

NO PDA

MECANISMO DE LA CONSERVACION ENERGETICA EN LA MITOCONDRIA

I. Acción de los cationes.

T E S I S

que presenta el Médico Cirujano Marietta Tuena  
de Gómez-Puyou para obtener el título de Doctor  
en Bioquímica.

U. N. A. M.

México, D.F.

1977



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>25</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>29</b>
<b>1. La mitocondria</b> .....	<b>31</b>
1.1 Sistema genético mitocondrial.....	31
1.1.1 Estructura y metabolismo del ADNmt.....	31
1.1.2 Características de la genética mitocondrial .....	33
1.2 La cadena de transporte electrónico y la fosforilación oxidativa.....	35
<b>2. Enfermedades mitocondriales</b> .....	<b>36</b>
2.1 Características clínicas.....	37
2.2 Características histológicas.....	37
2.3 Características bioquímicas .....	38
2.4 Características genéticas .....	39
2.4.1 Mutaciones del ADNmt.....	39
2.4.1.1 Mutaciones puntuales del ADNmt .....	39
2.4.1.2 Delecciones del ADNmt.....	40
2.4.3 Mutaciones en el genoma nuclear.....	41
<b>3. Biogénesis mitocondrial</b> .....	<b>41</b>
<b>4. Estrés oxidativo y biogénesis mitocondrial</b> .....	<b>42</b>
<b>5. Dinámica mitocondrial</b> .....	<b>43</b>
5.1 OPA1.....	45
<b>6. El citoesqueleto y su relación con la biogénesis mitocondrial</b> .....	<b>47</b>
6.1 Microfilamentos o filamentos de actina.....	47
6.2 Filamento intermedios .....	48
6.3 Microtúbulos o filamentos de tubulina .....	48
6.3.1 Acetilación y deacetilación de $\alpha$ -tubulina .....	49
6.3.2 Histona deacetilasa 6 (HDAC6).....	49
6.3.3 HDAC6 y Hsp27 .....	50
<b>7. Ciclo celular y biogénesis mitocondrial</b> .....	<b>50</b>
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>53</b>

<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>57</b>
<b>1. Materiales</b> .....	<b>59</b>
1.1 Muestras biológicas .....	59
1.1.1 Pacientes del estudio .....	59
1.1.1.1 Paciente 1 (m. 13200 G>A) .....	59
1.1.1.2 Paciente 2 (m. 8993 T>G) .....	60
1.2 Líneas celulares .....	60
1.3 Reactivos, soluciones y tampones .....	60
1.4 Oligonucleótidos .....	60
1.5 Anticuerpos .....	61
<b>2. Métodos</b> .....	<b>62</b>
2.1. Análisis genético del ADNmt .....	62
2.1.1 Extracción del ADN .....	62
2.1.2 Estudio y secuenciación del ADNmt .....	62
2.1.3 Detección mediante PCR y RFLP de la mutación G12300A .....	63
2.1.4 Estudio de la mutación G12300A en fibra aislada a partir de la biopsia de músculo esquelético. PCR-RFLP .....	63
2.1.5 Detección mediante PCR y RFLP de la mutación T8993G .....	64
2.1.6 Cuantificación de la depleción de ADNmt mediante RT-PCR .....	65
2.2. Cultivo de líneas celulares .....	65
2.3. Cíbridos transmitocondriales .....	66
2.3.1 Generación de cíbridos transmitocondriales.....	66
2.3.2 Enucleación de los fibroblastos de los pacientes en estudio y su fusión con células Rho <sup>0</sup> (ρ <sup>0</sup> ).....	66
2.3.3 Caracterización genética de los clones seleccionados .....	67
2.4. Estimación de la masa mitocondrial .....	67
2.5. Estudio de funcionalidad mitocondrial de las mutaciones del estudio .....	67
2.5.1 Valoración de la actividad enzimática de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial.....	67
2.5.2 Cuantificación del ATP total en las líneas celulares .....	68
2.5.3 Determinación del potencial de membrana mitocondrial mediante citometría de flujo.....	69

2.5.4 Visualización del potencial de membrana mitocondrial mediante microscopía confocal.....	69
2.6. Medida de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) .....	69
2.6.1 Visualización de ROS mediante microscopía de fluorescencia .....	70
2.6.2 Medida de ROS mediante citometría de flujo .....	70
2.7 Análisis del ciclo celular.....	71
2.7.1 Sincronización celular.....	71
2.7.2 Medida del ciclo celular .....	71
2.7.3 Determinación de la viabilidad celular y del tiempo de duplicación .....	71
2.8. Tratamiento de las células con agentes químicos .....	72
2.9. Valoración de la morfología de la red mitocondrial.....	72
2.10. Visualización de proteínas implicadas en la constitución del citoesqueleto mediante inmunofluorescencia.....	72
2.11. Inmunodetección de proteínas unidas a membrana (Western-blot) .....	73
2.11.1 Extracción de proteínas.....	73
2.11.2 Western-blot.....	73
2.12. Análisis estadístico .....	74

**RESULTADOS .....** **77**

**I. Estudios de funcionalidad mitocondrial y de estrés oxidativo en fibroblastos y en el modelo celular de cibridos transmitocondriales portadores de las mutaciones m.12300G>A y m.8993T>G.....** **79**

1.1 Estudio histológico de la biopsia muscular .....	79
1.2 Estudio genético en músculo, sangre y fibroblastos. PCR en fibra aislada .....	79
1.3 Generación de los cibridos transmitocondriales .....	81
1.3.1 Estudio genético de los clones obtenidos y cuantificación de los niveles de ADNmt81	
1.3.2 Análisis de la evolución del porcentaje de mutación de los clones heteroplásmicos y cuantificación de los niveles de ADNmt.....	82
1.4 Medida de la masa mitocondrial.....	83
1.5 Estudios de funcionalidad mitocondrial .....	83
1.5.1 Valoración enzimática de los complejos de la cadena respiratoria en músculo y en las líneas celulares en estudio .....	84

1.5.2 Medida del potencial de membrana y de los niveles de ATP total en las líneas celulares en estudio.....	85
1.6 Medida de la producción de especies reactivas de oxígeno .....	86
1.7 Medida de la masa mitocondrial, potencial de membrana y de las especies reactivas de oxígeno en fibroblastos control sometidos a estrés oxidativo.....	88
<b>II. Análisis de la red mitocondrial en los fibroblastos de los pacientes.....</b>	<b>88</b>
<b>III. Estudio de las proteínas implicadas en la fusión y fisión mitocondrial .....</b>	<b>89</b>
3.1 Determinación de las isoformas de OPA1 en cibridos portadores de la mutación m.12300A>G .....	91
3.2 Determinación de las isoformas de OPA1 en fibroblastos control sometidos a estrés oxidativo.....	92
<b>IV. Relación entre los microtúbulos y la proliferación mitocondrial .....</b>	<b>92</b>
4.1 Inmunodetección de $\alpha$ -tubulina acetilada .....	92
4.1.1 Inmunodetección de $\alpha$ -tubulina acetilada en fibroblastos .....	92
4.1.2 Inmunodetección de $\alpha$ -tubulina acetilada en cibridos portadores de la mutación m.12300A>G.....	93
4.1.3 Inmunodetección de $\alpha$ -tubulina acetilada en fibroblastos control sometidos a estrés oxidativo .....	93
4.2 Visualización de $\alpha$ -tubulina y $\alpha$ -tubulina acetilada mediante microscopía confocal .....	94
4.3 HDAC6 .....	94
4.3.1 Inmunodetección de HDAC6 en fibroblastos.....	95
4.3.2 Visualización de HDAC6 mediante microscopía confocal .....	95
4.4 Estudio de la modulación de la actividad de HDAC6 mediante activadores o inhibidores enzimáticos y su relación con el procesos de biogénesis mitocondrial .....	95
4.4.1 Determinación de la masa mitocondrial de las células tratadas .....	96
4.4.2 Inmunodetección de $\alpha$ -tubulina acetilada y de las isoformas de OPA1 en las células tratadas .....	96
4.4.3 Visualización de $\alpha$ -tubulina y $\alpha$ -tubulina acetilada mediante microscopía confocal en las células tratadas.....	97
4.4.4 Visualización de la red mitocondrial mediante microscopía confocal en las células tratadas .....	97
4.5 Relación entre HDAC6 y Hsp27 .....	98
<b>V. Relación entre el ciclo celular y la biogénesis mitocondrial .....</b>	<b>99</b>

