



Universidad
Zaragoza



La proteína AOX como terapia génica para enfermedades mitocondriales

Máster en Biología Molecular y Celular

Julia Marquina Reglero

Directores:

Patricia Meade Huerta

Patricio Fernández Silva

Curso 2013-2014

Índice

1. Presentación.....	4
2. Introducción	4
2.1. Sistema genético de las mitocondrias.	5
2.2. Origen endosimbiótico de las mitocondrias.	7
2.3. Proteínas mitocondriales.	8
2.4. Rutas metabólicas en la mitocondria.	9
2.5. Sistema de fosforilación oxidativa.	10
2.6. Vías alternativas de transporte de electrones.....	14
2.6.1. La oxidasa alternativa AOX.	14
2.7. Patología mitocondrial.....	16
2.8. Terapia génica de las enfermedades mitocondriales.	18
3. Hipótesis y objetivos	21
4. Materiales y métodos:	22
4.1. Muestras biológicas:	22
4.2. Cultivos celulares:	24
4.2.1. Medios de cultivo.	24
4.2.2. Descongelación, siembra y mantenimiento de las líneas celulares.....	24
4.2.3. Congelación de las líneas celulares.	25
4.2.4. Recuento celular.....	26
4.2.5. Ensayos de resistencia a rotenona.	27
4.3. Ácidos nucleicos:.....	28
4.3.1. Extracción de DNA a partir de cultivos celulares.	28
4.3.2. Extracción de DNA a partir de cola o dedo de ratón.....	29

4.3.3.	Cuantificación de los ácidos nucleicos.	29
4.3.4.	Amplificación del DNA.	30
4.3.5.	Electroforesis de DNA en geles de agarosa.	34
4.4.	Proteínas:	34
4.4.1.	Electroforesis de proteínas.....	34
4.4.2.	Electrotransferencia.	35
4.4.3.	Inmunodetección de proteínas.	36
4.4.4.	Cuantificación de proteínas.....	37
4.5.	Purificación de mitocondrias.	38
4.5.1.	Purificación de mitocondrias de células en cultivo.	38
4.5.2.	Purificación de mitocondrias procedentes de tejidos.....	39
4.6.	Análisis estadístico de los resultados.	40
5.	Resultados	41
5.1.	Ensayos de resistencia a rotenona.	41
5.2.	Genotipado de las líneas celulares.	43
5.3.	Genotipado de los ratones.	43
5.4.	Expresión de la proteína AOX en pulmón, testículo, timo, bazo, hígado y páncreas en ratones <i>knock-in</i> AOX.	45
5.5.	Diferencias en la expresión de AOX entre machos y hembras <i>knock-in</i> AOX.	46
5.6.	Degradación de la proteína AOX.....	47
6.	Discusión	51
7.	Conclusiones.....	56
8.	Bibliografía	57

La proteína AOX como terapia génica para enfermedades mitocondriales.

Las enfermedades mitocondriales constituyen un amplio grupo de patologías que se caracterizan por presentar alteraciones en la cadena de transporte de electrones, con la consiguiente disminución de la producción de energía en forma de ATP. El tratamiento de las enfermedades mitocondriales presenta una serie de dificultades y, de hecho, no existe una terapia efectiva para tratarlas. Actualmente, las medidas terapéuticas se limitan a ser de soporte en la gran mayoría de los pacientes.

Una de las terapias que se está investigando en la actualidad consiste en la xenoexpresión de la oxidasa alternativa AOX, enzima procedente del hongo *Emericella nidulans*.

En concreto, en el presente trabajo de fin de máster se ha continuado con la caracterización de dicha proteína, realizando ensayos de inmunodetección de AOX en distintos tejidos de ratón *knock-in*, y ensayos de viabilidad para estudiar la funcionalidad de la proteína.

Los ensayos de inmunodetección revelaron que AOX se expresa en todos los tejidos de ratón analizados y que su expresión es mayor en ratones machos. Sin embargo, no se pudo concluir el origen de las tres bandas correspondientes a AOX. Además, los ensayos de viabilidad demostraron que no ejerce ningún efecto cuando se produce un fallo en la cadena a nivel del complejo I, al contrario de lo que sucedía con los complejos III y IV, validando la relevancia funcional de dicha proteína.

1. Presentación

Las mitocondrias son orgánulos celulares que se encargan de la producción de energía para la célula en forma de ATP, a través del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS). 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).

En la actualidad no hay terapias eficaces para el tratamiento de estas enfermedades, lo que ha impulsado la investigación para poder ofrecer una alternativa terapéutica a las personas afectadas por estos síndromes. Una posible solución, a largo plazo, podría ser la terapia génica.

El grupo GENOXPHOS, en el cual he realizado el proyecto Máster, está ensayando la terapia génica mediante la xenoexpresión en células de mamíferos de la oxidasa alternativa AOX. Con este fin, han desarrollado un modelo de ratón *knock-in* para dicha proteína. En trabajos anteriores se ha comprobado que AOX se expresa en distintos tejidos de los ratones *knock-in* y que se localiza en la mitocondria.

En el presente trabajo de fin de máster se ha continuado la caracterización de dicha proteína en el ratón *knock-in* para AOX.

2. Introducción

Las mitocondrias son orgánulos membranosos que forman parte de las células eucariotas y se localizan en el citosol. Desempeñan un papel crucial en la generación de energía metabólica dentro de la célula, ya que son responsables de la mayor parte de la energía útil derivada de la degradación de los carbohidratos y los ácidos grasos, que es convertida en ATP en el proceso de fosforilación oxidativa. Debido a esto, las mitocondrias se localizan en áreas de gran consumo de energía y su concentración varía según el tejido.

En cuanto a su estructura, las mitocondrias tienen un sistema de doble membrana que delimita dos compartimentos: el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial. La membrana externa es fácilmente permeable a moléculas pequeñas e iones, debido a

que contiene una gran cantidad de porinas, una familia de proteínas integrales de membrana que forman canales que permiten la difusión libre de moléculas menores de 1 kDa. Por tanto, la composición del espacio intermembrana es similar a la del citosol en cuanto a los iones y a las moléculas pequeñas. La membrana interna forma unos pliegues llamados crestas mitocondriales que se extienden hacia el interior del orgánulo y es impermeable a la mayor parte de moléculas e iones, incluido el protón, lo que permite el mantenimiento del gradiente de protones, necesario para la fosforilación oxidativa. En la membrana interna mitocondrial se encuentran los componentes de la cadena respiratoria: complejos I, II, III y IV y la ATP sintasa. La matriz contiene el sistema genético mitocondrial, que se encuentra formando los nucleoides asociado a la cara interna de la membrana interna, y las enzimas responsables de las reacciones centrales del metabolismo oxidativo; excepto las de la glucólisis, que tiene lugar en el citosol. [1]

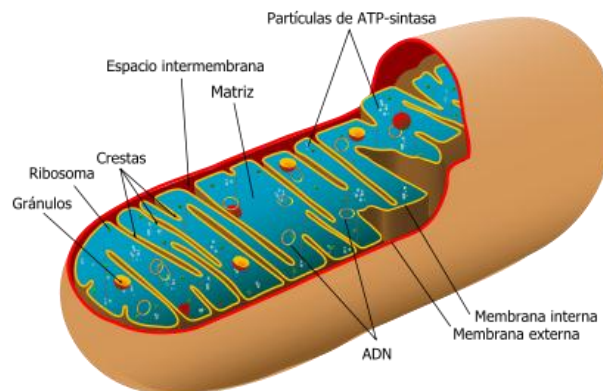


Figura 1: Representación esquemática de la estructura de una mitocondria.

2.1. Sistema genético de las mitocondrias.

Las mitocondrias contienen su propio genoma, que es distinto del genoma nuclear y se encuentra en la matriz mitocondrial. El genoma mitocondrial humano consiste en una molécula de DNA circular de cadena doble, sin intrones, que tiene 16569 pb y su secuencia se conoce en su totalidad [3]. Hay 37 genes: 2 rRNA, 22 tRNA y 13 secuencias codificadoras de subunidades de proteínas de la cadena respiratoria: 7 subunidades del complejo I o NADH ubiquinona:oxidoreductasa; la subunidad apocitocromo b del

complejo III o ubiquinona:citocromo c oxidorreductasa; las subunidades 1, 2 y 3 del complejo IV o citocromo c oxidasa; y las subunidades 6 y 8 del complejo V o $F_0 - ATP$ sintasa [4]. No obstante, la mayoría de proteínas mitocondriales están codificadas en el genoma nuclear [3].

Las 2 hebras del DNA mitocondrial (mtDNA) tienen diferente densidad, debido a que contienen una composición distinta en bases nitrogenadas y así se puede distinguir la hebra pesada, rica en guaninas, que codifica los 2 rRNA, 14 tRNA y 12 polipéptidos; y la hebra ligera, rica en citosinas, que contiene la información para 8 tRNA y el polipéptido ND6 del complejo I [5].

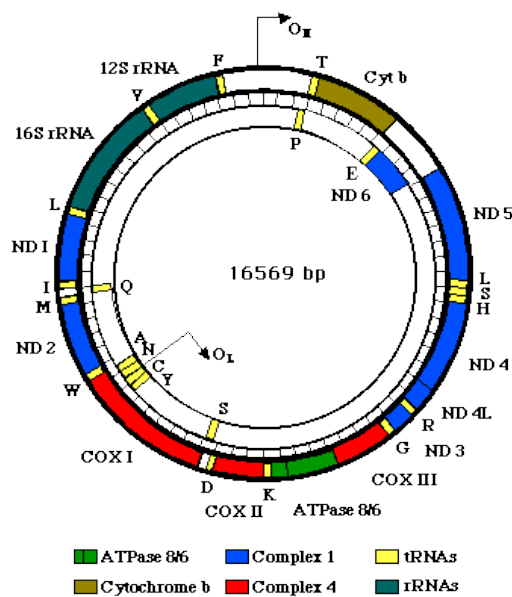


Figura 2: DNA mitocondrial.

Debido al ambiente oxidativo que existe en el interior de la mitocondria, por la producción de especies reactivas de oxígeno en la cadena respiratoria, y a la carencia de histonas, la tasa de mutaciones en el mtDNA es elevada. Además, el sistema de replicación mitocondrial es menos efectivo en la corrección de errores que el nuclear. Como consecuencia de estos dos factores, los defectos en el mtDNA se acumulan a lo largo del tiempo.

La herencia del mtDNA es exclusivamente por vía materna, debido a que las mitocondrias del espermatozoide están marcadas con ubiquitina y durante la fecundación el mtDNA del espermatozoide es selectivamente degradado por endonucleasas, por lo que el cigoto solo poseerá mitocondrias de la madre.

Cada célula contiene cientos de mitocondrias, por lo que existirán miles de copias de mtDNA y de los genes que codifica (poliplasmia). Durante la mitosis, las mitocondrias segregan al azar a las células hijas, fenómeno que se denomina segregación mitótica. Por tanto, a partir de un cigoto que es portador de mtDNA normal y mutado, en sucesivas divisiones pueden obtenerse tres tipos de poblaciones celulares: células que solo contienen mtDNA mutado (homoplasma mutante), células que solo tienen mtDNA normal (homoplasma normal), y células portadoras de ambos tipos de mtDNA (heteroplasma).

Según este hecho, en un paciente que hereda una mutación mitocondrial la proporción de moléculas mutadas puede variar de un tejido a otro. El porcentaje mínimo de mtDNA mutado necesario para que se exprese la patología se denomina umbral de expresión fenotípica. Este umbral es diferente para cada tejido, siendo menor para aquéllos con un mayor requerimiento energético (cerebro, músculo esquelético y cardíaco, por ejemplo) [6].

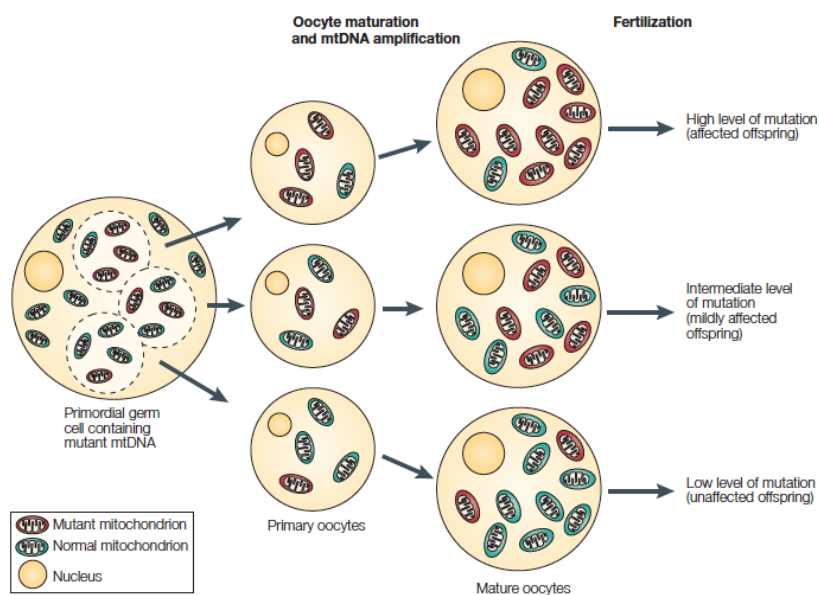


Figura 3: Selección genética mitocondrial.

2.2. Origen endosimbiótico de las mitocondrias.

La existencia dentro de las mitocondrias del mtDNA, ribosomas y tRNA apoya la hipótesis sobre su origen endosimbiótico, que supone que los primeros organismos capaces de metabolismo aeróbico, incluida la producción de ATP ligada a la

respiración, eran bacterias [7]. Los eucariotas primitivos que vivían anaeróbicamente adquirieron la capacidad de llevar a cabo la fosforilación oxidativa cuando establecieron una relación simbiótica con bacterias que vivían en su citosol. Tras mucha evolución y traslado de muchos genes bacterianos al núcleo del eucariota huésped, las bacterias endosimbióticas se transformaron finalmente en mitocondrias. La hipótesis del origen endosimbiótico de las mitocondrias supone que las bacterias primitivas que vivían libremente tenían la maquinaria enzimática para la fosforilación oxidativa y predice que sus descendientes bacterianos modernos han de tener cadenas respiratorias muy similares a las de los eucariotas modernos. [1]

2.3. Proteínas mitocondriales.

Las mitocondrias contienen cientos de proteínas diferentes, de las que sólo alrededor de un 1% están codificadas por el mtDNA [3, 4]. El resto están codificadas por genes nucleares, son sintetizadas por ribosomas citosólicos libres e importadas en las mitocondrias como cadenas polipeptídicas completadas, mediante un sistema de proteínas transportadoras de membrana. Debido a la estructura de doble membrana de la mitocondria, el importe de proteínas es más complejo que la transferencia de un polipéptido a través de las bicapas fosfolipídicas sencillas. El destino de las proteínas mitocondriales puede ser la membrana externa o interna, la matriz o el espacio intermembrana. Las proteínas atraviesan la membrana externa a través del sistema de translocadores mitocondriales externo e interno (TOM y TIM) que reconocen señales de importe de proteínas específicas para cada espacio del orgánulo. En el caso de ser proteínas del espacio intermembrana solo tendrán señales de importe a través de TOM, mientras que si tienen señales de importe a la matriz atravesarán TOM y TIM [2]. Las proteínas codificadas por el mtDNA interactúan con proteínas codificadas en el DNA nuclear (nDNA) que son importadas de forma selectiva a la mitocondria [8, 9]. Así, se forman los complejos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial I, III y IV, siendo el complejo II codificado exclusivamente por el núcleo. La cadena de transporte de electrones junto con la ATP sintasa (complejo V) se encargan de realizar una de las funciones mitocondriales más importantes, el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) [10], a través del cual la célula obtiene el 90% de su energía en forma de ATP. Existen otros procesos metabólicos que tienen lugar en la mitocondria como son

el ciclo de Krebs, la beta-oxidación de los ácidos grasos, el ciclo de la urea o la síntesis de pirimidinas [11]. Algunas de estas rutas metabólicas también dependen directamente de un buen funcionamiento del sistema OXPHOS. Por ejemplo, la beta-oxidación o la síntesis de pirimidinas se verán bloqueadas si no funcionan los complejos respiratorios III y IV.

