



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



TRABAJO FIN DE MÁSTER

Diagnóstico de enfermedades mitocondriales: Nuevas mutaciones del mtDNA y su caracterización patológica

Diagnosis of mitochondrial disease: New mtDNA mutations and their pathological characterization

Autora:

HORNA TERRÓN, ELENA

Directores:

LÓPEZ GALLARDO, ESTER

MONTOYA VILLARROYA, JULIO

Grupo de Biogénesis y Patología Mitocondrial

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Facultad de Veterinaria

2015/2016

ÍNDICE

ABREVIATURAS	3
1. RESUMEN	5
2. INTRODUCCIÓN	7
2.1. LA MITOCONDRIA. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN.....	7
2.2. GENÉTICA DEL DNA MITOCONDRIAL.....	8
2.3. SISTEMA DE FOSFORILACIÓN OXIDATIVA.....	9
2.3.1. Citocromo C oxidasa o complejo IV del sistema OXPHOS.....	11
2.4. ENFERMEDADES MITOCONDRIALES.....	12
2.4.1. Deficiencia de citocromo C oxidasa o complejo IV del sistema OXPHOS.	13
2.5. MODELOS DE ESTUDIO DE ENFERMEDADES MITOCONDRIALES: CÍBRIDOS TRANSMITOCONDRIALES.....	14
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	16
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
4.1. CULTIVOS CELULARES	17
4.1.1. Líneas celulares, materiales y equipos empleados	17
4.1.2. Mantenimiento de los cultivos celulares	18
4.1.3. Tripsinización de los cultivos celulares.....	18
4.1.4. Recuento celular	18
4.1.5. Congelación y descongelación de células.....	19
4.1.6. Construcción de cíbridos transmitocondriales A549 2446	20
4.1.7. Generación de clones de los cíbridos A549 2446.....	22
4.1.8. Dilución al límite	22
4.2. ANÁLISIS DEL mtDNA	24
4.2.1. Materiales y equipos empleados.....	24
4.2.2. Extracción de DNA de lisados celulares.....	24
4.2.3. Cuantificación de DNA.....	25
4.2.4. RFLP-PCR.....	25
4.2.5. Cuantificación del número de copias de mtDNA	28
4.3. ANÁLISIS PROTEICO POR WESTERN BLOT	29

4.3.1.	Materiales y equipos empleados	29
4.3.2.	Extracción y fraccionamiento de lisados celulares totales.....	30
4.3.3.	Cuantificación de proteínas totales por espectrofotometría (Método de Bradford)	31
4.3.4.	Separación de las proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.....	31
4.3.5.	Inmunodetección de las proteínas.....	32
4.4.	DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS	33
4.4.1.	Materiales y equipos empleados.....	33
4.4.2.	Determinación de la actividad enzimática y cantidad del complejo respiratorio IV.....	33
4.4.3.	Medida de la actividad de la Citocromo C oxidasa.....	34
4.5.	ANÁLISIS DE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL.....	35
4.5.1.	Materiales y equipos empleados.....	35
4.5.2.	Medida del consumo de oxígeno de la cadena respiratoria de los cíbridos A549 2446	35
5.	RESULTADOS.....	37
5.1.	CASO CLÍNICO	37
5.2.	PRUEBAS BIOQUÍMICAS.....	37
5.3.	ESTUDIO GENÉTICO	38
5.4.	CONSTRUCCIÓN DE CÍBRIDOS Y COMPROBACIÓN DEL NIVEL DE mtDNA MUTANTE.....	42
5.5.	DISMINUCIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS DE mtDNA Y SELECCIÓN DE LOS CLONES.....	44
5.6.	CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS DE mtDNA.....	46
5.7.	CUANTIFICACIÓN DE LA CANTIDAD DE COX POR WESTERN BLOT.....	47
5.8.	ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD Y CANTIDAD DE COX.....	48
5.9.	MEDIDA DEL CONSUMO DE OXÍGENO	50
6.	DISCUSIÓN	53
7.	CONCLUSIONES.....	57
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

ABREVIATURAS

A	Adenina
ATP	Adenosina trifosfato
bp	Pares de bases
BSA	Albúmina sérica bovina
C	Citosina
CO₂	Dióxido de carbono
CoQ	Coenzima Q
COX	Citocromo C oxidasa
COX1	Subunidad 1 de la citocromo C oxidasa
COX2	Subunidad 2 de la citocromo C oxidasa
COX3	Subunidad 3 de la citocromo C oxidasa
CS	Citrato sintasa
CsCl	Cloruro de cesio
cyt C	Citocromo C
CYTB	Citocromo B
Da	Dalton
DMEM	Medio Eagle modificado por Dubelcco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
DTNB	5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoico
E	Ácido glutámico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EtBr	Bromuro de etidio
FADH₂	Flavín adenín dinucleótido
FAM	6-carboxifluoresceína
FBS	Suero fetal bovino
FCCP	Carbonilcianida-4-(trifluorometoxi)fenilhidrazona
G	Guanina

H	<i>Heavy chain</i> (cadena pesada del material genético mitocondrial)
H₂O	Agua
HCl	Ácido clorhídrico
K	Aminoácido lisina
KCl	Cloruro de potasio
KCN	Cianuro de potasio
L	<i>Light chain</i> (cadena ligera del material genético mitocondrial)
MgCl₂	Cloruro de magnesio
MT-CO2	Gen de la subunidad 2 de la citocromo C oxidasa codificado en la mitocondria
mtDNA	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
N₂	Nitrógeno
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
nDNA	Ácido desoxirribonucleico nuclear
O₂	Oxígeno
OXPHOS	<i>Oxidative Phosphorylation System</i> (Sistema de Fosforilación Oxidativa)
PBS	Tampón fosfato salino
PEG	Polietilenglicol
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
RNA	Ácido ribonucleico
RNAse P	Ribonucleasa P
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
SDS	Dodecilsulfato sódico
T	Tiamina
TRIS	2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
V	Voltios
ρ⁰	Células sin material genético mitocondrial

1. RESUMEN

Las enfermedades mitocondriales son un grupo de patologías generadas por mutaciones en la cadena de transporte mitocondrial que dan lugar a un déficit en la síntesis de energía en forma de ATP. Una de estas alteraciones es la deficiencia del complejo IV mitocondrial o citocromo C oxidasa, que afecta a diversas partes del organismo incluyendo corazón, músculo esquelético o hígado.

La paciente estudiada en este trabajo presentaba una nueva mutación (m.7637A>G) en el gen *MT-CO2* del mtDNA que codificaba una proteína COX2 disfuncional, lo que daba lugar a una deficiencia del complejo IV del sistema OXPHOS. Para establecer por completo la patogenicidad de la mutación se construyeron cíbridos transmitocondriales fusionando plaquetas de la paciente citada con la línea celular ρ^0 A549. Utilizando las células generadas y disminuyendo el número de copias del mtDNA mutante por medio de un tratamiento con bromuro de etidio, se analizaron parámetros mitocondriales como el nivel de heteroplasmia y de mtDNA, la actividad y cantidad de complejo IV y el funcionamiento del sistema OXPHOS para caracterizar patológicamente la nueva mutación. A la vista de los resultados, la mutación m.7637A>G puede ser de gran severidad por el mal funcionamiento del complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial.

1. ABSTRACT

Mitochondrial diseases are a group of pathologies generated by mutations in the transport chain of the mitochondria that cause a deficit in energy synthesis in the form of ATP. One of these alterations is the mitochondrial complex IV deficiency or cytochrome c oxidase deficiency, which affects different parts of the organism including heart, skeletal muscle or liver.

The patient studied in this study showed a new mutation (m.7637A> G) in the MT-CO2 gene of mtDNA that encoded a dysfunctional COX2 protein, which gave rise to a deficiency of the IV complex of the OXPHOS system. In order to fully establish the pathogenicity of the mutation, transmitochondrial cybrids were constructed by fusing the platelets of the patient with the ρ^0 A549 cell line. Using the generated cells and

decreasing the copy number of the mutant mtDNA by means of an ethidium bromide treatment, mitochondrial parameters such as the level of heteroplasmy and mtDNA, the activity and amount of IV complex and the operation of the OXPHOS system were analyzed to characterize the new mutation pathologically. In view of the results, the m.7637A> G mutation may be of great severity due to the malfunctioning of the complex IV of the mitochondrial respiratory chain.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. LA MITOCONDRIA. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

Las mitocondrias son orgánulos situados en el citoplasma de las células eucariotas con metabolismo aeróbico y una de sus principales funciones es la síntesis de ATP. Son estructuras subcelulares que provienen de la endosimbiosis de una α -proteobacteria y un ancestro de las células eucariotas que contenía un núcleo [1-3].

Como consecuencia del proceso endosimbiótico, las mitocondrias poseen dos compartimentos (matriz y espacio intermembrana), que se encuentran delimitados por dos membranas, una interna y otra externa (Véase Figura 1).



Figura 1. Esquema de la estructura de una mitocondria. Imagen modificada de Cooper, 2009 [4].

La membrana externa separa el propio orgánulo del citoplasma y es permeable a iones y pequeñas moléculas inferiores a 10 kDa. Por su parte, la membrana interna contiene los complejos enzimáticos del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS). Es prácticamente impermeable a iones, lo que le confiere la capacidad de mantener el gradiente electroquímico de protones necesario para la biosíntesis de ATP. Esta membrana forma invaginaciones, conocidas como crestas mitocondriales, que aumentan la superficie para el asentamiento del sistema OXPHOS [4, 5].

La matriz mitocondrial contiene moléculas de DNA mitocondrial (mtDNA) y proteínas necesarias para su replicación y su transcripción, mitorribosomas (ribosomas encargados de la traducción de las proteínas codificadas en el mtDNA), así como otras proteínas involucradas en distintos procesos metabólicos como el ciclo de Krebs, la β -

oxidación de ácidos grasos, el ciclo de la urea, la biosíntesis de pirimidinas o la proliferación celular y apoptosis[3-6].

2.2. GENÉTICA DEL DNA MITOCONDRIAL

Las células humanas contienen dos sistemas genéticos diferentes: el nuclear (nDNA) y el mitocondrial (mtDNA). Este último, como en el caso del genoma de las bacterias, está constituido por una molécula circular de doble hebra, que se replica y se transcribe en la matriz mitocondrial [7]. Sin embargo, a pesar de tener un DNA propio, las mitocondrias no son del todo autónomas, dado que dependen considerablemente del nDNA para la síntesis del propio orgánulo y de algunas de las subunidades de los complejos del sistema OXPHOS [5].

El mtDNA de *Homo sapiens* está constituido por 16569 bp [8] y codifica 37 genes distribuidos entre las cadenas H (cadena pesada o “*Heavy chain*”) y la L (cadena ligera o “*Light chain*”), denominadas así por su diferente densidad en gradientes de CsCl. Dichos genes codifican 2 RNA ribosómicos (12S rRNA y 16S rRNA); 22 RNA de transferencia (tRNA) y 13 subunidades de los complejos del sistema OXPHOS (Véase Figura 2)[4, 5, 7-10].

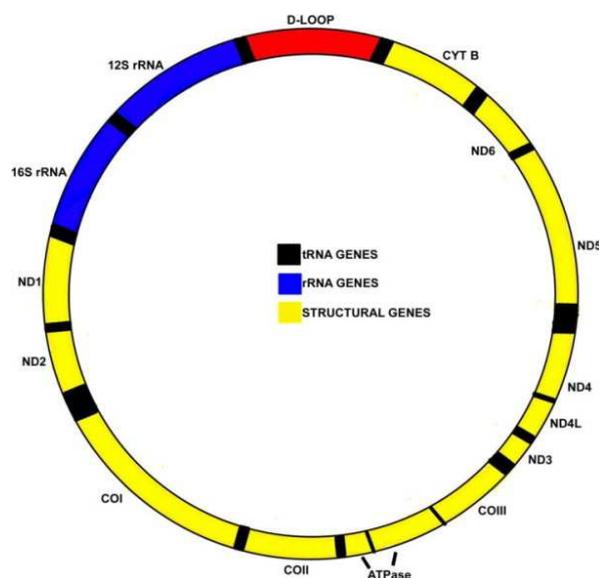


Figura 2. Representación esquemática del genoma mitocondrial humano [11]. Los genes estructurales se muestran en amarillo; los genes que codifican genes rRNA se muestran en azul; y los de tRNA, en color negro.

El DNA mitocondrial tiene una elevada tasa de mutación espontánea que es notablemente superior a la existente en el DNA nuclear. Esto podría deberse a que la mitocondria es la principal fuente de especies reactivas de oxígeno, compuestos que interaccionan fácilmente con mtDNA y lo dañan. Además, dicho material genético y los mecanismos de reparación no son tan eficientes como los que actúan sobre el DNA del núcleo celular [3, 6].

Por otro lado, el DNA nuclear se duplica antes de la división celular, por lo que las células hijas presentan la misma dotación genética nuclear que la madre. No obstante, en las mitocondrias, este hecho no se cumple, ya que el mtDNA muestra unas características diferentes. En primer lugar, el mtDNA posee un modo de herencia especial, ya que solamente la madre transmite el genoma mitocondrial a toda su descendencia [12]. Por tanto, las madres portadoras de una mutación puntual en el mtDNA se la transferirán a todos sus hijos (independientemente de si son machos o hembras), pero solamente sus hijas se la transmitirán a su descendencia [7, 10].

Por otra parte, el número de moléculas de mtDNA es muy variado y la mayor parte de los tejidos contienen entre 1.000 y 10.000 copias por célula, con 2 a 10 moléculas de DNA por mitocondria [13]. Las copias de mtDNA se distribuyen al azar entre las células hijas durante la división celular. En los tejidos normales, todas las moléculas de mtDNA son idénticas (homoplasmia). Sin embargo, la presencia de mutaciones en parte de dichas moléculas, hace que cohabiten dos poblaciones de mtDNA, una normal y otra mutada (heteroplasmia). Consecuentemente, el fenotipo de una célula con genotipo heteroplásmico dependerá del porcentaje de mtDNA que contenga, requiriéndose un número mínimo de mtDNA mutante para causar la disfunción mitocondrial (efecto umbral) [5, 7, 10].

2.3. SISTEMA DE FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

El metabolismo mitocondrial tiene como función principal la producción de energía en forma de ATP a partir de la oxidación aeróbica de sustratos. Todos los pasos de oxidación en los procesos de degradación de azúcares, grasas y aminoácidos confluyen en una etapa de respiración celular o fosforilación oxidativa (OXPHOS, del

inglés *Oxidative Phosphorylation System*). Se trata de un proceso por el cual se genera ATP como resultado de la transferencia de electrones desde los equivalentes reductores del NADH o el FADH₂ al oxígeno molecular a través de la cadena respiratoria mitocondrial. Los cuatro complejos multienzimáticos que componen dicha cadena son: NADH:ubiquinona oxidoreductasa (complejo I), succinato:ubiquinona oxidoreductasa (complejo II), ubiquinol:citocromo C oxidoreductasa o complejo bc1 (complejo III) y citocromo C oxidasa (complejo IV). Conjuntamente, está compuesta por dos proteínas transportadoras de electrones, la ubiquinona o coenzima Q (CoQ) y el citocromo C (cyt C), y por el complejo V o ATP sintasa. El flujo de electrones que parte bien desde el NADH o desde el FADH₂ pasa secuencialmente por el complejo I o el complejo II, respectivamente, para seguir por el CoQ, el complejo III y el citocromo C, y llegar finalmente al complejo IV, que será el encargado de ceder los electrones al O₂ para formar H₂O. Dicho flujo de electrones está acoplado a un bombeo de protones desde la matriz al espacio intermembrana través de los complejos I, III y IV para generar un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana interna, que proporciona la energía libre necesaria para la síntesis de ATP a través del complejo V (Véase *Figura 3*) [5, 14].

