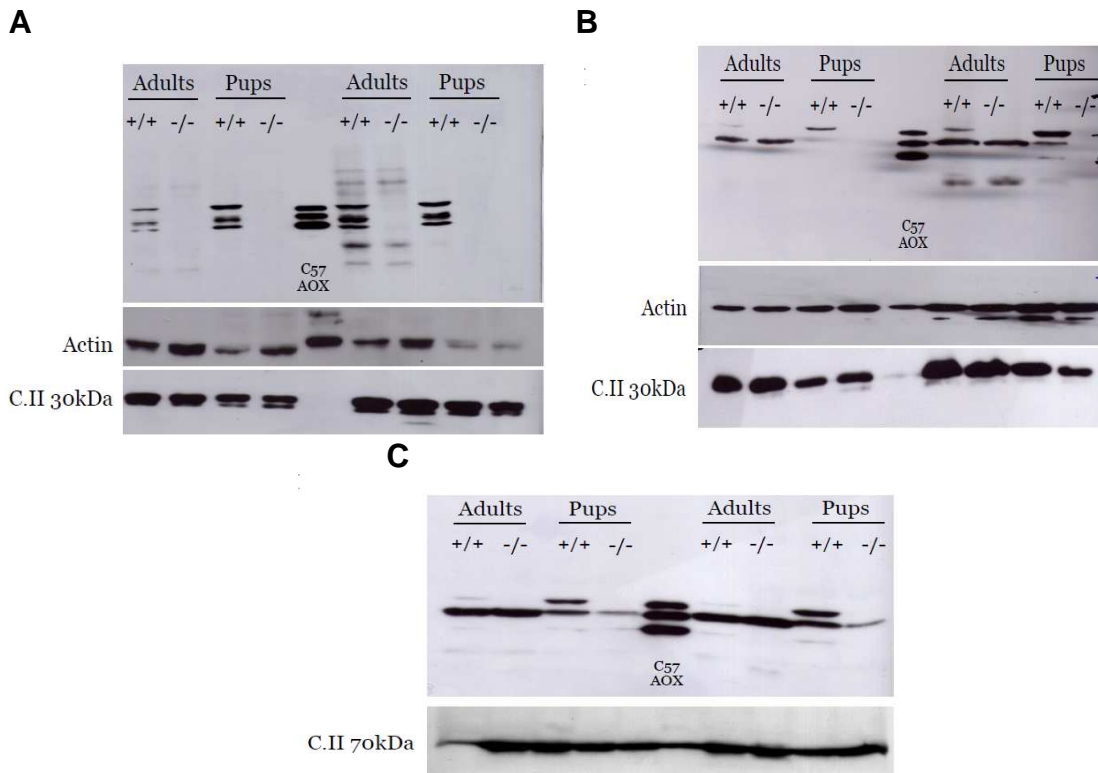


Figura 21. Detección de AOX por Western-Blot, de extractos mitocondriales procedentes de: (A) Hígado, (B) y (C) Cerebro, de ratones AOX (adultos y crías). En todos los casos se usó como control positivo C57AOX. En todos los geles, de izquierda a derecha, las 4 primeras calles se cargaron con 100 μ g de proteína y las 4 últimas con 200 μ g de proteína.

Con los resultados obtenidos se pudo afirmar que los animales jóvenes (de 1-1.5 semanas) presentan mayor nivel de expresión de la proteína AOX que los adultos.

Por otra parte, se sospechaba que las proteínas en nuestras muestras de trabajo, y en particular la proteína AOX, se degradaban al ir congelándolas y descongelándolas para usos posteriores. Por ello, se hizo un Western-Blot en el que la misma muestra de un animal joven AOX +/+ se analizó en diferentes condiciones: una alícuota se cargó directamente (sin tratamiento previo), otra se incubó a temperatura ambiente 15 minutos antes de cargarla, a 37°C durante 5 minutos y a 37°C durante 15 minutos. Los resultados se muestran en la siguiente figura (Figura 22).

