



**Universidad
Zaragoza**

Trabajo Fin de Grado

Estudio de mutaciones en pacientes con enfermedades
genéticas mitocondriales.

Autor

Daniel Luis Woods Alonso

Directores

Julio Montoya

Sonia Emperador Ortiz

Facultad de ciencias

2016

Índice

• Glosario	4
• Resumen	5
• Abstract	6
• Introducción	7
○ Hipótesis de estudio	8
○ Antecedentes	8
• Objetivos	8
• Materiales	8
○ Informe del caso	8
○ Material biológico	9
○ Otros reactivos utilizados	9
○ Instrumentación	10
○ Kits comerciales	10
• Métodos	10
○ Manejo de células en cultivo	10
○ Obtención de DNA a partir de células cultivadas	11
○ Cuantificación de ácidos nucleicos	11
○ PCR-RFLP	12
○ Creación de líneas celulares transmitocondriales	13
○ Cultivo y selección de líneas celulares transmitocondriales (cíbridos)	13
○ Comprobación de la correcta formación de cíbridos	14
○ Detección de la red mitocondrial celular	14
○ Determinación del potencial de membrana	15
○ Estudios de los niveles de mtDNA	15
○ Cuantificación de proteínas mediante el método Bradford	16
○ Ensayo de la actividad y cantidad del complejo mitocondrial IV	17
○ Medida de la actividad de citrato sintasa	17
○ Medida de niveles de ATP mitocondrial	18
○ Análisis de mutación en sangre	19
○ Estudio de la influencia del medio de cultivo en la tasa de mutación	19

• Resultados	20
○ Obtención de cíbridos.	20
1. Fusión de células.	20
2. Selección de cíbridos	20
3. Comprobación de cíbridos	21
○ Ensayos bioquímicos mitocondriales.	22
1. Análisis de la red mitocondrial	22
2. Potencial de membrana mitocondrial	22
3. Análisis de los niveles de ATP	24
4. Análisis de los niveles de mtDNA en cíbridos transmitocondriales	24
5. Análisis de la actividad del complejo IV	25
○ Estudios complementarios	26
1. Variabilidad de mutación en sangre	26
2. Variabilidad de la tasa de mutación frente al medio utilizado.	27
• Discusión	28
• Conclusiones	30
• Conclusions	30
• Bibliografía	31
• Anexo I	32
• Anexo II	33

Glosario

- BSA: Albúmina Sérica Bovina.
- BrdU: Bromodesoxiuridina
- DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium.
- DMSO: Dimetilsulfóxido.
- DDM: Dodecil maltoside.
- dNTP: Desoxinucleótido trifosfato
- EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.
- SFB: Suero fetal bovino.
- LHON: Neuropatía óptica hereditaria de Leber.
- mtDNA: DNA mitocondrial.
- PBS: Phosphate buffered saline
- PCR-RFLP: Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism.
- PEG: Polietilenglicol.
- PVDF: Fluoruro de polivinilideno.
- rRNA: RNA ribosómico.
- RT-PCR: Real Time PCR.
- SDS: Dodecilsulfato sódico
- TBE: Tris, borato y EDTA.
- TE: Tris:EDTA, 10:1.

Resumen

La enfermedad estudiada en este trabajo es la Neuropatía Óptica de Leber (del inglés Leber Hereditary Optic Neuropathy, o LHON). Esta patología cursa con una ceguera, que se torna crónica en ambos ojos. Se produce por una mutación puntual en el DNA mitocondrial (mtDNA). El 90% de estas mutaciones son las denominadas primarias (m.3460G>A, m.1178G>A y m.14484T>C), que afectan al complejo I mitocondrial. Las mutaciones restantes, en su mayoría afectan también a este complejo mitocondrial. La penetrancia de esta enfermedad es muy variable, ya que puede verse afectada por varios factores como hormonales, dietéticos, así como factores nucleares, que pueden afectar a la expresión de la enfermedad. Gracias a esto puede haber portadores que no sufran la enfermedad.

En el presente trabajo se estudiaron las células de un paciente que posee una mutación en el mtDNA, la mutación m.13094T>C descrita en un trabajo anterior como probablemente patológica, afectando a la subunidad NT-ND5 del complejo mitocondrial I.

En el estudio mencionado, se analizó la función de los fibroblastos del paciente, portadores de la mutación mitocondrial citada, pero también un fondo genético nuclear concreto que pudiera ser también responsable del fenotipo patológico. Por ello, con el objetivo de verificar que la disfunción celular se debe exclusivamente a la mutación mitocondrial, se construyeron híbridos transmitocondriales mediante la enucleación de fibroblastos del paciente y posterior fusión con una línea ρ^0 carente de mtDNA.

Tras la obtención y selección de esta línea celular transmitocondrial se procedió a realizar diferentes estudios mitocondriales, que evalúan la función e integridad mitocondrial, como son la medida de síntesis de ATP mitocondrial, número de copias de mtDNA, red mitocondrial, entre otros, para verificar que los efectos celulares son provocados por la mutación del mtDNA.

Los resultados obtenidos mostraron en los diferentes ensayos han mostrado que efectivamente la función mitocondrial se encuentra afectada por la presencia de la mutación mitocondrial descrita, y por lo tanto parecen ser la causa del cuadro clínico presentado por el paciente.

Abstract

The disease discussed in this assay is the Leber Hereditary Optic Neuropathy (LHON). This pathology starts off as blindness that turns chronic on both eyes. It is produced by a punctual mutation on mitochondrial DNA (mtDNA). 90% of these mutations are known as primary mutations (m.3460G>A, m.1178G>A y m.14484T>C), which affect the mitochondrial complex I. The remaining mutations, affect mostly this mitochondrial complex. This disease's penetrance is very variable, as it can be affected by several factors, such as hormonal, dietary and nuclear factors that can affect its expression. Thanks to this variability, carriers that do not suffer from said disease can be found.

In the current work the cells of a patient that has an mtDNA mutation, mutation m.13094T>C, described in a previous work as likely pathological, affecting the NT-ND5 subunit of mitochondrial complex I, have been studied.

In the previously mentioned study the function on the fibroblasts from the patient, carriers of the aforementioned mitochondrial mutation, as well as the nuclear genetic background that could be held responsible for such pathological phenotype. Hence, with the aim of verifying whether the cellular dysfunction is exclusively caused by the mitochondrial mutation or not, transmitochondrial hybrids were constructed by enucleation of the patient's fibroblasts and following fusion with an mtDNA deficient ρ^0 line.

After the extraction and selection of this transmitochondrial cellular line, we proceeded to perform several mitochondrial studies that evaluate mitochondrial function and integrity, such as mitochondrial ATP synthesis, number of mtDNA copies, mitochondrial network among others, in order to verify that the cellular effects were brought about by the mtDNA mutation.

The results obtained in these assays have shown that, indeed, mitochondrial function is affected by the presence of the described mitochondrial mutation, and therefore it seemingly is the cause of the medical profile presented by the patient.

Introducción

La Neuropatía Óptica Hereditaria de Leber (LHON, por cuyas siglas en inglés). Es una enfermedad que provoca la pérdida de la capacidad visual por la degeneración de células ganglionares localizadas en la retina (células neuronales encargadas de la correcta transmisión de la información visual al cerebro).

Los síntomas de esta enfermedad se caracterizan por una pérdida de visión aguda que en la mayoría de casos comienza en un solo ojo, y progresivamente va apareciendo en el otro, mientras que en un 25% de los casos se produce simultáneamente¹. Por la consecuente atrofia de los discos oculares, la pérdida de visión se torna crónica. Pueden aparecer anomalías neurológicas tales como temblor postural, neuropatía periférica, miopatías inespecíficas y ciertos desórdenes del movimiento.

En cuanto a la edad de aparición de esta enfermedad, se ha determinado que suele aparecer entre los 15 y 30 años de edad, produciéndose la mayoría (95% de los casos en una edad inferior a los 50 años) en varones jóvenes (son hasta cuatro veces más propensos que las mujeres)^{1,2}.

Se produce debido a una mutación en el DNA mitocondrial, por lo que su herencia es por vía materna. Las mutaciones más comunes (en torno a un 90% del total) son: m.3460G>A, m.1178G>A y m.14484T>C, afectan a los genes MT-ND1, MT-ND4 y MT-ND6 respectivamente, que codifican para proteínas correspondientes de la subunidad del complejo I de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, denominadas mutaciones primarias². Así mismo, existen mutaciones menos frecuentes llamadas mutaciones secundarias, que pueden afectar a otras proteínas de la cadena de transporte mitocondrial como subunidades del complejo IV, tal como la mutación m.13094T>C, que afecta al gen ND5⁵.

Debido a dificultades de estudio por diversos factores, no se ha podido comprobar la patogenicidad de muchas mutaciones del DNA mitocondrial en el LHON. La principal dificultad que se encuentra es que el LHON se caracteriza por presentar una penetrancia incompleta en mutaciones homoplásmicas, hecho reflejado en las características de esta enfermedad, por lo que hay otros factores, como pueden ser nucleares y ambientales, que modulan la expresión fenotípica de esta enfermedad^{1,2,3}.

La enfermedad de LHON presenta especificidad tisular, afectando únicamente a las células ganglionares de la retina, aun cuando está presente la mutación en todas las células del cuerpo. Aún no se ha encontrado una explicación a este hecho, sin embargo se han propuesto diferentes hipótesis, entre ellas el hecho de que este tipo de células requieren más ATP para realizar su función, así como una correcta distribución mitocondrial en el axón de las células ganglionares^{1,2}.