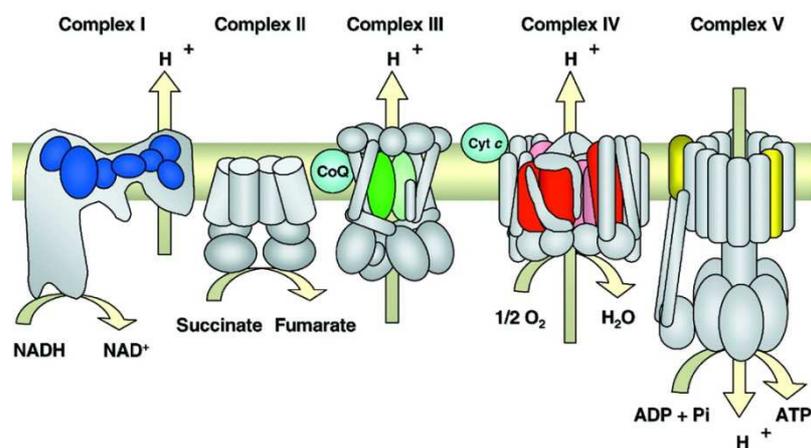


Figura 3. Representación del sistema de fosforilación oxidativa o sistema OXPHOS [14].

Los complejos del sistema OXPHOS contienen subunidades codificadas por ambos genomas celulares (nuclear y mitocondrial), exceptuando el II, que solamente tiene origen nuclear. El mtDNA codifica 7 proteínas del complejo I (subunidades ND1, ND2, ND3, ND4, ND4-L, ND5 y ND-6); una subunidad (apocitocromo b, CYTB) del

complejo III; 3 subunidades (COX1, COX2, COX3) del complejo IV, y dos proteínas (subunidades 6 y 8) del complejo V. Las subunidades nucleares se sintetizan en los ribosomas citosólicos y se importan a la mitocondria, donde se ensamblan junto a los grupos prostéticos y las subunidades codificadas por el genoma mitocondrial, formando los complejos de la cadena respiratoria con la ayuda de chaperonas o factores de ensamblaje específicos [5].

2.3.1. Citocromo C oxidasa o complejo IV del sistema OXPHOS

El complejo IV, citocromo C oxidasa o COX (EC 1.9.3.1) es un conjunto de proteínas transmembrana perteneciente a la cadena de transporte electrónico situado en la membrana interna mitocondrial de las células eucariotas. Es un complejo enzimático dímérico que cataliza la transferencia de electrones del citocromo C al oxígeno, es decir, de la reducción del oxígeno a agua [15-17]. Este proceso se genera vía cuatro cofactores metálicos presentes en el núcleo catalítico de la enzima y está acoplado a un bombeo de 4 protones a través de la membrana interna mitocondrial.

Cada monómero del complejo IV está constituido por 13 subunidades, de las cuales, las tres sintetizadas en el mtDNA (COX1, COX2 y COX3), contienen grupos prostéticos y forman el centro catalítico de la enzima.

El citocromo C es capaz de suministrar electrones al complejo IV, cediéndoselos a un átomo de cobre (Cu_A) que se encuentra en la subunidad COX2. De ahí pasan a otros centros metálicos de la subunidad COX1, primero al grupo hemo a y después al centro hemo a_3/Cu_B . Los electrones se transportan de uno en uno hasta acumular 4 en el último centro redox (a_3/Cu_B); entonces pueden cederse a una molécula de oxígeno de la matriz mitocondrial para formar agua. Además, se traslocan cuatro protones a través de la membrana, ayudando a establecer una diferencia de potencial electroquímico transmembrana de protones que la ATP sintasa usa entonces para sintetizar ATP (Véase Figura 4) [18].

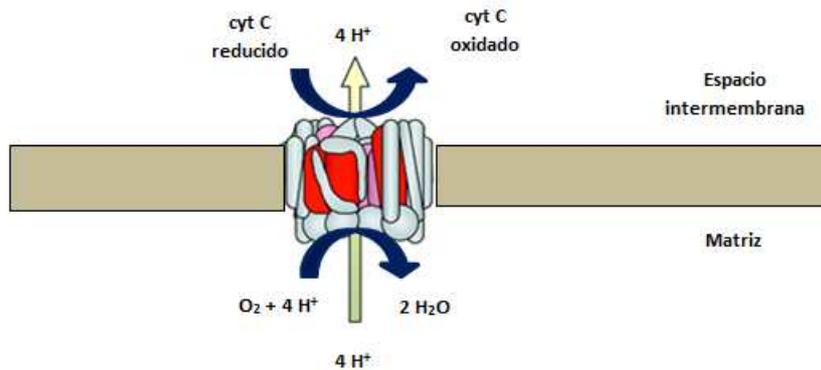


Figura 4. Esquema del funcionamiento del complejo IV del sistema mitocondrial OXPHOS. Imagen modificada de Zeviani, 2004 [14].

2.4. ENFERMEDADES MITOCONDRIALES

Una enfermedad mitocondrial es un trastorno producido en alguna de las rutas metabólicas mitocondriales. Sin embargo, este término suele emplearse para definir enfermedades originadas por defectos en el sistema OXPHOS, por ser este el único en el que interviene el genoma mitocondrial. Dado que el sistema de fosforilación oxidativa no solo está codificado en el DNA mitocondrial, sino que también en el nuclear, este tipo de enfermedades podrían estar causadas por mutaciones en cualquiera de los dos sistemas genéticos y por lo tanto, con tipos de herencia mendeliana o materna [7, 10].

Las patologías mitocondriales son enfermedades raras que se presentan con una gran variabilidad clínica, afectando a distintos órganos y tejidos [7]. En algunos casos es posible asignar una serie de síntomas a síndromes determinados pero, en general, no se puede delimitar con precisión, porque el solapamiento de síntomas es muy frecuente y el curso y gravedad de los mismos varía en los diferentes individuos. Otras veces, principalmente en niños, los síntomas no están bien desarrollados y es muy difícil asociarlos a un síndrome determinado [7]. Por ello, en numerosas ocasiones, su diagnóstico acarrea un trabajo costoso y complicado [3, 5, 10].

2.4.1. Deficiencia de citocromo C oxidasa o complejo IV del sistema OXPHOS

La deficiencia de citocromo C oxidasa, también conocida como deficiencia del complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial, es una enfermedad rara mitocondrial que puede afectar a varias partes del cuerpo, incluyendo el músculo esquelético, el corazón y el hígado. El alcance y la gravedad de los signos y síntomas pueden variar ampliamente entre los individuos afectados (incluso dentro del mismo subtipo y la misma familia de patologías) [19], por lo que es difícil clasificar a los individuos dentro de los subtipos de deficiencias de COX.

Los pacientes con una clínica más suave pueden presentar debilidad muscular e hipotonía. Por su parte, los afectados más gravemente, pueden llegar a mostrar disfunción cerebral, problemas del corazón, un agrandamiento del hígado o acidosis láctica, incluso pueden morir durante la infancia [19, 20].

En Europa del Este, la deficiencia de citocromo C oxidasa se estima que ocurre en 1 de cada 35.000 personas. La prevalencia de esta condición fuera de esta región es desconocida.

La deficiencia del complejo IV pueden presentar diferentes patrones de herencia dependiendo del gen implicado. En el caso de que las mutaciones se encuentren en el DNA nuclear, la herencia es autosómica recesiva y las dos copias del gen en cada célula tendrán la mutación. Los progenitores de un individuo con una condición autosómica recesiva llevan cada uno una copia del gen mutado, pero por lo general no muestran signos y síntomas de la enfermedad.

Cuando esta condición es causada por mutaciones en genes del mtDNA, se hereda por vía materna. Estos trastornos pueden aparecer en todas las generaciones de una familia y pueden afectar tanto a hombres como a mujeres.

La deficiencia del complejo IV es causada por mutaciones en 14 genes diferentes. La mayoría de los casos son producidos por mutaciones en genes que se encuentran dentro del DNA nuclear; no obstante, en algunos casos, las mutaciones se sitúan en el mtDNA. La mayoría de las mutaciones que producen la enfermedad alteran las

proteínas que se ensamblan el complejo respiratorio. En otras ocasiones, se generan subunidades alteradas que reducen la función del complejo IV, por lo que no se produce la fosforilación oxidativa y disminuye la producción de energía en forma de ATP.

Los investigadores creen que la alteración de la fosforilación oxidativa puede llevar a la muerte celular mediante la reducción de la cantidad de energía disponible en la célula. Ciertos tejidos que requieren grandes cantidades de energía, como el cerebro, los músculos o el corazón, parecen ser especialmente sensibles a la disminución de ATP en el interior celular [19, 20].

2.5. MODELOS DE ESTUDIO DE ENFERMEDADES MITOCONDRIALES: CÍBRIDOS TRANSMITOCONDRIALES

Debido a la heterogeneidad existente en las enfermedades mitocondriales, en numerosas ocasiones resulta complicado relacionar la mutación que posea el paciente en el genoma nuclear o en el mitocondrial y las características clínicas que este presenta. A pesar de las dificultades existentes, en los últimos años se ha avanzado notablemente en el campo de los mecanismos moleculares de dichas enfermedades por medio de modelos experimentales.

Dentro de las tácticas que ayudan a comprender este tipo de patologías destaca el uso de híbridos citoplasmáticos o cíbridos transmitocondriales. Estos son el resultado de la fusión de líneas celulares inmortales a las que se les elimina el mtDNA (conocidas como células ρ^0) y de células no nucleadas (como las plaquetas, que solo contienen el material genético mitocondrial) procedentes de pacientes con enfermedades mitocondriales (Véase Figura 5).

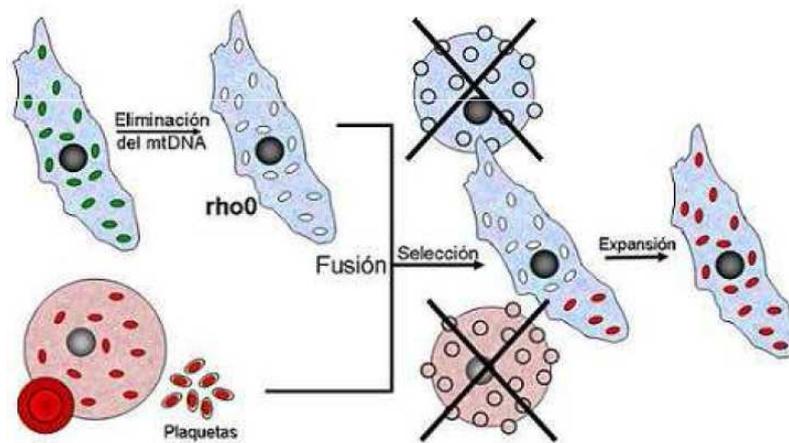


Figura 5. Esquema de la generación de híbridos transmitocondriales. La célula de color azul representa a la célula donante del fondo nuclear o ρ^0 (a la que previamente se le ha eliminado el mtDNA) y en rojo, la célula donadora de mtDNA y mitocondrias (plaquetas). Una vez fusionadas las células, se seleccionan los híbridos y se eliminan las células que no se hayan fusionado correctamente. Finalmente se expanden los clones correctos para su posterior estudio.

Como resultado se obtienen líneas celulares inmortales que permiten analizar el papel de diversas mutaciones del mtDNA en un mismo fondo genético nuclear. Por tanto, solamente se diferenciarán en el nivel de mutación que presenta el DNA mitocondrial y se podrán conocer los efectos de la mutación en cuestión sin influencia del DNA nuclear. Por todo ello, el uso de híbridos parece ser un modelo de estudio *in vitro* eficaz para estudiar las enfermedades mitocondriales [11, 21, 22].

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El Grupo de Biogénesis y Patología Mitocondrial de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza es experto en cuestiones de patología mitocondrial, por lo que recibió el historial clínico de una paciente (2446) con deficiencia de citocromo C oxidasa o complejo IV de la cadena mitocondrial en la que no se había logrado encontrar ninguna de las mutaciones patológicas más comunes. Tras secuenciar el mtDNA completo de la paciente se determinó que presentaba una nueva mutación (m.7637A>G) situada en el gen *MT-CO2* del mtDNA. Esta mutación se encontraba en heteroplasmia en diferentes tejidos de la paciente y sus familiares maternos.

Debido a la existencia de una gran heterogeneidad en las enfermedades mitocondriales, muchas veces es difícil relacionar la mutación que tiene el paciente con la sintomatología que presenta. Una de las técnicas de estudio de las enfermedades mitocondriales es la generación de cíbridos transmitocondriales que permiten analizar distintos fondos mitocondriales con un mismo DNA nuclear [11, 21, 22]. Por tanto, dicha metodología podía servir para estudiar la mutación m.7637A>G y caracterizar su patogenicidad.

Por ello, los objetivos que se plantearon en este Trabajo de Fin de Máster fueron los siguientes:

- Construcción de cíbridos transmitocondriales con fondo genético nuclear procedente de la línea celular A549 y fondo genético mitocondrial proveniente de las mitocondrias de la paciente 2446 como modelo de estudio de la mutación m.7637A>G.
- Realización de una RFLP-PCR de los cíbridos generados para la cuantificación de los niveles de heteroplasmia mitocondrial.
- Disminución del número de copias de mtDNA por medio de un tratamiento con bromuro de etidio para generar distintos clones con diferente nivel de DNA mutante y realización de una dilución al límite para poder aislar y seleccionar los clones.
- Análisis de la función mitocondrial de los clones por medio de la medida de la actividad y cantidad de complejo IV, la cuantificación del número de copias de mtDNA y el estudio del funcionamiento de la cadena de transporte electrónico (análisis de consumo de oxígeno).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. CULTIVOS CELULARES

4.1.1. Líneas celulares, materiales y equipos empleados

La línea celular empleada en estos experimentos fue la derivada de adenocarcinoma A549 [23]. También se emplearon plaquetas de la paciente 2446, que presentaba deficiencia en el complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial.

Para el cultivo de las células se emplearon distintos medios de cultivo y diferentes suplementos: Medio Eagle modificado por Dubelcco (DMEM) 4,5 g/l (25 mM), tampón fosfato (PBS) y suero fetal bovino (FBS) de Gibco™, Invitrogen; uridina y bromuro de etidio (EtBr) de Sigma y antibiótico penicilina-estreptomicina de Thermo Fisher Scientific.

Para la disociación de las células de las placas de cultivo se utilizó tripsina y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) de Sigma. Para la congelación de las células se utilizó el crioprotector dimetilsulfóxido (DMSO) de Sigma.

Las placas de 100 mm de diámetro empleadas, así como el resto del material plástico estéril (placas de 6, 12, 24, 48 y 96 pocillos, tubos Falcon, pipetas, criotubos) procedieron de TPP, Suiza.

El trabajo con cultivos celulares fue realizado en campanas de flujo laminar modelos LaminAir y NU-437-400E de las marcas Holten y Nuaire, respectivamente. Las líneas celulares se mantuvieron para su crecimiento en incubadores de CO₂, modelos DHD AutoFlow Incubator de la marca Nuaire. Las células se visualizaron en un microscopio invertido modelo DMIL (Leica).

El conteo del número de células se determinó mediante Countess® Automated Cell Counter de Invitrogen. Se utilizó una centrifuga Centrífuga Sorvall (rotor SS34), una centrifuga clínica y una centrifuga Allegra X-22 de la marca Beckman Coulter para la centrifugación de suspensiones celulares. Los medios de cultivo y otros reactivos se aatemperaron, previamente a su utilización, en un baño termostatzado modelo Precistern de la marca P-Selecta. Para el manejo de volúmenes en esterilidad se

manipuló un pipeteador automático de la marca PipetBoy. La congelación de líneas celulares se realizó en sistemas Cell Freezing Nalgene Mr. Frosty™ de Sigma.

La cuantificación del nivel de heteroplasma se realizó por medio del programa informático Gel-Pro Analyzer y el estudio bioinformático de la estructura de la proteína citocromo C oxidasa y de sus aminoácidos, a través del programa PyMol.

