



Universidad
Zaragoza



TOXICOGENÓMICA DE LAS ENFERMEDADES MITOCONDRIALES

Grado en Biotecnología

Trabajo Fin de Grado

Departamento de Bioquímica

Facultad de Veterinaria

Luis Díez Espallargas

RESUMEN

La Neuropatía Óptica Hereditaria de Leber (LHON) es una enfermedad que cursa con ceguera crónica y que está causada por mutaciones en el genoma mitocondrial. Se caracteriza por tener una baja penetrancia, de manera que ser portador de mutaciones patológicas como m.3460G>A, en estudio en este trabajo, no es determinante para padecer la enfermedad.

Haciendo uso del modelo de cíbridos, y mediante el uso de técnicas de cultivo celular, bioquímicas, genético – moleculares y a nivel proteico se pretende demostrar que existen factores genético – nucleares y ambientales que podrían afectar al lugar de unión del coenzima Q10 en el Complejo Respiratorio I, alterando la capacidad OXPHOS y aumentando la penetrancia y el riesgo a manifestar el fenotipo patológico.

La caracterización de dicho lugar de unión permite conocer hasta qué punto los genes nucleares y mitocondriales implicados en su conformación pueden afectar la función mitocondrial. En este sentido, se ha estudiado a fondo el gen nuclear NDUFS7 sin encontrar diferencias apreciables en los modelos utilizados, a falta de caracterizar por completo las proteínas que interaccionan con el coenzima Q10.

Por otra parte, los xenobióticos podrían afectar directamente esta interacción interrumpiendo la función OXPHOS. Se demuestra que es así en el caso de la rolliniastatina-1, pues la capacidad respiratoria se ve muy disminuida en los modelos mutantes; y la capacidad energética es afectada en valores muy significativos.

Este trabajo confirma que la penetrancia de mutaciones patológicas en el genoma mitocondrial se ve afectada por la exposición a factores ambientales.

ABSTRACT

Leber Hereditary Optic Neuropathy (LHON) is a disease that causes chronic blindness and is caused by mutations in the mitochondrial genome. It is characterized by low penetrance, so to have pathological mutations as m.3460G> A, the one studied in this work, is not decisive for the disease.

Using the model of cybrids, and through cell culture, biochemical, genetic and protein – based techniques we want to demonstrate that there are nuclear – genetic and environmental factors that could affect the binding site of coenzyme Q10 in Respiratory Complex I, altering the OXPHOS capacity and increasing the penetrance and risk to manifest the disease phenotype.

Characterization of the binding site allows us to know how nuclear and mitochondrial genes involved in its conformation may affect mitochondrial function. In this sense, it has been thoroughly studied the nuclear gene NDUF57, with no significant differences in the models used, in the absence of fully characterization proteins that interact with the coenzyme Q10.

Furthermore, xenobiotics could directly affect this interaction interrupting the OXPHOS function. We prove that it is true in the case of rolliniastatina-1, which greatly reduces the respiratory capacity in the mutant models; and energetic capacity is affected in very significant values.

This work confirms that the penetrance of disease mutations in the mitochondrial genome is affected by exposure to environmental factors.

ÍNDICE

<u>INTRODUCCIÓN</u>	5
<u>HIPÓTESIS</u>	7
<u>OBJETIVOS</u>	7
<u>MATERIALES</u>	
1. Líneas celulares	8
2. Medios de cultivo	8
3. Reactivos generales	8
4. Instrumentación	8
5. Kits comerciales empleados	9
<u>MÉTODOS</u>	
1. Condiciones de cultivo celular	9
2. Procedimientos de cultivo celular	9
3. Test de contaminación con micoplasmas	10
4. Extracción de DNA a partir de células	10
5. Extracción de RNA a partir de células	11
6. Cuantificación de ácidos nucleicos	11
7. Calidad del RNA extraído	11
8. Obtención de cDNA desde el RNA extraído	11
9. Purificación del cDNA amplificado	11
10. Reacción de PCR de genes nucleares que codifican proteínas del sitio de unión del coenzima Q10 en el Complejo Respiratorio I	12
11. Obtención de enriquecido de mitocondrias de línea celular	12
12. Electroforesis no desnaturalizante de proteínas mitocondriales	13
13. Electrotransferencia a membrana	13
14. Western Blot de Complejos Respiratorios I y II	13
15. Ensayo in gel de actividad de Complejos Respiratorios I y II	14
16. Consumo de oxígeno en células intactas	14
17. Ensayo de potencial de membrana por microscopía de fluorescencia	15
18. Ensayo de especies reactivas de oxígeno por microscopía de fluorescencia	15
19. Determinación de potencial de membrana y especies reactivas de oxígeno por citometría de flujo	15
20. Ensayo de ATP	16
21. Análisis estadísticos	17

<u>RESULTADOS</u>	
1. Pruebas de cultivo celular	18
a. Contaminación con micoplasmas	
2. Estudio de genes nucleares que conforman el lugar de unión del coenzima Q10 en el Complejo Respiratorio I	18
a. Análisis de las secuencias obtenidas	
3. Estudio de ensamblaje del Complejo Respiratorio I	20
a. Western Blot	
b. Actividades de los Complejos Respiratorios I y II in gel	
4. Determinación de concentraciones inhibitorias de xenobiótico para cada línea celular a partir del consumo de oxígeno en células intactas	22
5. Estudio de parámetros celulares por microscopía de fluorescencia	23
6. Estudio de parámetros celulares por citometría de flujo	26
a. Potencial de membrana	
b. ROS	
7. Determinación de niveles de ATP	28
<u>DISCUSIÓN</u>	29
<u>CONCLUSIONES</u>	31
<u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	32

INTRODUCCIÓN

La Neuropatía Óptica Hereditaria de Leber (LHON) es una enfermedad que se caracteriza por una pérdida de visión bilateral e indolora, generalmente en la edad adulta temprana (de 15 a 30 años de edad), debido a la degeneración de las células ganglionares retinales.

Suele comenzar de forma aguda en uno de los dos ojos y alrededor de dos meses después el otro. Los discos ópticos se atrofian tras la fase aguda y mediante pruebas de agudeza visual se puede diagnosticar un escotoma central (zona de ceguera parcial). La visión puede recuperarse parcialmente en algunos casos (20-40% de los enfermos) pero la mayoría de personas que la padecen permanecen ciegas y sufren un serio impacto en su calidad de vida. La mayoría de pacientes son jóvenes que pueden llegar a desarrollar trastornos de ansiedad o depresivos por el shock que supone una pérdida de visión casi total, a lo que hay que sumar la dificultad y tardanza en el diagnóstico, la incertidumbre relacionada con los trastornos genéticos raros,...

Como sintomatología asociada, se puede encontrar en algunos casos arritmia cardiaca, neuropatía periférica, temblor postural, miopatía inespecífica, desórdenes neurológicos,... Algunas mujeres pueden llegar a padecer un síndrome similar a la esclerosis múltiple.

El LHON afecta a alrededor de 1:30.000-50.000 personas en la población europea, y es más frecuente en hombres que en mujeres (50% de hombres y 10% de mujeres que presentan una mutación con alto potencial patológico llegan a padecer la enfermedad). Cuando se manifiesta, los síntomas suelen aparecer entre los 15 y los 30 años de edad, dándose el 95% de los casos antes de los 50 años.¹

Las tres mutaciones más frecuentes que producen LHON están presentes en torno al 90% de los enfermos y son m.3460G>A, m.11778G>A y m.14484T>C. Todas afectan a proteínas de la NADH:ubiquinona oxidoreductasa, o Complejo Respiratorio I (CI) de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (EC 1.6.5.3).

La transición m.3460G>A provoca alrededor de un 13% de todos los casos LHON. Afecta al gen *MT-ND1* que codifica para la proteína p.MT-ND1, una subunidad de membrana del CI. Provoca un cambio de aminoácido en la posición 53, de alanina a treonina. Conformar el sitio de unión del coenzima Q10 junto con p.MT-ND3, p.MT-ND4L y p.MT-ND6 (codificadas en el mtDNA), y NDUFS2 y 7 (codificadas en el nDNA).

Una razón que podría explicar la penetrancia incompleta son los haplogrupos mitocondriales (un haplogrupo se define como un conjunto de características genéticas que por su asociación permiten establecer subgrupos poblacionales) que pueden variar el entorno genético mitocondrial en el que se encuentra la mutación. Por ejemplo, miembros del haplogrupo UK presentan mayor riesgo a sufrir patología óptica. Sin embargo, esto no explicaría la diferencia de penetrancia entre personas dentro de un mismo pedigrí (por ejemplo, una madre sana y un hijo enfermo).²

La especificidad tisular y la mayor prevalencia masculina sugieren que factores específicos de tejido, incluyendo el juego de proteínas expresado y las condiciones fisiológicas, son requeridas para mostrar el fenotipo patológico. Algunos factores genético-nucleares en estudio en cuanto a las diferencias dentro de un pedigrí, podrían ser SNPs en el cromosoma X o la síntesis diferencial intersexual de estrógenos, pero no han podido ser demostrados hasta el momento.³

Otros factores que podrían explicar las diferencias en penetrancia dentro de un pedigrí son los factores ambientales, como tabaco, grandes cantidades de alcohol o xenobióticos^{4,7}. El presente estudio se encargará de demostrar si alguno de estos xenobióticos influye en el desarrollo del fenotipo patogénico marcado por la mutación m.3460G>A.

HIPÓTESIS

Factores genético-nucleares y ambientales que afectan al lugar de unión del coenzima Q10 en el Complejo Respiratorio I modificarían la capacidad de fosforilación oxidativa (OXPHOS) y la penetrancia de los portadores de m.3460G>A.

OBJETIVOS

Este proyecto se enmarca dentro de las investigaciones realizadas por la Dra. Ester López en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Veterinaria.

El objetivo principal de este trabajo es el estudio del efecto de factores genético-nucleares y ambientales (xenobióticos) que afectan a proteínas que conforman el lugar de unión del coenzima Q10 en el Complejo Respiratorio I de la cadena de transporte electrónico mitocondrial en dos líneas celulares transmitocondriales que poseen el cambio m.3460G>A.

Este objetivo general se ha subdividido en los siguientes objetivos puntuales:

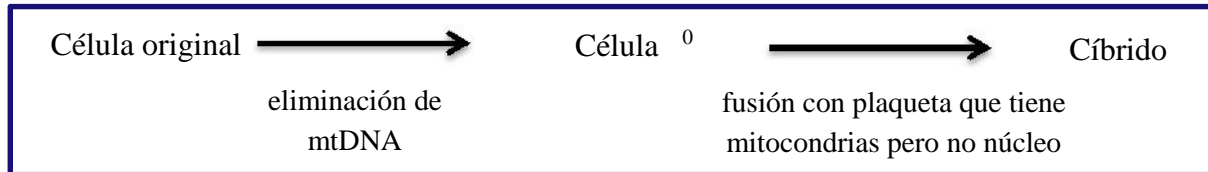
1. Caracterización de los genes, nucleares y mitocondriales, que codifican proteínas que conforman el lugar de unión del coenzima Q10 en el Complejo Respiratorio I.
2. Evaluación de los niveles y actividad del Complejo Respiratorio I de la cadena de transporte electrónico.
3. Estudio de la influencia de xenobióticos en la capacidad energética celular y parámetros asociados.