2.4. Rutas metabólicas en la mitocondria.

Las células utilizan la oxidación de 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 36-38 que se logran mediante la oxidación completa de la glucosa a CO_2 y H_2O 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. Asimismo 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, genera $\text{NADH}+\text{H}^+$ y FADH_2 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. [1]

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 [12], en la biosíntesis de pirimidinas, del grupo hemo y de los centros Fe-S [13], así como en la apoptosis celular y señalización celular [14].

2.5. Sistema de fosforilación oxidativa.

El sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) está formado conjuntamente por los complejos I-IV y la ATP sintasa (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 (Figura 4). Los complejos I, III y IV, son los puntos de la cadena de transporte de electrones 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 que es aprovechado por el complejo V para la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i , y así completar el proceso de la fosforilación oxidativa. El ATP que se obtiene a través de este proceso, es utilizado en los distintos tejidos para mantener las necesidades energéticas celulares. [1]

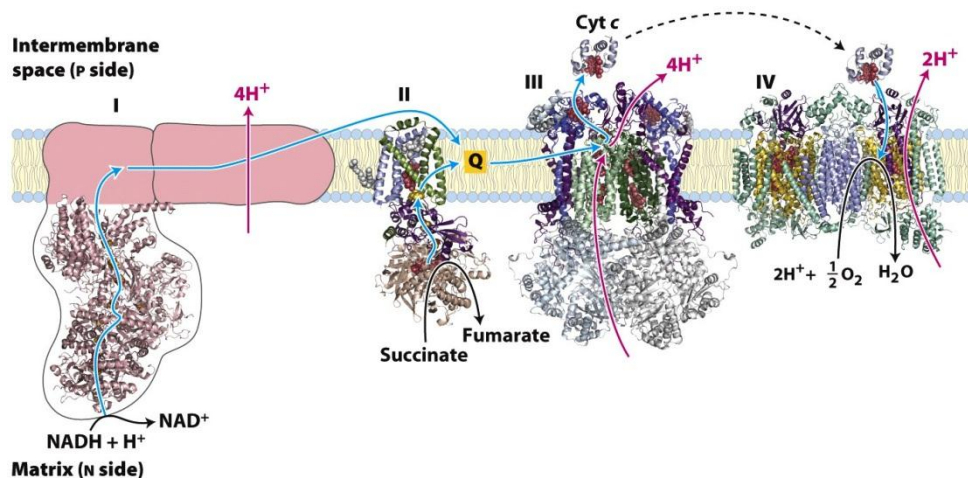


Figura 4: Representación esquemática de los complejos de la cadena de transporte de electrones, situados en la membrana interna mitocondrial.

Complejo I: NADH ubiquinona oxidoreductasa o NADH deshidrogenasa.

Es una enzima compuesta por 46 cadenas polipeptídicas diferentes, entre las que se encuentra una flavoproteína que contiene FMN (flavin mononucleótido) y como mínimo seis centros ferrosulfurados. La microscopía electrónica muestra que tiene forma de L, con un brazo de la L en la membrana y el otro prolongándose hacia la

matriz. El complejo I cataliza dos procesos simultáneos forzosamente acoplados: la transferencia exergónica hacia la ubiquinona de un ion hidruro del NADH y un protón de la matriz y la transferencia endergónica de cuatro protones de la matriz hacia el espacio intermembrana.

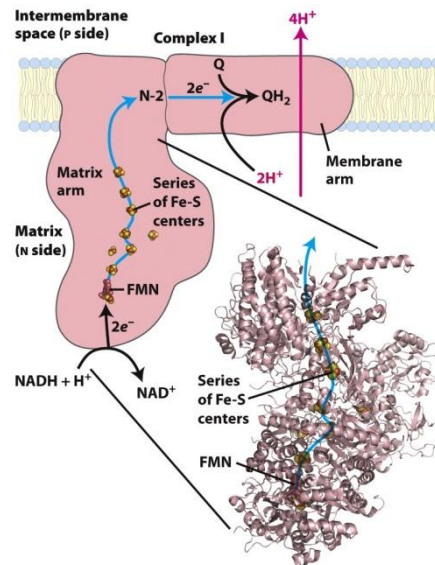


Figura 5: Complejo I o NADH deshidrogenasa. El complejo I cataliza la transferencia de los electrones desde el NADH a la ubiquinona, a través del FMN y los centros ferrosulfurados

Complejo II: succinato deshidrogenasa.

Es la única enzima del ciclo de Krebs que se encuentra en la membrana mitocondrial interna. Es más pequeño y sencillo que el complejo I, contiene 5 grupos prostéticos de 2 tipos y cuatro subunidades proteicas diferentes. Las subunidades C y D (Figura 6) son proteínas integrales de membrana, cada una con 3 hélices transmembrana. Contienen un grupo hemo (hemo b) y un sitio de unión para ubiquinona, que es el aceptor final de electrones en la reacción catalizada por el complejo II. Las subunidades A y B (Figura 6) se extienden hacia la matriz; contienen 3 centros ferrosulfurados, FAD (flavín adenina dinucleótido) y un sitio de unión para el succinato. Es el único complejo en el que no se produce transferencia de protones.

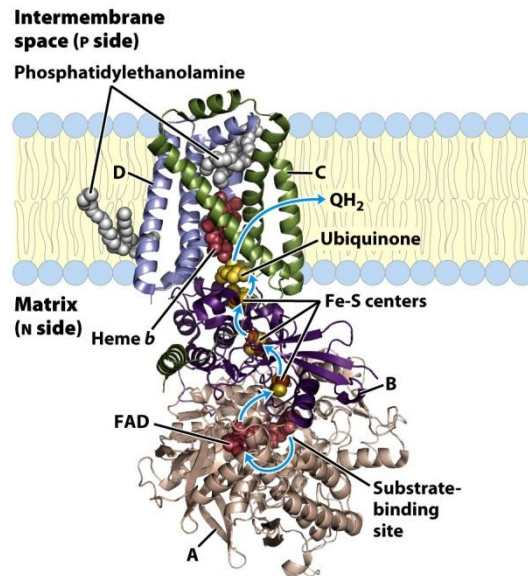


Figura 6: Complejo II o succinato deshidrogenasa. Cataliza la transferencia de electrones desde el FADH_2 hasta la ubiquinona.

Complejo III: complejo citocromo bc_1 o ubiquinona:citocromo c oxidorreductasa.

Es un dímero con las 2 unidades monoméricas del citocromo b que interacciona con la ubiquinona y el citocromo c y bombea protones a través de la membrana mitocondrial interna. Cada monómero tiene 9-11 polipéptidos y como grupos prostéticos tiene un centro ferrosulfurado, 2 grupos hemo b_{562} y b_{566} y un grupo hemo de tipo c_1 . 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.

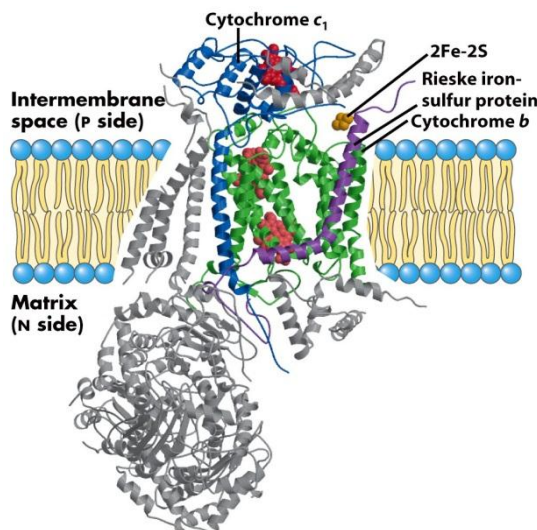


Figura 7: Complejo III o citocromo bc_1 . Cataliza la transferencia de electrones desde la ubiquinona al citocromo c_1 .

Complejo IV: citocromo oxidasa.

Es una enzima formada por 13 subunidades y que transporta electrones desde el citocromo c al oxígeno molecular, reduciéndolo a H₂O. El complejo sólo es 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 H₂O formada.

En mamíferos, el complejo IV tiene un peso molecular de 200 kDa, está formado por 13 proteínas y se localiza en la membrana interna mitocondrial. Como grupos prostéticos contiene dos citocromos, hemo-a y hemo-a₃, 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, COX2 y COX3).

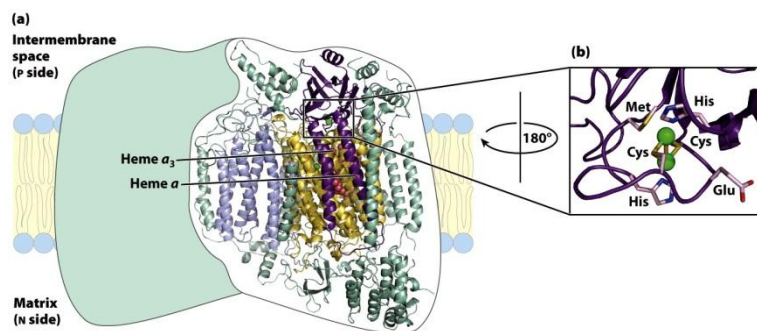


Figura 8: Complejo IV o citocromo oxidasa. Cataliza la transferencia de electrones desde el citocromo c₁, hasta el oxígeno molecular, reduciéndolo a agua.

Complejo V: ATP sintasa.

La ATPasa mitocondrial es un gran complejo enzimático de la membrana mitocondrial interna que cataliza la formación de ATP a partir de ADP y Pi, acompañada por el flujo de protones desde el lado P al lado N de la membrana. Tiene 2 componentes distintos: F₁, una proteína periférica de membrana, y F_o, que es una proteína integral de membrana. La región F₁ forma el dominio catalítico de la ATP sintasa. La región F_o 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_o están codificadas en el mtDNA.

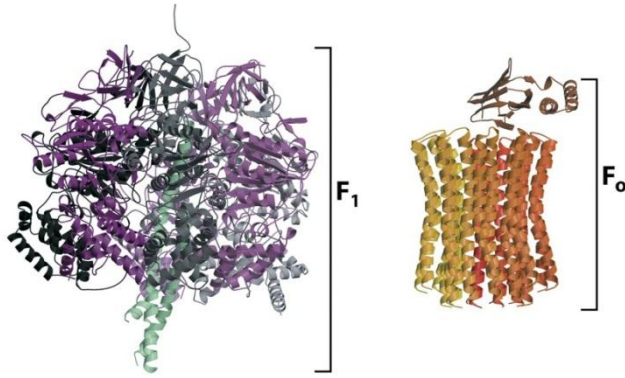


Figura 9: Complejo V o ATP sintasa. A la izquierda, la subunidad F₁, dominio catalítico. A la derecha, la subunidad F_o, poro por el que pasan los protones.

2.6. Vías alternativas de transporte de electrones.

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 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 O₂ acoplada a la transferencia de protones, al menos por un complejo [15].

2.6.1. La oxidasa alternativa AOX.

El cianuro es capaz de inhibir la respiración de mamíferos, ya que actúa bloqueando el transporte de electrones desde el citocromo c hasta el O₂, actuando a nivel del complejo IV. Muchos microorganismos y plantas sintetizan gran variedad de compuestos cianogénicos para su defensa, ante los cuales algunos parásitos son capaces de sobrevivir en sus huéspedes [16]. Dicha resistencia al cianuro, se basa en la existencia de una “oxidasa alternativa” (AOX), proteína que 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 O₂ permitiendo saltar desde el complejo I hasta el aceptor final de

electrones sin pasar por la parte de la cadena respiratoria mitocondrial dependiente de citocromos (complejos III y IV) (Figura 10).

La proteína AOX se había encontrado en 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* [17]. Sin embargo, AOX no está presente en vertebrados.

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 carece de una cisteína importante para la regulación en plantas, lo que ha facilitado su identificación por análisis bioinformáticos.

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 [18].

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 [19].

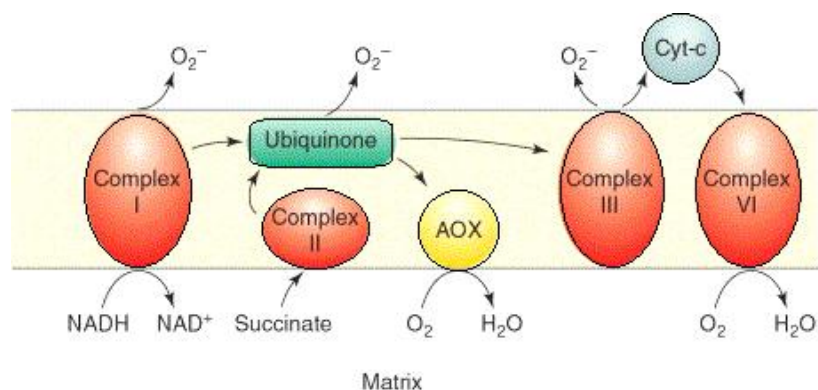


Figura 10: Cadena de transporte de electrones con la oxidasa alternativa (AOX). AOX transfiere los electrones del ubiquinol al oxígeno molecular, reduciéndolo a agua.

2.7. Patología mitocondrial.

Las enfermedades mitocondriales constituyen un amplio grupo de enfermedades que se caracterizan por presentar alteraciones en la cadena de transporte de electrones, con la consiguiente disminución de producción de energía en forma de ATP. Los defectos en el sistema OXPHOS pueden ser debidos a mutaciones en el mtDNA o en el nDNA y manifiestan una gran cantidad de fenotipos, que pueden aparecer en la infancia o en la edad adulta.

Una de las características de la patología mitocondrial es su complejidad. Pueden ser multisistémicas y afectar a una gran cantidad de tejidos y órganos. Además, una misma mutación puede dar lugar a distintos fenotipos y distintas mutaciones pueden producir un mismo fenotipo. Los síntomas son variados y se pueden solapar entre distintos síndromes, de ahí que se realice una clasificación de estas enfermedades en función de las características genético-moleculares de las mutaciones, más que con respecto a los síntomas clínicos [6].

Fue en 1988 cuando se describió, por primera vez, una mutación en el mtDNA que estaba asociada a una patología en el ser humano [20, 21] y desde entonces el número de mutaciones y el espectro de enfermedades producidas por ellas ha aumentado enormemente.

Las enfermedades mitocondriales son consideradas raras, debido a su baja prevalencia en la población (1/5000); y su diagnóstico es complejo, como consecuencia de la gran variedad de síntomas que presentan los enfermos, como se ha comentado anteriormente [6].

En el caso de mutaciones en el mtDNA, esta heterogeneidad de los desórdenes mitocondriales es consecuencia de la herencia materna, la heteroplasmia, la segregación replicativa y el efecto umbral. 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 [22] 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.

Desde hace varias décadas se están estudiando las características estructurales e histoquímicas de tejidos afectados por patologías mitocondriales y su relación con la alteración del mtDNA. Las mutaciones descritas en el mtDNA están recogidas en MITOMAP (<http://www.mitomap.org>) [23].

Las mutaciones responsables de la patología mitocondrial pueden dividirse en los siguientes grupos:

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 [24, 25].

Mutaciones puntuales en tRNA o rRNA

Aproximadamente la mitad de las mutaciones descritas en el mtDNA se localizan en los genes codificantes de tRNA. Se ha observado que mutaciones en los genes de tRNA

producen gran variedad de defectos [26] que se asocian con síndromes como el MERRF (síndrome de epilepsia mioclónica asociada a fibras rojas rasgadas) o el MELAS (encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y accidente cerebrovascular), mientras que las mutaciones en los genes de rRNA se han asociado principalmente a fenotipos de sordera, sobre todo tras el tratamiento con aminoglicósidos. También se han descrito mutaciones responsables de la intolerancia al ejercicio y de la aparición de CPEO [25].

Mutaciones en genes que codifican proteínas mitocondriales

Suelen ser pequeñas deleciones o mutaciones puntuales en las proteínas que codifican las subunidades que forman los complejos de la cadena respiratoria, provocando una deficiencia del complejo del que forman parte. Algunas patologías causadas por estas mutaciones son la neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON), el Síndrome de Leigh y la retinitis pigmentosa (NARP). Estos desórdenes clínicos tienen como fenotipos característicos la neuropatía óptica (LHON), encefalopatía y acidosis láctica (Leigh), neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa (NARP) [24, 25].

Mutaciones en genes nucleares

Se caracterizan por tener un patrón de herencia mendeliano y dan lugar a patologías análogas a las producidas por los genes mitocondriales. Muchos genes pueden verse afectados, desde subunidades estructurales de los complejos de la cadena respiratoria, factores de ensamblaje, chaperonas, hasta genes implicados en el mantenimiento, replicación y traducción del material genético mitocondrial.