<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>103</b>
<b>I. Estudios de funcionalidad mitocondrial y de estrés oxidativo en fibroblastos y en el modelo celular de cíbridos transmitocondriales portadores de las mutaciones m.12300G&gt;A y m.8993T&gt;G</b> .....	<b>105</b>
<b>II. Análisis de la red mitocondrial en los fibroblastos de los pacientes</b> .....	<b>108</b>
<b>III. Estudio de las proteínas implicadas en la fusión y fisión mitocondrial</b> .....	<b>110</b>
<b>IV. Relación entre los microtúbulos y la proliferación mitocondrial</b> .....	<b>112</b>
<b>V. Relación entre el ciclo celular y la biogénesis mitocondrial</b> .....	<b>113</b>
<b>VI. Resumen global</b> .....	<b>115</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>117</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>121</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>141</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

### INTRODUCCIÓN

Figura 1. Genoma mitocondrial humano .....	32
Figura 2 Sistema OXPHOS .....	36
Figura 3 Características histológicas de las enfermedades mitocondriales .....	38
Figura 4 Fusión y fisión mitocondrial .....	43
Figura 5 Estructura, función e isoformas de OPA1 y posibles proteínas asociadas .....	46

### MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 6. Patrón de restricción de la mutación m. 12300G>A en el gen ARN <sup>t</sup> <sub>Leu</sub> (CUN) .....	63
Figura 7. Patrón de restricción de la mutación m. 8993T>G en el gen ATPasa6 .....	64
Figura 8. Esquema de la técnica de generación de cíbridos transmitocondriales .....	66

### RESULTADOS

Figura 9. Electroferograma de la mutación detectada en el gen <i>MT-TL2</i> y análisis PCR-RFLP .....	80
Figura 10. Electroferograma de la mutación detectada en el gen <i>ATPasa 6</i> y análisis PCR-RFLP .....	81
Figura 11. Determinación de la masa mitocondria .....	83
Figura 12. Determinación del porcentaje de células con bajo potencial de membrana .....	86
Figura 13. Potencial de membrana observado mediante microscopía confocal .....	86
Figura 14. Especies reactivas de oxígeno observadas mediante microscopía de fluorescencia .....	87
Figura 15. Aumento de los ROS en el paciente portador de la mutación m.12300G>A .....	87
Figura 16. Detección de los ROS en los cíbridos transmitocondriales .....	87
Figura 17. Análisis de las especies reactivas de oxígeno, masa mitocondria y potencial de membrana en fibroblastos control sometidos a estrés oxidativo .....	88
Figura 18. Ejemplos de los tres tipos de morfología de la red mitocondria .....	89
Figura 19. Morfología de la red mitocondria de los pacientes .....	89
Figura 20. Proteínas implicadas en la fusión y en la fisión mitocondria .....	90
Figura 21. Drp1 fosforilada en S616 y en S637 .....	90
Figura 22. OPA1 .....	91
Figura 23. Relación entre las isoformas de OPA1 y el porcentaje de mutación m.12300G>A .....	91



Figura 24. Variación de la relación entre las isoformas de OPA1 en fibroblastos sometidos a estrés oxidativo.....	92
Figura 25. Determinación de $\alpha$ -tubulina acetilada en fibroblastos .....	93
Figura 26. Relación entre aumento en el porcentaje de mutación m.12300G>A, el aumento de $\alpha$ -tubulina acetilada y la modificación de las isoformas de OPA1.....	93
Figura 27. Determinación de $\alpha$ -tubulina acetilada en fibroblastos control sometidos a estrés oxidativo .....	94
Figura 28. Distribución de $\alpha$ -tubulina y de $\alpha$ -tubulina acetilada en fibroblastos.....	94
Figura 29. Disminución de los niveles de HDAC6 en el paciente portador de la mutación m.12300G>A. ....	95
Figura 30. Imágenes de HDAC6 .....	95
Figura 31. Medida de la masa mitocondrial tras el tratamiento con TSA y con EGF .....	96
Figura 32. Variación de los niveles de $\alpha$ -tubulina acetilada y de las isoformas de OPA1 tras el tratamiento con TSA o con EGF.....	96
Figura 33. Distribución de $\alpha$ -tubulina y de $\alpha$ -tubulina acetilada en fibroblastos tratados con TSA o con EGF .....	97
Figura 34. Morfología de la red mitocondrial en fibroblastos tratados con TSA o con EGF ..	98
Figura 35. Disminución de los niveles de Hsp27 en el paciente portador de la mutación m.12300G>A .....	98
Figura 36. Medida de la autofagia .....	99
Figura 37. Determinación de los niveles de ciclina D1 .....	100
Figura 38. Relación entre la masa mitocondrial y el tiempo de duplicación, la fase G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> y los ROS.....	100

## DISCUSIÓN

Figura 39. Posibles factores endógenos que están influyendo sobre la biogénesis mitocondrial en la mutación m.12300G>A.....	115
---	-----

## ÍNDICE DE TABLAS

### MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 1. Oligonucleótidos y condiciones de la amplificación de la región de interés .....	60
Tabla 2 Anticuerpos primarios .....	61
Tabla 3 Anticuerpos secundarios .....	61

### RESULTADOS

Tabla 4. Caracterización genética de los clones obtenidos .....	81
Tabla 5. Determinación del porcentaje de mutación y cuantificación del ADNmt en clones portadores de la mutación m.12300A>G .....	82
Tabla 6. Evolución del grado de heteroplasmia.....	82
Tabla 7. Medida de las actividades enzimáticas en músculo, fibroblastos y híbridos mitocondriales.....	84
Tabla 8. Detección del $\Delta\Psi_m$ mediante citometría de flujo y de los niveles de ATP total en las líneas celulares en estudio.....	85
Tabla 9. Ciclo celular y tiempo de duplicación.....	99

