



UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

MECANISMO MOLECULAR DE LA
ENFERMEDAD DE NARP/MILS POR
MUTACIÓN PUNTUAL EN EL CANAL DE
PROTONES DE LA F_1F_0 ATP SINTASA HUMNA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :
PAULINA CORTÉS HERNÁNDEZ

Tutor: DR. JOSÉ DE JESÚS GARCÍA TREJO.



MÉXICO, D. F.

Diciembre 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

MECANISMO MOLECULAR DE LA ENFERMEDAD DE NARP/MILS POR MUTACIÓN PUNTUAL EN EL CANAL DE PROTONES DE LA F₁F₀ ATP SINTASA HUMNA

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección del Dr. José de Jesús García Trejo en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología, y en el Departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. José de Jesús García Trejo	Facultad de Química, UNAM
Dr. Diego González Halphen	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Marietta Tuena de Gómez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Se reconoce la asesoría del Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez que fue miembro del comité tutorial en la primera parte de este proyecto.

Se reconoce la colaboración del Dr. J. Lenin Domínguez Ramírez, del Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas, de la Facultad de Medicina UNAM, por su asesoría en el modelaje *in silico* de la subunidad **6** humana en interfase con anillo de *c*.

Se reconoce la colaboración del Dr. Diego González Halphen, del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular UNAM, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de clonación de la proteína inhibidora humana, con la asesoría del Doctorante Francisco Figueroa Martínez.

Se reconoce la asesoría técnica de la Dra. Martha Elisa Vázquez Memije en los experimentos de sensibilidad a oligomicina.

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT (J34744-N and V43814-M). Durante los estudios de doctorado goce de una beca otorgada por CONACYT y DGEP-UNAM para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día 14 de Diciembre, 2007.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Marietta Tuena de Gómez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dra. Rosario Muñoz Clares	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Salvador Uribe Carvajal	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez	Facultad de Medicina, UNAM
Secretario	Dr. Diego González Halphen	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Suplente	Dra. Victoria Chagoya de Sánchez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Suplente	Dra. Marina Gavilanes Ruiz	Facultad de Química, UNAM

**Mecanismo molecular de la enfermedad de NARP/MILS
por mutación puntual en el canal de protones
de la F₁F₀ ATP sintasa humana.**

	Página
INDICE	1
RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	4
ABREVIATURAS.....	5
INTRODUCCIÓN.....	6
I. La Mitochondria, organelo central en el metabolismo oxidativo.....	6
II. El ADN mitocondrial humano, su herencia y sus enfermedades.....	7
III. La F ₁ F ₀ ATP sintasa mitocondrial humana: Estructura,	12
función y ensamblaje.	
a) <i>Composición de la F₁F₀ ATP sintasa y mecanismo de síntesis e hidrólisis de ATP...</i>	12
b) <i>Oligomerización de la F₁F₀ ATP sintasa mitocondrial y su efecto sobre</i>	15
<i>las crestas mitocondriales.</i>	
c) <i>Estructura de la F₁F₀ ATP sintasa.....</i>	17
d) <i>El motor de F₀: Mecanismo de translocación de protones acoplado a la rotación...</i>	18
e) <i>Ensamblaje de la F₁F₀ mitocondrial humana.....</i>	21
IV. Patología humana de la F ₁ F ₀ ATP sintasa: Las mutaciones en el gen	23
mitocondrial <i>ATP6</i> generan MILS y NARP.	
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
HIPÓTESIS	29
OBJETIVOS	30
RESULTADOS.....	30
I. Porcentaje de mutación en el gen mitocondrial <i>ATP6</i> , en cultivos humanos..	30
II. Ensamblaje de la ATP sintasa humana con las mutaciones L156R y L156P...	32
III. Oligomerización de la F ₁ F ₀ ATP sintasa humana mutante NARP/MILS	36
L156R y L156P.	
IV. Caracterización funcional de las mutantes homoplásmicas NARP/MILS	38
L156R y L156P.	
V. Estabilidad de la ATP sintasa mutante NARP/MILS L156R y L156P.....	42
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIONES.....	58

MATERIALES Y MÉTODOS.....	58
I. Cultivo Celular.....	58
II. Aislamiento de ADN, amplificación del gen mitocondrial ATP6 y RFLP para la identificación y cuantificación de la mutación mitocondrial T8993G.....	59
III. Aislamiento de mitocondrias.....	60
IV. Determinación de proteína por el método de Lowry.....	61
V. Choque osmótico a mitocondrias.....	62
VI. Acoplamiento del anticuerpo 12F4AD8 a esferas de agarosa.....	62
VII. Inmunoprecipitación de F1F0.....	63
VIII. Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamids (SDS-PAGE).....	64
IX. Electroforesis azul nativa (BN-PAGE) y bidimensional (nativa/desnaturizante).....	64
X. Tinción de geles con azul de Coomassie.....	66
XI. Inmunorréplica (Western Blot).....	66
XII. Evaluación de la estabilidad a la temperatura de la F1F0 ATPsintasa nativa.....	67
XIII. Captura de imágenes y densitometría.....	67
XIV. Ensayo de Síntesis de ATP.....	67
XV. Ensayo de Hidrólisis de ATP.....	68

REFERENCIAS.....	69
------------------	----

APÉNDICES.

1. Las enfermedades humanas más frecuentes por mutación en el ADNmt.....	78
2. ARTÍCULOS PUBLICADOS (como primer autor).....	79

RESUMEN.

La F_1F_0 ATP sintasa funciona como un motor rotatorio reversible, que acopla el gradiente electroquímico de protones en membranas transductoras de energía a la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi. Se compone de dos porciones: F_1 , ubicada en la matriz mitocondrial, que contiene los sitios catalíticos para la síntesis e hidrólisis de ATP, y F_0 que atraviesa la membrana mitocondrial interna y posee un canal por el que fluyen los protones provocando la rotación de la enzima. En humanos la subunidad 6 de F_0 , que contribuye a formar este canal, se codifica en el genoma mitocondrial por el gen *ATP6*. Existen mutaciones puntuales que producen patología al incidir sobre la porción más conservada de esta subunidad. Las más frecuentes causan NARP (Neuropatía, Ataxia y Retinitis Pigmentosa) o MILS (Síndrome de Leigh heredado por vía materna), enfermedades incapacitantes y mortales con gran afección neurológica y cardíaca. En este trabajo estudiamos el efecto de un par de estas mutaciones en el gen *ATP6* (T8993G y T8993C) sobre el ensamblaje, la oligomerización, la estabilidad y la función de la ATP sintasa mitocondrial humana, para comprender el mecanismo molecular de NARP/MILS. A fin de estudiar una población homogénea de enzimas, todas con la subunidad 6 mutada, utilizamos dos tipos celulares humanos *homoplásmicos*, es decir con la mutación en todas las copias de ADN mitocondrial. Por inmunoprecipitación y electroforesis azul nativa, demostramos que la ATP sintasa mutante se ensambla correctamente en mitocondrias homoplásmicas. Las mutantes muestran además mayor sensibilidad a oligomicina, lo que comprueba que las porciones F_1 y F_0 se encuentran estructural y funcionalmente acopladas. Además, detectamos por primera vez dímeros y otros homo-oligómeros de ATP sintasa humana y demostramos que las enzimas mutantes mantienen suficiente integridad estructural para oligomerizar. Encontramos un incremento reproducible en la proporción oligómero/monómero de las mutantes T8993G, lo que sugiere que la oligomerización de la ATP sintasa está regulada *in vivo* y puede modificarse en condiciones patológicas. A pesar del correcto ensamblaje, ambas mutaciones inhiben la síntesis de ATP. En condiciones desnaturalizantes demostramos que las mutaciones NARP/MILS desestabilizan a la ATP sintasa, sin embargo esto no disminuye la cantidad de enzima ensamblada en las condiciones nativas utilizadas para medir la síntesis de ATP. En conjunto, nuestros datos demuestran que el mecanismo molecular patogénico de estas mutaciones es la inhibición funcional de la ATP sintasa humana en la enzima

completamente ensamblada. La inestabilidad estructural de las mutantes puede contribuir a la progresión de la patología.

ABSTRACT.

In energy transducing membranes, the F_1F_0 ATP synthase works as a reversible rotary motor harnessing the electrochemical proton gradient to the synthesis of ATP from ADP and Pi. It has two portions: the water-soluble F_1 , located in the mitochondrial matrix that contains the catalytic sites for ATP synthesis and hydrolysis, and the membrane embedded F_0 that spans the inner mitochondrial membrane and has a channel that couples proton flux to enzyme rotation. The proton channel is constituted in part by subunit 6, which in humans is encoded by the mitochondrial gene *ATP6*. Several point mutations in this gene produce human disease by disturbing the conserved portion of this subunit. The molecular pathogenic mechanism of the human mitochondrial diseases Neurogenic Ataxia and Retinitis Pigmentosa (NARP) and Maternally Inherited Leigh Sndrome (MILS) was studied in cultured human cells harboring homoplasmic T8993G/T8993C point mutations in the *ATP6* gene, by analysing their effect on F_1F_0 assembly, oligomerization, stability and function. Immunoprecipitation and blue native electrophoresis showed that the F_1F_0 ATP synthase assembles correctly in homoplasmic mutant mitochondria. The mutants exhibited increased sensitivity to oligomycin, which further demonstrates the tight coupling between F_1 and F_0 sectors. Additionally, human ATP synthase dimers and higher homo-oligomers were observed for the first time, and it was demonstrated that mutant enzymes retain enough structural integrity to oligomerize. A reproducible increase in the ratio of oligomeric-to-monomeric enzyme was found for the T8993G mutant, suggesting that F_1F_0 oligomerization is regulated *in vivo* and that it can be modified in pathological conditions. Despite complete assembly, both mutants exhibited a decrease in ATP synthesis. We also studied the enzyme's stability using *in vitro* denaturing conditions and demonstrated that NARP/MILS mutations confer instability to F_1F_0 , although these mutations did not produce enzyme disassembly in the near-physiological conditions used for ATP synthesis determination. Taken together, our data show that the *primary* pathogenic molecular mechanism of these deleterious human mitochondrial mutations is functional inhibition in a completely assembled ATP synthase. Under potentially denaturing conditions, mutant F_1F_0 structural instability may play a role in the progression of disease.

ABREVIATURAS

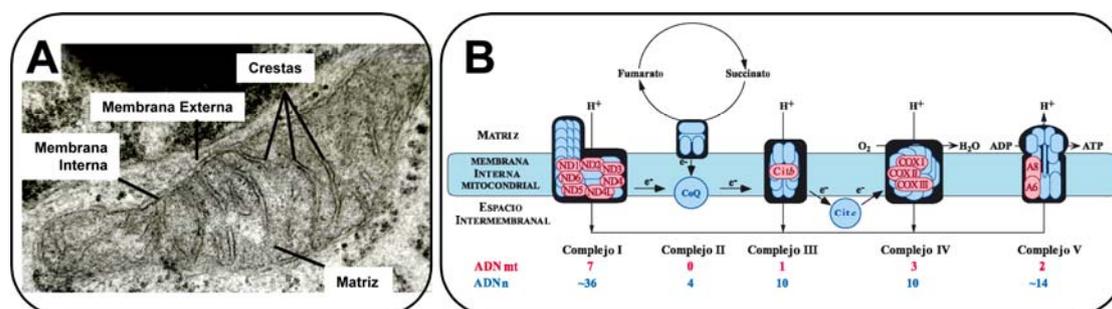
ADNmt	ADN <i>mitochondrial</i> , genoma <i>mitochondrial</i>
ADNn	Ácido desoxiribonucleico, ADN <i>nuclear</i> , genoma <i>nuclear</i>
BN-PAGE	Siglas en inglés de la electroforesis azul nativa en geles de poliacrilamida
Bis-Tris	2-bis(2-hidroxietil)amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanediol
CAPS	Ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfónico
DCCD	Diciclohexil carbodiimida
DMEM	Siglas en inglés de la Modificación de Dulbecco del Medio de Cultivo de Eagle
DMSO	Dimetil sulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilén diamina tetracético,
EGTA	Ácido glicol-bis(2-aminoetileter)-N,N',N'-tetraacético
IF ₁	Proteína inhibidora de la F ₁ F ₀ -ATP sintasa
IgG	Inmunoglobulina tipo G
MILS	Siglas en inglés del Síndrome de Leigh heredado por vía materna
NARP	Neuropatía Ataxia y Retinitis Pigmentosa
NBF-CI	4-cloro-7-nitrobenzofurazán
OSCP	Siglas en inglés de la proteína que confiere sesibilidad a oligomicina, subunidad de F ₁
PBS, PBS-T	Siglas en inglés del amortiguador de fosfatos con y sin Tween-20 (Phosphate Buffered Saline, Phosphate Buffered Saline with Tween-20)
PCR	Siglas en inglés de la reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Siglas en inglés del Banco de Datos de proteínas (Protein Data Bank)
PMSF	Fenilmetanosulfonil fluoruro
PVDF	Poliviniliden difluoruro
rARN	Ácido ribonucleico ribosomal
RFLP	Siglas en inglés del polimorfismo del patrón de restricción (Restriction Fragment Length Polymorphism)
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMSD	Siglas en inglés de la raíz cuadrada del promedio de la desviación de las distancias entre los átomos de dos estructuras (Root Mean Square Deviation)
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Siglas en inglés de la electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS
<i>sub</i> 6	Subunidad 6 de F ₀ (homóloga eucariote de la <i>sub a</i> procariote)
<i>sub a</i>	Subunidad a de F ₀
tARN	Ácido ribonucleico de transferencia
TBS-T	Siglas en inglés del amortiguador de Tris con y sin Tween-20 (Tris Buffered Saline, Tris Buffered Saline with Tween-20)
TCA	Ácido tri-cloro acético.

INTRODUCCIÓN

I. La Mitochondria, organelo versátil, central en el metabolismo oxidativo.

La mitocondria es un organelo celular compuesto por dos membranas –externa e interna- que delimitan el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial. Los pliegues de membrana interna hacia la matriz forman las crestas mitocondriales (Fig 1A). En ellas ocurre la producción aerobia de ATP mediante la fosforilación oxidativa, por la función coordinada de cinco complejos multiproteicos (Fig 1B): cuatro complejos respiratorios que generan un gradiente electroquímico y la F_1F_0 ATP sintasa que acopla ese gradiente a la síntesis de ATP [1, 2]. Además, en la mitocondria ocurre el ciclo de Krebs, la β -oxidación lipídica y algunas reacciones del ciclo de la urea y de la biosíntesis de esteroides, grupo hemo, bases nitrogenadas y aminoácidos [1]. También, la mitocondria tiene un papel fundamental en la homeostasis iónica celular, en la apoptosis vía citocromo c y en la producción de especies reactivas de oxígeno [3].

Figura 1. La Mitochondria y la Fosforilación Oxidativa.



(A) Mitocondria de fibroblasto humano vista al microscopio electrónico (cortesía de JJ García). (B) Esquema de los complejos de la fosforilación oxidativa. En rosa se esquematizan las subunidades codificadas en el ADN mitocondrial (ADNmt), y en azul las codificadas en el núcleo (ADNn). Complejo I: NADH-ubiquinol oxidoreductasa. Complejo II: Succinato deshidrogenasa. Complejo III: Ubiquinol-citocromo c oxidoreductasa, o complejo bc1. Complejo IV: Citocromo oxidasa. Complejo V: F_1F_0 ATP sintasa. Tomado de [4].

A pesar de que estas funciones son comunes a la mayoría de las mitocondrias, estos organelos muestran enorme variabilidad en su forma, tamaño, número y localización entre distintos tipos celulares, y hasta la mitad de sus proteínas se expresan de manera tejido-específica [5]. La mayoría de las células de mamífero poseen cientos o miles de mitocondrias con diámetro alrededor de 1 μ m, y con frecuencia forman una red que dinámicamente se fusiona y se escinde [5].

La mitocondria surgió hace 1,500 a 3,500 millones de años, por endosimbiosis entre una α -proteobacteria de vida libre y un proto-eucariote [6]. De su origen, conserva su

propio, aunque pequeño, genoma funcional [6], que se organiza de forma dramáticamente distinta al genoma nuclear y es esencial para el correcto funcionamiento del organelo [6, 7]. Además la mitocondria posee su propia maquinaria de expresión de proteínas [7] y se replica por fisión a partir de si misma [8].

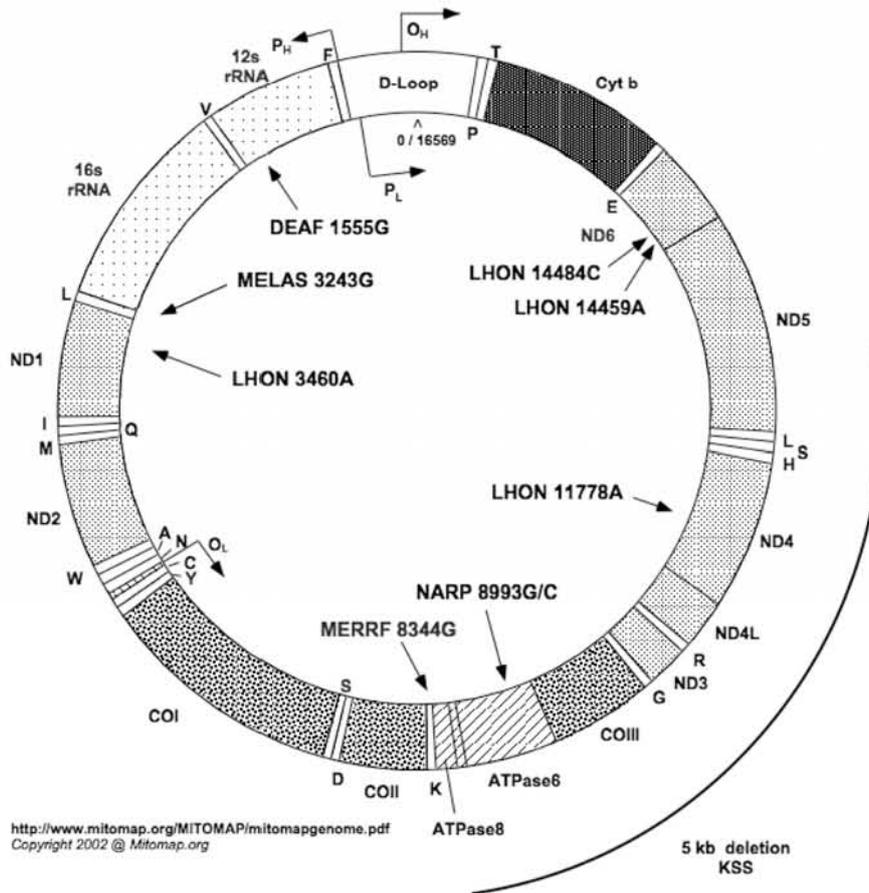
II. El ADN mitocondrial (ADNmt) humano, su herencia y sus enfermedades.

El genoma mitocondrial humano (Fig 2) es circular de doble cadena y se compone de 16,568 pares de bases que codifican 22 ARNs de transferencia (tARNs), 2 ARNs ribosomales (rARNs 12S y 16S) y únicamente 13 proteínas integrales de membrana, todas ellas subunidades de los complejos de la fosforilación oxidativa (siete de las 43 subunidades del complejo I, una de las 11 subunidades del complejo III, tres de las 13 subunidades del complejo IV y dos de las 16 subunidades del complejo V) (Fig 1B) [7, 9]. El resto de las subunidades de la fosforilación oxidativa (al menos 80 proteínas) se codifica en el núcleo, se sintetiza en ribosomas citoplásmicos y debe importarse a la mitocondria junto con los demás componentes mitocondriales [10]. Alrededor de 10 % de los genes nucleares (> 2,000 genes) codifica componentes mitocondriales o participa en la biogénesis mitocondrial [10].

En cada célula humana existen miles de copias (1,000 a 10,000) [11] de ADNmt y, a diferencia del genoma nuclear, su replicación puede ocurrir varias veces en el ciclo celular, lo que se llama **replicación relajada** [11]. Como la mayoría de los genomas mitocondriales, el ADNmt humano contiene muy poco espacio no codificante, no tiene intrones, posee regiones intergénicas muy pequeñas e incluso segmentos en las que cada hebra codifica para un gen [7]. Existe una maquinaria independiente de la nuclear para replicar, transcribir y traducir el genoma mitocondrial, especializada en la expresión de las proteínas muy hidrofóbicas que permanecen codificadas en él [7].

Si bien no se organiza como el genoma nuclear, el ADNmt no está desnudo. Como los genomas bacterianos, se dispone en nucleoides asociados a la membrana interna, que contienen múltiples copias de ADNmt unidas a proteínas básicas, como las encargadas de la replicación, transcripción y reparación del ADNmt [12], de la fusión y fisión mitocondrial [8] y sorprendentemente, otras proteínas que participan en el metabolismo energético, como las subunidades α y β de la ATP sintasa y el translocador de nucleótidos de adenina [13].

Figura 2. Esquema del ADNmt humano.



Los genes codificados por la cadena pesada se marcan por fuera, y los de la ligera por dentro. Los tARNs se indican con la letra mayúscula del aminoácido que unen. **ND** son genes de subunidades del complejo I (NADH-ubiquinol oxidoreductasa), **CO** del complejo IV (Citocromo Oxidasa), y **ATPase**, del complejo V (F₁F₀ ATP sintasa). **Cytb** es el gen de la subunidad con citocromo b del complejo III. **D-Loop** es el asa de desplazamiento, única región no codificante del ADNmt, que contiene los orígenes de replicación (**OH** y **OL**) y promotores (**PH** y **PL**) de la cadena pesada y ligera. **PH** contiene los dos promotores de la cadena pesada (PH1 y 2). Con flechas se designa el sitio de algunas mutaciones humanas patogénicas frecuentes, que se detallan en el Apéndice 1. Figura tomada de [9].

La tasa de mutación del genoma mitocondrial de mamíferos es 10 a 17 veces mayor que la del genoma nuclear [14]. Con la edad se acumulan mutaciones en el ADNmt, algunas de las cuales causan disfunción en la fosforilación oxidativa o apoptosis y repercuten en el envejecimiento [14]. En especial el genoma mitocondrial sufre más daño oxidativo por encontrarse en el compartimento donde se produce la mayoría de las especies reactivas de oxígeno en la célula [3, 15]. Los sistemas mitocondriales de reparación y empaquetamiento del ADN son menos complejos que los nucleares, y esto también contribuye al incremento en su tasa de mutación. Sin embargo en la mitocondria existen sistemas de reparación del ADN que incluyen la actividad de “proofreading” y de exonucleasa 3’-5’ de la ADN polimerasa mitocondrial γ , sistemas

de escisión de bases de tipo BER (“base excision repair”), y sistemas de reparación de bases oxidadas, apareamiento erróneo, quiebres en una o las dos hélices, y entrecruzamientos [3]. De hecho, algunas de las enzimas de reparación del ADNmt son isoformas de las nucleares, con presecuencias que las dirigen a la mitocondria [3].

Cuando alguna copia de ADNmt muta se desarrolla **heteroplasmia** que significa la coexistencia de dos poblaciones de ADNmt, con y sin mutación [16]. La expansión clonal relajada de las dos poblaciones y su subsecuente distribución aleatoria entre la progenie celular -que se denomina **segregación mitótica** [16]-, resulta en células con distintas proporciones de ADNmt mutado. La condición contraria en donde todas las copias de ADNmt son iguales, se denomina **homoplasmia**.

En vertebrados, el ADNmt se hereda únicamente de la madre [11, 17, 18] ^{Nota 1}, en parte por dilución durante la fertilización (los espermatozoides contienen 50-100 copias de ADNmt, contra $>10^5$ - 10^8 copias de los ovocitos) [11, 17], aunque también existen mecanismos para la destrucción selectiva de las mitocondrias paternas [17, 18]. Se especula que esto evita la herencia de un genoma expuesto a un ambiente muy oxidante, como el que ocurre en las mitocondrias del espermatozoide durante la fecundación [18]. Entonces, para transmitirse a la progenie, las mutaciones mitocondriales deben estar presentes en las células germinales femeninas. El porcentaje de mutación en los ovocitos de hembras heteroplásmicas se determina durante la ovogénesis temprana, cuando pocas células germinales migran a la gónada y se dividen rápidamente hasta formar la población total de ovogonias [11]. Durante este proceso, la poza inicial de ADNmt se replica abundantemente y se distribuye entre los gametos. El resultado es la generación de ovocitos con porcentajes de mutación más o menos independientes del porcentaje en el resto de los tejidos de la hembra, y provoca lo que se ha llamado **transmisión sesgada** de las mutaciones a la siguiente generación, que consiste en que algunos descendientes reciben porcentajes de mutación muy altos aun de hembras con niveles de heteroplasmía relativamente bajos [11].

A finales de la década de 1980 se identificaron las primeras enfermedades por mutación del ADNmt, y en los últimos 20 años se han descrito más de 150 mutaciones

Nota 1 Existe un único reporte de transmisión paterna del ADNmt en humanos, en un paciente con miopatía mitocondrial causada por una delección *de novo* en el ADNmt del músculo esquelético [19]. Sorpresivamente se encontró que el ADNmt muscular de este individuo era de origen paterno, mientras que el del resto de sus tejidos provenía de la madre. Sin embargo éste es un fenómeno infrecuente en humanos, y no se ha encontrado en otros individuos con patología mitocondrial [20, 21].

puntuales y múltiples rearrreglos en el genoma mitocondrial asociados a una sorprendente variedad de enfermedades humanas tanto multisistémicas como tejido-específicas, todas provocadas por disfunción de la fosforilación oxidativa [9, 16]. Las enfermedades más frecuentes se resumen en el Apéndice 1.

Las mutaciones del ADNmt se subdividen en: **(a) Mutaciones puntuales en los genes proteicos:** Se han identificado en todas las proteínas codificadas en el ADNmt humano, salvo *A6L*. Pueden ser mutaciones *sin-sentido* y generar una subunidad trunca; o *anti-sentido* y alterar el ensamblaje o la función de la subunidad.

(b) Mutaciones puntuales en los genes de ARNs ribosomales y de transferencia: Interfieren con la síntesis de todas las proteínas codificadas por el ADNmt. Con frecuencia afectan a los tARNs de leucina (tARN^{Leu(UUR)}) e isoleucina (tARN^{Ile}).

(c) Rearreglos: Incluyen las ablaciones y las duplicaciones del ADNmt, y su tasa de aparición *de novo* es mayor que la de las mutaciones puntuales. Las duplicaciones no generan enfermedad, pero predisponen a la aparición de ablaciones. El sitio y la extensión de las ablaciones varía ampliamente -de 2 bases a 8.8 kilobases- y no correlaciona de manera lineal con las manifestaciones, ya que basta un cambio de marco de lectura o la ablación de un tARN para impedir la correcta expresión de múltiples genes proteicos del ADNmt. A diferencia de las mutaciones puntuales, las ablaciones se acumulan en los tejidos con el tiempo. Revisado en [9].

La distribución aleatoria del ADNmt entre los tejidos, aunada a la heteroplasmia, provoca una expresión muy variable de las enfermedades mitocondriales entre distintos individuos [16, 22]. Los tejidos más afectados son aquellos en los que por azar se acumulan más copias de ADNmt mutado. Sin embargo el porcentaje de mutación no afecta de manera lineal al fenotipo ya que, hasta cierto grado, el ADNmt sano es capaz de compensarlo. Así, la enfermedad se manifiesta únicamente cuando la proporción de ADNmt mutado rebasa cierto **umbral** [16, 22], que es diferente para cada mutación y para cada tejido. Los órganos con el menor umbral para la expresión de enfermedades mitocondriales son el sistema nervioso, el corazón, el músculo, el riñón y las glándulas endócrinas [16]. Estos órganos por ser excitables o por realizar abundante transporte activo, requieren del suministro súbito, copioso y localizado de ATP para alimentar a las bombas iónicas [16], por lo que dependen de la fosforilación oxidativa para funcionar con eficiencia.

Existe un modelo experimental que permite corroborar la patogenicidad de las mutaciones en el genoma mitocondrial, basado en la fusión entre células enucleadas de

pacientes y células con un transfondo nuclear conocido que carezcan de ADNmt (células $\rho 0$)^{Nota 2}. Las células resultantes se llaman cíbridos, híbridos citoplásmicos o híbridos trans-mitocondriales [23, 24], y permiten estudiar la función de las mitocondrias de un paciente en presencia de genes nucleares normales, para corroborar si la mutación del genoma mitocondrial es suficiente para generar defectos en la fosforilación oxidativa^{Nota 2}.

La fosforilación oxidativa puede afectarse también por mutación en los genes *nucleares* involucrados en esta vía, produciendo patología con herencia mendeliana [29]. Los defectos genéticos en la fosforilación oxidativa se presentan en 1:7,500 individuos [22]. Cuando se manifiestan en adultos, la mitad de éstos son por mutaciones en el ADNmt, y la otra mitad por mutaciones nucleares [29]. En niños, el 80% se debe a mutaciones nucleares [29]. Las mutaciones del ADNmt ocurren con mayor frecuencia en los genes de tARNs, seguidas de las mutaciones en los genes proteicos, como *ATP6* que codifica una subunidad esencial del segmento F_0 de la ATP sintasa. Las mutaciones en *ATP6* producen patología humana devastadora para la que no existe cura, y cuyo estudio puede arrojar luz sobre el mecanismo molecular de un segmento de la F_1F_0 ATP sintasa humana que es difícil de manipular genéticamente.

^{Nota 2} Al incubar células con bromuro de etidio a bajas concentraciones (50-100 ng/ml), éste se acumula en las mitocondrias por efecto de su carga, y se intercala en el ADNmt inhibiendo su replicación sin afectar significativamente al ADN nuclear [24]. Al cabo de varias generaciones se producen células sin ADNmt, llamadas $\rho 0$, que no realizan fosforilación oxidativa y por su disfunción mitocondrial son auxotróficas para uridina y piruvato. La uridina es un intermediario en la síntesis de pirimidinas, cuya producción por la dihidroorotato deshidrogenasa depende de la cadena mitocondrial de transporte de electrones. Por su parte el piruvato permite a la célula regenerar el NAD^+ necesario para mantener la glucólisis activa [25]. Las células $\rho 0$ contienen mitocondrias poco reticuladas y sin crestas [26] que generan un bajo potencial de membrana -mediante la hidrólisis de ATP en la matriz por la F_1 ATPasa y el intercambio ADP/ATP con el citosol [27]- y son capaces de importar proteínas expresadas desde el núcleo [28]. En la construcción de cíbridos generalmente se utilizan como células receptoras versiones $\rho 0$ de neoplasias humanas estables, como el osteosarcoma 143B, el teratocarcinoma NT2 ó el carcinoma HeLa de cervix [23, 24], que son inmortales, están bien caracterizadas y crecen en abundancia.

III. La F₁F₀ ATP sintasa mitocondrial humana: Estructura, función y ensamblaje.

a) *Composición de la F₁F₀ ATP sintasa y mecanismo de síntesis e hidrólisis de ATP.*

La F₁F₀ ATP sintasa acopla con mucha eficiencia un gradiente electroquímico de protones -o de sodio, en algunas bacterias- a la síntesis de ATP [2, 30], por lo que resulta esencial para el metabolismo de organismos muy diversos. Se encuentra presente en la membrana celular bacteriana, en la tilacoidea del cloroplasto y en la interna mitocondrial; y en todos los casos tiene una estructura similar que le permite funcionar como un motor molecular rotatorio [30-33]. Se compone de dos segmentos acoplados: la porción membranal F₀, que posee un canal para el paso de protones; y la porción soluble F₁, que une nucleótidos y cataliza la síntesis e hidrólisis de ATP [33].

La forma más sencilla de esta enzima se encuentra en eubacterias, donde contiene 8 tipos de subunidades: 5 en F₁ (α , β , γ , δ , ϵ) y 3 en F₀ (a , b , c) [34]. En F₁, 3 subunidades α y 3 β se alternan formando un hexámero globular que se une a un cuello central rotatorio formado por las subunidades $\gamma\epsilon$ [35]. F₁ tiene tres sitios catalíticos, y tres sitios que unen nucleótidos pero no catalizan. Todos están ubicados de manera alternada, en las intercaras $\alpha\beta$ [33, 35]. Las subunidades β contienen los sitios catalíticos [35], que funcionan con cooperatividad positiva en la catálisis y cooperatividad negativa en la unión de sustratos [33].

En la F₀ bacteriana, múltiples copias -9 a 14- de la subunidad c se agrupan formando un anillo rotatorio, junto al cual se dispone la subunidad a (*sub a*), no rotatoria [36]. Los protones fluyen entre la *sub a* y el anillo de subunidades c [36], provocando la rotación del anillo y de las subunidades del cuello central de F₁ [30, 36]. Las subunidades que giran al centro de la enzima - c , γ , ϵ - integran juntas el *rotor*, que se mueve respecto a un *estator* compuesto por el resto de subunidades. En bacterias, un dímero de subunidades b [37] se adosa a la *sub a*, formando un cuello lateral coronado por δ , que une al hexámero de $\alpha\beta$ y fija el estator de F₁ con el de F₀ [38].

La rotación de γ induce cambios conformacionales en el hexámero de $\alpha\beta$ que permiten la síntesis y la liberación de ATP de acuerdo a un mecanismo cíclico de sitios alternantes [33, 39], en el que cada uno de los tres sitios tiene, en un momento dado, distinta conformación y afinidad por ATP. En ausencia de un gradiente electroquímico, la enzima puede acoplar la energía proveniente de la unión y la hidrólisis de ATP, en F₁, al bombeo de protones en F₀. Durante un ciclo de rotación de 360 ° se sintetizan 3

ATPs en el sentido de las manecillas del reloj (visto desde el espacio intermembranal), o se hidrolizan 3 ATPs en el sentido contrario [32, 33]. Cuando no están acopladas, las dos porciones de la enzima pueden catalizar por separado: F_1 hidrolizando ATP, y F_0 conduciendo protones [40].