2.8. Terapia génica de las enfermedades mitocondriales.

El tratamiento de las enfermedades mitocondriales presenta una serie de dificultades debido a que, como ya se ha comentado anteriormente, éstas pueden ser causadas tanto por mutaciones en el nDNA como en el mtDNA que, junto con las características genéticas de heteroplasmia y efecto umbral, producen una heterogeneidad tanto clínica como bioquímica en estos pacientes. No existen muchos pacientes con el mismo defecto molecular y la misma manifestación clínica que permitan realizar

estudios concluyentes sobre el efecto de los fármacos aplicados en el tratamiento. En la gran mayoría de los pacientes las medidas terapéuticas se limitan a ser de soporte [6].

En los últimos años, se han llevado a cabo estudios acerca de nuevas terapias como el aumento de la biogénesis mitocondrial [27], la suplementación con coenzima Q, o el aumento de la fusión y la fisión de las mitocondrias [28].

Otro grupo de aproximaciones terapéuticas proponen el uso de distintas estrategias de terapia génica como posible alternativa para el tratamiento de las enfermedades mitocondriales. Entre ellas encontramos la eliminación del gen mutante (mediante el uso de enzimas de restricción dirigidas a la mitocondria y que cortan específicamente las copias mutadas), la introducción del gen sano para su expresión en el citoplasma e importe a la mitocondria (expresión alotópica) y la xenoexpresión de enzimas alternativas (procedentes de otros organismos). Este último método se ha estudiado en el grupo de investigación GENOXPHOS como terapia para las enfermedades mitocondriales basada en el uso de vías alternativas al transporte electrónico en la cadena respiratoria y es el objeto de la presente memoria.

En investigaciones recientes se han desarrollado líneas de ratón portadoras de mutaciones en el nDNA para dar lugar a fenotipos equivalentes a los de las enfermedades humanas, para poder estudiarlas en un modelo animal, con el fin de 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.

Entre los modelos animales que se están estudiando actualmente están ratones portadores de mutaciones, creados por recombinación homóloga, para genes que codifican proteínas estructurales de la cadena respiratoria, entre ellos el gen COX10, presente en este estudio, que se ha visto que está mutado en enfermedades mitocondriales humanas [29, 30].

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 presentes en el mtDNA con el uso de estrategias de fusión

entre células enucleadas (citoplastos) que presentan la mutación y células madre embrionarias [31] o cigotos [32]. Las mutaciones estudiadas afectan a las subunidades del complejo IV y son hereditarias [33, 34]. Defectos en el complejo IV han sido asociados con varias enfermedades mitocondriales y neurodegenerativas [35, 36].

La expresión de la oxidasa alternativa AOX podría proporcionar una opción en el caso de deficiencias que afecten a los complejos III y IV. Esta enzima ha sido expresada en células humanas sanas en cultivo, comprobando que su expresión no resulta tóxica y las hace parcialmente resistentes al cianuro y a la antimicina A, inhibidores de los complejos IV y III, respectivamente [37]. En *Drosophila*, dicha oxidasa alternativa permite la supervivencia de moscas que tienen disminuida parcialmente la expresión del factor de ensamblaje del complejo IV Surf1, así como compensar el fenotipo en una cepa que contiene una mutación en el gen homólogo al humano Park7 relacionado con la enfermedad del Parkinson [38].

La xenoexpresión simultánea de la proteína AOX y una NADH deshidrogenasa (NAD11) en una línea celular carente de mtDNA (rho cero o ro) permitió restablecer el transporte electrónico desde NADH hasta el oxígeno molecular [39]. Además de la función respiratoria, se restablecieron vías metabólicas adyacentes como la síntesis de pirimidinas. Sin embargo, no se recuperó el bombeo protónico, ya que ninguna de estas proteínas cumple esta función, por lo que la compensación funcional de la cadena respiratoria fue incompleta. Para restaurarla, y así establecer un potencial de membrana para la síntesis de ATP, se podría desarrollar una estrategia de xenoexpresión con proteínas con función de bombeo de protones.

La expresión de AOX en el modelo de ratón permite el estudio del potencial terapéutico de dicha proteína como terapia génica en mamíferos con defectos del sistema OXPHOS.

Por ello, en el presente proyecto Máster se abordó el estudio de un modelo de ratón *knock-in* para AOX y del modelo resultante de cruzar dicho *knock-in* con animales *knock-out* para factores de ensamblaje del complejo IV de la cadena respiratoria (COX10).

3. Hipótesis y objetivos

3.1. Hipótesis

Nuestra hipótesis se basa en que, mediante la xenoexpresión de la proteína AOX de *Emericella nidulans*, se puede restaurar el paso de electrones del NADH al oxígeno en aquellos animales que tengan interrumpida la cadena respiratoria a nivel de los complejos III o IV. Esto disminuiría la producción de ROS, permitiría restablecer el funcionamiento del complejo I y de aquellas rutas metabólicas dependientes del funcionamiento de la cadena, con la consiguiente mejora de la sintomatología.

3.2. Objetivos

3.2.1. Completar la caracterización funcional de AOX en los ratones *knock-in* comparando con el fenotipo salvaje.

1.1. Expresión de AOX en pulmón, testículo, timo, bazo y páncreas en ratones *knock-in* AOX.

1.2. Diferencias en la expresión de AOX entre machos y hembras.

3.2.2. Definir las posibles opciones que expliquen la aparición de tres bandas en los análisis de western blot (procesamiento tras el importe a mitocondria o degradación de la proteína AOX).

3.2.3. Ensayos de resistencia a rotenona.

4. Materiales y métodos:

4.1. Muestras biológicas:

Con el fin de estudiar el papel de la proteína AOX *in vivo* se generó un ratón transgénico que expresara el gen AOX de forma ubicua. Esta parte del procedimiento fue llevada a cabo por la empresa genOway. El ratón fue generado por inserción del cDNA de AOX, bajo la influencia del promotor Rosa26, vía recombinación homóloga en células madre embrionarias.

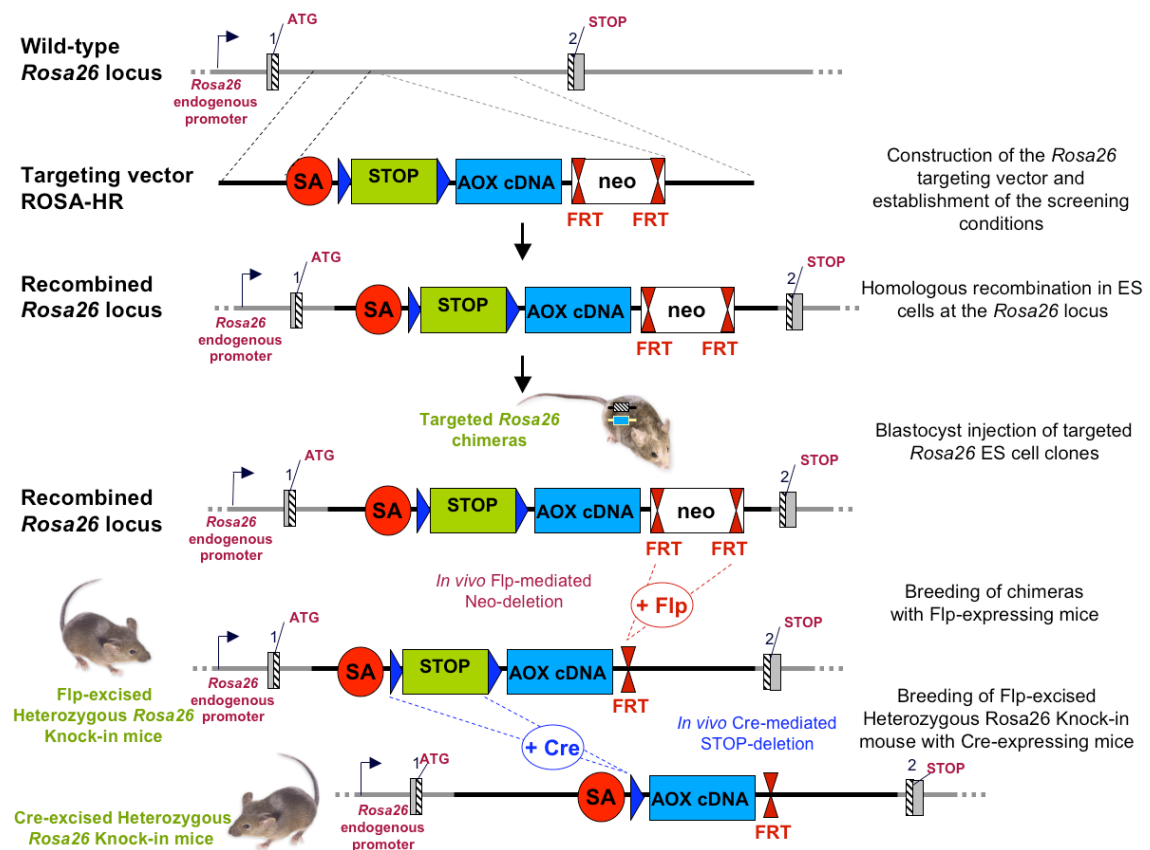


Figura 11: Representación esquemática del proceso de generación del ratón *knock-in* AOX.

El procedimiento comenzó con la inserción del constructo AOX cDNA, procedente del hongo *Emericella nidulans*, en el vector Rosa26 “Quick Knock-in™” de genOway. Se insertó un casete STOP flanqueado por sitios loxP (*floxeado*) en la zona *upstream* del constructo, para que la expresión del gen AOX dependiera de la acción de la enzima Cre-recombinasa, y un casete de resistencia a neomicina, flanqueado por sitios FRT, para facilitar la selección de las células recombinantes. Se introdujo el transgén en

células madre embrionarias por recombinación homóloga y éstas se inyectaron en blastocistos para generar las quimeras. Los ratones se cruzaron con otros que fueran portadores de Flp recombinasa, para escindir el casete de selección a neomicina mediante el sistema Flp-FRT, y posteriormente con ratones portadores de Cre recombinasa, para escindir el casete STOP y permitir la expresión del gen AOX (Figura 11).

El ratón *knock-out* para COX10 se generó eliminando el exón 6 del gen COX10 usando el sistema Cre-loxP. Primero, los sitios loxP fueron introducidos en el gen en células madre embrionarias por recombinación homóloga. A continuación, se eliminó el casete de selección con la Cre recombinasa para obtener el gen *floxeado*. Las células madre embrionarias que contenían el gen *floxeado* fueron inyectadas en blastocistos para producir ratones quiméricos. Posteriormente, el exón 6 fue eliminado *in vivo*, cruzando ratones portadores del gen *floxeado* con ratones transgénicos que expresaban Cre recombinasa de forma específica en músculo esquelético (Figura 12) [30].

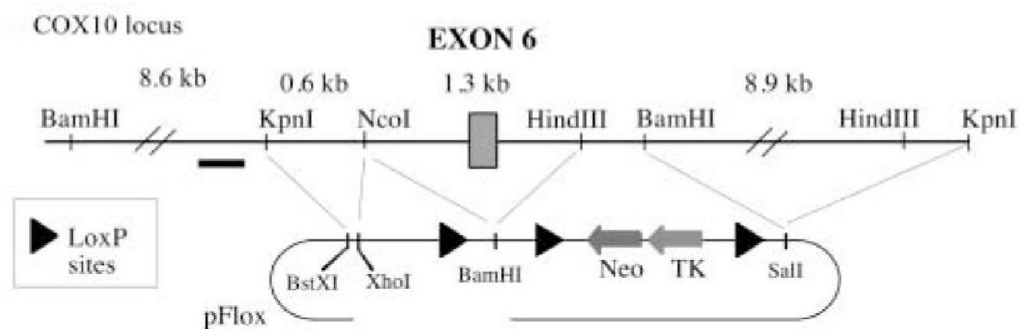


Figura 12: Esquema del exón 6 del gen COX 10 en los ratones *knock-out* para COX10.

La línea de ratones *knock-out* COX10 se cruzó con los ratones *knock-in* AOX para obtener ratones *knock-in-knock-out*.

Los ratones *knock-in* AOX utilizados a lo largo de este estudio fueron obtenidos a partir de cruces entre ratones *knock-in* heterocigotos para AOX (+/-). Las crías eran clasificadas como homocigotos AOX +/+, heterocigotos AOX +/- y homocigotos AOX -/-. Las líneas celulares utilizadas a lo largo de este estudio fueron fibroblastos inmortalizados AOX +/+, AOX +/- y AOX -/-, obtenidos a partir de ratones *knock-in* AOX;

C57-AOX línea celular C57 que sobreexpresa la proteína AOX [39]; y fibroblastos de ratón C57 silvestre.

4.2. Cultivos celulares:

Todo el trabajo con cultivos celulares se llevó a cabo en campana 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%.

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

4.2.1. Medios de cultivo.

Para el crecimiento y mantenimiento de las distintas líneas de fibroblastos 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 (10000 unidades/mL de penicilina G sódica y 10000 µg/mL de sulfato de estreptomicina, GIBCO).

4.2.2. Descongelación, siembra y mantenimiento de las líneas celulares.

Las líneas celulares se almacenan en viales de congelación en un tanque de nitrógeno líquido para evitar la pérdida accidental de una línea celular por muerte o contaminación y minimizar la acumulación de cambios genéticos.

Para descongelar las líneas celulares almacenadas, el vial se sumergió en un baño de agua a 37 °C. El contenido del vial se depositó en una placa de cultivo de 100 mm de diámetro con 7 mL de medio de cultivo y se almacenaron en el incubador a 37 °C, cambiándoles el medio de forma periódica cada 48-72 horas.

Cuando las placas estaban al 90% de confluencia era necesario dividir las. 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 los componentes 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% y EDTA 0,02%, 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. Las células fueron recogidas con medio de cultivo y sembradas en nuevas placas de cultivo o congeladas para su almacenamiento.

4.2.3. Congelación de las líneas celulares.

Para la congelación de las líneas celulares se utilizaron viales criogénicos resistentes al nitrógeno líquido. Los fibroblastos se crecieron hasta alcanzar un 80-90% de confluencia, se eliminó el medio de cultivo mediante aspiración, se lavaron con PBS y, tras eliminarlo, se tripsinizaron. A continuación, se recogieron con PBS con 20% de SFB, arrastrando por toda la placa para recoger todas las células y se traspasaron a un tubo tipo falcon de 15 mL. Los tubos falcon se centrifugaron a 2000 x g durante 5 minutos, para la obtención del sedimento celular. Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1000 µL de medio de congelación (DMEM, SFB 30% y dimetilsulfóxido (DMSO) 10%), y se pasó a un vial de congelación. El vial se guardó a -80 °C en un contenedor de policarbonato con isopropanol, que permite una congelación paulatina y uniforme (la temperatura va disminuyendo 1 °C/minuto). Al día siguiente, se pasaron a un contenedor de nitrógeno líquido a -200 °C, que permite conservar las células durante largos periodos de tiempo (años) sin deterioro celular apreciable.

4.2.4. Recuento celular.

Para la siembra de las placas de cultivo de 96 pocillos empleadas en el ensayo de resistencia a rotenona (4.2.5.) es necesario contar las células, para saber la densidad celular depositada en cada pocillo.

Esta operación se realizó con la ayuda de una cámara de Neubauer (Figura 13).



Figura 13: A. Cámara de Neubauer. B. Representación de la cuadrícula marcada en la cámara.

Las placas de 100 mm en las que se encontraban las células se tripsinizaron para la recogida de las mismas en tubos falcon de 15 mL. Se centrifugaron y el sedimento celular obtenido se redisolvió en 1 mL de medio de cultivo. A continuación, se tomaron 20 μ L y se añadieron a un tubo eppendorf, junto con 20 μ L de Azul Tripán (0,4% en NaCl 0,15 M), este colorante permite distinguir las células muertas de las vivas, ya que solo penetra en las muertas, tiñéndolas de azul.