<b>ADNmt</b>	ADN mitocondrial
<b>ADNn</b>	ADN nuclear
<b>ADP</b>	Adenosin difosfato
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>ARNt</b>	ARN de transferencia
<b>ARNr</b>	ARN ribosómico
<b>ATP</b>	Adenosin trifosfato
<b>BSA</b>	" <i>Bovine serum albumine</i> " (albumina de suero bovino)
<b>Carboxi-H<sub>2</sub>DCFDA</b>	Diacetato de 5'-carboxi-2',7'-diclorofluoresceína
<b>CCCP</b>	Carbonilcianida-3-clorofenilhidrazona
<b>CO, COX</b>	Citocromo C oxidasa
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>DCF</b>	2',7'-diclorofluoresceína
<b>DE</b>	Desviación Estandar
<b>DMEM</b>	" <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> " (medio eagle modificado por Dulbecco)
<b>Drp1</b>	" <i>Dynamín-related protein 1</i> " (proteína relacionada con dinamina 1)
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EGF</b>	"Epidermal Growth factor" (factor de crecimiento epidérmico)
<b>E.E.M</b>	Error estándar de la media
<b>FAD/FADH<sub>2</sub></b>	Flavin adenín dinucleótido
<b>FBS</b>	" <i>Fetal Bovine Serum</i> " (suero fetal bovino)
<b>Fis1</b>	" <i>mitochondrial fission protein 1</i> " (proteína de la fisión mitocondrial 1)
<b>FRR</b>	Fibras Rojo Rasgadas
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>HDAC</b>	Histona deacetilasa
<b>Hsp27</b>	" <i>Heat shock protein 27</i> " (proteína de choque térmico 27)
<b>JC-1</b>	1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina
<b>LC3</b>	Proteína 1 de cadena ligera asociada a microtúbulos
<b>Mfn1/2</b>	Mitofusina1/2

<b>MTG</b>	MitoTraker® Green
<b>MTR580</b>	MitoTraker® Red <sub>580</sub>
<b>NAD<sup>+</sup>/NADH</b>	Nicotinamida adenín dinucleótido
<b>ND</b>	NADH deshidrogenasa
<b>OPA1</b>	<i>"Optic Atrophy 1"</i> (proteína de la atrofia óptica 1)
<b>OXPHOS</b>	Fosforilación oxidativa
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PBS</b>	<i>"Phosphate Buffered Saline"</i> (tampón fosfato salino)
<b>PCR</b>	<i>"Polymerase Chain Reaction"</i> (reacción de la cadena de la polimerasa)
<b>PGC-1<math>\alpha</math></b>	<i>"Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha"</i> (coactivador 1 $\alpha$ de receptores activadores de la proliferación de peroxisomas)
<b>PFA</b>	Paraformaldehido
<b>RFLP</b>	<i>"Restriction Fragment Length Polymorphism"</i> (polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción)
<b>ROS</b>	<i>"Reactive Oxygen Species"</i> (Especies reactivas de oxígeno)
<b>SDH</b>	Succinato deshidrogenasa
<b>SDS</b>	<i>"Sodium Dodecil Sulfate"</i> (dodecil sulfato sódico)
<b>TD</b>	Tiempo de duplicación
<b>TSA</b>	Tricostanina A
<b>URF</b>	Unidades Relativas de Fluorescencia
<b><math>\Delta\Psi_m</math></b>	Potencial de membrana mitocondrial



Introducción

---

## 1. La mitocondria

Las mitocondrias son pequeños orgánulos localizados en el citoplasma de la mayoría de las células eucariotas. Observadas por primera vez hace más de 100 años (Altmann R, 1890), fueron denominadas “organismos elementales”, pensando que se trataba de organismos independientes que vivían dentro de las células eucariotas. Más tarde se desarrolló la teoría de la endosimbiosis, popularizada por Lynn Margulis (Margulis L, 1975) y que hoy es ampliamente aceptada.

Presentan distintas formas (filamentos, bastoncillos o esferas) y tamaños, dependiendo del tejido y tipo celular. También su número es variable, existiendo células que carecen de ellas, como los eritrocitos, y células que presentan un número elevado, como sucede en los miocitos del músculo esquelético. Sin embargo, la estructura es esencialmente la misma en todas las organelas. Poseen una membrana externa y otra interna, plegada en forma de crestas, lo que da lugar a dos espacios perfectamente definidos, la matriz mitocondrial y el espacio intermembrana. La membrana externa es permeable a pequeñas moléculas (<10KDa) mientras que la membrana interna permite libremente el paso de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. Esta impermeabilidad relativa de la membrana interna permite crear y mantener un gradiente de protones, esencial para la síntesis de ATP, a través de la cadena respiratoria mitocondrial o sistema OXPHOS, una de las funciones centrales de las mitocondrias. La matriz contiene el ADN mitocondrial (ADNmt), las proteínas necesarias para la replicación y transcripción del mismo, los ribosomas y numerosas enzimas que participan en otros procesos metabólicos como el ciclo de Krebs o la  $\beta$ -oxidación.

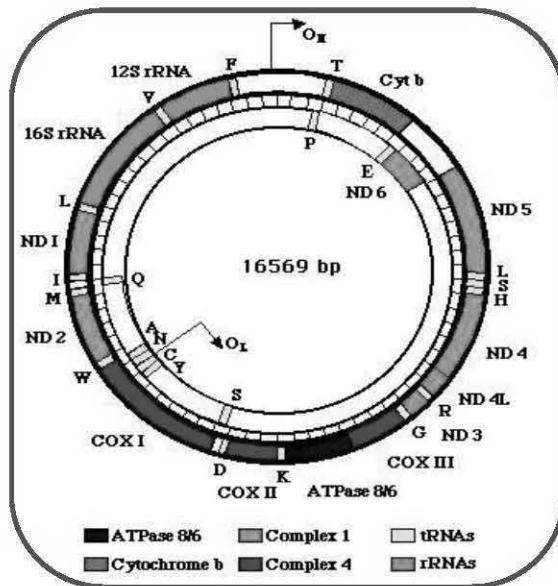
### 1.1 Sistema genético mitocondrial

#### 1.1.1 Estructura y metabolismo del ADNmt

La mitocondria posee su propio genoma (Nass MM, 1963), independiente del ADN nuclear (ADNn), en un número de copias que varía de 5 a 10.

El ADNmt humano es una molécula circular de doble cadena de 16.569 pares de bases (pb) (Anderson S, 1981) cuya composición de nucleótidos de las dos cadenas es diferente; una de ellas es rica en residuos de guanina y timina y se denomina cadena pesada (H), mientras que la otra se denomina ligera (L). Esta nomenclatura viene dada por la diferente movilidad que presentan las cadenas separadas en un gradiente desnaturalizante de cloruro de cesio. El genoma mitocondrial es compacto: los genes estructurales no poseen zonas ni 5' ni 3' no traducidas (UTRs), no contienen intrones y los espacios intergénicos son mínimos, llegando, en algunos casos, al solapamiento de genes consecutivos. Sólo existen dos regiones no codificantes en el ADNmt: una región de ~1 Kilobases que se denomina D-loop o bucle-D, en mamíferos, donde se localizan el origen de replicación de la cadena pesada (O<sub>H</sub>) y los promotores a partir de los cuales se inicia la transcripción mitocondrial (IT<sub>L1</sub>, IT<sub>H1</sub> y IT<sub>H2</sub>); y otra región de ~30 nucleótidos localizada en el interior de un *cluster* a dos tercios desde el D-loop (Strachan T & Read AP, 1999). El genoma mitocondrial codifica 37 genes, 28 de los cuales son codificados por la cadena pesada y 9 por la ligera. Estos genes codifican: 13 polipéptidos que forman parte del sistema OXPHOS, 2 ARN ribosómicos (ARNr 12S y 16S) y 22 ARN de

transferencia (ARNt). El resto de los aproximadamente 1500 genes que dan lugar al proteoma mitocondrial están codificados en el núcleo, son traducidos por ribosomas citoplásmicos y transportados a la mitocondria a través de diversos sistemas de importación de proteínas (Wallace DC, 2005).



**Figura 1. Genoma mitocondrial humano.** La cadena pesada se representa en el exterior, indicando su origen de replicación ( $O_H$ ) y la ligera en el interior, indicando también su origen de replicación ( $O_L$ ). Los ARNt se representan por el código de letra del aminoácido correspondiente.