MATERIALES

1. Líneas celulares

Se utilizan dos líneas celulares transmitocondriales con los fondos genéticos nucleares de adenocarcinoma alveolar A549 y osteosarcoma 143B. De cada línea se usan una sublínea control y una sublínea mutante, con el cambio m.3460G>A.

Una célula transmitocondrial o híbrido es una célula a la que se le elimina su mtDNA (célula ρ^0) y posteriormente se le introduce el nuevo mtDNA de interés:



Se utilizará la nomenclatura A549-C, A549-M, 143B-C y 143B-M para hablar del control y mutante de cada línea. Cuando se añada xenobiótico, se indicará con D.

2. Medios de cultivo

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) - high glucose (SIGMA, ref. 41966-029) 500 ml
- DMEM - glucose free (SIGMA, ref. 41966-052) 500 ml
- Suero fetal bovino (GIBCO) 500 ml

3. Reactivos generales

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico o aptos para biología molecular y cultivo celular en su caso. La mayoría de ellos proceden de las casas comerciales Sigma-Aldrich, BioRad, Invitrogen, Merck, Roche y Panreac®.

4. Instrumentación

- Cámaras de cultivo
- Microscopio invertido
- Contador de células automático Beckman Coulter
- Lector de microplacas NOVOstar, BMG Labtech
- Termociclador Veriti 96Well Thermal Cycler (Applied Biosystems)
- Nanodrop ND-1000 spectrophotometer
- OROBOROS Oxygraph-2k
- Estación de imágenes celulares FLoid (Life Technologies)
- Sistema cuantitativo de imágenes fluorescentes Odyssey (Li-COR)

5. Kits comerciales empleados

- MycoAlert™ mycoplasma detection kit (Lonza)
- NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel)
- Transcriptor First Strand cDNA synthesis kit (Roche)
- ExoSAP-IT® for PCR (Affymetrix)
- Cell-titer blue y Cell-titer-Glo luminescent (Promega)
- MitoTracker® Red CMXRos (Life Technologies)
- Mito-ID® Membrane Potential / Cytotoxicity kit (Enzo Life Sciences)
- CellROX® Red (Life Technologies)
- Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells (Abcam)
- NativePAGE Sample Prep Kit (Life Technologies)
- NativePAGE Novex Bis-Tris Gel System (Life Technologies)

MÉTODOS

1. Condiciones de cultivo celular

Para el cultivo de estas líneas celulares adherentes se utilizan placas de 100 y 150 mm de diámetro.

- Cultivo en normoxia: incubador de células Nuair® DHD AutoFlow, a 37°C y 5% de CO₂.
- Cultivo en hipoxia: cámara de hipoxia Whytley H35 Hypoxystation, a 37°C trabajando a una presión parcial de O₂ del 3%.

Como el proyecto se centra en analizar la actividad mitocondrial, y dado el origen bacteriano de las mitocondrias, se evita el uso de antibióticos para no afectar la funcionalidad.

2. Procedimientos de cultivo celular

El medio de cultivo se cambia de forma periódica cada 2-3 días. Las células se cultivan hasta llegar al 80% de confluencia (cuando el crecimiento se comienza a inhibir por contacto). En ese momento se tripsinizan. Para la tripsinización, se retira de las placas el medio de cultivo, se lavan con PBS para retirar los restos de éste, y se incuban con TrypLE Express durante 5 minutos. Se comprueba, con la ayuda de un microscopio invertido, que las células se han despegado, y se recogen en un volumen de medio de cultivo como mínimo tres veces mayor al de tripsina. Después, se centrifugan a 378xg para obtener el pellet celular, que se resuspende en medio de cultivo y se siembra en una placa de cultivo adecuada a los propósitos del cultivo.

La congelación celular se realiza de forma gradual en un dispositivo con isopropanol que impide una bajada brusca de temperatura, y se utilizan criotubos resistentes al N₂ líquido. El pellet celular se resuspende en DMEM suplementado con FBS al 20% y DMSO al 10% como

crioprotector. La cantidad de células congeladas por vial es de 1×10^6 . Para la descongelación, las células se resuspenden en un tubo de centrifuga con medio de cultivo. La suspensión celular resultante se centrifuga para eliminar el medio de cultivo empleado para la congelación y el pellet obtenido se siembra en una placa de cultivo adecuada.

3. Test de contaminación con micoplasmas

Para comprobar la contaminación bacteriana por micoplasmas se usa el kit Mycoalert Mycoplasma detection kit (Lonza). Este kit se basa en la síntesis de ATP por sistemas enzimáticos específicos de micoplasmas, y su posterior determinación por medio del sistema enzimático de la luciferasa.

Se recogen 2 ml de medio de cultivo de las sublíneas celulares, se centrifugan para eliminar cualquier resto que pudiera haber, y se recoge el sobrenadante. En una placa de 96 pocillos, se disponen 100 μ l de los sobrenadantes, así como el mismo volumen de control positivo y control negativo. Se añaden 100 μ l del reactivo del kit a cada pocillo, se incuba durante 5 minutos y se realiza la primera medida de luminiscencia. Después, se añaden 100 μ l del sustrato del kit, se incuba durante 10 minutos y se realiza la segunda medida.

4. Extracción de DNA a partir de células

Se resuspende el pellet celular en 250 μ l de TE (TRIS:EDTA 10:1) sobre el que se añade 5 μ l de SDS (al 25%) para romper las membranas celulares y 1,25 μ l de proteinasa K (20 mg/ml) para degradar las proteínas. La mezcla se incuba a 37°C durante toda la noche. Se añade un volumen equivalente de fenol, se agita con vórtex para mezclar las dos fases que aparecen, y se centrifuga la solución 5 minutos a 600xg. Se toma la fase acuosa, la superior, y se trasvasa a otro tubo eppendorf. La extracción con fenol ha de repetirse hasta obtener una fase acuosa de la claridad deseada, sin restos celulares (generalmente, son necesarias dos extracciones).

Posteriormente, se procede con la extracción con alcohol isoamílico-cloroformo 24:1 para eliminar los restos de fenol. Se añade un volumen al sobrenadante, se agita con vórtex y se centrifuga de nuevo 5 minutos a 600xg. Se trasvasa la fase acuosa a un nuevo tubo eppendorf. Finalmente, se añaden dos volúmenes de etanol absoluto frío, que hace precipitar el DNA al agitar el eppendorf suavemente (se observa un ovillo de color blanco). El ovillo de DNA se recoge con una pipeta Pasteur y se pasa a otro eppendorf intentando arrastrar la mínima cantidad de etanol. El restante se evapora en un evaporador, y el DNA se resuspende en 100 μ l H₂O destilada estéril y se deja a 37°C en agitación durante toda la noche.

En ocasiones el DNA no precipita en forma de ovillo, debido a una baja concentración. Si ocurre así, se deja el eppendorf con etanol frío a -20°C durante toda la noche ó a -80°C una hora para favorecer la precipitación. Tras esto, se centrifuga a 16200xg durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante que contiene el etanol se desecha, y el precipitado se seca en el evaporador y se resuspende en H₂O como en el caso anterior.

5. Extracción de RNA a partir de células

Se lleva a cabo con el kit NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel). El protocolo comienza con un tampón de lisis celular, y 2-mercaptoetanol para favorecer la desnaturalización de proteínas como RNasas y que la extracción sea mejor. Se filtra el lisado en la columna de purificación con una centrifugación de 1 minuto a 11000xg, se recoge el filtrado y se fija a la membrana de otra columna de purificación, tras otra centrifugación igual. Se trata con DNasas, distintos tampones y nuevas centrifugas para secar el RNA a la membrana de sílica, y finalmente se eluye en un volumen aproximado de 60 µl de H₂O libre de RNasas.

6. Cuantificación de ácidos nucleicos

Para la cuantificación del DNA o RNA se utiliza un espectrofotómetro Nanodrop y su programa informático asociado, que mide la absorbancia a 260 nm para cuantificar la cantidad de DNA/RNA, y a 230 y 280 nm para calcular la pureza de la muestra. En todos los casos la cuantificación se realiza en 2 µl de muestra que son depositados en el orificio de medida.

En primer lugar se hacen dos medidas con agua destilada, la segunda de ellas para fijar el blanco. Tras esto se añade la solución de DNA o RNA que queremos cuantificar y el programa informático nos da la concentración en ng / µl. Para finalizar también se realizan dos medidas con agua destilada.

7. Calidad del RNA extraído

Puede comprobarse fácilmente mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%, en la que se deberían diferenciar claramente dos bandas, correspondientes a los 28S y 18S rRNAs; y toda una franja difuminada que corresponde a todos los mRNAs de distintos tamaños.

8. Obtención de cDNA desde el RNA extraído

El kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) permite obtener cDNA mediante una reacción similar a una PCR. El programa del termociclador es 10 minutos a 25°C, 30 minutos a 55°C y 5 minutos a 85°C.

9. Purificación del cDNA amplificado

El kit ExoSAP-IT[®] for PCR (Affymetrix) está diseñado para eliminar cualquier resto de primers, nucleótidos,... que hayan podido quedar tras una amplificación, y dejar la muestra preparada para posteriores aplicaciones.

Se toman 15 µl de muestra y se tratan con 6 µl del reactivo ExoSAP (la proporción ha de ser 5:2), dando un volumen total de 21 µl suficiente para su uso posterior.

10. Reacción de PCR de genes nucleares que codifican proteínas del sitio de unión del coenzima Q10 en el Complejo Respiratorio I

Los genes nucleares de interés en este proyecto son:

- NDUF52: proteína NADH-coenzima Q10 oxidorreductasa. Amplicón de 1402 pb (también llamada 49kDa en la bibliografía).
- NDUF57: proteína PSST (ó 20 kDa), amplicón de 688 pb.

Los primers a emplear para su amplificación, y así encargados a *Integrated DNA Technologies*, son los siguientes:

- NDUF52:
 - Primers de los extremos:
NDUF52-For: AGTAAGATGGCGGCGCTGAGGG
NDUF52-Rev: CTCCACAGAAGAAGCTGATAGGC
 - Primers internos:
NDUF52-ForB: GATGACATTTATCAGTTTTCTAAG
NDUF52-RevB: CATCAAACCTAACCTGGTCG
(Al tratarse de un amplicón tan largo, se requiere de una pareja de primers internos para que la posterior secuenciación sea correcta).
- NDUF57
 - Primers de los extremos:
NDUF57-For: CTGAAGGCCGAGGCCAAG
NDUF57-Rev: CCTCACGGGACACAAGCAG

Las reacciones de PCR⁵ se llevan a cabo con el kit de Roche.