Encima de la cámara de Neubauer se depositó un cubreobjetos, se tomaron 20 μ L de la solución de células junto con el colorante y se depositaron entre la cámara de Neubauer y el cubreobjetos, de manera que la muestra entraba por capilaridad, hasta llenar toda la cuadrícula. La cámara se colocó en el microscopio y se procedió al recuento de las células en los cuatro cuadrantes de la cámara de Neubauer. La densidad celular se obtuvo realizando la siguiente operación:

$$N^{\circ} \text{ de células/mL} = \frac{N^{\circ} \text{ de células contadas en los 4 cuadrantes}}{\text{Número de cuadrantes contados (4)}} \times \text{dilución (2)} \times 10^4$$

4.2.5. Ensayos de resistencia a rotenona.

Los ensayos de citotoxicidad se realizaron en placas de 96 pocillos, por lo que el primer paso fue la siembra de las mismas. Se sembraron placas con 1000 células/pocillo, 2000 células/pocillo o 3000 células/pocillo. Para ello, lo primero fue el recuento de las células, explicado en el apartado 4.2.4., para conocer qué volumen celular debíamos tomar para cada placa. Se sembraron las células que contenían el gen de AOX, a las que llamamos +/+ en las cuatro filas superiores y las -/- en las inferiores, con ayuda de una pipeta multicanal añadiendo 200 μ L de medio de cultivo por pocillo, a excepción de las columnas 1 y 12, que solo contenían medio de cultivo (Figura 14).

A las 48 horas se añadió la rotenona, de manera que en cada columna había una concentración creciente de la droga. Para preparar las diluciones de rotenona, se partió de un stock 500 μ M, que se diluyó 10 veces en etanol al 99% y, a partir de ésta, se hicieron las demás diluciones seriadas, usando medio de galactosa (suero fetal bovino 5%, galactosa 0,9 g/L, piruvato 0,22%, antibiótico 1% en medio de cultivo DMEM sin glucosa y piruvato).

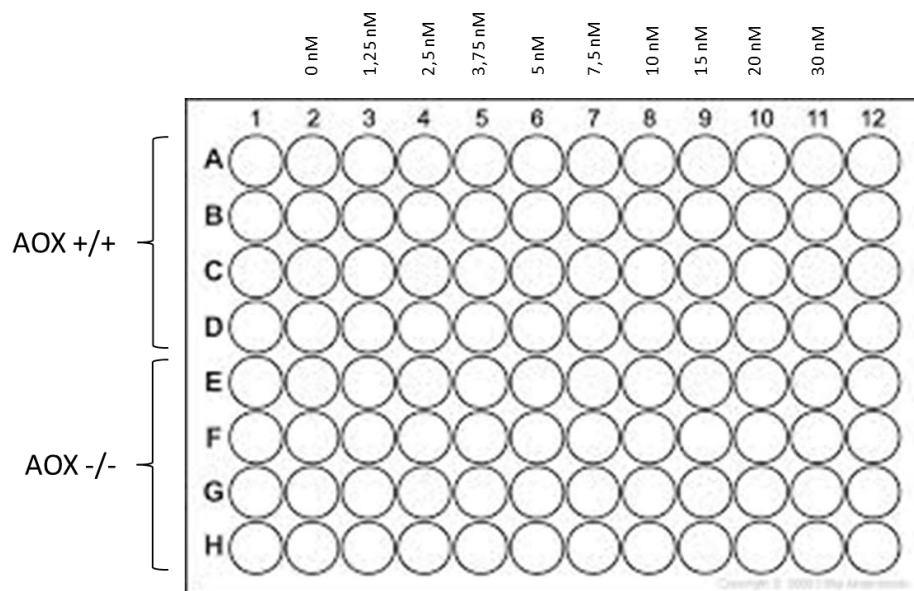


Figura 14: Representación esquemática de la distribución de las células en la placa de 96 pocillos, indicando las concentraciones de rotenona empleadas en cada columna. Las columnas 1 y 12 no tienen células, solo medio.

Pasadas 48 horas de la adición de la rotenona se realizó la prueba del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol), para distinguir las células viables de las muertas. El MTT es un compuesto que es captado por las células vivas y reducido por la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial para dar un compuesto insoluble coloreado, el formazán.

Primero, se eliminó el medio de cultivo que contenía la droga y, a continuación, se añadieron 200 μ L de medio de cultivo fresco y 50 μ L de MTT (5 mg/mL), las placas se taparon con papel de aluminio y se incubaron a 37 °C en el incubador. Pasadas 4 horas se eliminó el MTT y los cristales azules de formazán se solubilizaron con 200 μ L de DMSO y 25 μ L de tampón glicina (glicina 0,1 M, NaCl 0,1 M, pH 10,5, ajustado con NaOH 1 M). Por último, se midió la absorbancia a 550 nm en un lector de placas ELISA.

4.3. Ácidos nucleicos:

4.3.1. Extracción de DNA a partir de cultivos celulares.

El primer paso es la obtención de las células que se realizó en el cuarto de cultivos. Las células se encontraban en placas de cultivo de 100 mm de diámetro, en medio DMEM suplementado con SFB y antibióticos. Las células se recogieron por tripsinización, se centrifugaron durante 5 minutos a 2000 x g. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento celular se almacenó a -80 °C hasta su uso.

En el laboratorio, las células se resuspendieron en 250 μ L de TE pH 7,4 (Tris 10 mM y EDTA 1 mM), y se traspasaron a un tubo eppendorf. A continuación, se añadió 1,25 μ L de proteinasa K 20 mg/mL y 5 μ L de SDS 25%. La mezcla se incubó a 37 °C toda la noche con agitación (400 rpm). Al día siguiente se añadieron 10 μ L de ribonucleasa A 0,25 mg/mL y se incubó a 60 °C durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación la mezcla se extrajo una vez con 1,5 volúmenes de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó en vórtex 15 segundos y se centrifugó a 16200 x g durante 5 minutos. Se pasó la fase acuosa a un tubo eppendorf estéril y ésta se extrajo con un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se agitó en vórtex 15 segundos y se centrifugó de la misma manera. La fase acuosa superior se traspasó a un tubo eppendorf estéril al cual se añadió medio volumen de acetato de amonio 7,5 M y

1,5 volúmenes de isopropanol frío, para precipitar el DNA. Se mezcló por inversión y se incubó a -80°C durante 15 minutos. A continuación se centrifugó a $12000 \times g$ durante 5 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante. El *pellet* de DNA se lavó con $500 \mu\text{L}$ de etanol al 70 %, se agitó en vórtex y se centrifugó a $12000 \times g$ durante 5 minutos a 4°C . El sobrenadante se eliminó y el *pellet* se dejó secar al aire. Una vez seco, se resuspendió en $200 \mu\text{L}$ de agua y se almacenó a -20°C .

4.3.2. Extracción de DNA a partir de cola o dedo de ratón.

Para poder determinar el genotipo de los ratones es necesario contar con una muestra de DNA individual, para ello se extrajo DNA a partir de cola o dedo de las crías. Las muestras se recogieron en el animalario del Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA) donde los animales están estabulados.

Se añadió a cada muestra $50 \mu\text{L}$ del reactivo de lisis alcalina (NaOH 25 mM y EDTA 0,2 mM) y se agitaron. A continuación, se centrifugaron durante unos segundos en la centrífuga y se incubaron, primero a 65°C durante 30 minutos y después a 98°C durante 15 minutos, ambas incubaciones con agitación a 600 rpm. Seguidamente se incubaron en hielo 5 minutos y se volvieron a centrifugar durante unos segundos. A continuación, se añadió a cada muestra $50 \mu\text{L}$ del reactivo de neutralización (TRIS-HCl pH 4, 40 mM) y se agitaron. Se centrifugaron a máxima velocidad ($12000 \times g$) durante 1 minuto. Por último, se transfirieron $80 \mu\text{L}$ del sobrenadante a tubos eppendorf estériles y previamente etiquetados. Las muestras se almacenaron hasta su uso a -20°C .

4.3.3. Cuantificación de los ácidos nucleicos.

La concentración y la pureza de los ácidos nucleicos obtenidos a partir de los métodos anteriores se determinó mediante espectrofotometría visible ultravioleta (VIS-UV) con ayuda de un sistema NanoVue Plus (GE Healthcare) (Figura 15). Para determinar la pureza, el aparato realiza una relación de las medidas de absorbancia a longitudes de onda de $\lambda = 260 \text{ nm}$ y $\lambda = 280 \text{ nm}$, considerándose una buena pureza cuando $A_{260}/A_{280} = 1,8$ para DNA. La concentración de DNA se determina mediante la absorbancia a $\lambda = 260 \text{ nm}$, sabiendo que $A_{260}=1$ corresponde aproximadamente con $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ de DNA de doble cadena.

Primero se calibró el aparato con 2 μL de agua destilada, repitiendo 2 veces la operación. Para medir las muestras se debe limpiar la zona de carga con un papel especial y depositar 2 μL de cada muestra. El aparato proporciona la concentración de ácidos nucleicos en $\text{ng}/\mu\text{L}$ y las relaciones de pureza.



Figura 15: Espectrofotómetro NanoVue.

4.3.4. Amplificación del DNA.

Con el fin de determinar el genotipo de los ratones se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permite obtener numerosas copias de un fragmento de DNA determinado. Para ello se usó un termociclador (Figura 16) y la enzima polimerasa empleada fue SuperHot Taq polimerasa (Bioron).



Figura 16: Termociclador biometra T3000.

El esquema de la reacción de PCR se muestra en la figura 17.

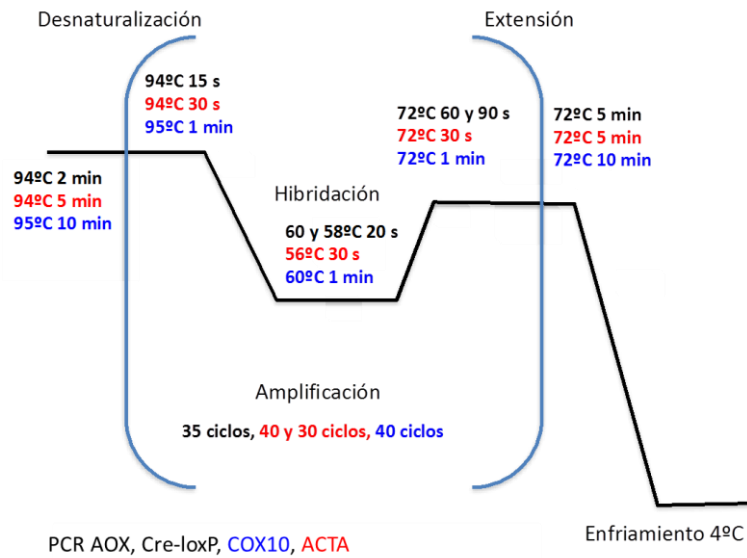


Figura 17: Representación del programa de PCR en la que se indica las temperaturas de cada etapa, para las distintas PCR.

En el proceso de genotipado de los ratones, para determinar los ratones que eran *knock-in* para AOX, los que eran *knock-in* y conservaban el casete STOP y los que eran AOX *-/-*, se llevaron a cabo dos protocolos distintos de PCR, con dos grupos distintos de cebadores. El primer protocolo incluye la PCR AOX y la PCR Cre-LoxP.

La PCR AOX identifica los ratones *knock-in* sin STOP y en ella se usan los cebadores Rosa-F, Rosa-R y AOX-R (Figura 18). En los ratones homocigotos para AOX se obtiene una banda de 711 pares de bases (pb), en los ratones heterocigotos se obtienen 2 bandas, una de 711 pb y otra de 400 pb y en los ratones homocigotos AOX *-/-* se obtiene una banda de 400 pb.

La PCR Cre-LoxP identifica los ratones que son *knock-in* para AOX y conservan el casete STOP, con los cebadores Rosa-F, Rosa-R2, AOX R y Cre-F (Figura 18). En los ratones AOX *-/-* se amplifica una banda de 400 pb, en los ratones heterocigotos se amplifican 2 bandas, una de 850 pb y otra de 400 pb y en los homocigotos (los 2 alelos son *knock-in*+STOP) se amplifica una banda de 850 pb.

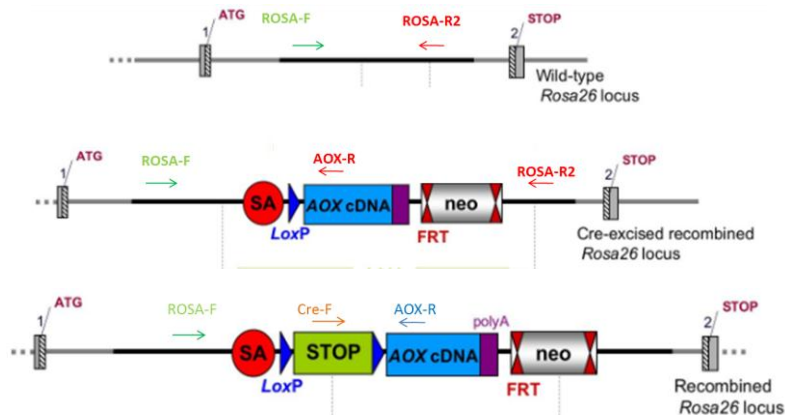


Figura 18: Representación esquemática del lugar de unión de los cebadores en las reacciones PCR AOX y PCR Cre-LoxP que identifica los ratones AOX $-/-$, los que tienen el gen AOX y los que tienen el gen AOX con el casete STOP.

En el segundo protocolo de PCR se usaron los cebadores: 027, 061, 15901, 028 (Figura 19). De tal manera que los cebadores 027/15901 permiten identificar los ratones *knock-in* AOX sin casete STOP (banda de 803 pb), los cebadores 061/15901 identifican los ratones *knock-in* AOX con STOP (banda de 593 pb) y los cebadores 028/027 se unen a los alelos silvestres (banda de 293 pb).

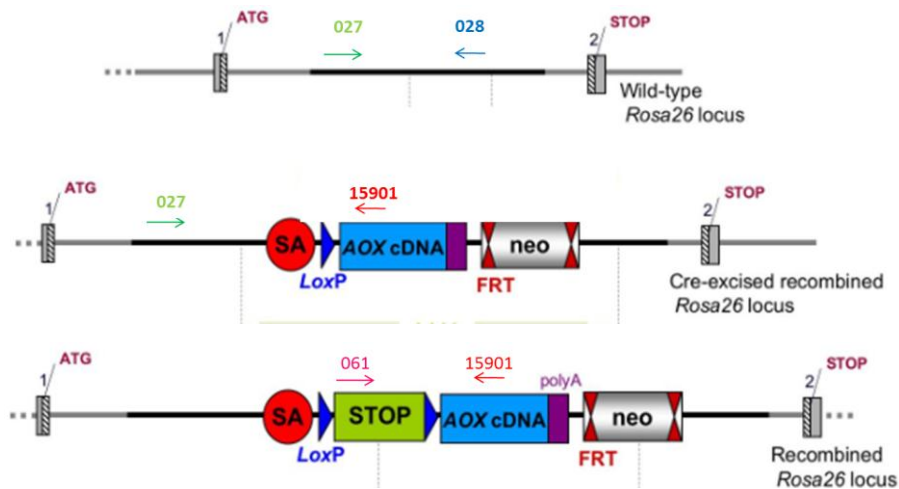


Figura 19: Representación esquemática del segundo protocolo con el lugar de unión de los cebadores en la reacción de PCR que identifica los ratones AOX $-/-$, los que tienen el gen AOX y los que tienen el gen AOX con el casete STOP.

La PCR ACTA permite identificar aquellos ratones que tienen Cre recombinasa específica de músculo esquelético. Usando los cebadores ACTA-Cre Forward y ACTA-Cre Reverse aquellos ratones que tengan Cre recombinasa en músculo esquelético dan una banda de 400 pb.

Por último, con la PCR COX10 se identifican los ratones que tienen el gen COX10 *floxeado*. En aquellos ratones que posean los 2 alelos del gen de COX10 *floxeados* se amplifica una banda de 838 pb, en los ratones con un alelo *floxeado* y un alelo silvestre se obtienen 2 bandas, una de 838 pb y otra de 708 pb y en los ratones AOX *-/-* se amplificará una banda de 708 pb (Figura 20).

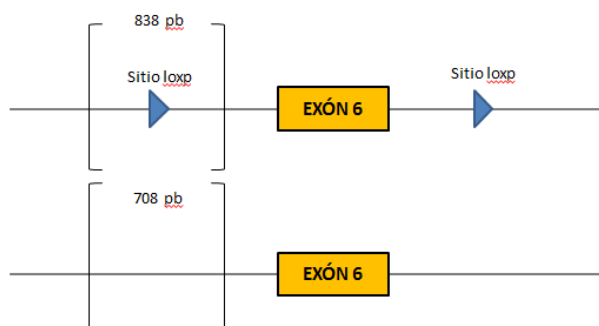


Figura 20: Representación esquemática del exón 6 del gen COX10, con los lugares de unión de los cebadores.