Desde el descubrimiento de las mutaciones primarias de LHON, se ha utilizado ampliamente el llamado modelo del híbrido transmitocondrial (cíbrido)^{4,6}. Mediante la utilización de líneas celulares transmitocondriales se puede realizar diversos estudios bioquímicos, como pueden ser estudios bioenergéticos y de estado oxidativo, como se realizará en el presente estudio.

La formación de estos híbridos consiste en la fusión de dos líneas celulares. En nuestro caso la primera de ellas se trata de una línea celular inmortal, privada de mtDNA (llamadas líneas Rho 0) que únicamente depende de la glucólisis para obtener su fuente energética, y son un knockout para la enzima timidina quinasa (TK-)⁴. El segundo tipo celular se trata de una línea celular primaria enucleada, que posee las mitocondrias deseadas (mutantes). Esto permite eliminar el fondo nuclear que puede interferir en los ensayos y en la expresión fenotípica de la enfermedad y confirmar si el defecto en las células se debe exclusivamente a la carga del mtDNA.

Hipótesis de estudio

1. La mutación m13094T>C es la causante del fenotipo LHON en el paciente 2831.
2. La generación de híbridos transmitocondriales a partir de fibroblastos del paciente 2831 y la línea celular Rho 0 143B permitirán el estudio de esta patología mitocondrial, eliminando el trasfondo nuclear y permitiendo afirmar que la clínica observada en el paciente se debe a la mutación m.13094T>C del DNA mitocondrial.

Antecedentes

Este trabajo continua el estudio previo del paciente 2831, realizado en este mismo departamento, en el que se concluyó la probable patología de la mutación m.13094T>C, pero en el que no se consiguieron híbridos.⁵

Objetivos

Los objetivos de este proyecto son:

1. La formación de híbridos para asegurar la patogenicidad de la mutación m.13094T>C, eliminando posibles factores nucleares que puedan interferir en el estudio o en la expresión fenotípica de la enfermedad.
2. Realizar estudios bioquímicos mitocondriales que determinen el fallo de la función de estos debido a la presencia de la mutación puntual mitocondrial.

Materiales

Informe del caso

Las células que se someterán a la formación de híbridos y estudio, son obtenidas del paciente designado como 2831, el cual que presenta un cuadro clínico compatible con LHON. Este paciente posee mutaciones patológicas, m.13094T>C, m.15527T>C candidatas a ser responsables de la patología presentada por el paciente. De estas dos mutaciones, nos centramos en la mutación m.13094T>C puesto que se ha encontrado en diferente grado de

heteroplasmia en diferentes tejidos del paciente (criterio relacionado con patología), además de haberse descrito previamente asociada a otras patologías mitocondriales⁵. La segunda mutación parece encontrarse en homoplasmia y no ha sido previamente asociada a patologías mitocondriales por lo que consideramos la primera mutación (m.13094T>C) como la candidata a la patología presentada por el paciente.

Hay que destacar que este paciente volvió a recuperar la vista, esto puede ser debido a posibles cambios de factores ambientales o la aplicación de algún tratamiento médico, pero no se puede saber debido a confidencialidad médica.

Material biológico

Entre el material biológico usado se encuentran las siguientes líneas celulares

- Fibroblastos primarios humanos control, sin mutaciones mitocondriales.
- Fibroblastos primarios humanos del paciente 2831
- Línea celular ρ^0 143B TK- de osteosarcoma
- Cíbridos transmitocondriales producido tras la fusión de Rh0 143B y fibroblastos enucleados del paciente 2831.
- Línea transmitocondrial ρ^0 143B - ACH, formada con anterioridad a este estudio.
- Muestras de DNA de sangre del paciente 2831
- DNA control humano

Los medios de cultivos con los que se ha mantenido son los siguientes

- Dulbecc's modified Eagle médium (DMEM) (invitrogen)
- Medio de cultivo de células ρ^0 143B y cíbridos: DMEM suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB) y 50 $\mu\text{g/ml}$ de uridina
- Medio de cultivo de fibroblastos DMEM suplementado con un 20% SFB
- Medio de selección de cíbridos: DMEM suplementado con 20% SFB dializado, BrdU 100 $\mu\text{g/ml}$.
- Medio de congelación: DMEM suplementado con 20% SFB y DMSO al 10%.

Otros reactivos utilizados

- PBS, pH 7,4 (invitrogen)
- Tripsina (0,05 p/v): preparada con tripsina sigma y disuelta en pbs y suplementada con EDTA (sigma)
- Uridina (10mg/ml)
- Piruvato (50mg/ml)
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Actinomicina D (1mg/ml)
- Desoxiglucosa
- Bromodesoxiuridina 10mg/ml.

Instrumentación

- Contador de células automático Beckman coulter
- Lector de microplacas NOVOstar, BMG labtech
- Real-Time PCR applied biosystems stepone
- Termocicladores: veriti 96well thermal cycler (applied biosystems) y biometriq t3 thermocycler
- Nanodrop ND-1000 spectrophotometer
- Flouid cell imaging station (life technologies)
- Transiluminador (Bio-Rad)
- Evaporador SpeedVac (Eppendorf)
- Estufa de cultivo a 37° con 5% de CO₂.

Kits comerciales

- Cell-titer blue y Cell-titter-Glo luminescent (Promega)
- MitoTracker Red CMXRos
- Mito-ID membrane potential cytotoxicity Kit (enzo life sciences)
- Reactivo Bradford (biorad)
- Speedtools tissue DNA extraction kit (Biotools)
- Complex IV Human Enzyme Activity Microplate Assay Kit

Métodos

Manejo de células en cultivo

Se cultivaron las células deseadas en los diferentes medios anteriormente mencionados, cambiando este cada 2-3 días renovándolo para evitar la muerte celular (senescencia), hasta que la confluencia presentada era entorno a un 80% (momento en el que se puede llegar a producir la muerte celular o la inhibición por contacto), punto en el que se procede a la tripsinización.

Esta tripsinización se llevó a cabo retirando el medio en el que se encuentran las células, posteriormente lavando con PBS para eliminar los restos de medio, dado que el suero contenido en él inhibe la tripsina. A continuación se añade la tripsina, dejando a esta actuar durante 5 minutos a 37°C en la estufa de cultivo, pasados los cuales se recogen las células usando medio de cultivo con suero (para inactivar la tripsina, así evitamos un daño celular por el exceso de actividad) pasándolas a un tubo falcón para su centrifugación (5 minutos a 1600g).

Una vez obtenido el pellet celular deseado, se sembró de nuevo en diferentes placas para así seguir con el cultivo o por el contrario se realizó la congelación de estas para utilizarlas más adelante.

La congelación se lleva a cabo en criotubos termoresistentes. En ellos se añaden en torno a 10⁶ células por vial, resuspendidas en DMEM con un 20% de SFB, y DMSO al 10%,

siendo el volumen final 1,5 ml. El DMSO es un crioprotector que evita la formación de cristales de hielo en el interior celular, ya que estos podrían comprometer la estabilidad de la membrana. A continuación, se colocan los criotubos en un dispositivo con isopropanol en su interior, cuya función es evitar una disminución brusca de la temperatura, ya que será introducido en un refrigerador a -80 °C. Por último estas células son almacenadas en un recipiente con nitrógeno líquido a -195,8°C para su almacenamiento prolongado.

Obtención de DNA a partir de células cultivadas.

La obtención de DNA de estas células cultivadas se realiza mediante la utilización de Speedtools tissue DNA extraction kit.

El procedimiento es el siguiente: tras lavar con PBS el pellet celular, se resuspende en un eppendorf de 1,5 ml, en 200 µL de buffer BT1. Se añade a esta suspensión 25 µL de proteinasa K y 200 µL de buffer BB3, y se incuba esta mezcla durante 15 minutos a 70°C. Este paso sirve para liberar el DNA. A continuación se añade 210 µL de etanol al lisado y se mezcla utilizando un vortex, para hacer precipitar el DNA, que quedará con un aspecto filamentoso.

Se carga la mezcla en una columna de separación incluida en el kit. Se centrifuga a 11.000 g durante 1 minuto, tras el cual se descarta el filtrado. En los siguientes pasos se lava la columna de separación, añadiendo 500 µL de BBW y centrifugando de nuevo como se ha realizado en el paso anterior, se descarta el filtrado y se añade 600 µL de buffer BB5, realizando otra centrifugación y descartando igualmente el filtrado.

El secado de la columna de sílica se realiza mediante un centrifugado a 11.000 g y 1 minuto, sirve para eliminar el etanol residual que haya podido quedar en la columna. Tras este paso se realiza la elución de la membrana con agua destilada calentada previamente a 70°C. El DNA eluido se recoge en un tubo eppendorf, se marca y se lleva a una nevera a 4°C para su almacenamiento.

Cuantificación de ácidos nucleicos

La cuantificación del DNA obtenido se realiza utilizando un espectrofotómetro llamado Nanodrop. Este dispositivo calcula la concentración de ácidos nucleicos midiendo la absorbancia a 260 nm, y la pureza midiendo a 230 nm y 280nm, así determinando si la muestra contiene fenol, proteínas u otras impurezas.

La forma de proceder es depositar sobre el orificio del dispositivo indicado 1 µL de muestra, previamente habiendo realizado dos lavados con agua destilada, la primera para lavar posibles restos de medidas anteriores y la segunda para obtener el blanco (ya que nuestra solución está resuspendida en agua destilada). El programa informático del ordenador acoplado al dispositivo realiza el cálculo dando los valores en ng/ µL de la solución. Por último se realiza otros dos lavados del dispositivo con agua destilada, para eliminar restos de la medición.