11. Obtención de enriquecido de mitocondrias de línea celular

El pellet se obtiene por tripsinización de 5 placas de 150 mm de diámetro al 90% de confluencia. Se resuspende en 1 ml de PBS, se trasvasa a un nuevo eppendorf, se centrifuga de nuevo para descartar el sobrenadante y se congelan a -80°C para facilitar la rotura de las membranas celulares. Después se descongela, y para disgregar completamente las membranas y obtener un extracto crudo celular, se tratan con un homogenizan.

A partir de este momento, se utilizan los materiales de los kits Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells (Abcam) y NativePAGE Sample Prep Kit (Life Technologies). Sobre el extracto crudo, se añaden diversos reactivos con sendas centrifugaciones para ir eliminando restos celulares. La última centrifugación sirve para precipitar las mitocondrias. Después se elimina el sobrenadante y se resuspenden en tampón con inhibidor de proteasas.

Se realiza una reacción de Bradford para estimar la cantidad aproximada de proteínas en la solución, y ajustar la cantidad de detergente DDM al 10% a añadir, pues ha de añadirse 2,5 g DDM / g proteína. El DDM libera los complejos mitocondriales de las mitocondrias previamente extraídas, de manera que quedan solubilizados. Se centrifuga, se recoge el

sobrenadante y se cuantifican las proteínas mediante otra reacción de Bradford para finalmente alicuotar las soluciones a una cantidad aproximada de 50 ng de proteína.

Cabe decir que este protocolo no busca la purificación de mitocondrias, sino la obtención de un enriquecido que posea las proteínas integrantes de la cadena de transporte electrónico y de la fosforilación oxidativa.

12. Electroforesis no desnaturante de proteínas mitocondriales

Se utiliza el kit NativePAGE Novex Bis-Tris Gel System (Life Technologies). Se acondicionan las muestras con el tampón de carga, que ha de estar en una proporción $\frac{1}{4}$ respecto a la cantidad de detergente DDM que hay en la muestra a cargar.

Por otra parte, se preparan los tampones de ánodo (transparente) y cátodo (azul) según indica el fabricante; y el gel en gradiente 4-16% de poliacrilamida para la electroforesis, se lavan los pocillos con abundante H₂O destilada y con el tampón de cátodo, y se dejan en última instancia llenos con esta solución.

Se cargan las muestras en la parte izquierda del gel para Western Blot y en la derecha para actividades, teniendo en cuenta que la cantidad de proteína para Western Blot ha de ser 20 µg / pocillo, 40 µg / pocillo y para ensayo de actividades enzimáticas.

Se rellenan las dos partes de la cubeta de electroforesis con los tampones de ánodo y cátodo y se corre el gel a 150 V durante 90-120 minutos, hasta que el frente del gel se sale. Se saca el gel del sistema y se sigue con las técnicas apropiadas.

13. Electrotransferencia a membrana

Tras la electroforesis se incuba la mitad del gel en tampón de transferencia durante 10 minutos. En ese tiempo, se prepara el sistema iBlot de Life Technologies, con el que se realizará la transferencia de las proteínas del gel a la membrana.

Una vez transferida, se incuba la membrana en agitación 5 minutos en una solución al 8% en ácido acético para fijar las proteínas, seguida de otra incubación en H₂O destilada otros 5 minutos. Se seca la membrana al aire.

14. Western Blot de Complejos Respiratorios I y II

A partir de ahora, es fundamental que la membrana no se seque, y una vez se trabaje con el anticuerpo secundario, intentar trabajar lo máximo posible en oscuridad.

Para activar la membrana para la inmunodetección se realizan 3 incubaciones de 30 segundos en metanol con agitación, seguido de un lavado con H₂O destilada durante 5 minutos. La solución de bloqueo de la membrana, para evitar cualquier unión inespecífica de los anticuerpos, consiste en PBS con 5% de leche en polvo, con la que se deja en agitación durante 60 minutos.

Una vez bloqueada, se prepara una solución PBS-Tween al 1% de leche en polvo y el anticuerpo primario, y se incuba durante toda la noche. Los anticuerpos empleados son:

- Complejo I: código ab14713.
- Complejo II: código ab14715.

Al día siguiente, se hacen 4 lavados de 5 minutos con PBS-Tween y se prepara otra solución PBS-Tween, al 0,1% de leche en polvo y el anticuerpo secundario. Se incuba una hora y se escanea utilizando la estación de imágenes Odyssey (Li-COR).

15. Ensayo in gel de actividad de Complejos Respiratorios I y II

Tras finalizar la electroforesis, se toma la otra mitad del gel y se incuba durante toda la noche en 20 ml de solución TRIS/HCl 5 mM con 200 μ l NADH (10 mg / ml) y 50 mg NTB, como sustratos de las actividades enzimáticas a ensayar. El NADH es específico para la actividad CI, mientras que NTB sirve para ensayar ambas.

Al día siguiente, se trata el gel con una solución al 50% en metanol y al 10% en ácido acético para desteñir el color azul del tampón de cátodo de la electroforesis, y se escanea la membrana.

16. Consumo de oxígeno en células intactas

El consumo de oxígeno se mide en un sistema de alta resolución Oroboros[®]. Una muestra celular que consume el oxígeno presente en una cámara cerrada hará disminuir su concentración. Si representamos esta disminución frente al tiempo, se obtiene la gráfica de la velocidad de consumo de oxígeno. La respirometría de alta resolución utiliza electrodos muy sensibles, con un diseño que minimiza la difusión de oxígeno, y está acoplada a un software avanzado (DatLab4) que da la información simultánea de las velocidades de consumo de oxígeno, así como la estabilidad de la señal del mismo.

Células en crecimiento exponencial se tripsinizan, se centrifugan, se cuentan y se resuspenden a una concentración de 1×10^6 células/ml, en DMEM sin FBS para evitar la formación de burbujas en la cámara de respirometría. El aparato dispone de dos cámaras de medición, por lo que se ensayan cada vez las parejas sublínea celular control – sublínea celular mutada.

Se cierra la cámara y se espera a que se establezca el flujo de oxígeno, obteniéndose así el valor de respiración endógena o de rutina. A continuación se configura el software para la adición automática del xenobiótico rolliniastatina-1 mediante la bomba TIP-2K, 1 μ l cada tres minutos:

- Línea A549: a concentración 1 nM. Dado que el volumen de la cámara de respiración es 2 ml, el incremento de concentración corresponde a 0,0005 nM / dosis.
- Línea 143B: a concentración 5 nM. Análogamente, el incremento es 0,0025 nM / dosis.

El ensayo se realiza por triplicado para cada línea celular, para obtener resultados estadísticamente más homogéneos.

Previamente, se realiza la titulación de rolliniastatina-1 a utilizar en ambas líneas celulares, para determinar qué concentración de droga es la adecuada para poder observar la inhibición del consumo de oxígeno.

17. Ensayo de potencial de membrana por microscopía de fluorescencia

Para su realización, se utiliza la estación de visualización Fluid Cell Imaging Station (Life Technologies) y el kit Mito-ID® Membrane Potential / Cytotoxicity kit (Enzo Life Sciences). Se basa en una sonda catiónica que cambia de color según su estado de protonación: tras entrar libre en la célula se dirige al espacio intermembranoso mitocondrial y allí se protona, virando de color verde a rojo.

El cultivo es idéntico al realizado para la localización de mitocondrias. Tras las 24 horas, se prepara la solución para realizar la incubación según las instrucciones del fabricante. Se retira el medio de los pocillos, se lavan con PBS y se disponen 2 ml de la solución por pocillo, a los que se añaden en el último momento 200 µl de la sonda MitoID M Detector Reagent. Se incuba 15 minutos a 37°C. Para la visualización, se usa NucBlue™ Cell Stain (Life Technologies), que tiñe los núcleos de color azul. Todas las imágenes se toman con la misma intensidad de luz y contraste, para poder comparar los resultados.

Se hace en paralelo el mismo ensayo, realizando la incubación con la concentración adecuada de xenobiótico para cada línea celular.

18. Ensayo de especies reactivas de oxígeno por microscopía de fluorescencia

En este caso, se emplea el kit CellROX® Red (Life Technologies). Se basa en la detección del ión superóxido.

El cultivo es idéntico al realizado para los dos ensayos anteriores. Tras las 24 horas, se prepara la solución para realizar la incubación según las instrucciones del fabricante. Se incuba 15 minutos a 37°C. Para la visualización, se usa NucBlue™ Cell Stain (Life Technologies), que tiñe los núcleos de color azul. Todas las imágenes se toman con la misma intensidad de luz y contraste, para poder comparar los resultados.

Se hace en paralelo el mismo ensayo, realizando la incubación con la concentración adecuada de xenobiótico para cada línea celular.

19. Determinación de potencial de membrana y especies reactivas de oxígeno por citometría de flujo

Tomando placas de 6 pocillos, se establecen los cultivos el día anterior a los ensayos de citometría de la siguiente forma: una placa para cada línea, con tres pocillos (tres medidas) para medida de potencial de membrana y tres pocillos para medida de ROS, a 150.000 células / pocillo.

Todo el establecimiento de cultivos se hace por duplicado, para que la incubación con los reactivos se lleve a cabo en las dos condiciones experimentales, sin y con xenobióticos.

La determinación del potencial de membrana se realiza con el kit Mito-ID® Membrane Potential / Cytotoxicity kit (Enzo Life Sciences), pues sirve tanto para microscopía de fluorescencia como para citometría de flujo.

Para ROS, se emplea la sonda diclorofluoresceína-diacetato (DCFH-DA). La conversión de la sonda no fluorescente (DCFH-DA) en un compuesto altamente fluorescente (DCF) ocurre en dos etapas. Primero, la DCFH-DA atraviesa la membrana celular y es deacetilada por esterasas para formar la DCFH, impidiendo su salida de las células. Después, la DCFH se convierte en la DCF por la acción del peróxido de hidrógeno, gracias a la acción de la peroxidasa.

20. Ensayo de ATP

Se realiza mediante los kits Cell-titer blue y Cell-titer-Glo Luminescent (Promega). Mide el ATP total, es decir, determina el ATP sintetizado durante la incubación menos el que se consuma el que se haya creado en esas dos horas (menos el que se haya consumido). Balance en esas dos horas, de lo que se sintetiza, lo que se ha consumido, y la vida media del ya había que se supone que habrá desaparecido ya.

Para este ensayo, se tienen en cuenta dos variables experimentales:

- La ausencia o presencia de xenobióticos
- La concentración de O₂ durante el cultivo: se realiza el ensayo a concentración atmosférica de O₂ y en hipoxia, condición también considerada como “normoxia tisular”, con O₂ al 3%.

Se establece el crecimiento de las sublíneas celulares en placas de 96 pocillos de fondo blanco. Por pocillo ha de haber 10.000 células en un volumen de 200 µl, lo que equivale a resuspender las células a una concentración de 50.000 células / ml.

Las cuatro filas superiores de la placa se usan para la cuantificación de ATP y las cuatro inferiores para la cuantificación de células. De esta manera se normalizan los resultados (concentración de ATP / célula).