La F_1F_0 *mitochondrial* (Fig 3A) es similar a la bacteriana tanto en su estructura global como en su funcionamiento. Contiene todas las subunidades presentes en bacterias y algunas extra: en humanos está constituida por 16 subunidades [41] y en levaduras por al menos 18 [42] (Tabla 1). Las subunidades de la enzima eucariote que no están presentes en bacterias se denominan supernumerarias.

Las subunidades $\alpha\beta$ de F_1 están muy conservadas -72 % de identidad entre *E. coli* y humano-, y el segmento F_1 mitocondrial posee únicamente dos subunidades más que el bacteriano [41]: ϵ y una subunidad reguladora llamada proteína inhibidora de F_1 o IF_1 (Tabla 1). Sin embargo, la nomenclatura comparativa de las subunidades de F_1 es intrincada: la subunidad δ de eucariotes es homóloga a la ϵ de bacterias; mientras que la ϵ eucariote no tiene contraparte bacteriana y se encuentra también en el cuello central. Así, el cuello central de F_1 en mitocondrias se compone de las subunidades $\gamma\delta\epsilon$, que junto con el anillo de c , integran el **rotor** en la enzima mitocondrial. Por otro lado, la subunidad **OSCP** es homóloga a δ de bacterias, y completa el cuello lateral acoplando F_1 con F_0 (Fig 3A).

La subunidad reguladora IF_1 es una larga α -hélice de 84 residuos, no esencial para la catálisis que, mediante su interacción con $\alpha\beta$ y con el cuello central, impide tanto la síntesis como de la hidrólisis de ATP [40, 43]. Su papel fisiológico es evitar la hidrólisis de ATP en mitocondrias cuando el potencial transmembranal no es óptimo para la síntesis [40, 43]. Además aumenta la estabilidad de F_1 y F_1F_0 , como se ha demostrado en experimentos de desnaturalización [44-46].

Como en bacterias, F_0 en mitocondrias contiene un anillo de subunidades c que, en respuesta al flujo de protones, rota respecto a la subunidad δ -homóloga de a - y a la subunidad b que forma el cuello lateral (Fig 3A). Además, la enzima mitocondrial tiene varias subunidades extra en F_0 [47] (Tabla 1). Dos de ellas - d y F_6 - son proteínas solubles que, junto con b y **OSCP**, forman el cuello lateral. El resto - e , f , g y $A6L$ - tiene un cruce transmembranal, y se acomoda en torno a las subunidades b y δ . En levadura, se agregan además las subunidades i [48] -transmembranal- y k [42] -periférica a la membrana-, que no existen en mamíferos. En ausencia de las

subunidades supernumerarias **IF₁** [49], *i* [48], *e*, *g*, o *k* [42] las levaduras aún son capaces de crecer en medios no fermentables, por lo tanto se asume que no son esenciales para la síntesis de ATP. No obstante, como se discutirá después, estas subunidades participan en la dimerización de la enzima, y la ablación de *e*, *g* o *k* provoca la pérdida parcial o total del ADNmt en cultivos prolongados [50].

Tabla 1. Composición de la F₁F₀ de distintos organismos [41, 42]

Segmento	Subunidad (masa Kda)		
	<i>E. coli</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>S. cerevisiae</i>
F₁	3 α (55)	3 α (55)	3 α (55)
	3 β (50)	3 β (51)	3 β (51)
	γ (32)	γ (30)	γ (30)
	δ (19)	OSCP (21)	OSCP (20)
	ε (14)	δ (15)	δ (14)
	-	ε (5.6)	ε (6.6)
	-	IF₁ (10)	IF₁ (7) ⁺
F₀	a (30)	6 (25) *	6 (27) *
	2 b (17)	b (24)	4 (23)
	ⁿ c (8.2)	ⁿ c (7.6)	¹⁰ g (7.7) *
	-	d (18)	d (10)
	-	e (8)	e (10)
	-	f (10)	f (10)
	-	g (11)	g (12)
	-	F6 (9)	h (10)
	-	-	i (6.6)
	-	-	k (7.5)
	-	A6L (8) *	8 (5.8) *

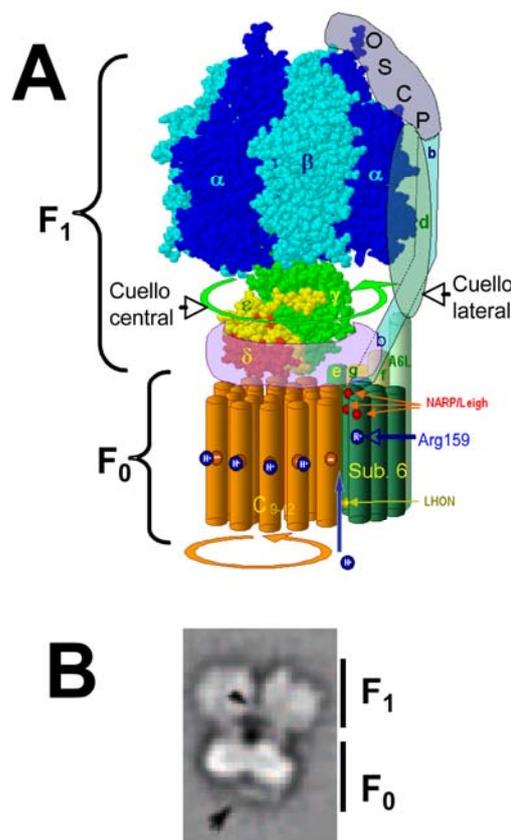
Las estequiometrías las subunidades en la enzima monomérica se indican, con numeros arábigos, antes del nombre de la subunidad. Donde no se especifica, la estequiometría es de uno. Sólo las subunidades **α**, **β**, y **c**, así como la **b** bacteriana tienen una estequiometría > 1.

ⁿ Indica que la estequiometría de la subunidad **c** aún se discute (ver texto).

+ Además de la proteína inhibidora (IF₁) la levadura tiene al menos dos proteínas más que participan en la inhibición, llamadas STFs (stabilization factors).

* Subunidades codificadas en el ADNmt.

Figura 3. La F₁F₀ ATP sintasa mitocondrial de mamíferos.



(A) Esquema de la F₁F₀ mitocondrial humana, con la ubicación de sus subunidades. Se indica el sitio propuesto para las mutaciones en la subunidad 6 (**Sub 6**), asociadas a NARP/MILS (puntos rojo) y a LHON (punto amarillo). En azul se muestra la ubicación de la arginina 159, esencial para la translocación de protones, en la cuarta hélice de la **sub 6**. Tomado de [51]. (B) La F₁F₀ dimerica de mitocondria de corazón de res, vista por microscopía electrónica. Con puntas de flechas se señalan los puentes que se observaron entre los segmentos F₁ y F₀. Tomado de [52].

Existen múltiples inhibidores químicos de F_1F_0 que afectan tanto a la enzima de procariotes como a la mitocondrial. Algunos inhiben la catálisis en F_1 (azida [53, 54], efrapeptina [55, 56], DCCD [56, 57], aurovertina [55, 58], NBF-Cl [56]) y otros se unen a F_0 y se propone que bloquean el flujo de protones y/o la rotación (DCCD [59, 60], venturicidina [58], oligomicina [58, 59] ^{Nota 3}). Los inhibidores que se unen en F_1 pueden impedir la actividad de F_0 y viceversa, siempre que ambos sectores estén acoplados a través de los dos cuellos bien ensamblados.

b) Oligomerización de la F_1F_0 ATP sintasa mitocondrial y su efecto sobre las crestas mitocondriales.

Mediante electroforesis azul nativa [42, 62] y microscopía electrónica [52, 63], recientemente se describió que la F_1F_0 mitocondrial se organiza en homodímeros y otros homo-oligómeros. Por microscopía electrónica se observó que la dimerización ocurre mayoritariamente mediante contactos entre los segmentos F_0 [52] (Fig 2B). En levaduras, donde la oligomerización ha sido más estudiada, las subunidades *e*, *g* y *k* se encuentran únicamente en los dímeros y oligómeros de la enzima [42]; y la ablación de *e* o *g* impide la oligomerización de F_1F_0 [42]. La enzima bacteriana, que carece de estas subunidades, no forma oligómeros [64]. En mamíferos –como res y rata- la ATP sintasa se ha observado en forma dimerica y oligomérica [52, 62, 65], aunque no se han identificado subunidades dímero-específicas. Por otro lado, las formas oligoméricas de la ATP sintasa mitocondrial humana no se han estudiado.

En levaduras pueden entrecruzarse las subunidades *b*, aún en ausencia de *e* o *g* [66], a pesar de que su estequiometría por monómero de F_1F_0 es uno. Esto implica que *b* también participa en la homodimerización de la enzima. Lo mismo ocurre para la subunidades *h* e *i* [48]. (La subunidad *h* es equivalente a *F6*, del cuello lateral de mamíferos; mientras que la subunidad *i* no tiene homólogos en mamíferos, ver Tabla 1). Por lo anterior, se propone que la formación de dímeros y su organización en oligómeros mayores, requiere de dos superficies de contacto entre los monómeros, ambas en F_0 : una formada por las subunidades *e* y *g*, y la otra por *b* y otras subunidades del cuello lateral [48].

^{Nota 3} La F_1F_0 bacteriana es menos sensible a oligomicina que la enzima mitocondrial. En membranas de *E. coli* la actividad de ATPasa se inhibe 28 % con 100 μg de oligomicina/mg de proteína, mientras que en partículas sub-mitocondriales de corazón de res se inhibe 95 % con 0.4 μg /mg de proteína [61].

Por otro lado, la proteína inhibidora de F_1 (IF_1) se homodimeriza a través sus extremos carboxilo, formando una hélice enrollada anti-paralela [67] con los extremos amino-terminales libres para unir F_1 . Así es capaz de dimerizar a los segmentos F_1 aislados [68, 69], pero su contribución a la dimerización del complejo F_1F_0 completo ha sido motivo de controversia. La ablación de IF_1 en levadura no altera la formación de dímeros de F_1F_0 [49], lo cual concuerda con la baja tendencia de la proteína inhibidora de levadura para dimerizar [70, 71]. En contraste, en la enzima mitocondrial de rata y res la reconstitución con IF_1 aumenta la dimerización de F_1F_0 [72]. Además, en la microscopía electrónica del complejo F_1F_0 dimérico de mitocondrias de corazón de res, se observa un puente entre los segmentos F_1 congruente con la ubicación de la proteína inhibidora [52] (Fig 3B). Entonces, se propone que en mamíferos la proteína inhibidora favorece y/o estabiliza la oligomerización de F_1F_0 , aunque al parecer no es esencial para que ocurra ésta.

Existe evidencia de que los oligómeros de F_1F_0 ocurren *in vivo*: por microscopía electrónica, en membranas mitocondriales de *Paramecium multinucleatum* se observan cadenas de F_1F_0 [73], y por microscopía de fuerza atómica en membranas mitocondriales de levadura se han identificado arreglos de F_0 en hileras de dímeros [74]. Además, existe transferencia de energía entre proteínas fluorescentes adosadas a las subunidades *b* de F_1F_0 en levaduras [75]. Sin embargo, se desconoce la proporción de F_1F_0 que se encuentra en estado oligomérico *in vivo*.

Sorprendentemente, la ablación de las subunidades *e* y *g*, y otras estrategias para evitar la formación de dímeros, provoca mitocondrias sin crestas, cuya membrana interna prolifera hasta formar estructuras concéntricas que se han descrito como “aros de cebolla” [50, 76, 77], y que espontáneamente pierden el ADNmt al cabo de algunas generaciones [50]. Por ello, se propone que la oligomerización de F_1F_0 participa en la formación o el mantenimiento de las crestas de la membrana mitocondrial interna. Por microscopía electrónica se observa que, al dimerizar, los monómeros de F_1F_0 forman un ángulo con el vértice en la membrana (Fig 3B) que, se postula, induce una curvatura en la membrana interna y contribuye a moldear las características crestas [52, 78].

Aún se desconocen las implicaciones de la oligomerización de F_1F_0 sobre la eficiencia de síntesis de ATP, pero es factible que la oligomerización incremente la catálisis si la unión entre dos estatores aumenta la resistencia al arrastre provocado por la rotación de la enzima. La hidrólisis de ATP de dímeros y monómeros de F_1F_0 de mitocondrias de corazón de res se comparó recientemente en geles azules nativos. Los

dímeros mostraron hasta 4 veces más actividad de ATPasa que los monómeros [79]. Sin embargo, esta diferencia no se mantuvo al analizar los complejos extraídos de partículas submitocondriales, a pesar de que la proporción dímero/monómero no cambió [79].

c) Estructura Atómica de la F_1F_0 ATP sintasa.

La estructura completa del complejo F_1F_0 no se conoce con detalle atómico. El segmento F_1 se ha determinado casi entero, a alta resolución y de diversas fuentes – mamíferos [35, 80-82], levadura [83], bacterias [84, 85], cloroplasto [86]. Estas estructuras han confirmado el mecanismo de sitios alternantes al evidenciar las diferencias predichas entre los tres sitios catalíticos: cada uno tiene una conformación distinta y un nucleótido diferente unido [35]. Además se corroboró que la subunidad γ mantiene contactos simultáneos con cada una de las subunidades α y β . Por la asimetría intrínseca de γ , estos contactos son todos diferentes [35]. También, la porción soluble del cuello lateral de F_1F_0 de mamífero empieza a conocerse por difracción de rayos x [87, 88]. En cambio, la estructura del segmento hidrofóbico F_0 sólo se conoce parcialmente y a baja resolución. El anillo de subunidades c se ha analizado por microscopía de fuerza atómica en cristales bidimensionales de varias fuentes [89, 90], así como por difracción de rayos-x (a 3.9 Å en un complejo de *S. cerevisiae* compuesto por F_1 con el anillo de c [91]; y recientemente, el anillo aislado de la F_0 -ATPasa de sodio de *I. tartaricus*, a 2.4 Å de resolución [92]). Además, la estructura de la subunidad c monomérica bacteriana se resolvió por RMN, a pH 5.0 [93] y 8.0 [94]. Con base en estas estructuras y en estudios bioquímicos [95], se sabe que la subunidad c se compone de dos hélices transmembranales unidas por un asa, y que sus extremos terminales se encuentran en el espacio intermembranal. Cada subunidad c se orienta con el primer cruce transmembranal al centro del anillo y el segundo en el borde externo del anillo [94, 95] (Fig 4A).

La estequiometría de la subunidad c en F_1F_0 aún se discute. Cada subunidad c une un protón para trasladarlo al otro lado de la membrana. Entonces, el número de subunidades del anillo influye en la estequiometría H^+/ATP de la enzima [30, 96]. Por marcaje radioactivo de la subunidad [97], y por determinación bioquímica de la relación H^+/ATP [98], se predicen de 9 a 12 subunidades c en la enzima bacteriana y mitocondrial. Entrecruzamientos y fusiones genéticas de la subunidad indican que la estequiometría preferida del anillo, tanto en *E. coli* [99] como en el termófilo *Bacillus*

PS3 [100], es de 10 subunidades. También la estructura cristalográfica F_1c de *S. cerevisiae* reveló 10 subunidades [91]. Por otra parte, todas las evidencias en *I. Tartaricus* permiten distinguir 11 subunidades por anillo [92]; mientras que por microscopía de fuerza atómica se observaron 14 subunidades en el anillo de cloroplasto [90]. Esto sugiere que la estequiometría de la subunidad *c* cambia con la especie, y no se descarta que varíe también en distintas circunstancias metabólicas en un mismo organismo [96].

Las interacciones del anillo de *c* con la **sub a**, donde se propone radica el canal de protones de F_0 , no se han resuelto estructuralmente. Tampoco se conoce a detalle atómico la estructura de la **sub a**, o el resto de la porción membranal de la enzima.

d) El motor de F_0 : Mecanismo de translocación de protones acoplado a la rotación.

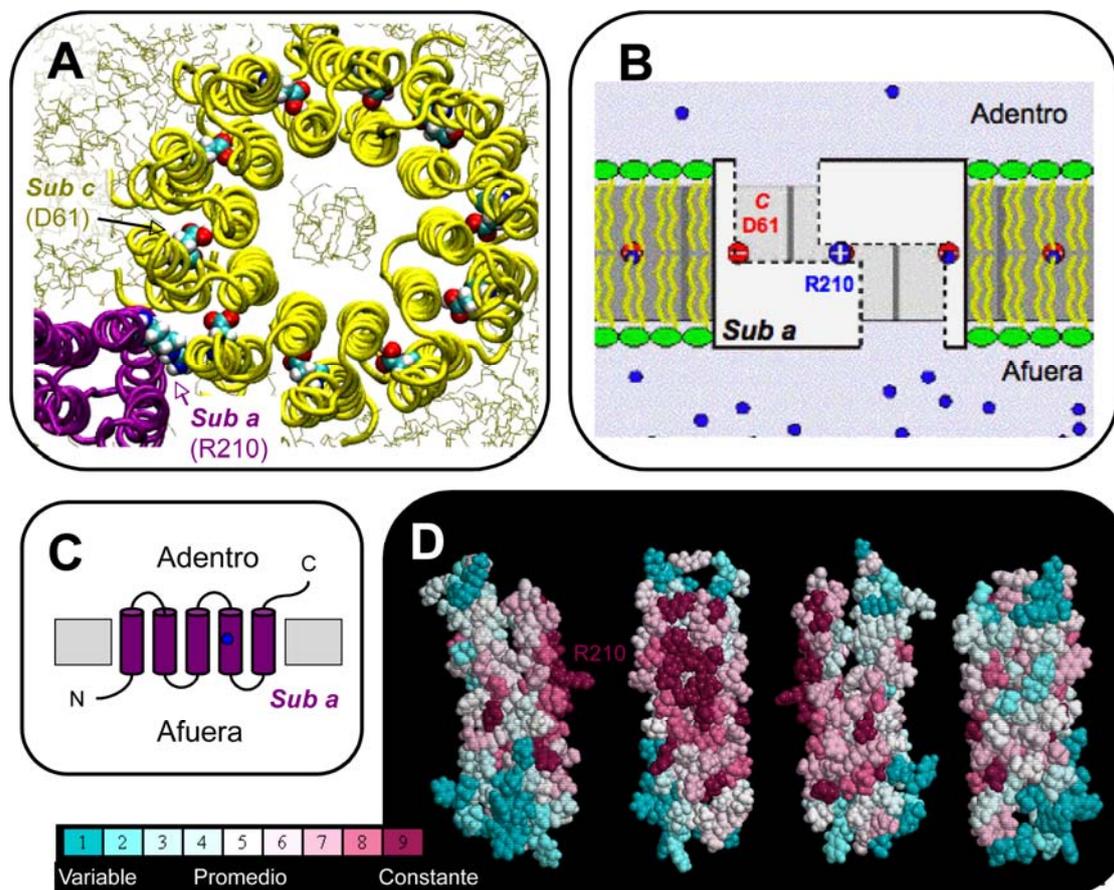
La rotación de la porción central de F_1F_0 se ha observado en experimentos de molécula única -tanto en respuesta a ATP [31, 101] como a un gradiente electroquímico [32]. Sin embargo, los eventos atómicos involucrados en esta rotación aún no se entienden del todo, sobre todo en lo que respecta a F_0 .

Por hidrofobicidad, entrecruzamientos, análisis de mutantes y accesibilidad a derivatizantes, proteasas o anticuerpos, se conoce la topología de la **sub a** de *E. coli* y su ubicación en la enzima [36, 37, 102, 103], y se han propuesto modelos estructurales de esta subunidad y su interacción con el anillo de *c* [94, 103-105] (Fig 4A). De acuerdo a éstos, la subunidad consta de 5 hélices transmembranales, con el extremo amino-terminal en el espacio periplásmico y el carboxilo-terminal en el interior bacteriano (Fig 4C). Múltiples residuos de la cuarta hélice de **a** entrecruzan con residuos de la segunda hélice de *c*, por lo que se infiere que estas hélices están adosadas [106]. A la mitad de ellas se encuentran los dos únicos residuos identificados como esenciales para la translocación de protones, ubicados frente a frente en la intercara **sub a**/anillo de *c*: la arginina 210 de **sub a** [107, 108] y el aspártico 61 presente en cada una de las subunidades *c* de *E. coli* [36]. Estos residuos están conservados en todas las especies, y sus homólogos humanos son la arginina 159 de **sub6** y el glutámico 58 de *c* [109]. Por su ambiente, el grupo carboxilo esencial de *c* posee un pKa inusualmente alto, que le permite retener un protón a pHs cercanos a la neutralidad ^{Nota 4}. El pKa de la arginina esencial de **a** también es alto, por lo que *in vivo*

^{Nota 4} En la subunidad *c* aislada de *E. coli*, el pKa para D61 determinado con RMN-1H fue de 7.1 (al menos 1.5 unidades mayor que el de otros aspárticos de la subunidad) [110]. La modificación con DCCD a diferentes pHs en la F_1F_0 de *E. coli* en micelas arrojó un pKa de 8.0 para D61 [60]. Oster y

se encuentra siempre protonada y constituye una carga positiva en la intercara *sub a*/anillo de *c* [105].

Figura 4. Modelos de la subunidad *a* y su interacción con el anillo de *c*.



(A) Modelo de la interacción entre la *sub a* (en morado) y el anillo de 10 subunidades *c* (en amarillo) de *E. coli*, visto desde el interior bacteriano. Se destacan los residuos esenciales para la translocación de protones: R210 de *sub a* y D61 en cada una de las *sub c*. Modificado de [104]. (B) Esquema de la *sub a* (al frente) que muestra los dos hemicanales conductores de protones, desde los espacios acuosos a los lados de la membrana hasta los aspárticos (en rojo) ubicados a la mitad de las subunidades *c* (esquemáticas atrás). La arginina esencial de *sub a* (R210, en azul) se encuentra en medio de los hemicanales actuando como guardavallas. Modelo propuesto por Oster y cols con base en lo descrito en [105]. (C) Esquema de la topología predicha para la *sub a* de *E. coli* y la *sub 6* humana, con 5 hélices transmembranales. Con un punto azul se muestra la ubicación de la arginina esencial. (D) Modelo de la *sub a* que destaca la conservación de sus residuos. Se muestran las cuatro caras del modelo al rotarlo en pasos de 90°. La mayoría de los residuos están poco conservados, con excepción de aquellos que se encuentran en torno a la arginina esencial (marcada con la nomenclatura de *E. coli*, como R210). Los residuos conservados forman la cara de interacción con el anillo de *c* (que se encuentra hacia el frente en la segunda imagen de izquierda a derecha), e incluyen las leucinas cuya mutación produce NARP/MILS (ver texto). Imagen generada con ayuda del Dr. Lenin Domínguez, con el programa **Consurf** (<http://consurf.tau.ac.il>), a partir de 208 secuencias de subunidades bacterianas y mitocondriales, modeladas con base en las coordenadas del PDB 1c17 [94], que incluye las 4 hélices carboxilo-terminales, predichas para la *sub a* de *E. coli*.

cols. postulan que la mayor eficiencia del rotor (es decir, la mayor velocidad de rotación en respuesta al

Se propone que en la membrana todas las subunidades **c** del anillo están protonadas y los carboxilos esenciales quedan empacados entre una subunidad **c** y la siguiente, ocultos al solvente. Sólo el par de subunidades **c** que se encuentra en la intercara con **sub a** puede desprotonarse y protonarse estocásticamente [104, 105]. Las estructuras de la subunidad **c** aislada determinadas por RMN muestran que la segunda hélice transmembranal rota 140° sobre su eje en respuesta al pH [94]. Se propone que cuando cada subunidad **c** llega a la intercara con **a**, gira su segunda hélice exponiendo el carboxilo esencial a la **sub a** [104]. La proximidad con la arginina esencial de **a** baja el pKa del carboxilo y favorece su desprotonación hacia un lado de la membrana [105]. Luego se establece un puente salino transitorio entre ambos residuos esenciales, seguido por la nueva protonación del carboxilato desde el otro lado de la membrana [104, 105].

Aunque la ruta exacta de translocación de protones no se conoce, se propone que existen dos hemicanales formados a través de la **sub a**, o en la intercara entre ésta y el anillo de **c**, que comunican el espacio acuoso a un lado de la membrana con el sitio protonable de una de las subunidades **c** en la intercara, como se observa en la Fig 4B [105, 111]. Estos hemicanales no se comunican entre sí, ya que están separados por la carga positiva de la arginina esencial de **a**. Mediante la accesibilidad de los residuos a N-etil-maleimida y plata, Fillingame y cols. proponen que, en *E. coli*, el hemicanal de entrada desde el periplasma reside entre las hélices 2, 4 y 5 de **sub a**, y termina en el residuo N214, homólogo a N163 de humano; mientras que el hemicanal de salida hacia el citosol se forma en la intercara de la cuarta hélice de **a** con el anillo de **c**, con participación de los residuos S206 y K203 de la **sub a**, que en humanos son A155 y Q152 [36, 111]. El hemicanal de salida es más corto que el de entrada, ya que la arginina esencial se encuentra más cerca del lado citoplásmico en bacterias [36], y de la matriz mitocondrial en humanos [109].

En resumen, el mecanismo propuesto para la rotación del anillo de **c** en respuesta al gradiente electroquímico es como sigue [104, 105]: cuando una subunidad **c** protonada llega a la intercara con **a**, gira su segunda hélice exponiendo su carboxilo acarreador de protón a uno de los hemicanales y a la arginina esencial de la **sub a**, lo que disminuye su pKa. Si el pH del hemicanal es favorable, el carboxilo se desprotona. Una vez desprotonado, adquiere una carga y es energéticamente desfavorable que regrese a interactuar con la membrana. En cambio, tenderá a formar un puente salino con la

flujo de protones) se alcanza si D61 tiene un pKa entre 7.0 y 7.5 [105].

arginina esencial. Esta interacción acercará al carboxilato hasta el segundo hemicanal donde, si existe una concentración alta de protones, tenderá a protonarse y a dejar de interaccionar con la arginina, cuyo puente salino se transfiere al siguiente carboxilato. La segunda hélice de *c* rota hasta su posición inicial al interaccionar con la arginina esencial, o al protonarse nuevamente [104]. Ya protonada y con su carboxilo oculto al solvente, la subunidad *c* sigue su camino hacia la membrana y da una vuelta completa en el anillo antes de encontrarse nuevamente en la intercara con *a*. Los protones ocupan y abandonan los carboxilos en la intercara con *sub a* de manera estocástica. La concentración de protones a ambos lados de la membrana determina la dirección de la rotación del anillo [105]. Con base en los modelos de F_0 de *E. coli* y a dinámicas moleculares, se estima que esta rotación ocurre a una velocidad de 75-100 revoluciones por segundo para un anillo de 10 subunidades *c* [104], congruente con las ~ 100-130 revoluciones por segundo observadas experimentalmente [31].

La arginina esencial de *sub a* actúa como guardavallas entre los dos hemicanales, evitando la rotación reversa de las subunidades *c*. Esto minimiza el flujo de protones no acoplado a rotación, aumentando la eficiencia del rotor y permitiendo que se alcance la torca necesaria de 40-50 pNewtons nm para sintetizar 3 ATPs por vuelta a los pHs presentes en torno a membranas transductoras de energía [105].

Aunque la estructura primaria de la *sub a* está poco conservada, la predicción de su estructura terciaria es similar entre diversas especies [28, 112] (Fig 4D). Los modelos de topología para la subunidad **6** humana (*sub6*) predicen cinco cruces transmembranales, equivalentes a los de su homóloga (*sub a*) de bacterias, y se propone que el motor de F_0 funciona igual en humanos [109, 113]. En torno a la arginina esencial de *sub a*, existe una región con residuos conservados, como se observa en la figura 4D. La identidad global de esta subunidad entre *E. coli* y humano es de 21.7 %, determinada con la matriz BLOSUM 80.

e) Ensamblaje de la F_1F_0 mitocondrial humana.

En humanos las subunidades **6** y **A6L** de F_0 están codificadas en el genoma mitocondrial. El resto de subunidades de F_1F_0 se importa a la mitocondria en su forma desplegada, mediante translocadores especializados en las membranas mitocondriales: el complejo TOM en la externa y el complejo TIM23 en la interna, cuyo componente final para proteínas solubles es la chaperona HSP70 [10]. Las subunidades cuyo destino es la membrana interna pueden ser insertadas en ella directamente por TIM23,

sin pasar por la matriz mitocondrial; o pueden usar la ruta *conservativa*, que conlleva su ingreso a la matriz con la participación de HSP70 y su incorporación a la membrana por una maquinaria especializada en inserción, cuyo miembro más estudiado es Oxa1^{Nota 5} [10]. La primera ruta (directa) funciona preferentemente para proteínas monotópicas (sólo un cruce transmembranal), como las subunidades supernumerarias de F₀. En cambio, las proteínas politópicas, en especial si contienen prolinas en las primeras hélices, utilizan la vía *conservativa*, como se ha demostrado para la subunidad *c* en algunos hongos [10]. Una vez en su destino, las subunidades aún requieren chaperonas para ensamblarse correctamente en F₁F₀. Además de las chaperonas generales de matriz mitocondrial -como HSP60 y 70-, existen otras específicas para cada subunidad, por ejemplo ATP12 y ATP11 que unen respectivamente la superficie hidrofóbica de α y β , evitando su agregación [114].

El proceso de ensamblaje de F₁F₀ ocurre en una secuencia específica cuyos pasos se han definido por análisis de los subcomplejos de la enzima en células con ablaciones [28, 115], o siguiendo el ensamblaje *in vivo* por experimentos de pulso y caza [116]. La mayoría del segmento F₁ se ensambla, independiente de F₀, en la matriz mitocondrial [109]. Por otro lado en la membrana interna, se ensambla el anillo de *c*, con participación de HSP70 [117]. F₁ se une a este anillo, y entonces se integran las subunidades del cuello lateral [109, 116]. En células ρ^0 , se encuentra un subcomplejo compuesto por F₁, el anillo de *c* y las subunidades *b*, **OSCP** y *d* [28]; por lo que se infiere que las subunidades codificadas en la mitocondria -*A6L* y *sub6*- se integran después de las del cuello lateral [109]. La ausencia de *A6L* impide el ensamblaje de *sub6* [115], por lo que se acepta que la *sub6* se incorpora al final, habilitando el canal de protones cuando ya existe una enzima acoplada para sintetizar ATP, con sus dos cuellos ensamblados [28, 116]. De esta manera se evita el flujo desacoplado de protones por F₀ [109].

Por estudios en levadura, se sabe que la *sub6* se sintetiza en ribosomas adosados a la membrana mitocondrial interna [118]. Su inserción en la membrana parece ser co-traduccional y auxiliada por las proteínas Oxa1^{Nota 5} y Mba1 [118]. Además las chaperonas ATP10 [117] y ATP23 [119] participan en el acomodo de la subunidad en la membrana y en la enzima, actuando desde la matriz mitocondrial y el espacio

^{Nota 5} Oxa1 exporta los segmentos con carga negativa de las proteínas membranales -asas o extremos terminales- de la matriz al espacio intermembranal, de manera dependiente del gradiente electroquímico, para favorecer su correcta topología antes de que sean degradadas por proteasas; y funciona tanto en la ruta conservativa como en la inserción de proteínas sintetizadas en la matriz mitocondrial [10].

intermembranal, respectivamente. Todos estos factores protegen a la subunidad de la degradación por proteasas. En humanos no existen homólogos de ATP10; sin embargo si los hay para ATP23 [119], Oxa1 y Mba1 (llamados respectivamente Oxa1Hs y MprL45) [118].

Se desconoce en qué paso se integran a la ATP sintasa las subunidades supernumerarias. Las que participan en la dimerización probablemente se unen al final del proceso. Congruente con esto, en levadura la ablación de **IF₁** [49] *e*, *f* o *g* [42] no evita el ensamblaje del monómero de F₁F₀; pero las subunidades **IF₁**, *e*, *f*, *g* y **F6** se encuentran disminuidas en la enzima de células ρ0 humanas [28]. Se propone que existe una poza mitocondrial de subunidades *e* no ensambladas, controlada por la GTPasa de fusión mitocondrial Mgm1 [120], y pueden existir mecanismos celulares que controlen la dimerización de F₁F₀, con consecuencias sobre el metabolismo mitocondrial y la morfología de las crestas mitocondriales.

IV. Patología Humana de la F₁F₀ ATP sintasa: Las mutaciones en el gen mitocondrial ATP6 generan MILS y NARP.

Debido a que el metabolismo celular depende del ATP producido por la F₁F₀, la deficiencia en esta enzima genera enfermedades humanas graves, la mayoría por mutación en el gen mitocondrial *ATP6* que codifica la subunidad **6** de F₀^{Nota 6}. En este gen se han identificado 10 mutaciones puntuales patogénicas (Tabla 2), seis de las cuales se manifiestan como NARP (Neuropatía, Ataxia y Retinitis Pigmentosa) o como síndrome de Leigh heredado por vía materna (MILS: Maternally Inherited Leigh Sndrome). Basta una mutación puntual en *ATP6* para producir NARP o MILS, y la manifestación patológica dependerá del porcentaje de ADNmt mutado [123].