El ADNmt se encuentra formando parte de complejos nucleoproteicos asociados a la membrana interna mitocondrial denominados nucleoides (Bogenhagen DF et al, 2003). Dichos nucleoides se consideran la unidad de transmisión y herencia del ADNmt. El factor de transcripción mitocondrial A (TFAM o mtTFA), la proteína de unión al DNA de hebra única (mtSSB), la helicasa Twinkle y la DNA polimerasa gamma (POLG), además de otras proteínas todavía no identificadas, forman parte de estos nucleoides (Garrido N et al, 2003). El genoma mitocondrial se replica y transcribe en el organelo. Los elementos *cis*-responsables de la regulación de estos procesos están localizados en la región D-loop del ADNmt. Sin embargo, todos los factores *trans*-activadores son codificados en el núcleo (Garesse R & Vallejo CG, 2001). El mecanismo de replicación del genoma mitocondrial está actualmente bajo debate. El primer modelo, sugerido hace más de 3 décadas (Kasamatsu H & Vinograd J, 1973), describe ésta como una reacción asimétrica y asincrónica que envuelve dos orígenes de replicación independientes y unidireccionales,  $O_H$  y  $O_L$  (Clayton DA, 1982). Alternativamente, se ha propuesto un modelo (Holt IJ et al., 2000) en el que ambas cadenas se replicarían de manera simétrica y simultánea desde múltiples orígenes situados en una región amplia cercana al  $O_H$  (Bowmaker M et al., 2003). Aún permanece sin esclarecer si coexisten ambos mecanismos de replicación, quizás regulados por distintas condiciones fisiológicas en la célula.

El proceso de transcripción requiere la presencia de una ARN polimerasa específica (h-mtRPOL), 2 factores de transcripción implicados en la iniciación (mtTFA y mtTFB) y uno en la terminación (mTERF), todos ellos codificados en el ADNn (Montoya J, 2005). Tiene un solo lugar de inicio situado en el bucle-D, a partir de los promotores de transcripción de ambas cadenas ( $IT_{L1}$ ,  $IT_{H1}$  y  $IT_{H2}$ ), que dará lugar a tres moléculas policistónicas largas que se procesarán por cortes endonucleolíticos precisos delante y detrás de los ARNt, que actuando como señales de reconocimiento para las enzimas de procesamiento, al adquirir la configura-

ción en hoja de trébol en las cadenas nascentes de ARN, dan lugar a los ARNr, ARNt y ARNm maduros. Los productos de transcripción del ADNmt humano aislados incluyen los 2 ARNr (ARNr 12S y 16S), los 22 ARNt y 18 ARN poliadenilados en el extremo 3' (poli(A)- ARN), la mayoría de los cuales corresponden a los ARNm. Los ARNm mitocondriales no contienen la estructura "cap" en el extremo 5' (Montoya J, 1981) y su extremo 3' carece de región no codificante, finalizando en un codon de terminación incompleto que, tras una poliadenilación posterior, se generaran, en todos los caso, un codon de terminación.

Al contrario que la replicación y transcripción del ADNmt, la traducción mitocondrial es poco conocida. El proceso de traducción ocurre en la matriz mitocondrial con su propio aparato de síntesis proteica que incluye dos tipos de ARN ribosómicos, el 12S y 16S. Todas las proteínas que forman parte de los ribosomas mitocondriales están codificadas por genes nucleares, que son traducidos en el citosol y transportados hasta las mitocondrias. La función de la maquinaria de traducción mitocondrial, similar a la encontrada en procariontes, es la síntesis de los trece polipéptidos codificados por el genoma mitocondrial y que forman parte del sistema OXPHOS. Este proceso requiere, además de los ARNt codificados en el ADNmt, la acción concertada de factores de traducción y ribosomas mitocondriales. En mamíferos, han sido clonados y secuenciados dos factores de iniciación, IF2 e IF3; cuatro de elongación, EFTu, EFTs, EFG1 y EFG2 (Spremulli LL et al., 2004); un factor de liberación, RF1; y un factor de reciclado ribosomal, RRF (Zhang Y & Spremulli LL, 1998). A pesar de los estudios realizados, todavía no se ha desarrollado un sistema que reproduzca in vitro la síntesis de las proteínas mitocondriales. El código genético utilizado por la mitocondrias tiene una serie de diferencias con respecto al universal. Así el codón UGA codifica triptófano en lugar de terminación; AUA indica metionina en lugar de isoleucina; AGA y AGG especifican terminación en lugar de arginina. Este fenómeno asegura que solo los mensajes codificados por el ADNmt serán traducidos satisfactoriamente en la matriz.

### **1.1.2. Características de la genética mitocondrial**

La transmisión del ADNmt es un fenómeno complejo que es aún bastante poco conocido. El alto número de copias, su compartimentalización en organelas y su organización en nucleoides dentro de la mitocondria, contribuye a su complejidad. Son varias las características que diferencian la genética mitocondrial de la nuclear, descritas a continuación:

#### **- Herencia materna**

La herencia del ADNmt es exclusivamente materna. Normalmente el ADNmt paterno es etiquetado con una cola de ubiquitina que involucra un rápido proceso de proteólisis cuando éste entra en el oocito (Sutovsky P et al., 1999). Debido al tipo de herencia, una mutación en el ADNmt puede afectar a ambos sexos por igual (Fischel-Ghodsian N, 1999). En general, una madre que porte una mutación en su ADNmt puede transmitirla a su descendencia, pero sólo sus hijas la transmitirán a la siguiente generación. Hay, sin embargo, un único caso de un paciente con una enfermedad mitocondrial que procede del ADNmt paterno (Schwartz M & Vissing J, 2002). En este caso los niveles de ADNmt paterno en músculo esquelético del paciente eran del 90%, suficientemente alto para la manifestación de la patología.



### - Poliplasmia, homoplasma y heteroplasma

Cada célula humana, dependiendo de su requerimiento energético, contiene cientos de mitocondrias, y cada una de ellas un número de copias que varía de 5 a 10, por tanto existen en cada célula de 1.000 a 10.000 copias de ADNmt, fenómeno llamado **poliplasmia**. Durante la división celular, si una célula posee dos poblaciones de mitocondrias, con ADNmt con la secuencia consenso y ADNmt mutado, las células hijas podrán ser de 3 tipos: células hijas normales, todas ellas con un ADNmt normal, en cuyo caso hablaremos de **homoplasma normal**; células en las que todas sus mitocondrias porten ADNmt mutado, en cuyo caso hablaremos de **homoplasma mutante** y células que porten los dos tipos de mitocondrias, normales y mutantes, en cuyo caso las definiremos como **heteroplásmicas**. El grado de heteroplasma es el producto de una aparente segregación al azar de ambos tipos de ADNmt durante la embriogénesis temprana (Finsterer J, 2004).

### - Segregación mitótica y transmisión del ADNmt

Cuando las células se dividen, las mitocondrias se transmiten a las células hijas de forma aleatoria, fenómeno conocido como **segregación mitótica**. La segregación de las mitocondrias se creía que era un proceso estrictamente al azar, pero algunos autores han demostrado que ocurre de una forma específica, en función del tejido y bajo un control nuclear (Jenuth J et al, 1996; Battersby BJ et al, 2003).