Se cultivan durante toda la noche. Al día siguiente se preparan los siguientes medios de cultivo:

Medios	ATP	Células
DMEM "free"	50 ml	50 ml
Piruvato 50 mg/ml	110 µl	110 µl
Deoxiglucosa 1 M	250 µl	---

Si procede, se añaden las cantidades adecuadas de xenobiótico. El medio DMEM “free” no tiene ni glucosa ni piruvato. La deoxiglucosa es un análogo de la glucosa que bloquea la glucólisis; el piruvato permite sintetizar poder reductor para poder realizar el metabolismo aeróbeo (ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa) en la mitocondria. Se retira el medio de cultivo del día anterior, se lava con PBS, se añaden los medios recién preparados. A las filas de pocillos utilizadas para el contaje celular se añade 20 µl / pocillo del colorante Cell-titer Blue.

Se incuba durante dos horas a 37°C. Se mide la fluorescencia en las filas de cuantificación celular. Se añade el reactivo del kit, 100 µl / pocillo, en las filas de cuantificación de ATP, se incuba 10 minutos en agitación y se procede a medir la luminiscencia.

21. Análisis estadísticos

Se realizan con el programa bioinformático StatView 6.0. En los gráficos se presentan las medias y la desviación estándar. Para comprobar que la distribución de las variables es normal se realiza el test de Kolmogorov-Smirnov. Si lo es, se realiza un test t desapareado para comparar los distintos parámetros. Si no lo es, se aplica el test no paramétrico de Mann Whitney. Los p-valores menores a 0,05 se consideran estadísticamente significativos.

RESULTADOS

1. Pruebas de cultivo celular

a. Contaminación con micoplasmas

Se realizó el estudio de contaminación con micoplasmas en todas las líneas utilizadas. Los resultados de las medidas de luminiscencia fueron:

	medida 1	medida 2	relación 2/1
C+	1843	2237	1,214
C-	2131	253	0,119
A549-C	755	588	0,779
A549-M	532	423	0,795
143B-C	1242	277	0,223
143B-M	1033	292	0,283

Tabla 1: Resultados de medidas de luminiscencia.

La relación medida 2 / medida 1 permite evaluar la contaminación: valores por debajo de 0,9 indican ausencia de micoplasmas. Dado que las cuatro muestras se encontraron por debajo de dicho valor, se puede afirmar que todas están libres de contaminación por micoplasmas.

2. Estudio de genes nucleares que conforman el lugar de unión del coenzima Q10 en el Complejo Respiratorio I

En primer lugar se aisló el RNA de cada una de las líneas celulares utilizadas. Tras ello se cuantificó y se analizó la calidad de dicho RNA. En la tabla 2 y en la figura 1 se puede ver la concentración y calidad del RNA obtenido.

Sublínea	[ng / μ l]	
A549-C	1110,4	1207,3 ng / μl
A549-C	1304,2	
A549-M	971,8	1061,4 ng / μl
A549-M	1151,0	
143B-C	225,3	221,5 ng / μl
143B-C	217,6	
143B-M	256,2	251,8 ng / μl
143B-M	247,4	

Tabla 2: Concentraciones de RNA.

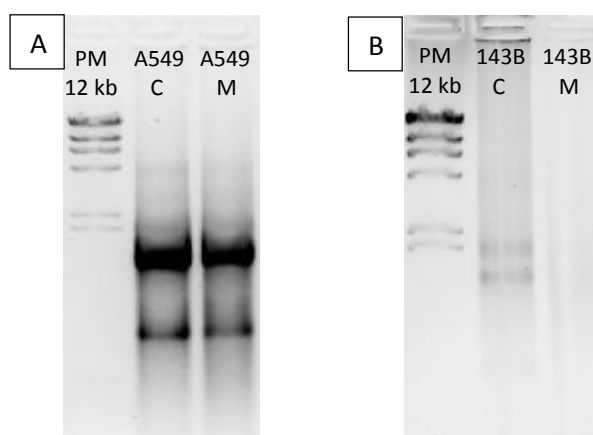


Figura 1: Geles de electroforesis con las muestras de RNA extraído. A) Muestras de la línea A549. B) Muestras de la línea 143B.

En las muestras de la línea A549 se obtuvo RNA con buena calidad, con las bandas de 28S y 18S rRNAs claramente diferenciadas. No fue así para las muestras de 143B, pues en el control

son visibles dos bandas, de las cuales una correspondería al 28S; y en el mutante no se observa nada. Pese a ello, todas las muestras funcionaron en la reacción de obtención de cDNA.

A continuación se construyó el cDNA de dichas muestras, se cuantificó y se realizó la reacción de PCR de los genes de interés (NDUFS2 y NDUFS7). Tras ella, se comprueba la amplificación por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Deberá observarse una única banda de amplificado, de aproximadamente 1400 pb para el gen NDUFS2 y 700 pb para NDUFS7.

En la tabla 3 se recogen los valores de cuantificación del cDNA obtenido y en la figura 2 la comprobación de la reacción de PCR para el gen NDUFS7.

Sublínea	[ng / μ l]	
A549-C	1636,4	1640,9 ng / μl
A549-C	1645,4	
A549-M	1587,7	1584,9 ng / μl
A549-M	1582,0	
143B-C	1651,9	1657,3 ng / μl
143B-C	1662,6	
143B-M	1618,3	1623,8 ng / μl
143B-M	1629,2	

Tabla 3: Concentraciones de cDNA.

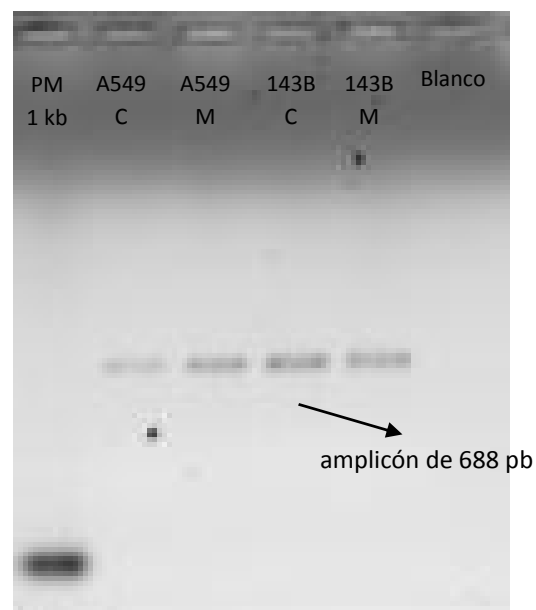


Figura 2: Gel de electroforesis con las muestras de cDNA amplificadas para el gen NDUFS7.

La reacción de PCR del gen NDUFS2 no funcionó. Se repitió cambiando las condiciones de reacción descritas en la referencia, pero el resultado nunca fue el esperado. Sería conveniente poner a punto la reacción de PCR de este gen para poder seguir adelante con el estudio del sitio de unión del coenzima Q10 en CI.

En cuanto al gen NDUFS7 (Figura 2), se obtuvo una sola banda. No pudo verse en este mismo gel si era la banda correcta ya que el marcador de pesos moleculares de 1 kb se encontraba en mal estado, pero se repitió la electroforesis con las mismas muestras de cDNA amplificado y se certificó que eran de la longitud requerida, aproximadamente 700 kb. Se seleccionaron estas muestras para continuar el estudio.

a. Análisis de las secuencias obtenidas

El Servicio de Secuenciación Automática de la Universidad Autónoma de Madrid (sede Moncloa) mandó los archivos con las secuencias de las cuatro sublíneas para el gen NDUFS7, y fueron tratados gracias al programa bioinformático Sequencher 4.1.4.

Se alinearon las secuencias de las dos líneas celulares con la secuencia de referencia NM_024407.4 (base de datos Nucleotide, NCBI). La línea 143B presentó el cambio 111C>T (numeración en la secuencia de referencia).

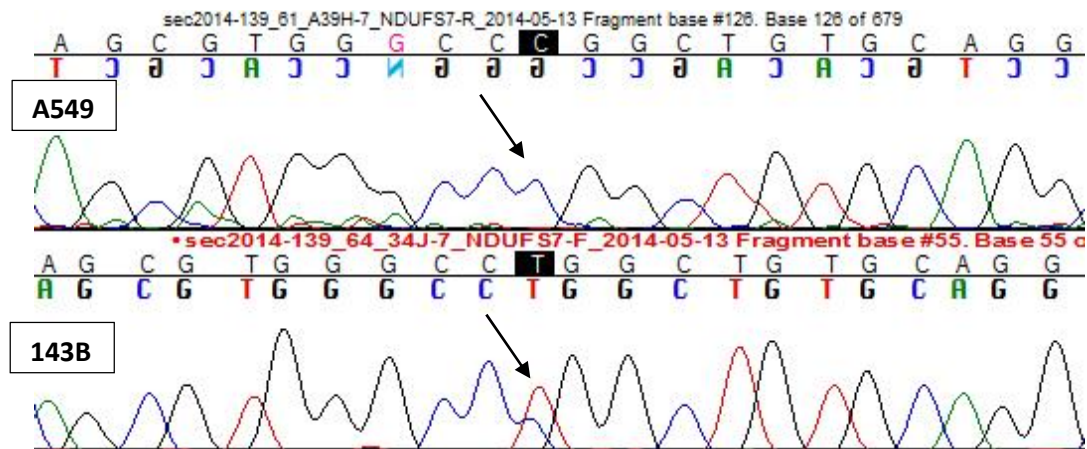


Figura 3: Fragmento de secuencia en el que se encuentra el cambio 111C>T.

Puede observarse (figura 3) que la línea A549 presenta claramente un único pico en la posición 111, correspondiente a C. En la línea 143B se observan el pico más alto y que el programa detectó como correcto, correspondiente a T; y un pico más bajo que podría ser señal de fondo de las dos C anteriores o podría ser real y que la muestra analizada fuera heterocigota en esta posición. En estudios posteriores se debería comprobar la heterocigosidad diseñando un RFLP-PCR.

3. Estudio de ensamblaje del Complejo Respiratorio I

Para poder estudiar los niveles y la actividad de CI se obtuvo el enriquecido de mitocondrias y se realizó una electroforesis en condiciones no desnaturizantes. El gel resultante fue por una parte electrotransferido a membrana para cuantificar los niveles de CI y CII, y por otra se ensayaron los niveles de actividad de ambos complejos.

Se estudian ambos ya que CII está compuesto íntegramente por proteínas codificadas en el DNA nuclear, de manera que se utiliza como control de cantidad de proteína cargada y así se normalizan los resultados.

Los resultados que se muestran corresponden al ensayo de actividad in gel (figura 17) y la tabla de datos asociada (tabla 4) tras el tratamiento de la imagen con el programa bioinformático Quantity One 1-D Analysis Software, v. 4.6.5 (Biorad).

a. Western Blot

Los resultados obtenidos en el Western Blot no fueron buenos. Por una parte, la electrotransferencia a membrana arrastró mucho colorante azul de los tampones de la electroforesis no desnaturizante, por lo que el color perturbó mucho la imagen obtenida a través del escáner Odyssey (Li-COR).