NARP [124] se manifiesta en individuos con 70 a 90 % de mutación, y produce afecciones neurológicas progresivas que aparecen en niños, adolescentes o adultos jóvenes y se vuelven incapacitantes al cabo de algunos años o décadas. Afecta los nervios periféricos, provocando debilidad proximal neurogénica y neuropatía sensorial

^{Nota 6} Entre los genes nucleares relacionados con F₁F₀, sólo se han identificado mutaciones patogénicas en ATP12 (chaperona de la subunidad α) [121]. Además existen pacientes con deficiencia en la síntesis de ATP, *sin* defectos en el ADNmt, para los que no se ha identificado un gen nuclear responsable [121, 122].

con parestia, parestesia y dolor, sin acidosis láctica ni fibras rojas rasgadas en músculo. También cursa con severas manifestaciones cerebelares como pérdida de balance y coordinación (ataxia). Se agrega además degeneración retiniana por la muerte de células fotorreceptoras, que resulta en la pérdida progresiva de la visión, sobre todo nocturna y periférica. Puede acompañarse de sordera neurosensorial progresiva, atrofia del nervio óptico, pérdida de la función intelectual (demencia), convulsiones, o falla en la conducción cardíaca (arritmias). Con frecuencia los pacientes y sus parientes por vía materna tienen historia de retraso en el desarrollo psicomotor o problemas de aprendizaje. La prevalencia de NARP aún no se ha determinado, pero se estima alrededor de 1 en 12,000 a 45,000 individuos [125].

El síndrome de Leigh es aun más grave, y se manifiesta en neonatos, lactantes o infantes con más del 90 % de ADNmt mutado en *ATP6* [113, 123]. Cursa con severo retraso en el desarrollo psicomotor, profunda debilidad y distonía, encefalopatía con convulsiones y ataxia, asociada a lesiones necrotizantes simétricas en los ganglios basales, tálamo, tallo cerebral, y en ocasiones corteza cerebral; además de sordera, atrofia del nervio óptico o retinopatía, ptosis y nistagmus, acidosis láctica y cardiomiopatía. Generalmente causa la muerte en los primeros tres años de vida. Algunas mutaciones nucleares homocigotas que afectan a los complejos respiratorios I, II o IV, o a la piruvato deshidrogenasa, también causan síndrome de Leigh [113, 126, 127]. Esto implica que aquellas mutaciones que impiden drásticamente la fosforilación oxidativa -ya sea por afectar los dos alelos de un gen nuclear, o la mayoría de las copias de un gen mitocondrial- producen cuadros clínicos similares y devastadores, que llevan a la muerte a temprana edad. La incidencia del síndrome de Leigh es de 1 en 36,000 nacimientos [127]. De los casos de Leigh 8 al 30 % son por mutaciones en *ATP6* y se heredan por vía materna (Maternally Inherited Leigh Syndrome o MILS) [125, 127].

Todas las mutaciones que producen NARP o MILS reemplazan residuos de leucina muy conservados en la *sub6*, por arginina o prolina (Tabla 2). De acuerdo a los modelos de topología para la *sub6* humana, estos residuos se localizan en la cuarta o quinta hélice transmembranal (Fig 3A), y en estructura terciaria se agrupan en una región de residuos conservados (Fig 4D), muy cerca de la arginina esencial para la translocación de protones (R159) y del paso propuesto para los protones hacia la matriz mitocondrial [51, 113].

Tabla 2. Mutaciones puntuales humanas en el gen mitocondrial *ATP6* asociadas a patología

Mutación		Patología	Mutación descrita por:	Actividad (% respecto a silvestre) ^a	
nucleótido (ADNmt)	residuo (Sub6)			síntesis de ATP	hidrólisis de ATP
T8993G	L156R	NARP/MILS	Holt, 1990 [124]	10 a 40 (L207R: 0)	65 a 100 (L207R: 0)
T8993C	L156P	NARP/MILS	deVries, 1993 [128]	75 a 90 (L207P: 20 a 55)	100 (L207P: 50 a 100)
T9176G	L217R	NARP/MILS	Carrozzo, 2001 [129]	20 a 40 (L259R: 10)	85 a 100 (L259R: 5)
T9176C	L217P	NARP/MILS	Thyagarajan, 1995 [130]	95 (L259P: 65 a 100)	100 (L259P: 50 a 70)
T9185C	L220P	NARP/MILS	Ogilvie, 1999 [131]	95 (V262P: 65)	100 (V262P: 100)
T9191C	L222P	NARP/MILS	Moslemi, 2005 [132]	ND	ND
T8576C	L17P	Encefalomiopatía	Johansson, 2001 [133]	ND	ND
T8821C	S99P	Infertilidad	Holyoake, 1999 [134]	ND	ND
T8851C	W109R	NBE	De Meirleir, 1995 [135]	ND (F258R: 90)	ND (F258R: 100)
T9101C	I192T	LHON	Lamminen, 1995 [136]	100 (Q234T: 85)	80 (Q234T: 70)

Sombreadas se muestran las mutaciones que se estudiaron en esta tesis. **NARP:** Neuropatía Ataxia y Retinitis Pigmentosa/**MILS:** Maternally Inherited Leigh Syndrome; **NBE:** Necrosis bilateral del Estriado; **LHON:** Neuropatía Óptica Hereditaria de Leber. Además, varias ablaciones afectan al gen *ATP6* (ver Apéndice 2). También, la microdelección de los nucleótidos 9205 y 9206, que elimina el codón de paro de *ATP6* y altera la secuencia de procesamiento entre este gen y el siguiente (*Citocromo oxidasa III*), se encontró asociada a encefalopatía en un paciente [137]; aunque la patogenicidad de esta delección aún se discute [138].

^a Se incluye el intervalo de valores reportados para la actividad sensible a oligomicina, medida en mitocondrias o células humanas homoplásmicas o cercanas a la homoplasmía. Entre paréntesis se menciona la mutación equivalente en *E. coli*, y el porcentaje de actividad remanente al modelar la mutación en la bacteria. Referencias donde se estudia la actividad de las mutantes humanas: *L156R* [28, 139-144], *L156P* [140, 142], *L217R* [129], *L217P* [130], *L220P* [145] *I192T* [136, 146]. (En *I192T* la actividad de síntesis de ATP a velocidades respiratorias máximas fue la misma que en silvestres; pero se encontró un bajo cociente ATP/O a velocidades respiratorias bajas). Referencias donde se estudia la mutación en *E. coli*: *L207R* [147-149], *L207P* [131, 148, 149], *L259R* [149], *L259P* [131, 149], *V262P*, *F258R* y *Q234T* [131]. **ND:** No se ha determinado. Las actividades se revisan en [51].

Las mutaciones que reemplazan la leucina 156 o 217 por arginina (T8993G y T9176G) resultan en manifestaciones clínicas y bioquímicas más severas que la sustitución del mismo residuo por prolina (mutaciones T8993C y T9176C) [51, 113, 140] (Tabla 2). T8993G, es la más frecuente y grave de las mutaciones NARP/MILS y reemplaza, por arginina, la leucina 156, ubicada en la misma hélice transmembranal que

la arginina esencial para el flujo de protones [51]. En lo subsecuente me referiré a las mutaciones NARP/MILS por el residuo que cambian en la *sub6*: L156R o L156P.

Las mutaciones NARP/MILS suelen presentarse en una proporción similar en todos los tejidos del paciente y variar poco con el paso del tiempo (≤ 10 % en pacientes seguidos hasta por 23 años) [150]. Las características bioquímicas de las mutaciones NARP/MILS se han estudiado a partir de células en cultivo que, a pesar de su grave defecto en la fosforilación oxidativa, crecen en medios con glucosa (≥ 10 mM). Las mutantes NARP/MILS muestran una masa y distribución mitocondrial similar a la de células silvestres [151]. Sin embargo, por microscopía electrónica las mitocondrias homoplásmicas L156R tienen escasas crestas [151] (JJ García observaciones no publicadas).

Las mutaciones NARP/MILS inhiben la síntesis de ATP (Tabla 2) y producen hiperpolarización mitocondrial [28, 143, 151], que a su vez causa un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno [143] y predispone a la apoptosis [143, 151, 152]. El potencial transmembranal determinado con sondas fluorescentes se encontró aumentado alrededor de 25 % en mitocondrias homoplásmicas L156R [28, 151]. El pH de la matriz mitocondrial medido con la fluorescencia de la proteína mito-pH-luorina transfectada a cíbridos, fue 7.7 para silvestres y 8.2 para mutantes homoplásmicas L156R [143]. La producción de especies reactivas de oxígeno fue 4 veces mayor en cíbridos homoplásmicos L156R que en células silvestres [143], lo que correlaciona con un aumento al triple en la cantidad de lípidos peroxidados (malondialdehído y 4-hidroxi-alquenal) [143] y un aumento de 4 veces en la actividad y la expresión de la superóxido dismutasa mitocondrial [143, 152].

La capacidad funcional de la cadena respiratoria no se encuentra dañada en las mutantes NARP/MILS [126, 140, 153], pero el defecto en la ATP sintasa limita la velocidad de respiración en algunas condiciones. El consumo de oxígeno en estado 4 o desacoplado con dinitrofenol es similar en mitocondrias NARP/MILS y silvestres, pero el control respiratorio disminuye 25 a 35 % en cultivos primarios con las mutaciones L156R/P cercanas a la homoplasmía, a expensas de una baja velocidad de respiración en estado 3 [140, 153]. El cociente ADP/O se ha encontrado normal [140] o disminuido hasta 30 % [143, 153], en la mutante L156R.

Llama la atención que la hidrólisis de ATP parece menos afectada que la síntesis en presencia de las mutaciones NARP/MILS (Tabla 2). Baracca y cols [154] incluso encontraron incrementado el bombeo de protones acoplado a la hidrólisis de ATP en

partículas submitocondriales mutantes L156R, aunque utilizaron preparaciones heteroplásmicas en las que enzimas silvestres contribuyeron al bombeo observado. En cambio, la K_m y la V_{max} para la reacción de hidrólisis de ATP sensible a oligomicina, determinadas en partículas submitocondriales-EDTA humanas, se encontraron disminuidas 45 % en L156R y 35 % en L156P [140]. Ello sugiere que estas mutaciones afectan también la hidrólisis de ATP, aunque sin disminuir la eficiencia catalítica de F_1 , ya que el cociente V_{max}/K_m no cambió en mutantes respecto a silvestres [140].

Las mutaciones NARP/MILS se han modelado en *E. coli*, mutando los residuos 207, 259 o 262 de la **sub a** bacteriana, equivalentes a las leucinas 156, 217 y 220 de la **sub b** humana [131, 147, 148, 155]. En *E. coli* estas mutaciones también inhiben la síntesis y la hidrólisis de ATP, y la inhibición es mayor cuando el cambio se hace por arginina que por prolina (Tabla 2). De hecho, las enzimas mutantes L207R y L259R de *E. coli* muestran nula actividad de síntesis y de hidrólisis de ATP sensible a DCCD, y no bombean protones en respuesta al ATP [147-149]. Además, las membranas bacterianas de la mutante L207R (equivalente a L156R humana) contienen ≤ 40 % de la **sub a** presente en silvestres, pero conservan niveles normales de subunidades α , γ o **b** de F_1F_0 , determinadas por inmunorréplica [148, 149]. Esto sugiere que en *E. coli* la mutación L207R interfiere con la incorporación de la **sub a** en la membrana o en F_1F_0 . Las otras mutaciones modeladas en *E. coli* no disminuyen la **sub a** en las membranas, o la disminuyen sólo marginalmente [148, 149].

En conjunto, los análisis funcionales de células y mitocondrias NARP/MILS sugieren un defecto en la ATP sintasa que disminuye tanto la conducción de protones por F_0 como la síntesis de ATP. Este comportamiento podría deberse a una disminución en la cantidad total de enzima ensamblada disponible para sintetizar ATP y permitir el regreso de protones a la matriz mitocondrial. La introducción de prolina, un residuo que desfavorece la formación de hélices ^{Nota 7}, o de arginina, un residuo

^{Nota 7} La prolina distorsiona la geometría de las hélices debido a que su átomo de nitrógeno establece un enlace covalente con la cadena lateral que limita la rotación del enlace N- C_α (ángulo ϕ). Además este nitrógeno queda sin sustituyentes disponibles para establecer un puente de hidrógeno con el oxígeno del carbonilo cuatro residuos hacia el amino terminal (i-4), como sucede típicamente en las α -hélices.

Las hélices transmembranales contienen prolinas con mayor frecuencia que las hidrosolubles. Estas prolinas inducen quiebres en las hélices membranales que son importantes para la estructura y la función, o bien, se ubican en sus extremos delimitándolas [156]. De hecho, la mayoría de las hélices transmembranales no tienen una geometría ideal de α -hélice; los quiebres son muy frecuentes y al menos el 60 % de ellos se debe a la presencia de prolina [156]. La introducción de prolina en la membrana a la mitad de una α -hélice cuesta la energía equivalente a la introducción de residuos polares

polar cargado en una hélice transmembranal, podría impedir la inserción de la **sub6** en la membrana y su ensamblaje en F_1F_0 , como parece ocurrir en *E. coli* con la mutación L207R [148, 149]. Sin embargo, una enzima completamente ensamblada pero con un canal de protones bloqueado por la introducción de una carga positiva extra y/o por la distorsión del hemicanal de salida también es compatible con las características funcionales de la mutación. Para distinguir entre estas hipótesis, resulta crucial el análisis estructural de la F_1F_0 mutante, especialmente la verificación inequívoca del ensamblaje en presencia de las mutaciones.

Si una mutación evita el ensamblaje de la F_1F_0 deberían encontrarse enzimas incompletas, como las que se observan en células ρ^0 . Mediante electroforesis azul nativa de mitocondrias de pacientes con la mutación L156R aisladas de tejido cardíaco post-mortem [158], cíbridos humanos [159] o biopsias de músculo esquelético [160] la F_1F_0 se encontró muy disminuida y se identificaron grandes cantidades de segmentos F_1 aislados y F_1 con subunidades c. En contraposición, al purificar a la enzima mediante cromatografía de afinidad a partir de fibroblastos humanos con 90 % de mutación T8993G (L156R), se encontró la misma cantidad de F_1F_0 ensamblada que en células silvestres, con un contenido normal de subunidades, incluyendo a la subunidad 6 [28].

En la mayoría de estos estudios se han utilizado células heteroplásmicas [28, 158, 160], en las que se expresa tanto la **sub6** mutada como la silvestre. En éstas podría existir un sesgo hacia la incorporación de la subunidad silvestre si la subunidad mutada se pliega y/o se incorpora a la enzima más lentamente. Además, existe evidencia de que la subunidad silvestre complementa funcionalmente a la mutación: en células con 90 % de ADNmt mutado T9883G, la síntesis de ATP se inhibe tan solo 25 %; mientras que en células *homoplásmicas* se inhibe al menos 60 % [28]. Debido a esto, resulta crucial el análisis estructural de la F_1F_0 a partir de células *homoplásmicas* NARP/MILS para descartar que el ensamblaje se deba a la complementación por la subunidad silvestre.

Actualmente se realiza el diagnóstico prenatal [161] o preimplantacional [162] de las mutaciones NARP/MILS en familias con antecedentes; sin embargo no existe cura para estas enfermedades. Se han propuesto tratamientos experimentales enfocados a

cargados (ΔG_{app} 2.55, 2.25 y -0.5 kcal mol⁻¹, respectivamente para la introducción en una membrana de una hélice modelo que contiene a la mitad arginina, prolina ó leucina) [157].

paliar los efectos de la mutación mediante la administración de antioxidantes [143], o a disminuir *in vivo* la proporción de ADNmt mutado por exposición a oligomicina [141, 163] o a endonucleasas [164]. Por otro lado, la expresión alotópica de la *sub6* en cíbridos humanos se ha explorado como una opción de terapia génica (revisado en [112]), sin resultados sobre la función de F_1F_0 [165], o con modestos incrementos en la síntesis de ATP [166, 167]. En este respecto, es importante determinar si la subunidad 6 mutante puede incorporarse en F_1F_0 para predecir si la subunidad expresada desde el núcleo competirá por el ensamblaje con la subunidad mutada.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Falta evidencia para establecer el mecanismo molecular de la enfermedad de NARP/MILS. La patogenicidad de las mutaciones puede deberse a que impidan el ensamblaje de F_1F_0 [158-160], o a que provoquen un bloqueo funcional en el flujo de protones por F_0 [28, 51, 113]. Además existen opciones intermedias en donde distintos grados de ensamblaje erróneo pueden afectar la estructura o el acoplamiento de F_1F_0 o la función de la enzima en otros aspectos además del flujo de protones. La ATP sintasa con la mutación L156R se ha encontrado ensamblada [28] o desensamblada [158-160] en distintos estudios con células heteroplásmicas; mientras que el ensamblaje de otras mutaciones NARP/MILS como la L156P no ha sido analizado. Tampoco se ha determinado si las mutaciones NARP/MILS afectan la oligomerización de F_1F_0 , cuyas implicaciones para la morfología y la fisiología mitocondrial empiezan a conocerse [76]. Para entender esta incapacitante enfermedad humana y proponer tratamientos es crucial establecer inequívocamente si las mutaciones NARP/MILS impiden el ensamblaje completo de F_1F_0 . Además la correlación cuidadosa entre la estructura y la función en las mutantes homoplásmicas permitirá distinguir si la patogénesis es atribuible a un bloqueo en el flujo de protones a través de F_0 .

HIPÓTESIS

La mutación de la leucina 156 de la *sub 6* permite el completo ensamblaje de la F_1F_0 ATP sintasa humana, pero inhibe la función al bloquear el flujo de protones a través de

F₀. La síntesis disminuida de ATP en la F₁F₀ mutante completamente ensamblada, provoca NARP/MILS.

OBJETIVOS

Objetivo General: Conocer los efectos de las mutaciones *homoplásmicas* NARP/MILS en el residuo 156 de la subunidad **6** sobre la estructura y la función de la F₁F₀ ATP sintasa mitocondrial humana, para proponer un mecanismo molecular de la génesis de estas enfermedades.

Objetivos Particulares:

1. Determinar si las mutaciones homoplásmicas NARP/MILS L156R y L156P permiten el ensamblaje de la F₁F₀ ATP sintasa humana.
2. Determinar si las mutaciones NARP/MILS L156R y L156P afectan el estado oligomérico de la F₁F₀ ATP sintasa humana.
3. Determinar si las mutaciones NARP/MILS L156R y L156P afectan la función y el acoplamiento entre F₁ y F₀ de la ATP sintasa humana.
4. Determinar si las mutaciones NARP/MILS L156R y L156P afectan la estabilidad de la F₁F₀ ATP sintasa humana.

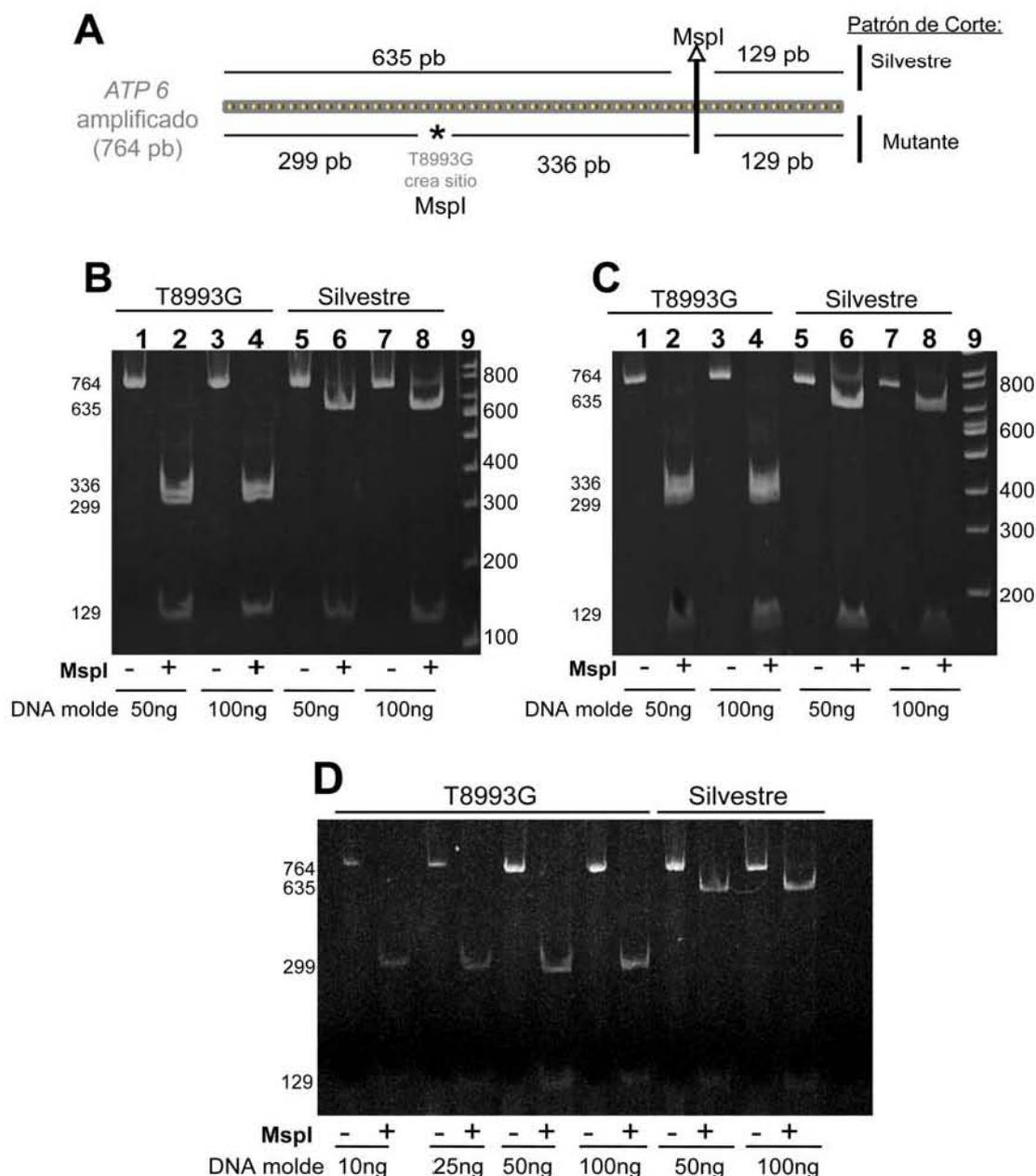
RESULTADOS.

I. Porcentaje de mutación en el gen mitocondrial *ATP6*, en cultivos de células humanas.

El mecanismo patogénico de NARP/MILS se estudió a partir de células humanas cultivadas, con las mutaciones puntuales del ADNmt T8993G o T8993C. Estudiamos dos tipos de cultivos humanos: (1) fibroblastos con la mutación L156R (T8993G) o L156P (T8993C), provenientes de la piel de pacientes con MILS, donados por el Dr B. Robinson (Hospital for Sick Children, Toronto, Canadá); y (2) cíbridos L156R resultado de la fusión entre fibroblastos enucleados de pacientes con MILS y células ρ^0 del osteosarcoma 143B/TK⁻ [151], donados por la Dra R. Carozzo (Hospital Bambino Gesù, Roma, Italia). Como controles utilizamos (1) fibroblastos silvestres MRC-5 de pulmón humano (comprados a In-Vitro), y (2) células ρ^+ de osteosarcoma

humano 143B/TK⁻ (donadas por la Dra Carozzo). Los cíbridos son inmortales, crecen más rápido que los cultivos primarios, y con ellos podemos estudiar la mutación del ADNmt en un trans fondo genético nuclear ya caracterizado e idéntico entre mutantes y controles. A su vez, los fibroblastos no han sido manipulados genéticamente y su trans fondo nuclear no es neoplásico. Todos los resultados se verificaron en ambos cultivos.

Figura 5. RFLP para determinar el porcentaje de mutación T8993G.



(A) Esquema del mapa de restricción esperado con MspI para el fragmento amplificado del gen *ATP6*, silvestre o con la mutación T8993G que crea un sitio extra para la endonucleasa (marcado con asterisco). El sitio original para MspI se indica con una flecha. (B-C) Geles representativos que muestran el análisis de RFLP del gen *ATP6* amplificado a partir de cultivos mutantes (carriles 1 a 4) y controles (carriles 5 a 8), en (B) fibroblastos y (C) cíbridos. Los carriles noes contienen el gen amplificado sin digerir, mientras que los pares contienen la

digestión con MspI. En la parte inferior se indica la cantidad de ADN que se utilizó como molde para la amplificación. Los geles en (B) y (C) fueron teñidos con bromuro de etidio y en los carriles 9 se incluyó un estándar (indicado en pares de bases o pb). (D) Muestra el análisis de RFLP con cebadores fluorescentes, sin tinción con bromuro de etidio. Se observan sólo las bandas que incorporan la fluorescencia de los cebadores. El gel muestra el gen amplificado de fibroblastos humanos, pero el mismo resultado se obtuvo con ADN de híbridos humanos.

El porcentaje de mutación T8993G de los cultivos se determinó mediante RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism o Polimorfismo del patrón de restricción) en un fragmento del gen *ATP6* amplificado por PCR, con la endonucleasa MspI que corta en un solo sitio al fragmento silvestre (Fig 5). La mutación T8993G genera un nuevo sitio de restricción para MspI (Fig 5A), lo que produce diferentes patrones de corte en el ADN silvestre y mutante. Por cuantificación densitométrica de la banda de 635 pb (patrón silvestre) en relación con las de 336 y 299 pb (patrón mutante), se determinó que < 1 % del ADNmt amplificado es silvestre en los cultivos mutantes T8993G (L156R) utilizados en este trabajo, tanto en fibroblastos (Fig 5B) como en híbridos (Fig 5C).

El análisis de RFLP también se realizó con cebadores fluorescentes que permiten la observación de las bandas de 635 pb y 299 pb con intensidad normalizada, ya que ambas incorporan el mismo cebador en el extremo 5' y por lo tanto exhiben la misma fluorescencia, a pesar de su diferente tamaño. Por fluorescencia no se detectó el patrón de corte silvestre en los cultivos mutantes (Fig 5D). Con esto confirmamos que los cultivos, tanto fibroblastos como híbridos, son homoplásmicos para la mutación L156R (T8993G).

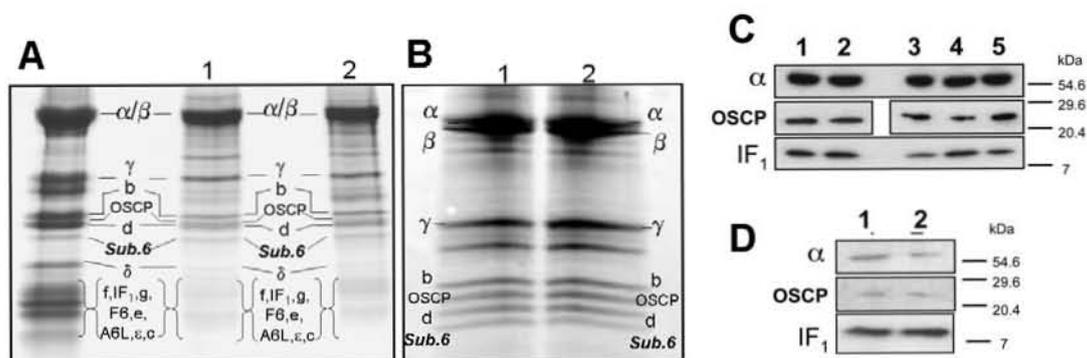
A fin de asegurarnos de que aun mínimas cantidades de ADNmt silvestre se amplificaran de estar presentes, variamos las cantidades de ADN total utilizado como molde entre 10 y 250 ng. En todos los casos observamos el mismo resultado en RFLP. Tampoco varió el porcentaje de mutación detectado al utilizar como molde el ADNmt presente en los sobrenadantes de mitocondrias sometidas a choque osmótico. El análisis de RFLP se realizó periódicamente a los cultivos y a las mitocondrias para asegurarnos de trabajar siempre con células homoplásmicas NARP/MILS. El porcentaje de mutación no se modificó a lo largo del tiempo de cultivo.

II. Ensamblaje de la F₁F₀ ATP sintasa humana con las mutaciones L156R y L156P.

Una vez verificada la homoplasmia de los cultivos mutantes, analizamos el ensamblaje de la F₁F₀ ATP sintasa a partir de mitocondrias aisladas de ellos. Por inmunorreplica de lisados de mitocondrias, determinamos que las mutantes L156R y

las silvestres expresan una cantidad similar de subunidades α , OSCP e IF₁ (Fig 6C). A continuación, inmunoprecipitamos a la ATP sintasa a partir de mitocondrias, con un anticuerpo monoclonal que reconoce la porción globular nativa de F₁ (José García, resultados no publicados), y captura a la enzima completa, nativa, funcional y sensible a oligomicina [168]. En este ensayo, las subunidades de F₀ co-inmunoprecipitarán con F₁ solamente cuando ambos segmentos se encuentren asociados, lo que permite evaluar el ensamblaje de la ATP sintasa. Las enzimas humanas inmunoprecipitadas se analizaron por SDS-PAGE. El rendimiento de la inmunoprecipitación fue similar en mutantes L156R y silvestres; y en ambas se encontró el mismo patrón de subunidades (Fig 6A y B): α , β , γ , δ , *b*, OSCP, *d*, y la *sub6* que alberga las mutaciones NARP/MILS. Las subunidades pequeñas de F₁ (IF₁ y ϵ) y de F₀ (*e*, *f*, *g*, A6L, F6 y *c*) no se resolvieron.

Figura 6. F₁F₀ humana purificada por inmunoprecipitación a partir de mitocondrias NARP/MILS.



(A-B) SDS-PAGE, teñido con azul de Coomassie, de la F₁F₀ ATP sintasa inmunoprecipitada a partir de mitocondrias silvestres (carriles 1) o mutantes L156R (carriles 2) de (A) fibroblastos y (B) cíbridos. Las subunidades se asignaron de acuerdo a [168], y se han confirmado por espectrometría de masas. En el carril de la extrema izquierda de (A) se incluyó como estándar F₁F₀ inmunoprecipitada a partir de mitocondrias de corazón de res. En (B) las mitocondrias se sometieron a choque osmótico antes de solubilizarlas. La proporción densitométrica γ /*sub 6* fue 4.12 y 5.03, en silvestres y cíbridos L156R, respectivamente, y *b*/*sub 6* fue 2.04 y 2.00.

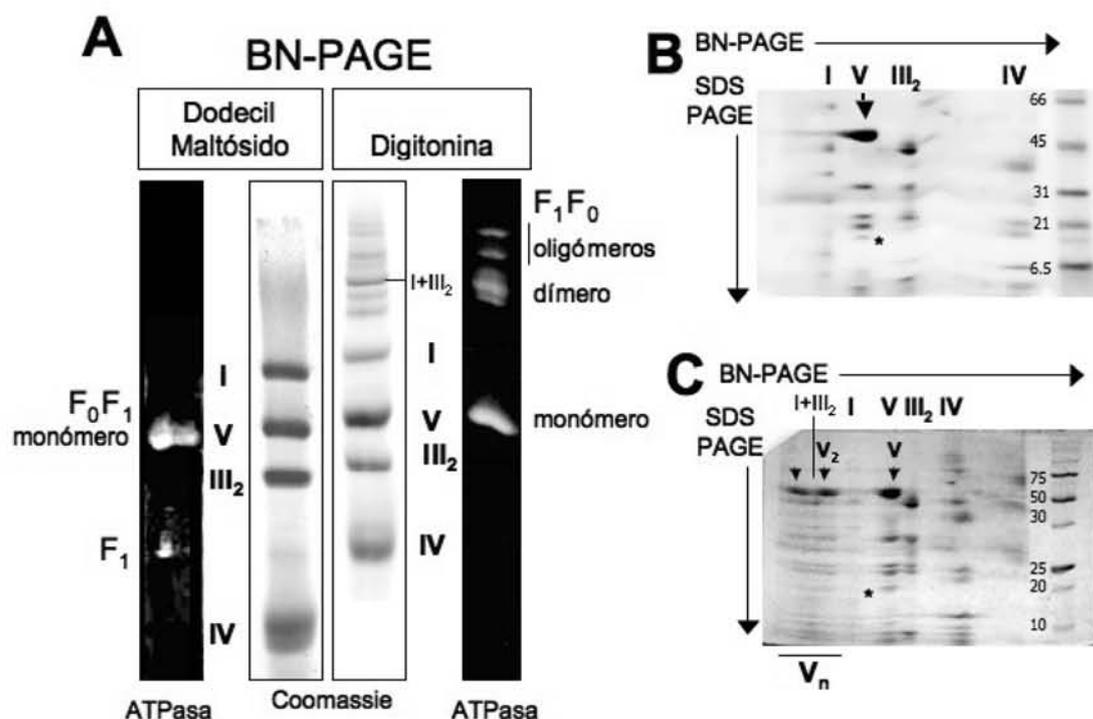
(C-D) Las subunidades α , OSCP e IF₁ se detectaron en inmunorréplica con anticuerpos monoclonales, en 10 μ g de lisados de mitocondrias completas (C), o en 50 μ l de sobrenadantes post-choque osmótico de mitocondrias (D). Carriles: (1) osteosarcoma silvestre, (2) cíbridos L156R, (3) fibroblastos silvestres, (4) fibroblastos mutantes L156R y (5) L156P.

Las enzimas mutantes inmunoprecipitadas, tanto de fibroblastos (Fig 6A) como de cíbridos (Fig 6B), contienen *sub6* en la misma proporción que las enzimas silvestres (determinado por análisis densitométrico de SDS-PAGE), lo que indica que la *sub6* con la mutación L156R se incorpora en la enzima. También sometimos mitocondrias a choque osmótico a fin de retirar las proteínas de la matriz mitocondrial antes de solubilizar las membranas para la inmunoprecipitación. Este paso aumentó la pureza de

la F_1F_0 inmunoprecipitada (Fig 6B). Además, por inmunorréplica determinamos que la cantidad de subunidades de F_1 (α , **OSCP** e **IF₁**) liberadas al sobrenadante tras el choque osmótico es similar en mitocondrias silvestres y mutantes L156R (Fig 6D); lo que indica que las mutantes no tienen más F_1 libre en la matriz.