Poco es conocido sobre los mecanismos de transmisión de ADNmt en humanos. Se sabe que en ratones hembra con un ADNmt heteroplásmico éste se transmite de forma neutral a su descendencia, y la variabilidad de dicha descendencia está en gran medida determinada por una segregación aleatoria (Jenuth JP et al., 1996). Se cree que una restricción en el número de moléculas de ADNmt en la ovogénesis temprana está detrás de este proceso, lo que se conoce como hipótesis de cuello de botella (Poulton J et al., 1998). La teoría de cuello de botella fue propuesta por Ashley y colaboradores (Ashley MV et al., 1989). Ellos encontraron en vacas Holstein que el grado de heteroplasma podría cambiar en una sola generación y que en dos o tres generaciones puede llegar a dar lugar a un ADNmt homoplásmico. De acuerdo con esta teoría, el ADNmt de una pocas mitocondrias serían selectivamente amplificado en el proceso de ovogénesis y, por tanto, un genotipo puede llegar a ser predominante y fijo en futuras generaciones (Brown DT et al., 2000). Como resultado, una mujer puede albergar un defecto en su ADNmt que sea patogénico y puede transmitir bajos niveles de dicho ADNmt mutante a algunos descendientes y los altos niveles a otros. Algunos de los descendientes pueden verse gravemente afectados, mientras algunos se quedan asintomáticos durante toda su vida (Chinnery PF et al., 2000).

### - Efecto umbral

La expresión fenotípica de una mutación patogénica del ADNmt no sigue las reglas de la genética mendeliana y depende generalmente de la proporción de ADNmt mutado que existen en un tejido en particular. El efecto umbral representa la proporción mínima de ADNmt mutado necesaria para alterar el metabolismo oxidativo y suficiente para que se produzca una disfunción en un determinado órgano o tejido. Este concepto es un tanto relativo ya que el número de genomas mitocondriales necesarios para producir una disfunción

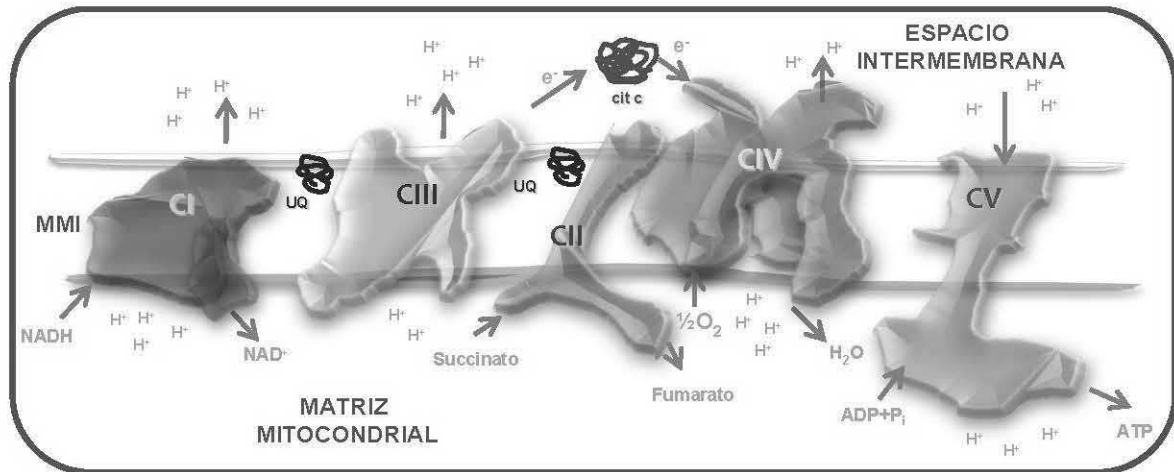
celular varía de tejido a tejido, en función de su dependencia del metabolismo oxidativo.

## 1.2. La cadena de transporte electrónico y la fosforilación oxidativa

El metabolismo mitocondrial tiene como función principal la producción de energía a partir de la oxidación aerobia de sustratos. El proceso oxidativo final está acoplado a una cadena de transporte electrónico encargada de transformar los potenciales de oxido-reducción generados en energía en forma de ATP, mediante el acoplamiento a la fosforilación oxidativa.

La glucólisis y el ciclo del ácido cítrico generan de por sí una cantidad relativamente baja de energía en forma de ATP. Sin embargo, 6 pasos de deshidrogenación (uno en la glucólisis, otro en la reacción de la piruvato deshidrogenasa y 4 más en el ciclo de Krebs) reducen en total 10 moles de NAD<sup>+</sup> a NADH y 2 moles de FAD a FADH<sub>2</sub> por mol de glucosa. La reoxidación de estos equivalentes reductores genera la mayor parte de la energía necesaria para la síntesis de ATP. La reoxidación del NADH y FADH<sub>2</sub> tiene lugar, en las células eucariotas, en un proceso en el que se producen reacciones acopladas de oxido-reducción, con el paso de electrones a través de transportadores electrónicos integrados en la membrana interna mitocondrial. La transferencia de electrones de unos transportadores a otros, que se realiza de forma secuencial a favor del potencial oxidorreductor, está acoplada al bombeo de protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana. El gradiente electroquímico que se establece se manifiesta como un gradiente de pH y una diferencia de potencial a través de la membrana mitocondrial interna (potencial de membrana mitocondrial o  $\Delta\Psi_m$ ). El último paso es la reducción del O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O. La energía generada por la disipación del gradiente de protones a través de la ATP-sintasa es utilizada para fosforilar el ADP, con la consiguiente formación de ATP.

La fosforilación oxidativa y la cadena de transporte electrónico son llamadas conjuntamente "cadena respiratoria", o sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS), y está constituida por 5 complejos multienzimáticos y 2 pequeñas moléculas que sirven de nexo de unión o lanzadera (la coenzima Q y el citocromo c). La característica más remarcable del sistema OXPHOS es que está controlado por dos genomas distintos, el ADNn y el ADNmt. De las más de 90 proteínas que forman la cadena respiratoria, 13 están codificadas por el genoma mitocondrial y todas las demás están codificadas por el nuclear. Todos los complejos, a excepción del complejo II o succinato:ubiquinona oxidorreductasa, contienen algunas subunidades codificadas por el ADNmt. En el complejo I o NADH:ubiquinona oxidoreductasa lo son las subunidades ND1, 2, 3, 4L, 4, 5 y 6. En el complejo III o ubiquinol:citocromo c oxidoreductasa solo lo es la subunidad Cyt b mientras que en el complejo IV o citocromo c oxidasa los son estas 3: COI, II, III. En el complejo V o F<sub>1</sub>-F<sub>0</sub> ATP sintasa lo son 2: ATPasa 6 y ATPasa 8.



**Figura 2. Sistema OXPHOS.** La oxidación de los coenzimas reducidos procedentes del catabolismo celular genera electrones que son cedidos a la cadena respiratoria y finalmente al oxígeno molecular. El flujo de protones se transforma en energía química que es usada por el complejo V para obtener ATP. MMI: Membrana Mitocondrial Interna. UQ: CoenzimaQ o Ubiquinona. Cit c: citocromo c

Se ha observado en distintos organismos, desde bacterias a mamíferos, que los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria mitocondrial pueden agruparse en estructuras supramoleculares, con distintas estequiometrías, llamados *supercomplejos* (Schagger H & Pfeiffer K, 2000). Los supercomplejos formados por los complejos I, III y IV son también conocidos como respirasomas. La formación de estos complejos parece ser esencial para la estabilización y/o ensamblaje de los distintos complejos de sistema OXPHOS. (Acin-Perez R et al., 2004; Schagger H et al., 2004 Vonck J & Schafer E, 2009)

El sistema OXPHOS es uno de los principales reguladores del equilibrio ácido-base y redox de la célula, encargándose también del balance metabólico celular. El potencial electroquímico generado es utilizado por el proceso de termogénesis para producción de calor en el tejido adiposo marrón (Cannon B & Nedergaard J, 2004).