Además, la técnica de Western Blot no funcionó, pues donde deberían haberse visto las bandas correspondientes a CI (éste da dos bandas) y CII el escáner no reveló nada, por lo que se concluye que o algún paso de la transferencia a membrana, fijación de proteínas o incubación con anticuerpos fue mal realizado, o bien éstos últimos se encontraban en mal estado y no permitieron la visualización de las proteínas.

b. Actividades de los Complejos Respiratorios I y II in gel

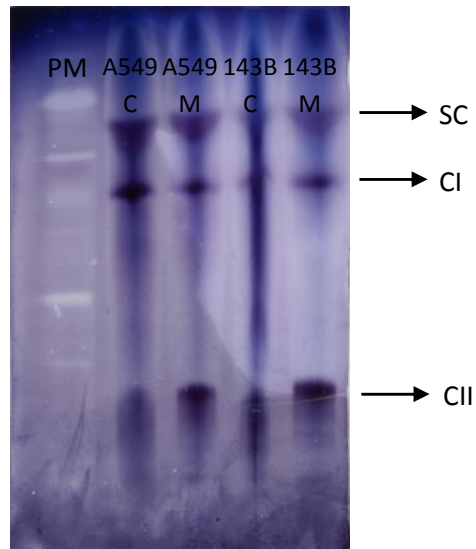


Figura 17: Gel de electroforesis no desnaturalizante de proteínas mitocondriales.

*SC se refiere a supercomplejos: estructuras de CI asociadas y detectadas así en el ensayo.

	A549-C		A549-M		143B-C		143B-M	
CI	12,12	12,66	21,31	8,09	3,38	3,4	10,29	9,56
	24,78		29,40		6,78		19,85	
CII	0,79		12,17		8,17		19,77	
CI/CII	31,37		2,42		0,83		1,00	

Tabla 4: Valores de señal (actividad) en el gel calculados con el software QuantityOne.

Las relaciones CI/CII en la línea celular A549 reflejaron que la actividad de CI se ve muy comprometida en el mutante. En 143B los resultados no mostraron lo mismo, dado que la medición hecha por el software se vio afectada por los restos de tinción del carril de 143B-C en el gel. Sería conveniente repetir el experimento con las muestras de esta línea para poder obtener resultados más fiables.

4. Determinación de concentraciones inhibitorias de xenobiótico para cada línea celular a partir del consumo de oxígeno en células intactas

El xenobiótico que se ha elegido para realizar los estudios que se tratan más adelante es la rolliniastatina-1.

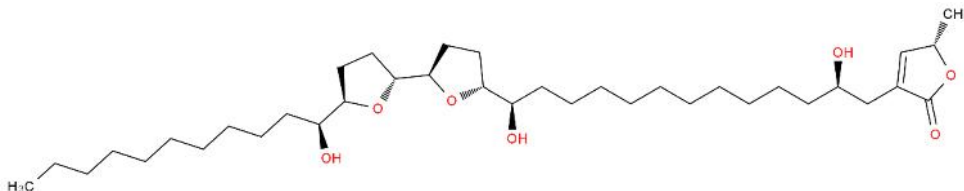


Figura 4: Fórmula química de la rolliniastatina-1.

Es una acetogenina anonanácea. Se ha elegido por tener actividad inhibitoria en CI, más concretamente por ocupar el lugar de unión del coenzima Q10, región de CI de interés en el estudio.

Como primera aproximación al estudio de la inhibición diferencial con rolliniastatina-1 en las diferentes líneas celulares se procedió a medir el consumo de oxígeno (respiración endógena) tras la adición de cantidades crecientes del xenobiótico.

Se toman los valores de consumo de oxígeno de las tres respiraciones de cada línea tras cada dosis de rolliniastatina-1 (una vez se ha estabilizado la gráfica) y se refieren a la respiración endógena, que se toma como el 100%. Con dichos valores en forma de porcentaje, se hace un tratamiento estadístico con el programa StatView 6.0.

El procedimiento es el siguiente: con los datos de una pareja sublínea celular control – sublínea celular mutada, se realiza un test t-student. Se toman las parejas de datos de respiración de control y mutada con la misma dosis de droga y se comprueba el p-valor:

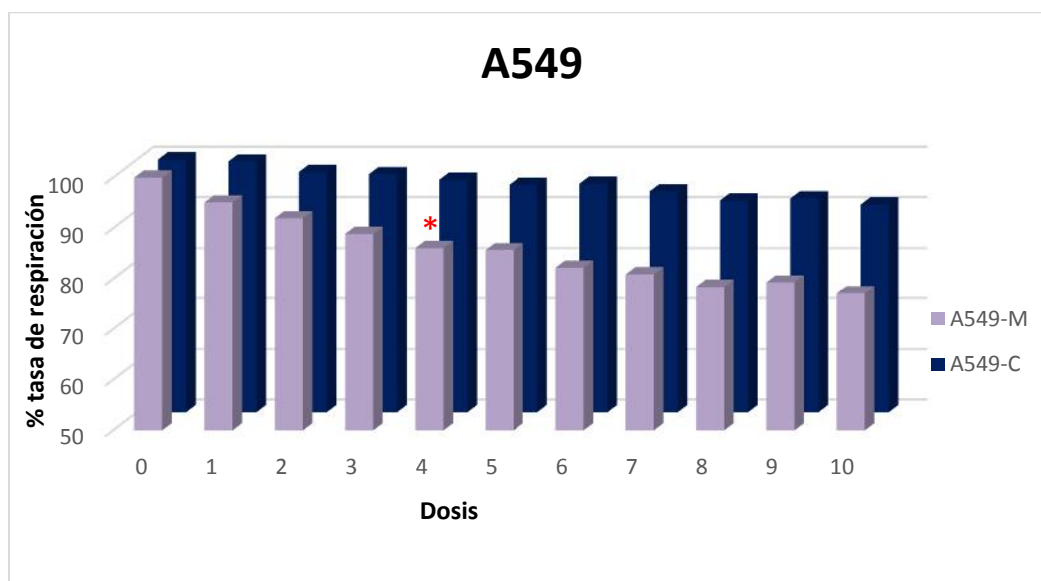


Figura 5: Porcentajes de capacidad respiratoria en la línea celular A549 tras las dosis de rolliniastatina-1. *: primera variación significativa entre control y mutante, p-valor = 0,0466.

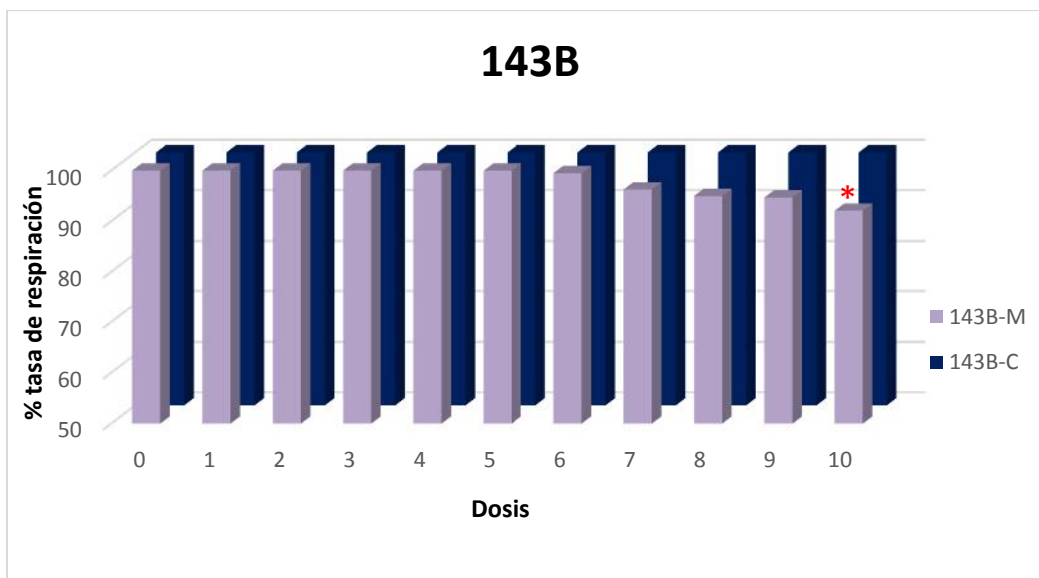


Figura 6: Porcentajes de capacidad respiratoria en la línea celular 143B tras las dosis de rolliniastatina-1. *: primera variación significativa entre control y mutante, p-valor = 0,0204.

Para la línea celular A549 (figura 5) la diferencia ocurre tras la cuarta dosis y por tanto la concentración elegida es 0,002 nM. Para 143B (figura 6), la dosis es 0,025 nM. Éstas serán las concentraciones adicionadas a las líneas celulares para estudiar cómo afecta la presencia del xenobiótico al parámetro en estudio de aquí en adelante.

5. Estudio de parámetros celulares por microscopía de fluorescencia

Se estudió el potencial de membrana mediante el uso de la sonda catiónica que vira de color verde a rojo cuanto mayor es el potencial. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 9 y 10.

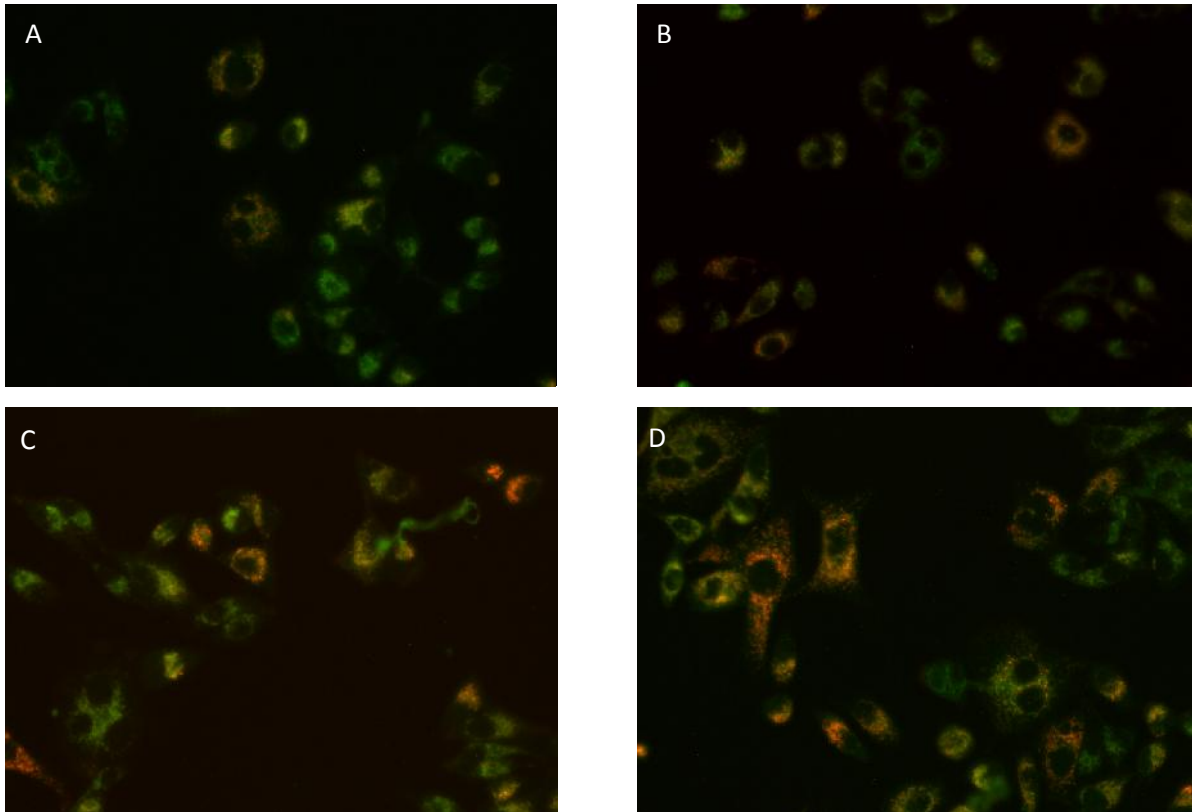


Figura 7: Imágenes de microscopía de fluorescencia de la línea celular A549, potencial de membrana. A) Control. B) Mutante. C) Control con xenobiótico. D) Mutante con xenobiótico.