Para corroborar el ensamblaje de F_1F_0 utilizamos también electroforesis azul nativa (BN-PAGE), técnica que permite separar en su forma nativa los complejos respiratorios extraídos con detergente, teñirlos por actividad, y someterlos a segundas dimensiones de electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) para separar las subunidades que los componen (Fig 7).

Figura 7. La Electroforesis Azul Nativa permite el análisis de F_1F_0 .

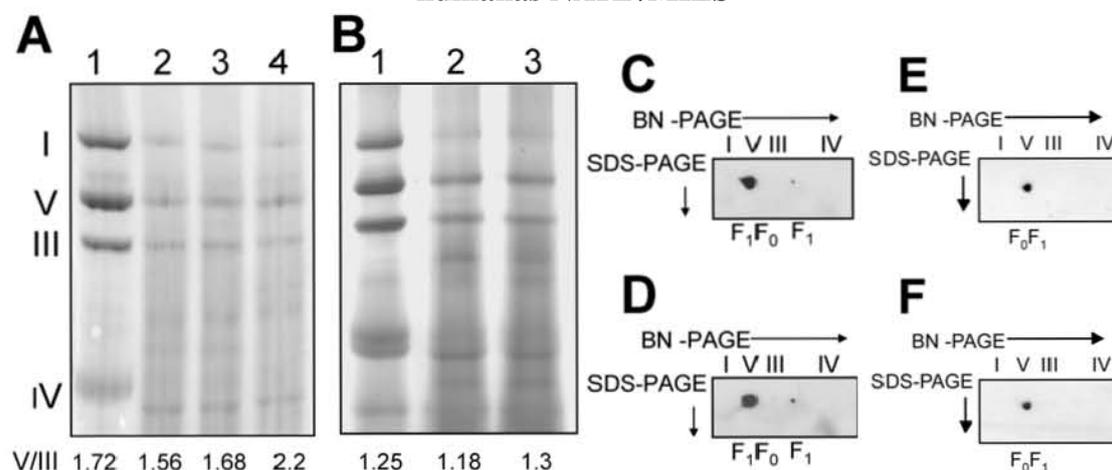


Solubilizados de mitocondrias de corazón de res analizados por electroforesis azul nativa (BN-PAGE), para estandarizar la detección de F_1F_0 . (A) muestra la separación mediante BN-PAGE de los complejos de la fosforilación oxidativa nativos (designados con números romanos), extraídos con los detergentes que se indican arriba del carril (2.5 g/g, detergente/proteína). Se incluyeron 40-60 μ g de proteína del solubilizado por carril. La digitonina respeta algunos supercomplejos (bandas más pesadas que el complejo I), incluyendo oligómeros de F_1F_0 . Se indica la banda identificada como dímero, y las que corresponden a otros oligómeros de F_1F_0 . Con dodecil maltósido no se distinguen supercomplejos. Los carriles centrales se tiñeron con azul de Coomassie y los de los extremos por actividad de ATPasa. Las bandas que hidrolizan ATP se tiñen por precipitación de fosfato de plomo. (B) y (C) Son muestras equivalentes a las de (A), pero separadas por electroforesis de dos dimensiones (nativa/desnaturizante). (B) corresponde a dodecil-maltósido y (C) a digitonina. En la parte superior de cada gel se indica el nivel de migración nativo de los complejos de la fosforilación oxidativa (números romanos). El complejo V (F_1F_0) se indica con cabezas de flecha, tanto en forma monomérica, como en la dimérica (V_2) y otras formas oligomérica. En el análisis de las mutantes NARP/MILS, tanto el dímero como los oligómeros mayores de F_1F_0 se cuantificaron juntos (ver adelante) y se

designan como V_n . Justo debajo de las cabezas de flecha se aprecian las subunidades α , β de F_1F_0 , el resto de subunidades de ésta enzima resueltas en (B-C) son en orden descendente γ , b, OSCP/d, y *sub 6* (marcada con asterisco). En el extremo derecho se incluye un carril con marcador de masa molecular (indicada en kDa). Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie. Las masas aparentes de migración nativa de los complejos son: oligómeros mayores de F_1F_0 >1500 kDa, I+III₂ 1500 kDa, dímero de F_1F_0 1200 kDa, complejo I 980 kDa, monómero de F_1F_0 (complejo V) 600 kDa, complejo III₂ 500 kDa, complejo IV 280 kDa.

Mediante cuantificación densitométrica en BN-PAGE encontramos que con dodecil-maltósido se extrae una cantidad equivalente de F_1F_0 nativa monomérica (complejo V) en mitocondrias mutantes y silvestres, tanto en fibroblastos (Fig 8A) como en cíbridos (Fig 8B). En este análisis incluimos a los fibroblastos mutantes L156P, cuya F_1F_0 no había sido cuantificada antes. También recurrimos a la inmunodetección de la subunidad α de F_1 por inmunorréplica de extractos nativos separados por electroforesis de dos dimensiones (nativa/desnaturalizante) (Fig 8C-F). Además de la gran señal correspondiente a F_1F_0 , en algunas muestras detectamos mínima señal de α ubicada al nivel de migración de F_1 , presente en la misma proporción en mutantes (Fig 8C) y controles (Fig 8D). Concluimos que esta técnica tiene suficiente sensibilidad para detectar subcomplejos de F_1F_0 , es decir enzimas parcialmente ensambladas o incompletas; mas no encontramos evidencia de que las mutaciones homoplásmicas L156R o P disminuyan la cantidad de enzima ensamblada en estado estacionario, a pesar de expresar sólo copias mutadas de la *sub6*. Junto con los resultados de la inmunoprecipitación, esto corrobora que las mutaciones NARP/MILS L156R y L156P, permiten el ensamblaje de F_1F_0 .

Figura 8. Electroforesis Azul Nativa y de doble dimensión de mitocondrias humanas NARP/MILS



(A-B) BN-PAGE de mitocondrias humanas solubilizadas con dodecil-maltósido (3 g/g de proteína), provenientes de (A) fibroblastos y (B) cíbridos. En los carriles (1) se incluyeron 40 μ g de solubilizado de mitocondrias de corazón de res, como estándar. Los carriles (2) corresponden a mitocondrias humanas silvestres, (3) son mitocondrias mutantes L156R y (4), L156P. De las muestras humanas se incluyeron 100 μ g de solubilizado por carril. Los geles

nativos fueron teñidos con azul de Coomassie. Los complejos de la fosforilación oxidativa se indican con números romanos. La proporción de la densidad entre el complejo V y el complejo III se indica en la parte inferior de cada carril. (C-F) Inmunorréplicas anti- α de 50 μ g de solubilizados separados por electroforesis de dos dimensiones (nativa/desnaturalizante). (C) y (D) son mitocondrias de osteosarcoma silvestre y cíbridos L156R, respectivamente; mientras que (E) y (F) son mitocondrias silvestres y L156R de fibroblastos humanos. La migración de los complejos en BN-PAGE se indica en la parte superior, en números romanos.

III. Oligomerización de la F_1F_0 ATP sintasa humana mutante NARP/MILS L156R y L156P.

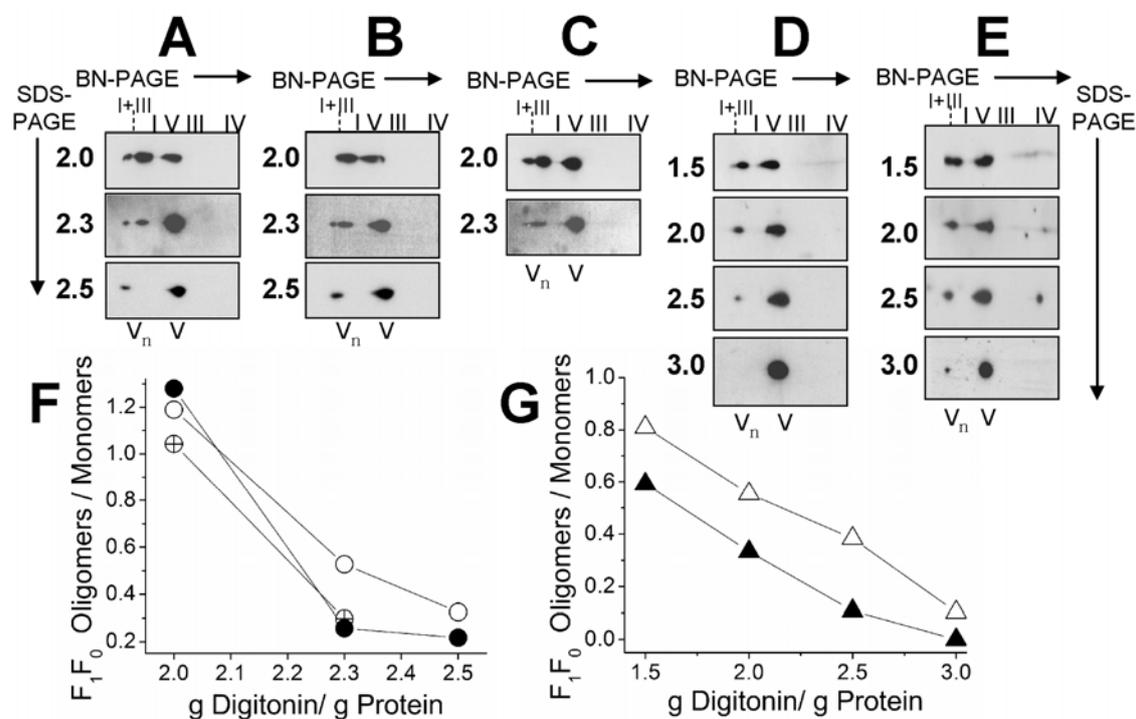
En este trabajo estudiamos por primera vez la oligomerización de la ATP sintasa humana, que involucra a las subunidades supernumerarias de F_0 [42] que no pudieron resolverse en los experimentos de inmunoprecipitación. Además, la oligomerización contribuye a la morfología de las crestas mitocondriales [76], que está alterada en las mutantes L156R [151].

Por BN-PAGE de mitocondrias solubilizadas con digitonina, se distinguen oligómeros de complejos respiratorios (supercomplejos), algunos de los cuales corresponden a homodímeros y otros homo-oligómeros de F_1F_0 con actividad de ATPasa (Fig 7) [64]. Tanto en muestras humanas (Fig 9) como de corazón de res (Fig 7), los dímeros de F_1F_0 migran en BN-PAGE con una masa aparente de 1200 kDa, entre el complejo I (980 kDa) y el supercomplejo formado por I+III₂ (1500 kDa). Otros oligómeros de F_1F_0 con una masa aparente >1500 kDa migran menos que el supercomplejo I+III₂, y corresponden a trímeros, tetrámeros, y otros oligómeros de F_1F_0 [65]. Los oligómeros y el monómero de F_1F_0 muestran un patrón similar de subunidades en las segundas dimensiones desnaturalizantes (Fig 7), aunque no se descarta que algunos de los oligómeros tengan asociadas a otras proteínas mitocondriales.

Para identificar con alta sensibilidad los oligómeros de ATP sintasa humana, recurrimos a la inmunorréplica con anticuerpos anti- α en extractos mitocondriales nativos, preparados con digitonina y separados en electroforesis de dos dimensiones (nativa/desnaturalizante). Encontramos oligómeros de F_1F_0 tanto en las muestras silvestres como en las mutantes NARP/MILS, provenientes de fibroblastos (Fig 9A-C) y cíbridos (Fig 9D-E) humanos. A fin de comparar la cantidad de oligómeros en mutantes y silvestres, titulamos el detergente en un intervalo estrecho (1.5 a 3 g digitonina / g proteína) (Fig 9). Tanto en mutantes como en controles, la cantidad de oligómeros de F_1F_0 en los extractos nativos disminuyó al agregar más detergente. Aparentemente, los oligómeros más pesados de F_1F_0 resisten mayores cantidades de detergente; pero, para evitar errores derivados de la resolución electroforética de estos

complejos con masas muy grandes, la densidad de todos los oligómeros se cuantificó en conjunto (V_n) y se normalizó respecto a la cantidad de monómero (V), en cada muestra (Fig 9). Concluimos que las mutaciones L156R o P de la *sub6* no evitan la oligomerización de la ATP sintasa humana. Por el contrario, la proporción oligómero/monómero tiende a ser mayor en las mutantes L156R, y esto es más notorio en híbridos al compararlos contra células silvestres con el mismo transgenio nuclear (Fig 9G). La proporción oligómero/monómero en mitocondrias solubilizadas a 1.5 g de digitonina/ g de proteína fue de 0.62 ± 0.11 para silvestres y 1.47 ± 0.43 para híbridos L156R (promedios de 5 experimentos con distintas preparaciones de mitocondrias. Las figuras 9D-E y 16A-B, muestran experimentos representativos). Cabe señalar que la proporción oligómero/monómero identificada en estos experimentos no es la presente *in vivo* ya que, como demostramos, depende inversamente de la cantidad de detergente en la muestra. Sin embargo, dado que el protocolo experimental favorece la monomerización y no la oligomerización de F_1F_0 , consideramos que los oligómeros identificados en nuestros experimentos se formaron en el organelo.

Figura 9. Inmunodetección de oligómeros de F_1F_0 humana.



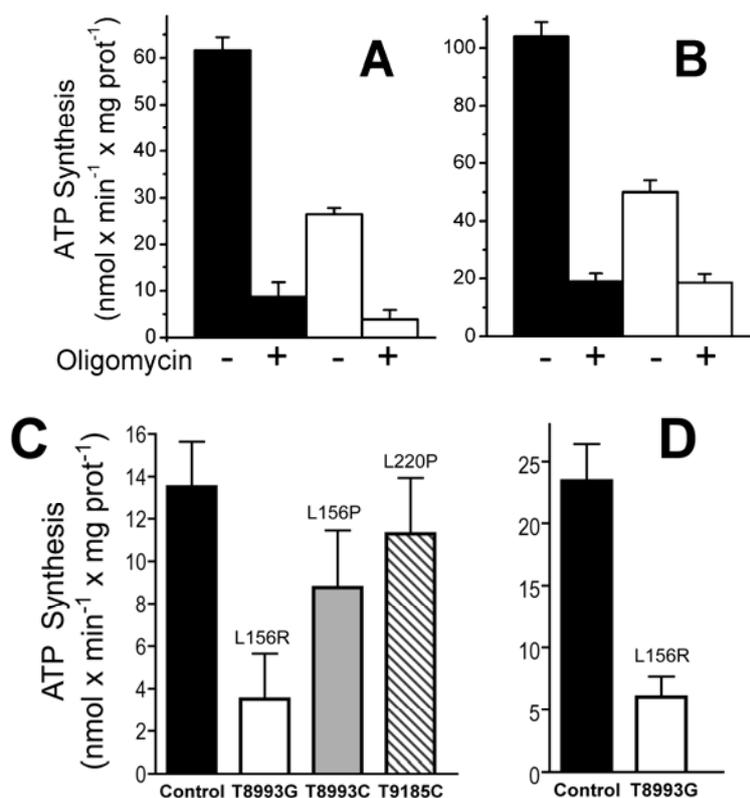
(A-E) 100 μ g de proteínas mitocondriales humanas extraídas con digitonina en condiciones nativas fueron separadas mediante electroforesis de dos dimensiones (nativa/desnaturalizante) y analizadas por inmunorréplica anti subunidad α . (A-C) corresponden respectivamente a mitocondrias silvestres y mutantes L156R y L156P, de fibroblastos humanos; mientras que (D) y (E) son mitocondrias de osteosarcoma silvestre y híbridos L156R. Los números romanos en la parte superior marcan la migración nativa de los complejos respiratorios y del supercomplejo I+III₂. Los números arábigos a la izquierda indican la proporción

digitonina/proteína en cada muestra. La proporción de enzima oligomérica (V_n)/ monomérica (V) se obtuvo por densitometría y se graficó contra la cantidad de detergente por proteína, para (F) fibroblastos y (G) cíbridos. Los símbolos negros son mitocondrias silvestres, los blancos son mutantes L156R y los tachados, mutantes L156P.

IV. Caracterización funcional de las mutantes homoplásmicas L156R y L156P.

Evaluamos la síntesis de ATP en las mutantes homoplásmicas NARP/MILS en mitocondrias aisladas (Fig 10 A-B) y en células permeabilizadas (Fig 10 C-D), con un ensayo que acopla la producción de ATP a la reducción de NADP^+ . Congruente con lo reportado antes, encontramos que las mutaciones NARP/MILS inhiben la síntesis de ATP y que la mutación L156R inhibe más que la L156P (74 vs 30 % de inhibición en células permeabilizadas) (Fig 10C). La mutante NARP/MILS L220P que introduce una prolina al final de la quinta hélice transmembranal de *sub6*, más lejos de la arginina esencial (R159), inhibe la síntesis de ATP sólo 16 % (Fig 10C).

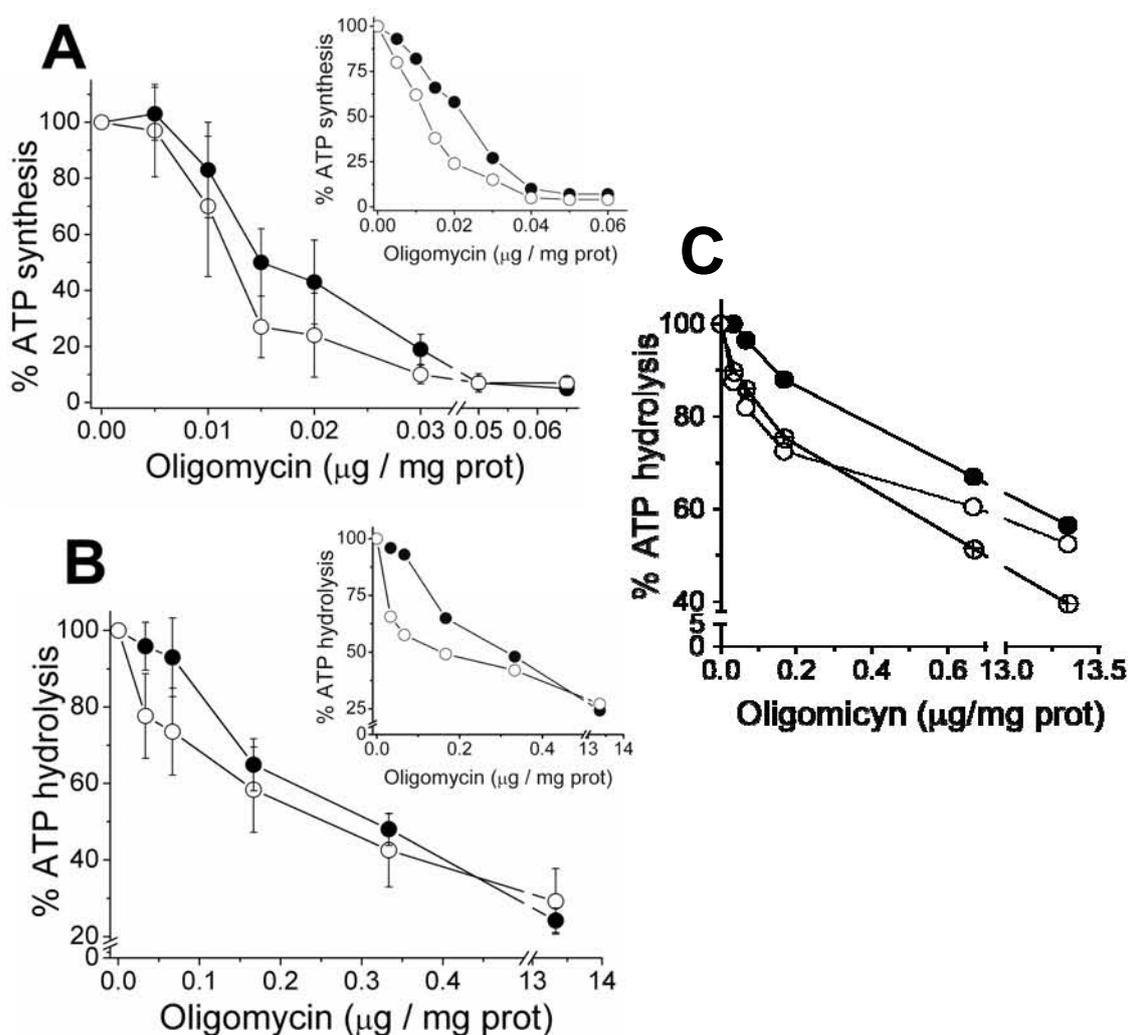
Figura 10. Síntesis de ATP en las mutantes humanas NARP/MILS.



Actividad de síntesis de ATP medida en (A-B) mitocondrias aisladas, y (C- D) células permeabilizadas, de (A y C) fibroblastos y (B y D) cíbridos. En mitocondrias aisladas se muestran los valores con y sin oligomicina (10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ prot). En células permeabilizadas se muestra únicamente la producción de ATP sensible a oligomicina (10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ prot). Las barras negras corresponden a controles, las blancas a mutantes L156R, la gris a la mutante L156P y la de líneas diagonales a la mutante L220P.

La inhibición provocada por la mutación L156R fue un poco mayor en células permeabilizadas que en mitocondrias aisladas (74 vs 60 %) (Fig 10), probablemente debido a que la medición en células evalúa todas las mitocondrias del cultivo, mientras que el protocolo de fraccionamiento y sedimentación para aislar mitocondrias inevitablemente selecciona algunas, frecuentemente las más íntegras. Encontramos inhibiciones similares de la síntesis de ATP por la mutación L156R en fibroblastos y en cíbridos (Fig 10), aunque la actividad de síntesis del modelo neoplásico fue mayor, lo que quizás esté relacionado con un mayor enriquecimiento de ATP sintasa en el osteosarcoma. La gran inhibición en la síntesis de ATP es semejante a la descrita en otras preparaciones homoplásmicas L156R humanas [28, 165-167].

Figura 11. Sensibilidad a oligomicina de la F₁F₀ humana NARP/MILS.



Porcentaje de inhibición por oligomicina de la actividad de (A) síntesis e (B-C) hidrólisis de ATP en (A-B) cíbridos y (C) fibroblastos humanos. Los círculos negros corresponden a controles, los blancos a mutantes L156R y los tachados a mutantes L156P. Las cantidades de oligomicina que se indican se adicionaron a (A) mitocondrias, o (B-C) membranas mitocondriales obtenidas tras choque osmótico, y se incubaron a 37 °C, 5 minutos antes de las mediciones. La síntesis de ATP se determinó por incorporación de ³²Pi, y la hidrólisis en un

ensayo acoplado a la oxidación de NADH. Los valores correspondientes al 100 % de actividad ($\text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg prot}^{-1}$) fueron: 103 ± 35 y 24 ± 17 en la síntesis de ATP; y 412 ± 37 y 326 ± 42 en la hidrólisis, para osteosarcoma silvestre y híbridos L156R, respectivamente. En fibroblastos los valores del 100 % de hidrólisis de ATP ($\text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg prot}^{-1}$) fueron 358, 369 y 347, respectivamente para controles, y mutantes L156R y L156P. En (A y B) se muestran los promedios y desviaciones estándar de 3 experimentos. En los insertos de (A y B), así como en (C), se incluyen los valores de un experimento representativo.

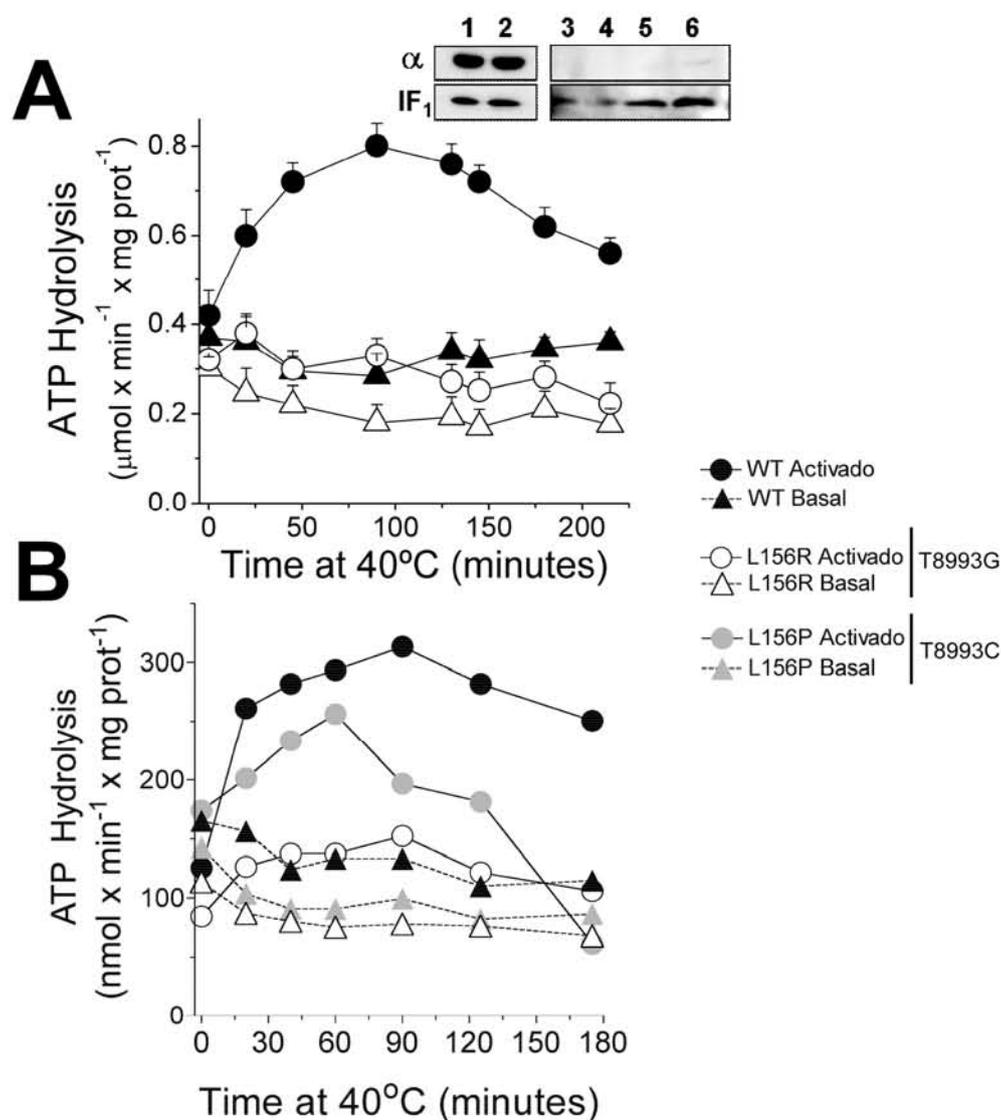
A continuación verificamos la sensibilidad a oligomicina de la síntesis (Fig 11A) y la hidrólisis (Fig 11B y C) de ATP en mitocondrias aisladas de las mutante L156R/P. La oligomicina permite evaluar el acoplamiento entre los sectores F_1 y F_0 , ya que se une a F_0 bloqueando el canal de protones y limita la catálisis en F_1 sólo si ambos sectores están funcional y estructuralmente ligados. Encontramos a las mutates ligeramente más sensibles a oligomicina que la enzima silvestre (Fig 11). Esto es una prueba más de que la enzima mutante L156R o P se encuentra ensamblada y de que sus segmentos F_1 y F_0 están fuertemente acoplados. Esta mayor sensibilidad a oligomicina se ha descrito antes para la síntesis de ATP en mitocondrias de fibroblastos mutantes L156R/P [140] y se ha usado para modificar la proporción de ADNmt mutante en cultivos [141].

En mitocondrias, la hidrólisis de ATP se evita por la proteína inhibidora de F_1 (IF_1), que bloquea la catálisis a pHs ácidos, y puede ser removida experimentalmente con temperatura, pH alcalino y fuerza iónica. En estas condiciones, llamadas “de activación”, la subunidad inhibitoria se disocia de la enzima hacia el sobrenadante lo que permite observar la máxima velocidad de hidrólisis de ATP, que suele ser varias veces mayor que en la enzima no activada. Medimos la hidrólisis de ATP en membranas mitocondriales humanas incubadas con o sin condiciones de activación (Fig 12). En condiciones basales (0.25 M sacarosa, 2 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, inhibidores de proteasas) la hidrólisis de ATP en enzimas mutantes y silvestres resultó similar, o ligeramente menor en las mutantes (inhibición ≤ 30 % en L156R y ≤ 15 % en L156P) (Fig 12, triángulos). En condiciones de activación (125 mM KCl, 2 mM EDTA, 30 mM Tris-SO₄, pH 8.0, inhibidores de proteasas) la enzima silvestre (círculos negros) aumentó su hidrólisis alrededor de 2.5 veces tras 90 minutos, mientras que la mutante L156R (círculos blancos) no aumentó su actividad sensible a oligomicina. La mutante L156P (círculos grises) se activó casi tanto como la silvestre en la primera hora y después se inactivó rápidamente (Fig 12B).

Nos preguntamos si la falta de activación podría deberse a que la enzima mutante L156R retuviera proteína inhibidora a pesar de las condiciones de activación. Para determinarlo, analizamos por inmunorréplica el contenido de IF_1 respecto a α , en

mitocondrias y en los sobrenadantes de membranas incubadas en condiciones de activación (Fig 12A, inserto). Encontramos que las mitocondrias mutantes y silvestres enteras, no activadas, tienen una cantidad similar de proteína inhibidora respecto a α (carril 2 vs 1 en el inserto de la Fig 12A) y que las membranas mitocondriales mutantes L156R liberan al sobrenadante incluso más IF_1 que las silvestres tras 90 minutos de incubación en condiciones de activación (carril 5 vs 6). Por lo tanto, a pesar de perder a su proteína inhibidora, la F_1F_0 mutante L156R no incrementa la hidrólisis de ATP.

Figura 12. Hidrólisis de ATP por la F_1F_0 humana en condiciones de activación



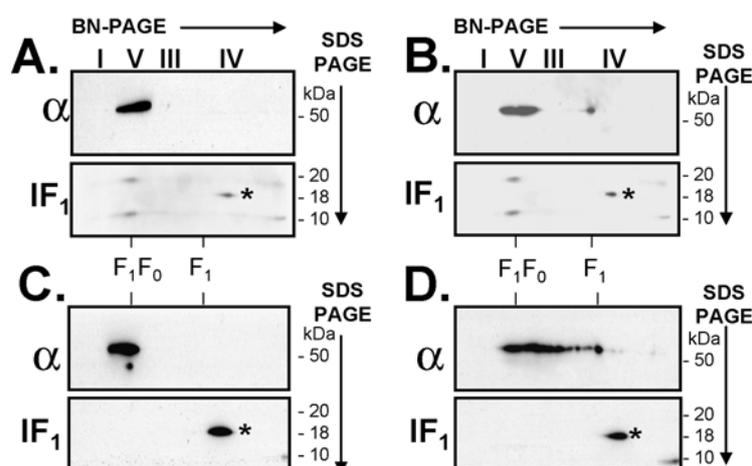
Curso temporal de la activación de hidrólisis de ATP sensible a oligomicina, en membranas mitocondriales silvestres (símbolos negros), mutantes L156R (símbolos blancos) o L156P (símbolos grises), de (A) cíbridos y (B) fibroblastos. Las membranas se incubaron a 40 °C, en condiciones de activación (círculos) o en condiciones basales (triángulos) que se describen en el texto, y en cada tiempo una alícuota se utilizó para medir hidrólisis de ATP acoplada a la oxidación de NADH. (A) muestra el promedio y la desviación estándar de tres experimentos, (B) muestra un experimento representativo.

Inserto de (A): Las subunidades α e IF_1 se detectaron por inmunorréplica en 10 μ g de lisados de mitocondrias (carriles 1 y 2), o en 40 μ g de los sobrenadantes de membranas mitocondriales sometidas por 90 minutos a condiciones basales (carriles 3 y 4), o a condiciones de activación (carriles 5 y 6). Los carriles nones son silvestres y los pares mutantes L156R. La proporción densitométrica IF_1/α para los dos primeros carriles fue de 0.47 y 0.57. Las subunidades α resultaron prácticamente indetectables en el resto de los carriles.

V. Estabilidad de la ATP sintasa mutante NARP/MILS L156R y L156P.

Nos interesó determinar si la estructura nativa de F_1F_0 se mantiene en mutantes y controles tras la activación por sal, calor y pH alcalino. Para ello, incubamos membranas mitocondriales 90 minutos a 40 °C en condiciones de activación (descritas para la Fig 12), las solubilizamos con dodecil-maltósido y las separamos por electroforesis de dos dimensiones (nativa/desnaturalizante) antes de inmunodetectar a las subunidades α e IF_1 (Fig 13). Sólo en las muestras no activadas, la IF_1 se detectó alineada con las subunidades α en las electroforesis desnaturalizantes (Fig 13A-B). En las muestras no activadas, ambas subunidades se encontraron al nivel de la migración nativa del complejo V monomérico. Esto nos permitió concluir que la proteína inhibidora está asociada a la F_1F_0 no activada, tanto silvestre como mutante L156R, y que la activación libera a la IF_1 tanto de mutantes como de controles.