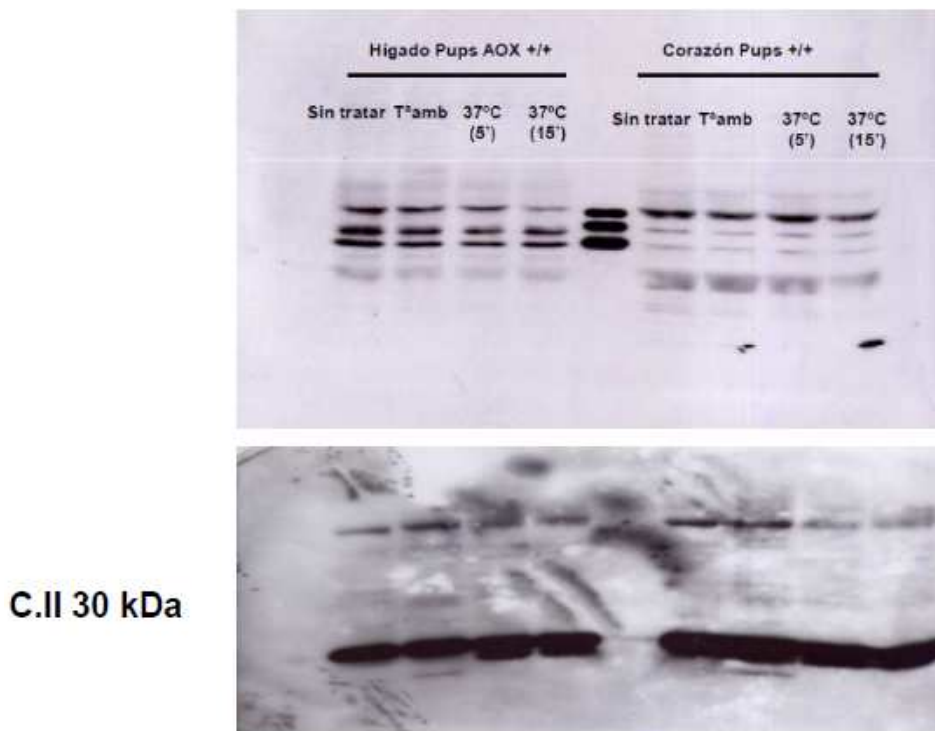


Figura 22. Detección de AOX con el anticuerpo Anti-AOX (HA-peroxidasa) de muestras de cría de ratón AOX +/+ de extracto mitocondrial proveniente de tejido de hígado y corazón. La misma membrana fue reutilizada con el anticuerpo contra subunidad 30 KDa del complejo II, como control de carga.

En este experimento se pudo constatar que las bandas correspondientes a AOX, en particular la de mayor peso molecular, se degradaban con las diferentes incubaciones, siendo estos resultados más claros para las muestras que procedían de hígado. Esto puede deberse a que el hígado posee más lisosomas que el resto de tejidos y, por lo tanto, en él hay más proteasas que posiblemente no se inactiven totalmente al añadir los inhibidores de proteasas.

También se quiso estudiar la ubicuidad de la expresión de la proteína AOX en los ratones AOX. Para ello se analizaron mediante Western-Blot, muestras de diferentes tejidos provenientes de los ratones *knock-in*. Se eligieron, por su

especial relevancia en patología mitocondrial, músculo esquelético y cardiaco, cerebro, hígado y riñón.

Se realizaron varios Western-Blot para cada tejido, y en cada gel se cargó tanto extracto mitocondrial de ratones AOX como proteína total. Como control positivo se volvió a utilizar C57AOX y como control negativo las muestras de tejido provenientes de ratones AOX $-/-$. Un ejemplo representativo de los resultados que se obtuvieron se muestran en la siguiente figura (Figura 23).