## 2. Enfermedades mitocondriales

Las enfermedades mitocondriales constituyen un amplio grupo de cuadros clínicos cuyo nexo de unión es una alteración en el paso final del metabolismo oxidativo, con la consiguiente disminución en la producción de energía. En 1962, Luft y colaboradores describen la primera enfermedad producida por una alteración mitocondrial en un paciente que presentaba un hipermetabolismo no tiroideo (Luft R et al., 1962). Las primeras mutaciones del ADNmt fueron descritas en 1988 (Holt IJ et al., 1988; Wallace DC et al., 1988) y en 1989 se evidencia un nuevo grupo de enfermedades mitocondriales de origen nuclear (Zeviani M et al., 1989). La mayoría de las mutaciones en los genes del ADNmt han sido relacionadas con enfermedades en humanos, sin embargo, las enfermedades mitocondriales también puede surgir de mutaciones en genes nucleares, ya que la mayoría de las proteínas humanas mitocondriales están codificadas en el núcleo y luego importadas a dicho orgánulo. Además, también pueden ser debidas a factores exógenos como drogas, toxinas e infecciones (Finsterer J, 2004). Los trastornos hereditarios de la función mitocondrial producen, tanto en la infancia como en adultos, enfermedades con manifestaciones clínicas notablemente diversas. Aunque existen sín-

dromes clínicos perfectamente definidos, en muchas ocasiones el paciente presenta una asociación de síntomas y signos que pueden modificarse a lo largo de la evolución del proceso, por lo que el estudio de la enfermedad mitocondrial puede ser complejo. Las enfermedades mitocondriales que afectan a un solo órgano son escasas y tienden a presentarse como trastornos de varios sistemas que afectan predominantemente a los tejidos con alta demanda energética, como los músculos, cerebro, corazón, hígado, retina y oído (Finsterrer J, 2004). Durante casi tres décadas, el diagnóstico de una enfermedad mitocondrial se ha basado en datos clínicos, bioquímicos y hallazgos histomorfológicos en biopsia de músculo. Actualmente, el diagnóstico final ha de realizarse conjugando varios factores: clínicos, bioquímicos, anatomopatológicos y genéticos. Según los resultados obtenidos podremos obtener un diagnóstico confirmatorio, probable, posible o descartar la enfermedad (Bernier FP et al., 2002).

A pesar de la importancia clínica de las enfermedades mitocondriales, el hecho de que el genoma mitocondrial fue secuenciado hace más de 2 décadas (Anderson S et al., 1981) y que se conoce la función de todos y cada uno de los genes que éste codifica, los mecanismos moleculares que conducen a una enfermedad mitocondrial siguen sin resolverse ya que son muchos los factores que contribuyen al desarrollo de este tipo de enfermedades. La falta de conocimiento sobre la correlación genotipo-fenotipo y la fisiopatología de las enfermedades impiden el asesoramiento útil a los pacientes y la búsqueda de mejores intervenciones terapéuticas.

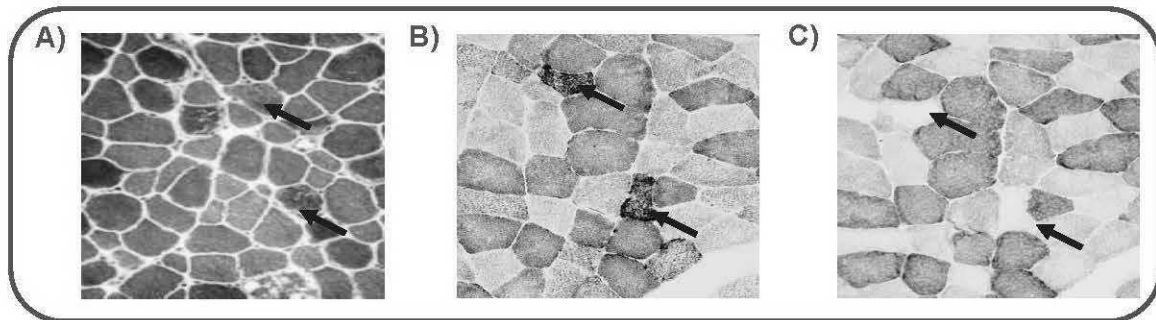
## **2.1 Características clínicas**

Una de las características más singulares de las alteraciones del ADNmt es la heterogeneidad clínica, que va desde la afectación de un solo tejido u órgano hasta un fenotipo con afectación multisistémica. Una misma mutación puede dar lugar a cuadros clínicos diversos, mientras que distintas mutaciones puede tener la misma manifestación fenotípica. Esto puede explicarse, en parte, por la coexistencia de dos tipos de ADNmt dentro de las células y tejidos, ADNmt mutante y ADNmt salvaje, situación conocida con el nombre de heteroplasmia. La fracción de ADNmt mutante puede variar de menos del 1% a más del 95% en los tejidos afectados de los pacientes con una enfermedad mitocondrial. Además, el grado de heteroplasmia varía de un tejido a otro, e incluso entre las células de un mismo tejido (Naviaux RK, 2000) y, en algunos casos, la heteroplasmia puede cambiar con el tiempo (Larsson NG & Clayton DA, 1995). Las mutaciones más severas, en general, se encuentran en estado heteroplásmico, ya que un estado homoplásmico mutante podría ser letal. El efecto umbral o porcentaje de mutación necesaria para manifestarse clínicamente, depende de cada tejido en particular, de la edad y del medio ambiente. Además, la comunicación intergenómica podría también contribuir a la diversidad de fenotipos clínicos (Leonard JV & Schapira AH, 2000a, b).

## **2.2 Características histológicas**

En los años 60, Engel y Cunningham describieron una modificación de la técnica del tricrómico de Gomori que permitía visualizar las mitocondrias en tejido congelado (Engel W & Cunningham GG, 1963). Con esta modificación se observó que algunas fibras musculares presentaban grandes acúmulos de organelas. Estas

fibras fueron denominadas Fibras Rojo Rasgadas (FRR). Las FRR corresponden a fibras musculares con alteraciones notables en el número, disposición, forma y estructura interna de las mitocondrias. Existen otras técnicas que nos permiten observar el acúmulo subsarcolemal de mitocondrias y su disfunción, característica de las FRR, basadas en la valoración, por métodos histoquímicos, de la actividad de la succinato deshidrogenasa (SDH), y de la citocromo c oxidasa (COX). La doble tinción para la SDH y la COX permite una mejor aproximación al diagnóstico, tanto si el paciente presenta FRR como si no. A nivel ultraestructural es frecuente observar alteraciones en el tamaño y forma de las mitocondrias, alteraciones en la distribución de las crestas mitocondriales y en ocasiones inclusiones paracristalinas.



**Figura 3. Características histológicas de las enfermedades mitocondriales.** Tinción seriada de cortes sucesivos de músculo esquelético con tricrómico modificado de Gomori (Figura 3A) y para las enzimas SDH (Figura 3B) y COX (Figura 3C). Las flechas en las fotos indican FRR con tinción COX negativa.