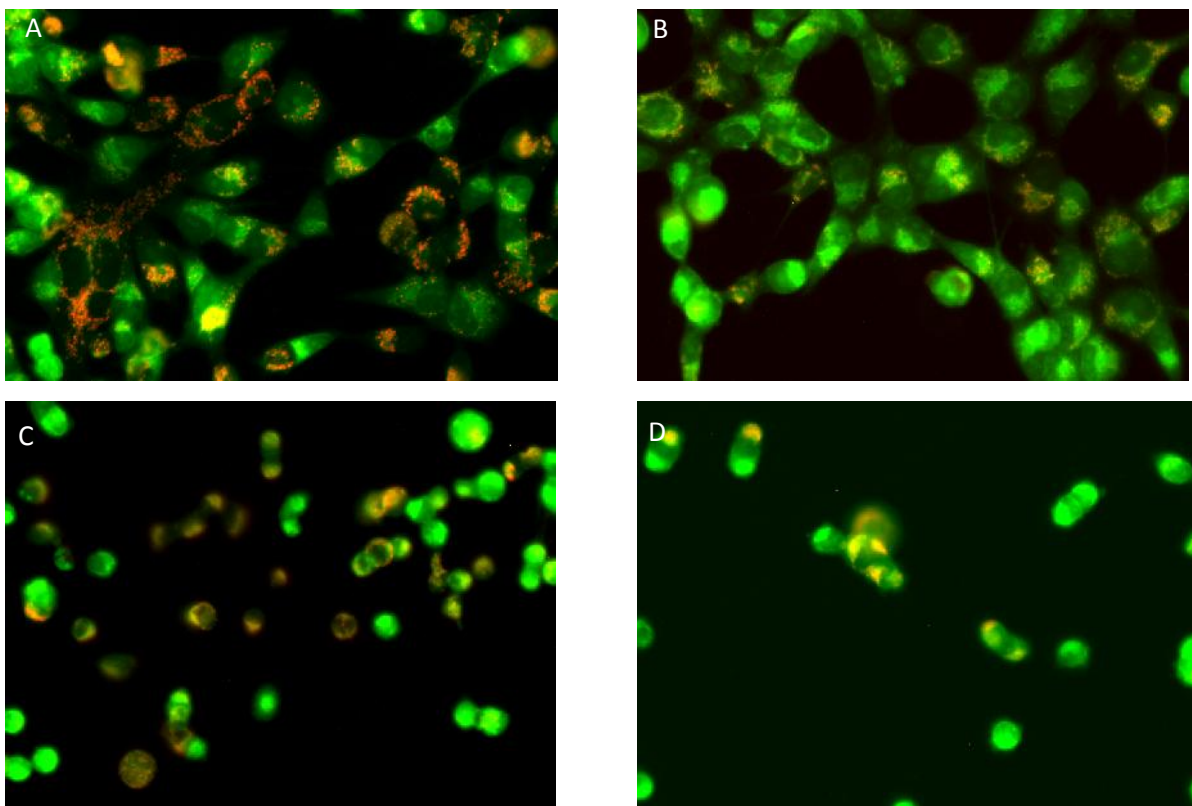


Figura 8: Imágenes de microscopía de fluorescencia de la línea celular 143B, potencial de membrana. A) Control. B) Mutante. C) Control con xenobiótico. D) Mutante con xenobiótico.

Se estudió el nivel de ROS por detección del ión superóxido, que es visible tras una reacción que da fluorescencia roja. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 11 y 12.

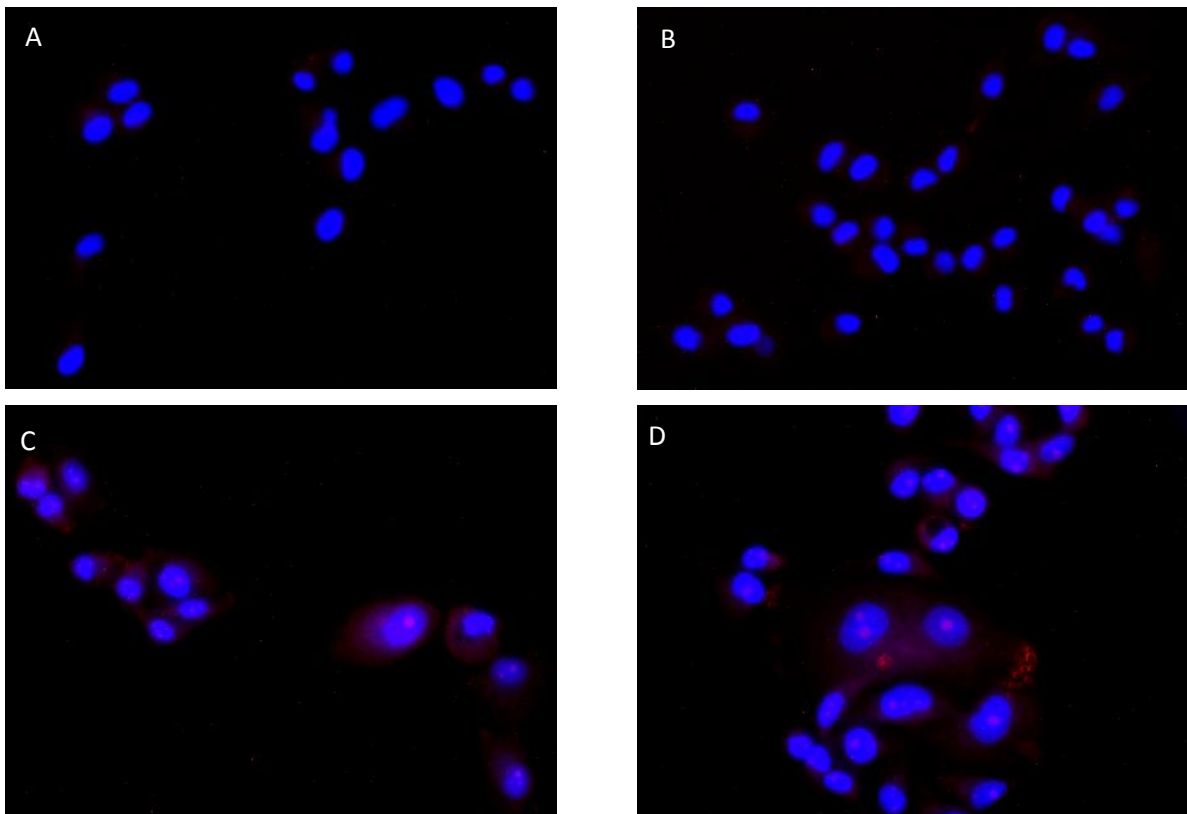


Figura 9: Imágenes de microscopía de fluorescencia de la línea celular A549, ROS. A) Control. B) Mutante. C) Control con xenobiótico. D) Mutante con xenobiótico.

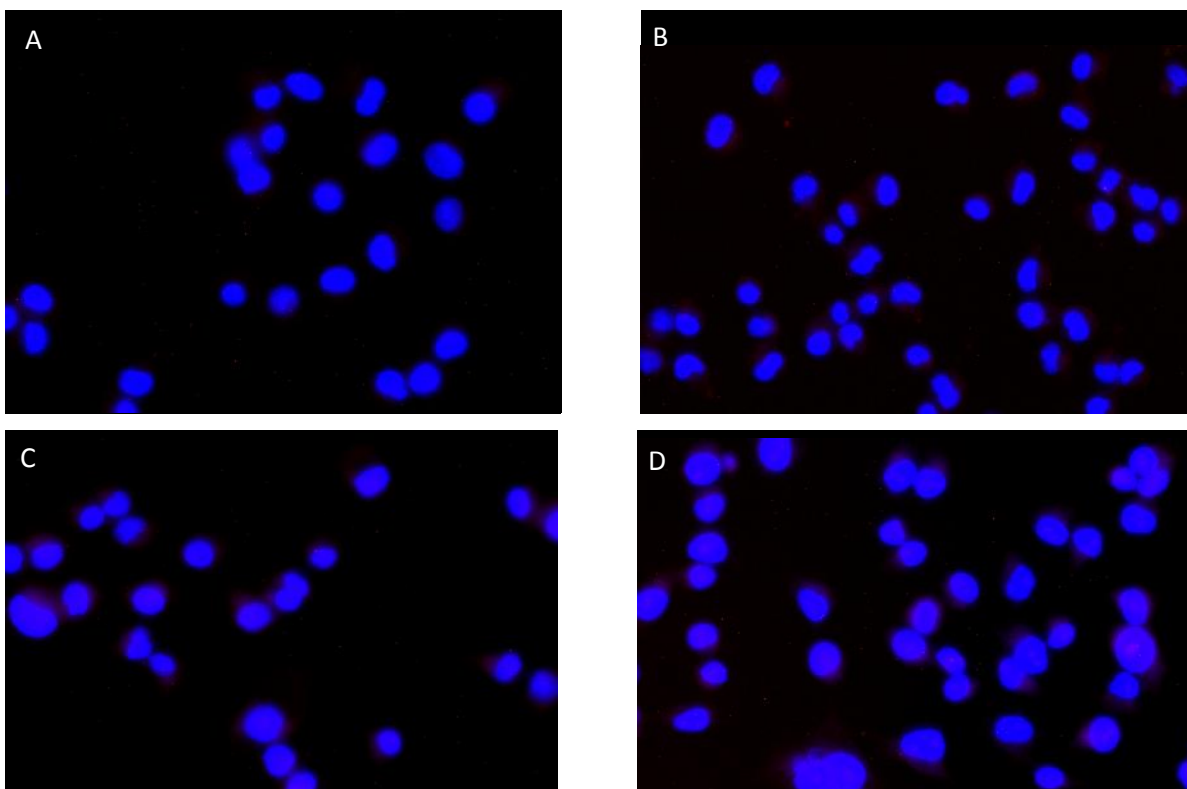


Figura 10: Imágenes de microscopía de fluorescencia de la línea celular 143B, ROS. A) Control. B) Mutante. C) Control con xenobiótico. D) Mutante con xenobiótico.