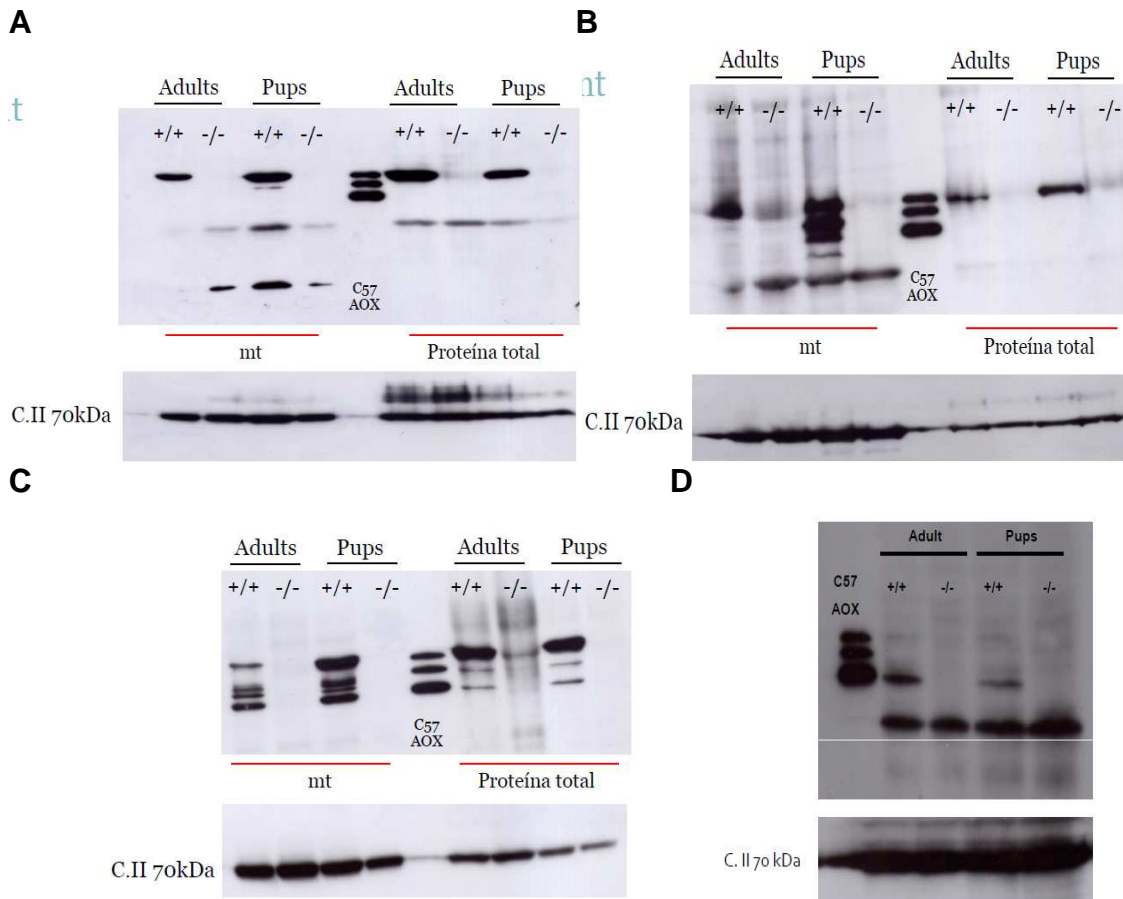


Figura 23. Western-Blot para la inmunodetección de AOX. En cada pocillo se cargó 150 μ g de extracto mitocondrial (mt) y de proteína total de (A) Músculo, (B) Corazón, (C) Hígado y Cerebro (dato no mostrado). (D) Western-Blot de extracto mitocondrial de tejido de riñón (150 μ g/pocillo). En todas las membranas se utilizó el anticuerpo primario contra AOX (HA-peroxidasa) y se reincubaron con el anticuerpo contra la subunidad de 70 kDa del complejoII, como control de carga.