Durante muchos años, la presencia de FRR ha sido un marcador inequívoco de una patología mitocondrial, pero este tipo de fibras también están presentes en patologías no mitocondriales como las distrofias musculares, polimiositis, dermatomiositis e incluso en biopsias de pacientes ancianos (Campos Y et al., 1995; González-Crespo, MR et al., 1999). La existencia de FRR es característica de ciertas patologías mitocondriales, y en particular en aquellas en las que una mutación en el ADNmt da lugar a una alteración en la síntesis de proteínas, tal y como ocurre en mutaciones en los ARNt. Por otra parte, hay enfermedades mitocondriales donde no se detectan estas fibras como ocurre en la atrofia óptica de Leber (LHON), relacionada con mutaciones en proteínas que forman parte del complejo I, y en los pacientes con síndrome de Leigh (que presentan mutaciones puntuales en el gen de la ATPasa 6) (Holt IJ et al., 1990).

### 2.3 Características bioquímicas

Cualquier déficit enzimático que afecte al sistema OXPHOS perjudicará marcadamente al metabolismo celular. Una consecuencia directa será la limitación en la cantidad de ATP intracelular, aunque también se producirán otro tipo de efectos metabólicos. Entre ellos, una marcada alteración del metabolismo de los carbohidratos y de la  $\beta$ -oxidación y como consecuencia de ello será posible encontrar un incremento de los ratios lactato/piruvato y  $\beta$ -OH butirato/acetoacetato, con la elevación secundaria en plasma de los niveles de lactato, detectada frecuentemente en estos pacientes. Los estudios del metabolismo energético, como la medida enzimática de los distintos complejos de la cadena respiratoria o de la  $\beta$ -oxidación nos permiten diferenciar las enfermedades mitocondriales de otro tipo de enfermedades metabólicas. La valoración bioquímica de los distintos complejos de la cadena respiratoria se suele realizar en músculo esquelético (tejido

post-mitótico), ya que en este tipo de tejido se suele evidenciar de forma más clara los déficits enzimáticos. Preferentemente, se utilizan métodos que miden la actividad de los complejos de forma individual. Mediante esta metodología se ha determinado que existen dos tipos de déficit enzimáticos: déficits únicos que afectan a un solo complejo y se suelen asociar con alteraciones en proteínas que forman parte del correspondiente complejo (Parker WD et al., 1989) o que intervienen en su ensamblaje (Tiranti V et al., 1998), o déficits combinados, habituales cuando el paciente presenta una mutación en el ADNmt que altera la síntesis proteica como pueden ser las deleciones (Moraes CT et al., 1989) o las mutaciones puntuales en los ARNt (Ciafaloni E et al., 1992), aunque mutaciones en genes reguladores, codificados por el ADNn, pueden dar lugar también a déficit múltiples (Casademont J et al., 1994).

## **2.4 Características genéticas**

Las enfermedades mitocondriales no son raras en su conjunto, estimándose que afectan, al menos, a 1 de cada 5000 individuos (Horvath et al., 2008). Las mutaciones más frecuentes en ambos genomas y los síntomas o síndromes a los que se encuentran asociadas son descritos a continuación.

### **2.4.1 Mutaciones del ADNmt**

Las mutaciones en el ADNmt pueden ser clasificadas en dos grandes grupos: mutaciones puntuales y deleciones-duplicaciones.

#### **2.4.1.1 Mutaciones puntuales en el ADNmt**

Existen descritas, hasta el momento, más de 200 mutaciones (DiMauro S & Schon EA, 2008) en genes codificados por el ADNmt, que afectan a los ARNt, ARNr y a genes que codifican subunidades estructurales de los complejos OXPHOS.

El ARNt<sup>Leu (UUR)</sup> es el gen mitocondrial donde se han descrito más mutaciones puntuales causantes de patología en humanos. La primera mutación encontrada fue una transición A>G en la posición 3243 del ADNmt (Goto Y et al., 1990). Estudios con grandes series de pacientes han confirmado que esta mutación es una de las más frecuentes en el genoma mitocondrial y se asocia al síndrome MELAS (Miopatía con Encefalopatía, acidosis láctica y accidentes cerebrovasculares) (Ciafaloni E et al., 1992). Otra de las mutaciones puntuales más frecuentes en un ARNt es la transición A>G en la posición 8344 perteneciente al ARNt<sup>Lys</sup>, asociada al síndrome MERRF (Epilepsia Mioclónica con Fibras Rojo Rasgadas) (Shoffner JM et al., 1990). Un 80-90% de los pacientes con este síndrome presenta la mutación m.8344A>G (Shoffner JM & Wallace DC, 1992). Fenotipos celulares asociados a esta y otras mutaciones puntuales mitocondriales han sido estudiados en modelos celulares en los que las mitocondrias derivadas de un paciente se transfieren a células carentes de ADNmt (células p0) (Schon EA et al., 1992; Bentlage HA & Attardi G, 1996). Mutaciones en el triplete de un anticodón son poco frecuentes y, hasta la fecha sólo se han descrito 4 en asociación con enfermedad mitocondrial (Moraes CT et al., 1993; Mancuso M et al., 2004; Sacconi S et al., 2008; Martín-Jiménez R et al., 2011). Durante el estudio patofisiológico de la mutación característica del síndrome MELAS,

El Meziane y colaboradores mostraron, en cíbridos que contenían altos niveles de ADNmt mutado para la transición m.3243A>G, que algunos sub-clones presentaban un metabolismo respiratorio mitocondrial normal (El Meziane et al., 1998a). El análisis mediante secuenciación mostró que dichos subclones eran heteroplásmicos, con un 10% de ADNmt mutado, para una nueva mutación en la posición 12300 (G>A) correspondiente al gen ARNt<sup>Leu</sup>(<sup>CUN</sup>) (*MT-TL2*). Esta transición introducía un cambio en el anticodón de este ARNt mitocondrial, transformando el triplete normal UAG en UAA, que corresponde al ARNt<sup>Leu</sup>(<sup>UUR</sup>) (*MT-TL1*), proporcionando una explicación lógica para la restauración del fenotipo. Esta fue la primera descripción de una mutación mitocondrial supresora en células humanas.

La mutación más frecuente en los genes que codifican ARNr se ha descrito en la posición 1555. Se trata de la transición A>G localizada en el ARNr 12S. Esta mutación es responsable de un fenotipo clínico que cursa con sordera neurosensorial no sindrómica sensible a aminoglucósidos (Prezant TR et al., 1993).

Con respecto a las mutaciones puntuales en genes mitocondriales que codifican proteínas, éstas se manifiestan a nivel bioquímico con un defecto aislado del complejo al cual pertenece la proteína alterada. Las más frecuentes son las mutaciones presentes en el gen de la *ATPasa 6* y en diversos genes *ND* del Complejo I. En el gen de la *ATPasa 6* las mutaciones más frecuentes son m.8993T>G y m.8993T>C asociadas con el síndrome NARP (Neuropatía, Ataxia y Retinitis pigmentosa) o síndrome de Leigh de transmisión materna. La mutación m.8993T>G fue hallada al principio de la década de los 90 en una familia que presentaba una enfermedad neurológica con características muy similares a las miopatías mitocondriales descritas hasta entonces y con un claro patrón de herencia materna (Holt IJ et al., 1990). Son muchas mutaciones puntuales presentes en los genes *ND* y de ellas, las más frecuentes, están asociadas al síndrome LHON o Neuropatía óptica hereditaria de Leber. Estas mutaciones son conocidas como mutaciones primarias. La mutación G11778A en el gen *ND4* (Wallace DC et al., 1988) está presente en el 69% de los pacientes, y aparece frecuentemente en heteroplasmia; G3460A en el gen *ND1* (Huoponen K et al., 1991) es detectada en el 13% de los pacientes, generalmente en homoplasmia; T14484C en el gen *ND6* (Johns DR et al., 1992) es detectada de forma homoplásmica en un 14% de los pacientes. Es importante señalar que este tipo de mutaciones son mucho más frecuentes en varones y en algunos casos se produce la recuperación espontánea de la visión. Las mutaciones localizadas en genes mitocondriales que codifican proteínas que forman parte del sistema OXHOS no suelen estar asociadas a proliferación mitocondrial y por tanto los pacientes, en general, no presentan acúmulos subsarcolemales en su biopsia muscular.