4.1.2. Mantenimiento de los cultivos celulares

Las células A549 se cultivaron de manera rutinaria en placas de 100 mm de diámetro en un incubador termostatzado DHD Autoflow (Nuaire) a 37°C, en aire saturado de humedad y con 5% de CO₂. El medio de cultivo empleado fue medio DMEM, suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y uridina a concentración 10 mg/ml. Este medio de cultivo fue cambiado a las células cada 2-3 días.

4.1.3. Tripsinización de los cultivos celulares

Cuando las células alcanzaron un 80% de confluencia en la placa de cultivo, se lavaron con tampón fosfato (PBS) con el fin de eliminar las proteínas del suero que inhiben el efecto de la tripsina y se incubaron con tripsina (0,05 % de tripsina y 0,02 % de EDTA) unos 2-3 minutos a 37°C para que no siguieran adheridas las células a las placas. Seguidamente, se comprobó con un microscopio invertido que las células se hubieran despegado de la placa y se resuspendieron en un volumen de medio de cultivo 2-3 veces mayor que el volumen de tripsina utilizado y se centrifugaron a 1400 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente en una centrífuga X-22 Beckman Coulter. Una vez obtenido el sedimento celular este fue procesado según el uso que se le fuera a dar.

4.1.4. Recuento celular

El recuento de las células y la evaluación de su viabilidad se llevó a cabo con el contador Countess® Automated Cell Counter de Invitrogen empleando la técnica del

azul tripán. Las células vivas no se coloreaban porque la membrana celular no deja atravesar el azul tripán, mientras que las no viables, al tener una membrana dañada, fueron teñidas con el colorante. Se mezclaron 10 µl de suspensión celular con 10 µl de azul tripán en una cámara desechable y las células viables se contaron automáticamente durante unos 30 segundos.

4.1.5. Congelación y descongelación de células

Para la congelación de los cultivos, primeramente se despegaron las células de las placas por tripsinización (siguiendo el procedimiento citado con anterioridad) y, posteriormente, se recogió un precipitado celular de entre 1-2 células/ml por centrifugación a temperatura ambiente. Dicho precipitado fue resuspendido en medio de congelación, constituido por medio DMEM suplementado con 20 % de FBS y 10 % de crioprotector DMSO, y se introdujo en criotubos resistentes a N₂ líquido. Seguidamente, dichos criotubos se colocaron en un Cell Freezing Nalgene Mr. Frosty™ de Sigma, el cual fue guardado en un congelador a una temperatura de -80°C. El sistema de congelación Mr. Frosty™ es un contenedor de policarbonato que contiene 250 ml de alcohol isoamílico y que al ser sometido a congelación, permite un descenso gradual de la temperatura de 1°C/minuto, dando lugar a una buena conservación celular.

En el caso de la descongelación, se tomaron los criotubos mantenidos en el congelador a -80°C y se resuspendió su contenido en un tubo Falcon de 15 ml con 9ml de medio de cultivo. Las células se centrifugaron a 1400 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente en una centrífuga X-22 Beckman Coulter. El sobrenadante se decantó para eliminar el DMSO y el sedimento de células obtenido se sembró en una placa de cultivo de 100 mm de diámetro.

4.1.6. Construcción de cíbridos trans mitocondriales A549 2446

4.1.6.1. Extracción y conservación de plaquetas

4.1.6.1.1. Extracción de plaquetas

La extracción de plaquetas para la construcción de líneas cíbridas trans mitocondriales se llevó a cabo según Chomyn A., 1996 [24]. En primer lugar, se recogieron aproximadamente unos 10-15 ml de sangre del paciente (en este caso de la paciente 2446) en tubos con anticoagulante EDTA y se pasaron a un tubo Falcon de 15ml. Seguidamente, se añadió sobre la muestra de sangre 1/9 del volumen de una solución de citrato sódico 0,11M y NaCl 0,15 M para evitar la agregación de las plaquetas. Se mezcló bien por inversión y se centrifugó la muestra a 1400rpm durante 20 minutos a 12°C en una Centrífuga Sorvall, rotor SS34.

Tras la centrifugación se obtuvieron tres fracciones bien diferenciadas: el plasma (de color amarillento), donde se encontraban las plaquetas; una interfase blanquecina constituida por leucocitos, de color blanquecino; y en el fondo, una fase de color rojizo formada por los eritrocitos de la sangre. Para la extracción de las plaquetas se recogieron 3/4 partes del sobrenadante (plasma), dejando aproximadamente unos 3 mm antes de la fase de células rojas. Después, se pasó el plasma a un tubo Falcon de 15 ml y se centrifugó a 4200 rpm durante 20 minutos a 4°C en una Centrífuga Sorvall, rotor SS34. Una vez obtenido el sedimento celular que incluía a las plaquetas, este fue lavado en suero salino pipeteando para separar los agregados celulares. Se volvió a centrifugar la muestra a 4200 rpm, durante 20 minutos a 15°C, y el precipitado se empleó para la fusión con la línea celular A549 y para la congelación de las plaquetas, para su preservación.

4.1.6.1.2. Congelación y descongelación de plaquetas

Para congelar las plaquetas se empleó el Cell Freezing Mr. Frosty™ del mismo modo que para la congelación de líneas celulares A549. El medio de congelación estaba formado por PBS suplementado con FBS al 20% y DMSO al 10%. Por tanto, una vez que se obtuvo un precipitado de plaquetas, se resuspendió en el citado medio de congelación y se procedió del mismo modo que en las células en cultivo para su

conservación a -80°C . Se mantuvieron en el recipiente durante 24 horas a -80°C y después, se pasaron a N_2 líquido donde se conservaron hasta su posterior uso.

4.1.6.2. Preparación de las células ρ^0 de la línea celular A549

Las células ρ^0 (sin mtDNA) se tripsinizaron, contaron y resuspendieron en medio DMEM con 10 % de FBS a una concentración de 5×10^5 células/ml. Se tomaron 2 ml de dicha disolución para obtener un total de 1×10^6 células.

4.1.6.3. Fusión de las células ρ^0 A549 y plaquetas 2446

Se recogieron 7ml de la solución de plaquetas y se centrifugaron a 4200 rpm en una Centrífuga Clínica a 15°C durante 15 minutos, eliminando el sobrenadante con sumo cuidado. A continuación, se añadieron 2ml de la solución de células ρ^0 sobre el precipitado de plaquetas. Se centrifugó la muestra en una centrífuga clínica a 1400rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente y sin freno y se descartó el sobrenadante. Seguidamente se añadieron 0,1ml de PEG (polietilenglicol) al 50 %, y el sedimento se resuspendió vigorosamente hasta conseguir la completa disgregación del mismo. Una vez disgregado, se esperó 1 minuto para favorecer la fusión de las membranas celulares ayudadas por el detergente. Pasado dicho tiempo, se resuspendió el homogenado celular durante 30 segundos más. Después se añadió rápidamente un volumen de 10 ml de medio DMEM con 10 % de FBS para evitar el efecto tóxico del PEG. El homogenado celular se centrifugó a 4200rpm durante 5 minutos una centrífuga X-22 Beckman Coulter. El precipitado celular obtenido se sembró en una placa de 100 mm medio DMEM con 10 % de FBS.

4.1.6.4. Tratamiento post-fusión y selección de híbridos

Cuando la fusión celular alcanzó una confluencia del 100 %, las células se pasaron a dos placas de cultivo y cuando estas últimas alcanzaron una alta confluencia (más del 80%), las células de una de las placas de cultivo se congeló y a la otra se añadió medio

selectivo formado por medio DMEM 4,5 g/l suplementado con 10 % de FBS, sin uridina ni piruvato [25].

El proceso de selección de los cíbridos se realizó aproximadamente durante 4 semanas. Durante ese periodo de tiempo el medio de cultivo fue renovado periódicamente. Una vez finalizado el tiempo de selección solo sobrevivieron las células que incorporaron el mtDNA de las plaquetas. Después de este periodo, las células debían recuperar sus niveles de mtDNA, para lo cual las células se cultivaron de manera que cada vez que una placa de cultivo alcanzaba una confluencia cercana al 100%, esta era doblada. Dicho proceso se repitió de 25 a 30 veces, hasta que se confirmó que los niveles de mtDNA eran constantes.

Durante el proceso de recuperación de los niveles de mtDNA, las células se congelaron cada cierto número de doblajes.

4.1.7. Generación de clones de los cíbridos A549 2446

Para generar clones con un nivel de mutación en el DNA mitocondrial superior al que poseían, se realizó un tratamiento con bromuro de etidio (EtBr), sobre una de las placas con cíbridos. El medio en cuestión estaba formado por DMEM, 10% de SFB, EtBr (50ng/ml) y uridina (50 µg/ml) y 500ml de antibiótico (penicilina-estreptomicina) fue renovando diariamente durante un periodo de 9 días.

4.1.8. Dilución al límite

Una vez finalizado el tratamiento con bromuro de etidio, se retiró el medio y se tripsinizó la placa siguiendo el procedimiento habitual. A continuación, se realizó un recuento celular y tras determinar el valor de la concentración, se llevaron a cabo diluciones sucesivas en medio de cultivo sobre la muestra celular, tal y como se muestra a continuación:

- 1- Dilución de la muestra para obtener una concentración celular de 10^5 células/ml.

- 2- Dilución 1:100 de la muestra celular de 10^5 células/ml para obtener una concentración de 10^3 células/ml.
- 3- Dilución 1:100 de la muestra celular de 10^3 células/ml para obtener una concentración de 10 células/ml.

Tras obtener una dilución 10 células/ml en un volumen de 20 ml, se tomaron 100 μ l para adicionarlos a cada uno de los pocillos de dos placas de 96 pocillos que contenían previamente 100 μ l de medio de cultivo cada uno. De esta forma, fue posible asegurarse de que en cada uno de los pocillos había una (o ninguna) célula (Véase Figura 6).

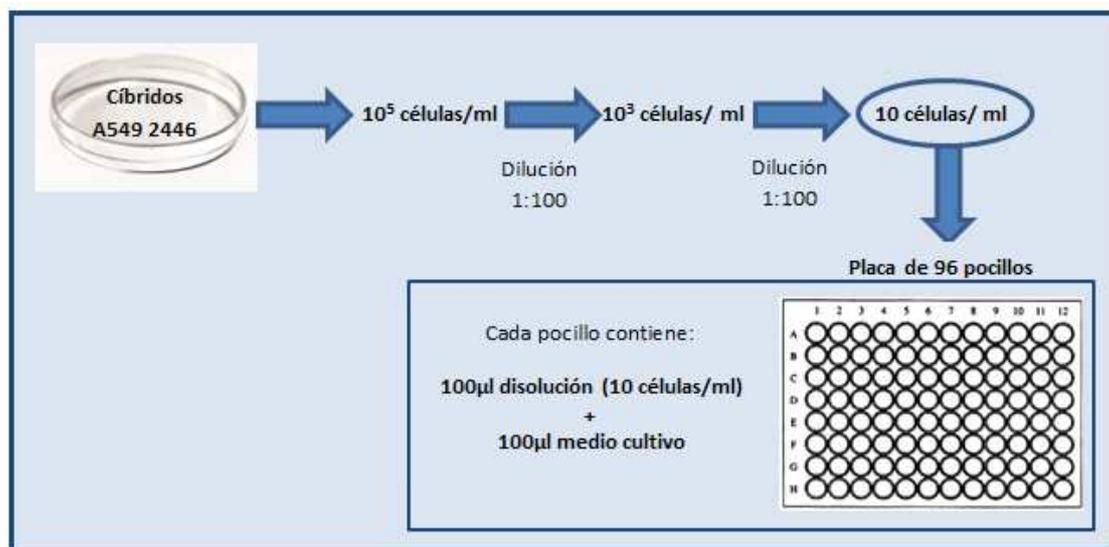


Figura 6. Resumen del proceso dilución al límite para tener una o ninguna célula por pocillo en una placa de 96 pocillos.

A medida que iban creciendo los clones, se iban tripsinizando los pocillos y pasando, progresivamente, a placas con menor número de pocillos y mayor diámetro. En primer lugar, se pasaron los clones de las placas de 96 a las de 48 pocillos individualmente cuando alcanzaban el 80% de confluencia; después de las de 48 a las de 24; de las de 24 a las de 12; de las de 12 a las de 6; y finalmente, de las de 6 a las placas de 100 mm de diámetro.

Este proceso de selección de clones fue muy costoso y duradero, dada la dificultad que presentaban algunos de ellos para crecer.

4.2. ANÁLISIS DEL mtDNA

4.2.1. Materiales y equipos empleados

La Multiplex PCR Master Mix y el agua libre de nucleasas empleados para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) procedían de la casa comercial Thermo Fisher Scientific, así como la enzima de restricción Eam1104 (*EarI*) y su tampón de incubación.

Los oligonucleótidos empleados en la PCR fueron sintetizados por Sigma-Genosys y purificados mediante el método de desalado.

Para la extracción de DNA de las muestras celulares se empleó el kit Biotools Speedtools Tissue DNA Extraction Kit.

Se empleó el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 para cuantificar el DNA y el termociclador de la marca Biometra modelo T3 Thermocycler para la PCR. Para la electroforesis de geles horizontales de agarosa de DNA se utilizó el sistema Bio-Rad y para la visualización de los geles se empleó el Transiluminador Gel Doc™ XR+ System (Bio-Rad).

Los oligonucleótidos y sondas para PCR cuantitativa (Real-Time PCR), así como otros reactivos utilizados (Master Mix, *RNAse P*, etc), el material consumible (placas 48 pocillos, tapas, etc.) y el instrumento StepOne™ fueron de Applied Biosystems.

4.2.2. Extracción de DNA de lisados celulares

Para poder analizar el DNA de cada uno de los clones citados, se tripsinizaron las placas en los que se encontraban adheridos y se pasaron a tubos Falcon para centrifugar las muestras a 1400 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente en una centrífuga X-22 Beckman Coulter y obtener un sedimento con el que poder trabajar. Una vez

conseguidas las muestras, se extrajo el DNA de las mismas con el kit comercial Biotools Speedtools Tissue DNA Extraction Kit siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.2.3. Cuantificación de DNA

La cuantificación del DNA se efectuó con un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000, midiendo la absorbancia a 260nm y cuantificar la cantidad de DNA/RNA. Asimismo, se midió la absorbancia a 230 y 280 nm para descartar contaminaciones de solventes orgánicos y proteínas.

En todos los casos se depositaron 2 μ l de muestra sobre el orificio de medida del espectrofotómetro. Primeramente, se hizo una medida con agua destilada para fijar un blanco y después se añadieron cada una de las disoluciones del DNA de los clones y el programa informático asociado al aparato calculó la concentración del mismo (en ng/ μ l). Para eliminar los restos de ácidos nucleicos, al finalizar el proceso, se realizaron dos medidas con agua destilada.

4.2.4. RFLP-PCR

Para comprobar si la mutación de un paciente concreto era patológica y causaba una enfermedad mitocondrial se realizó una PCR de tipo RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* o polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción). Esta técnica se basa en amplificar por medio de PCR zonas del DNA del paciente que pueden tener mutaciones y después, cortar esos productos de PCR con endonucleasas de restricción. Entonces, si el paciente tiene una mutación en un sitio concreto, se cambiará el sitio de corte de la enzima de restricción utilizada y se observará un patrón de bandas diferente al observado en el DNA control.

Para llevar a cabo una RFLP-PCR primero se amplifica el fragmento de gen con la PCR, y luego este se expone a un enzima de restricción específica que corta solamente una de las formas alélicas. Los productos de PCR digeridos se revelan mediante electroforesis y se determina el patrón de bandas generado.