En las muestras de músculo, corazón, hígado y cerebro, se observó en general una mayor intensidad en la señal que corresponde a la banda superior de AOX. Se cree que esta banda representa a la proteína que no ha sufrido procesamiento, mientras que la banda inferior correspondería a la proteína madura. Sin embargo, en la muestra control (C57AOX) se observó que la proteína madura presentaba una mayor proporción. Como se ha mencionado anteriormente, el nivel de expresión de AOX era mayor en ratones jóvenes y la banda con mayor intensidad de señal se corresponde con la proteína cuando aún no ha sufrido procesamiento. Esto se observó sobre todo en las muestras

de cerebro, corazón y músculo (Figuras 21 y 23). Por lo tanto, podemos concluir que hay una menor eficiencia en el importe del precursor en muestras provenientes de tejidos que en muestras provenientes de cultivos celulares.

El último tejido que se estudió fue el de riñón. En los resultados obtenidos en el Western-Blot se volvió a observar que la expresión de AOX es mayor en crías de ratones AOX +/+ en comparación a los adultos AOX +/+. Pero en este caso la señal más intensa de AOX correspondería a la banda inferior, lo que podría deberse a que en este tejido la forma de AOX más estable corresponda a la estructura de la proteína madura.

2.2 Análisis de la expresión de AOX en fibroblastos inmortalizados de ratón

Como parte de este segundo objetivo se realizaron también los ensayos para analizar la expresión de AOX en las líneas celulares provenientes de los fibroblastos inmortalizados de ratón AOX de los tres genotipos (+/+, +/- y -/-).

Para dichos ensayos se procedió a la extracción de proteína total a partir de cultivos celulares (ver apartado 2.5.1 de materiales y métodos) y las muestras obtenidas se sometieron a geles desnaturalizantes (SDS-PAGE) del 12,5%, tal y como se detalla en el apartado 2.5.4 y 2.5.5 de materiales y métodos, para finalmente realizar la inmunodetección de AOX mediante Western-Blot (apartado 2.5.7 de materiales y métodos).

Se cargaron 100 µg/pocillo de cada muestra en el gel (Figura 24). Como control positivo se utilizó C57AOX.

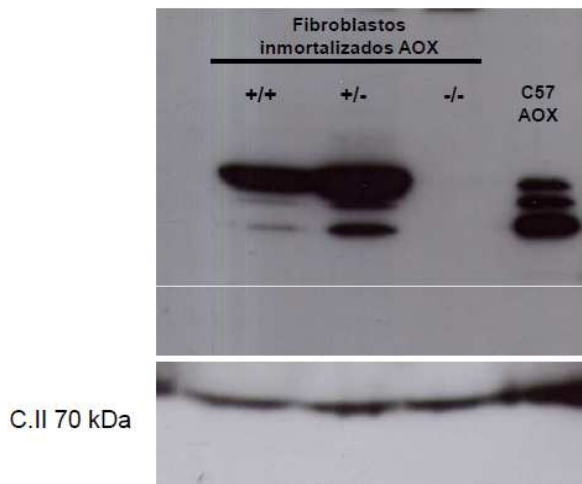


Figura 24. Western-Blot de las líneas celulares derivadas de fibroblastos de ratón AOX de los tres genotipos con anticuerpo contra AOX y como control de carga anticuerpo contra la subunidad 70 kDa del complejo II.

Los resultados que se obtuvieron fueron los esperados, en AOX -/- no se expresaba AOX, mientras que la triple banda característica de AOX en +/+ y +/-

sí fue detectada. La banda con más intensidad de señal volvió a ser la banda superior. Como control de carga se utilizó el anticuerpo contra la subunidad de 70 kDa del complejo II.

2.3 Genotipado de las líneas celulares y de los ratones.

Este tipo de ensayos se realizaron a lo largo de todo el proyecto para confirmar de que se estaba trabajando con los genotipos adecuados en las líneas celulares y para identificar los genotipos obtenidos en los cruces de los ratones, y así evitar posibles errores en su utilización posterior.