PCR-RFLP

Este protocolo se utiliza para analizar la presencia de la mutación m.13094T>C y el porcentaje de heteroplasmia de la misma en las diferentes células que se ha utilizado a lo largo del ensayo y muestras de tejidos del paciente disponibles en el laboratorio.

Los primers utilizados para cada PCR previa a la digestión enzimática fueron los siguientes (tabla 1)

Tabla 1: Primers utilizados para la amplificación por PCR.

m.13094T>C	
12906Fw	5'CCT ACA CTC CAA CTC ATG AGA CCC3'
13310Rc	5'TGC TAG GTG TGG TTG GTT GAT GCC G3'

Durante este trabajo se utilizaron los reactivos para realizar la PCR, los cuales vienen recogidos en la tabla 2 junto al volumen utilizado de cada uno de los mismos.

Tabla 2: Volúmenes utilizados para hacer el mix de PCR.

Tampón 10X	5 µl
Oligo L (25 µM)	0,5 µl
Oligo H (25 µM)	0,5 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Taq Roche (1U)	0,25 µl
DNA (100 ng aproximado)	
PCR Grade Water (Roche)	Hasta volumen final: 50 µl

El programa de temperaturas utilizado en el termociclador es el siguiente:

1. 95°C- 2 min
 2. 95°C – 30s
 3. 60°C- 30s
 4. 72°C- 90s
 5. 72°C- 5min
- } 35 ciclos

La comprobación de la amplificación de DNA se realiza mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TBE (Tris, borato y EDTA). El revelador utilizado es bromuro de etidio, agente que se intercala en el DNA y posee la propiedad de que es fluorescente frente a la radiación ultravioleta del transiluminador, así pues es utilizado para revelar el gel.

Una vez realizada esta comprobación de la amplificación, se procede a realizar el corte con el enzima de restricción correspondiente, que en este caso se trata de Alu I (fermentas), para la mutación a estudiar (13094T>C), utilizando el buffer proporcionado por la casa comercial. Se realiza una incubación O/N a 37°C.

Una vez pasado el tiempo de incubación, se realiza una segunda electroforesis en gel de agarosa al 2%, para así separar los fragmentos de restricción y posteriormente para analizar el resultado se visualizan los fragmentos cortados en el transiluminador.

El patrón de restricción que podremos observar es: Si existe una mutación, con cambio de base, la enzima utilizada (AluI) realizará un corte, por lo que en el gel resultante veremos dos bandas de aproximadamente 200 pares de bases. Si no existe mutación, no se realizará el corte y por lo tanto observaremos una banda de aproximadamente 400 pares de bases. Al ser una mutación que se encuentra en heteroplasmia, vemos que existen las tres bandas en el gel, en los pacientes afectados.

Para cuantificar la tasa de mutación se utiliza el programa informático QuantityOne, que mide esta tasa a partir de la intensidad de las bandas presentadas en el gel.

Creación de líneas celulares transmitocondriales

Este protocolo se ha utilizado para formar líneas transmitocondriales (cíbridos), líneas celulares resultantes de la fusión entre dos líneas celulares, eliminando previamente el mtDNA de una de ellas y el núcleo de la otra para el posterior estudio bioquímico de estos.

Concretamente, se llevó a cabo la fusión de fibroblastos enucleados del paciente 2831 (poseedor de la mutación mitocondrial m.13094T>C) con la línea celular ρ^0 143B que no posee mtDNA, para la formación de los cíbridos deseados.

En primer lugar se ha de cultivar los fibroblastos del paciente y la línea celular ρ^0 143B hasta una confluencia del 80%, para que se encuentren en una cantidad óptima, y no se dé lugar a la secreción de factores de inhibición o de muerte.

El siguiente proceso es la enucleación de los fibroblastos del paciente; para ello se utiliza actinomicina D, que evita la replicación nuclear, ya que inhibe la duplicación del DNA (posee una gran afinidad de secuencias ricas en GC). Para ello se inocula en las placas seleccionadas para la formación de cíbridos este compuesto químico a una concentración de 1 μ g/ml durante 15 horas.

Una vez obtenidas las células enucleadas, se procede a poner en contacto ambas líneas celulares, en una placa de cultivo con medio de ρ^0 143B (DMEM suplementado con uridina y 10% SFB), en presencia de polietilenglicol (PEG), para así favorecer la fusión de ambos tipos celulares. Como resultado, en esta placa habrá una mezcla de cíbridos y de células ρ^0 143B sin seleccionar (los fibroblastos al pasar el tratamiento con actinomicina D no tienen posibilidad de replicación, y por lo tanto, de haber sido correcta la enucleación, no podrán crecer en la placa), y es por ello por lo que se debe de realizar una selección en esta placa.

Cultivo y selección de líneas celulares transmitocondriales (cíbridos)

Una vez realizado el procedimiento anterior, obtenidos los supuestos cíbridos, se procede a la selección de estos, para así eliminar las células restantes de ρ^0 143B, que hayan podido quedar sin fusionar. Para ello se cultivan durante 2 meses, con medio DMEM 20% SFB dializado y bromodesoxiuridina a una concentración de 100 μ g/ml. Las células ρ^0 143B morirán al no haber uridina en el medio, mientras que la bromodesoxiuridina se requiere para eliminar a las células TK+, ya que resulta tóxico para ellas, de esa forma se eliminan los fibroblastos que hayan podido quedar en la placa. Al final solo las células cíbridas, con mtDNA, que posee la mutación m.13094T>C y el núcleo TK-, sobrevivirán.

Para cerciorarse de la correcta muerte de las células ρ^0 143B, se utilizará como control un cultivo de ρ^0 143B, al cual se le añadirá el mismo medio de selección utilizado con la placa de formación de cíbridos, de tal forma que al morir todas las células en la placa control se dará por supuesto que han sido eliminadas las células ρ^0 143B de la placa de formación de cíbridos.

Comprobación de la correcta formación de cíbridos

Una vez terminada la selección de cíbridos se requiere una comprobación para cerciorar que poseen el núcleo de la célula ρ^0 143B con la mutación mitocondrial y que no quedan núcleos del cíbrido por mala nucleación.

Para determinar que el núcleo presente en el cíbrido es de la célula 143B, se estudia un marcador polimórfico en el cromosoma 11q13 mediante una amplificación PCR, con una temperatura de annealing de 65°C. Se utilizó como patrones nucleares DNA de células PO 143B y de fibroblastos del paciente.

Los primers utilizados para determinar los polimorfismos nucleares son los siguientes

Tabla 3: primers utilizados para amplificar el marcador polimórfico nuclear.

Polimorfismo nuclear	
D11S533S	5'GCC TAG TCC CTG GGT GTG GTC3'
D11S533as	5' GGG GGT CTG GGA ACA TGT CCC C3'

Para la determinación de que poseen la mutación del paciente, se realiza un PCR-RFLP como se ha indicado anteriormente, para la mutación m.13094T>C. Utilizando los mismos controles dictados anteriormente.

Detección de la red mitocondrial celular

Se sembró en una placa 10^5 células/ ml para tener un nivel bajo de confluencia así evitando posibles superposiciones de células y poder observar adecuadamente la red mitocondrial. La detección de la red mitocondrial se lleva a cabo con un kit comercial "MitoTracker Red CMXRos", que posee un tinte rojo fluorescente que tiñe las mitocondrias vivas (es dependiente del potencial de membrana).

Para este ensayo se realizó una dilución 1:10000 de la solución stock original (1mM), en el medio pertinente a cada línea celular, resultando la solución final de concentración 0,1 μ M. Una vez diluido se añade a la placa de crecimiento, previamente retirado el medio y habiendo realizado un lavado con PBS, y se incuba a 37°C durante 45 minutos. Una vez realizada esta incubación, se lleva la placa al visualizador "Floyd Cell imaging Station", lector que podrá visualizar la fluorescencia emitida por el tinte.

En estos ensayos introduciremos una línea cíbrida formada con anterioridad a este estudio, resultada de la fusión de ρ^0 143B y una línea con mitocondrias sin mutación (es decir, sana), la línea ACH-143B, del mismo haplogrupo mitocondrial que los fibroblastos sometidos a estudio (H1), por los SNP mitocondriales que poseen.

Se utiliza porque poseen el mismo núcleo que hemos utilizado para formar nuestros híbridos, de forma que tenemos un trasfondo genético con el que comparar nuestros resultados y determinar que los fallos mitocondriales pueden provenir de esta mutación mitocondrial.

Determinación del potencial de membrana

El potencial de membrana se determinó usando el Kit Mito-ID® Membrane Potencial Detection de la casa Enzo, que contiene la sonda catiónica fluorescente JC-1, capaz de acumularse en la mitocondria donde hay un alto potencial de membrana, generando agregados-J cuyo perfil de emisión son 590nm en el rojo-naranja. Sin embargo, en condiciones de bajo potencial de membrana, no se forman los agregados y los monómeros de JC-1 emiten en el verde (529 nm). Así, se pueden observar las dos poblaciones (en agregados o monómeros) y determinar un ratio que nos de una idea del potencial de membrana mitocondrial.

Este ensayo sólo se trata de forma cualitativa, por lo que se procede a visualizar la tinción del potencial de membrana con el microscopio de fluorescencia “Fluid Cell imaging Station”.

Estudios de los niveles de mtDNA

En este protocolo se cuantificara los niveles de DNA de cada una de las líneas celulares a ensayar, para ello se extrae el DNA y se cuantifica para poder ajustar la cantidad a añadir al ensayo. Se utiliza un proceso de RT-PCR, explicado a continuación.