Figura 13. Evaluación de la estructura nativa de F_1F_0 humana en condiciones que liberan a la IF_1



Obtuvimos membranas mitocondriales de osteosarcoma silvestre (A y C), o de cíbridos mutantes L156R (B y D). Una alícuota de las membranas se incubó durante 90 minutos en condiciones que liberan a la proteína inhibidora (descritas en el texto). Estas membranas activadas (C-D), y sus contrapartes no activadas (A-B), fueron solubilizadas con dodecil maltósido. 80 μ g de los extractos protéicos obtenidos se separaron por electroforesis de dos dimensiones (nativa/desnaturalizante). Las subunidades α e IF_1 se detectaron por inmunorréplica de estas electroforesis y se muestran en la figura. Los números romanos en la parte superior de las inmunorréplicas señalan el nivel de migración esperado para los complejos de la fosforilación oxidativa en la electroforesis nativa. En (A, B y C) las subunidades α se

detectaron sólo al nivel de migración nativo del complejo V. **IF₁** forma homodímeros resistentes a SDS y por lo tanto se detectan dos bandas de 10 y 20 kDa, alineadas con las subunidades α , en los paneles inferiores de las muestras no activadas (**A** y **B**). Adicionalmente, el anticuerpo anti-**IF₁** detecta a la subunidad de 18 kDa de la citocromo oxidasa (marcada con asterisco), que en este experimento puede ser usada como referencia de la migración nativa del complejo IV. En las muestras activadas (**C** y **D**) no se detectó **IF₁** y en el panel inferior sólo se ve la mancha sobreexpuesta de la subunidad del complejo IV.

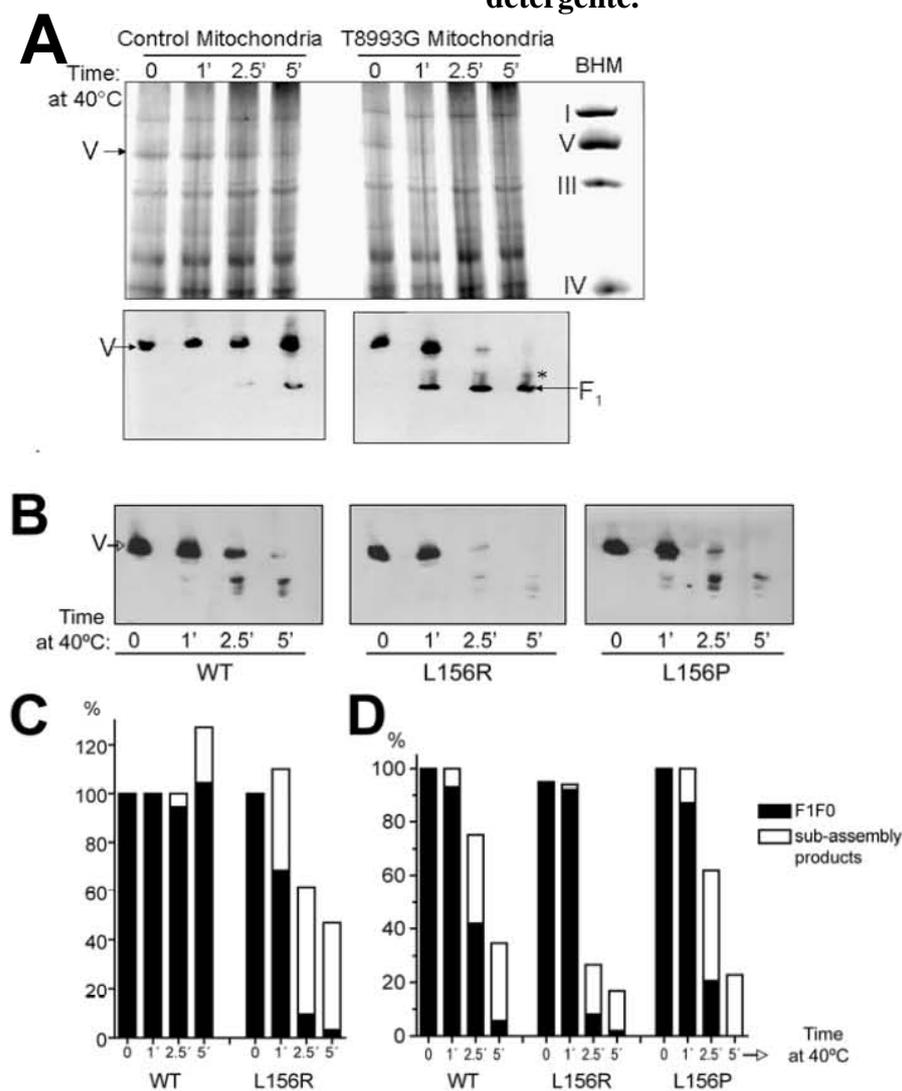
En las muestras silvestres -activadas y no activadas- la señal de α se encontró únicamente al nivel de migración del complejo V nativo (Fig 13A y C), lo que indica que la enzima silvestre mantuvo su estructura nativa ensamblada tras 90 minutos de activación. Sin embargo, las subunidades α de la mutante L156R incubada en condiciones de activación se detectaron al nivel de F_1F_0 y en una sucesión de puntos que contienen F_1 y migran en la electroforesis nativa con pesos aparentes menores al complejo V completo, por lo que corresponden a sub-complejos del desensamblaje de F_1F_0 (Fig 13D). Con este resultado concluimos que en condiciones de activación, además de liberar **IF₁**, una fracción de la enzima mutante L156R se desensambla, lo que explica en parte la falta de activación en la hidrólisis de ATP de esta mutante (Fig 12). Además sugiere que la enzima mutante es menos estable que la silvestre.

A la luz de estos experimentos, decidimos estudiar la estabilidad de la ATP sintasa con las mutaciones NARP/MILS en otras condiciones desnaturizantes. Preparamos extractos nativos de mitocondrias con dodecil-maltósido e incubamos alícuotas de ellos a 40 °C, directamente en la mezcla de solubilización y en presencia de detergente. Inmediatamente después, separamos los extractos por BN-PAGE para observar a la ATP sintasa monomérica, nativa y desensamblada (Figs 14 y 15). Determinamos que bastan pocos minutos de incubación a 40 °C para producir el desensamblaje parcial de la enzima extraída con detergente, tanto silvestre como mutante. Además, el desensamblaje es proporcional a la cantidad de detergente presente en la muestra: ocurre más rápido con 3 g detergente/g proteína (Fig 14) que con 2 g/g (Fig 15). Además encontramos que las enzimas mutantes L156R o L156P se desensamblan a tiempos ligeramente menores que la silvestre, y que la mutación L156R resulta más desestabilizante que la L156P (Fig 14).

Mediante inmunorréplica de los solubilizados desestabilizados por calor y separados por BN-PAGE, observamos la cinética de pérdida de las subunidades α , **OSCP** e **IF₁**

durante el desensamblaje de la ATP sintasa monomérica (Fig 15). Encontramos que la proteína inhibidora se desprende de la enzima antes que α u OSCP, lo que resulta mucho más notorio en los solubilizados de mitocondrias silvestres que se desensamblan más lentamente (Fig 15).

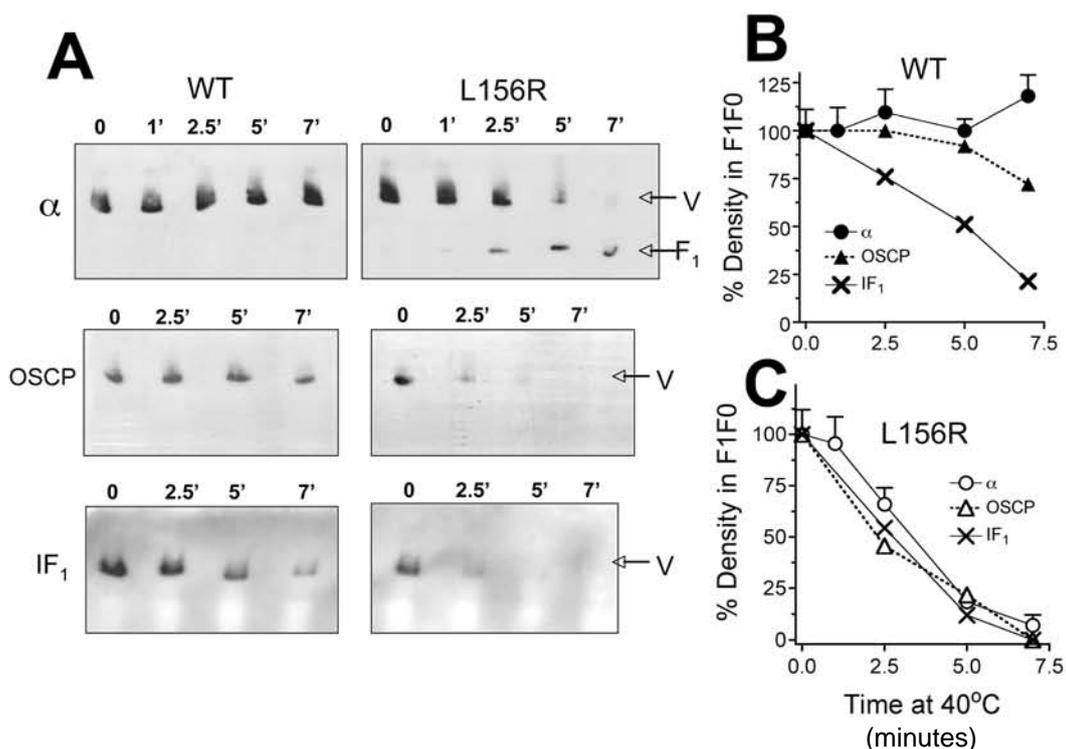
Figura 14. Desestabilización por calor de la F_1F_0 monomérica en presencia de detergente.



Las proteínas de mitocondrias humanas de (A) cíbridos o (B) fibroblastos, fueron extraídas en condiciones nativas con dodecil-maltósido (3 g/g de proteína), incubadas los minutos que se indican a 40 °C y sometidas a BN-PAGE. (A) **Panel superior:** Muestra un gel nativo representativo teñido con azul de Coomassie, de solubilizados de mitocondrias silvestres o de cíbridos L156R (marcados como T8993G) (80 µg de solubilizado/carril). En el carril de la extrema derecha se incluyó un estándar de mitocondrias de corazón de res (señalado como BHM). Los complejos de la fosforilación oxidativa se indican con números romanos. En el **panel inferior** de (A) se muestran geles nativos equivalentes a los del panel superior pero transferidos y revelados con anticuerpos anti- α (50 µg de solubilizado/carril). Similares inmunorréplicas anti- α se muestran en (B), pero para fibroblastos silvestres, y mutantes L156R y L156P. En las inmunorréplicas se indica la banda correspondiente al complejo V monomérico y a F₁. Con un asterisco en cíbridos L156R (A) se indica una banda compatible con un subcomplejo compuesto por F₁ y subunidades c, que ha sido reportado antes en

muestras NARP/MILS [158, 160]. En fibroblastos (B) también se observan subcomplejos del desensamblaje de F_1F_0 . El calor provocó la pérdida de la banda del complejo V (F_1F_0), más rápidamente en las mutantes NARP/MILS que en silvestres; sin afectar las bandas del complejo I y III (ver gel teñido con Coomassie en A). En (C-D) se grafica el porcentaje de F_1F_0 completo (negro) y los productos de desensamblaje (blanco), detectables a los diferentes tiempos de incubación, por densitometría de las inmunorrélicas para (C) cíbridos y (D) fibroblastos. El 100% corresponde a la densidad de la muestra silvestre no calentada (WT al tiempo cero).

Figura 15. Detección de las subunidades α , OSCP e IF_1 durante el desensamblaje de la ATP sintasa desestabilizada por calor, en presencia de detergente.

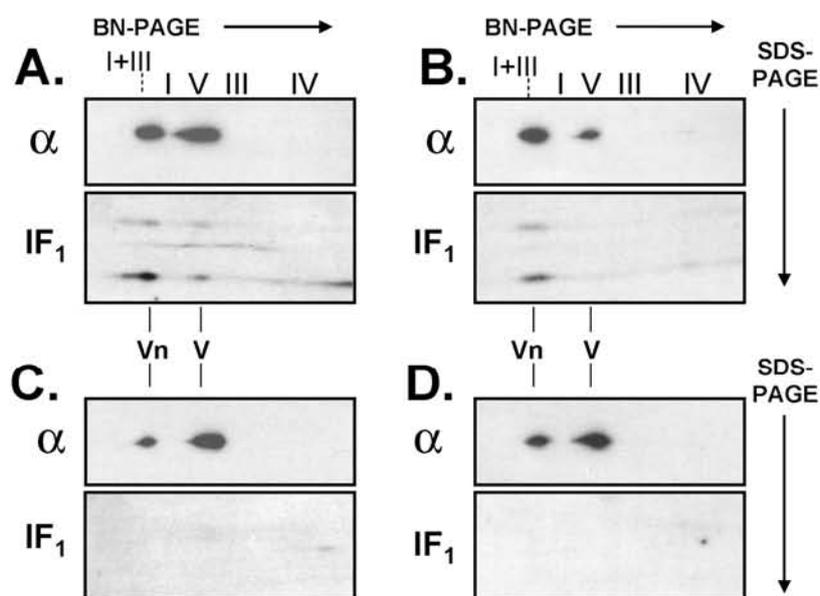


(A) Las subunidades α , OSCP e IF_1 se detectaron mediante inmunorréplica de extractos mitocondriales nativos obtenidos con dodecil-maltósido (2 g/g proteína), incubados los minutos que se indican a 40 °C y separados por BN-PAGE. Se muestran experimentos representativos con mitocondrias humanas de osteosarcoma control (WT) y cíbridos mutantes L156R, con 50 μ g de solubilizado por carril. La subunidad detectada se indica a la izquierda. Se marca la banda correspondiente al complejo V monomérico. En el panel revelado con anticuerpos anti- α , se detectó además una banda compatible con la migración de F_1 . Se determinó la densidad de las bandas en las inmunorrélicas y en (B-C) se graficó el porcentaje de cada subunidad encontrado en complejo V completo, a lo largo del tiempo, para silvestres y mutantes L156R. Los círculos corresponden a α , los triángulos a OSCP y los taches a IF_1 . Los símbolos negros representan a la enzima silvestre y los blancos a la mutante. Para la subunidad α se muestra el promedio y la desviación estándar de tres experimentos distintos. El 100 % fue la densidad de la muestra no calentada de cada inmunorréplica (tiempo cero).

Además, incubamos a 40 °C extractos mitocondriales nativos obtenidos con digitonina para observar, mediante electroforesis bidimensional seguida de inmunorréplica, la desestabilización por temperatura de la ATP sintasa oligomérica presente en la muestra (Fig 16). Nuevamente, la proteína inhibidora se encontró asociada únicamente a la F_1F_0 no calentada, tanto silvestre como mutante (Fig 16 A-B

vs C-D). Llama la atención que más proteína inhibidora se encontró asociada con los oligómeros de F_1F_0 que con los monómeros, tanto en controles como en mutantes (Fig 16 A-B). Además, como en los experimentos mostrados antes (Fig 9), encontramos una mayor proporción oligómero/monómero de ATP sintasa en la mutante L156R respecto a la enzima silvestre, en las muestras no calentadas (Fig 16). En las muestras desestabilizadas por calor, además de la pérdida de IF_1 , observamos disminución de la proporción oligómero/monómero, tanto en mutantes como en controles. Tras la incubación a 40 °C mutantes y controles mostraron una proporción similar de oligómeros (Fig 16). En el tiempo evaluado no detectamos desensamblaje de la ATP sintasa monomérica, probablemente debido a que el monómero de F_1F_0 es más estable en digitonina (1.5 g/g proteína) que en dodecil-maltósido (≥ 2 g/g, Fig 14 y 15).

Figura 16. Desestabilización por calor de la F_1F_0 oligomérica en presencia de detergente.



Extractos nativos de mitocondrias control (A y C) o híbridos L156R (B y D), se obtuvieron con digitonina (1.5 g/g proteína). Una alícuota de los extractos se calentó a 40 °C durante 90 minutos, directamente en la mezcla de solubilización y en presencia del detergente. Posteriormente, 100 μ g de las muestras no calentadas (A-B) y las calentadas (C-D) se sometieron a electroforesis bidimensional (nativa/ desnaturalizante), y las subunidades α e IF_1 se detectaron por inmunorréplica. Se muestra un experimento representativo. En la parte superior de la figura se indica en números romanos el nivel de migración de los complejos de la fosforilación oxidativa en el gel nativo (BN-PAGE). En todas las muestras se encontraron oligómeros (Vn) y monómeros (V) de ATP sintasa. La proporción densitométrica dímero/monómero (Vn /V) fue de 0.64 y 0.31 en controles y 1.89 y 0.34 en mutantes, en las muestras no calentadas y calentadas, respectivamente.

De estos experimentos concluimos que las mutaciones NARP/MILS L156R y L156P disminuyen la estabilidad de la ATP sintasa monomérica y dimérica. Por otro lado, la

proteína inhibidora (**IF₁**) se encuentra preferentemente asociada con la ATP sintasa oligomérica y su desprendimiento de la F₁F₀ es uno de los pasos iniciales en el desensamblaje de este complejo enzimático.

DISCUSIÓN

Para conocer el mecanismo molecular de las enfermedades NARP y MILS, analizamos el ensamblaje, la oligomerización, la función, el acoplamiento y la estabilidad de la F₁F₀ ATP sintasa humana, a partir de células cultivadas con las mutaciones homoplásmicas T8993G y T8993C del ADNmt, que cambian el residuo L156 en la *sub6* de F₀ por arginina o prolina, respectivamente. La homoplasmía de los cultivos humanos nos permitió estudiar una población de enzimas donde todas contienen a la *sub6* mutada y no existe complementación por parte de la subunidad silvestre. Verificamos nuestros resultados en dos tipos celulares humanos: fibroblastos de piel de pacientes con MILS, y cíbridos, que son células inmortales de osteosarcoma humano cuyas mitocondrias provienen de pacientes con MILS. La comparación entre ambos cultivos permite distinguir los efectos que dependen del transgenoma nuclear, de aquellos dominados por el ADNmt. Todos nuestros resultados fueron reproducibles en ambos tipos celulares, aunque en cíbridos resultó más notorio el aumento en la oligomerización de la F₁F₀ mutante.

Mediante inmunoprecipitación (Fig 6), electroforesis azul nativa (Fig 8) y bidimensional (nativa/desnaturante) (Figs 8-9), demostramos que la *sub6* con las mutaciones L156R o L156P se incorpora en la ATP sintasa humana y que la enzima mutante se ensambla completamente en ambos tipos celulares, incluso hasta su forma oligomérica. Esto indica que en presencia de las mutaciones NARP/MILS la estructura general de F₀ está conservada, incluso lo suficiente para que las superficies de oligomerización interactúen. Estas interacciones incluyen a las subunidades pequeñas de F₀ que no se resolvieron por electroforesis. En las mutantes L156R detectamos una mayor proporción de oligómeros de ATP sintasa, que resultó más notoria en los cíbridos (Fig 9 y 16, y promedios en el texto), lo cual abre la interesante posibilidad de que la oligomerización de F₁F₀ sea una respuesta compensatoria ante la mutación, activa en algunos tipos celulares.

A pesar de encontrarse ensambladas y capaces de oligomerizar, las enzimas con mutación en el residuo 156 de la *sub6*, sintetizan ATP a menor velocidad que las silvestres (Fig 10). Entonces, la causa *primaria* de la enfermedad de NARP/MILS es la inhibición en la síntesis de ATP, y no la falta de ensamblaje de la enzima como se había propuesto [158-160]. En los cultivos homoplásmicos evaluados en un estado estacionario de producción y degradación de proteínas, existe la misma cantidad de enzima nativa ensamblada en mitocondrias mutantes y silvestres (Figs 6, 8 y 9), por lo que la baja síntesis de ATP observada en las mitocondrias mutantes proviene del 100 % de las enzimas ensambladas trabajando a menos de la mitad de la capacidad silvestre en el caso de la mutante L156R, y al 70 % de la capacidad silvestre en el caso de L156P. Esto contrasta con lo que ocurre en *E. coli*, en donde la mutación equivalente a L156R impide la incorporación de la mayoría de la *sub6* en las membranas y/o su ensamblaje en la enzima [148, 149]. Recientemente, di Rago y cols. modelaron la mutación L156R en *S. cerevisiae*, encontrando resultados similares a los nuestros: la enzima mutante de levadura se ensambla y oligomeriza, pero está inhibida tanto en la síntesis como en la hidrólisis de ATP y en el bombeo de protones [169]. Así, la levadura parece ser un mejor modelo para las mutaciones NARP/MILS, que la bacteria.

La inhibición funcional de la enzima mutante completamente ensamblada es compatible con un bloqueo en el flujo de protones a través de F_0 , como se ha propuesto [28, 113, 170], lo que además concuerda con la hiperpolarización observada en mitocondrias NARP/MILS [28, 151]. Aún quedan por definirse los mecanismos precisos por los que las mutaciones producirían este bloqueo. La carga positiva introducida en F_0 por algunas de las mutaciones NARP/MILS es fundamental en la patogenia ya que las mutantes de arginina muestran mayor inhibición en la síntesis de ATP y enfermedad más grave que la introducción de prolina en el mismo sitio. La arginina introducida por la mutación podría (1) interaccionar con el glutamato esencial (E58) de las subunidades *c*, y/o (2) distorsionar el canal de protones, ya sea desfavoreciendo las interacciones entre los residuos esenciales para la translocación, o perturbando el camino de los protones.

Para explorar estos mecanismos, modelamos *in silico* las mutaciones NARP/MILS. La estructura de *sub a* no está resuelta, por lo que fue necesario generar un modelo para *E. coli* y humano de la subunidad adosada a un anillo de 10 subunidades *c* (*sub*

*a/c*₁₀). Para *E. coli* se ha reportado un modelo con estas características (Fig 4A), que se ha utilizado en dinámicas moleculares de la rotación de F₀ [104], pero sus coordenadas no han sido depositadas.

Nosotros generamos un nuevo modelo para *E. coli*, a partir del modelo previo de *sub a/c*₁₂ [94] (PDB 1C17) ^{Nota 8} y del anillo de 10 subunidades *c*, resuelto en la estructura cristalográfica de F_{1c} de *S. cerevisiae* (PDB 1Q01). Alineamos la estructura de la subunidad *c* protonada de *E. coli*, determinada por RMN a pH 5.0 (PDB 1C0V), sobre 8 de las 10 subunidades *c* resueltas en el cristal, en el programa Pymol [171]. Las dos subunidades *c* restantes que se encuentran en la intercara con *a*, así como la *sub a*, se modelaron a partir de las coordenadas del PDB 1C17 [94]. La integración del modelo se realizó en el programa Swiss PDB viewer (SPDBV) [172], mientras que en Coot (Crystallographic Object Oriented Toolkit) [173] se introdujeron las mutaciones NARP/MILS equivalentes a L156R/P (L207R/P) y se eligieron manualmente los rotámetros con menos choques, a partir de la base de datos de probabilidad de rotámetros reportada en [174]. Tanto el modelo silvestre como los mutantes fueron sometidos a una minimización de energía de 1,000 pasos en el programa UCSF Chimera [175], con el campo de fuerza AMBER ff99, rutinas MMTK, hasta que la energía del sistema no cambió. Los modelos resultantes para *E. coli* se muestran en la Fig 17 y 18.

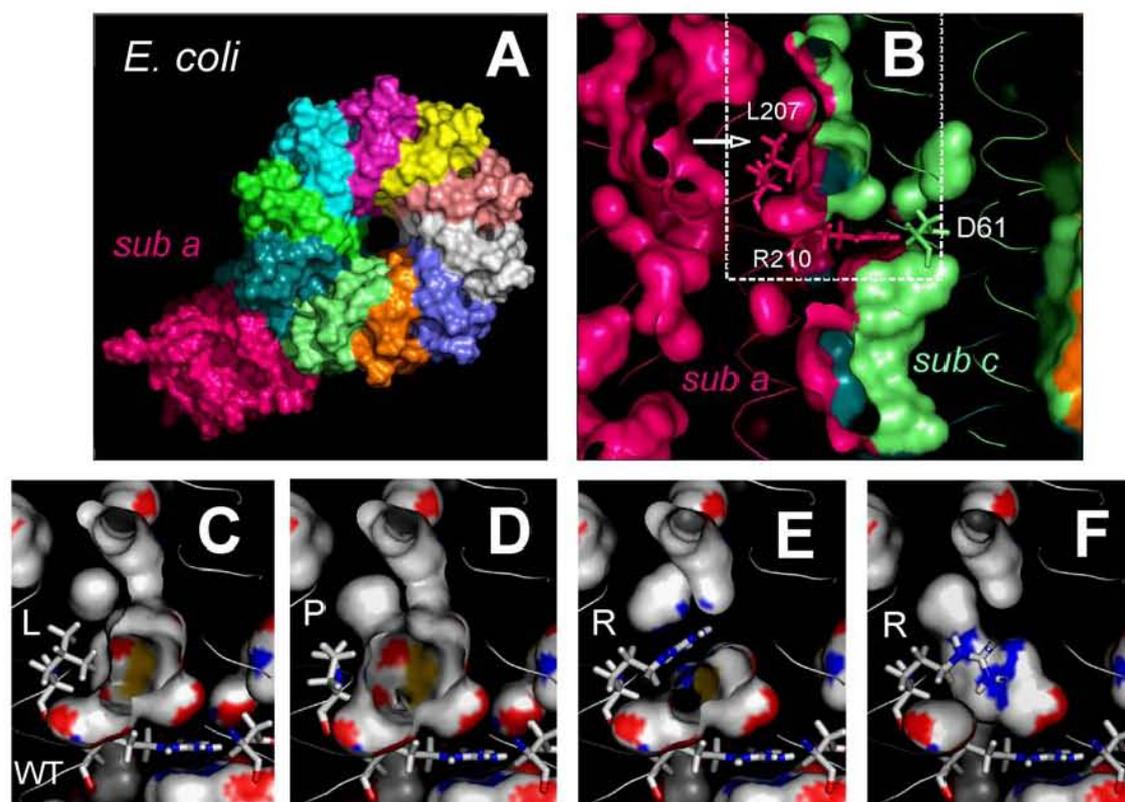
El modelo humano se generó por homología a partir del de *E. coli* silvestre, en el programa Modeller [176], para lo cual se utilizó un alineamiento múltiple con las secuencias de *sub a* de 24 especies, con representación uniforme de bacterias, levaduras, plantas, insectos y vertebrados. Se obtuvo una familia de 100 modelos humanos, y se eligieron los 10 modelos con menor energía. Entre estos, se buscó el que respetara la interacción de los residuos esenciales en la intercara *a/c*. Sobre él se

^{Nota 8} El modelo de *sub a/c*₁₂, publicado por Rastogi *et al* [94] (PDB 1C17), se generó a su vez a partir de las estructuras determinadas por RMN de la subunidad *c* de *E. coli* a pH 5.0 y 8.0. Se incluyeron 11 subunidades *c* protonadas (RMN a pH 5.0) y una desprotonada (RMN a pH 8.0), formando un anillo con distancias y restricciones de acuerdo a los análisis bioquímicos reportados. Las cuatro hélices carboxilo-terminales de *sub a*, se modelaron con métodos de cálculo de estructura para datos generados por RMN, utilizando como única restricción los datos bioquímicos previos. La posición de *sub a* respecto al anillo de *c* se determinó con base en los datos de entrecruzamiento entre éstas. El modelo *sub a/c*₁₂ [94], así como el *sub a/c*₁₀ publicado posteriormente por Fillingame y cols [104], satisfacen los datos bioquímicos, y el de Fillingame ha sido exitoso en la simulación de la rotación, pero al igual que nuestro modelo, contienen la incertidumbre derivada de la falta de una estructura atómica para *sub a*.

generaron las mutaciones L156R/P, se eligieron manualmente los rotámeros y tanto silvestre como mutantes se minimizaron como se describe para *E. coli*. Los modelos humanos se muestran en la Fig 19 y 20.

En los modelos, la introducción de las mutaciones NARP/MILS no produjo una distorsión significativa de la estructura completa, ni de las hélices de *a*, incluso tras la minimización de energía. Al comparar el modelo humano completo silvestre y mutante, encontramos valores de RMSD de 0.002 Å para la mutante de prolina, y de 0.003 y 0.004 Å, para dos rotámeros de la mutante de arginina, que no aumentaron al evaluar sólo las dos hélices carboxilo terminales de *sub 6*. Tampoco cambió significativamente la posición de los residuos esenciales para la translocación de protones (Fig 17-20).

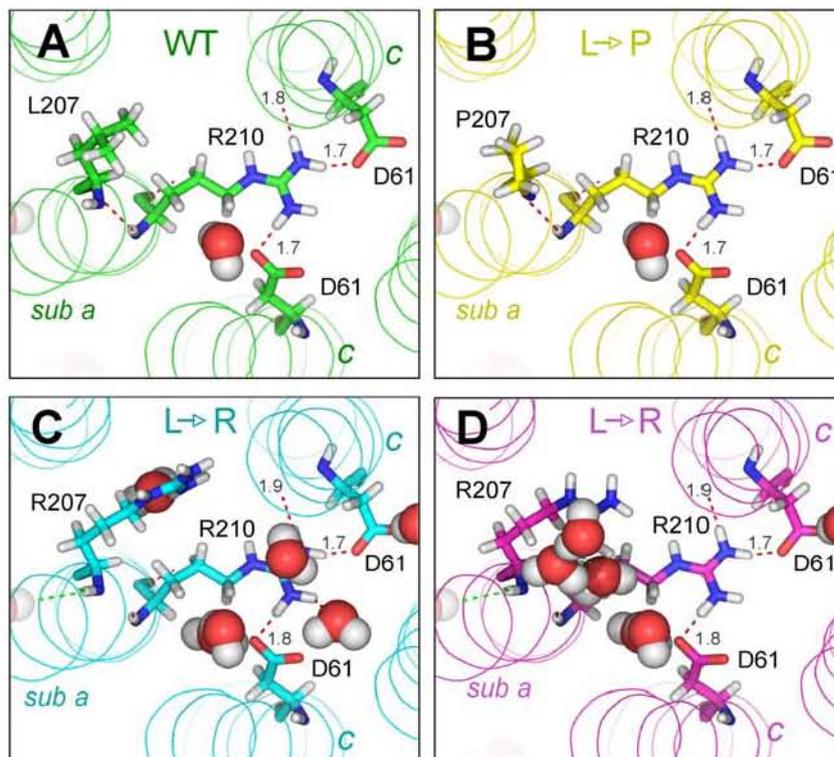
Figura 17. Superficie accesible al solvente en el modelo *a/c*₁₀ de *E. coli*.



(A) El modelo completo visto desde el interior bacteriano. (B) Corte paralelo a los lípidos de la membrana, enfocado en la intercara *sub a/c*. En esta vista, el interior de la célula está hacia arriba. Como en (A), la *sub a* es rosa y las subunidades *c* de la intercara, son verdes. Se muestran las cadenas laterales de los residuos esenciales para la translocación de protones (R210 de *a*, y D61 de *c*), y la leucina 207 (marcada con flecha), que es equivalente a la leucina 156 en humanos, cuya mutación produce NARP/MILS. Se aprecian algunas cavidades, incluyendo una alargada, dentro del rectángulo punteado, cuyas paredes se forman tanto por la superficie de *a* como de las dos subunidades *c*, y cuya base se encuentra muy cerca de los residuos esenciales. Esta cavidad forma un túnel que podría constituir el hemi-canal de protones hacia el interior bacteriano. (C-F) Muestra un acercamiento a la región delimitada en (B) por líneas punteadas, en presencia de la leucina silvestre (C), o de las mutantes

NARP/MILS de prolina (**D**), y dos rotámeros de arginina (**E-F**). Imágenes generadas en Pymol con ayuda del Dr. Lenin Domínguez.

Figura 18. Interacción de los residuos esenciales para la translocación de protones en la intercara *a/c* del modelo de *E. coli*.

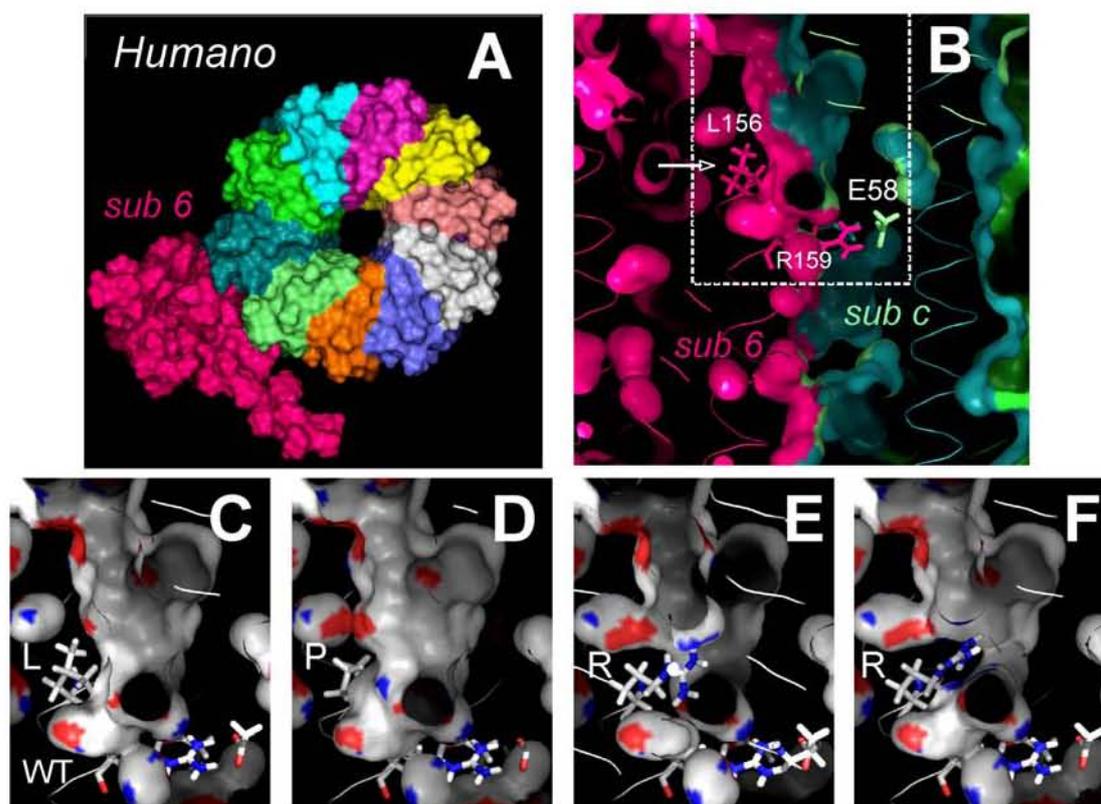


(**A**) Silvestre, (**B**) mutante de prolina (L207P), (**C y D**) dos rotámeros de la mutante de arginina (L207R). En todos los casos se muestra un corte perpendicular a los lípidos de la membrana, visto desde el interior bacteriano. Se destacan las cadenas laterales de los residuos esenciales para la translocación de protones: R210 de *a*, en interacción con los D61 desprotonados de dos subunidades *c* sucesivas; y las distancias de enlace no covalente de R210 con átomos de *c*, que cambian muy poco entre silvestre y mutantes. También se muestra la cadena lateral del residuo 207, cuya mutación en humanos produce NARP/MILS. Además se incluyen las aguas estables determinadas con el programa Dowser. Las mutantes de arginina estabilizan más aguas en la intercara *a/c*. Imágenes generadas en Pymol, con ayuda del Dr. Lenin Domínguez.