Para ello se extrajo DNA tanto de las líneas celulares de trabajo como de los ratones (apartados 2.4.1.2 y 2.4.1.1, respectivamente, de materiales y métodos) y se realizó una PCR siguiendo el protocolo detallado en el apartado 2.4.3 de materiales y métodos. Una vez hecha la PCR, las muestras se sometieron a electroforesis en gel de agarosa de 1,8% (apartado 2.4.4 de materiales y métodos). Tras la electroforesis, el gel se visualizó en un transiluminador de geles GelDoc de BioRad. La identificación de los diferentes genotipos se basa en la presencia y tamaño de los productos de la PCR (Tabla 10)

PCR AOX	PCR tamaño del producto (pb)
Homocigoto AOX +/+	711
Heterocigoto AOX +/-	711 + 400
Homocigoto AOX -/-	400

Tabla 10. Tamaño de los productos de PCR según genotipo.

Con los resultados obtenidos se identificaron las diferentes muestras según el genotipo (Figura 25 y Figura 26).

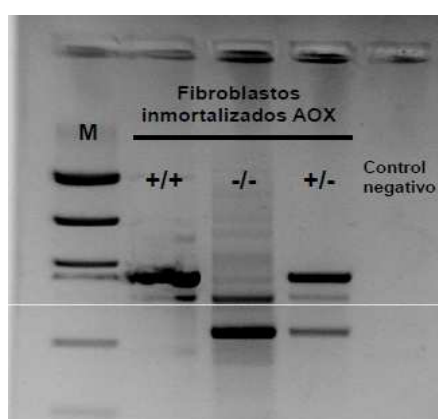


Figura 25. Visualización del genotipado en gel de agarosa 1.8% de las muestras de las tres líneas celulares de AOX (+/+, +/-, -/-).

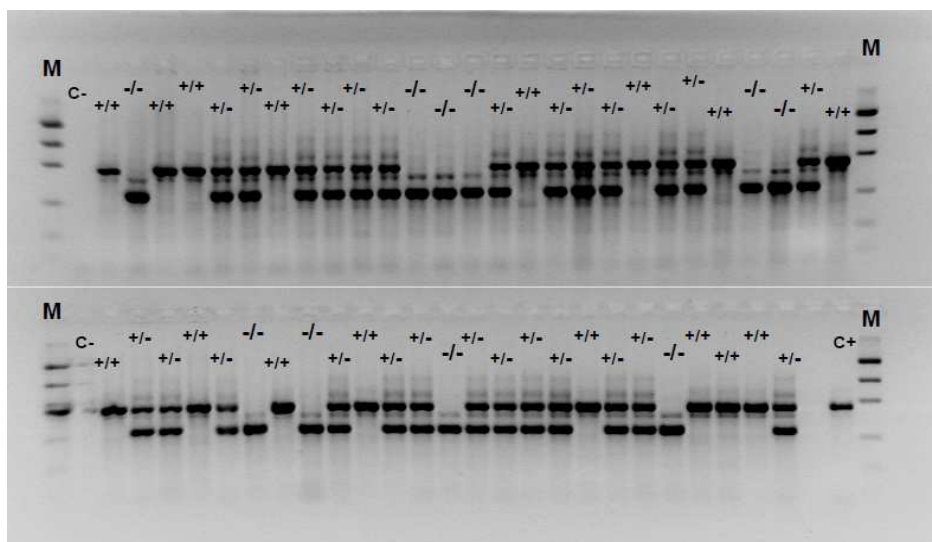


Figura 26. Resultados del análisis de genotipado, en gel de agarosa 1.8%, de muestras de cola, oreja o dedo de ratón AOX (+/+, +/-, -/-).

El análisis del genotipado de los ratones mostró la proporción mendeliana esperada: 25% homocigoto +/+, 50% heterocigoto +/- y 25% homocigoto -/-.