Los reactivos empleados para la reacción de PCR se detallan en la Tabla 1 y la secuencia de los cebadores usados, en la Tabla 2.

Tabla 1: Reactivos empleados en las reacciones de PCR, con los volúmenes utilizados y la concentración de cada uno en los 25 μL de volumen final.

	Concentración inicial	Volumen	Concentración final
Tampón SO_4	10x	2,5 μL	1x
MgCl_2	100 mM	0,5 μL	2 mM
dNTPs	10 mM	0,5 μL	0,2 mM
Cebador directo	10 μM	1 μL	0,4 μM
Cebador reverso	10 μM	1 μL	0,4 μM
Taq polimerasa	5 U/ μL	0,1 μL	0,02 U/ μL
DNA		1 μL	4 ng/ μL
H_2O		18,4 μL	

El programa usado en el termociclador varía según la PCR que se lleva a cabo ya que las temperaturas de hibridación de los cebadores dependen de la longitud de éstos y de su contenido en bases nitrogenadas y el tiempo de extensión depende de la longitud del tamaño del producto de PCR (Figura 17).

Tabla 2: Cebadores empleados en las reacciones de PCR.

Nombre del cebador	Secuencia
Rosa-F	CACTTGCTCTCCCAAAGTCGCTCT
AOX-R	CTCCACGATCTTTGGGGCGTCTG
Rosa-R2	GCGGATCACAAAGCAATAATAACCTG
Cre-F	GTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGT
COX10-F	ACCCATTAGAAACTGCTGATGGCT
COX10-R	CACTGACGCAGCGCCAGCATCTT
ACTA-Cre-F	CGCAGAACCTGAAGATGTTC
ACTA-Cre-R	GTTCGAACGCTAGAGCCTG
027	CAATACCTTTCTGGGAGTTCTCTGC
061	CATGGTAAGTAAGCTTGGGCTGCAGG
15901	GGAGGACATCAAGAAGTTCCAGATGACC
028	GGTAGTCATCTGGGGTTTTATGCAG

4.3.5. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

Los geles de agarosa empleados tenían una concentración del 1,8% de agarosa y se prepararon disolviendo 1,44 gramos de agarosa en 80 mL de TAE 1x (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM) y calentando la mezcla en un microondas hasta la completa disolución de la agarosa. Una vez templada la disolución se añadieron 4 µL de bromuro de etidio (10 mg/mL) para conseguir una concentración final de 0,5 µg/mL, se vertió en el molde del gel, se pusieron los peines y se dejó polimerizar. Una vez sólido se quitaron los peines y el gel se colocó en la cubeta de electroforesis y se llenó con TAE 1x. Para cargar las muestras se añadió a cada muestra 5 µL del tampón de carga (Ficoll400 al 30% y azul de bromofenol al 0,1% (p/v) en TAE) y se cargaron 20 µL en cada pocillo. Como marcador de pesos moleculares se usó Low Mass Ladder de Invitrogen. La corriente empleada fue 100 voltios y el tiempo de electroforesis varió entre 30 y 50 minutos, dependiendo de las muestras. Para visualizar los geles se empleó un transiluminador Geldoc de Bio-Rad.

4.4. Proteínas:

4.4.1. Electroforesis de proteínas.

El primer paso en la inmunodetección de proteínas es la separación de las mismas mediante geles desnaturizantes de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE). Estos geles se

componen de gel concentrador en la parte superior, y gel separador en la inferior. Los reactivos usados para la preparación de los geles, que tenían 1 mm de espesor, se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3: Reactivos empleados en la preparación de los geles separador y concentrador.

	Gel separador (12,5%)	Gel concentrador (5%)
Acrilamida:bisacrilamida 30:0,8	2,125 mL	0,33 mL
Tris HCl 1,5 M pH 8 4x	1,25 mL	0,5 mL
Agua	2 mL	1,1 mL
10% persulfato amónico	30 μ L	20 μ L
TEMED	5 μ L	5 μ L

Primero se montaron los cristales sobre el soporte y se comprobó que no había fugas añadiendo agua destilada. Se eliminó el agua y se añadió el gel separador, hasta una altura de 5 centímetros, seguido de un pequeño volumen de isopropanol para eliminar las burbujas de la superficie y evitar la entrada de oxígeno, que inhibe la polimerización. Una vez polimerizado, se eliminó el isopropanol, se añadió el gel concentrador y se colocaron los peines, con cuidado de que no se formaran burbujas. Cuando el gel polimerizó se retiraron los peines y los pocillos se lavaron con agua destilada. Los cristales se colocaron en la cubeta de electroforesis, que se llenó con tampón de electroforesis 1x (preparado a partir de tampón de electroforesis 10x Tris-HCl 250 mM, glicina 1,92 mM y SDS 1%). Para cargar las muestras se mezclaron con tampón de carga 4x (Tris-HCl pH 6,8 50 mM, SDS 2%, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 1% y azul de bromofenol 0,02%) y el marcador de pesos moleculares empleado fue Precision Plus Protein Dual Color de Bio-Rad. Se conectó a una corriente de 10 mA por gel durante 30 minutos, hasta que las muestras alcanzaban el gel separador y, a continuación, se aumentó la corriente a 20 mA por gel durante 2 horas.

4.4.2. Electrotransferencia.

La transferencia de proteínas desde el gel a membranas de PVDF se realiza mediante electrotransferencia húmeda en un sistema Mini Trans-Blot Cell de Bio-Rad (Figura 21). Las membranas empleadas son Hybond-P de Amersham y necesitan activarse en metanol durante 10 segundos. El gel se incubó en BSN (Tris 48 mM, glicina 39 mM y

metanol 20%) durante 20 minutos y la membrana, una vez activada, se lavó en agua destilada 1 minuto y se incubó en BSN 15 minutos. La preparación de los sándwiches se realizó en una cubeta llena de BSN, para que todos los componentes estuvieran humedecidos con BSN. Se colocó, encima del casete transparente, la esponja, 3 papeles de filtro, la membrana, el gel, 3 papeles de filtro, la otra esponja y se cerró, con cuidado de que no quedaran burbujas entre la membrana y el gel. Los sándwiches se colocaron en la cubeta de transferencia y se añadió BSN hasta arriba. Se conectó a una corriente de 100 voltios, durante 1 hora a 4 °C.

Una vez acabada la transferencia se sacó la membrana y se lavó con agua destilada y PBS-T (PBS con 0,05% Tween 20) y se utilizó inmediatamente.



Figura 21: Sistema Mini Trans-Blot Cell de Bio-Rad.

4.4.3. Inmunodetección de proteínas.

Para detectar las proteínas fijadas a la membrana el primer paso fue el bloqueo de sitios inespecíficos con solución de bloqueo (12% de leche desnatada en polvo y 4 mg/mL de albúmina sérica bovina (BSA) en PBS-T). La membrana se incubó en la solución de bloqueo durante toda la noche a 4 °C, con agitación. Antes de poner el anticuerpo primario, se lavó brevemente con PBS-T. El anticuerpo primario fue anti HA-peroxidasa (Roche, no precisa de anticuerpo secundario) 1:5000, que se preparó en una disolución que contenía leche (1%) y BSA (2,4 mg/mL) en PBS-T, y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Al finalizar el tiempo de incubación se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS-T y se procedió a la detección de la proteína.

Para la detección de la proteína se bañó la membrana con el reactivo quimioluminiscente del kit comercial EZ-ECL de Biological Industries. La enzima peroxidasa de rábano, que está conjugada al anticuerpo, actúa sobre el luminol y produce una señal luminosa que se detectó exponiendo la membrana a una placa autorradiográfica (Amersham, Hyperfilm). Esta operación se realizó colocando la membrana y la placa en un casete de exposición y en oscuridad. Transcurrido el tiempo de exposición se sumerge la placa en líquido revelador (Kodak) durante unos segundos, después en agua y, por último, en líquido fijador (Kodak). Una vez terminado este proceso, se lavó la placa con agua destilada y se dejó secar al aire.

La membrana se aclaró con agua destilada para eliminar el reactivo quimioluminiscente y se conservó a 4 °C hasta su posterior utilización.

Para la inmunodetección de proteínas control se incubó la membrana en una solución de bloqueo al 5% de leche en PBS-T, durante toda la noche a 4 °C. Antes de poner el anticuerpo primario, se lavó brevemente con PBS-T. A continuación, se incubó la membrana con el anticuerpo primario (1:20000, complejo II 70 kDa Invitrogen), en una solución de 0,5% de leche en PBS-T durante 2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se lavó la membrana con PBS-T (3 lavados de 10 minutos) y se incubó con el anticuerpo secundario (1:30000, anti IgG de ratón GE Healthcare) en una solución de 0,5% de leche en PBS-T durante una hora. Finalizado el tiempo se lavó de nuevo con PBS-T (3 lavados de 10 minutos) y la proteína de 70 kDa del complejo II se detectó de la manera explicada anteriormente.

4.4.4. Cuantificación de proteínas.

Para cuantificar las proteínas en los homogenados tisulares y en las mitocondrias aisladas se realizó un método espectrofotométrico, llamado método de Bradford, y se usó el espectrofotómetro UV-VIS (Unicam, UV 500 y software Vision32 versión 1.05).

En primer lugar se obtuvo una recta de calibrado a partir de concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA), para ello se prepararon distintas diluciones de una solución de concentración 1 mg/mL de BSA, con agua y reactivo de Bradford (Bio-Rad Protein Assay). Las cantidades añadidas de cada reactivo para la realización de la curva se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4: Reactivos empleados para la realización de la recta de calibrado.

Reactivo	Tubo 0	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6
BSA	0 μL	1 μL	2 μL	3 μL	5 μL	10 μL	15 μL
Agua	800 μL	799 μL	798 μL	797 μL	795 μL	790 μL	785 μL
Bradford	200 μL	200 μL	200 μL	200 μL	200 μL	200 μL	200 μL
$\mu\text{g}/\mu\text{L}$ proteína	0	1	2	3	5	10	15

Para preparar las muestras se mezcló 1 μL de muestra, 200 μL de Bradford y 799 μL de agua, se agitaron con el vórtex y se incubaron 5 minutos. A continuación, se procedió a la lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm.

Una vez obtenidos los valores de absorbancia para cada muestra se extrapolaron en la recta de calibrado para conocer su concentración proteica.

4.5. Purificación de mitocondrias.

4.5.1. Purificación de mitocondrias de células en cultivo.

La extracción y purificación de mitocondrias se realizó partiendo de 7-10 placas de 150 mm al 80% de confluencia, de cada línea celular. Las células se recogieron por tripsinización y se centrifugaron a 2000 x g durante 10 minutos, el *pellet* celular resultante fue lavado 2 veces con PBS frío mediante resuspensión y posterior centrifugación. El *pellet* celular resultante se congeló a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para facilitar la ruptura de las células.

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 al menos 2 minutos para permitir el aumento de volumen celular y así facilitar la ruptura por homogeneización mecánica. La suspensión celular se homogeneizó usando un tubo potter tipo Elvehjem con un émbolo de teflón rotando a una velocidad de 600 rpm. Se realizaron 8-10 pases, para romper las membranas celulares ya tensas debido al aumento de volumen

sufrido. En este punto se tomaron alícuotas de homogenado total. El resto de la muestra se diluyó a la mitad con tampón hipertónico (sacarosa 250 mM, MOPS 30 mM, pH 7,2) y se mezcló bien. A continuación se centrifugó a 1000 x g durante 5 minutos a 4 °C para eliminar núcleos y células no rotas. Se recogió el sobrenadante y se sedimentaron las mitocondrias mediante centrifugación a 10000 x g durante 2 minutos en frío. En este punto se tomaron alícuotas del sobrenadante.

Las mitocondrias se resuspendieron en medio A (sacarosa 0,32 M, EDTA 1 mM, Tris-HCl, 10 mM pH 7,4), se centrifugaron a 10000 x g durante 2 minutos en frío, y finalmente se resuspendieron en medio MAITE (sacarosa 25 mM, sorbitol 75 mM, KCl 100 mM, EDTA-Na 0,05 mM, MgCl₂ 1 mM, Tris-HCl 10 mM pH=7,4 y H₃PO₄ 10 mM, pH=7,4). Tras esto se procedió a la cuantificación de las proteínas (apartado 4.4.4.).

Por último, las muestras se prepararon para realizar los geles de proteínas. A las fracciones de homogenado y sobrenadante se les añadió RIPA 10x (Tris-HCl 0,5 M, pH 7,4, NaCl 1,5 M, ácido deoxicólico 2,5%, NP-40 10%, EDTA 10 mM) a concentración final 1X o 2X y se dividieron en dos tubos eppendorf, a uno de ellos se le añadió inhibidores de proteasas (1x) (Protease Inhibitor Cocktail, SIGMA).

La fracción de mitocondrias se dividió en 3 partes: a una se le añadió RIPA 1x más inhibidores de proteasas, a otra se le añadió RIPA 1x sin inhibidores de proteasas y a la tercera se le añadió TRIzol e inhibidores de proteasas.

4.5.2. Purificación de mitocondrias procedentes de tejidos.

Para la inmunodetección de AOX se realizó la extracción de mitocondrias procedentes de hígado y corazón de ratón.

Para preparar los homogenados tisulares, se procedió al sacrificio del animal por dislocación cervical, extrayéndose los distintos órganos a estudio: pulmón, testículo, timo, bazo, hígado, páncreas y corazón, que se colocaron en tubos tipo falcon de 50 mL que contenían medio A frío y se pesaron. Después se trocearon finamente con unas tijeras y se lavaron varias veces (2-3) con medio A frío para eliminar la mayor cantidad posible de sangre y pelos, filtrando con la ayuda de un colador estéril. A continuación las muestras de tejido fueron transferidas a un homogeneizador tipo Potter-Elvehjem de volumen adecuado con un émbolo de teflón rotando a 600 rpm, utilizando distintas

cantidades de medio A según el tejido y peso del mismo (10 mL de medio A/g de tejido para corazón, y para el resto de tejidos 4 mL/g).

Cada muestra de tejido se homogeneizó realizando varios pases por muestra hasta que se observó un homogenado uniforme, el cual se transfirió a tubos vórtex (de plástico) y se centrifugaron a 1000 x g durante 5 minutos a 4 °C. El sobrenadante resultante fue transferido a 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 en microcentrífuga a 10000 x g durante 2 minutos a 4 °C, se eliminó el sobrenadante, los *pellets* mitocondriales obtenidos se lavaron con medio A juntándolos de dos en dos. Este proceso se repitió hasta tener todas las mitocondrias en un mismo tubo.

Posteriormente, la fracción mitocondrial obtenida se resuspendió en medio MAITE, centrifugando de nuevo a 10000 x g durante 2 minutos a 4 °C, el *pellet* final se resuspendió en tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 50 mM, Tritón X-100 1%, deoxicolato de sodio 0,5%, EDTA 5 mM, esterilizado mediante autoclave). Finalmente, a la fracción mitocondrial obtenida se añadió inhibidores de proteasas (Protease Inhibitor Cocktail, SIGMA) para su conservación, y se almacenaron a -80 °C. La concentración proteica total se cuantificó a través del método Bradford (apartado 4.4.4.).

4.6. Análisis estadístico de los resultados.

En los ensayos de resistencia a rotenona, se realizaron 5 experimentos independientes, por lo que fue necesario realizar un análisis estadístico de los resultados obtenidos para comprobar si existían diferencias significativas. En estos ensayos se incluyeron 2 muestras correspondientes con los genotipos de las líneas celulares (el homocigoto para AOX +/+ y el silvestre -/-) y la significancia estadística se determinó usando el test t-student. Los datos mostrados en los resultados (Figura 22 B) representan el promedio de los 5 experimentos realizados, con sus desviaciones estándar. El intervalo de confianza se estableció en el 95%, por lo que el valor de significancia necesario para descartar que el efecto era debido al azar fue $p < 0,05$. El valor de p se obtuvo mediante el programa GraphPad Software.