En nuestros modelos se aprecia además que las mutaciones NARP/MILS se ubican en la intercara *a/c*, en la región que realiza la transferencia de protones. Sin embargo, la arginina introducida por la mutación se encuentra demasiado lejos para establecer un puente salino con el aspartato o glutamato de alguna de las subunidades *c*: en humano los grupos aminos cargados de esta arginina se encuentran a más de 6.7 Å del carboxilato de E58 más cercano, y en *E. coli* a más de 7.8 Å de D61 (distancia NH-O entre las cadenas laterales). Sin embargo, en estos modelos estáticos no podemos descartar que la arginina introducida por la mutación se encuentre a menor distancia de alguno de los carboxilatos esenciales en algún momento del ciclo de transferencia de protones. Falta incluir las mutaciones NARP/MILS en un modelo dinámico para

aseverar su distancia de los carboxilatos y su efecto sobre la estructura *sub a*/anillo de *c* durante todo el ciclo.

Figura 19. Superficie accesible al solvente en el modelo *sub6/c*₁₀ humano.

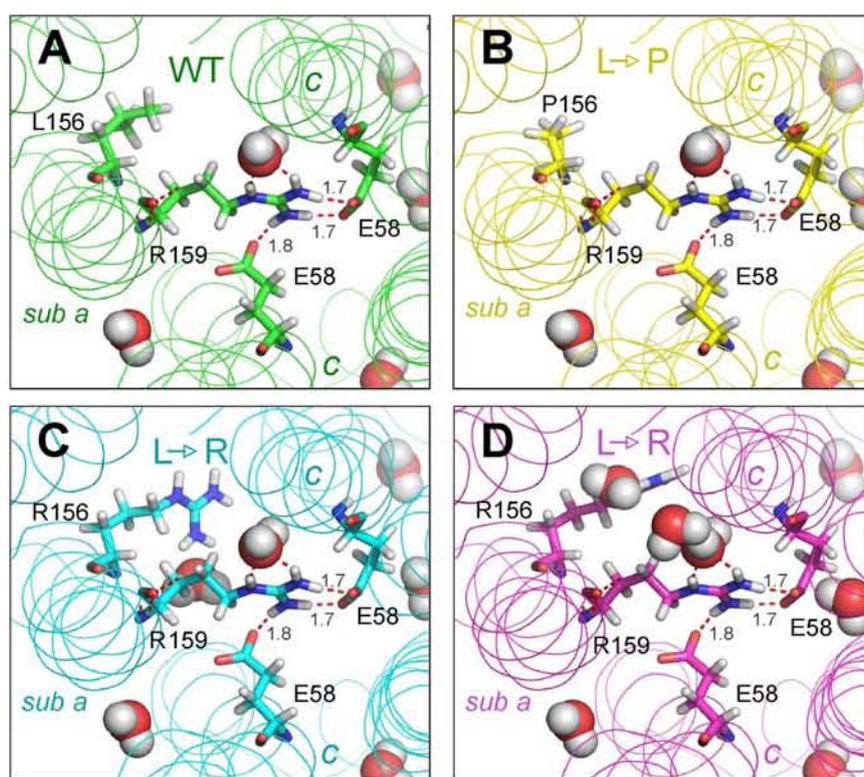


(A) El modelo completo visto desde la matriz mitocondrial. En la parte inferior de la imagen se observa una porción de *sub6* que no aparece en el modelo de *E. coli*, debido a un extremo carboxilo terminal más largo en humano que se modeló como un asa. (B) Corte longitudinal del modelo enfocado en la intercara *sub 6/c*. En esta vista, la matriz mitocondrial está hacia arriba. Se muestran las cadenas laterales de los residuos esenciales para la translocación de protones (R159 de *sub6*, y E58 de *c*), y la leucina 156 (marcada con flecha), cuya mutación produce NARP/MILS. Dentro del rectángulo punteado se aprecia una cavidad similar a la del modelo de *E. coli* (Fig 17B) que podría constituir el canal de salida de los protones a la matriz mitocondrial. (C-F) Muestra un acercamiento a la región delimitada en (B) por líneas punteadas, en presencia de la leucina silvestre (C), o de las mutantes NARP/MILS de prolina (D), y dos rotámeros de arginina (E-F). Imágenes generadas en Pymol con ayuda del Dr. Lenin Domínguez.

Analizamos los modelos con el programa DOWSER [177] que localiza las cavidades de tamaño adecuado para albergar agua, y conserva hidratadas aquellas en las que la interacción agua-proteína es ≥ 12 kcal/mol. Mientras que en la mutante de prolina el patrón de aguas estables es igual al silvestre, en las mutantes de arginina encontramos diferencias notables en las aguas estables de la intercara *a/c*, cercanas a los residuos esenciales para la translocación de protones: al menos cuatro aguas *extra* se estabilizan en el modelo de *E. coli* (Fig 18) y una o dos lo hacen en el de humano (Fig 20), coordinadas principalmente por las argininas en la intercara *sub a/c*.

La conducción de protones en el agua no ocurre por difusión de H_3O^+ , sino por un mecanismo de transferencia prototrópica, o mecanismo de Grotthuss, en el que los protones saltan de una molécula de agua a la siguiente en un cable: un protón se une a un extremo del cable de agua, al tiempo que un protón distinto abandona el cable en el extremo opuesto (Revisado en [178]). Por lo tanto, si las aguas estables de la intercara *a/c* en las mutantes de arginina tienen ambos dipolos satisfechos, o están mal orientadas, podrían cortar o distorsionar el cable, con consecuencias negativas para la translocación de protones.

Figura 20. Interacción de los residuos esenciales para la translocación de protones en la intercara *sub6/c* del modelo humano.

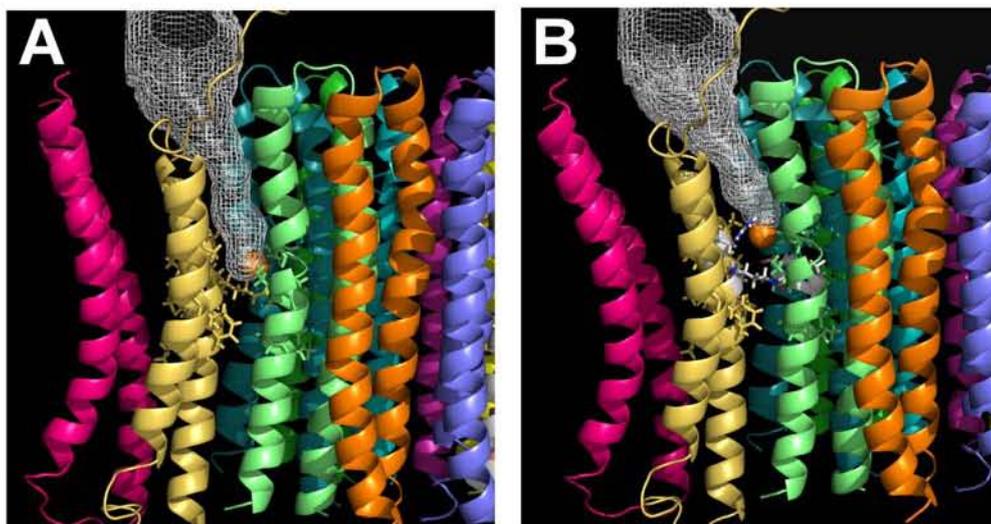


(A) Silvestre, (B) mutante de prolina (L156P), (C y D) dos rotámeros de la mutante de arginina (L156R). En todos los casos se muestra un corte perpendicular a los lípidos de la membrana, visto desde la matriz mitocondrial. Se destacan las cadenas laterales de los residuos esenciales para la translocación de protones: R159 de *sub6*, en interacción con los E58 desprotonados de dos subunidades *c* sucesivas; y las distancias de enlace no covalente de R159 con *c*, que cambian muy poco entre silvestre y mutantes. También se muestra la cadena lateral del residuo 156, cuya mutación produce NARP/MILS. Además se incluyen las aguas estables determinadas con el programa Dowser. Las mutantes de arginina estabilizan más aguas en el canal de salida de la intercara *sub6/c*. Imágenes generadas en Pymol con ayuda del Dr. Lenin Dominguez.

Además encontramos cambios importantes, aunque localizados, en la superficie accesible al solvente de la intercara *a/c* en los modelos mutantes analizados en Pymol

(Fig 17 y 19). Los cambios se concentran en un túnel que resulta un candidato ideal para constituir el hemi-canal de salida de los protones ya que comunica los residuos esenciales para la translocación con el espacio acuoso correspondiente al interior bacteriano o la matriz mitocondrial. Esta cavidad se muestra dentro del rectángulo punteado de los incisos (**B**) en las figuras 17 y 19, para *E. coli* y humano, respectivamente. Con el programa CAVER [179], que encuentra cavidades en las estructuras, identificamos este mismo túnel (se muestra en la Fig 21 para el modelo de la *sub6* humana). Entonces, por dos análisis distintos, encontramos un mismo túnel en la intercara *a/c* y observamos que se distorsiona notablemente en las mutantes (Fig 17, 19 y 21), en especial en las de arginina. Mientras que en presencia de prolina el canal se ensancha un poco, en presencia de arginina se estrecha e incluso se interrumpe con algunos rotámeros, lo cual es acorde con la severidad clínica observada en los pacientes con estas mutaciones.

Figura 21. El hemi-canal de salida de protones en el modelo humano.



Vista del modelo humano *sub6/c*₁₀ paralela a los lípidos de la membrana, con la matriz mitocondrial hacia arriba. La segunda y tercera hélices de *sub 6* están en rosa, y la cuarta y quinta en amarillo. La malla blanca delimita un túnel, encontrado por análisis en el programa CAVER, que conecta los residuos esenciales para la translocación de protones con el solvente de la matriz mitocondrial en el modelo silvestre (**A**). En la mutante L156R (**B**), este túnel es más corto y no está bien definido cerca de los residuos esenciales. En ambos casos este túnel tiene un diámetro suficiente para albergar un cable de agua. Imágenes generadas en Pymol, con ayuda del Dr. Lenin Domínguez.

Nuestros modelos *in silico* asumen que las mutaciones NARP/MILS permiten la inserción de la cuarta hélice de *a* en la membrana, tal como ocurre en las enzimas silvestres. Los datos experimentales indican que la *sub6* mutante se integra en la F₁F₀ humana y que existe síntesis residual de ATP, por lo que debe existir un canal de

protones parcialmente funcional. Si la cuarta hélice transmembranal de la *sub6* mutante alcanza la misma posición que la silvestre, nuestros modelos aportan evidencia de que la mutación L156R cambia las propiedades fisicoquímicas del hemicanal, volviéndolo menos eficiente para permitir la salida de los protones, debido a la presencia de la carga positiva introducida por la mutación, aunada a la distorsión del cable de donación de protones; y son compatibles con la actividad residual observada en las mutantes y la severidad clínica encontrada en los pacientes con estas mutaciones.

Se acepta que los protones recorren, en direcciones opuestas, el mismo camino a través de F_0 durante la síntesis y la hidrólisis de ATP, por lo que se espera que un bloqueo en el canal inhiba de manera similar ambas reacciones. Sin embargo, en las mutantes NARP/MILS la hidrólisis de ATP se ha encontrado menos afectada que la síntesis (la Tabla 2 muestra los reportes de otros autores; el tiempo cero en la Fig 12 muestra nuestros resultados de actividad de hidrólisis sensible a oligomicina). Solaini y cols. proponen que esto se debe a un acoplamiento defectuoso en las mutantes entre los segmentos F_1 y F_0 , o entre el rotor y el estator en F_0 [144, 154], pues el segmento F_1 desacoplado puede hidrolizar ATP a gran velocidad (en ausencia de IF_1), pero se requiere a la enzima completa y acoplada para sintetizarlo. Para explorar el acoplamiento entre F_1 y F_0 evaluamos la sensibilidad de la enzima a oligomicina, que se une a F_0 y sólo limita la catálisis en F_1 si estos segmentos están estrechamente asociados, estructural y funcionalmente. Encontramos que tanto la síntesis como la hidrólisis de ATP son tan sensibles a oligomicina en mutantes como en silvestres (Fig 11), lo que descarta que las mutaciones L156R/P reduzcan el acoplamiento entre los sectores F_1 y F_0 (o entre el rotor y el estator). Además esto es una prueba adicional del completo ensamblaje de la enzima mutante. Las mutantes incluso muestran una tendencia a inhibirse con menores concentraciones de oligomicina que las silvestres (Fig 11), como se ha reportado antes [140, 141]. Este efecto de las mutaciones NARP/MILS también podría estar relacionado a la distorsión del canal de protones, que, se propone, es el sitio de unión de la oligomicina. Otras mutaciones que alteran la sensibilidad de la enzima a oligomicina se localizan, como las NARP/MILS, en la región de la *sub6* que forma el canal de protones (revisado en [51, 141]).

Para observar la máxima actividad del complejo F_1F_0 en el sentido de la hidrólisis de ATP, utilizamos condiciones que desprenden a la subunidad inhibitoria (IF_1) de la

enzima (Fig 12). Demostramos que la F_1F_0 mutante L156R no aumenta su actividad sensible a oligomicina a pesar de perder IF_1 . En el tiempo de máxima activación silvestre, la hidrólisis de la mutante se encontró muy inhibida (35 % de la actividad silvestre); sin embargo determinamos que esto se debe, en parte, a que las condiciones utilizadas para desprender la proteína inhibidora desensamblan ~50 % de las enzimas mutantes, mientras que respetan la estructura nativa de la enzima silvestre (Fig 13). Por lo tanto, la hidrólisis en condiciones de activación no es directamente comparable entre silvestres y mutantes L156R, pues en las mutantes únicamente las enzimas ensambladas y acopladas contribuyen a la actividad. Una parte de la inhibición observada en la Fig 12 probablemente proviene del bloqueo en el canal de protones por la mutación, ya que alrededor del 50 % de las enzimas mutantes catalizan el 35% de la actividad observada en silvestres. En conclusión, la mayoría de las evidencias [140, 169], incluyendo nuestro trabajo, indican que el canal de protones se encuentra bloqueado en ambos sentidos, aunque falta comparar rigurosamente la magnitud de la inhibición en cada sentido para aclarar si la síntesis y la hidrólisis de ATP realmente se afectan diferencialmente por las mutaciones NARP/MILS.

A fin de comparar la máxima hidrólisis de ATP sin provocar el desensamblaje de la enzima mutante, ensayamos condiciones fisiológicas que desplazan a IF_1 de su sitio inhibitorio, como el establecimiento de un gradiente de protones [180]. Desafortunadamente, aun en nuestras preparaciones de mitocondrias silvestres, la activación de la hidrólisis de ATP por el gradiente de protones fue despreciable y no se muestra.

Por otro lado, el hallazgo de que las condiciones de activación producen desensamblaje de manera preferencial en la enzima mutante, nos interesó como evidencia de que la mutación L156R confiere inestabilidad al complejo F_1F_0 . Obtuvimos más evidencias al respecto, siguiendo el desensamblaje de la ATP sintasa en geles nativos, tras incubar a 40 °C a la enzima extraída con detergente. Con dodecil-maltósido encontramos que las enzimas mutantes L156R/P se desensamblan antes que las silvestres, siendo L156R ligeramente más inestabilizante que L156P (Fig 14). La F_1F_0 resultó más estable en digitonina (1.5 g/g proteína), que en dodecil-maltósido (>2.5 g/g proteína) (Fig 16 vs 14-15). Sin embargo, en las enzimas extraídas con

digitonina el calor también liberó a la proteína inhibidora y provocó una marcada monomerización de la ATP sintasa, que fue más dramática en las mutantes L156R.

La F_1F_0 mutante L156R obtenida de tejido postmortem o biopsia se ha encontrado desensamblada y, con base en ello, algunos grupos sostienen que el mecanismo patogénico de NARP/MILS es el desensamblaje de la ATP sintasa, o bien un bloqueo en su ruta de ensamblaje [158-160]. Nuestros resultados descartan el bloqueo en la ruta de ensamblaje y demuestran que no es necesario el desensamblaje, ni el desacoplamiento entre rotor y estator, para observar inhibición funcional en la enzima mutante. Para evidenciar la inestabilidad de la ATP sintasa mutante NARP/MILS, fue necesario utilizar condiciones *in vitro* (detergente, 40 °C, fuerza iónica, pH alcalino), que también desnaturalizan a la enzima control, aunque con una cinética ligeramente más lenta. En condiciones fisiológicas es muy factible que la célula pueda contender con la inestabilidad de las mutantes mediante un mayor recambio de la enzima, o aumentando la oligomerización de F_1F_0 , ya que la inestabilidad no se reflejó en una menor cantidad de F_1F_0 mutante ensamblada en estado estacionario. Entonces, ¿cómo contribuye a la patogénesis la inestabilidad conferida a la ATP sintasa por las mutaciones NARP/MILS? En condiciones desnaturalizantes la inestabilidad de la ATP sintasa mutante podría acelerar la progresión de la enfermedad de NARP/MILS. Estas condiciones pueden presentarse en los tejidos con alta demanda metabólica y enfermedad crónica, con hiperpolarización mitocondrial y aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno por el bloqueo en el flujo de protones a través de F_0 .

Resulta interesante que las condiciones desnaturalizantes utilizadas para desensamblar a la ATP sintasa desprenden a la subunidad reguladora IF_1 antes que a otras subunidades de la enzima (Fig 13-15). Además llama la atención que la proteína inhibidora se encontró asociada con la F_1F_0 oligomérica más que con la monomérica (Fig 16). Esto concuerda con el aumento en la oligomerización de F_1F_0 , inducible por la reconstitución de IF_1 en partículas submitocondriales de mamíferos [72]. Con base en estas evidencias consideramos que la sobreexpresión de la proteína inhibidora en células humanas podría aumentar la estabilidad de la enzima mutante monomérica y oligomérica, al tiempo que propiciaría una estrecha regulación para evitar la hidrólisis del ATP producido. Esta estrategia ya se encuentra en marcha: hemos clonado el gen de IF_1 humano con su presecuencia de direccionamiento mitocondrial a partir de ARN de nuestros cultivos de osteosarcoma. Preparamos diferentes construcciones con el gen, incluyendo una versión trunca que no expresa el carboxilo terminal dimerizante, y

hemos logrado una sobreexpresión de la **IF₁** de hasta 6 veces en células de osteosarcoma humanos por transfección transitoria de los cultivos (no se muestra).

CONCLUSIONES:

1. El mecanismo patogénico *primario* de la enfermedad de NARP/MILS es la síntesis disminuida de ATP en una F₁F₀ ATP sintasa completamente ensamblada y acoplada. La inhibición funcional es compatible con un bloqueo en el flujo de protones a través de F₀.
2. Observamos por primera vez los dímeros y oligómeros de la ATP sintasa humana, y constatamos que las mutaciones NARP/MILS L156R/P no impiden esta oligomerización. Al contrario, la mutación L156R aumenta la oligomerización de la enzima en algunos tipos celulares, probablemente como respuesta compensatoria ante la mutación.
3. La F₁F₀ ATP sintasa mutante L156R o L156P es menos estable que la enzima control, como se demostró en condiciones desnaturalizantes. La inestabilidad que puede contribuir a la *progresión* de la enfermedad crónica en condiciones metabólicas demandantes.

MATERIALES Y METODOS.

I. Cultivos Celulares

Las células humanas se cultivaron en condiciones de esterilidad, adheridas en monocapa a platos de poliestireno para cultivo, de 150 cm², se nutrieron con 18 ml/plato de medio DMEM (GIBCO) pH 7.4, con 4.5 g/L (25 mM) glucosa, 110 mg/L (1 mM) piruvato, 75 mg/L (0.3 mM) uridina, 1 mg/L insulina, 584 mg/L (4 mM) glutamina, 2.6 g/L (10 mM) HEPES, 3.7 g/L (44 mM) NaHCO₃, 10 % suero fetal bovino, antibióticos (100,000 U/L penicilina G, 100 mg/L sulfato de estreptomicina), y el antimicótico anfotericina B (2 mg/L). Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en una incubadora para células eucariotes, con ambiente húmedo y aporte constante de CO₂ al 5 % que completa el sistema de amortiguación de pH (bicarbonato/ácido carbónico) del medio de cultivo. Los cambios de medio se realizaron cada 24 a 72 horas según la densidad del cultivo.

Los fibroblastos en confluencia, que producen abundante matriz extracelular y se adhieren con fuerza a ella, se despegaron mediante incubación ≤ 5 minutos en una solución de tripsina al 0.05 % con 0.2 % (0.48 mM) Na₄EDTA, en Solución

Balancedeada de Hanks (5.33 mM KCl, 0.441 mM KH₂PO₄, 4.17 mM NaHCO₃, 137.93 mM NaCl, 0.338 mM Na₂HPO₄, 10 % rojo de fenol) (GIBCO); mientras que los cíbridos y el osteosarcoma control se despegaron sin proteasas, quelando el calcio y magnesio de las proteínas de adhesión, con Verseno (136 mM NaCl, 5.36 mM KCl, 25 mM Tris, 2 mM Na₄EDTA, pH 7.7). Las células se cosecharon mediante centrifugación a 300 x g. Una parte se diluyó y se sembró para la expansión de los cultivos. La dilución típica para la resiembra fue de 1:5 para fibroblastos y 1:8 para osteosarcoma y cíbridos (siembra de 5-10 x 10³ células por cm², contadas al microscópio en un hemocitómetro). El resto de las células se lavó una vez con PBS (136 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄, pH 7.4) y la pastilla celular se guardó sin sobrenadante a -70 °C durante un máximo de 2 meses, hasta acumular suficiente material para hacer un fraccionamiento celular. Los fibroblastos se mantuvieron en cultivo por un máximo de 20 duplicaciones de la población; mientras que los cíbridos y el osteosarcoma control se cultivaron por < 50 duplicaciones.

Algunas células jóvenes se congelaron en nitrógeno líquido para mantener un banco. 25 cm² de monocapa en confluencia (aprox 1 x 10⁶ células) se suspendieron en 1 ml de medio DMEM completo, con 20 % suero fetal bovino y 10 % DMSO, y se guardaron en viales de plástico a -70 °C por 24 horas en caja de unicel, para su congelación gradual. Congeladas, se transfirieron a nitrógeno líquido, donde se conservan por años. La descongelación de células se realizó por incubación a 37 °C. Las células se obtuvieron por centrifugación a 300 x g, se retiró el medio con DMSO, y se sembraron.

II. Aislamiento de ADN, amplificación del gen mitocondrial *ATP6* y RFLP para la identificación y cuantificación de la mutación mitocondrial T8993G.

El ADN total se aisló a partir de 1 x 10⁶ células, con los sistemas NucleonTM (Amersham) o Ready AmpTM (Promega), para purificación de ADN genómico. La concentración del ADN obtenido se determinó por absorbancia a 260 nm. 10 a 250 ng del ADN total purificado, se utilizaron como molde para amplificar por PCR un fragmento del gen mitocondrial *ATP6* (nucleótidos 8657 al 9421 del ADNmt). Los oligonucleótidos para la amplificación corresponden a los nucleótidos 8657-8679 y 9421-9398 del ADNmt humano, y fueron marcados con fluoresceína-isotiocianato por el proveedor (Synthagen). La reacción de PCR se preparó en 50 µl con 2 mM MgCl₂,

50 pmol de cada uno de los oligonucleótidos, Taq polimerasa y 25 μ M de dNTPs. El programa para la amplificación fue: 2 min a 94 °C, 1 min a 54°C, 1 min a 72 °C; 29 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 54 °C, 1 min a 72 °C; finalizando con de 10 min a 72 °C. La amplificación de *ATP6* fue proporcional al molde usado, con cantidades \leq 100 ng; pero el rendimiento disminuyó con cantidades mayores. Alternativamente utilizamos como molde el ADNmt liberado al sobrenadante de mitocondrias cuya integridad membranal se destruyó mediante choque osmótico. 5 a 40 μ l del sobrenadante de choque osmótico se agregaron en la PCR, en vez del ADN total purificado, con los mismos resultados.

Para RFLP, una parte de la mezcla amplificada por PCR se incubó con la endonucleasa MspI a 37 °C por 12 horas (30 μ l de PCR, 3 μ l Amortiguador 10X de reacción, 2 μ l MspI). El ADN, se mezcló con 1 volumen de amortiguador de carga (glicerol 20 %, 25 mM NaOH, en TBE), y se analizó por electroforesis nativa en gel de poliacrilamida (8 %T, 2.6 %C), con amortiguador TBE (90 mM Tris/HCl pH 8.0, 90 mM ácido bórico, 2 mM EDTA), en paralelo a una escalera de masa molecular (1 Kb, de New England Biolabs). El gel se iluminó con luz UV y se fotografió para apreciar la fluorescencia de los oligonucleótidos; después se tiñó por incubación en una solución de bromuro de etidio (10 μ g/ml), para ver las bandas no fluorescentes. El análisis de RFLP se realizó por densitometría de las bandas, de acuerdo a las consideraciones descritas en RESULTADOS.

III. Aislamiento de Mitocondrias.

Las mitocondrias humanas se aislaron mediante centrifugación diferencial, a 4 °C, como en [28]. Las células se congelaron a -70 °C al menos durante 12 horas y por un máximo de 2 meses, para favorecer su ruptura. Se juntaron las pastillas correspondientes al menos a 10^8 células (típicamente 1×10^8 para fibroblastos y 2×10^8 para cíbridos). Tras descongelarlas, se resuspendieron a 1×10^7 células/ml de medio con 0.25 M sacarosa, 1 mM EGTA, 10 mM HEPES/NaOH, 2.5 % albúmina sérica bovina, pH 7.4, e inhibidores de proteasa (0.5 μ g/ml leupeptina, 0.5 μ g/ml pepstatina, 1 mM PMSF) y se rompieron mecánicamente en un baño de hielo con 20 homogenizaciones de un vástago conectado a un taladro y controlado por reóstato a 300 revoluciones por minuto. Los homogenizados se centrifugaron a $1500 \times g$ por 10 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes (postnucleares) se reservaron, mientras las pastillas

volvieron a homogeneizarse y centrifugarse por 4 o 5 ciclos, para maximizar la ruptura de células. Conforme la población celular se rompe, la pastilla tiene mayor proporción de núcleos y adquiere apariencia gelatinosa y transparente, mientras el sobrenadante se torna translúcido.

Los sobrenadantes postnucleares combinados se centrifugaron a 1500 x g durante 10 minutos. El sobrenadante, que contiene organelos, se centrifugó por 15 minutos a 10,000 x g. En la pastilla quedaron las mitocondrias, que se lavaron con 5 ml de 0.25 M sacarosa, 1 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl, pH 7.5, con inhibidores de proteasas, por centrifugación a 10,000 x g, y se resuspendieron en 200-500 µl del medio de lavado. Las mitocondrias resuspendidas se alicuotaron en tubos tipo Eppendorff y se congelaron rápidamente por inmersión en nitrógeno líquido, donde se guardaron hasta por 6 meses. Las mitocondrias de corazón bovino se aislaron mediante centrifugación diferencial, como se describe en [181].

IV. Determinación de proteína por el método de Lowry [182].

La muestra problema y estándares de 5, 10, 15, 20, 30 y 40 µg de albúmina se aforaron a 100 µl con H₂O. 1 ml de una mezcla 50:1 entre la solución A (2 % Na₂CO₃ en 0.1 N de NaOH) y la B (1 % CuSO₄, 2 % tartrato Na-K en 0.1 N de NaOH), se agregó a cada muestra y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente, para generar complejos cobre-proteína. A continuación se adicionaron 100 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma) diluído 1:1 con H₂O, y las muestras se incubaron a temperatura ambiente por 20 minutos. Durante este tiempo se desarrolla color azul debido a la reducción del ácido fosfomolibdico/fosfotúngstico (reactivo de Folin), por los complejos cobre-proteína. La absorbancia de las muestras se leyó a 660 nm, y se comparó contra la curva estándar para conocer la concentración de proteína.

Algunas muestras se precipitaron con ácido tricloroacético (TCA) antes de la determinación de proteína para evitar interferencia de los componentes del medio. Las muestras y la curva patrón se aforaron a 1 ml con H₂O, se agregaron 100 µl de desoxicolato de sodio al 0.15 % y se incubaron por 10 minutos; a continuación se agregaron 100 µl de TCA al 72 % y se incubaron 15 minutos en hielo. Las proteínas precipitadas se obtuvieron en la pastilla de una centrifugación a 10,000 x g por 15 minutos. Se descartaron los sobrenadantes. A cada pastilla se agregaron 100 µl de H₂O

y 1 ml de mezcla A+B 50:1 (que permite la resuspensión de la pastilla ácida) y se siguió el protocolo de Lowry [182].

V. Choque osmótico a mitocondrias [28].

Las mitocondrias aisladas se resuspendieron en 40 volúmenes de agua con 5 mM Na₄EDTA (pH 8.0) e inhibidores de proteasas (0.5 µg/ml leupeptina, 0.5 µg/ml pepstatina, 1 mM PMSF), se incubaron en hielo durante 10 minutos agitando en vortex cada minuto, para favorecer la ruptura de las membranas. Posteriormente, las membranas mitocondriales se recuperaron por centrifugación a 12,000 x g, y se resuspendieron en el medio pertinente al experimento en que fueran a ocuparse. Con este protocolo se libera al sobrenadante el contenido de la matriz mitocondrial, que se analizó por PCR y inmunorréplica.

VI. Acoplamiento del anticuerpo 12F4AD8 a esferas de agarosa [168].

Utilizamos esferas de agarosa con proteína G recombinante (Invitrogen) con afinidad por la región Fc de la IgG de diversas especies, incluido ratón. Las esferas se lavaron 3 veces con PBS para eliminar el conservador, mediante centrifugación de 30 segundos a 10,000 x g (todos los lavados que se mencionan en este protocolo y el siguiente se realizaron recuperando las esferas con una centrifugación como ésta).

El anticuerpo monoclonal de ratón 12F4AD8, con afinidad por F₁, fue donado por el Dr R.A. Capaldi (Mitosciences). 0.5 a 1 mg del anticuerpo se incubó con 500 µl de esferas, durante 1 hora a temperatura ambiente, con agitación suave y continua, para unirlo de manera no covalente a la proteína G. (Reservamos 5 µl de esta suspensión). Las esferas con el anticuerpo unido se lavaron dos veces en 10 volúmenes de borato de sodio 0.2 M, pH 9.0. A continuación, agregamos 20 mM de dimetilpimelidato en borato de sodio 0.2 M pH 9.0, e incubamos 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave, para entrecruzar el anticuerpo con la proteína G; esta reacción ocurre eficientemente a pH >8.3. Reservamos una alícuota de 5 µl (alícuota post-entrecruzamiento). Lavamos las esferas una vez con 0.2 M etanolamina pH 8.0, las resuspendimos en 10 volúmenes del mismo medio y las incubamos 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave, para detener el entrecruzamiento. Por último, lavamos las esferas 2 veces en PBS y las guardamos a 4°C en PBS con azida 5 mM, con lo que se conservan por un par de años y pueden utilizarse varias veces para inmunoprecipitar F₁F₀. Para verificar la eficiencia de entrecruzamiento las alícuotas pre y post entrecruzamiento se mezclaron con amortiguador de carga para SDS-PAGE, se hirvieron por 2 minutos y se analizaron en un gel desnaturizante en el sistema

electroforético de Laemmli [183]. La banda correspondiente a la cadena pesada del anticuerpo debe verse en el carril de la alícuota pre-entrecruzamiento, pero no en la post-entrecruzamiento.