V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

1. Conclusiones y perspectivas

Los resultados obtenidos en el estudio de la xenoexpresión de AOX para obtener evidencias de su funcionalidad en líneas celulares inmortalizadas provenientes de fibroblastos de ratón AOX nos han permitido obtener las siguientes conclusiones:

1. La proteína AOX, en la línea celular AOX +/+, es funcional ya que confiere a las células resistencia a antimicina A y azida de sodio, inhibidores del complejo III y IV de la mtCTE, respectivamente.
2. La expresión de la proteína AOX, en las líneas celulares AOX (+/+ y +/-), tiene un nivel muy bajo e insuficiente para detectar su actividad de respiración por el método polarográfico, pese a que la proteína sea funcional como demuestran los ensayos de citotoxicidad.
3. La expresión de la proteína AOX, no afecta de forma detectable al crecimiento de las líneas celulares AOX (AOX +/+ y +/-) al compararlo con el de la línea celular control (AOX -/-), que no expresa la proteína.

Los resultados obtenidos en el estudio de la xenoexpresión de la proteína AOX en tejidos del ratón *knock-in*, nos han permitido obtener las siguientes conclusiones:

4. La xenoexpresión de la proteína AOX en el ratón *knock-in* bajo la influencia del promotor *Rosa26* hace que su expresión sea constitutiva y ubicua (corazón, hígado, cerebro, músculo, riñón y fibroblastos de tejido conectivo), aunque aparece a niveles bajos en comparación con una línea celular control que sobreexpresa AOX (C57AOX).
5. AOX presenta un nivel de expresión claramente mayor en ratones jóvenes (de 1-1.5 semanas) que en adultos.

Por lo tanto en este trabajo, se ha demostrado que la oxidasa alternativa de *E. nidulans* AOX, se puede expresar en células de mamíferos, se dirige a la mitocondria y además es funcional. Estos resultados son muy relevantes de cara al objetivo principal del proyecto en el que se encuadra la presente memoria de Máster: la posible utilidad terapéutica de AOX en las enfermedades mitocondriales. Cabe destacar además, que no se han detectado hasta el momento efectos tóxicos o negativos como consecuencia de dicha expresión: los ratones no muestran alteraciones notables en su longevidad, comportamiento y parámetros reproductivos y el crecimiento de las líneas celulares derivadas de los mismos no se ve afectado.

Sin embargo, los experimentos realizados para estudiar la funcionalidad y el efecto fenotípico de AOX en la respiración, no nos han permitido observar los efectos ya descritos en otros modelos experimentales, como *Drosophila*, en los que se ha demostrado respiración resistente a cianuro potásico y sensible a SHAM. Esto puede deberse a que el nivel de expresión de AOX en la mitocondria de células de ratón sea bajo.

Los niveles de expresión de AOX en tejidos son del orden de unas 100 veces menos que en la línea celular C57AOX utilizada como control, lo que puede deberse a una baja estabilidad de la proteína madura o a una baja eficiencia en el importe a la mitocondria y procesamiento posterior del precursor. El esclarecimiento de estos puntos requiere ulteriores estudios.

Como continuación del proyecto de investigación del grupo GENOXPHOS, se han empezado a analizar ya los cruces del modelo animal *knock-in* con animales *knock-out* que carecen del complejo IV (Cox 10 *-/-* y Cox 15 *-/-*), y que presentan bien una miopatía severa o letalidad embrionaria (los modelos *KO* músculo-específicos y constitutivos, respectivamente). De esta forma se pretende comprobar si AOX es capaz de revertir los defectos funcionales por la carencia del complejo IV y la letalidad embrionaria que presentan los animales *knock-out*. Aunque son pocos los datos y resultados obtenidos hasta este momento, parece que tanto la letalidad embrionaria como la miopatía severa pueden revertir como consecuencia de la expresión de AOX.