5. Resultados

5.1. Ensayos de resistencia a rotenona.

En estudios realizados en el laboratorio Genoxphos con anterioridad se demostró que la presencia de la proteína AOX confería resistencia a fibroblastos en cultivo frente a antimicina y azida de sodio, inhibidores de los complejos III y IV, respectivamente. Para confirmar que la función de la proteína AOX se observa de forma específica a nivel de los complejos III y IV, se propuso la realización de ensayos de citotoxicidad con rotenona. Este compuesto es un inhibidor del complejo I y, por tanto, las células +/+ (2 copias del gen AOX) y -/- (ninguna copia del gen AOX) deberían comportarse de la misma manera en su presencia.

Para la realización de los ensayos de citotoxicidad se utilizaron fibroblastos inmortalizados de ratón provenientes de animales AOX +/+ y -/- (apartado 4.1.), que no tenían ningún tipo de patología mitocondrial. El análisis se llevó a cabo mediante el método del MTT (apartado 4.2.5.), un compuesto que penetra en las células vivas y es reducido por la enzima succinato deshidrogenasa en las mitocondrias dando formazán y desarrollando un color azulado. Tras la incubación con MTT y para la determinación del número de células vivas, se mide la absorbancia a 550 nm, siendo ésta proporcional a la cantidad de células viables. Los datos de absorbancia obtenidos se usaron para la determinación de la dosis letal 50 (LD₅₀), es decir, la concentración de rotenona a la cual el 50% de las células están muertas.

Para los ensayos de citotoxicidad por rotenona se utilizaron las siguientes concentraciones: 1,25 nM, 2,5 nM, 3,75 nM, 5 nM, 7,5 nM, 10 nM, 15 nM, 20 mM y 30 nM. En la Figura 22 A 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 rotenona en las dos líneas celulares analizadas (AOX +/+ y AOX -/-). Tomando en cuenta los resultados obtenidos en 5 experimentos independientes, la LD₅₀ en las células AOX +/+ es 7,114 nM y en las células AOX -/- es 7,167 nM. Como puede observarse en la gráfica (Figura 22 B) no existen diferencias significativas ($p=0,9676$) en el comportamiento de las líneas celulares ante la rotenona. A simple vista, se veía una gradación de color muy similar para las dos líneas en las placas de 96 pocillos

empleadas en el experimento (Figura 23), a diferencia de lo observado previamente para antimicina y azida de sodio.

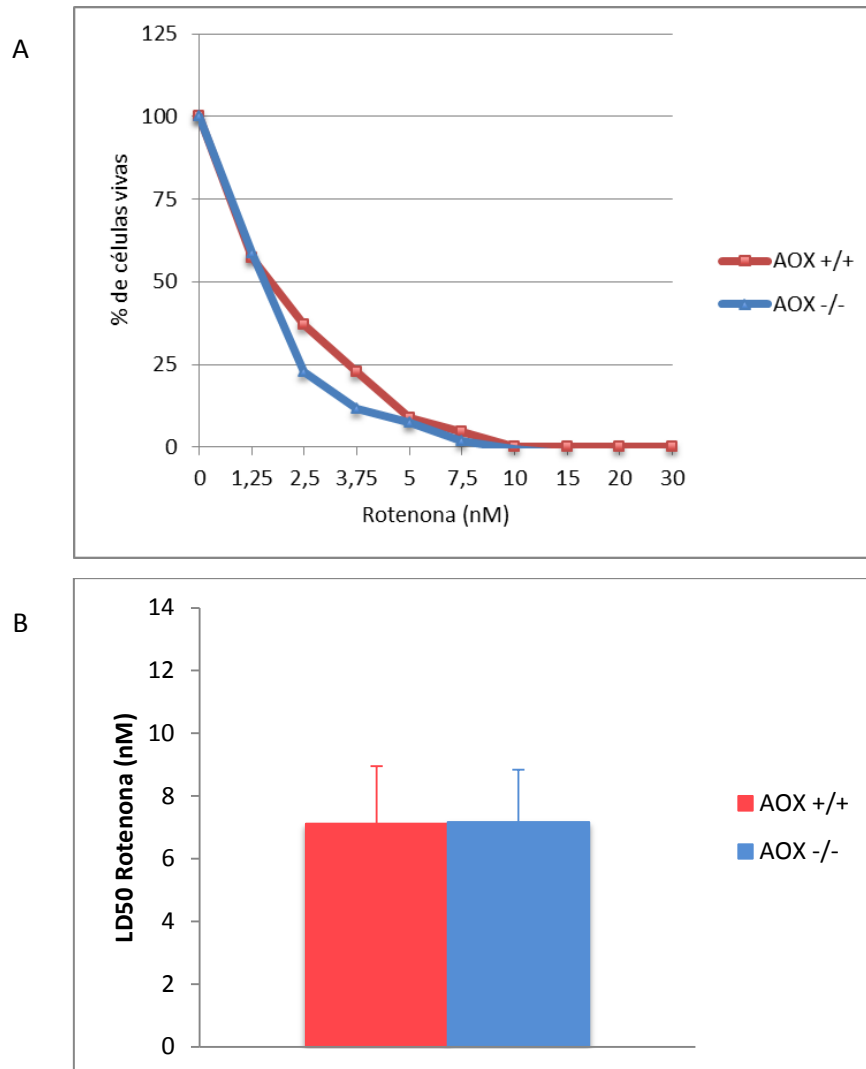


Figura 22: A: Gráfica que representa el porcentaje de células viables frente a la concentración de rotenona, con datos obtenidos en un experimento. B: Gráfico de barras que permite la comparación de la LD₅₀, calculada a partir de 5 experimentos independientes. Las células AOX +/+ se muestran en rojo y las -/- en azul.

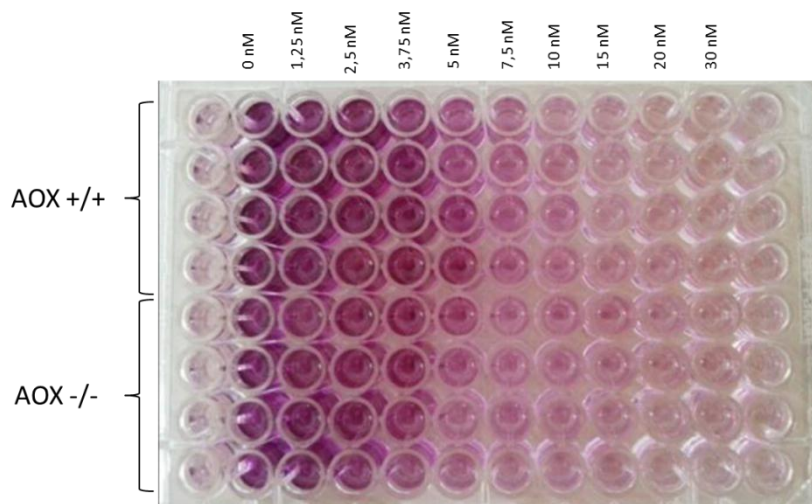


Figura 23: Foto de una de las placas de 96 pocillos empleadas en el ensayo de viabilidad. En morado se observan las células vivas, que han captado el MTT y lo han reducido a formazán. Las no coloreadas son células muertas debido a la acción de la rotenona. Las 4 filas superiores corresponden a las células AOX +/+ y las 4 inferiores a las células AOX -/-.

5.2. Genotipado de las líneas celulares.

Para comprobar que las líneas celulares empleadas en el experimento de resistencia a rotenona eran, en efecto, +/+, +/- y -/-, se extrajo DNA (apartado 4.3.1.) y se llevó a cabo una PCR que detecta la presencia del gen de AOX (Figura 24), descrita en el apartado 4.3.4.

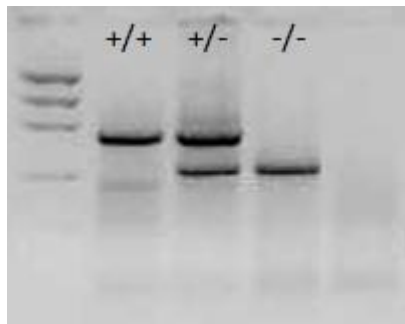


Figura 24: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación de la PCR AOX en la que se usaron los cebadores Rosa-F, Rosa-R2 y AOX-R2, de las muestras de DNA extraídas de las células en cultivo usadas en los experimentos de viabilidad. La banda de 711 pb identifica las células +/+ y la de 466 pb las -/-.

Con esta prueba se confirmó el genotipo de las células empleadas en el experimento de resistencia a rotenona.

5.3. Genotipado de los ratones.

Con el fin de estudiar el papel de AOX en un modelo animal, se dispone de ratones con las variantes génicas *knock-in* AOX, *knock-out* COX10 y ACTA-Cre específica de músculo. Las distintas líneas de ratón utilizadas en este estudio se encuentran estabuladas en el animalario del CIBA y existen ratones con todas las combinaciones

posibles de genotipos. Cuando los ratones son suficientemente mayores se cruzan entre ellos para obtener crías con el genotipo deseado. Para saber qué genotipo tiene cada ratón y así diseñar los cruces se llevaron a cabo las PCR descritas en el apartado 4.3.4., previa extracción del DNA explicada en el apartado 4.3.2. Esto se realizó de manera rutinaria durante todo el año, cada vez que nacía una nueva camada. Figuras 25-27.

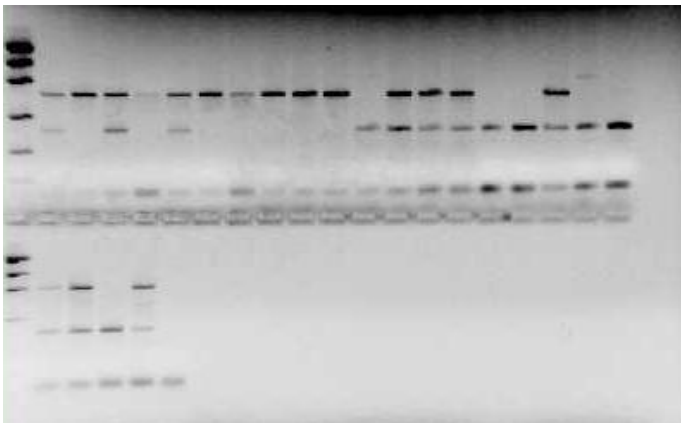


Figura 25: Imagen de un ejemplo de electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación de la PCR AOX, en la que se usaron los cebadores: 027, 061, 028 y 15901. La banda de 593 pb identifica ratones *knock-in* AOX que conservan el casete STOP, la banda de 293 pb identifica ratones AOX $-/-$.

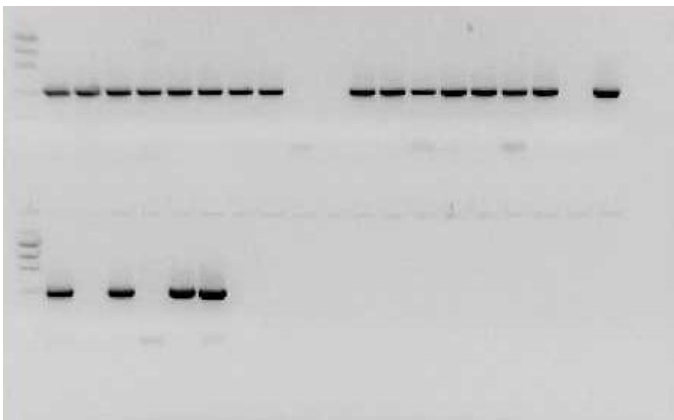


Figura 26: Imagen de un ejemplo de electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación de la PCR ACTA, en la que se usaron los cebadores Acta-Cre-R y Acta-Cre-F, de las muestras de DNA procedentes de los ratones. La banda de 400 pb indica que tiene el gen ACTA-Cre específica de músculo.

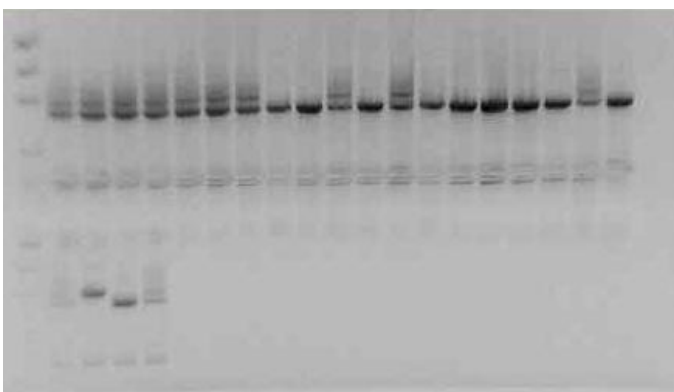


Figura 27: Imagen de un ejemplo de electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación de la PCR COX10, en la que se usaron los cebadores COX10-R y COX10-F de las muestras de DNA de los ratones. La banda de 708 pb indica el alelo silvestre y la de 838 pb el gen floxeado.

5.4. Expresión de la proteína AOX en pulmón, testículo, timo, bazo, y páncreas en ratones *knock-in* AOX.

En trabajos anteriores se hicieron estudios de inmunodetección de proteínas para comprobar la expresión de AOX en distintos tejidos procedentes de los ratones *knock-in* AOX. Para completar el estudio de la expresión de AOX en los ratones, se realizaron ensayos de inmunodetección de la proteína en mitocondrias purificadas (apartado 4.5.2.) de otros tejidos no analizados previamente: pulmón, testículo, timo, bazo y páncreas. En todos los casos, en una de las calles se cargó un control procedente de células C57-AOX, que sobreexpresan la proteína AOX. Además, de cada western blot se realizó un control (complejo II, subunidad de 70 kDa) para comprobar que se había cargado la misma cantidad de proteína en todos los pocillos.

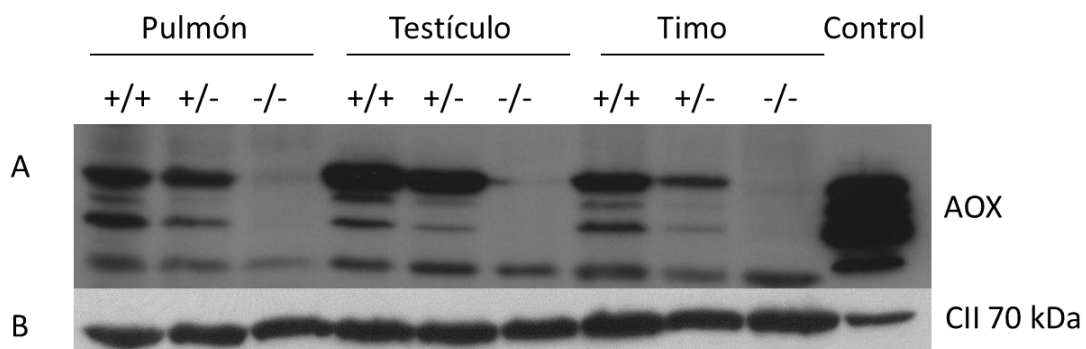


Figura 28: Western blot de muestras de pulmón, testículo y timo. En cada pocillo se cargaron 200 μ g de la fracción mitocondrial correspondiente. A: Proteína AOX. B: Control del complejo II (70 kDa), para comprobar la cantidad de proteína cargada.

En los tres tejidos se observa que la señal correspondiente a la proteína AOX es más intensa en los ratones +/+, menos intensa en los +/- e inexistente en los -/-, que son los ratones de genotipo silvestre, como cabría esperar. En la muestra de testículo, la expresión de AOX es mayor que en los otros dos tejidos (Figura 28), esto se comprobó por normalización por complejo II, usando el programa Image J, que calcula la densidad de las bandas.

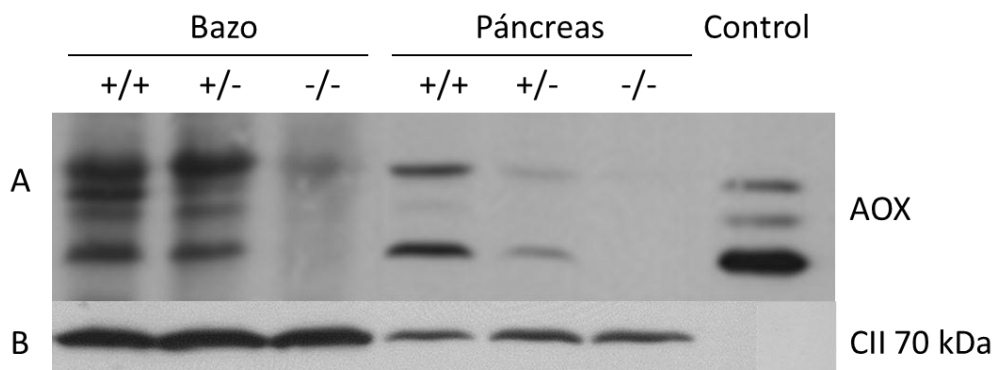


Figura 29: Western blot de los tejidos bazo y páncreas. Se cargaron 200 μ g de la fracción mitocondrial. A: Proteína AOX. B: Western blot control. Complejo II (70 kDa).