Para determinar los niveles de mtDNA de las muestras se amplifica un fragmento del mtDNA, que en este caso se corresponde con un fragmento del rRNA 12S al que se le une la sonda fluorescente FAM; y un fragmento correspondiente a la RNAasa P, que se trata de un gen nuclear y al que se le une la sonda VIC. De este modo, cuantas más copias de mtDNA existan en la célula, más sonda FAM se unirá y más señal detectaremos.

Para poder conocer cuantitativamente la cantidad de mtDNA de las muestras, se construye una recta patrón utilizando una estándar que contiene una cantidad conocida de una mezcla de plásmidos. Uno de los plásmidos contiene el fragmento del gen mitocondrial (rRNA 12S) mientras que el otro lleva insertado el gen nuclear (RNAasa P). Realizando el cociente entre el valor obtenido con la sonda mitocondrial y el de la nuclear para cada una de las muestras y extrapolándolo a los valores de la recta patrón, se consigue el número de copias de mtDNA por número de copias del DNA nuclear (nDNA).

El kit utilizado para las amplificaciones es “TaqMan Gene Expression Master Mix” (Applied biosystems). Posee los dNTPS, la enzima Taq polimerasa y el buffer de reacción.

En los pocillos a ensayar se añaden 20 µl de la mezcla de reacción, que posee la siguiente composición (tabla 4)

Tabla 4: Mix de RT-PCR para el estudio de los niveles de mtDNA.

Mix	10 μ l
Sonda FAM	0,5 μ l
Oligo L (5 μ M)	0,5 μ l
Oligo H (5 μ M)	0,5 μ l
RNAse P	1 μ l
DNA (10 ng aproximadamente)	5 μ l
PCR Grade Water (roche)	2,5 μ l

Las temperaturas utilizadas en el aparato StepOne, lector de la placa de 96 pocillos son las indicadas:

- | | | |
|----|-------------|-------------|
| 1. | 50°C-2 min | } 35 ciclos |
| 2. | 95°C-10 min | |
| 3. | 95°C 15 seg | |
| 4. | 60°C 1 min | |
| 5. | 4°C | |

Cuantificación de proteínas mediante el método Bradford

Utilizando esta técnica podremos cuantificar la cantidad de proteínas totales presentes en una muestra. Se basa en una lectura colorimétrica, dado que el reactivo de Bradford se une a proteínas y posee un color azul, detectable por el espectrofotómetro.

Para realizar el calibrado se utiliza albúmina sérica bovina (BSA) de un stock a 1 mg/ml, con el cual se preparan una serie de disoluciones de concentración conocida. Para realizar estas disoluciones utilizamos agua destilada, tal y como se indica en la siguiente tabla (Tabla 5).

Tabla 5: Volúmenes utilizados para crear la recta patrón en la técnica de Bradford.

Concentración (mg/mL)	Agua (μ l)	BSA (μ l)
Blanco	1000	0
0,05	950	50
0,1	900	100
0,2	800	200
0,3	700	300
0,4	600	400
0,5	500	500

El reactivo de Bradford se diluye en una proporción 1:5 en agua destilada. El estudio se realiza en placas de 96 pocillos, en los que se añaden los volúmenes de cada dilución de la recta de calibrado y las muestras (10 μ l) y del reactivo de Bradford (200 μ l).

Para finalizar se mide la absorbancia a 595 nm en el lector de placas NOVostar, se construye la recta de calibrado con los valores de las diluciones de BSA y se interpolan los valores de absorbancia de las muestras, hallando entonces la concentración de proteína de las mismas.

Ensayo de la actividad y cantidad del complejo mitocondrial IV

Para analizar la actividad y cantidad de CIV se utiliza un kit comercial (Complex IV Human Enzyme Activity Microplate Assay Kit, de Abcam y se sigue el protocolo indicado por el fabricante del kit.

En primer lugar se extrae la proteína siguiendo las instrucciones del kit, se cuantifica mediante Bradford y se deja a la concentración indicada por el fabricante. A continuación se preparan los reactivos necesarios:

1. Buffer proporcionado: se añaden 10 µl de la solución "Tube 1" a 190 µl de ddH₂O (dilución 1:40) y se marca esta solución como "Solución 1".
2. Reactivo de ensayo: contiene 84 µl de reactivo C (citocromo c) y 1,67 ml de la solución 1.

Los pocillos donde se lleva a cabo la reacción están recubiertos por anticuerpos monoclonales anti-complejo IV, los cuales retendrán dentro del pocillo al complejo IV. Se pone 200 µl del extracto de proteínas de cada línea celular a estudiar, y en el blanco 200 µl de la solución 1. Se deja incubar durante 3 horas, tras las cuales se voltea la placa para eliminar el líquido sobrante (la proteína se encuentra inmovilizada mediante los anticuerpos). Se realiza tres lavados con la solución 1 vaciando los pocillos en cada lavado. Por último se añade la 200 µl de la solución de ensayo y se lleva al espectrofotómetro NOVostar, para realizar una lectura a 550nm. Al transcurrir la reacción, la absorbancia a 550nm, disminuirá, ya que se el citocromo c en forma reducida, se oxidará, reduciendo así su absorbancia.

Mediante una cuantificación Bradford, descrita anteriormente, se hallará la cantidad total de complejo IV presente en la muestra, que posteriormente estará referida a la citrato sintasa, para poder comparar entre las líneas celulares utilizadas, observando si puede haber cambios significativos en la variación de la cantidad de complejo IV formada.

Medida de la actividad de citrato sintasa

Para normalizar la actividad del complejo IV del sistema OXPHOS entre las diferentes líneas celulares, se referirá los resultados obtenidos del complejo IV a la actividad de la citrato sintasa, ya que es un indicador de la biogénesis mitocondrial por ser una enzima presente en la matriz mitocondrial, pero ajena al sustrato genético mitocondrial.

El ensayo mide el incremento de absorbancia observado a 412 nm, producido por el cambio a la forma aniónica del 5,5-Ditio-bis-2-nitrobenzónico (DTNB) tras añadir oxalacetato (OAA), a 30° C durante 1 min. El experimento se llevó a cabo en una placa de 96 pocillos en el lector de placas NOVostar. A continuación (tabla 6), se muestran las cantidades y concentraciones de reactivos para determinar la actividad enzimática de la citrato sintasa. El DTNB, disuelto en tampón de medida y el OAA que se disolvió en agua destilada se prepararon

en fresco, mientras que el acetil-CoA se preparó previamente y se guardó alicuotado a -80° C. Las medidas se realizaron por duplicado, y los valores de actividad se dieron corregidos por la cantidad de proteínas totales de cada muestra.

Tabla 6. Cantidades y concentraciones de reactivos para las dos formas de determinar la actividad enzimática de la citrato sintasa.

Reactivo	Cantidad lector de placas
Tris-HCl 10 mM pH 8,0	163,4 µl
Muestra	5 µl
Acetil CoA (7 mg/ml)	0,66 µl
DTNB 1mM	20 µl
Tritón X-100 10%	2,5 µl
OAA 50 mM	1 µl

La actividad de la citrato sintasa (UI/l) medida en cubeta se define como:

$$\frac{rate/min}{13.6} \cdot \frac{V_{total}}{V_{muestra}} \cdot 1000$$

La actividad específica de la citrato sintasa medida en placa de 96 pocillos se da como mOD/min/mg proteína.

Medida de niveles de ATP mitocondrial

Para realizar este ensayo se siembran 10⁴ células en cada pocillo en una placa de 96 en medio DMEM 25 mM y se dejan en cultivo 24 horas (para que se adhieran a la placa). Para cada línea celular se siembran 12 pocillos, permitiendo así hacer estadística con un buen número de resultados.

En paralelo, y con el fin de referenciar los niveles de ATP detectados a un número concreto de células se sembró otros 12 pocillos de cada línea celular, en los que se llevaría a cabo un recuento celular, con el kit de viabilidad celular CellTiter-Blue. Este kit se basa en la capacidad que poseen las células viables de convertir la resazurina en resorufina (molécula fluorescente) ya que la siembra puede ser errónea.

Transcurridas estas 24 horas de cultivo se han de añadir los reactivos que se describen en la tabla 7.

Tabla 7: Reactivos utilizados para la medida de los niveles de ATP mitocondrial.

Reactivo Blue (Niveles celulares)	Medio DMEM Free (Sin glucosa)
	Piruvato 50mg/ml
	CellTiter-Blue
Reactivo ATP (Niveles de ATP mt)	Medio DMEM Free
	Piruvato 50 mg/ml
	Deoxiglucosa 1M

En aquellos pocillos donde mediremos los niveles de ATP mitocondrial se añade un medio sin glucosa y con piruvato, suplementando con deoxiglucosa, para así inhibir la glucólisis (que al poseer un grupo deoxi- evita que las enzimas de la glucólisis puedan llegar a degradarlo). Así pues únicamente se medirá el ATP proveniente de la cadena de transporte electrónico mitocondrial.

El siguiente paso es eliminar el medio en el que se encuentran estas células mediante un lavado con PBS. A continuación se añade 100 µl por pocillo de los medios de incubación, indicados anteriormente. Se realiza una incubación durante dos horas a una temperatura de 37°C, tras los cuales se llevan al lector de microplacas NOVOstar.

Primeramente se realiza una medida de fluorescencia para ajustar la saturación de las muestras. Se añade entonces 100 µl de reactivo de luminiscencia. A continuación se agita la placa durante 2 minutos, para homogeneizar los pocillos, y se realiza una medida de la luminiscencia, obteniendo los valores de ATP por cada célula.