VII. Inmunoprecipitación de F_1F_0 [168].

Resuspendimos mitocondrias enteras o membranas mitocondriales obtenidas por choque osmótico, a 3 mg de proteína/ml de medio ADP (150 mM sacarosa, 20 mM Mes-Tris, 1 mM ADP, pH 6.8, con inhibidores de proteasas), y las solubilizamos agregando lentamente un volumen de medio ADP con 6 mg/ml n-dodecil- β -D-maltósido (Sigma), en agitación dentro de un baño de hielo. Obtuvimos una preparación a 1.5 mg de proteína/ml y 2 mg de detergente/mg proteína, la cual incubamos a 4 °C por 60 minutos, en agitación, para maximizar la solubilización. Centrifugamos el solubilizado a 100,000 x g, a 4 °C por 45 minutos, y el sobrenadante se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora con esferas sin anticuerpo, a fin de eliminar las proteínas que se unen de manera inespecífica a las esferas. Todas las esferas, acopladas o no acopladas, deben lavarse previo a su uso, 2 veces en PBS, para eliminar el conservador en el que se guardan, y deben equilibrarse con medio ADP. Recuperamos el sobrenadante por centrifugación a 10,000 x g por 30 segundos, y lo incubamos con las esferas acopladas al anticuerpo monoclonal 12F4AD8 (100 μ l de esferas por cada 4 mg de mitocondrias iniciales), con agitación suave, durante toda la noche (>12 horas) a 4 °C. En este paso la F_1F_0 se une al anticuerpo. Las esferas con F_1F_0 se lavaron 5 veces en 5 volúmenes de medio ADP con 0.05 % de dodecil-maltósido, y luego la F_1F_0 se eluyó en dos etapas, resuspendiendo cada vez en $\frac{1}{2}$ volumen de 100 mM glicina/HCl pH 2.0, agitando suavemente en vortex, y recuperando el sobrenadante por centrifugación a 10,000 x g. En el sobrenadante se encuentra la F_1F_0 inmunoprecipitada que se desnaturaliza por el bajo pH de elución y pierde afinidad por el anticuerpo. Posteriormente, el pH del eluido, se ajusta a 7.5, agregando $\frac{1}{20}$ de volumen de solución 1 M de fosfatos, pH 8.0. Para regenerar las esferas acopladas al anticuerpo, se lavan una vez con 5 volúmenes de glicina 100 mM pH 2.0, dos veces con glicina pH 7.0 y dos veces con PBS; se guardan en PBS con azida 5 mM a 4 °C, y pueden reutilizarse (2 o 3 veces).

La F_1F_0 inmunoprecipitada a partir de 3 a 6 mg de mitocondrias humanas, se analizó por SDS-PAGE en un mini-gel. Dado el escaso material, no determinamos proteína a

la F_1F_0 eluída, pero cargamos volúmenes equivalentes de las distintas muestras, inmunoprecipitadas en paralelo, a partir de la misma cantidad inicial de mitocondrias o membranas mitocondriales.

VIII. Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Se realizó de acuerdo a Laemmli [183] en mini-geles de 84 x 73 x 1 mm. El gel concentrador se preparó al 4 %T, 2.6 %C con amortiguador 125 mM Tris/HCl pH 6.8, 0.1 % SDS; y el separador fue un gradiente lineal continuo de 10 a 22 %T, 2.6 %C, con amortiguador Tris/HCl 375 mM pH 8.8, 0.1 % SDS. El amortiguador de corrida fue 25 mM Tris/HCl, 191.8 mM glicina, 0.1 % SDS. Antes de cargar, las muestras se combinaron con un volumen de mezcla de carga (62.5 mM Tris/HCl pH 6.8, 2 % SDS, 25 % glicerol, 0.01 % azul de bromofenol, 10 mM DTT), y se hirvieron durante 2 minutos. Cuando se corrieron lisados completos de mitocondrias, éstas únicamente se diluyeron en agua a la concentración pertinente y su lisis ocurrió al combinarlas con la mezcla de carga y hervirlas.

Las electroforesis se corrieron en cámaras mini-Protean II de Bio-Rad, a 150 V y temperatura ambiente, por alrededor de 80 minutos, hasta que el frente salió. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie o se transfirieron para inmunorréplica, como se describe adelante.

Los amortiguadores del gel concentrador y separador se prepararon concentrados 4X con reactivos de Bio-Rad. La acrilamida:bis-acrilamida se preparó 30 %T, 2.6 %C a partir del polvo pre-pesado (37.5:1) de Bio-Rad. Se conservaron a 4 °C. El amortiguador de corrida se preparó concentrado 10X y se conservó a temperatura ambiente. Se utilizaron estándares de masa molecular de Bio-Rad.

IX. Electroforesis azul nativa (BN-PAGE) y bidimensional (nativa/desnaturalizante).

Las muestras para BN-PAGE se prepararon a partir de mitocondrias humanas o de corazón de res de acuerdo a [184], en hielo durante todo el protocolo. Las mitocondrias se centrifugaron a 10,000 x g durante 10 minutos a 4 °C, se eliminó el sobrenadante, se resuspendieron a 10 mg/ml en amortiguador de solubilización (750 mM ϵ -aminocaproico, 50 mM Bis-Tris/HCl, pH 7.0), y se solubilizaron agregando detergente gota a gota y agitando la muestra suavemente dentro de un baño de hielo. Las mitocondrias se incubaron con el detergente por 60 (dodecil-maltósido) o 90

(digitonina) minutos, en agitación suave a 4 °C, para maximizar la solubilización. El n-dodecil-β-D-maltósido (Sigma) se preparó al 10 % en amortiguador de solubilización; y la digitonina (Sigma) a 500 mg/ml en DMSO (Baker) (para disolver la digitonina fue necesario incubar a 50 °C); y se conservaron en alícuotas a -20 °C. Los tiempos y las cantidades de detergente para solubilizar el complejo V monomérico (dodecil-maltósido) o dimérico (digitonina), se determinaron experimentalmente mediante curvas de detergente/proteína.

Los solubilizados se centrifugaron a 100,000 x g, a 4 °C por 45 minutos. La concentración de proteína del sobrenadante se determinó por el método de Lowry en alícuotas precipitadas con TCA (para evitar interferencia del ε-aminocapróico). El colorante azul-G (grado reactivo de Serva, Heidelberg) disuelto en 0.5 M ε-aminocapróico pH 7.0, se agregó a los sobrenadantes (5 µg azul Serva/mg proteína). Los sobrenadantes se cargaron a geles nativos de acrilamida (84 x 73 mm, gradiente lineal continuo de 4-11 %T, 2.6 %C, con 0.5 M ácido ε-aminocapróico y 50 mM Bis-Tris, pH 7.0 como amortiguador de gel). Los geles se corrieron durante 14-16 horas a 40 V, 4 °C, con amortiguador 15 mM Bis-tris/HCl pH 7.0, 50 mM Tricina, y Azul-G Serva al 0.01 % en el cátodo, y 15 mM Bis-tris/HCl pH 7.0 en el ánodo [184]. Los amortiguadores de ánodo y cátodo se prepararon concentrados 10X; y el amortiguador de gel, 3X; con reactivos de Sigma, y se conservaron a 4 °C.

Para la segunda dimensión desnaturalizante, tras la corrida nativa, los carriles se cortaron, se incubaron 10 minutos en 0.1 % SDS con 5 mM DTT y cada carril se montó transversalmente, en el borde superior de un mini-gel Laemmli (10-22 %T). El gel concentrador Laemmli, se gelificó con el carril nativo dentro y el SDS-PAGE se corrió como se describe antes.

Para la tinción por actividad de ATPasa, los geles nativos o los carriles individuales se incubaron a 4 °C por algunas horas en 50 mM de glicina, 10 mM MgCl₂, 10 mM ATP, y 0.15 % acetato de plomo, ajustado a pH 8.4 con etanolamina [76, 79]; o toda la noche en 50 mM Hepes, 30 mM CaCl₂, 10 mM ATP, pH 8.0 [184], hasta que las bandas que hidrolizan ATP se tiñeron con un precipitado blanco de fosfato de calcio o fosfato de plomo (la tinción con plomo es más sensible). Se requieren >50 µg de proteína/carril para ver la actividad en muestras de corazón de res, y >100 µg/carril para muestras humanas.

X. Tinción de geles con azul de Coomassie. [185]

Los geles, nativos o desnaturizantes, se incubaron a temperatura ambiente durante 1-2 horas, con agitación, en una solución al 0.2 % de colorante azul brillante de Coomassie R250 (Research Organics) en 47.5 % etanol y 10 % ácido acético; tras lo cual se destiñeron en 50 % metanol y 7.5 % ácido acético, hasta que se eliminó el colorante del fondo; por último, se rehidrataron en agua y se fotografiaron.

XI. Inmunorréplica (Western Blot).

Se realizó como en [186]. Las proteínas se transfirieron por voltaje en cámara húmeda (Mini-TransBlot Cell de Bio-Rad) a membranas de PVDF de 0.2 μm (Imobilon P-SQ de Millipore), incubadas previamente 5 minutos en metanol absoluto (grado reactivo de Baker), y equilibradas con el amortiguador de transferencia (10 mM CAPS/NaOH, pH 11.0, 10 % metanol) por 10 minutos. Los geles nativos o desnaturizantes de 1 mm de grosor se equilibraron con el amortiguador de transferencia 20 minutos, se adosaron a una membrana hidratada de PVDF y se transfirieron en 0.8 L de amortiguador de transferencia, durante 2 horas a 100 mAmp (geles desnaturizantes), o durante 8 horas a 60 V (geles nativos), en hielo. En los geles desnaturizantes se incluyó un carril con estándares de masa molecular preteñidos (Kaleidoscope de Bio-Rad). Las membranas se bloquearon 2 horas a temperatura ambiente en 5 % de leche descremada (Svelty) en PBS-T (PBS con 0.1 % de Tween-20 de Sigma). Después se incubaron en agitación toda la noche a 4 °C, con los anticuerpos monoclonales (Mitosciencias) de ratón disueltos en TBS-T (136.9 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl pH 7.6, 0.01 % Tween-20) con 5 % de leche y 0.02 % azida. El anticuerpo anti- α se utilizó a 1.5 $\mu\text{g/ml}$, mientras que anti-OSCP y anti-IF₁ se usaron a 0.5 $\mu\text{g/ml}$. Los anticuerpos se recuperaron y se guardaron a 4 °C, para su reutilización. Las membranas se lavaron 3 veces por 10 minutos con 20 ml de PBS-T, en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron en agitación durante una hora a temperatura ambiente con anticuerpo secundario (cabra, anti-ratón) acoplado a peroxidasa, diluido 1:20,000 en PBS-T con 5 % de leche. Las membranas se lavaron (como arriba) 2 veces con PBS-T y una vez con PBS, y se revelaron por quimioluminiscencia con el sistema ECL-plus (Amersham), detectada por autoradiografía en placas fotográficas (KODAK, Biomax-Light Film).

XII. Evaluación de la estabilidad a temperatura de la F_1F_0 ATP sintasa nativa.

Se prepararon muestras para BN-PAGE. Antes de cargar los geles, cada muestra se dividió en alícuotas de 300 μg de proteína. Algunas alícuotas se incubaron los minutos que se indican en las Figs 14 y 15, en un baño a 40 °C; luego, todas se adicionaron con Azul Serva (5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína) y se cargaron al gel. De esta forma nos aseguramos de que la cantidad de detergente no variara entre las muestras calentadas y las no calentadas. Los geles nativos se corrieron como se describió antes, y se tiñeron con azul de Coomassie o se transfirieron para inmunorréplica, a fin de comparar las muestras calentadas con su contraparte no calentada. Para evaluar los solubilizados con digitonina se prefirió la inmunorréplica de muestras separadas por electroforesis de dos dimensiones (nativa/desnaturalizante), ya que resulta difícil transferir con eficiencia los oligómeros nativos de F_1F_0 de gran masa molecular.

XIII. Captura de imágenes y densitometría.

Los geles y las inmunorréplicas se capturaron con una cámara digital Kodak DC290, controlada por computadora con el programa AlphaDigiDoc, especializado en la captura de imágenes y en el análisis densitométrico de las bandas.

XIV. Ensayo de síntesis de ATP

La síntesis de ATP se detectó en mitocondrias aisladas o células permeabilizadas, acoplada a la reducción de NADP^+ [187]. La mezcla de reacción fue 150 mM sacarosa, 20 mM Tris/HCl, pH 7.5, 20 mM succinato, 1 mM ADP, 20 mM fosfato, 5 mM MgCl_2 , 10 mM glucosa, 1 mg/ml hexocinasa, 30 U/ml glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, 0.5 mM NADP^+ , y 100 μM de diadenosina-pentafosfato (como inhibidor de la adenilato cinasa). La reacción se inició con la adición de mitocondrias (50 μg de proteína) o células permeabilizadas (200 μg de proteína). Las velocidades iniciales de producción de NADPH (extinción molar, 6.22) a 37 °C, se siguieron por absorbancia a 340 nm en 1 ml de mezcla de reacción y corresponden estequiométricamente al ATP producido. En paralelo a cada trazo se realizó uno con oligomicina (10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) incubada con las mitocondrias o las células por 5 minutos a 37 °C. Las mitocondrias se aislaron justo antes del ensayo y se evaluaron frescas. Las células, se cosecharon antes del ensayo (25 cm^2 de cultivo en monocapa confluyente >90 %), se lavaron con PBS y se resuspendieron en 1 ml de 150 mM sacarosa, 20 mM Tris/HCl, pH 7.5 (la suspensión final quedó aprox 1×10^6

células/ml). Se determinó la concentración de proteína de la suspensión por el método de Lowry y se agregó digitonina gota a gota hasta 25 µg/mg de proteína celular, para permeabilizar la membrana plasmática. La cantidad de detergente se determinó experimentalmente siguiendo la exclusión del colorante azul de tripano por microscopía, y se eligió una cantidad que permeabiliza >90 % de la población celular sin decremento en la síntesis de ATP, y es similar al protocolo utilizado por [166, 188] de permeabilización celular para determinar síntesis de ATP. La digitonina se preparó a 1 mg/ml en DMSO y la concentración final de DMSO en el ensayo se mantuvo por debajo del 1 %.

Para determinar la sensibilidad a oligomicina se incubaron mitocondrias aisladas, con las cantidades de oligomicina que se indican en la Fig 11 (0.005-0.6 µg/mg proteína mitocondrial) durante 5 minutos a 37 °C, y se les determinó la síntesis de ATP midiendo la fosforilación de ADP por fosfato inorgánico marcado (³²Pi), como se reporta en [140].

XV. Ensayo de hidrólisis de ATP

Se resuspendieron membranas mitocondriales, obtenidas por choque osmótico, en condiciones de activación (125 mM KCl, 2 mM EDTA, 30 mM Tris-SO₄ pH 8.0, inhibidores de proteasas) o condiciones basales (0.25 M sacarosa, 2 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, inhibidores de proteasas). Se incubaron a 40 °C y se usaron alícuotas de cada mezcla a los tiempos que se indican (Fig 12) para determinar la hidrólisis de ATP, con un ensayo que acopla la regeneración de ATP a la oxidación de NADH de acuerdo a [28]. La mezcla de reacción incluyó 250 mM sacarosa, 50 mM Tris/acetato pH 7.4, 3 mM acetato de magnesio, 30 mM acetato de potasio, 3 mM ATP, 0.2 mM NADH, 1 mM fosfoenolpiruvato, 4 U/ml de piruvato cinasa, 4 U/ml de lactato deshidrogenasa, 0.5 µM FCCP, 1 µg/ml rotenona. La reacción se inició con la adición de membranas mitocondriales (35 a 50 µg de proteína), y las velocidades iniciales de oxidación de NADH, se siguieron a 37 °C en 1 ml de mezcla de reacción, por absorbancia a 340 nm. En paralelo se leyó la actividad de membranas mitocondriales incubadas con oligomicina (10 µg/mg proteína) durante 5 minutos a 37 °C, que se restó a cada muestra para construir la Fig 12. Tras 90 minutos de incubación a 40 °C, las membranas se centrifugaron a 15,000 x g, y los sobrenadantes (40 µg de proteína) se analizaron mediante SDS-PAGE e inmunorréplica, para evaluar la liberación de IF₁. Para determinar la sensibilidad a oligomicina, las membranas

mitocondriales se resuspendieron en 125 mM KCl, 2 mM EDTA, 30 mM Tris-SO₄ pH 8.0, se incubaron 5 minutos a 37 °C con las cantidades de oligomicina que se indican en la Fig 11 (0.03-13 µg/mg de proteína) y se determinó la hidrólisis de ATP con el ensayo acoplado a oxidación de NADH.

REFERENCIAS:

1. Nelson, D.L. and Cox, M.M., *Lehninger Principles of Biochemistry*. Third Edition ed. 2000, New York: Worth Publishers.
2. Mitchell, P., *Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism*. *Nature*, 1961. **191**: p. 144-8.
3. Stuart, J.A. and Brown, M.F., *Mitochondrial DNA maintenance and bioenergetics*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1757**(2): p. 79-89.
4. Cortes-Hernandez, P. and Garcia, J.J., *Cardiomiopatías Mitocondriales*, in *Tratado de Cardiología.*, J. Vargas-Barron, Editor. 2006.
5. Jensen, R.E., *Control of mitochondrial shape*. *Curr Opin Cell Biol*, 2005. **17**(4): p. 384-8.
6. Gray, M.W., Burger, G. and Lang, B.F., *Mitochondrial evolution*. *Science*, 1999. **283**(5407): p. 1476-81.
7. Taanman, J.W., *The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication*. *Biochim Biophys Acta*, 1999. **1410**(2): p. 103-23.
8. Scott, S.V., Cassidy-Stone, A., Meeusen, S.L. and Nunnari, J., *Staying in aerobic shape: how the structural integrity of mitochondria and mitochondrial DNA is maintained*. *Curr Opin Cell Biol*, 2003. **15**(4): p. 482-8.
9. Ruiz-Pesini, E., Lott, M.T., Procaccio, V., Poole, J.C., Brandon, M.C., Mishmar, D., Yi, C., Kreuziger, J., Baldi, P. and Wallace, D.C., *An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny*. *Nucleic Acids Res*, 2007. **35**(Database issue): p. D823-8.
10. Neupert, W. and Herrmann, J.M., *Translocation of Proteins into Mitochondria*. *Annu Rev Biochem*, 2007.
11. Poulton, J. and Marchington, D.R., *Segregation of mitochondrial DNA (mtDNA) in human oocytes and in animal models of mtDNA disease: clinical implications*. *Reproduction*, 2002. **123**(6): p. 751-5.
12. Chen, X.J. and Butow, R.A., *The organization and inheritance of the mitochondrial genome*. *Nat Rev Genet*, 2005. **6**(11): p. 815-25.
13. Wang, Y. and Bogenhagen, D.F., *Human mitochondrial DNA nucleoids are linked to protein folding machinery and metabolic enzymes at the mitochondrial inner membrane*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(35): p. 25791-802.
14. Loeb, L.A., Wallace, D.C. and Martin, G.M., *The mitochondrial theory of aging and its relationship to reactive oxygen species damage and somatic mtDNA mutations*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(52): p. 18769-70.
15. Hanes, J.W., Thal, D.M. and Johnson, K.A., *Incorporation and replication of 8-oxo-deoxyguanosine by the human mitochondrial DNA polymerase*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(47): p. 36241-8.
16. DiMauro, S. and Schon, E.A., *Mitochondrial DNA mutations in human disease*. *Am J Med Genet*, 2001. **106**(1): p. 18-26.
17. Nishimura, Y., Yoshinari, T., Naruse, K., Yamada, T., Sumi, K., Mitani, H., Higashiyama, T. and Kuroiwa, T., *Active digestion of sperm mitochondrial DNA in single living sperm revealed by optical tweezers*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(5): p. 1382-7.
18. Cummins, J.M., *Fertilization and elimination of the paternal mitochondrial genome*. *Hum Reprod*, 2000. **15 Suppl 2**: p. 92-101.
19. Schwartz, M. and Vissing, J., *Paternal inheritance of mitochondrial DNA*. *N Engl J Med*, 2002. **347**(8): p. 576-80.
20. Johns, D.R., *Paternal transmission of mitochondrial DNA is (fortunately) rare*. *Ann Neurol*, 2003. **54**(4): p. 422-4.
21. Taylor, R.W., McDonnell, M.T., Blakely, E.L., Chinnery, P.F., Taylor, G.A., Howell, N., Zeviani, M., Briem, E., Carrara, F. and Turnbull, D.M., *Genotypes from patients indicate no paternal mitochondrial DNA contribution*. *Ann Neurol*, 2003. **54**(4): p. 521-4.

22. Jacobs, L.J., de Wert, G., Geraedts, J.P., de Coo, I.F. and Smeets, H.J., *The transmission of OXPHOS disease and methods to prevent this*. Hum Reprod Update, 2006. **12**(2): p. 119-36.
23. Swerdlow, R.H., *Mitochondria in cybrids containing mtDNA from persons with mitochondriopathies*. J Neurosci Res, 2007.
24. King, M.P. and Attardi, G., *Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation*. Science, 1989. **246**(4929): p. 500-3.
25. Bodnar, A.G., Cooper, J.M., Holt, I.J., Leonard, J.V. and Schapira, A.H., *Nuclear complementation restores mtDNA levels in cultured cells from a patient with mtDNA depletion*. Am J Hum Genet, 1993. **53**(3): p. 663-9.
26. Gilkerson, R.W., Margineantu, D.H., Capaldi, R.A. and Selker, J.M., *Mitochondrial DNA depletion causes morphological changes in the mitochondrial reticulum of cultured human cells*. FEBS Lett, 2000. **474**(1): p. 1-4.
27. Appleby, R.D., Porteous, W.K., Hughes, G., James, A.M., Shannon, D., Wei, Y.H. and Murphy, M.P., *Quantitation and origin of the mitochondrial membrane potential in human cells lacking mitochondrial DNA*. Eur J Biochem, 1999. **262**(1): p. 108-16.
28. Garcia, J.J., Ogilvie, I., Robinson, B.H. and Capaldi, R.A., *Structure, functioning, and assembly of the ATP synthase in cells from patients with the T8993G mitochondrial DNA mutation. Comparison with the enzyme in Rho(0) cells completely lacking mtdna*. J Biol Chem, 2000. **275**(15): p. 11075-81.
29. Zeviani, M., Spinazzola, A. and Carelli, V., *Nuclear genes in mitochondrial disorders*. Curr Opin Genet Dev, 2003. **13**(3): p. 262-70.
30. Weber, J. and Senior, A.E., *ATP synthesis driven by proton transport in F1F0-ATP synthase*. FEBS Lett, 2003. **545**(1): p. 61-70.
31. Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M. and Kinosita, K., Jr., *Direct observation of the rotation of F1-ATPase*. Nature, 1997. **386**(6622): p. 299-302.
32. Kaim, G., Prummer, M., Sick, B., Zumofen, G., Renn, A., Wild, U.P. and Dimroth, P., *Coupled rotation within single F0F1 enzyme complexes during ATP synthesis or hydrolysis*. FEBS Lett, 2002. **525**(1-3): p. 156-63.
33. Boyer, P.D., *The ATP synthase--a splendid molecular machine*. Annu Rev Biochem, 1997. **66**: p. 717-49.
34. Walker, J.E., Saraste, M. and Gay, N.J., *The unc operon. Nucleotide sequence, regulation and structure of ATP-synthase*. Biochim Biophys Acta, 1984. **768**(2): p. 164-200.
35. Abrahams, J.P., Leslie, A.G., Lutter, R. and Walker, J.E., *Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria*. Nature, 1994. **370**(6491): p. 621-8.
36. Fillingame, R.H., Angevine, C.M. and Dmitriev, O.Y., *Mechanics of coupling proton movements to c-ring rotation in ATP synthase*. FEBS Lett, 2003. **555**(1): p. 29-34.
37. Deckers-Hebestreit, G., Greie, J., Stalz, W. and Altendorf, K., *The ATP synthase of Escherichia coli: structure and function of F(0) subunits*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1458**(2-3): p. 364-73.
38. Wilkens, S., Zhou, J., Nakayama, R., Dunn, S.D. and Capaldi, R.A., *Localization of the delta subunit in the Escherichia coli F(1)F(0)-ATP synthase by immuno electron microscopy: the delta subunit binds on top of the F(1)*. J Mol Biol, 2000. **295**(3): p. 387-91.
39. Boyer, P.D., *Energy transduction and proton translocation by adenosine triphosphatases*. FEBS Lett, 1975. **50**(2): p. 91-4.
40. Pullman, M.E., Penefsky, H. and Racker, E., *A soluble protein fraction required for coupling phosphorylation to oxidation in submitochondrial fragments of beef heart mitochondria*. Arch Biochem Biophys, 1958. **76**(1): p. 227-30.
41. Walker, J.E., Runswick, M.J. and Saraste, M., *Subunit equivalence in Escherichia coli and bovine heart mitochondrial F1F0 ATPases*. FEBS Lett, 1982. **146**(2): p. 393-6.
42. Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R.A. and Schagger, H., *Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits*. Embo J, 1998. **17**(24): p. 7170-8.
43. Jackson, P.J. and Harris, D.A., *Binding of mitochondrial ATPase from ox heart to its naturally occurring inhibitor protein: localization by antibody binding*. Biosci Rep, 1983. **3**(10): p. 921-6.
44. Vazquez-Contreras, E., de Gomez-Puyou, M.T. and Dreyfus, G., *A Column Centrifugation Method for the Reconstitution in Liposomes of the Mitochondrial F0F1 ATP Synthase/ATPase*. Protein Expr Purif, 1996. **7**(2): p. 155-9.
45. Fornells, L.A., Guimaraes-Motta, H., Nehme, J.S., Martins, O.B. and Silva, J.L., *Pressure effects on the interaction between natural inhibitor protein and mitochondrial F1-ATPase*. Arch Biochem Biophys, 1998. **349**(2): p. 304-12.

46. de Gomez-Puyou, M.T., Dominguez-Ramirez, L., Perez-Hernandez, G. and Gomez-Puyou, A., *Effect of denaturants on multisite and unisite ATP hydrolysis by bovine heart submitochondrial particles with and without inhibitor protein*. Arch Biochem Biophys, 2005. **439**(1): p. 129-37.
47. Belogradov, G.I., Tomich, J.M. and Hatefi, Y., *Membrane topography and near-neighbor relationships of the mitochondrial ATP synthase subunits e, f, and g*. J Biol Chem, 1996. **271**(34): p. 20340-5.
48. Fronzes, R., Weimann, T., Vaillier, J., Velours, J. and Brethes, D., *The peripheral stalk participates in the yeast ATP synthase dimerization independently of e and g subunits*. Biochemistry, 2006. **45**(21): p. 6715-23.
49. Dienhart, M., Pfeiffer, K., Schagger, H. and Stuart, R.A., *Formation of the yeast F1F0-ATP synthase dimeric complex does not require the ATPase inhibitor protein, Inh1*. J Biol Chem, 2002. **277**(42): p. 39289-95.
50. Arselin, G., Vaillier, J., Salin, B., Schaeffer, J., Giraud, M.F., Dautant, A., Brethes, D. and Velours, J., *The modulation in subunits e and g amounts of yeast ATP synthase modifies mitochondrial cristae morphology*. J Biol Chem, 2004. **279**(39): p. 40392-9.
51. Vazquez-Memije, M.E. and García, J.J., *Human ATPase 6 mutations: Molecular mechanisms of pathology.*, in *Recent research developments in human mitochondrial myopathies.*, J.J. García., Editor. 2002, Research Signpost: Trivandrum. p. 151-171.
52. Minauro-Sanmiguel, F., Wilkens, S. and Garcia, J.J., *Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: novel F0 bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(35): p. 12356-8.
53. Vigers, G.A. and Ziegler, F.D., *Azide inhibition of mitochondrial ATPase*. Biochem Biophys Res Commun, 1968. **30**(1): p. 83-8.
54. Bowler, M.W., Montgomery, M.G., Leslie, A.G. and Walker, J.E., *How azide inhibits ATP hydrolysis by the F-ATPases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(23): p. 8646-9.
55. Gledhill, J.R. and Walker, J.E., *Inhibitors of the catalytic domain of mitochondrial ATP synthase*. Biochem Soc Trans, 2006. **34**(Pt 5): p. 989-92.
56. Galante, Y.M., Wong, S.Y. and Hatefi, Y., *Independent inhibitions of mitochondrial complex V by the adenosinetriphosphatase inhibitor protein and active-site modifiers*. Biochemistry, 1982. **21**(4): p. 680-7.
57. Pougeois, R., Satre, M. and Vignais, P.V., *Reactivity of mitochondrial F1-ATPase to dicyclohexylcarbodiimide. Inactivation and binding studies*. Biochemistry, 1979. **18**(8): p. 1408-13.
58. Lardy, H., Reed, P. and Lin, C.H., *Antibiotic inhibitors of mitochondrial ATP synthesis*. Fed Proc, 1975. **34**(8): p. 1707-10.
59. Glaser, E., Norling, B., Kopecky, J. and Ernster, L., *Comparison of the effects of oligomycin and dicyclohexylcarbodiimide on mitochondrial ATPase and related reactions*. Eur J Biochem, 1982. **121**(3): p. 525-31.
60. Valiyaveetil, F., Hermolin, J. and Fillingame, R.H., *pH dependent inactivation of solubilized F1F0 ATP synthase by dicyclohexylcarbodiimide: pK(a) of detergent unmasked aspartyl-61 in Escherichia coli subunit c*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1553**(3): p. 296-301.
61. Perlín, D.S., Latchney, L.R. and Senior, A.E., *Inhibition of Escherichia coli H+-ATPase by venturicidin, oligomycin and ossamycin*. Biochim Biophys Acta, 1985. **807**(3): p. 238-44.
62. Schagger, H. and Pfeiffer, K., *Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria*. Embo J, 2000. **19**(8): p. 1777-83.
63. Dudkina, N.V., Sunderhaus, S., Braun, H.P. and Boekema, E.J., *Characterization of dimeric ATP synthase and cristae membrane ultrastructure from Saccharomyces and Polytomella mitochondria*. FEBS Lett, 2006. **580**(14): p. 3427-32.
64. Schagger, H., *Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1555**(1-3): p. 154-9.
65. Krause, F., Reifschneider, N.H., Goto, S. and Dencher, N.A., *Active oligomeric ATP synthases in mammalian mitochondria*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **329**(2): p. 583-90.
66. Spannagel, C., Vaillier, J., Arselin, G., Graves, P.V., Grandier-Vazeille, X. and Velours, J., *Evidence of a subunit 4 (subunit b) dimer in favor of the proximity of ATP synthase complexes in yeast inner mitochondrial membrane*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1414**(1-2): p. 260-4.
67. Cabezon, E., Runswick, M.J., Leslie, A.G. and Walker, J.E., *The structure of bovine IF(1), the regulatory subunit of mitochondrial F-ATPase*. Embo J, 2001. **20**(24): p. 6990-6.
68. Cabezon, E., Arechaga, I., Jonathan, P., Butler, G. and Walker, J.E., *Dimerization of bovine F1-ATPase by binding the inhibitor protein, IF1*. J Biol Chem, 2000. **275**(37): p. 28353-5.
69. Dominguez-Ramirez, L., Mendoza-Hernandez, G., Carabez-Trejo, A., Gomez-Puyou, A. and Tuena de Gomez-Puyou, M., *Equilibrium between monomeric and dimeric mitochondrial F1-inhibitor protein complexes*. FEBS Lett, 2001. **507**(2): p. 191-4.