4.2.4.1. PCR

La técnica PCR (*Polymerase Chain Reaction* o reacción en cadena de la polimerasa) se basa en la propiedad de la enzima *Taq*-polimerasa para duplicar hebras de DNA. Son ciclos repetitivos de transiciones de temperatura que permiten la desnaturalización del DNA, la hibridación de los oligonucleótidos (también llamados cebadores o *primers*) al DNA diana y elongación de las cadenas de DNA sintetizadas. Estas fases componen un ciclo de amplificación y cada uno de los productos de PCR formados puede usarse de DNA molde para el ciclo siguiente.

En este caso, la PCR llevada a cabo permitió amplificar una zona del mtDNA por medio de 35 ciclos de PCR. Para el desarrollo de esta técnica, son necesarios los siguientes reactivos:

- 12,5µl de Master Mix (dNTPs + *Taq*-polimerasa + MgCl₂ + Tampón TRIS 100mM, MgCl₂ 15 mM, KCl 500 mM, pH 8,3)
- 0,5 µl de *primer* hmtL7336 (25µM)
- 0,5 µl de *primer* hmtH8251 (25µM)
- 100ng de DNA del paciente
- H₂O hasta completar en un volumen de 25µl

Los *primers* empleados en este proceso de PCR se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. *Primers utilizados para llevar a cabo la reacción PCR [26].*

PRIMER 5'→3'	HEBRA DEL mtDNA	SECUENCIA 5'→3'	TAMAÑO (bp)
hmtL7336	L	GATTTGAGAAGCCTTCGCTTC	916
hmtH8251	H	GCTATAGGGTAAATACGGGC	

Una vez que se tiene la mezcla de reacción completa en el interior de tubos eppendorf, estos se introdujeron en un termociclador Biometra (modelo T3 Thermocycler) para que tuviese lugar el proceso de amplificación. Los cambios de temperatura y los tiempos de cada fase se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de la amplificación del mtDNA por PCR.

	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	Nº DE CICLOS
Desnaturalización inicial	95	5 minutos	1 ciclo
Desnaturalización	95	45 segundos	35 ciclos
Hibridación	60	30 segundos	
Extensión	72	3 minutos	
Elongación	72	5 minutos	1 ciclo

4.2.4.2. Digestión de productos de PCR con la enzima de restricción *EcoRI*

Este ensayo se utilizó para la determinación de la presencia de una mutación puntual en el mtDNA en posición 7637 (m. 7637A>G). Para ello, se empleó la enzima de restricción *EcoRI* (Thermo Fisher) que reconoce el siguiente sitio de restricción CTCTTC^A, produciendo un patrón de bandas que permite identificar estos cambios puntuales en el DNA.

Los productos de PCR se digirieron tomando 5 µl de los mismos llevándolos a un volumen final de 10 µl, que contenía 5U de la enzima, el tampón de incubación de la enzima y agua libre de nucleasas para completar el volumen total.

4.2.4.3. Separación electroforética de ácidos nucleicos

Para determinar si se ha producido la amplificación del mtDNA mediante PCR y para observar el patrón de bandas generado tras la digestión con *EcoRI*, se utilizaron geles de agarosa de para separar los ácidos nucleicos. El gel de comprobación de la PCR era del 1% de concentración y el de los productos de la digestión, del 2%.

La agarosa se fundió en un microondas en el tampón TBE (50 mM TRIS, 50 mM ácido bórico, 1 mM EDTA-Na, pH 8,3) y después se añadió el bromuro de etidio (1 µg/ml) y se dejó que la solución gelificara en las camas de electroforesis. Las muestras se mezclaron con 2 µl de mezcla colorante (Ficoll 400 15 %, azul de Bromofenol 0,2 %).

La electroforesis se desarrolló a 50 V durante diez minutos y a 80 V el tiempo restante, en función de cómo iba corriendo el gel. El resultado se visualizó tras la exposición del gel a una fuente de radiación ultravioleta en un Transiluminador Gel Doc™ XR+ System (Bio-Rad).

4.2.5. Cuantificación del número de copias de mtDNA

El estudio de determinación de niveles de mtDNA se realizó mediante la técnica de sondas TaqMan. Esta técnica permite la cuantificación del número de copias de mtDNA mediante la cuantificación relativa por *real time* PCR (PCR a tiempo real o PCR cuantitativa) de un gen mitocondrial presente en una región conservada (12S), al que se le une una sonda fluorescente FAM, frente a un gen nuclear (*RNasa P*), que se utiliza para normalizar y que se le une una sonda fluorescente VIC.

Se realizó un curva patrón con diluciones seriadas de una mezcla de plásmidos que contenía el gen mitocondrial y el nuclear para interpolar los resultados. Esta mezcla de plásmidos se diluyó 1:200 en TRIS-HCl 10mM pH 8,5 y se tomó como dilución inicial de la recta. A partir de esta última, se generaron las siguientes diluciones seriadas: 1/3, 1/9, 1/27 y 1/81.

- N1 → N (M diluido 1:200)
- N2 → N/3 (20µl de N1 + 40 µl de TRIS-HCl)
- N3 → N/9 (20µl de N2 + 40 µl de TRIS-HCl)
- N4 → N/27 (20µl de N3 + 40 µl de TRIS-HCl)
- N5 → N/81 (20µl de N4 + 40 µl de TRIS-HCl)

La cantidad de DNA para la reacción fue de entre 10 y 15 ng/µl. El volumen final de reacción fue de 20 µl y se añadieron los siguientes reactivos (Véase Tabla 3):

Tabla 3. Reactivos necesarios para la cuantificación del número de copias de mtDNA.

	CONCENTRACIÓN STOCK	VOLUMEN
Master Mix	2X	10 µl
Sonda MT-FAM MGB	10X	0,5 µl
Primer F	5 µM	0,5 µl
Primer R	5 µM	0,5 µl
RNasa P (VIC)	20X	1 µl
mtDNA	10-15ng/µl	5 µl
H₂O estéril	-	2,5 µl

Los *primers* y la sonda empleados se muestran a continuación (Véase Tabla 4):

Tabla 4. Primers empleados para la real time PCR para la cuantificación del número de copias de mtDNA.

PRIMERS	SECUENCIA 5'→3	Temperatura (°C)
12S-F	CCACGGGAAACAGCAGTGAT	58,4
12-R	CTATTGACTTGGGTTAATCGTGTGA	58,2
SondaMT-FAM MGB	FAM-TGCCAGCCACCGCG	69,3

Las reacciones de Real-Time PCR tuvieron lugar en el aparato StepOne™ System de Applied Biosystems con las siguientes condiciones (Véase Tabla 5):

Tabla 5. Condiciones de la real time PCR para la cuantificación del número de copias de mtDNA.

	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	Nº DE CICLOS
Calentamiento	50	2 minutos	1 ciclo
Desnaturalización inicial	95	10 minutos	1 ciclo
Desnaturalización	95	15 segundos	40 ciclos
Elongación	60	1 minuto	
Estabilización	60	30 segundos	1 ciclo

4.3. ANÁLISIS PROTEICO POR WESTERN BLOT

4.3.1. Materiales y equipos empleados

El tampón de lisis y extracción de proteínas RIPA conteniendo inhibidores de proteasas procedió de la casa comercial Sigma. La microcentrífuga 5415R Eppendorf programada a 4°C fue empleada para la extracción de proteínas.

Para la determinación de la cantidad de proteína se utilizaron los siguientes reactivos: albúmina sérica bovina (BSA) y reactivo de Bradford, ambos de Sigma. Para las medidas se utilizó el lector de placas Novostar de BMG-Labtech.

Los geles empleados para la electroforesis de proteínas fueron Mini-PROTEAN TGX™ Precast Gels de la marca Bio-Rad. Las cubetas en las que se introdujeron los geles, así como el equipo de electroforesis también provinieron de la casa Bio-Rad.

Los componentes del tampón de electroforesis utilizado presentó los siguientes reactivos: TRIS-HCl 0,125 M, Glicina 0,96 M y SDS 0,01% pH 8,3, todos ellos de Sigma.

El tampón de carga utilizado presentó una concentración de 4X y la siguiente composición: TRIS -HCl 0.16 M pH 6,8, EDTA 20 mM, SDS 8%, glicerol 20% (v/v), mercaptoetanol 4% (v/v) y azul de bromofenol 0.4% (p/v) (todos ellos de Sigma, excepto el SDS, suministrado por Merck).

Las membranas Trans-Blot® Turbo™ Transfer Pack (0,2 µm PVDF) fueron de Bio-Rad. Las autorradiografías utilizadas en la detección de proteínas fueron Hyperfilm™ ECL de Amersham. Los reactivos utilizados para el revelado por quimioluminiscencia fueron SuperSignal® West Pico Mouse IgG Detection Kit de Pierce.

Los anticuerpos primarios monoclonales empleados en la inmunodetección fueron: anti-COX1 4550 de Life Technologies y el anticuerpo monoclonal anti-COX2 (COX 229) de Thermo Fisher Scientific. El anticuerpo secundario utilizado fue 31430 Anti-Mouse Peroxidasa IgG (H+L) de Thermo Fisher Scientific.

4.3.2. Extracción y fraccionamiento de lisados celulares totales

Para poder llegar a obtener una muestra de proteínas de cada uno de los clones, primero se tripsinizaron las células y se pasaron a tubos Falcon y se centrifugaron 5 minutos a 1400 rpm a temperatura ambiente en una Centrífuga X-22 Beckman Coulter. A continuación, se eliminó el sobrenadante y se lavó con 1 ml de PBS, transfiriendo el contenido tubos eppendorf. Inmediatamente, se añadieron entre 50-300 µl de tampón de lisis RIPA conteniendo inhibidores de proteasas (Sigma) a las soluciones celulares. El tampón de lisis utilizado fue: 50 mM TRIS-HCl pH 7,4, 50 mM NaCl, 0,5% deoxicolato de sodio, 5 mM EDTA, 1% de Tritón 100X (Sigma).

Los eppendorf se incubaron durante 15 minutos a 4°C en una rueda giratoria para permitir la ruptura de las membranas celulares. Consecutivamente, el homogeneado se centrifugó a 13000 rpm a 4°C durante 15 minutos en una microcentrífuga 5415R Eppendorf. El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf que se guardó a -20°C hasta su utilización.

4.3.3. Cuantificación de proteínas totales por espectrofotometría (Método de Bradford)

Para medir la cantidad de proteínas totales se utilizó el método colorimétrico de Bradford, que se basa en la elaboración de una recta patrón con una concentración conocida de proteína (en este caso de albúmina sérica bovina o BSA) y se mide la absorbancia a 595nm. Es decir, teniendo una recta patrón de BSA absorbancia frente a concentración, es posible medir la absorbancia de muestras proteicas desconocidas e interpolar el valor en la recta patrón y así determinar la concentración de las mismas.

La recta de calibrado con BSA se realizó a partir de un stock de BSA 1mg/ml y se realizaron las siguientes diluciones (Véase Tabla 6):

Tabla 6. Diluciones de BSA para la recta de calibrado del Bradford.

MUESTRAS (mg/ml)	BSA (µl)	AGUA (µl)
Blanco	0	100
0,05	5	95
0,1	10	90
0,2	20	80
0,3	30	70
0,4	40	60
0,5	50	50

El reactivo de Bradford se diluyó 1:5, y se conservó en oscuridad. Los puntos de la recta patrón y las muestras se midieron por triplicado.

La cantidad de muestra en cada punto fue de 10 µl y de reactivo Bradford de 200 µl.

4.3.4. Separación de las proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS

La separación electroforética de proteínas aisladas de los cultivos celulares se realizó en geles de poliacrilamida, que permiten la separación de las mismas en función de su peso molecular. Los geles están formados por dos fases que difieren en composición y función. La fase superior o de concentración, contiene un 5 % (p/v) de poliacrilamida y

asegura la migración de todas las proteínas en el frente de migración, provocándose la acumulación de todas las que se han cargado en el pocillo. La fase inferior o de resolución, contiene un 10% (p/v) de acrilamida-bisacrilamida y permite la separación de las proteínas. Los geles empleados eran geles comerciales Mini-PROTEAN TGX™ Precast Gels de la marca Bio-Rad.

Se calculó la cantidad de proteína a cargar en cada pocillo, que fue siempre entre 60-100 µg y se llevó a un volumen final de 10 µl. Las muestras se mantuvieron todo el tiempo de su manipulación en hielo para evitar la acción de las proteasas.

Las muestras de proteínas e mezclaron con el tampón de carga para introducir las en el gel. Las cubetas en las que se introdujeron los geles utilizados fueron de Bio-Rad y la electroforesis se realizó a 50 V durante 10 minutos y a 200 V, los 40 minutos siguientes. El tampón de electroforesis utilizado presentó la siguiente composición: TRIS -HCl 0,125 M, glicina 0,96 M y SDS 0,01% pH 8,3 (Sigma).

4.3.5. Inmunodetección de las proteínas

Las proteínas separadas en el gel se transfirieron a una membrana Trans-Blot® Turbo™ Transfer Pack (0,2 µm PVDF) de Bio-Rad siguiendo las instrucciones del fabricante, utilizando el programa HIGH MW con una duración de 10 minutos.

Posteriormente, se realizó el bloqueo de la membrana con PBS-Tween al 5 % p/v de leche desnatada en polvo, que se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron 3 lavados de 1 minutos con PBS-Tween para eliminar los restos de la solución de bloqueo. Finalmente, la membrana se incubó con el anticuerpo primario, diluido en PBS-Tween al 1 % de leche desnatada en polvo durante toda la noche a 4 °C. Transcurrido ese tiempo, se realizaron de nuevo 3 lavados de 10 minutos con PBS-Tween, para arrastrar posibles restos de anticuerpo primario no adherido. Seguidamente, se incubó la membrana durante 1 hora con el anticuerpo secundario, diluido en PBS-Tween al 0,1 % de leche desnatada en polvo. Después de esto, se realizaron otros 3 lavados de 10 min con PBS-Tween para eliminar las trazas de anticuerpo secundario y se procedió a la detección, por medio de quimioluminiscencia

siguiendo el protocolo del kit SuperSignal®West Pico Mouse IgG Detection Kit de Pierce.

4.4. DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS

4.4.1. Materiales y equipos empleados

El análisis de la actividad enzimática y la cantidad del complejo IV se realizaron siguiendo las instrucciones del kit Complex IV Human Duplexing (Activity + Quantity) Microplate Assay Kit de MitoSciences (Abcam).

Los reactivos empleados para analizar la actividad de la citrato sintasa (5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoico o DTNB, oxalacetato, TRIS-HCl y AcetilCoA) procedieron de la casa comercial Sigma.

Para las medidas de la actividad enzimática y la cantidad del complejo IV y la actividad de la citrato sintasa fueron llevadas a cabo en un lector de placas NOVOstar (BMG Labtech).

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo en Microsoft Excel y en StatView 5.0 utilizando test t para comparar los diferentes parámetros utilizados. Los p-valores inferiores a 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

4.4.2. Determinación de la actividad enzimática y cantidad del complejo respiratorio IV

La actividad enzimática y la cantidad de citocromo C oxidasa fueron medidos usando el kit comercial Complex IV Human Duplexing (Activity + Quantity) Microplate Assay Kit de MitoSciences (Abcam).

El kit se basa en la inmunocaptura del complejo IV en cada uno de los 96 pocillos del kit y la actividad se determinó colorimétricamente a través de la oxidación del citocromo C reducido por disminución de la absorbancia a 550 nm.

La cantidad de enzima se midió en los mismos pocillos añadiendo un anticuerpo específico del complejo IV conjugado con fosfatasa alcalina. Esta última era la encargada de transformar un sustrato incoloro en un producto de color amarillo que absorbía a 405 nm.

4.4.3. Medida de la actividad de la citrato sintasa

La citrato sintasa es una enzima presente en todas las células y que cataliza la primera reacción del ciclo de Krebs, condensando acetato (proveniente del acetilCoA) y el oxalacetato para formar citrato. Es una enzima localizada en la matriz mitocondrial, pero es codificada por DNA nuclear. Por tanto, al no formar parte de la cadena de transporte mitocondrial, la citrato sintasa es empleada como un marcador mitocondrial.