Los niveles de ATP total se midieron siguiendo el método de luciferina/luciferasa según. Se empleó el kit de determinación CellTiter-Glo® Luminiscent Cell Viability Assay de la casa comercial Promega, según el protocolo del fabricante.

Análisis de mutación en sangre

En este ensayo se procederá a ver si varía la tasa de mutación en las células sanguíneas del paciente a lo largo del tiempo. Las muestras de DNA, tomadas a tiempos diferentes, se someten a un PCR-RFLP para la mutación m.13094T>C, y posterior visualización en un transiluminador.

Estudio de la influencia del medio de cultivo en la tasa de mutación

Para determinar si la composición del medio ejerce algún efecto en la tasa de mutación de las células cultivadas, se procederá al cultivo de los fibroblastos del paciente 2831 en dos medios de cultivo DMEM con 10% SFB suplementado con uridina, y medio DMEM 10% SFB sin uridina.

Tras un mes de crecimiento se procederá a realizar un PCR-RFLP indicado anteriormente para la mutación m.13094T>C. Este resultado servirá para descubrir si hay una selección de la mutación por el medio utilizado.

Resultados

Obtención de híbridos.

1. Fusión de células.

Como se muestra en la imagen, en la que se puede apreciar las células de los fibroblastos encima de las células ρ^0 143B.

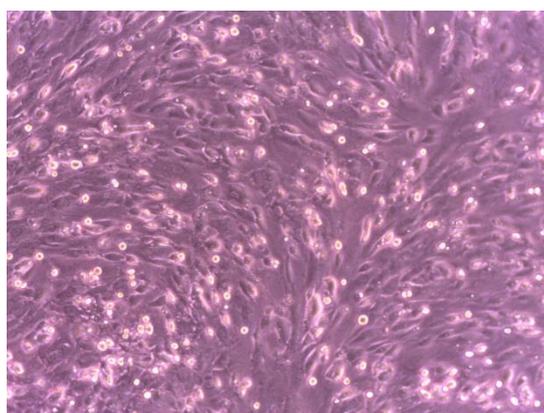


Figura 1: Se muestra en esta fotografía de microscopio invertido, el momento en el que se añaden los fibroblastos tripsinizados (con forma esférica) sobre las células ρ^0 143b.

2. Selección de híbridos

Tras la fusión, se dispuso una selección para eliminar las células Rho 0 143B y los fibroblastos del paciente que pudiesen quedar. Tras 2 meses de cultivo en este medio se detectó que en la placa control (placa de ρ^0 143B), resultó en su muerte total mientras que la placa de híbridos seguía creciendo. Esto nos indica que posiblemente en la placa de híbridos todas las células ρ^0 143B muriesen, teniendo así un cultivo puro de híbridos únicamente.

En las siguientes imágenes (Figura 2) se aprecia la destrucción de la línea ρ^0 143B utilizada como control frente a la placa de fusión.

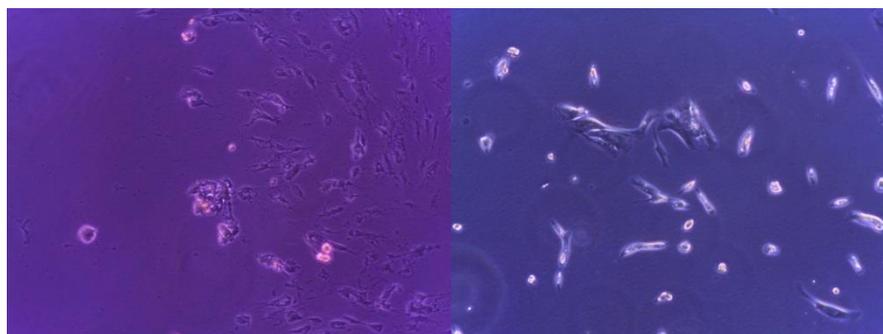


Figura 2: En la imagen de la izquierda se muestra la placa control (frente ρ^0 143B) a la placa de fusión de la izquierda. Se puede apreciar que la placa control ha muerto debido al medio de selección.

3. Comprobación de híbridos

El PCR-RFLP de realizado para la comprobación del núcleo de los híbridos arrojó los siguientes resultados, mostrados en la figura 3. Los resultados arrojados indican que el híbrido

posee el mismo patrón polimórfico que la línea ρ^0 143B, lo que indica que el híbrido ha tiene el núcleo adecuado para nuestros experimentos.

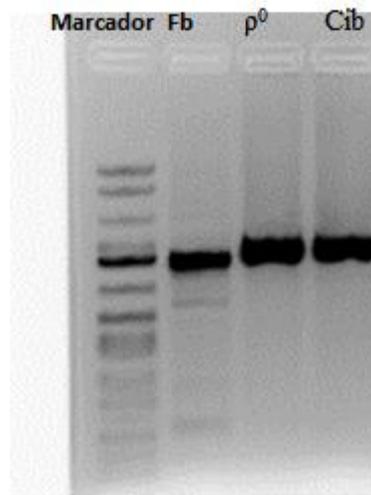


Figura 3: En la imagen se puede apreciar el gel realizado tras la amplificación del polimorfismo nuclear. En la imagen se observa la correspondencia de cada carril y los patrones de amplificación de cada línea celular realizado por doble. En ella se ven los carriles: Marcador, Fibroblasto control (Fb), rho 0 (ρ^0) y híbrido 2831-143B (Cib)

En segundo lugar se confirma que los híbridos obtenidos eran portadores de la m.13094T>C En la figura 4 se muestra el resultado de la comprobación de la posesión de la mutación del híbrido obtenido.

Los resultados de la comprobación de la posesión de la mutación del híbrido obtenido se muestra en la siguiente figura 4. Como se puede comprobar posee la mutación, debido a que se puede llegar a apreciar el corte realizado por la digestión con la enzima Alu1. Lo que indica que posee las mitocondrias mutantes, importante ya que es lo que se quiere estudiar en este trabajo. Una vez obtenidos los híbridos puros, se realiza una PCR-RFLP con la enzima Alu1, para comprobar la tasa de mutación obtenida en los híbridos generado, con el programa informático Quantity one dando como resultado, una mutación del 40%.

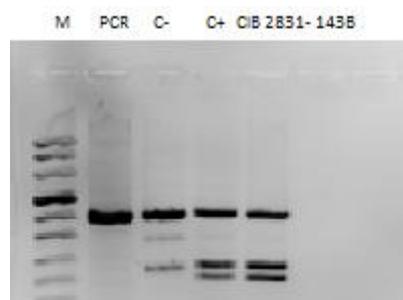


Figura 4: Gel resultado del PCR-RFLP, digerida con la enzima de restricción Alu1. Los carriles de izquierda se corresponden con: Marcador (M), PCR, control negativo (C-), control positivo (C+) y híbrido 2831-143B (Cib 2831-143B)

Los resultados de la obtención de híbridos fueron positivos, se obtuvo híbridos resultantes de la fusión de las líneas ρ^0 143B y los fibroblastos del paciente resultó en una placa de cultivo con células crecientes.

Ensayos bioquímicos mitocondriales.

1. Análisis de la red mitocondrial

En la figura siguiente (Figura 5) se muestra los resultados de la tinción con mitotracker red, en estas imágenes se puede apreciar la red mitocondrial de las tres líneas celulares estudiadas. Diversas mutaciones descritas presentan cambios en la red mitocondrial, en algunos casos produciendo una agregación de las mitocondrias y perdiendo su continuidad.

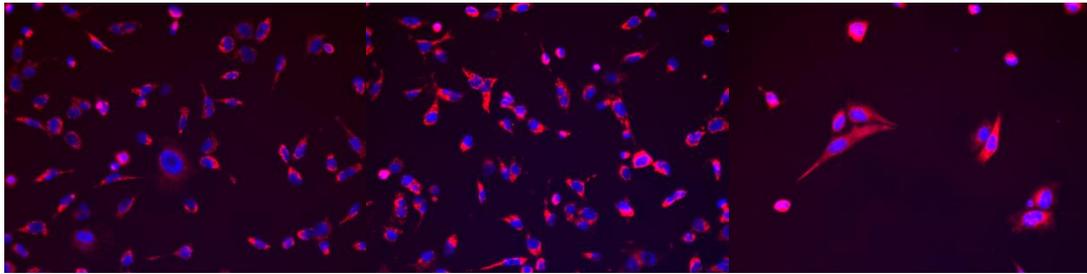
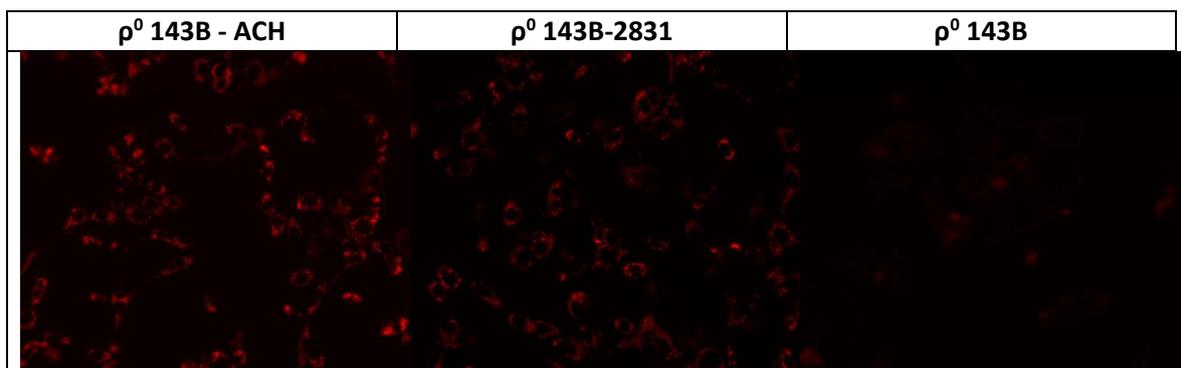


Figura 5: En las imágenes mostradas (de izquierda a derecha híbrido 143B-ACH, Híbrido 143B-2831 y línea ρ^0 143B), se observa la tinción de mitotracker red (en rojo) y la tinción con Hoesch para los núcleos (azul).