70. Cabezon, E., Butler, P.J., Runswick, M.J., Carbajo, R.J. and Walker, J.E., *Homologous and heterologous inhibitory effects of ATPase inhibitor proteins on F-ATPases*. J Biol Chem, 2002. **277**(44): p. 41334-41.
71. Dominguez-Ramirez, L., Gomez-Puyou, A. and de Gomez-Puyou, M.T., *A hinge of the endogeneous ATP synthase inhibitor protein: the link between inhibitory and anchoring domains*. Proteins, 2006. **65**(4): p. 999-1007.
72. Garcia, J.J., Morales-Rios, E., Cortes-Hernandez, P. and Rodriguez-Zavala, J.S., *The inhibitor protein (IF1) promotes dimerization of the mitochondrial F1FO-ATP synthase*. Biochemistry, 2006. **45**(42): p. 12695-703.
73. Allen, R.D., Schroeder, C.C. and Fok, A.K., *An investigation of mitochondrial inner membranes by rapid-freeze deep-etch techniques*. J Cell Biol, 1989. **108**(6): p. 2233-40.
74. Buzhynskyy, N., Sens, P., Prima, V., Sturgis, J.N. and Scheuring, S., *Rows of ATP synthase dimers in native mitochondrial inner membranes*. Biophys J, 2007.
75. Gavin, P.D., Prescott, M. and Devenish, R.J., *F1FO-ATP synthase complex interactions in vivo can occur in the absence of the dimer specific subunit e*. J Bioenerg Biomembr, 2005. **37**(2): p. 55-66.
76. Paumard, P., Vaillier, J., Coulary, B., Schaeffer, J., Soubannier, V., Mueller, D.M., Brethes, D., di Rago, J.P. and Velours, J., *The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology*. Embo J, 2002. **21**(3): p. 221-30.
77. Gavin, P.D., Prescott, M., Luff, S.E. and Devenish, R.J., *Cross-linking ATP synthase complexes in vivo eliminates mitochondrial cristae*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 11): p. 2333-43.
78. Allen, R.D., *Membrane tubulation and proton pumps*. Protoplasma, 1995. **189**(1-2): p. 1-8.
79. Bisetto, E., Di Pancrazio, F., Simula, M.P., Mavelli, I. and Lippe, G., *Mammalian ATPsynthase monomer versus dimer profiled by blue native PAGE and activity stain*. Electrophoresis, 2007. **28**(18): p. 3178-85.
80. Gibbons, C., Montgomery, M.G., Leslie, A.G. and Walker, J.E., *The structure of the central stalk in bovine F(1)-ATPase at 2.4 A resolution*. Nat Struct Biol, 2000. **7**(11): p. 1055-61.
81. Cabezon, E., Montgomery, M.G., Leslie, A.G. and Walker, J.E., *The structure of bovine F1-ATPase in complex with its regulatory protein IF1*. Nat Struct Biol, 2003. **10**(9): p. 744-50.
82. Bowler, M.W., Montgomery, M.G., Leslie, A.G. and Walker, J.E., *Ground State Structure of F1-ATPase from Bovine Heart Mitochondria at 1.9 A Resolution*. J Biol Chem, 2007. **282**(19): p. 14238-42.
83. Kabaleeswaran, V., Puri, N., Walker, J.E., Leslie, A.G. and Mueller, D.M., *Novel features of the rotary catalytic mechanism revealed in the structure of yeast F1 ATPase*. Embo J, 2006. **25**(22): p. 5433-42.
84. Hausrath, A.C., Gruber, G., Matthews, B.W. and Capaldi, R.A., *Structural features of the gamma subunit of the Escherichia coli F(1) ATPase revealed by a 4.4-A resolution map obtained by x-ray crystallography*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(24): p. 13697-702.
85. Rodgers, A.J. and Wilce, M.C., *Structure of the gamma-epsilon complex of ATP synthase*. Nat Struct Biol, 2000. **7**(11): p. 1051-4.
86. Groth, G. and Pohl, E., *The structure of the chloroplast F1-ATPase at 3.2 A resolution*. J Biol Chem, 2001. **276**(2): p. 1345-52.
87. Carbajo, R.J., Kellas, F.A., Runswick, M.J., Montgomery, M.G., Walker, J.E. and Neuhaus, D., *Structure of the F1-binding domain of the stator of bovine F1Fo-ATPase and how it binds an alpha-subunit*. J Mol Biol, 2005. **351**(4): p. 824-38.
88. Dickson, V.K., Silvester, J.A., Fearnley, I.M., Leslie, A.G. and Walker, J.E., *On the structure of the stator of the mitochondrial ATP synthase*. Embo J, 2006. **25**(12): p. 2911-8.
89. Singh, S., Turina, P., Bustamante, C.J., Keller, D.J. and Capaldi, R., *Topographical structure of membrane-bound Escherichia coli F1FO ATP synthase in aqueous buffer*. FEBS Lett, 1996. **397**(1): p. 30-4.
90. Seelert, H., Poetsch, A., Dencher, N.A., Engel, A., Stahlberg, H. and Muller, D.J., *Structural biology. Proton-powered turbine of a plant motor*. Nature, 2000. **405**(6785): p. 418-9.
91. Stock, D., Leslie, A.G. and Walker, J.E., *Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase*. Science, 1999. **286**(5445): p. 1700-5.
92. Meier, T., Polzer, P., Diederichs, K., Welte, W. and Dimroth, P., *Structure of the rotor ring of F-Type Na+-ATPase from Ilyobacter tartaricus*. Science, 2005. **308**(5722): p. 659-62.
93. Girvin, M.E., Rastogi, V.K., Abildgaard, F., Markley, J.L. and Fillingame, R.H., *Solution structure of the transmembrane H+-transporting subunit c of the F1FO ATP synthase*. Biochemistry, 1998. **37**(25): p. 8817-24.
94. Rastogi, V.K. and Girvin, M.E., *Structural changes linked to proton translocation by subunit c of the ATP synthase*. Nature, 1999. **402**(6759): p. 263-8.

95. Jones, P.C., Jiang, W. and Fillingame, R.H., *Arrangement of the multicopy H⁺-translocating subunit c in the membrane sector of the Escherichia coli F₁F₀ ATP synthase*. J Biol Chem, 1998. **273**(27): p. 17178-85.
96. Ferguson, S.J., *ATP synthase: what dictates the size of a ring?* Curr Biol, 2000. **10**(21): p. R804-8.
97. Foster, D.L. and Fillingame, R.H., *Stoichiometry of subunits in the H⁺-ATPase complex of Escherichia coli*. J Biol Chem, 1982. **257**(4): p. 2009-15.
98. Hinkle, P.C., *P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1706**(1-2): p. 1-11.
99. Jiang, W., Hermolin, J. and Fillingame, R.H., *The preferred stoichiometry of c subunits in the rotary motor sector of Escherichia coli ATP synthase is 10*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(9): p. 4966-71.
100. Mitome, N., Suzuki, T., Hayashi, S. and Yoshida, M., *Thermophilic ATP synthase has a decamer c-ring: indication of noninteger 10:3 H⁺/ATP ratio and permissive elastic coupling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(33): p. 12159-64.
101. Panke, O., Gumbiowski, K., Junge, W. and Engelbrecht, S., *F-ATPase: specific observation of the rotating c subunit oligomer of EF(o)EF(1)*. FEBS Lett, 2000. **472**(1): p. 34-8.
102. Valiyaveetil, F.I. and Fillingame, R.H., *Transmembrane topography of subunit a in the Escherichia coli F₁F₀ ATP synthase*. J Biol Chem, 1998. **273**(26): p. 16241-7.
103. Vik, S.B., Long, J.C., Wada, T. and Zhang, D., *A model for the structure of subunit a of the Escherichia coli ATP synthase and its role in proton translocation*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1458**(2-3): p. 457-66.
104. Aksimentiev, A., Balabin, I.A., Fillingame, R.H. and Schulten, K., *Insights into the molecular mechanism of rotation in the Fo sector of ATP synthase*. Biophys J, 2004. **86**(3): p. 1332-44.
105. Elston, T., Wang, H. and Oster, G., *Energy transduction in ATP synthase*. Nature, 1998. **391**(6666): p. 510-3.
106. Jiang, W. and Fillingame, R.H., *Interacting helical faces of subunits a and c in the F₁F₀ ATP synthase of Escherichia coli defined by disulfide cross-linking*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(12): p. 6607-12.
107. Lightowlers, R.N., Howitt, S.M., Hatch, L., Gibson, F. and Cox, G.B., *The proton pore in the Escherichia coli F₀F₁-ATPase: a requirement for arginine at position 210 of the a-subunit*. Biochim Biophys Acta, 1987. **894**(3): p. 399-406.
108. Cain, B.D. and Simoni, R.D., *Proton translocation by the F₁F₀ATPase of Escherichia coli. Mutagenic analysis of the a subunit*. J Biol Chem, 1989. **264**(6): p. 3292-300.
109. García, J., Bravo, C., Minauro-Sanmiguel F., *Mitochondrial F₁F₀-I ATP synthase: structure, function, assembly and topography model for human subunit 6.*, in *Recent research developments in human mitochondrial myopathies.*, J.J. García., Editor. 2002, Research Signpost: Kerala, India. p. 127-150.
110. Assadi-Porter, F.M. and Fillingame, R.H., *Proton-translocating carboxyl of subunit c of F₁F₀ H(+)-ATP synthase: the unique environment suggested by the pK_a determined by 1H NMR*. Biochemistry, 1995. **34**(49): p. 16186-93.
111. Angevine, C.M., Herold, K.A., Vincent, O.D. and Fillingame, R.H., *Aqueous access pathways in ATP synthase subunit a: Reactivity of cysteine substituted into transmembrane helices 1, 3 and 5*. J Biol Chem, 2007.
112. Gonzalez-Halphen, D., Funes, S., Perez-Martinez, X., Reyes-Prieto, A., Claros, M.G., Davidson, E. and King, M.P., *Genetic correction of mitochondrial diseases: using the natural migration of mitochondrial genes to the nucleus in chlorophyte algae as a model system*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1019**: p. 232-9.
113. Schon, E.A., Santra, S., Pallotti, F. and Girvin, M.E., *Pathogenesis of primary defects in mitochondrial ATP synthesis*. Semin Cell Dev Biol, 2001. **12**(6): p. 441-8.
114. Ackerman, S.H., *Atp11p and Atp12p are chaperones for F(1)-ATPase biogenesis in mitochondria*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1555**(1-3): p. 101-5.
115. Marzuki, S., Watkins, L.C. and Choo, W.M., *Mitochondrial H⁺-ATPase in mutants of Saccharomyces cerevisiae with defective subunit 8 of the enzyme complex*. Biochim Biophys Acta, 1989. **975**(2): p. 222-30.
116. Nijtmans, L.G., Klement, P., Houstek, J. and van den Bogert, C., *Assembly of mitochondrial ATP synthase in cultured human cells: implications for mitochondrial diseases*. Biochim Biophys Acta, 1995. **1272**(3): p. 190-8.
117. Tzagoloff, A., Barrientos, A., Neupert, W. and Herrmann, J.M., *Atp10p assists assembly of Atp6p into the F₀ unit of the yeast mitochondrial ATPase*. J Biol Chem, 2004. **279**(19): p. 19775-80.

118. Ott, M., Prestele, M., Bauerschmitt, H., Funes, S., Bonnefoy, N. and Herrmann, J.M., *Mba1, a membrane-associated ribosome receptor in mitochondria*. *Embo J*, 2006. **25**(8): p. 1603-10.
119. Zeng, X., Neupert, W. and Tzagoloff, A., *The metalloprotease encoded by ATP23 has a dual function in processing and assembly of subunit 6 of mitochondrial ATPase*. *Mol Biol Cell*, 2007. **18**(2): p. 617-26.
120. Amutha, B., Gordon, D.M., Gu, Y. and Pain, D., *A novel role of Mgm1p, a dynamin-related GTPase, in ATP synthase assembly and cristae formation/maintenance*. *Biochem J*, 2004. **381**(Pt 1): p. 19-23.
121. Houstek, J., Pickova, A., Vojtiskova, A., Mracek, T., Pecina, P. and Jesina, P., *Mitochondrial diseases and genetic defects of ATP synthase*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1757**(9-10): p. 1400-5.
122. Sperl, W., Jesina, P., Zeman, J., Mayr, J.A., Demeirleir, L., VanCoster, R., Pickova, A., Hansikova, H., Houst'kova, H., Krejcik, Z., Koch, J., Smet, J., Muss, W., Holme, E. and Houstek, J., *Deficiency of mitochondrial ATP synthase of nuclear genetic origin*. *Neuromuscul Disord*, 2006. **16**(12): p. 821-9.
123. Carelli, V., Baracca, A., Barogi, S., Pallotti, F., Valentino, M.L., Montagna, P., Zeviani, M., Pini, A., Lenaz, G., Baruzzi, A. and Solaini, G., *Biochemical-clinical correlation in patients with different loads of the mitochondrial DNA T8993G mutation*. *Arch Neurol*, 2002. **59**(2): p. 264-70.
124. Holt, I.J., Harding, A.E., Petty, R.K. and Morgan-Hughes, J.A., *A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy*. *Am J Hum Genet*, 1990. **46**(3): p. 428-33.
125. Santorelli, F. and Tessa, A. *Orphanet* http://www.orpha.net/static/GB/narp_syndrome.html. 2007 [cited].
126. Vazquez-Memije, M.E., Shanske, S., Santorelli, F.M., Kranz-Eble, P., Davidson, E., DeVivo, D.C. and DiMauro, S., *Comparative biochemical studies in fibroblasts from patients with different forms of Leigh syndrome*. *J Inherit Metab Dis*, 1996. **19**(1): p. 43-50.
127. Lombes, A. *Orphanet* http://www.orpha.net/static/GB/leigh_disease.html. 2006 [cited].
128. de Vries, D.D., van Engelen, B.G., Gabreels, F.J., Ruitenbeek, W. and van Oost, B.A., *A second missense mutation in the mitochondrial ATPase 6 gene in Leigh's syndrome*. *Ann Neurol*, 1993. **34**(3): p. 410-2.
129. Carozzo, R., Tessa, A., Vazquez-Memije, M.E., Piemonte, F., Patrono, C., Malandrini, A., Dionisi-Vici, C., Vilarinho, L., Villanova, M., Schagger, H., Federico, A., Bertini, E. and Santorelli, F.M., *The T9176G mtDNA mutation severely affects ATP production and results in Leigh syndrome*. *Neurology*, 2001. **56**(5): p. 687-90.
130. Thyagarajan, D., Shanske, S., Vazquez-Memije, M., De Vivo, D. and DiMauro, S., *A novel mitochondrial ATPase 6 point mutation in familial bilateral striatal necrosis*. *Ann Neurol*, 1995. **38**(3): p. 468-72.
131. Ogilvie, I. and Capaldi, R.A., *Mutation of the mitochondrially encoded ATPase 6 gene modeled in the ATP synthase of Escherichia coli*. *FEBS Lett*, 1999. **453**(1-2): p. 179-82.
132. Moslemi, A.R., Darin, N., Tulinius, M., Oldfors, A. and Holme, E., *Two new mutations in the MTATP6 gene associated with Leigh syndrome*. *Neuropediatrics*, 2005. **36**(5): p. 314-8.
133. Johansson A, A.H., von Dobeln U, Hagenfeldt L, P-92. *A new mutation in the mitochondrial ATPase 6 gene in siblings with mitochondrial encephalomyopathy*. *Mitochondrion*, 2001. **1**(Supplement 1): p. S55.
134. Holyoake, A.J., Sin, I.L., Benny, P.S. and Sin, F.Y., *Association of a novel human mtDNA ATPase6 mutation with immature sperm cells*. *Andrologia*, 1999. **31**(6): p. 339-45.
135. De Meirleir, L., Seneca, S., Lissens, W., Schoentjes, E. and Desprechins, B., *Bilateral striatal necrosis with a novel point mutation in the mitochondrial ATPase 6 gene*. *Pediatr Neurol*, 1995. **13**(3): p. 242-6.
136. Lamminen, T., Majander, A., Juvonen, V., Wikstrom, M., Aula, P., Nikoskelainen, E. and Savontous, M.L., *A mitochondrial mutation at nt 9101 in the ATP synthase 6 gene associated with deficient oxidative phosphorylation in a family with Leber hereditary optic neuroretinopathy*. *Am J Hum Genet*, 1995. **56**(5): p. 1238-40.
137. Jesina, P., Tesarova, M., Fornuskova, D., Vojtiskova, A., Pecina, P., Kaplanova, V., Hansikova, H., Zeman, J. and Houstek, J., *Diminished synthesis of subunit a (ATP6) and altered function of ATP synthase and cytochrome c oxidase due to the mtDNA 2 bp microdeletion of TA at positions 9205 and 9206*. *Biochem J*, 2004. **383**(Pt. 3): p. 561-71.
138. Chrzanowska-Lightowlers, Z.M., Temperley, R.J., Smith, P.M., Seneca, S.H. and Lightowlers, R.N., *Functional polypeptides can be synthesized from human mitochondrial transcripts lacking termination codons*. *Biochem J*, 2004. **377**(Pt 3): p. 725-31.

139. Tatuch, Y. and Robinson, B.H., *The mitochondrial DNA mutation at 8993 associated with NARP slows the rate of ATP synthesis in isolated lymphoblast mitochondria*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. **192**(1): p. 124-8.
140. Vazquez-Memije, M.E., Shanske, S., Santorelli, F.M., Kranz-Eble, P., DeVivo, D.C. and DiMauro, S., *Comparative biochemical studies of ATPases in cells from patients with the T8993G or T8993C mitochondrial DNA mutations*. J Inher Metab Dis, 1998. **21**(8): p. 829-36.
141. Manfredi, G., Gupta, N., Vazquez-Memije, M.E., Sadlock, J.E., Spinazzola, A., De Vivo, D.C. and Schon, E.A., *Oligomycin induces a decrease in the cellular content of a pathogenic mutation in the human mitochondrial ATPase 6 gene*. J Biol Chem, 1999. **274**(14): p. 9386-91.
142. Pallotti, F., Baracca, A., Hernandez-Rosa, E., Walker, W.F., Solaini, G., Lenaz, G., Melzi D'Eril, G.V., Dimauro, S., Schon, E.A. and Davidson, M.M., *Biochemical analysis of respiratory function in cybrid cell lines harbouring mitochondrial DNA mutations*. Biochem J, 2004. **384**(Pt 2): p. 287-93.
143. Mattiazzi, M., Vijayvergiya, C., Gajewski, C.D., DeVivo, D.C., Lenaz, G., Wiedmann, M. and Manfredi, G., *The mtDNA T8993G (NARP) mutation results in an impairment of oxidative phosphorylation that can be improved by antioxidants*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(8): p. 869-79.
144. Sgarbi, G., Baracca, A., Lenaz, G., Valentino, L.M., Carelli, V. and Solaini, G., *Inefficient coupling between proton transport and ATP synthesis may be the pathogenic mechanism for NARP/Leigh syndromes resulting from the 8993T>G mutation in mtDNA*. Biochem J, 2006.
145. Castagna, A.E., Addis, J., McInnes, R.R., Clarke, J.T., Ashby, P., Blaser, S. and Robinson, B.H., *Late onset Leigh syndrome and ataxia due to a T to C mutation at bp 9,185 of mitochondrial DNA*. Am J Med Genet A, 2007. **143**(8): p. 808-16.
146. Majander, A., Lamminen, T., Juvonen, V., Aula, P., Nikoskelainen, E., Savontaus, M.L. and Wikstrom, M., *Mutations in subunit 6 of the F1FO-ATP synthase cause two entirely different diseases*. FEBS Lett, 1997. **412**(2): p. 351-4.
147. Hartzog, P.E. and Cain, B.D., *The aleu207-->arg mutation in F1FO-ATP synthase from Escherichia coli. A model for human mitochondrial disease*. J Biol Chem, 1993. **268**(17): p. 12250-2.
148. Hartzog, P.E., Gardner, J.L. and Cain, B.D., *Modeling the Leigh syndrome nt8993 T-->C mutation in Escherichia coli F1FO ATP synthase*. Int J Biochem Cell Biol, 1999. **31**(7): p. 769-76.
149. Carrozzo, R., Murray, J., Santorelli, F.M. and Capaldi, R.A., *The T9176G mutation of human mtDNA gives a fully assembled but inactive ATP synthase when modeled in Escherichia coli*. FEBS Lett, 2000. **486**(3): p. 297-9.
150. White, S.L., Shanske, S., McGill, J.J., Mountain, H., Geraghty, M.T., DiMauro, S., Dahl, H.H. and Thorburn, D.R., *Mitochondrial DNA mutations at nucleotide 8993 show a lack of tissue- or age-related variation*. J Inher Metab Dis, 1999. **22**(8): p. 899-914.
151. Carrozzo, R., Rizza, T., Stringaro, A., Pierini, R., Mormone, E., Santorelli, F.M., Malorni, W. and Matarrese, P., *Maternally-inherited Leigh syndrome-related mutations bolster mitochondrial-mediated apoptosis*. J Neurochem, 2004. **90**(2): p. 490-501.
152. Geromel, V., Kadhom, N., Cebalos-Picot, I., Ouari, O., Polidori, A., Munnich, A., Rotig, A. and Rustin, P., *Superoxide-induced massive apoptosis in cultured skin fibroblasts harboring the neurogenic ataxia retinitis pigmentosa (NARP) mutation in the ATPase-6 gene of the mitochondrial DNA*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(11): p. 1221-8.
153. Trounce, I., Neill, S. and Wallace, D.C., *Cytoplasmic transfer of the mtDNA nt 8993 T-->G (ATP6) point mutation associated with Leigh syndrome into mtDNA-less cells demonstrates cosegregation with a decrease in state III respiration and ADP/O ratio*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(18): p. 8334-8.
154. Baracca, A., Barogi, S., Carelli, V., Lenaz, G. and Solaini, G., *Catalytic activities of mitochondrial ATP synthase in patients with mitochondrial DNA T8993G mutation in the ATPase 6 gene encoding subunit a*. J Biol Chem, 2000. **275**(6): p. 4177-82.
155. Carrozzo, R., Murray, J., Capuano, O., Tessa, A., Chichierchia, G., Neglia, M.R., Capaldi, R.A. and Santorelli, F.M., *A novel mtDNA mutation in the ATPase6 gene studied by E. coli modeling*. Neurol Sci, 2000. **21**(5 Suppl): p. S983-4.
156. Cordes, F.S., Bright, J.N. and Sansom, M.S., *Proline-induced distortions of transmembrane helices*. J Mol Biol, 2002. **323**(5): p. 951-60.
157. Hessa, T., Kim, H., Bihlmaier, K., Lundin, C., Boekel, J., Andersson, H., Nilsson, I., White, S.H. and von Heijne, G., *Recognition of transmembrane helices by the endoplasmic reticulum translocon*. Nature, 2005. **433**(7024): p. 377-81.
158. Houstek, J., Klement, P., Hermanska, J., Houstkova, H., Hansikova, H., Van den Bogert, C. and Zeman, J., *Altered properties of mitochondrial ATP-synthase in patients with a T-->G mutation*

- in the ATPase 6 (subunit a) gene at position 8993 of mtDNA.* Biochim Biophys Acta, 1995. **1271**(2-3): p. 349-57.
159. Nijtmans, L.G., Henderson, N.S., Attardi, G. and Holt, I.J., *Impaired ATP synthase assembly associated with a mutation in the human ATP synthase subunit 6 gene.* J Biol Chem, 2001. **276**(9): p. 6755-62.
160. Carozzo, R., Wittig, I., Santorelli, F.M., Bertini, E., Hofmann, S., Brandt, U. and Schagger, H., *Subcomplexes of human ATP synthase mark mitochondrial biosynthesis disorders.* Ann Neurol, 2006. **59**(2): p. 265-275.
161. Steffann, J., Gigarel, N., Corcos, J., Bonniere Darcy, M., Encha-Razavi, F., Sinico, M., Prevot, S., Dumez, Y., Yamgnane, A., Frydman, R., Munnich, A. and Bonnefont, J.P., *Stability of the m.8893T>G mtDNA mutation load during human embryofetal development has implications for the feasibility of prenatal diagnosis in NARP syndrome.* J Med Genet, 2007.
162. Steffann, J., Frydman, N., Gigarel, N., Burlet, P., Ray, P.F., Fanchin, R., Feyereisen, E., Kerbrat, V., Tachdjian, G., Bonnefont, J.P., Frydman, R. and Munnich, A., *Analysis of mtDNA variant segregation during early human embryonic development: a tool for successful NARP preimplantation diagnosis.* J Med Genet, 2005.
163. Zullo, S.J., Parks, W.T., Chloupkova, M., Wei, B., Weiner, H., Fenton, W.A., Eisenstadt, J.M. and Merrill, C.R., *Stable transformation of CHO Cells and human NARP cybrids confers oligomycin resistance (oli(r)) following transfer of a mitochondrial DNA-encoded oli(r) ATPase6 gene to the nuclear genome: a model system for mtDNA gene therapy.* Rejuvenation Res, 2005. **8**(1): p. 18-28.
164. Srivastava, S. and Moraes, C.T., *Manipulating mitochondrial DNA heteroplasmy by a mitochondrially targeted restriction endonuclease.* Hum Mol Genet, 2001. **10**(26): p. 3093-9.
165. Bokori-Brown, M. and Holt, I.J., *Expression of algal nuclear ATP synthase subunit 6 in human cells results in protein targeting to mitochondria but no assembly into ATP synthase.* Rejuvenation Res, 2006. **9**(4): p. 455-69.
166. Ojaimi, J., Pan, J., Santra, S., Snell, W.J. and Schon, E.A., *An algal nucleus-encoded subunit of mitochondrial ATP synthase rescues a defect in the analogous human mitochondrial-encoded subunit.* Mol Biol Cell, 2002. **13**(11): p. 3836-44.
167. Manfredi, G., Fu, J., Ojaimi, J., Sadlock, J.E., Kwong, J.Q., Guy, J. and Schon, E.A., *Rescue of a deficiency in ATP synthesis by transfer of MTATP6, a mitochondrial DNA-encoded gene, to the nucleus.* Nat Genet, 2002. **30**(4): p. 394-9.
168. Aggeler, R., Coons, J., Taylor, S.W., Ghosh, S.S., Garcia, J.J., Capaldi, R.A. and Marusich, M.F., *A functionally active human F1FO ATPase can be purified by immunocapture from heart tissue and fibroblast cell lines. Subunit structure and activity studies.* J Biol Chem, 2002. **277**(37): p. 33906-12.
169. Rak, M., Tetaud, E., Duvezin-Caubet, S., Ezkurdia, N., Bietenhader, M., Rytka, J. and di Rago, J.P., *A yeast model of the neurogenic ataxia retinitis pigmentosa (NARP) T8993G mutation in the mitochondrial ATP synthase-6 gene.* J Biol Chem, 2007.
170. Tatuch, Y., Christodoulou, J., Feigenbaum, A., Clarke, J.T., Wherret, J., Smith, C., Rudd, N., Petrova-Benedict, R. and Robinson, B.H., *Heteroplasmic mtDNA mutation (T----G) at 8993 can cause Leigh disease when the percentage of abnormal mtDNA is high.* Am J Hum Genet, 1992. **50**(4): p. 852-8.
171. DeLano, W., *The PyMOL Molecular Graphics System.* 2002, DeLano Scientific: Palo Alto, CA.
172. Guex, N. and Peitsch, M.C., *SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling.* Electrophoresis, 1997. **18**(15): p. 2714-23.
173. Emsley, P. and Cowtan, K., *Coot: model-building tools for molecular graphics.* Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2004. **60**(Pt 12 Pt 1): p. 2126-32.
174. Dunbrack, R.L., Jr. and Cohen, F.E., *Bayesian statistical analysis of protein side-chain rotamer preferences.* Protein Sci, 1997. **6**(8): p. 1661-81.
175. Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C. and Ferrin, T.E., *UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis.* J Comput Chem, 2004. **25**(13): p. 1605-12.
176. Marti-Renom, M.A., Stuart, A.C., Fiser, A., Sanchez, R., Melo, F. and Sali, A., *Comparative protein structure modeling of genes and genomes.* Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2000. **29**: p. 291-325.
177. Zhang, L. and Hermans, J., *Hydrophilicity of cavities in proteins.* Proteins, 1996. **24**(4): p. 433-8.
178. Decoursey, T.E., *Voltage-gated proton channels and other proton transfer pathways.* Physiol Rev, 2003. **83**(2): p. 475-579.

179. Petrek, M., Otyepka, M., Banas, P., Kosinova, P., Koca, J. and Damborsky, J., *CAVER: a new tool to explore routes from protein clefts, pockets and cavities*. BMC Bioinformatics, 2006. **7**: p. 316.
180. Dreyfus, G., Gomez-Puyou, A. and Iuena de Gomez-Puyou, M., *Electrochemical gradient induced displacement of the natural ATPase inhibitor protein from mitochondrial ATPase as directed by antibodies against the inhibitor protein*. Biochem Biophys Res Commun, 1981. **100**(1): p. 400-6.
181. Low, H. and Vallin, I., *Succinate linked diphosphopyridine nucleotide reduction in submitochondrial particles*. Biochimica et Biophysica Acta, 1963. **69**: p. 361-374.
182. Peterson, G.L., *A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable*. Anal Biochem, 1977. **83**(2): p. 346-56.
183. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
184. Schagger, H. and von Jagow, G., *Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form*. Anal Biochem, 1991. **199**(2): p. 223-31.
185. Malik, N. and Berrie, A., *New stain fixative for proteins separated by gel isoelectric focusing based on Coomassie Brilliant Blue*. Anal Biochem, 1972. **49**(1): p. 173-6.
186. Bravo, C., Minauro-Sanmiguel, F., Morales-Rios, E., Rodriguez-Zavala, J.S. and Garcia, J.J., *Overexpression of the inhibitor protein IF(1) in AS-30D hepatoma produces a higher association with mitochondrial F(1)F(0) ATP synthase compared to normal rat liver: functional and cross-linking studies*. J Bioenerg Biomembr, 2004. **36**(3): p. 257-64.
187. Trautschold I., L.W., Schweitzer G., *UV method with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase*, in *Methods of Enzymatic Analysis*, Bergmeyer, Editor. 1995, Verlagsgesellschaft. p. 346-357.
188. James, A.M., Sheard, P.W., Wei, Y.H. and Murphy, M.P., *Decreased ATP synthesis is phenotypically expressed during increased energy demand in fibroblasts containing mitochondrial tRNA mutations*. Eur J Biochem, 1999. **259**(1-2): p. 462-9.

Apéndice 1. Las enfermedades humanas más frecuentes por mutación en el ADNmt.

Enfermedad o Síndrome	Mutación ^a	Gen afectado ^b	Manifestaciones	Observaciones
LHON Neuropatía Óptica Hereditaria de Leber	G3460A	ND1 (30%)	Ceguera bilateral con escotoma central de inicio en la juventud. Los hombres la padecen más que las mujeres (4:1). Puede acompañarse de distonía o síndromes de preexcitación cardiaca.	Las mutaciones suelen ser homoplásmicas y presentarse en todos los tejidos. El entorno y los genes nucleares afectan la gravedad de LHON
	G11778A	ND4 (50%)		
	T14484C	ND6 (10%)		
	T9101C	ATP6		
	Otras	ND2, citb, cox		
NARP o MILS	T8993G/C T9176G/C T9185C	ATP6	Debilidad neurogénica con ataxia y retinitis pigmentosa o Síndrome de Leigh heredado por vía materna	Ver texto para una descripción extensa de estas enfermedades.
Kearns-Sayre	Ablación 5 o 7.4Kb u otras	ND3,4,5,6 ATP6, citb coxIII, 5 a 7 tARNs	Oftalmoplegia externa y retinopatía pigmentaria de inicio anterior a los 20 años. Suele acompañarse de: ptosis, talla baja, hipoacusia, miopatía, encefalopatía, ataxia, falla renal, disfagia, diabetes, trastornos de la conducción cardiaca, hipoparatiroidismo o demencia.	Es el más común de los síndromes por ablación del ADNmt, y suele ser esporádico. La ablación se acumula en el tejido cardiaco de conducción.
CPEO Oftalmoplejía externa crónica y progresiva	Ablación	5 Kb u otra	Oftalmoplejía externa progresiva de inicio posterior a los 20 años. Suele incluir ptosis. Puede acompañarse además de alguno de los defectos mencionados para Kearns-Sayre	Cuando es causada por ablación, se presenta de manera esporádica.
	A3243G ^c	tARN Leu		
	T4274C	tARN Ile		
Síndrome de Pearson	Ablación	Variable	Anemia sideroblástica de la infancia, pancitopenia, mala absorción intestinal, pancreatitis, defectos en la reabsorción renal.	Causa disfunción de médula ósea, páncreas exócrino y túbulo renal
Diabetes y sordera	Ablación	Variable	Diabetes no insulino dependiente y sordera neurosensorial progresiva.	Cuando es causada por ablación, se presenta de manera esporádica.
	A3243G ^c	tARN Leu		
	C12258A	tARN Ser		
MELAS	A3243G ^c	tARN Leu	Encefalopatía con acidosis láctica y episodios que imitan infarto cerebral. Miopatía. Puede incluir convulsiones, demencia, fibras rojas rasgadas en músculo, diabetes, cardiomiopatía, sordera, retinopatía o ataxia.	MELAS son las siglas de : Encefalopatía mitocondrial con acidosis láctica e infarto cerebral (stroke)
	T3271C			
	A3251G			
MERRF	A8344G	tARN Lys	Convulsiones mioclónicas y miopatía con fibras rojas rasgadas. Puede incluir demencia, atrofia óptica, sordera, neuropatía, lipomatosis.	MERRF siglas de: Epilepsia mioclónica con fibras rojas rasgadas.
	T8356C			
Miopatía Mitochondrial	T14709C	tARN Glu	Fatiga, debilidad, hipotonía, inflamación y fibras rojas rasgadas en músculo esquelético. Acidosis Láctica. Oftalmoplejía, ptosis. Puede afectar también músculo liso o cardiaco.	Puede ocurrir también por ablación ADNmt.
	A12320G	tARN Leu		
Cardio Miopatía	A3243G ^c	tARN Leu	Generalmente es cardiomiopatía hipertrófica, que puede evolucionar a dilatada. Puede incluir acidosis láctica, miopatía, sordera, oftalmoplejía o ataxia.	Puede ocurrir también por ablaciones del ADNmt, o por otras mutaciones en tARNs
	A4269G	tARN Ile		
	A4300G	tARN Ile		
Encefalo Miopatía	G1606A	tARN Thr	Miopatía asociada a convulsiones, espasticidad, ataxia, síndromes extrapiramidales, episodios que imitan infarto cerebral, migraña o enfermedad psiquiátrica.	Puede ocurrir también por ablaciones múltiples del ADNmt.
	T10010C	tARN Gly		
Sordera	A7445G	tARN Ser	Sordera Neurosensorial no sindromática. Si se asocia a mutaciones en el rARN 16S, aumenta la sensibilidad a desarrollar sordera inducida por aminoglucósidos.	Puede ocurrir por otras mutaciones en el tARN de serina, o por la mutación A3243G ^c
	A1555G	rARN 12S		
	A827G			

Estas enfermedades se revisan en las referencias: [9][4, 16].

^a Nucleótido mutado en el ADNmt. Una sola de las mutaciones mencionadas provoca la enfermedad.

^b Los genes ND codifican subunidades del complejo I; ATP6, la subunidad 6 del complejo V; citb, la subunidad del complejo III que contiene citocromo b; cox, subunidades del complejo IV. Los números en paréntesis son el porcentaje de casos en los que la enfermedad es causada por dicha mutación.

^c La mutación A3243G en el tARN (UUR) para leucina provoca diferentes enfermedades. En el ADNmt existen dos tARNs para leucina. Todas las mutaciones que se mencionan como tARN Leu corresponden al gen tARN Leu (UUR); salvo A12320G que ocurre en el gen tARN Leu (CUN). Además existen dos tARNs para serina: la mutación A7445G ocurre en tARN Ser (UCN), mientras que la C12258A en tARN Ser (AGY)