La actividad citrato sintasa [27] se midió como el incremento en la absorbancia a 412 nm que se produce debido a la formación de la forma aniónica del ácido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB, $\epsilon=13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) tras añadir oxalacetato como iniciador de la reacción.

En primer lugar, se preparó un mix de reacción con los componentes que se muestran en la *Tabla 7*. Tanto el DTNB como el oxalacetato se prepararon en fresco, mientras que el acetilCoA se almacenó alicuotado a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

Tabla 7. Mezcla de reacción para la medida de la actividad de la citrato sintasa.

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN STOCK	VOLUMEN (μl)	CONCENTRACIÓN FINAL
Tampón TRIS -HCl pH 8,0	1M	15	75mM
DTNB (0,4mg/ml) en TRIS-HCl 10mM	1mM	20	0,1mM
Tritón X-100	10%	2	0,10%
AcetilCoA (7mg/ml)	8mM	2	0,08 mM
H ₂ O	-	146	-

A cada pocillo, de una placa de 96 pocillos, se añadieron 185 μl de esta mezcla y 5 μl de cada extracto proteico obtenido por medio del kit Complex IV Human Duplexing (Activity + Quantity) Microplate Assay Kit de MitoSciences (Abcam).

Finalmente, se añadieron 10 μl de oxalacetato a una concentración de 50 mM en agua destilada. Dicha adición se realizó de manera automática con el pipeteador programable del aparato NOVOstar (BMG Labtech), de manera que se puede empezar a medir en el instante en el que empieza la reacción. La medida de absorbancia se realizó a 412 nm durante 5 minutos a 30 °C.

4.5. ANÁLISIS DE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL

4.5.1. Materiales y equipos empleados

Para analizar la respiración mitocondrial se empleó un respirómetro de alta resolución Oroboros®.

Los inhibidores utilizados (oligomicina, FCCP y KCN) procedieron de la casa comercial Sigma.

4.5.2. Medida del consumo de oxígeno de la cadena respiratoria de los cíbridos A549 2446

Para medir el consumo de oxígeno de las cíbridos y analizar la respiración mitocondrial se empleó un sistema de alta resolución Oroboros® que se basa en el principio básico de la respirometría: una muestra celular que consume el oxígeno presente en una cámara cerrada hará disminuir la concentración de oxígeno. Por lo tanto, representando dicha disminución frente al tiempo, es posible obtener la velocidad de consumo de oxígeno.

La respirometría de alta resolución emplea electrodos muy sensibles, con un diseño que minimiza la difusión de oxígeno, y está acoplada a un software avanzado (DatLab4) que da la información simultánea de las velocidades de consumo de oxígeno, así como la estabilidad de la señal del mismo.

Para llevar a cabo el procedimiento, primeramente se tripsinizaron los cíbridos, se centrifugaron y se contaron. El sedimento celular se diluyó en 2 ml de medio DMEM sin FBS para evitar burbujas y se introdujo en la cámara del Oroboros®. Tras cerrar la cámara, se esperó a que se estabilizara el flujo de oxígeno para determinar el valor de respiración endógena. Seguidamente, se añadió oligomicina 16 nM, que bloquea el flujo de protones de la respiración mitocondrial inhibiendo la ATP sintasa, para determinar el consumo de oxígeno filtrante, es decir, en consumo de oxígeno debido a otros mecanismos celulares distintos al de la cadena respiratoria mitocondrial.

Para medir la respiración desacoplada (máxima capacidad del sistema de transporte electrónico) se añadió carbonilcianuro-p-trifluorometoxi-hidrazona (FCCP) 0,8 μ M, que es un agente desacoplante que interrumpe la síntesis de ATP mediante el transporte de protones a través de la membrana interna mitocondrial antes de que puedan ser utilizados para proporcionar la energía para la fosforilación.

Finalmente, se inhibió el consumo de oxígeno utilizando KCN, un inhibidor del complejo IV, obteniéndose el valor de la respiración no dependiente de cadena respiratoria.

5. RESULTADOS

5.1. CASO CLÍNICO

La paciente estudiada en este trabajo actualmente es una adolescente de 16 años de edad diagnosticada de deficiencia del complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial en el primer año de vida por medio de un estudio de biopsia muscular en el Hospital 12 de Octubre de Madrid.

A la edad de 6 años la paciente no presentaba ningún tipo de visceromegalia. Previamente, se le había estado suministrando tiamina sin cambio evidente, por lo que comenzó a tomar Carnicor (L-carnitina) en solución oral al 30% para mejorar la miopatía (debilidad muscular) y evitar la aparición de cardiomiopatía en la paciente [28]. Por otro lado, a dicha edad, ya estaba operada de estrabismo del ojo derecho en dos ocasiones. Además, presentaba dificultades de aprendizaje y en el desarrollo del lenguaje.

Con 9 años, se llevó a cabo un electrocardiograma y seguían sin presentarse problemas a nivel cardiovascular, el corazón tenía una actividad cardíaca normal. La paciente seguía manteniéndose estable a nivel neurológico, a pesar de que persistían las dificultades en cuanto a lo que se refería a la motricidad fina, en movimientos que requieren de cierta precisión para poder llevarse a cabo correctamente.

Tras revisiones periódicas, actualmente la paciente sigue el tratamiento con Carnicor. Aunque presenta dificultades psicomotrices, su estudio cardiológico sigue siendo normal.

5.2. PRUEBAS BIOQUÍMICAS

El estudio de una biopsia muscular de la paciente en el hospital 12 de Octubre de Madrid demostró la existencia de una deficiencia del complejo IV de la cadena de transporte electrónico. Se valoró la actividad de los diferentes complejos de dicha cadena mitocondrial a partir del homogenado muscular de la paciente demostrando así la existencia de la enfermedad.

Por otro lado, se llevaron a cabo estudio complementario en metabopatías congénitas de la paciente citada en el Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares de la Universidad Autónoma de Madrid. En primer lugar, se determinó la concentración de ácido láctico y pirúvico en sangre, obteniéndose unos resultados dentro de los rangos adecuados. También fue analizada la relación β -hidroxibutirato/acetoacetato, consiguiendo unos resultados normales, descartando así una disfunción mitocondrial asociada a la concentración de los mismos. Además, se cuantificó la concentración de aminoácidos en sangre, descartándose una deficiencia de piruvato deshidrogenasa; así como la de los ácidos orgánicos a nivel de orina, excluyendo la existencia de aciduria dicarboxílica en la paciente.

Por otra parte, se analizaron los niveles de carnitina libre y total, estableciéndolos dentro de los rangos correctos. Sin embargo, posteriormente, la paciente comenzó a tomar Carnicor como tratamiento de la miopatía.

5.3. ESTUDIO GENÉTICO

Dado que en el hospital 12 de Octubre de Madrid se diagnosticó a la paciente con deficiencia de citocromo C oxidasa, seguidamente se efectuó un estudio genético para analizar la mutación existente. En dicho estudio se descartó la presencia de deleciones únicas y múltiples en el DNA mitocondrial de la paciente. Por ello, se decidió realizar un estudio genético más exhaustivo en el Grupo de Biogénesis y Patología Mitocondrial de la facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, dirigido por el Doctor Julio Montoya, dada su elevada experiencia en el campo de las enfermedades mitocondriales y el sistema de fosforilación oxidativa.

Se llevó a cabo la secuenciación del mtDNA de la paciente, encontrándose diversos polimorfismos (Véase Tabla 8), además de una sustitución de una guanina por una adenosina en posición 7637 del mtDNA (m.7637A>G) (Véase Figura 7). Esta mutación estaba presente el gen *MT-CO2*, que codifica la subunidad 2 del complejo IV de la cadena respiratoria o citocromo C oxidasa [26].

Tabla 8. Polimorfismos encontrados tras llevar a cabo la secuenciación completa del mtDNA de la paciente 2446.

POLIMORFISMOS DEL mtDNA del paciente 2446			
m.73 A>G	m.2706 A>G	m.10550 A>G	m.14167 C>T
m.263 A>G	m.3480 A>G	m.11299 A>C	m.14766 C>T
m.nt311(ins C)	m.3552 T>C	m.11467 A>G	m.14798 T>C
m.nt315(ins C)	m.4769 A>G	m.11719 G>A	m.15326 A>G
m.497 C>T	m.7028 C>T	m.11194 G>A	m.16224 T>C
m.750 A>G	m.8860 G>A	m.12103 C>T	m.16311 T>C
m.1189 T>C	m.9055 G>A	m.12308 A>G	m.16519 T>C
m.1438 A>G	m.9698 T>C	m.12372 G>A	
m.1811 A>G	m.10348 A>G	m.12406 G>A	

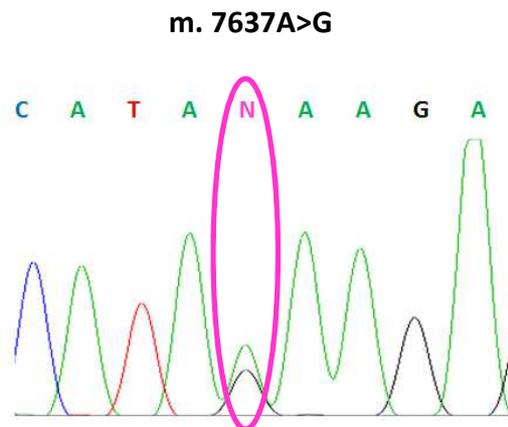


Figura 7. Representación de la mutación a nivel de mtDNA de la paciente 2446. Con un círculo rosa se muestra la presencia de una mutación en posición 7637 del mtDNA (m. 7637A>G).

La mutación genera un cambio de un glutámico por una lisina (E18K) en COX2, por el que la proteína podría dejar de ser funcional y generarse una deficiencia del complejo IV de la cadena respiratoria.

Por otro lado, una vez estudiada la mutación, se realizó una RFLP-PCR con la enzima Eam11044I (*EarI*) de muestras de mtDNA procedente de sangre, orina y mucosa bucal de la paciente (2446), así como mtDNA proveniente de muestras de sangre y mucosa

bucal de su madre 2499 y su hermana mayor (2498). Se observó que la paciente presentaba una mutación en heteroplasmia, ya que la enzima cortaba el alelo normal en fragmentos de 619 y 297bp (Véase Figura 8). Tanto la madre como la hermana de la paciente presentaban DNA mutante, pero ninguna de ellas presentaba ningún signo ni síntoma de deficiencia de citocromo C oxidasa.

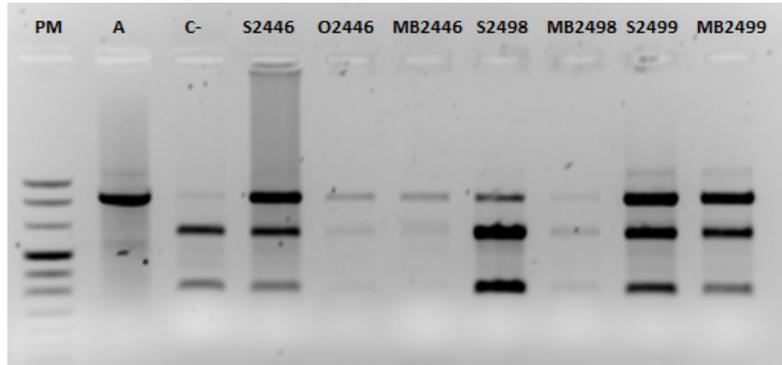


Figura 8. RFLP de mtDNA de la paciente (2446) y de su hermana (2498) y de su madre (2499). PM se refiere al marcador de peso molecular; A, al DNA amplificado; C-, al control negativo. Las muestras procedentes de sangre se denotan con una S; las de orina con una O; y las de mucosa bucal, MB.

Para determinar si la mutación puntual encontrada era patogénica, se siguieron los criterios de patogenicidad de mutaciones puntuales del DNA mitocondrial descritas por Julio Montoya (Montoya, J., et al 2009) [3]:

- La mutación debe estar presente en los pacientes y ausente en los controles.
- La mutación debe encontrarse en fondos genéticos mitocondriales diferentes.
- La mutación debe ser la mejor variante de mtDNA candidata a ser patológica.
- El porcentaje de la mutación debe correlacionar con el fenotipo.
- La mutación debe afectar nucleótidos conservados altamente evolutivos.
- La mutación debe afectar dominios funcionalmente importantes.
- La transferencia del mtDNA mutado a otra línea celular debe ir acompañada de la transferencia de la célula o defecto molecular [3].

En el caso de la paciente 2446, todos los criterios se cumplían:

- Tras realizar RFLP-PCR de muestras de la paciente y de muestras control, se demostró que la mutación solamente estaba presente en las de la paciente.
- Después de examinar las pruebas bioquímicas llevadas a cabo en las muestras de la paciente, se analizaron posibles mutaciones relevantes en el caso de la deficiencia de citocromo C oxidasa, pero se demostró posteriormente que la mutación descrita era la mejor candidata a ser patológica.
- El porcentaje de la mutación se correlacionaba con el fenotipo, ya que la paciente presenta la sintomatología general de una deficiencia del complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial, a pesar de no poder clasificar a la paciente en ninguno de los subtipos existentes de la enfermedad [19, 20] y sin embargo, sus familiares con menor porcentaje de mutación (madre y hermana sana) no presentan ninguna sintomatología.
- La mutación se encuentra en una zona muy conservada evolutivamente en todo tipo de animales (prácticamente del 100%), incluso en el dominio protista (81,25% de conservación), dada la naturaleza endosimbionte de las mitocondrias. Esta elevada conservación se debe a la importancia funcional, dado que se encuentra en el centro catalítico del complejo multienzimático IV de la cadena respiratoria (Véase Figura 9). Así pues, una simple modificación de un aminoácido (Véase Figura 10), genera la patología mitocondrial.

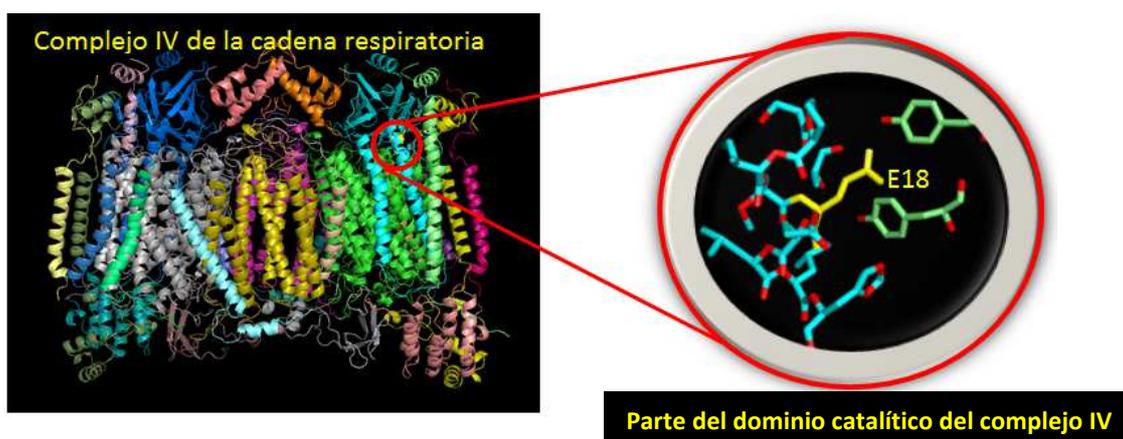


Figura 9. Representación en PyMol del complejo CIV de la cadena respiratoria mitocondrial (1OCC). En un círculo rojo se muestra aumentado el aminoácido glutámico 18 (E18) que es el que resulta sustituido en la paciente 2446 y que se encuentra en el domino catalítico de la enzima.