En los resultados obtenidos se aprecia que la red mitocondrial no se encuentra afectada en las línea de híbridos (tanto la línea obtenida con 2831 como la línea de ACH), al menos de forma drástica, lo que indica que la clínica no se debe a un fallo en la estructura de la red mitocondrial.

2. Potencial de membrana mitocondrial

El potencial de membrana encontrado en las mitocondrias se debe a que las cargas negativas se acumulan en la matriz mitocondrial y las cargas positivas (protones) se encuentran en el espacio intermembrana, como resultado de la acción de los complejos de la cadena de transporte electrónico. En caso de poseer una mutación, puede afectar a los diferentes complejos, y por lo tanto no generar un potencial de membrana mitocondrial adecuado.



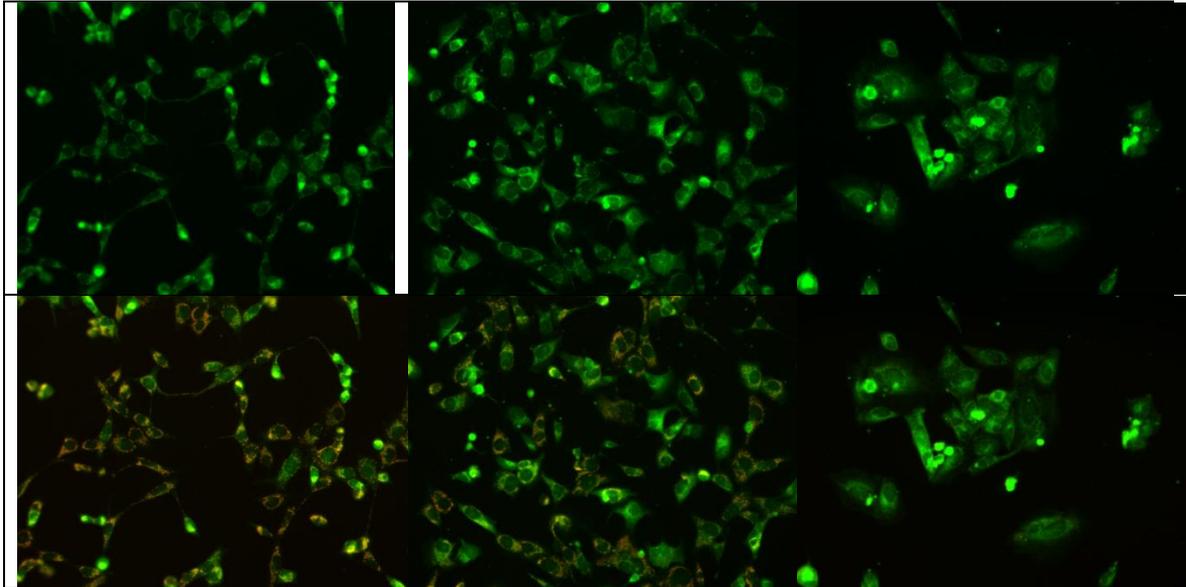


Figura 6: Imágenes tomadas del microscopio de fluorescencia de las tres líneas células teñidas con el tinte catiónico. De arriba a abajo, fluorescencia en rojo, emitido por estado agregado del tinte catiónico. Segunda fila tinte en forma citosólica monomérica, última fila, superposición de ambas fluorescencias.

Los resultados obtenidos se recogen en la figura superior (Figura 6), donde se muestran las imágenes tomadas con el microscopio de fluorescencia. En la primera fila se aprecia la fluorescencia roja que emite el tinte fluorescente mitotracker red al estar en forma de agregados en el interior de la mitocondria. En la segunda fila se puede observar el tinte verde al estar en forma de monómeros cuando este tinte se encuentra en el citosol. En la última fila se aprecia la superposición de ambas emisiones fluorescentes.

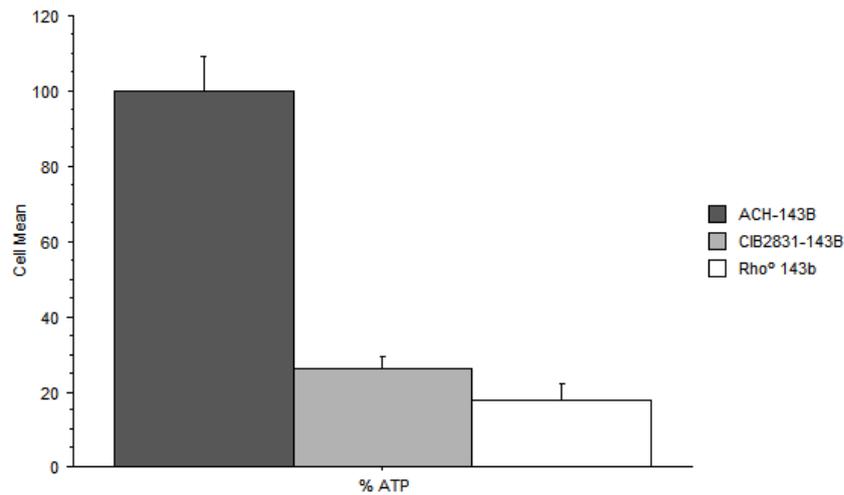
En la línea usada como control, ACH-143B, el potencial de membrana se conserva adecuadamente en casi todas las células, indicando que el sistema OXPHOS se encuentra en buen estado.

En cuanto al cíbrido obtenido se puede observar que el potencial de membrana ha disminuido respecto al control positivo y aumenta frente al control negativo por lo que se puede deducir que la mutación m.13094T>C afecta a algún complejo mitocondrial, y como consecuencia se ve disminuido el ϕ_m .

Por último la línea ρ^0 143B no posee potencial de membrana mitocondrial, ya que sólo aparece fluorescencia verde. Este resultado era de esperar, ya que a la línea de ρ^0 143B se encuentra privada de mtDNA

3. Análisis de los niveles de ATP

En el estudio de la patogenicidad producida por la mutación m.13094T>C se analizó los niveles de ATP mitocondrial producidos por las diferentes líneas celulares a estudiar. En la siguiente gráfica mostrada (Figura 7) se pueden apreciar los resultados de este experimento.



Unpaired t-test for % ATP
 Grouping Variable: Línea celular
 Hypothesized Difference = 0

	Mean Diff.	DF	t-Value	P-Value
ACH-143B, CIB2831-143B	73,792	22	26,323	<,0001
ACH-143B, Rho ⁰ 143b	82,245	22	27,934	<,0001
CIB2831-143B, Rho ⁰ 143b	8,454	22	4,998	<,0001

Figura 7: en esta figura se puede observar los datos obtenidos del ATP mitocondrial por célula, y su representación gráfica, junto al estudio estadístico.

En este caso se toma ρ^0 143B como el 0% de ATP, ya que no posee mtDNA, por lo que se tomaría como el blanco o línea basal, la señal que observamos se puede deber al background de la prueba realizada. En cuanto al ATP consideramos que la línea control (ACH-143B) es el 100%, como control positivo. La línea a estudiar, CIB2831-143B, sólo posee un 26,17% del ATP respecto del control, lo cual es una caída muy grande del ATP mitocondrial. En cuanto al estudio estadístico presentada, se puede observar que existen diferencias significativas, en cuanto a la caída de ATP.

4. Análisis de los niveles de mtDNA en híbridos transmitocondriales

Se analizó el número de copias de DNA de las diferentes líneas a estudiar mediante una RT-PCR, más sensible y eficaz que una PCR tradicional, por lo que podemos detectar realmente cuantas copias de mtDNA tiene cada línea.

Para observar cómo se estabiliza la cantidad de mtDNA en las células híbridas tras la fusión se realizó el ensayo con muestras de diferente tiempo, con el fin de valorar que se alcanzaban niveles normales de mtDNA.