Resulta también interesante la xenoexpresión de NDI1, ya que podría ser útil como herramienta terapéutica frente a enfermedades causadas por deficiencias en el complejo I de la mtCTE. Actualmente se están realizando investigaciones con modelos animales *knock-in* en *Drosophila*, con las proteínas NDI1 y AOX, pues se cree que la expresión y funcionalidad de dichas proteínas podría ser muy beneficiosa para enfermedades que presentan mutaciones combinadas que comprometen la totalidad de la mtCTE, así como en enfermedades tan frecuentes como son el Parkinson o el Alzheimer.

Debido a la falta de modelos experimentales y de tratamientos efectivos para las enfermedades mitocondriales, el desarrollo de la xenoexpresión de AOX y NDI puede ser un gran avance para el desarrollo de terapias génicas y tratamientos más efectivos para dichas enfermedades.

VI. BIBLIOGRAFÍA

McDonald, A. and G. Vanlerberghe (2004). "Branched mitochondrial electron transport in the Animalia: presence of alternative oxidase in several animal phyla." *IUBMB life* 56(6): 333-341.

McDonald, A. E. (2009). "Alternative oxidase: what information can protein sequence comparisons give us?" *Physiologia plantarum* 137(4): 328-341.

McDonald, A. E., G. C. Vanlerberghe, et al. (2009). "Alternative oxidase in animals: unique characteristics and taxonomic distribution." *The Journal of experimental biology* 212(Pt 16): 2627-2634.

Montoya, J., T. Christianson, et al. (1982). "Identification of initiation sites for heavy-strand and light-strand transcription in human mitochondrial DNA." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79(23): 7195-7199.

Montoya, J., D. Ojala, et al. (1981). "Distinctive features of the 5'-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs." *Nature* 290(5806): 465-470.

Moreno Loshuertos, R. (2009). "DNA mitocondrial de la variabilidad poblacional a las mutaciones patológicas". Tesis doctoral

Park, C. B. and N. G. Larsson (2011). "Mitochondrial DNA mutations in disease and aging." *The Journal of cell biology* 193(5): 809-818.

Perales-Clemente, E., M. P. Bayona-Bafaluy, et al. (2008). "Restoration of electron transport without proton pumping in mammalian mitochondria." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(48): 18735-18739.

Perales-Clemente, E. (2010). "Construcción y deconstrucción de la cadena de transporte electrónico mitocondrial". Tesis Doctoral.

Sligh, J. E., S. E. Levy, et al. (2000). "Maternal germ-line transmission of mutant mtDNAs from embryonic stem cell-derived chimeric mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(26): 14461-14466.

Torraco, A., F. Diaz, et al. (2009). "Mouse models of oxidative phosphorylation defects: powerful tools to study the pathobiology of mitochondrial diseases." *Biochimica et biophysica acta* 1793(1): 171-180.

Vempati, U. D., A. Torraco, et al. (2008). "Mouse models of oxidative phosphorylation dysfunction and disease." *Methods* 46(4): 241-247.

Wallace, D. C. (1999). "Mitochondrial diseases in man and mouse." *Science* 283(5407): 1482- 1488.

Wallace, D. C. (2001). "Mouse models for mitochondrial disease." *American journal of medical genetics* 106(1): 71-93.

Wallace, D. C. (2005). "The mitochondrial genome in human adaptive radiation and disease: on the road to therapeutics and performance enhancement." *Gene* 354: 169-180.

Wallace, D. C. (2005). "A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine." *Annual review of genetics* 39: 359-407.

Wallace, D. C. and W. Fan (2009). "The pathophysiology of mitochondrial disease as modeled in the mouse." *Genes & development* 23(15): 1714-1736.

Wallace, D. C., G. Singh, et al. (1988). "Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy." *Science* 242(4884): 1427-1430.

Yagi, T., B. B. Seo, et al. (2006). "Possibility of transkingdom gene therapy for complex I diseases." *Biochimica et biophysica acta* 1757(5-6): 708-714.

Humphrey, D. M, Hirth, F., et al. (2012) "Alternative oxidase rescues mitochondria-mediated dopaminergic cell loss in *Drosophila*"