Los resultados de potencial de membrana de la línea A549 (figura 7) indican que éste parece ser mayor en el mutante que en el control, y además aumenta en ambos tras la adición de rolliniastatina-1. No ocurre así en la línea 143B (figura 8), ya que el control sin xenobiótico muestra la mayor señal de potencial.

En cuanto a ROS, la línea A549 (figura 9) sí se ve afectada por la adición de rolliniastatina-1 pues se detecta mayor concentración, mientras que en la línea 143B (figura 10) no puede verse tal cambio.

6. Estudio de parámetros celulares por citometría de flujo

a. Potencial de membrana

Se realizó el estudio del potencial de membrana en el Servicio de Citometría de flujo del CIBA, para analizar la influencia del xenobiótico a este nivel sobre las líneas celulares y sus fondos genéticos. Los resultados obtenidos se resumen en la figura 11.

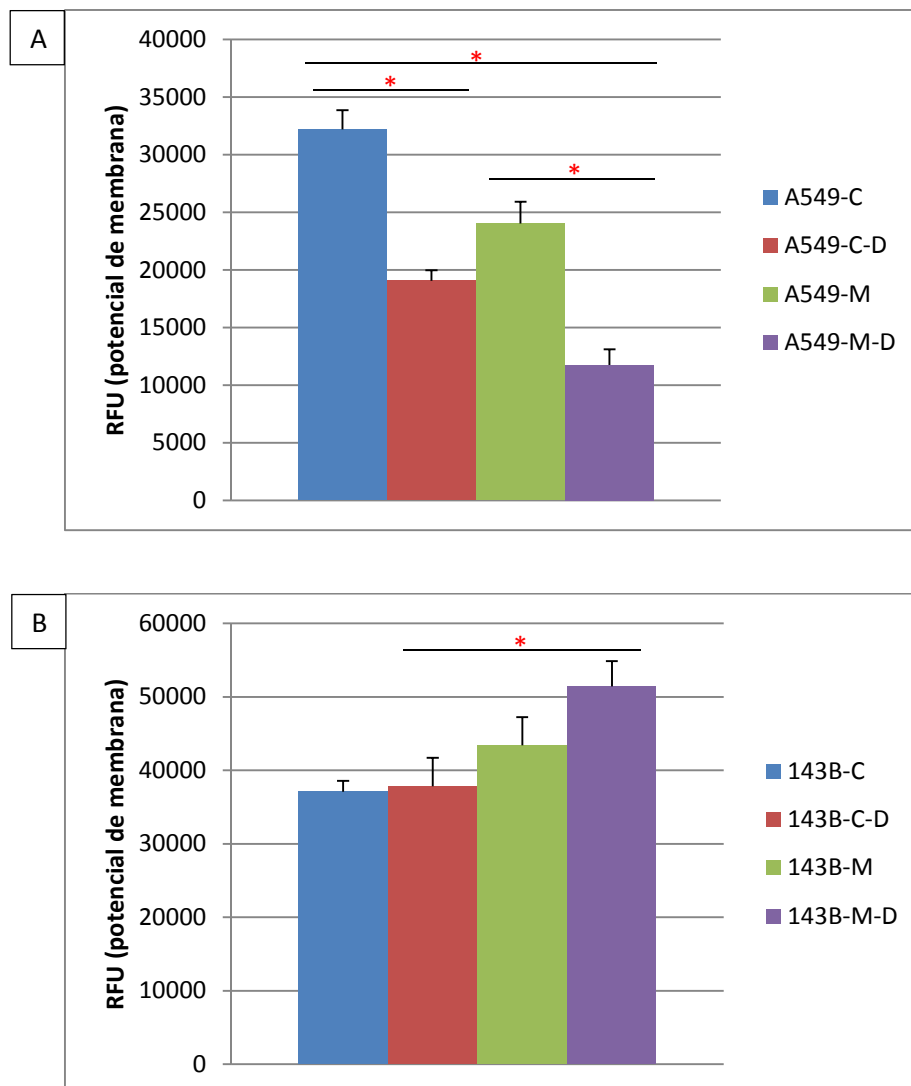


Figura 11: A) Gráfico con medidas de potencial de membrana en la línea celular A549. *: cambios estadísticamente significativos; p-valores < 0,005. B) Gráfico con medidas de potencial de membrana en la línea celular 143B. *: ídem; p-valor = 0,0104.

En la línea celular A549 (figura 11.A) el control presentó mayor potencial de membrana que el mutante en las dos condiciones experimentales, y la rolliniastatina-1 afectó significativamente a ambos. En 143B (figura 11.B) sólo hay diferencia significativa de interés entre control y mutante con rolliniastatina-1.

b. ROS

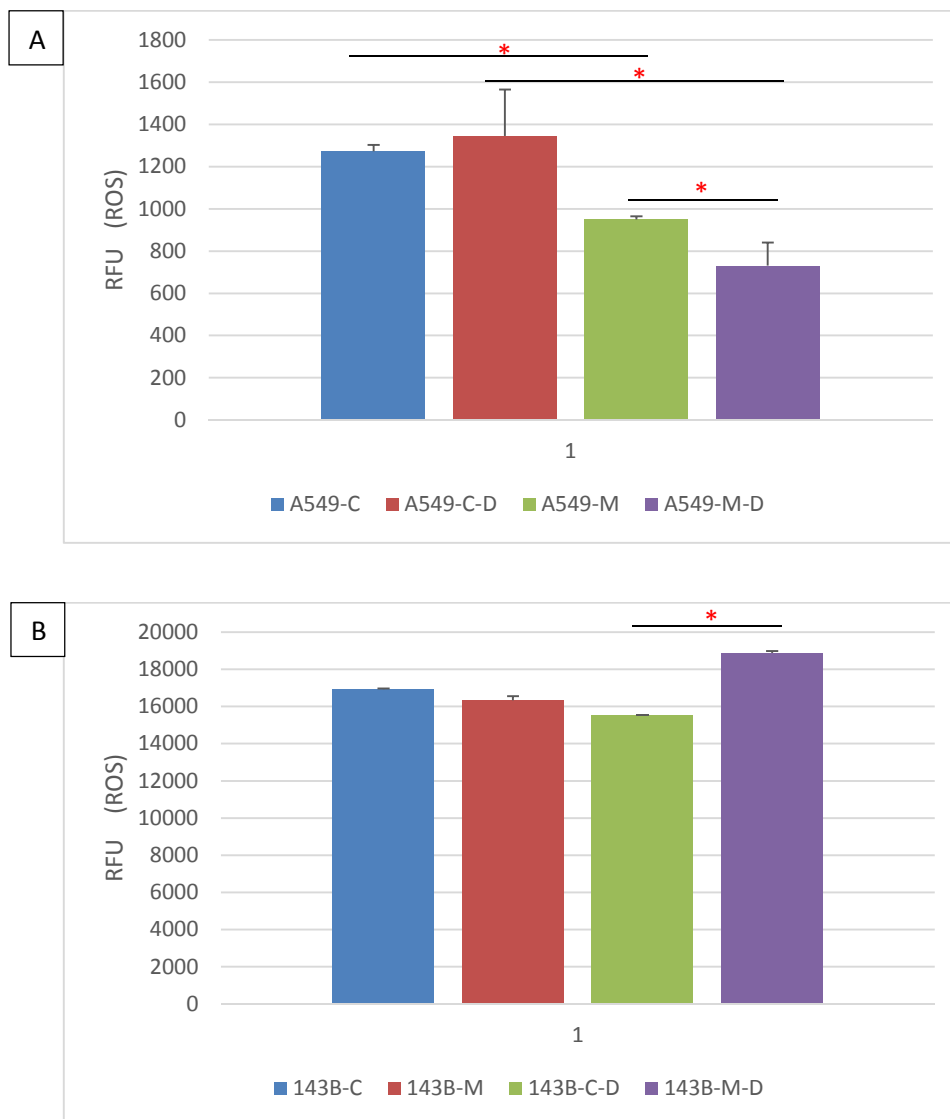


Figura 12: A) Gráfico con medidas de ROS en la línea celular A549. *: cambios estadísticamente significativos; p-valores < 0,0263. B) Gráfico con medidas de ROS en la línea celular 143B. *: ídem; p-valor = 0,0033.

Para la línea A549 (Figura 12.A), el mutante presentó menos ROS que el control en ambas condiciones experimentales. El xenobiótico aumentó los niveles de ROS en el control pero no de forma significativa. En el caso de 143B (Figura 12.B), sólo fue significativa la variación positiva entre mutante sin y con rolliniastatina-1.

7. Determinación de niveles de ATP

Se realizaron los estudios en hipoxia sin xenobiótico y en normoxia con xenobiótico. El experimento en hipoxia se realiza como aproximación a la realidad, en la que los tejidos no tienen una concentración de O₂ atmosférica, sino en torno al 3-5%. Este efecto es conocido como “normoxia tisular”.

Los resultados se recogen en las figuras 15 y 16 respectivamente. En ellos, se expresan los niveles de ATP como porcentaje respecto a la media del control en cada pareja, que se toma como 100%.

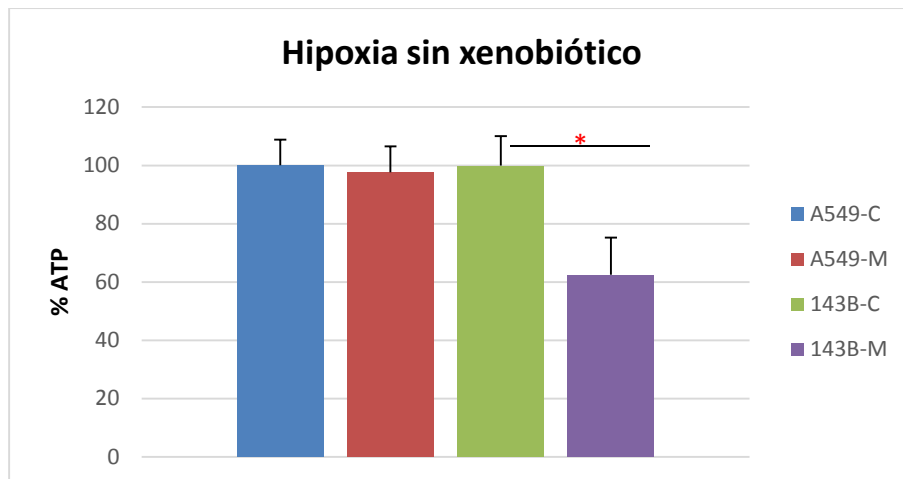


Figura 13: Gráfico de medida de ATP en hipoxia. *: cambio estadísticamente significativo; p-valor < 0,0001.

La variación (figura 13) en los niveles de ATP en la línea celular 143B fue muy importante, pero A549 no se vio afectada (p-valor = 0,5351) por la adición de rolliniastatina-1.