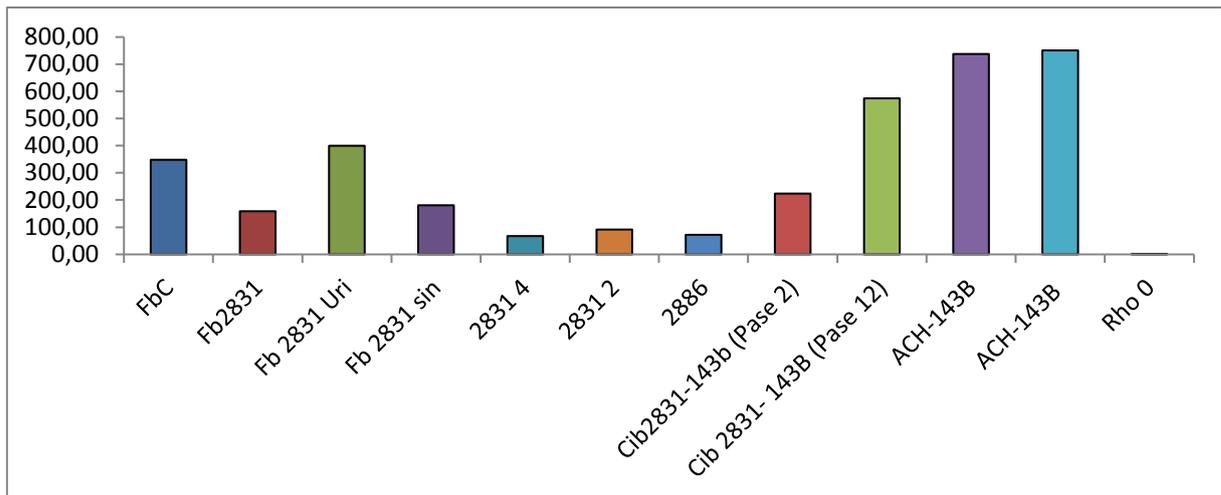


Figura 8: Gráfica en la que se muestra la cantidad de copias de mtDNA por núcleo celular (nDNA), de las diferentes líneas estudiadas. En el eje de las ordenadas se presenta el número de moléculas de mtDNA por célula.

Primeramente comentar que se tomarían dos muestras de DNA de los cíbridos utilizados, ya que, el mtDNA puede tardar en estabilizarse, y se recomienda una serie de cultivos para que pueda tomarse como estable.

Como se puede observar en la figura 8, la cantidad de mtDNA es muy superior en las líneas de cíbridos. En cuanto a la recuperación del número de copias en el cíbrido generado se observa que se alcanzan niveles normales, similares al cíbrido control.

En cuanto a las demás líneas celulares, se puede observar que en los fibroblastos control existe un mayor número de mtDNA que en el fibroblasto del paciente. Además hay un aumento llamativo en el número de copias en las células crecidas en medio con uridina.

5. Análisis de la actividad y cantidad del complejo IV

En el presente trabajo se estudió la actividad de del complejo IV mitocondrial o citocromo c oxidasa, que forma parte de la cadena de transporte electrónico mitocondrial.

La actividad de este complejo la referimos a la actividad de citrato sintasa para así normalizar la actividad entre los distintos tipos celulares y hacer frente a posibles efectos compensatorios vía biogénesis mitocondrial.

En los resultados observados (figura 9) se puede apreciar que hay un aumento en la actividad del complejo IV de los cíbridos del paciente (2831), respecto a la línea de control ACH. Esto se puede explicar por una compensación ejercida por la célula en un intento de maximizar el ATP mitocondrial.

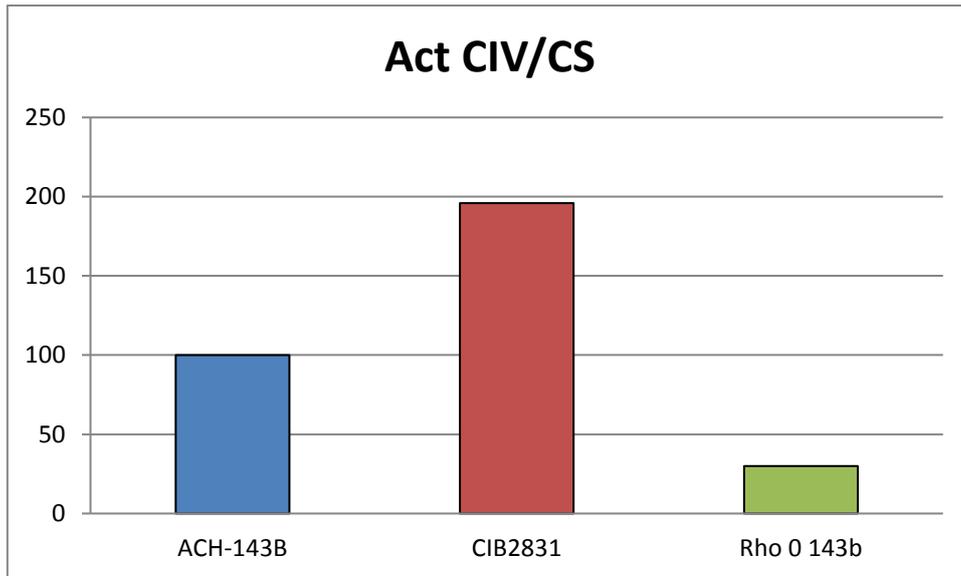


Figura 9: En la gráfica superior se puede apreciar la cantidad de actividad del complejo IV mitocondrial dividido entre la actividad de citrato sintasa para esa misma línea. Se aprecia una mayor actividad en la línea del cíbrido obtenida en este trabajo.

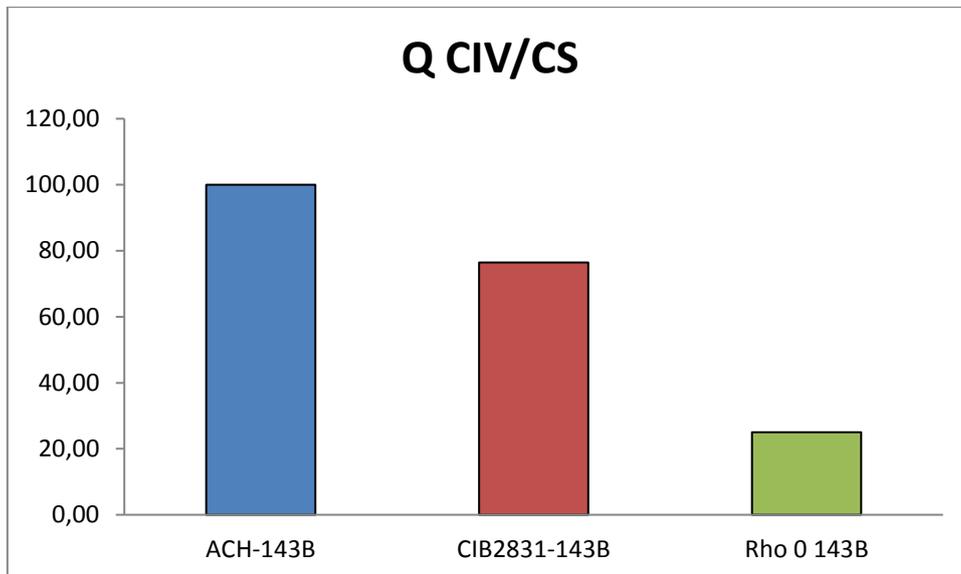


Figura 10: En la gráfica superior se puede observar la cantidad de complejo IV encontrada frente a la cantidad de citrato sintasa. Se aprecia que disminuye en la del cíbrido obtenida en este estudio.

Como se puede observar en la gráfica (Figura 10) se puede observar que hay una disminución que parece ser significativa, de la cantidad del complejo IV del cíbrido formado en este estudio frente al cíbrido control.

Estudios complementarios

1. Variabilidad de mutación en sangre

Se avisó de que la tasa de mutación en las células sanguíneas del paciente variaba conforme pasa el tiempo, lo que podría indicar una posible selección frente a la mutación, ya que este tipo de células requiere una gran cantidad de energía, lo que podría explicar esta variación.

En la figura 11 podemos apreciar que la tasa de mutación baja desde un 40% hasta un 2%. Sería interesante preguntar al médico para obtener más información sobre este hecho, por si el paciente ha seguido algún tipo de tratamiento.

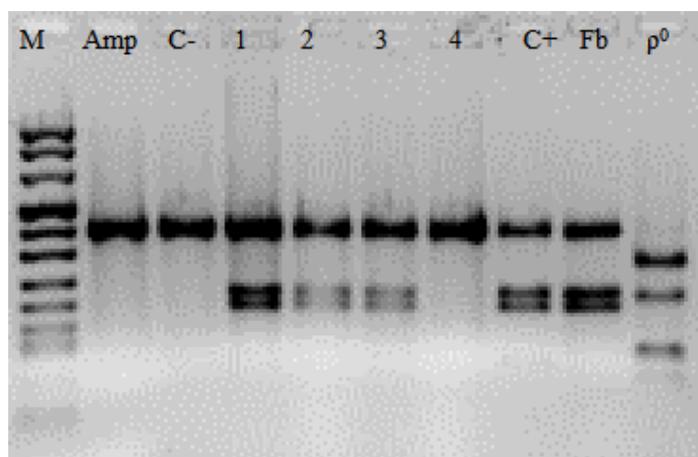


Figura 11: Gel de PCR-RLFP tras el corte con la enzima Alu 1. En los carriles se puede observar de izquierda a derecha; Marcador, amplificado, control negativo (DNA sin mutación) y las muestras de DNA sanguíneas tomadas en orden temporal (1,2,3,4), control positivo, fibroblasto control y la línea p⁰ 143B.

Tabla 8: Se muestra los porcentajes de mutación de las muestras de DNA sanguíneo frente a la temporalidad de su toma.

Muestra	Porcentaje de mutación
2831 1	40%
2831 2	16%
2831 3	15%
2831 4	2%

En la tabla 8 se muestran los resultados de la cuantificación de la tasa de mutación encontrada; se puede observar en la misma tabla que el porcentaje de la mutación en sangre disminuye progresivamente. Esto puede deberse a que el paciente esté siguiendo un tratamiento médico que ejerza una selección frente a las células mutantes.

2. Variabilidad de la tasa de mutación frente al medio utilizado.

Con el fin de evaluar la dinámica de la mutación, tras los datos observados en la sangre del paciente se procedió a cultivar fibroblastos del mismo en dos medios distintos, con suplementación de uridina (10mg/ml) y sin uridina. Esto permite ver si hay una selección de la mutación que haga variar su porcentaje en los cultivos realizados.