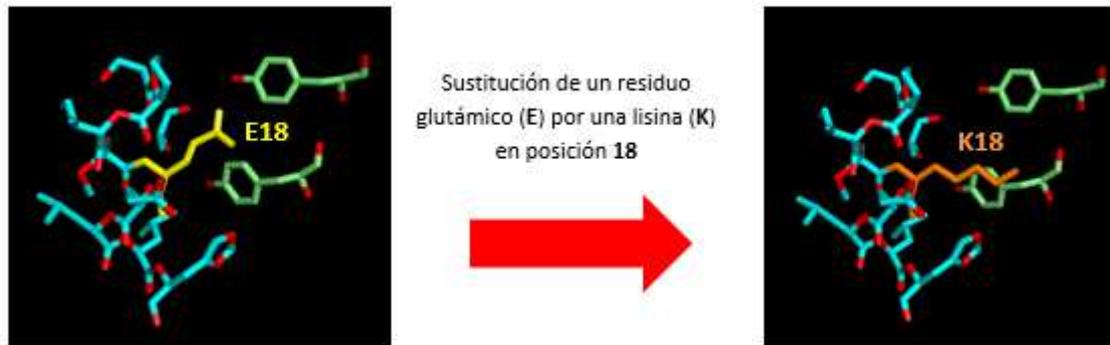


Figura 10. Representación en PyMol de la mutación E18K del complejo CIV de la cadena respiratoria mitocondrial (1OCC). La imagen de la izquierda muestra el residuo glutámico en posición 18 en color amarillo en un individuo normal. A la derecha se muestra en color naranja el residuo mutado (glutámico por lisina) en la paciente 2446.

- A pesar de las anteriores afirmaciones, es difícil establecer por completo el carácter patogénico de la mutación, ya que los fondos genéticos mitocondriales o nucleares, así como el ambiente, pueden actuar como factores modificadores del fenotipo. Por ello, la mejor forma de saber si la mutación era patológica era la construcción de híbridos transmitocondriales con el mtDNA de la paciente.

5.4. CONSTRUCCIÓN DE CÍBRIDOS Y COMPROBACIÓN DEL NIVEL DE mtDNA MUTANTE

Dada la importancia de determinar la gravedad y patogenicidad de la mutación m.7637A>G, mi trabajo consistió en la construcción de híbridos transmitocondriales con un fondo genético nuclear de la línea celular ρ^0 de adenocarcinoma A549 [23] y un DNA mitocondrial procedente de las plaquetas de la paciente (2446) con la mutación citada.

Una vez sintetizados los híbridos, se comprobó si se había transferido del mtDNA mutado de las plaquetas de la paciente a la línea celular ρ^0 A549. Para ello, se extrajo el DNA de los híbridos a partir de un extracto de cultivo celular y se realizó una RFLP-PCR con el fin de comprobar el patrón de bandas generado por la enzima *EarI*. En primer lugar, se amplificó la zona de 916 bp en la que debía encontrarse la mutación m.7637A>G y seguidamente se llevó a cabo una electroforesis. Se pudo comprobar por

medio de esta técnica que se había amplificado dicho fragmento de 916 bp del mtDNA tanto de los controles como del híbrido A549 2446 (Véase Figura 11).

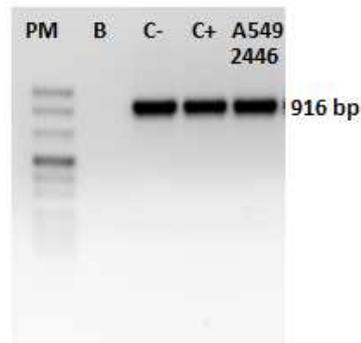


Figura 11. Resultados de la electroforesis del fragmento de mtDNA estudiado en el híbrido A549 2446. PM se refiere al marcador de peso molecular; B, al blanco de la reacción; C-, al control negativo; C+, al control positivo.

Posteriormente, se realizó una RFLP-PCR empleando la enzima de restricción *EarI* que reconoce el alelo normal de mtDNA y lo corta en dos fragmentos (619 y 297 bp). Con esta digestión se demostró que la mutación m.7637A>G de la paciente 2446 se había transferido al híbrido A549 2446 en heteroplasmia, dado tras realizar una electroforesis de los fragmentos digeridos se obtuvo una banda a 916bp (correspondiente al alelo mutado, al no haber sido cortado por la enzima), además de las dos bandas generadas por el corte con la enzima del alelo normal (619 y 297 bp) (Véase Figura 12).

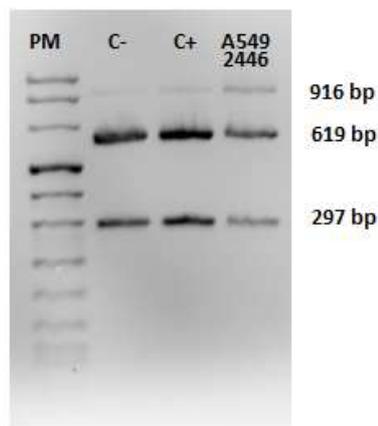


Figura 12. Resultados de la RFLP-PCR de los híbridos A549 2446. PM representa el marcador de peso molecular; C- es el control negativo; C+ es el control positivo; A549 2446 es el híbrido estudiado.

No obstante, el nivel de alelo mutante no era tan alto como para superar el umbral mínimo de mutación para alterar la cadena respiratoria (11,72% de mutación) (Véase Figura 13).

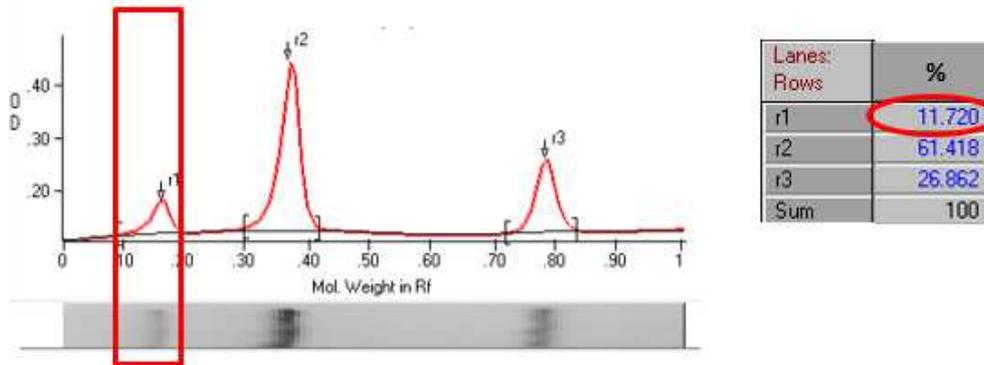


Figura 13. Análisis del nivel de heteroplasma del híbrido A549 2446 con el programa Gel-Pro Analyzer. En la gráfica de la izquierda, recuadrado en rojo, se muestra la banda que se corresponde con el alelo mutado. La tabla de la derecha representa el porcentaje de alelo mutado (11,72 %).

5.5. DISMINUCIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS DE mtDNA Y SELECCIÓN DE LOS CLONES

Debido a la baja densidad de mutación en el híbrido A549 2446, había que intentar aumentar el nivel de mtDNA mutante para que se superase el umbral de patogenicidad y pudiera estudiarse cómo afectaba la mutación a la cadena respiratoria mitocondrial. Para ello, se decidió realizar un tratamiento con bromuro de etidio en una concentración adecuada para que solo se afectara el mtDNA y no el nDNA. Tras disminuir el número de copias de mtDNA, se realizó una dilución al límite con el fin de que hubiese una o ninguna copia de dicho DNA por célula. Por tanto, si una de las células adicionadas a uno de los pocillos de una placa de 96 pocillos poseía únicamente el mtDNA mutante, al ir creciendo, se podía aislar y estudiar.

Tras ir seleccionando clones durante muchos meses, al final se consiguieron aislar ocho clones. Realizando RFLP-PCR en muestras aisladas de mtDNA de cada uno de ellos, se obtuvieron clones con distinto nivel de mtDNA mutante (Véase Figura 14, Figura 15 y Figura 16).

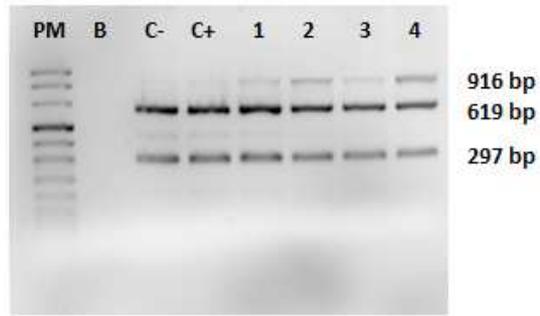


Figura 14. Resultados de la RFLP-PCR de los clones 1, 2, 3 y 4. PM representa el marcador de peso molecular; C- es el control negativo; C+ es el control positivo.

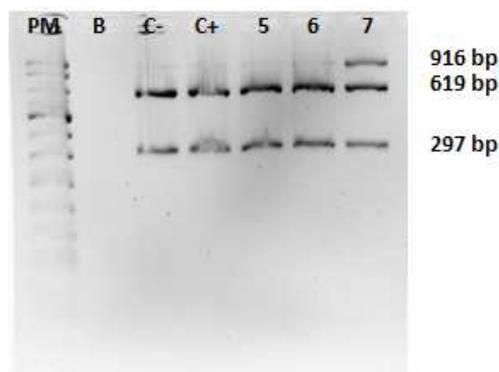


Figura 15. Resultados de la RFLP-PCR de los clones 5, 6 y 7. PM representa el marcador de peso molecular; C- es el control negativo; C+ es el control positivo.

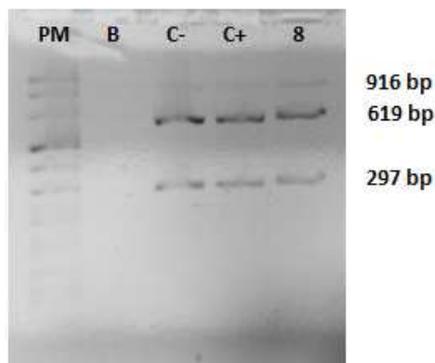


Figura 16. Resultados de la RFLP-PCR del clon 8. PM representa el marcador de peso molecular; C- es el control negativo; C+ es el control positivo.

Analizando la densidad de mtDNA mutante de cada uno de ellos, el clon escogido como “control” para el resto de experimentos del trabajo fue el clon 1, por su bajo

nivel de mutación (2,01%) (Véase Figura 17). El elegido como “mutante” por su mayor nivel de mtDNA mutado (21,15%) fue el clon 7 (Véase Figura 18).

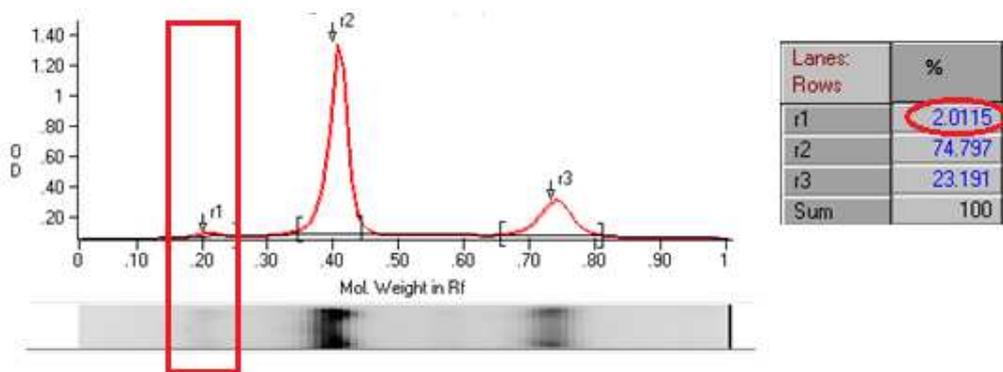


Figura 17. Análisis del nivel de heteroplasmia del clon 1 con programa Gel-Pro Analyzer. En la gráfica de la izquierda, recuadrado en rojo, se muestra la banda que se corresponde con el alelo mutado. La tabla de la derecha representa el porcentaje de alelo mutado (2,01 %).

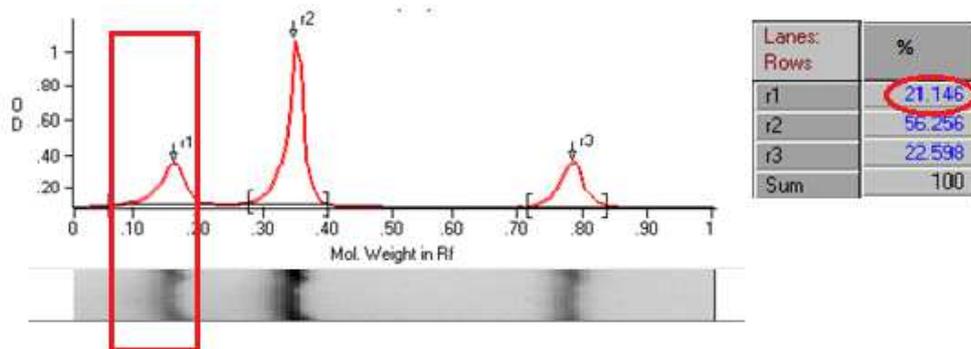


Figura 18. Análisis del nivel de heteroplasmia del clon 7 con programa Gel-Pro Analyzer. En la gráfica de la izquierda, recuadrado en rojo, se muestra la banda que se corresponde con el alelo mutado. La tabla de la derecha representa el porcentaje de alelo mutado (21,15 %).

5.6. CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS DE mtDNA

Para garantizar que la cantidad de mtDNA había llegado a un nivel basal tras la generación de los cíbridos y selección de los clones, se cuantificó el número de copias de mtDNA en los cíbridos control y en los mutantes por medio de una *real time* PCR. En el control se obtuvo una relación mtDNA/nDNA de 155,64 y en el mutante, 175,00 (Véase Figura 19).

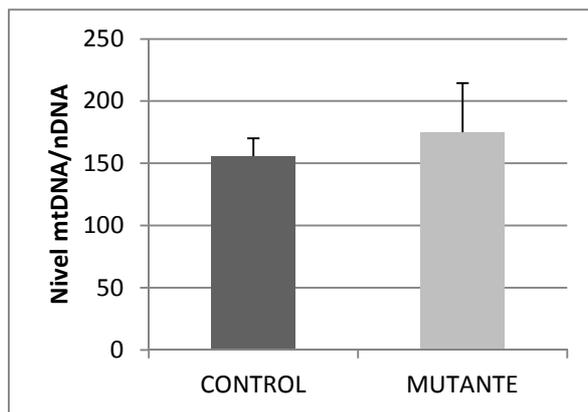


Figura 19. Niveles de mtDNA/nDNA en el cíbrido control y el cíbrido mutante. CONTROL: 155,64 ± 14,50; MUTANTE: 175,00 ± 39,56.

Por la experiencia del laboratorio el nivel de esta línea celular (A549) tiene un nivel mtDNA/nDNA de 200, por lo que los valores obtenidos son un poco más bajos. Sin embargo, se encuentran cerca del proceso de estabilización para alcanzar los niveles normales.

5.7. CUANTIFICACIÓN DE LA CANTIDAD DE COX POR WESTERN BLOT

El western blot es una técnica importante utilizada en biología molecular y celular con la que es posible identificar proteínas específicas a partir de una mezcla compleja de proteínas extraídas de las células.

Dado que la mutación m.7637A>G afecta a la correcta codificación del complejo IV de la cadena respiratoria, se intentó analizar la presencia de dicho complejo en los cíbridos control y mutantes por medio de una inmunodetección por western blot con un anticuerpo primario frente a la subunidad 1 de la citocromo c oxidasa.

A pesar de los esfuerzos invertidos, no se observó banda alguna en el western blot. Es posible que no se detectaran bandas debido a una baja concentración de proteínas cargada en el gel de electroforesis. No obstante, el problema podría ser debido a que el anticuerpo anti COX1 no funcionó de manera adecuada y no se conjugó con la subunidad 1 de la citocromo C oxidasa.