Al igual que en los tejidos anteriores, en las muestras de bazo y páncreas hay mayor expresión de AOX en los ratones +/+, menor en +/- e inexistente en -/- (Figura 29). Normalizando con respecto al complejo II se observa que la expresión en el caso de los ratones +/+ es mayor para páncreas, sin embargo, en el caso de los +/- es mayor para bazo. Esto puede deberse a una cuantificación errónea de las muestras de páncreas por el método de Bradford.

5.5. Diferencias en la expresión de AOX entre machos y hembras *knock-in* AOX.

Con el fin de averiguar si la expresión de AOX depende de factores hormonales se realizaron western blot de muestras de mitocondrias purificadas (apartado 4.5.2.) de hígado y corazón de ratones machos y hembras *knock-in* AOX.

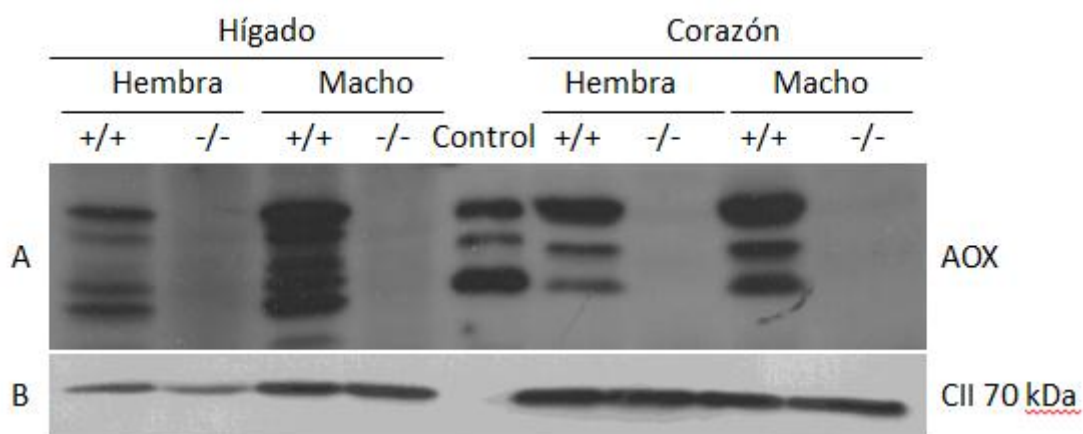


Figura 30: Western blot de las muestras de hígado y corazón extraídas de ratones machos y hembras. Se cargaron 100 μ g de la fracción mitocondrial. A: Proteína AOX. B: Western blot control complejo II (70 kDa).

Como se observa en la Figura 30 existe una expresión mayor de la proteína AOX en las muestras de machos en comparación con las hembras *knock-in* AOX.

5.6. Degradación de la proteína AOX.

Al realizar los western blot de las distintas muestras de tejidos y células se observó que casi siempre aparecían tres bandas para la proteína AOX. La banda de arriba se sabe que es la proteína intacta ya que corresponde con el peso molecular de la misma, sin embargo, se desconoce a qué formas de la proteína pertenecen las otras 2 bandas. En una primera hipótesis se pensó que una de estas dos bandas podría corresponder a la forma de la proteína que se encuentra en la mitocondria, después de perder el péptido señal que permitiría su importe. La otra podría corresponder a una forma de la proteína degradada por proteasas de la mitocondria. Para intentar averiguarlo se realizaron varios experimentos.

En el primer ensayo se intentó comprobar si los inhibidores de proteasas tenían algún efecto sobre la degradación. Para ello se emplearon las muestras de homogenado (Hom), sobrenadante (Sn) y mitocondrias (Mit) extraídas durante el proceso de purificación de mitocondrias (apartado 4.5.1.) obtenidas a partir de fibroblastos de ratón AOX +/+. También se utilizaron muestras de proteína total de células C57-AOX, extraídas con RIPA.

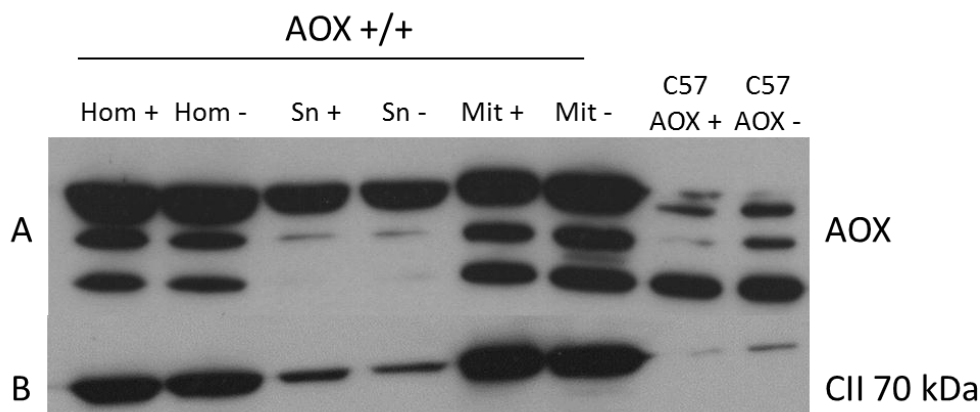


Figura 31: Western blot de las muestras de homogenado, sobrenadante y mitocondrias procedentes de fibroblastos AOX +/+ y proteína total de células C57-AOX extraídas con RIPA. Los signos + y - hacen referencia a la presencia o ausencia de inhibidores de proteasas.

Como se puede observar en la Figura 31 no hay un efecto notable con el uso de inhibidores de proteasas. Excepto en la muestra C57-AOX, la segunda banda es menos intensa en la muestra tratada con inhibidores, lo que sugiere que puede ser resultado de degradación por proteasas.

Con el fin de encontrar un método alternativo de extracción que pueda ser más eficiente a la hora de inhibir posibles proteasas se cargaron muestras de proteína total de células C57-AOX lisadas utilizando RIPA o TRIzol. A las muestras se les añadió o no inhibidores de proteasas para estudiar si pueden detener la acción de estas enzimas.

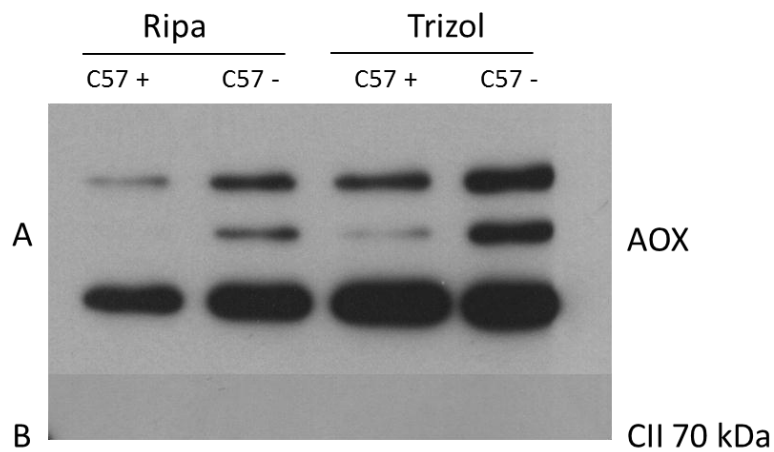


Figura 32: Western blot de las muestras de mitocondrias extraídas de células C57-AOX con RIPA o con TRIzol. Los signos + y - hacen referencia a la presencia o ausencia de inhibidores de proteasas. En el control del complejo II no se observan bandas probablemente porque la cantidad de proteína cargada es muy pequeña.

Como se puede observar en la Figura 32, las bandas de las muestras que no llevan inhibidores de proteasas son más intensas. La segunda banda, al igual que en la Figura 31, es más intensa en la muestra que no está tratada con inhibidores de proteasas. Además, no se observan grandes diferencias entre ambos procesos de extracción.

Para tratar de esclarecer los resultados obtenidos en el western blot de la Figura 31 se extrajeron nuevas muestras de homogenado, sobrenadante y mitocondrias de células C57-AOX y AOX +/+, en este caso, la fracción de sobrenadante se centrifugó 2 veces con el fin de obtener una segunda fracción mitocondrial correspondiente a mitocondrias con menor densidad (fracción Mit 2).

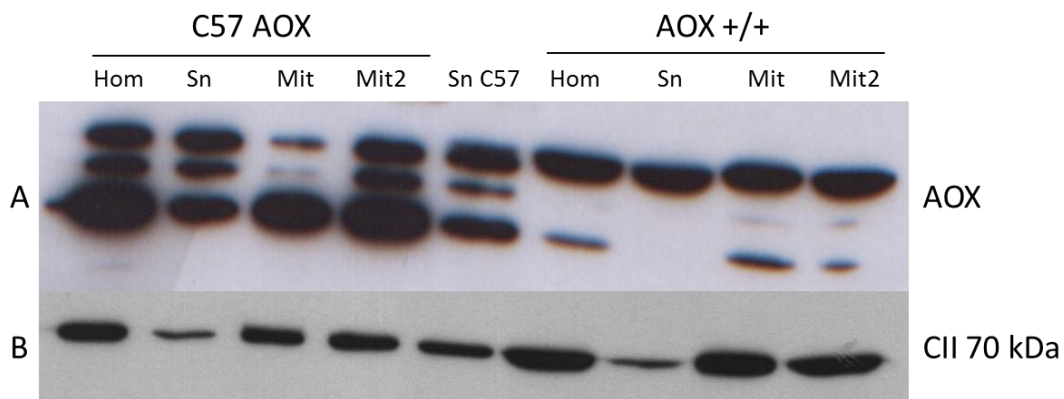


Figura 33: Western blot de las muestras de homogenado, sobrenadante y mitocondrias extraídas de células AOX +/+ y C57-AOX. La muestra llamada Mit 2 corresponde a una muestra más ligera de mitocondrias obtenida de una segunda centrifugación.

Como se puede observar en la Figura 33, la banda de menor tamaño de las muestras de C57-AOX es proporcionalmente más intensa en ambas fracciones mitocondriales. Este resultado sugiere que la hipótesis del procesamiento podría ser válida.

El siguiente ensayo se diseñó para comprobar si las proteasas degradaban la proteína AOX. Se utilizaron las muestras de sobrenadante que debería contener solo la proteína AOX de la fracción citosólica ya que las mitocondrias han sido sedimentadas y no están en esta fracción. Las muestras de sobrenadante se incubaron con mitocondrias extraídas de células C57 control (sin AOX), a 37 °C a diferentes tiempos, temperatura a la que actúan las proteasas. Con este ensayo se pretendía comprobar si las proteasas mitocondriales y lisosomales que copurifican en la misma fracción, degradan la proteína AOX de la muestra de sobrenadante (mayoritariamente la banda superior) para formar parte de las 2 bandas inferiores.

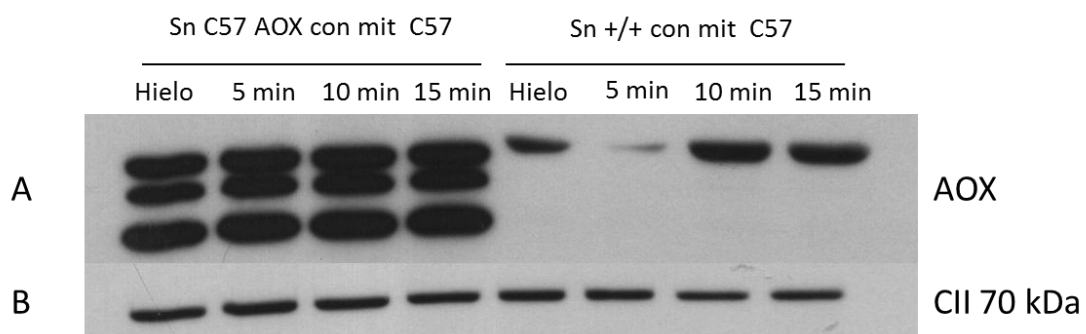


Figura 34: Western blot de las muestras de sobrenadante de células C57-AOX y AOX +/+, incubadas junto con mitocondrias -/- e incubadas en hielo y a 37 °C a diferentes tiempos.

El resultado obtenido se muestra en la Figura 34, no se observa ningún efecto al incubar muestras de sobrenadante con mitocondrias -/- procedentes de células C57, quizá porque la cantidad usada de mitocondrias era baja en proporción con la fracción de sobrenadante, y porque además las muestras se lisaron con RIPA concentrado 2X, lo que ayudaría a inhibir a las posibles proteasas.

Se decidió repetir el ensayo anterior, esta vez con mitocondrias obtenidas de hígado procedente de ratón AOX +/+, en una mayor proporción con respecto al sobrenadante.

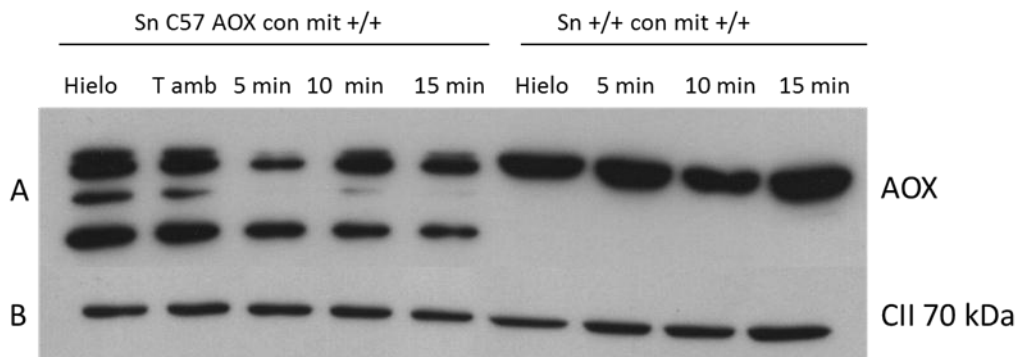


Figura 35: En las 5 primeras calles se cargó una mezcla de sobrenadante de células C57 y mitocondrias +/+ de hígado, incubadas a 37 °C a diferentes tiempos. En las 4 últimas calles se hizo lo mismo pero con sobrenadante de células AOX +/+.

El resultado se muestra en la Figura 35, en las cinco primeras calles (sobrenadante C57-AOX) se observa una degradación de todas las bandas y en mayor medida de la banda intermedia a 37 °C, temperatura a la que actúan las proteasas, al incubar las muestras de sobrenadante con mitocondrias +/+ de hígado. En las calles de la derecha que corresponden a sobrenadante de células AOX +/+ no se detecta ningún efecto de la incubación, quizás porque la fracción mitocondrial de hígado de ratón AOX +/+ estaba aún diluida, y por tanto, las posibles proteasas presentes también.

6. Discusión

Ensayos de resistencia a rotenona en células en cultivo.

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 [40].

En estudios más recientes, se probó la resistencia de fibroblastos embrionarios de ratón frente a inhibidores de los complejos III y IV. En presencia de antimicina, un inhibidor del complejo III, se vio que las células AOX +/+ conseguían sobrevivir en concentraciones más altas de esta droga que las AOX -/-. Lo mismo se observó en el caso de un inhibidor del complejo IV, en este caso, azida de sodio. En ambos experimentos se obtuvo una LD₅₀ superior para las células que tenían AOX que para las que no lo tenían.

Como AOX recibe los electrones del ubiquinol, que se forma por la transferencia de electrones desde los complejos I y II, un inhibidor del complejo I va a afectar por igual a células que tengan AOX, como a las que no lo tengan.

En este ensayo se observó que, como se esperaba, la rotenona afectaba por igual a las células +/+ que a las -/-, confirmando que la función de AOX es efectiva para subsanar fallos en los complejos III y IV, pero no para aquellos que afecten a los complejos I y II (Figura 22).

Expresión de AOX en distintos tejidos del ratón *knock-in* para AOX.

Con el fin de continuar analizando la expresión de la proteína AOX en los ratones *knock-in* para AOX, se realizaron experimentos de inmunodetección de dicha proteína en distintos tejidos obtenidos de ratones que expresaban AOX.