Como se puede observar en la siguiente figura (Figura 12) en el gel de PCR-RLFP cortado con la enzima Alu1, la tasa de mutación de los diferentes cultivos, ha variado de forma significativa. En el medio no suplementado con uridina la tasa de mutación se ha mantenido, respecto a la tasa de mutación obtenida con el DNA de la primera toma de los fibroblastos, mientras que la tasa de mutación de la suplementada sin uridina ha caído. Se deduce pues, que la composición del medio sin suplementación con uridina ha ejercido una selección sobre la línea mutante.

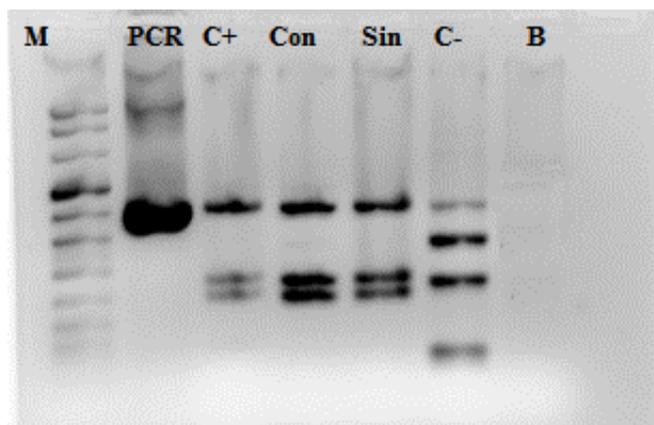


Figura 12: Se muestran el gel obtenido de la digestión enzimática con AluI, los carriles corresponden, de izquierda a derecha: Marcador, Amplificación de la PCR, control positivo, DNA obtenido del medio suplementado con uridina, medio sin uridina, control negativo, blanco.

Discusión

En este trabajo se estudió la patología mitocondrial presentada por un paciente joven, cuyos síntomas se adecuan al diagnóstico de LHON. Presenta dos mutaciones en el genoma mitocondrial, presentes. La mutación m.13094T>C en heteroplasmia y la segunda mutación m.15527T>C en homoplasmia. Siendo la primera de ellas candidata a ser la responsable de la patología presentada por el paciente, estudiadas en un trabajo anterior a este, y en el que se centran los estudios realizados. Así mismo, la madre del paciente, presenta igualmente la mutación analizada en disminución del tanto por ciento de heteroplasmia, sin embargo presenta una tasa de mutación muy baja, con lo que no presenta síntomas de la enfermedad.

El principal objetivo de este trabajo, fue obtener una línea de cíbridos, resultado de la fusión de una línea 143B, desprovistas de mtDNA y una línea donora de mitocondrias a estudiar, en este caso fibroblastos del paciente 2831, portador de la mutación 13094. La obtención de esta línea celular transmitocondrial permite realizar los pertinentes estudios bioquímicos eliminando la influencia en la expresión fenotípica que pueda ejercer el trasfondo nuclear del paciente, descartando así que el cuadro clínico que presenta el paciente sea causado por este mismo, asegurando que está causada únicamente por la mutación mitocondrial.

Realizada la fusión de ambas líneas celulares siguiendo el protocolo mencionado se procedió a seleccionar los cíbridos obtenidos, para evitar una posible contaminación por diferentes líneas celulares (ρ^0 143B y fibroblastos del paciente) con el medio de selección, que eliminó las células ρ^0 143B, como se ha demostrado en la paca control. Posteriormente se comprobó con éxito que el núcleo provenía de la línea 143B y las mitocondrias provenían del fibroblasto del paciente portador de la mutación, consiguiendo así satisfactoriamente el cíbrido deseado.

Obtenidos los cíbridos, se procedió a realizar los diferentes estudios bioquímicos que han demostrado el fallo del sistema mitocondrial en estas células.

En primer lugar, se procedió a analizar la tasa de mutación del genoma mitocondrial, en los resultados arrojados se observó que los cíbridos obtenidos tenían una tasa de mutación parecido al que poseen los fibroblastos del paciente, del 40%.

Sin embargo, como se ha observado, ha podido haber una selección que favorezca que haya alterado la tasa de mutación por una diferente proliferación debido al medio o al tiempo de toma, como se ha comprobado que ocurre en los experimentos de la tasa de mutación respecto a un u otro medio, por lo que se ha de tomar estos resultados con cautela y se recomienda realizar de nuevos estos ensayos con diferentes condiciones.

En cuanto a los resultados de los ensayos bioquímicos, se puede deducir que la función mitocondrial está claramente afectada. Respecto a los niveles de ATP mitocondriales por célula, se observa una clara disminución del cíbrido portador de la mutación, ya que están casi al mismo nivel que la línea p⁰ 143B (que se ha tomado como blanco, ya que no posee mtDNA), lo que deriva en una falta bioenergética para la correcta función celular, lo que podría explicar que LHON sólo se exprese en las células ganglionares de la retina, ya que estas requieren de una mayor fuente de ATP dada su función⁹.

En cuanto al potencial de membrana vista en el microscopio de fluorescencia, se ha determinado cualitativamente que es menor que la observada en la línea ACH, que no poseía un fallo en el potencial de membrana, lo que indica que el gradiente de protones generado por el sistema de fosforilación oxidativa es muy deficiente, por lo que la función bioenergética de la mitocondria se ve afectada¹⁰. Por el contrario la red mitocondrial no se ha visto alterada.

Por último se ha visto que la actividad de la citocromo c oxidasa o complejo IV mitocondrial posee una mayor actividad que otras líneas, esto se puede deber igualmente a algún tipo de mecanismo de compensación mitocondrial al haber un fallo en la producción de ATP.

En cuanto a la cantidad de proteína, entre las tres líneas, se puede observar que hay una caída que parece ser significativa entre la línea control y el cíbrido formado.

Es interesante relacionar ambos resultados, ya que hay una mayor actividad respecto al cíbrido control aun cuando parece que hay una disminución significativa de proteína, también respecto del control. Una explicación plausible a este hecho es que el paciente pueda tener alguna mutación que haga que el complejo IV pueda ganar actividad, pero habría que realizar más estudios para confirmar esta hipótesis.

Conclusiones

Las conclusiones a las que se puede llegar gracias a los resultados obtenidos son:

1. La línea celular cíbrida obtenida resultada de la fusión entre los fibroblastos enucleados del paciente 2831 y la línea celular rho 0 143B, posee la mutación del mtDNA m.13094T>C, un núcleo celular control y niveles adecuados de mtDNA. Esta línea es un modelo idóneo para el estudio de la patología de esta mutación.
2. Los fenómenos patológicos que afectan a la función mitocondrial en los cíbridos del paciente parecen deberse a la mutación puntual m.13094T>C encontrada en el mtDNA.

Conclusions

The conclusions that can be obtained from this assay are the following:

1. The cybrid cellular line was properly obtained as a result of the fusion of the patient 2831's enucleated fibroblasts and the cellular rho 0 143B line, containing the mtDNA mutation m.13094T>C, a cellular control core/ nucleus and adequate mtDNA levels. This line is a suitable model for the pathological studies on this mutation.
2. Pathological phenomena affecting mitochondrial function on cybrids seem to be the result of the punctual mutation (m.13094T>C) found in the mtDNA

BIBLIOGRAFÍA

1. Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Hudson G, Chinnery PF. Inherited mitochondrial optic neuropathies. *J Med Genet*. 2009 vol 46 pag 145–158
2. Yu-Wai-Man P, Chinnery PF. Leber Hereditary Optic Neuropathy. 2000 Oct 26 [Updated 2016 Jun 23]. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2016.
4. Valentino ML, Barboni P, Ghelli A, Bucchi L, Rengo C, Archilli A, et al. The ND1 gene of complex I is a mutational hot spot for Leber's hereditary optic neuropathy. *Ann. Neurol*. 2004; vol 56 pag 631-641
3. Kirches E. LHON: mitochondrial mutations and more. *Curr Genomics*. 2011 Vol 1 pag 44–54.
5. Cristina Ruiz Ruiz. Patogeneicidad y penetrancia de mutaciones raras asociadas a la Neuropatía Óptica Hereditaria de Leber.
6. Liza A. Pon, Eric A. Schon *Mitochondria* 2ª Edition. *Methods in Cell Biology*. Vol 80. Pag 510-516
7. Cruz-Bermúdez A, et al. (2016) Functional Characterization of Three Concomitant MtDNA LHON Mutations Shows No Synergistic Effect on Mitochondrial Activity. *PLoS ONE* 11(1)
8. Heather M. Wilkinsa, Steven M. Carla, Russell H. Swerdlowa. Cytoplasmic hybrid (cybrid) cell lines as a practical model for mitochondriopathies. *Redox Biology*, Vol 2, 2014, Pag 619–631
9. Carelli V, et al. Bioenergetics shapes cellular death pathways in Leber's hereditary optic neuropathy: a model of mitochondrial neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Vol 1658, pag
10. Valerio Carelli, et al. Oestrogens ameliorate mitochondrial dysfunction in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain* Vol 134 Pp. 220 – 234.
11. Helen Swalwell et al. Respiratory chain complex I deficiency caused by mitochondrial DNA mutations. *Eur J Hum Genet*. Vol 19, pag 769-775.
12. Grainne S, et al. Prevalence of Nuclear and Mitochondrial DNA Mutations Related to Adult Mitochondrial Disease. *Ann neurol* vol 77 pag 753-759.