Por si el experimento no salía a causa de la poca especificidad del anticuerpo, se probó con otro anticuerpo secundario, anti-COX2, pero tampoco fue posible encontrar bandas en la autorradiografía. Por ello, lo más probable era que la muestra no estuviera bien y la concentración de citocromo c oxidasa fuera tan pequeña que sería imposible detectarla.

5.8. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD Y CANTIDAD DE COX

La mutación m.7637A>G afecta a la correcta codificación del complejo IV o citocromo C oxidasa, por lo que resultaba interesante analizar la actividad de dicho complejo enzimático. Además, el análisis del complejo IV es una de las formas más utilizadas para estudiar la funcionalidad del sistema OXPHOS. Esto es debido a que es el último de los complejos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial y su función es la de catalizar la oxidación del citocromo C con la consiguiente reducción del O₂ para dar H₂O, por lo que es un excelente indicador de la eficiencia de la respiración mitocondrial.

El kit comercial empleado permitía analizar la actividad y la cantidad de complejo IV en un mismo pocillo de una placa de 96 pocillos. Para que el resultado fuera representativo, se realizó el análisis de las muestras por triplicado.

Los datos de actividad frente a cantidad de complejo IV mostraron una disminución de dicho parámetro en los híbridos mutantes respecto del control (Véase Figura 20).

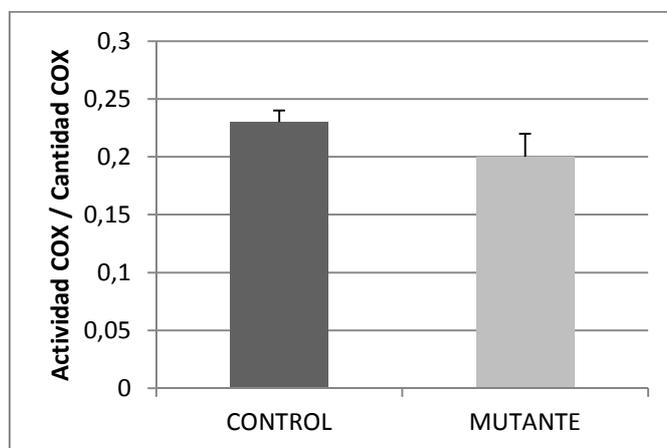


Figura 20. Actividad citocromo C oxidasa (COX) frente a cantidad de citocromo C oxidasa en híbridos control y mutantes. CONTROL: 0,23 ± 0,01; MUTANTE: 0,20 ± 0,02.

Como la disminución citada no fue significativa (*p=0,3483), se decidió realizar un análisis paralelo de la actividad específica de la enzima citrato sintasa al tratarse de un marcador de biogénesis mitocondrial. En este caso se observó un aumento significativo (*p=0,0008) de la actividad de la citrato sintasa (CS) en las células mutantes respecto de las control, lo que indicaba que se estaban sintetizando más mitocondrias en los cíbridos mutantes para poder hacer frente a la mayor concentración de alelo mutante (Véase Figura 21).

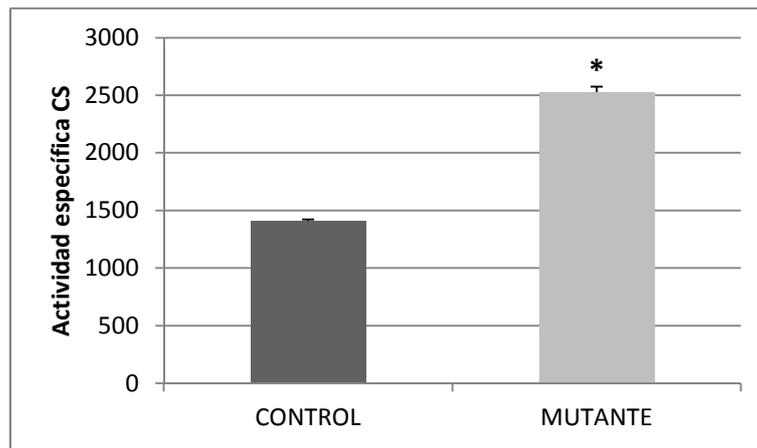


Figura 21. Actividad específica de la enzima Citrato Sintasa (CS) en cíbridos control y mutante. CONTROL: 1409,17 ± 12,45; MUTANTE: 2528,17 ± 45,55. *p = 0,0008.

La actividad citrato sintasa se utiliza como una medida de la cantidad mitocondrial de una muestra, por lo que es útil para normalizar los valores de actividad de las enzimas del sistema OXPHOS. Por tanto, Para analizar los valores de actividad y cantidad de COX por mitocondria, se dividieron los valores obtenidos por los de la citrato sintasa y se obtuvo una disminución significativa de la actividad (*p=0,0176) y de la cantidad de COX (*p=0,0008) (Véase Figura 22 y Figura 23), debido a la existencia de mayor cantidad de mutación en el cíbrido mutante que en el control.

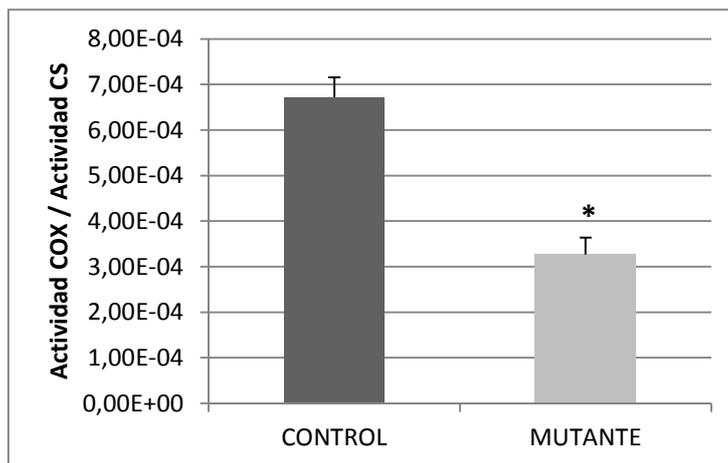


Figura 22. Actividad citocromo C oxidasa (COX) frente a actividad de citrato sintasa (CS) en cíbridos control y mutante. CONTROL: $6,72 \times 10^{-4} \pm 4,35 \times 10^{-5}$; MUTANTE: $3,27 \times 10^{-4} \pm 3,69 \times 10^{-5}$. * $p=0,0176$.

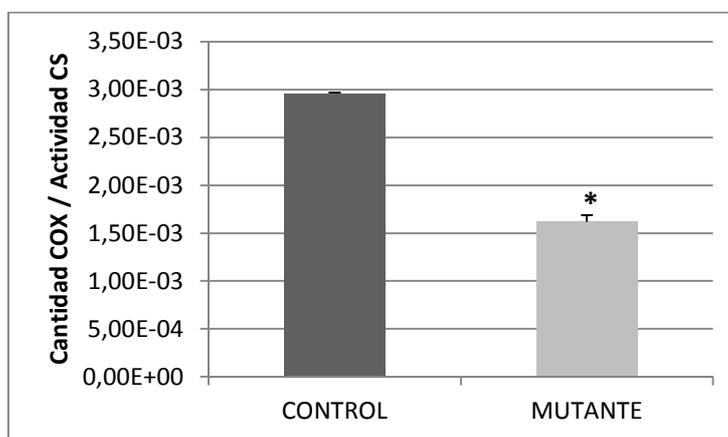


Figura 23. Cantidad de citocromo C oxidasa (COX) frente a actividad de citrato sintasa (CS) en cíbridos control y mutante. CONTROL: $2,96 \times 10^{-3} \pm 7,73 \times 10^{-6}$; MUTANTE: $1,62 \times 10^{-3} \pm 6,98 \times 10^{-5}$. * $p=0,0008$.

5.9. MEDIDA DEL CONSUMO DE OXÍGENO

Para medir funcionamiento de la cadena de transporte de electrones se estudió el consumo de oxígeno a partir de células intactas utilizando un respirómetro de alta resolución (Oroboros®).

En el experimento se empleó una línea celular A549 que se analizó como un control de cómo tendría que ser la respiración en el cíbrido control (Véase Figura 24).

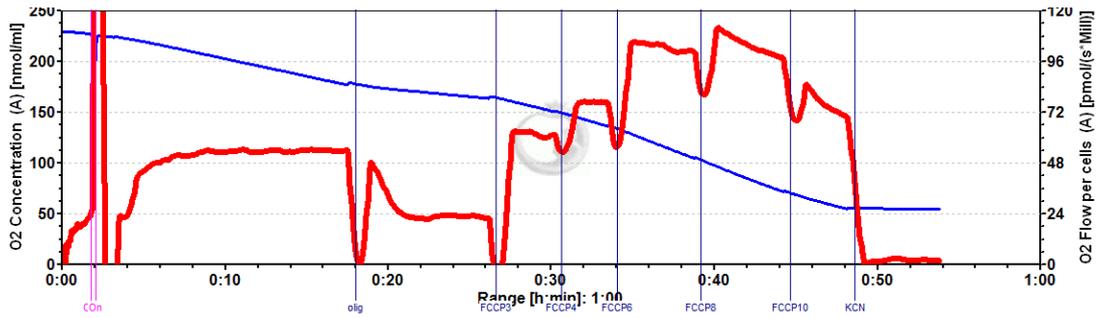


Figura 24. Consumo de oxígeno de la línea celular A549 empleadas como control de la respiración. En azul se muestra la concentración de oxígeno y el rojo, el consumo de oxígeno a lo largo del tiempo. Los eventos señalados se corresponden a la adición de oligomicina, FCCP y KCN.

Por otro lado, analizando los cíbridos con bajo y alto porcentaje de mutación, se observó que la respiración endógena era el doble en el de bajo porcentaje (“control”) respecto al de mayor porcentaje (“mutante”). Tras añadir oligomicina se midió la respiración no acoplada a la síntesis de ATP: el consumo de oxígeno fue disminuyendo tanto en el mutante como en el control. Pero al ir adicionando pequeñas dosis del desacoplante FCCP, se observó casi el doble de respiración máxima del sistema de transporte electrónico en el control que en el mutante (Véase Figura 25 y Figura 26).

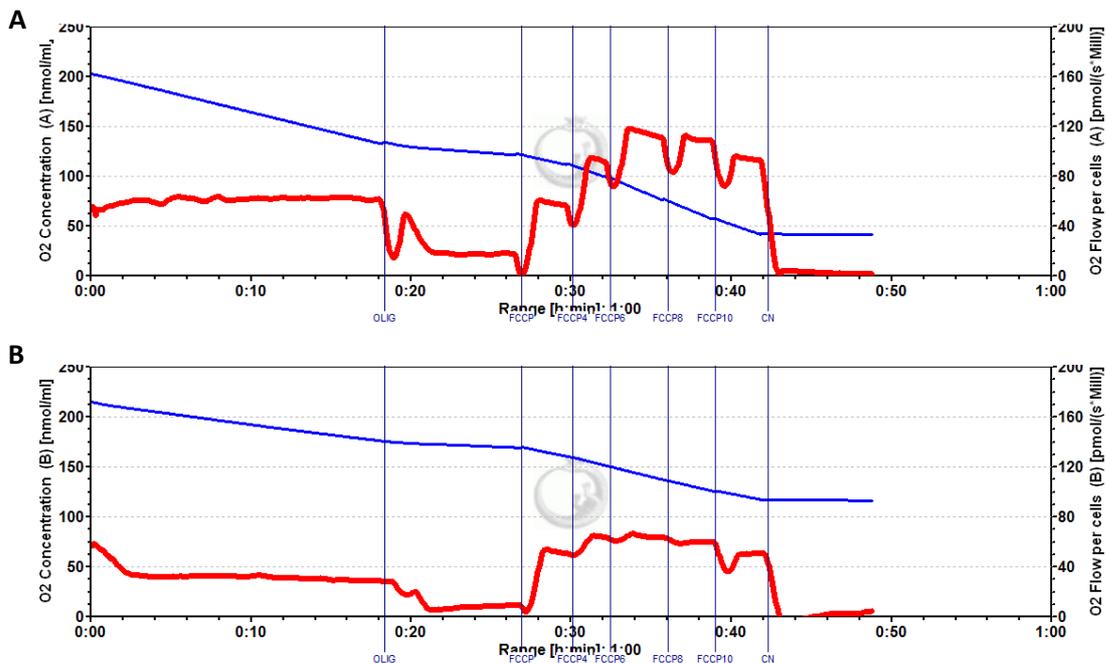


Figura 25. Consumo de oxígeno de los cíbridos control (A) y de los cíbridos mutantes (B). En azul se muestra la concentración de oxígeno y el rojo, el consumo de oxígeno a lo largo del tiempo. Los eventos señalados se corresponden a la adición de oligomicina, FCCP y KCN.

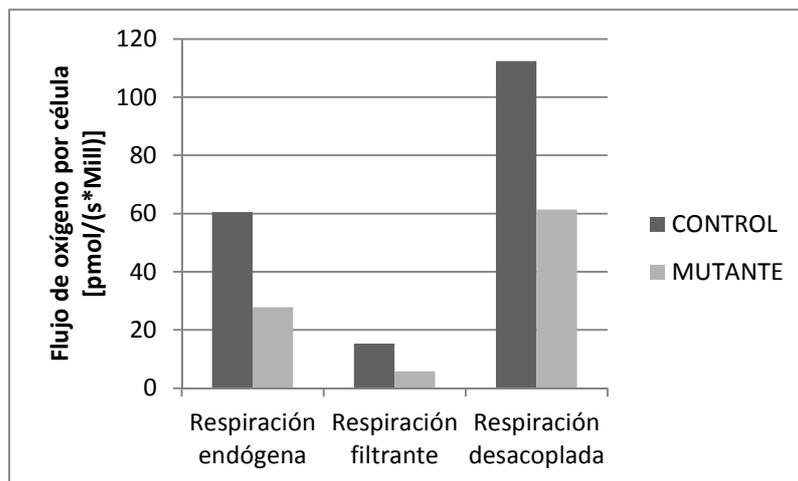


Figura 26. Flujo de oxígeno por célula (pmol/(s*Millón de células) en la muestra control y mutante. En la gráfica se muestran las tasas de respiración endógena, filtrante y desacoplada de las muestras control y mutante.

Para expresar la tasa de consumo por unidad de la cadena respiratoria, se realiza el cociente de los datos de consumo entre los de la citrato sintasa, obteniéndose unos resultados comparables a los anteriores (Véase Figura 27).

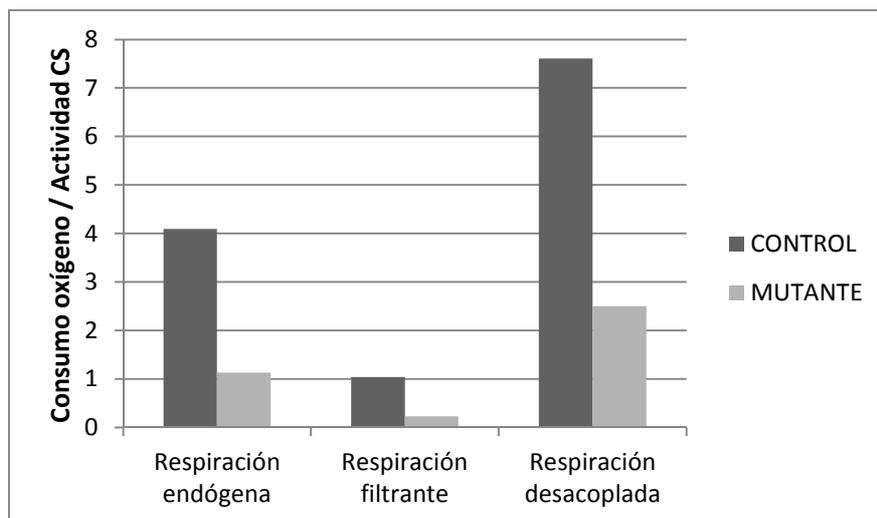


Figura 27. Tasa de consumo de oxígeno por unidad de la cadena respiratoria (consumo de oxígeno/actividad de citrato sintasa o CS). En la gráfica se muestran las tasas de respiración endógena, filtrante y desacoplada de las muestras control y mutante.