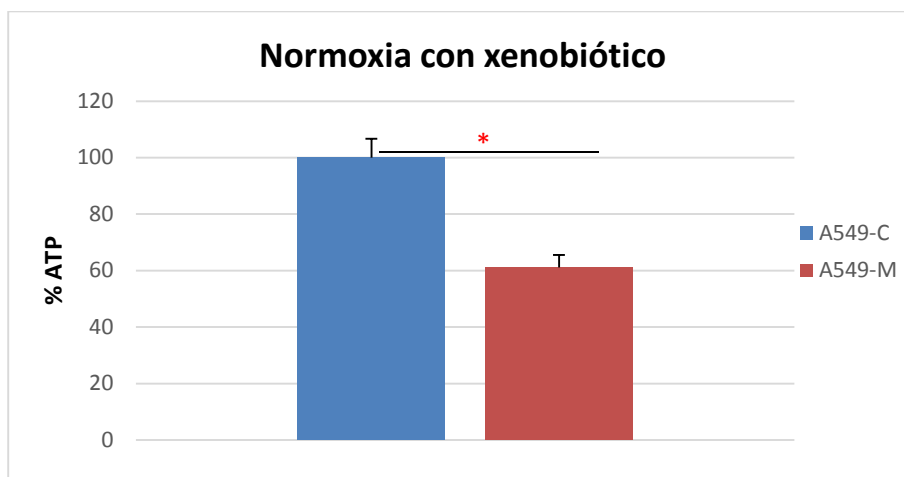


Figura 14: Gráfico de medida de ATP en normoxia con xenobiótico. *: cambio estadísticamente significativo; p-valor < 0.0001.

El efecto de la rolliniastatina-1 (figura 14) fue enorme en cuanto a la diferencia entre control y mutante.

DISCUSIÓN

Aunque el objetivo principal de este trabajo no es el estudio de la mutación m.3460G>A, los resultados obtenidos mediante el análisis de actividad in gel (figura 17, tabla 4) permiten reconfirmar su patogenicidad en las dos líneas celulares ensayadas. En la línea de osteosarcoma 143B ya había sido comprobado, y en adenocarcinoma A549 sirve para confirmarlo en un fondo genético nuclear distinto. En esta última se observó una gran diferencia en la actividad CI siendo claramente menor en el mutante. Se observaron también diferencias en los niveles de CII entre controles y mutantes, lo que podría indicar la existencia de mecanismos compensatorios de la mutación que estimulen la biogénesis mitocondrial para tratar de recuperar la función OXPHOS.

Además de confirmar la patogenicidad en ambos modelos, éstos se han llevado a condiciones más fisiológicas (normoxia tisular) para el estudio de la energética celular. En estas condiciones (figura 13), el fondo genético nuclear marca un patrón de comportamiento completamente distinto entre las dos líneas celulares. Así, no existe variación significativa en A549 mientras que en 143B se registró una gran bajada en la proporción de ATP celular.

Esta mutación se encuentra en el gen *MT-ND1*, codificante para la proteína p.MT-ND1 que forma parte del lugar de unión del coenzima Q10 a CI. Otros genes mitocondriales que intervienen en conformar este lugar de CI son *MT-ND3*, *MT-ND4L* y *MT-ND6*, pero su influencia se ha minimizado al utilizar parejas de control – mutante que pertenecen a los mismos haplogrupos mitocondriales (H los de la línea de adenocarcinoma A549 y J los de la línea de osteosarcoma 143B).

La penetrancia incompleta de LHON hace pensar, además de en la genética mitocondrial, en factores genético – nucleares y ambientales como posibles desencadenantes del fenotipo patológico. En cuanto a proteínas codificadas en genes nucleares implicadas en la conformación del lugar de unión de coenzima Q10 a CI juegan un papel importante las conocidas como 49 kDa y PSST, codificadas por los genes *NDUFS2* y *7*.

El estudio del gen *NDUFS2* no fue completado debido a la dificultad de reacción de PCR⁵, ya que se trata de un amplicón largo. La secuencia del cDNA para el gen nuclear *NDUFS7* fue caracterizada y en la línea de adenocarcinoma A549 es idéntica a la tomada como referencia (NM_024407.4). En la línea de osteosarcoma 143B, se encontró la transición 111C>T (figura 3) que provoca el cambio de aminoácido en la posición 23 de prolina por leucina. Este aminoácido se encuentra formando parte del péptido señal (aminoácidos 1-38) que conduce la proteína a la mitocondria tras su síntesis. Por tanto, no puede establecerse ninguna relación entre la mutación y una estructura del lugar de unión del coenzima Q10 anormal ya que no se encuentra en la proteína madura. De cualquier manera, podría influir en la cantidad de proteína importada pero aparentemente las bandas de CI entre las líneas parecen ser similares lo que sugeriría que no afecta al sistema de importe. De hecho, consultando la base de datos UniProt se descubre que esta transición es un polimorfismo poblacional y no parece tener importancia patológica.

Se han estudiado numerosos xenobióticos que afectan a la función mitocondrial. Destacan la rotenona y las rolliniastatinas, que se unen a CI ocupando el lugar del coenzima Q10 alterando su función. La rotenona es un xenobiótico empleado como insecticida, de vida media corta, que no supone un gran riesgo para los portadores de la mutación. Sin embargo, el grupo de las rolliniastatinas son moléculas que se encuentran presentes en alimentos pertenecientes a la familia Annonaceae, como la piña. De hecho, en la isla de Guadalupe se ha caracterizado un tipo específico de Párkinson derivado de una pérdida de función mitocondrial por el alto consumo de piña. Se demuestra que constituyen un factor ambiental al que los afectados por la mutación m.3460G>A pueden estar expuestos y ser muy importantes en el desencadenamiento de la enfermedad.

Para el presente estudio, se seleccionó la rolliniastatina-1, presente en *Rollinia mucosa*. Otros autores ya han trabajado con rolliniastatina-2⁶. La diferencia encontrada en la tasa de respiración en presencia de rolliniastatina-1 (figuras 5 y 6) entre control y mutante es muy grande, lo que confirma la hipótesis de que la exposición al xenobiótico en estudio aumenta la susceptibilidad a manifestar el fenotipo patológico. Además, como se obtiene de los resultados, las concentraciones que resultan inhibitorias para los mutantes son bajísimas. Por otra parte, la capacidad energética celular también se vio afectada de manera muy significativa por el xenobiótico dado que disminuyó en torno al 40% los niveles de ATP.

Vale la pena incidir en el hecho de que no es raro que los portadores de la mutación entren en contacto con el tóxico en esas concentraciones, así como pueden existir otros muchos xenobióticos cuyo mecanismo de acción sea similar al de las rolliniastatinas e impidan un correcto funcionamiento de CI⁷, como la capsaicina, compuesto encontrado en las plantas del género *Capsicum* (pimiento).

El estudio de parámetros energéticos asociados refleja resultados contradictorios entre la microscopía de fluorescencia y la citometría de flujo. En cualquier caso, los ofrecidos por la citometría de flujo son más fiables por ser cuantitativos. Sería necesario revisar el protocolo de la microscopía de fluorescencia para poder optimizar tanto la incubación con rolliniastatina-1 como el tiempo hasta la visualización. Cabe decir que las imágenes obtenidas por microscopía son válidas para comprobar el cambio morfológico que sufren las células por su incubación con el xenobiótico (figura 8), de una forma alargada con prolongaciones a una forma mucho más redondeada.

El diferente comportamiento entre las dos líneas celulares en estudio es patente (figura 11). En A549 (13.A) la mutación y la presencia de xenobiótico provocaron la disminución de potencial de membrana de manera significativa. En 143B (13.B) el mutante presentó mayor potencial. Esto es indicativo de la gran influencia que tiene el fondo genético nuclear en la mitocondria y no debería ser ignorado al estudiar patologías de índole mitocondrial, con la gran especificidad tisular que presentan.

En cuanto a ROS (figura 12), los resultados de la línea celular A549 revelaron que el mutante, que en condiciones normales ya produce menos ROS, se ve afectado por el xenobiótico al

contrario del control en el que la variación no es significativa. En 143B, la rolliniastatina-1 provocó que los niveles de ROS aumentaran. Tiene sentido esta correlación entre potencial y ROS, dado que una menor función OXPHOS supone menor diferencia en la concentración de protones a ambos lados de la membrana y también menor flujo de electrones que puedan desencadenar la síntesis de ROS.

La modificación de la penetrancia de mutaciones patológicas en el mtDNA no es específica de la rolliniastatina-1 y LHON. Existen multitud de xenobióticos de todo tipo que podrían afectar a mutaciones desencadenantes de otras enfermedades mitocondriales, de otros fenotipos, incluso en el caso de enfermedades multifactoriales como el Parkinson.

CONCLUSIONES

Las conclusiones que se han obtenido con la realización de este trabajo son las siguientes:

- Se confirma la patogenicidad de la mutación m.3460G>A. tanto en el modelo ampliamente estudiado (143B) como en otro con fondo genético nuclear distinto (A549) y en condiciones más cercanas a las fisiológicas (normoxia tisular).
- No hay diferencias determinantes en la secuencia del gen NDUFS7. Debería realizarse la secuenciación de todas las subunidades nucleares y mitocondriales implicadas en la unión del coenzima Q10 a CI.
- La exposición a rolliniastatina-1 aumenta el riesgo a desencadenar el desarrollo del fenotipo patológico.

Los factores ambientales como xenobióticos pueden modificar la penetrancia de mutaciones patológicas, lo que puede ser utilizado por aquellos afectados por este tipo mutaciones a modo de prevención, para evitar la exposición y contacto con estas sustancias.

CONCLUSIONS

The conclusions that we have obtained from this work are:

- Pathogenical mutation m.3460G> A is confirmed both in widely studied model (143B) and the one with different nuclear genetic background (A549), and in conditions closer to physiological (tissue normoxy).
- No determinant differences in gene NDUFS7 sequence. Sequencing of all nuclear and mitochondrial subunits involved in the binding of coenzyme Q10 to CI should be done.
- Exposure to rolliniastatin-1 increases the risk to trigger the development of the disease phenotype.

Environmental factors such as xenobiotics may modify the penetrance of disease mutations, which can be used by those affected by these mutations as a prevention in order to avoid exposure and contact with these substances.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Yu-Wai-Man, P. et al, *Leber Hereditary Optic Neuropathy*. GeneReviews (1993).
- 2.- Hudson, G. et al, *Clinical expression of Leber hereditary optic neuropathy is affected by the mitochondrial DNA-haplofroup background*. The american journal of human genetics (2007).
- 3.- Giordano, C. et al, *Oestrogens ameliorate mitochondrial dysfunction in Leber hereditary optic neuropathy*. Brain (2010).
- 4.- Kirkman, M. A. et al, *Gene-environment interactions in Leber hereditary optic neuropathy*. Brain (2009).
- 5.- Potluri, P. et al, *A novel NDUFA1 mutation leads to a progressive mitochondrial complex I-specific neurodegenerative disease*. Molecular Genetics and Metabolism (2009).
- 6.- Carelli, V et al, *Leber hereditary optic neuropathy: Biochemical effect of 11778/ND4 and 3460/ND1 mutations and correlation with the mitochondrial genotype*. American academy of neurology (1997).
- 7.- Degli Esposti, M, *Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview*. Biochimica et Biophysica Acta (1998).