AOX se expresa en todos los tejidos de ratón analizados, con una mayor expresión en aquellos que requieren un mayor requerimiento energético. Esto se puede deber a que estos tejidos tienen una mayor masa mitocondrial.

Expresión de AOX en machos y hembras del ratón *knock-in* para AOX.

En ensayos anteriores se había estudiado la expresión de AOX en ratones adultos en distintos tejidos, y se había comparado la expresión entre adultos y crías, viendo que en crías la proteína AOX tenía un mayor nivel de expresión. Para seguir con la caracterización del ratón *knock-in* para AOX se decidió comprobar si existía alguna diferencia en la expresión de la proteína entre ratones machos y hembras.

Para comparar la expresión de AOX en ratones machos y hembras se usaron mitocondrias extraídas de hígado y corazón, y se observó que la proteína se expresaba en ambos, dando las tres bandas típicas de AOX. Sin embargo, en hígado se observan más bandas lo que se puede ser debido probablemente a la degradación de la proteína llevada a cabo por las enzimas presentes en este tejido.

En ambos casos, vemos una mayor expresión de AOX en machos que en hembras. Una de las hipótesis que se barajaban para explicar este hecho era una posible regulación hormonal del promotor Rosa26, aunque no se han encontrado referencias bibliográficas al respecto. Estos resultados pueden tener relevancia a la hora de ver un posible efecto terapéutico de AOX ya que quizás cabría esperar que fuera más notable en los machos.

Degradación de la proteína AOX.

En los ensayos de inmunodetección de la proteína AOX realizados en el grupo Genoxphos se observan en todos ellos 3 bandas. La banda de arriba se sabe que corresponde a la proteína sintetizada por los ribosomas en el citosol. Para explicar la naturaleza de las bandas de menor peso molecular se pensó que podían ser resultado del procesamiento de la proteína para ser importada a la mitocondria o de la degradación por enzimas inespecíficas. Pero se observó que la proporción de las bandas inferiores no era siempre la misma en los distintos tejidos, ni en las muestras de un mismo tejido procedentes de distintos ratones y extraídas en diferentes días, ni en una misma muestra de mitocondrias después de estar un tiempo almacenada a -80 °C y ser congelada y descongelada más de una vez. Además, otros grupos obtenían una única banda (la superior) en ensayos de inmunodetección de AOX [41]. Todo esto sugería una degradación por enzimas liberadas durante el proceso de extracción.

Para tratar de averiguar a qué formas de la proteína correspondían las bandas inferiores se realizaron diferentes ensayos de inmunodetección de AOX, de muestras de células C57-AOX y de fibroblastos de ratón AOX +/+.

En el primer ensayo (Figura 31) se probó el efecto de inhibidores de proteasas en las distintas fracciones obtenidas durante el proceso de extracción de las mitocondrias de fibroblastos de ratón AOX (apartado 4.5.1.). La fracción de homogenado contiene todas las formas en que AOX se encuentra en la célula: la citosólica y la mitocondrial. La banda superior, como ya se ha dicho, corresponde a la forma citosólica y las dos inferiores podrían corresponder a productos de degradación o a la forma procesada y un producto de proteólisis. También se barajó la hipótesis de que AOX sufriera un doble procesamiento para entrar a la mitocondria. Sin embargo, no se observa un efecto claro en el uso de los inhibidores de proteasas, lo que podría significar que ambas bandas no son producto de la degradación o que son sustrato de proteasas no inhibibles por los cócteles comerciales.

La fracción de sobrenadante solo contiene la forma de AOX citosólica que, al ser la banda más intensa, concuerda con la teoría de que en el citosol se encuentra la forma de la proteína sin procesar. La presencia de la banda de peso intermedio, aunque sea muy tenue, podría indicar que ésta banda corresponde a un producto de degradación de AOX y la banda de menor tamaño, a la forma procesada. Sin embargo, no se puede concluir del todo esta afirmación, ya que en esta fracción las proteasas son mucho menos abundantes.

En la fracción mitocondrial esperaríamos ver solo la forma de la proteína AOX procesada, pero observamos las tres bandas, en un patrón muy similar al obtenido para la muestra de homogenado, aunque la banda de peso inferior parece ser más intensa en la fracción mitocondrial que en la de homogenado. En esta fracción se concentran la mayor cantidad de proteasas, ya que junto con las mitocondrias copurifican los lisosomas, que tienen una gran actividad enzimática. A la vista de estos resultados no se puede descartar ninguna hipótesis.

En las dos calles de células C57-AOX, que corresponden a proteína total, sí se observa un efecto en la acción de los inhibidores de proteasas en la banda intermedia, lo que podría sugerir que ésta es resultado de proteólisis.

Para tratar de encontrar un proceso de extracción que minimizara la acción de proteasas se lisaron células C57-AOX con RIPA y con TRizol y se observó que la segunda banda era mucho más tenue si se usaban inhibidores de proteasas (Figura 32), llegando casi a desaparecer en el caso de las células lisadas con RIPA. Esto, de nuevo, parece indicar el origen proteolítico de la segunda banda. También se observó que no había diferencias significativas en el uso de RIPA o TRizol.

Para tratar de esclarecer los resultados de la Figura 31, se extrajeron mitocondrias de células C57-AOX y fibroblastos AOX +/+ y se guardaron fracciones de homogenado y sobrenadante, como en el caso anterior. En el caso de las células C57-AOX (Figura 33) se observa que la banda inferior es mucho más intensa en las fracciones mitocondriales, lo que refuerza la hipótesis de que sea resultado del procesamiento para su importe a la mitocondria. Además, en las muestras de fibroblastos, esta banda también se observa en ambas fracciones mitocondriales y no en el sobrenadante. Hay que destacar que todas las bandas son más intensas en el caso de las células C57-AOX, ya que éstas sobreexpresan AOX.

Aunque la hipótesis del procesamiento había cobrado fuerza en el último ensayo no se podía descartar la hipótesis de la degradación de la proteína por proteasas inespecíficas.

Para comprobar si las bandas inferiores eran resultado de la degradación de la proteína por las enzimas presentes en la fracción mitocondrial durante el proceso de extracción, se planteó la realización de un ensayo que consistía en mezclar sobrenadante de células C57-AOX o fibroblastos AOX +/+ con mitocondrias extraídas de células C57 silvestres (Figura 34). Sin embargo, las cantidades usadas para la realización de los ensayos no fueron las adecuadas y no se observó ningún efecto. En este punto la cantidad de muestra era insuficiente para realizar otro western blot. Debido a la falta de tiempo, ya que el proceso de extracción de mitocondrias de células en cultivo requiere de varios días, se decidió realizar el mismo ensayo con mitocondrias de hígado de ratón AOX +/+ (Figura 35), muestra que se encontraba disponible en el laboratorio. Aunque en esta fracción se espera encontrar la forma AOX mitocondrial, la cantidad de mitocondrias era muy pequeña con respecto a la de sobrenadante y se decidió probar así. En las muestras de sobrenadante de C57-AOX se

observa que, a 37 °C, temperatura a la que las proteasas se encuentran activas, la banda superior desaparece y también en menor medida las de inferior tamaño, reforzando en este caso la hipótesis de la degradación.

A la vista de los resultados no podemos descartar ninguna hipótesis y se debe seguir trabajando en esta línea para tratar de encontrar un proceso de extracción y fraccionamiento que disminuya la proteólisis y clarifique esta cuestión.

7. Conclusiones.

Como resultado de los ensayos de inmunodetección de AOX se puede concluir que:

- En el ratón *knock-in* AOX, la proteína AOX se expresa en todos los tejidos analizados en este estudio, con una mayor presencia en aquellos que requieren de un mayor aporte energético.
- En el ratón *knock-in* AOX, la expresión de AOX es mayor en ratones machos que en hembras, diferencia que no podemos explicar con los datos que contamos hasta ahora.
- No hay evidencias claras que demuestren que en el ratón *knock-in* AOX la proteína AOX sufre el procesamiento del péptido señal en su importe a la mitocondria.
- Las bandas de menor tamaño observadas en los ensayos de inmunodetección podrían ser consecuencia de la degradación no específica de la proteína por parte de proteasas, durante el proceso de extracción.

Los ensayos de viabilidad con rotenona demostraron que:

- Cuando la cadena de transporte de electrones se encuentra bloqueada en el complejo I, AOX no ejerce ningún efecto sobre el transporte de electrones; al contrario de lo que sucedía con los complejos III y IV, validando por tanto la relevancia funcional de esta proteína.

8. Bibliografía

1. Lehninger. Principios de Bioquímica. David L. Nelson, Michael M. Cox. Omega. Quinta edición. 2009.
2. Cooper. La célula. Geoffrey M. Cooper, Robert E. Hausman. Marbán. Quinta edición. 2011.
3. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981 Apr 9;290(5806):457-65.
4. Enríquez JA, Martínez-Azorín F, Garesse R, López-Pérez MJ, Pérez-Martos A, Bornstein B, Montoya J. Sistema genético mitocondrial humano. *Rev Neurol*. 1998;26(1):S21-6.
5. Kasamatsu H, Vinograd J. Replication of circular DNA in eukaryotic cells. *Annual Review of Biochemistry*. 1974;43(0):695-719.
6. Campos Y, Pineda M, García Silva MT, Montoya J, Andreu A. Protocolo para el diagnóstico de las enfermedades mitocondriales. *Acta pediátrica española* 64, S24-S48, 2006.
7. Sagan L. On the origin of mitosing cells. *Journal of Theoretical Biology*. 1967;14(3):255-74.
8. Schatz G. Getting mitochondria to center stage. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2013;434(3):407-10.
9. Scarpulla RC, Vega RB, Kelly DP. Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2012;23(9):459-66.
10. Wallace DC, Fan W. Energetics, epigenetics, mitochondrial genetics. *Mitochondrion*. 2010;10(1):12-31.
11. Attardi G, Schatz G. Biogenesis of mitochondria. *Annual Review of Cell and Developmental Biol*. 1988;4:289-333.
12. Taylor SW, Fahy E, Zhang B, Glenn GM, Warnock DE, Wiley S, et al. Characterization of the human heart mitochondrial proteome. *Nature Biotechnology*. 2003;21(3):281-6.
13. Lill R, Kispal G. Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends in Biochemical Science*. 2000;25(8):352-6.
14. Newmeyer DD, Ferguson-Miller S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell*. 2003;112(4):481-90.
15. Rustin P, Jacobs HT. Respiratory chain alternative enzymes as tools to better understand and counteract respiratory chain deficiencies in human cells and animals. *Physiology Plant*. 2009;137(4):362-70.
16. Chaudhuri M, Ott RD, Hill GC. Trypanosome alternative oxidase: from molecule to function. *Trends in Parasitology*. 2006;22(10):484-91.

17. McDonald AE, Vanlerberghe GC, Staples JF. Alternative oxidase in animals: unique characteristics and taxonomic distribution. *Journal of Experimental Biology*. 2009;212(16):2627-34.
18. Vanlerberghe GC. Alternative Oxidase: A Mitochondrial Respiratory Pathway to Maintain Metabolic and Signaling Homeostasis during Abiotic and Biotic Stress in Plants. *International Journal of Molecular Science*. 2013;14(4):6805-47.
19. Juszczuk IM, Rychter AM. Alternative oxidase in higher plants. *Acta Biochimica Polonica*. 2003;50(4):1257-71.
20. Wallace DC¹, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM, Elsas LJ 2nd, Nikoskelainen EK. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science*. 1988 Dec 9;242(4884):1427-30.
21. Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature*. 1988 Feb 25;331(6158):717-9.
22. Gerbitz KD, Jaksch M. Mitochondrial DNA, aging and sudden infant death syndrome. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*. 1994 Jun;32(6):487-8.
23. Brandon MC, Lott MT, Nguyen KC, Spolim S, Navathe SB, Baldi P, et al. MITOMAP: a human mitochondrial genome database-2004 update. *Nucleic Acids Research*. 2005;33(Database issue):D611-3.
24. Montoya J. Biogénesis y patología mitocondrial. *Rev. Real Academia de Ciencias*. 2005;60:7-28.
25. Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nature Reviews Genetics*. 2005;6(5):389-402.
26. Jacobs HT. Disorders of mitochondrial protein synthesis. *Human Molecular Genetics*. 2003 Oct 15;12 Spec No 2:R293-301.
27. Viscomi C¹, Bottani E, Civiletto G, Cerutti R, Moggio M, Fagiolari G, Schon EA, Lamperti C, Zeviani M. In vivo correction of COX deficiency by activation of the AMPK/PGC-1 α axis. *Cell Metabolism*. 2011 Jul 6;14(1):80-90. doi: 10.1016/j.cmet.2011.04.011
28. Schon EA¹, DiMauro S, Hirano M, Gilkerson RW. Therapeutic prospects for mitochondrial disease. *Trends in Molecular Medicine*. 2010 Jun;16(6):268-76. doi: 10.1016/j.molmed.2010.04.007.
29. Mitomap
30. Diaz F¹, Thomas CK, Garcia S, Hernandez D, Moraes CT. Mice lacking COX10 in skeletal muscle recapitulate the phenotype of progressive mitochondrial myopathies associated with cytochrome c oxidase deficiency. *Human Molecular Genetics*. 2005 Sep 15;14(18):2737-48. Epub 2005 Aug 15.
31. 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.

32. Inoue K1, Nakada K, Ogura A, Isobe K, Goto Y, Nonaka I, Hayashi JI. Generation of mice with mitochondrial dysfunction by introducing mouse mtDNA carrying a deletion into zygotes. *Nature Genetics*. 2000 Oct;26(2):176-81
33. Fan W1, Waymire KG, Narula N, Li P, Rocher C, Coskun PE, Vannan MA, Narula J, Macgregor GR, Wallace DC. A mouse model of mitochondrial disease reveals germline selection against severe mtDNA mutations. *Science*. 2008 Feb 15;319(5865):958-62. doi: 10.1126/science.1147786.
34. Kasahara A1, Ishikawa K, Yamaoka M, Ito M, Watanabe N, Akimoto M, Sato A, Nakada K, Endo H, Suda Y, Aizawa S, Hayashi J. Generation of trans-mitochondrial mice carrying homoplasmic mtDNAs with a missense mutation in a structural gene using ES cells. *Human Molecular Genetics*. 2006 Mar 15;15(6):871-81. Epub 2006 Jan 31
35. Comi GP1, Strazzer S, Galbiati S, Bresolin N. Cytochrome c oxidase deficiency. *International Review of Neurobiology*. 2002;53:205-40
36. Darin N, Moslemi AR, Lebon S, Rustin P, Holme E, Oldfors A, Tulinius M. Genotypes and clinical phenotypes in children with cytochrome-c oxidase deficiency. *Neuropediatrics*. 2003 Dec;34(6):311-7.
37. Hakkaart GA, Dassa EP, Jacobs HT, Rustin P. Allotopic expression of a mitochondrial alternative oxidase confers cyanide resistance to human cell respiration. *EMBO Reports*. 2006;7(3):341-5.
38. Fernandez-Ayala DJ, Sanz A, Vartiainen S, Kempainen KK, Babusiak M, Mustalahti E, Costa R, et al. Expression of the *Ciona intestinalis* alternative oxidase (AOX) in *Drosophila* complements defects in mitochondrial oxidative phosphorylation. *Cell Metabolism*. 2009;9(5):449-60.
39. Perales-Clemente E, Bayona-Bafaluy MP, Pérez-Martos A, Barrientos A, Fernández-Silva P, Enriquez JA. Restoration of electron transport without proton pumping in mammalian mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Science U S A*. 2008 Dec 2;105(48):18735-9. doi: 10.1073/pnas.0810518105. Epub 2008 Nov 19.
40. Dassa EP, Dufour E, Gonçalves S, Paupe V, Hakkaart GA, Jacobs HT, Rustin P. Expression of the alternative oxidase complements cytochrome c oxidase deficiency in human cells. *EMBO Mol Med*. 2009 Apr;1(1):30-6
41. El-Khoury R, Dufour E, Rak M, Ramanantsoa N, Grandchamp N, Csaba Z, Duvillié B, Bénit P, Gallego J, Gressens P, Sarkis C, Jacobs HT, Rustin P. Alternative oxidase expression in the mouse enables bypassing cytochrome c oxidase blockade and limits mitochondrial ROS overproduction. *PLoS Genetics*. 2013;9(1):e1003182. doi: 10.1371/journal.pgen.1003182. Epub 2013 Jan 3