Al no recuperarse el consumo de oxígeno en el mutante tras haber añadido la FCCP, esto indicaba que la cadena respiratoria mitocondrial es deficiente.

6. DISCUSIÓN

Las mitocondrias desempeñan un papel fundamental en la síntesis de energía metabólica (ATP) en las células eucariotas a través del proceso de fosforilación oxidativa. Por lo tanto, los trastornos mitocondriales son causados por la deficiente función de la cadena respiratoria, llegando a producir distintas patologías [3, 5, 7, 10].

El asesoramiento genético es complicado porque las subunidades de la cadena respiratoria son codificadas por los dos sistemas genéticos celulares (nDNA y mtDNA). Las mutaciones presentes en el DNA mitocondrial son especialmente difíciles de analizar debido a la complejidad de la genética mitocondrial: el DNA mitocondrial se hereda por vía materna; hay una gran cantidad de copias de DNA mitocondrial en las células; los individuos afectados a menudo presentan heteroplasmia (mezcla de mtDNA normal y mutado). Por otro lado, el nivel de mtDNA mutado puede variar ampliamente entre los diferentes individuos emparentados (incluso en tejidos del mismo paciente) y se requiere un umbral mínimo de dicho mtDNA para alterar la función de la cadena respiratoria; y no siempre existe una buena correlación entre el genotipo y el fenotipo [3, 5, 7, 10, 13].

El presente Trabajo de Fin de Máster está basado en el estudio de una nueva mutación mitocondrial presente en la paciente 2446 diagnosticada previamente con déficit en el complejo IV o citocromo C oxidasa de la cadena mitocondrial. Llevando a cabo la secuenciación completa del mtDNA de la paciente 2446, se descubrieron diversos polimorfismos (Véase Tabla 8), además de la mutación que debía de ser la causante de la deficiencia de citocromo C oxidasa: una sustitución de una adenina (A) por una guanina (G) en posición 7637 (m.7637A>G) en el gen *MT-CO2* del mtDNA. Dicho gen codifica una proteína COX2 no funcional que es la responsable de la afección mitocondrial de la paciente.

Por otro lado, se sabe que en los últimos años se han realizados importantes investigaciones que pretendían entender el funcionamiento del sistema OXPHOS y su implicación en las enfermedades mitocondriales. No obstante, a pesar de los avances conseguidos, en multitud de pacientes estudiados existe una amplia diversidad en el perfil de expresión de los genes mutados. Este era el caso de la paciente 2446, ya que a

pesar de que su madre y su hermana tienen la misma mutación, ninguna de ellas presenta fenotipo mutante y están completamente sanas. Por todo ello, es importante hacer uso de modelos moleculares útiles que ayuden a esclarecer dicha cuestión. Una de las mejores técnicas de estudio de las enfermedades mitocondriales es la generación de cíbridos transmitocondriales que permiten analizar la mutación del mtDNA con un mismo DNA nuclear. Dicha técnica fue empleada en este Trabajo de Fin de Máster por medio de la fusión de la línea celular ρ^0 A549 con plaquetas de la paciente 2446, permitiéndose de esta forma conocer los efectos de la mutación mitocondrial m.7637A>G sin influencia del DNA nuclear.

Tras analizar el nivel de heteroplasma de los cíbridos construidos (A549 2446), se consiguió un nivel bastante bajo (11,72%), por lo que debía de aumentarse el número de mtDNA para que se superase el umbral de patogenicidad de la mutación. Para solventar el problema fue necesario hacer un tratamiento con bromuro de etidio de los cíbridos y así disminuir el número de mtDNA que contenían. El EtBr es un agente intercalante del DNA, por lo que si la célula no tiene DNA, no es viable. Además, este agente afecta tanto al mtDNA como al nDNA, por lo que en este experimento se tenía que emplear a una concentración adecuada para que no afectara al nDNA.

Realizando una dilución al límite de los cíbridos tratados con EtBr y tras un costoso proceso de crecimiento y selección, se lograron aislar 8 clones de los cíbridos A549 2446 con distinto porcentaje de mtDNA. Los clones elegidos para estudios posteriores fueron dos: el clon 1 (con muy bajo porcentaje de mutación) y el clon 7 (con mayor porcentaje de mtDNA). A partir de dicho instante se empleó el clon 1 como control del mutante 7.

Las actividades de los complejos multienzimáticos del sistema OXPHOS se encuentran bajo el control de los niveles de mtDNA, dado que algunas subunidades se encuentran codificadas en dicho genoma mitocondrial [5]. Para asegurar que la cantidad de mtDNA había llegado a un nivel normal tras la generación de los cíbridos y selección de los clones, se cuantificó el número de copias de mtDNA en los cíbridos control y en los mutantes por medio de una *real time* PCR. Por la experiencia del laboratorio el nivel de esta línea celular (A549) tiene un nivel mtDNA/nDNA de 200, por lo que los

valores obtenidos son un poco más bajos. Sin embargo, se encuentran cerca del proceso de estabilización para alcanzar los niveles normales y no creemos que estos niveles ligeramente disminuidos pudieran influir en el fenotipo de dichos híbridos.

Por otro lado, se realizó un western blot con un anticuerpo primario frente a la subunidad 1 del complejo IV para detectar la presencia de dicho complejo en los clones. Sin embargo, este experimento fue fallido porque no se obtuvo ninguna banda. Se intentó realizar de nuevo el western blot pero con otro anticuerpo frente a la subunidad 2 del complejo IV, pero tampoco se apreció banda alguna. Podría ser que no se hubiera logrado obtener proteína o que la concentración de la misma fuera muy baja, por lo que posteriormente se decidió detectar la cantidad de proteína con un kit comercial (Complex IV Human Duplexing (Activity + Quantity) Microplate Assay Kit de MitoSciences (Abcam)) para esclarecer el problema. Dicho kit sí que detectó la presencia de proteína citocromo C oxidasa tanto en el híbrido control como en el mutante, pero a lo mejor debido a la baja cantidad de proteína, no se pudo detectar con el western blot.

El análisis de la actividad específica de la citrato sintasa mostró un aumento en el clon mutante frente al control, dado que esta enzima es un marcador de biogénesis mitocondrial. Es decir, al tener mayor cantidad de mtDNA mutante, el clon mutado debe hacer frente a la afección por medio de la síntesis de más mitocondrias y así aumentar el número de mtDNA normal. A este fenómeno se le conoce como compensación mitocondrial.

La actividad y la cantidad de complejo IV normalizadas con los valores de la citrato sintasa indicaron una disminución significativa en ambos parámetros en el híbrido mutante. Esto indicaba que el citado híbrido no había logrado sintetizar una cantidad adecuada de complejo IV funcional por la presencia de la mutación (m.7637A>G) y, por ello, la actividad de la enzima era más baja que la detectada en el control.

Por otro lado, para analizar cómo funcionaba la cadena de transporte electrónico, se realizó un respirometría de alta resolución de los clones estudiados. La respiración endógena era más baja en el clon mutante que en el control, es decir, que con la mutación m.7637A>G no se lograba codificar complejo IV que funcionara

adecuadamente como en el control y el sistema de fosforilación oxidativa no lograba una efectividad máxima. Esto se correlacionaba con el hecho de que la actividad del complejo IV era significativamente menor en el híbrido mutante y, por tanto, la función mitocondrial se veía alterada.

Seguidamente se analizó la tasa de respiración filtrante de las muestras por adición de oligomicina, que es un inhibidor de la ATP sintasa. Como en los dos casos se disminuyó el valor de dicha tasa, se adicionó el desacoplante FCCP para poder obtener un valor de respiración máxima, ya que al añadir dicha sustancia se produce paso de electrones a través de la cadena de transporte electrónico sin estar acoplada a la síntesis de ATP. En el caso del mutante, dicho valor era prácticamente la mitad del control, por lo que el problema era grave. A pesar de ser una mutación puntual y de que el híbrido mutante estudiado presentaba solamente un 21,15% de mutación, el complejo IV no es funcional y hace que la citocromo C no se activa y, en consecuencia, la cadena de transporte electrónico mitocondrial no funcione adecuadamente.

En resumen, esta nueva mutación puede afectar de manera severa al portador de la misma dependiendo del nivel de mutación presente en sus tejidos ya que a bajos porcentajes no hemos encontrado afectación fenotípica y a porcentajes intermedios se manifiesta una marcada deficiencia de la actividad respiratoria. Por ello, estos experimentos realizados, además de otros adicionales, así como seguir consiguiendo clones con una alta tasa de mtDNA mutante, pueden ayudar a conocer más el tipo de deficiencia de citocromo C oxidasa causada por la mutación m.7637A>G y ayudar de esta forma a pacientes (como la descrita en el trabajo) de manera eficaz.

7. CONCLUSIONES

Las conclusiones que se han extraído de la elaboración de este Trabajo de Fin de Máster son las siguientes:

- Se logró generar cíbridos transmitocondriales con fondo genético nuclear procedente de la línea celular A549 y fondo genético mitocondrial procedente de las mitocondrias de la paciente 2446 para comprobar la patogenicidad de la mutación m.7637A>G.
- Se cuantificó el nivel de heteroplasmia mitocondrial de los cíbridos por medio de una RFLP-PCR, obteniéndose un bajo nivel de mtDNA mutante.
- Se disminuyó el número de copias de mtDNA por medio de un tratamiento con bromuro de etidio, obteniéndose distintos clones con diferente nivel de DNA mutante.
- Se realizaron estudios funcionales a partir de clones del cíbrido construido: se estudió el número de copias de mtDNA mutante, la cantidad y actividad del complejo IV de la cadena respiratoria y la tasa de respiración mitocondrial en el clon con mayor nivel de mtDNA mutante, determinándose una disfunción del complejo IV y como consecuencia, una disfunción de la cadena respiratoria.

7. CONCLUSIONS

The conclusions drawn from the preparation of this Master's Degree Project are the following:

- *It was possible to generate transmitochondrial cybrids with nuclear genetic background from the A549 cell line and mitochondrial genetic background from the mitochondria of the patient 2446 to verify the pathogenicity of the m.7637A> G mutation.*
- *The level of mitochondrial heteroplasmy of the cybrids was quantified by means of a RFLP-PCR, obtaining a low level of mutant mtDNA.*
- *The number of copies of mtDNA was decreased by means of a treatment with ethidium bromide, obtaining different clones with different level of mutant DNA.*
- *Functional studies were carried out from constructed cybrid clones: the copy number of mutant mtDNA, the amount and activity of the IV complex of the respiratory*

chain and the mitochondrial respiration rate in the clone with highest level of mutant mtDNA were studied, determining a dysfunction of the complex IV and as a consequence, a dysfunction of the respiratory chain.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Emelyanov, V.V., *Mitochondrial connection to the origin of the eukaryotic cell*. Eur J Biochem, 2003. 270(8): p. 1599-618.
2. Giezen, M.v.d., *Mitochondria and the Rise of Eukaryotes*. BioScience, 2011. 61 (8): 594-601.
3. Montoya, J., et al., *20 years of human mtDNA pathologic point mutations: carefully reading the pathogenicity criteria*. Biochim Biophys Acta, 2009. 1787(5): p. 476-83.
4. Cooper, G.M., *The Cell: A Molecular Approach*. 5nd edition. ed. 2009, Sunderland (MA): Sinauer Associates.
5. Montoya, J., *Del genoma mitocondrial a la enfermedad*. 2010: Prensas Universitarias de Zaragoza.
6. Pérez, M.J.L. and J. Montoya, *Capítulo II: Sistema genético mitocondrial humano*, in *Sistema Mitocondrial: Un reto en la medicina humana*. 2012, Eds. Instituto de España. Real Academia de Farmacia (Monografía XXXVI). Madrid. p. 31-46.
7. Montoya, J., et al., *Capítulo VII: Enfermedades del ADN mitocondrial*, in *Sistema Mitocondrial: Un reto en la medicina humana*. 2012, Instituto de España. Real Academia de Farmacia (Monografía XXXVI). Madrid. p. 129-154.
8. Anderson, S., et al., *Sequence and organization of the human mitochondrial genome*. Nature, 1981. 290(5806): p. 457-65.
9. Fernandez-Silva, P., J.A. Enriquez, and J. Montoya, *Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA*. Exp Physiol, 2003. 88(1): p. 41-56.
10. Dimauro, S. and G. Davidzon, *Mitochondrial DNA and disease*. Ann Med, 2005. 37(3): p. 222-32.
11. Wilkins, H.M., S.M. Carl, and R.H. Swerdlow, *Cytoplasmic hybrid (cybrid) cell lines as a practical model for mitochondrial pathies*. Redox Biol, 2014. 2: p. 619-31.
12. Sutovsky, P., E. Neuber, and G. Schatten, *Ubiquitin-dependent sperm quality control mechanism recognizes spermatozoa with DNA defects as revealed by dual ubiquitin-TUNEL assay*. Mol Reprod Dev, 2002. 61(3): p. 406-13.
13. Garrido, N., et al., *Composition and dynamics of human mitochondrial nucleoids*. Mol Biol Cell, 2003. 14(4): p. 1583-96.
14. Zeviani, M., *Mitochondrial disorders*. Suppl Clin Neurophysiol, 2004. 57: p. 304-12.

15. UniProt. *UniProtKB - P00403 (COX2_HUMAN)*. 2016 [cited May 2016]; Available from: http://www.uniprot.org/uniprot/P00403#section_comments.
16. GeneCards. *MT-CO2 Gene*. 2016 [cited May 2016]; Available from: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MT-CO2>.
17. InterPro. *Cytochrome C oxidase subunit II, transmembrane domain (IPR011759)*. 2016 [cited; Available from: <https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR011759>.
18. HumanCyc. *Gene MT-CO2*. 2016 [cited 2016 July 2016]; Available from: <http://biocyc.org/gene?orgid=HUMAN&id=HS00027>.
19. Reference, G.H. *Cytochrome c oxidase deficiency*. 2012 [cited 2016 October 2016]; Available from: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/cytochrome-c-oxidase-deficiency#>.
20. GARD. *Cytochrome c oxidase deficiency*. 2016 [cited 2016 May 2016]; Available from: <https://rarediseases.info.nih.gov/diseases/48/cytochrome-c-oxidase-deficiency>.
21. Pye, D., et al., *Production of transmitochondrial cybrids containing naturally occurring pathogenic mtDNA variants*. *Nucleic Acids Res*, 2006. 34(13): p. e95.
22. King, M.P. and G. Attardi, *Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation*. *Science*, 1989. 246(4929): p. 500-3.
23. Giard, D.J., et al., *In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors*. *J Natl Cancer Inst*, 1973. 51(5): p. 1417-23.
24. Chomyn, A., *Platelet-mediated transformation of human mitochondrial DNA-less cells*. *Methods Enzymol*, 1996. 264: p. 334-9.
25. Miller, S.W., et al., *Creation and characterization of mitochondrial DNA-depleted cell lines with "neuronal-like" properties*. *J Neurochem*, 1996. 67(5): p. 1897-907.
26. MITOMAP. *A human mitochondrial genome database*. 2016 [cited 2016]; Available from: <http://www.mitomap.org/MITOMAP>.
27. Faloon, G.R. and P.A. Srere, *Escherichia coli citrate synthase. Purification and the effect of potassium on some properties*. *Biochemistry*, 1969. 8(11): p. 4497-503.
28. DiMauro, S. and M. Mancuso, *Mitochondrial diseases: therapeutic approaches*. *Biosci Rep*, 2007. 27(1-3): p. 125-37.