#### 2.4.1.2 Deleciones del ADNmt

Desde que en 1988 se describieran por primera vez (Holt IJ et al., 1988), se han publicado numerosos artículos acerca de pacientes en los que, mediante Southern Blot, se detectaba la presencia de 2 poblaciones diferentes de ADNmt: ADNmt normal y ADNmt delecionado. El tamaño de la deleción es variable de unos pacientes a otros, siendo la deleción más común, presente en un 30-40% de los pacientes, la que comprende desde la subunidad 8 de la *ATPasa* hasta el gen *ND5* (4977 pb). Las deleciones de gran tamaño están asociadas a fenotipos que incluyen la oftalmoplejía externa progresiva crónica (CPEO), el síndrome de Kearns-

Sayre y el síndrome de Pearson, aunque ocasionalmente han sido asociadas con prácticamente todos los síndromes de encefalopatías mitocondriales. En muchos casos la presencia de ADNmt deletado junto con ADNmt normal va acompañada de otras especies de ADNmt como son duplicaciones y dímeros de deleciones (Rotig A et al., 1995), que pueden representar estados intermedios, aunque su patogenicidad es algo incierta (Manfredi G et al., 1997). Solamente en estos casos de coexistencia de deleciones y duplicaciones se ha descrito un patrón de herencia materna.

#### 2.4.2 Mutaciones en el genoma nuclear

Mutaciones en genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales también pueden causar enfermedades, y además siguen una herencia típicamente mendeliana. Se han descrito con un patrón de herencia autosómico recesivo o dominante y pueden ser clasificadas en 4 grupos: i) mutaciones en genes que codifican subunidades de los complejos de la cadena respiratoria; ii) mutaciones en genes que codifican proteínas accesorias necesarias para el correcto ensamblaje y función de los complejos de la cadena respiratoria; iii) mutaciones que afectan a la estabilidad y replicación del ADNmt, las cuales pueden producir daños cuantitativos (depleción) o cualitativos (deleciones y duplicaciones) en el ADNmt y; iv) mutaciones que afectan de un modo indirecto a la cadena respiratoria mitocondrial. En este último apartado se encontrarían las mutaciones en genes que codifican proteínas esenciales para diferentes procesos de la fisiología mitocondrial, como aquellas que afectan a la composición lipídica de la membrana, o las mutaciones en genes implicados en los procesos de fusión y fisión mitocondrial (Schon E & DiMauro S, 2007; Shapira AH, 2012).

### 3. Biogénesis mitocondrial

La biogénesis mitocondrial comprende una serie de procesos celulares involucrados en la formación de nuevas mitocondrias. En este fenómeno confluyen la proliferación o aumento del número de mitocondrias por célula y la diferenciación, mediante la cual, el orgánulo adquiere las características estructurales y funcionales adecuadas para el desarrollo de sus funciones específicas en las distintas células del organismo. Las mitocondrias nunca se sintetizan "de novo" si no que surgen por el crecimiento y división de mitocondrias preexistentes. Por tanto, la biogénesis mitocondrial es un proceso biológico complejo, altamente controlado y no un acontecimiento causal, que implica cambios en la expresión de más de 1000 genes, la cooperación de dos genomas y la alteración de aproximadamente un 20% de las proteínas celulares (López-Lluch G et al., 2008). El que el contenido mitocondrial y la capacidad respiratoria varían en función de la demanda energética y la abundancia mitocondrial puede ser modulada en respuesta a distintas condiciones fisiológicas como: disponibilidad de nutrientes, hormonas, ejercicio, exposición al calor, restricción calórica, hipoxia o el ciclo circadiano (Ventura-Clapier R, 2008). Múltiples factores, tanto endógenos como exógenos, regulan la biogénesis mitocondrial a través de PGC1 $\alpha$  (*Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1-alpha* o coactivador 1 $\alpha$  de los receptores activadores de la proliferación de peroxisomas) un cofactor transcripcional que regula genes implicados en el metabolismo celular y la función y biogénesis mitocondrial (Wu Z et al., 1999). Durante el proceso de biogénesis es de gran importancia el papel que juegan las especies reac-



tivas de oxígeno (Lee HC et al., 2000; Lee HC et al., 2002), la dinámica mitocondrial (López-Lluch G et al., 2008) y la estructura de los microtúbulos (Karbowski M et al., 2001). Todos estos estudios muestran la importancia de estos tres factores en la regulación del volumen de organelas en la célula.

La proliferación (biogénesis) y degradación (mitofagia) de las organelas depende de su estado funcional o del estado energético celular (Twig G et al., 2008). Ambos eventos y su equilibrio regulan de forma muy fina el volumen mitocondrial por célula. Una desorganización en estos procesos está a menudo relacionada con un acúmulo de mitocondrias. La proliferación mitocondrial es una manifestación común encontrada en ciertos pacientes con miopatías mitocondriales y en el músculo de individuos ancianos, siendo la responsable de la presencia de FRR en el músculo esquelético. El aumento del número de mitocondrias tiene como resultado un incremento de la capacidad OXPHOS en la célula, en un intento de compensación de los niveles de ATP deficitarios (Moraes CT et al., 2008).

#### **4 Estrés oxidativo y biogénesis mitocondrial**

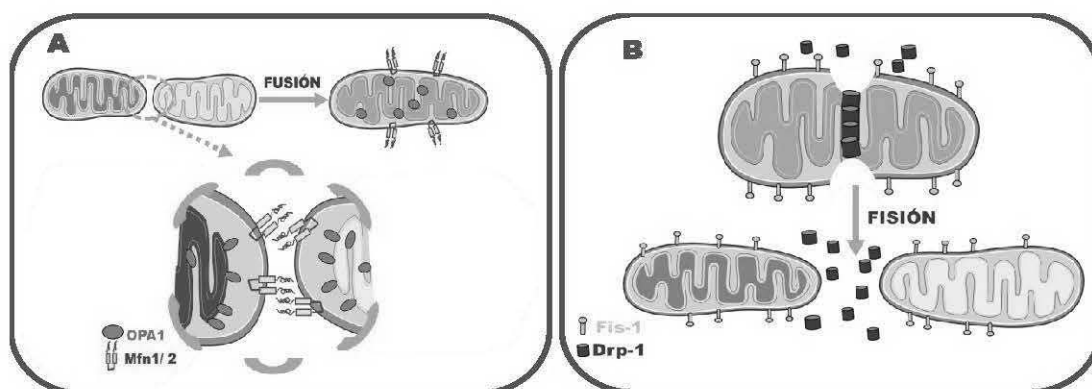
En la mitocondria se generan la mayoría de especies reactivas de oxígeno (ROS) como subproducto de la fosforilación oxidativa. Cuando la cadena respiratoria funciona correctamente, la mayoría del oxígeno consumido por la mitocondria es convertido en H<sub>2</sub>O, proceso que ocurre en el complejo IV, y la generación de ROS se presenta en un bajo porcentaje (~4-5%). Se sabe que, del 1 al 3% del oxígeno consumido por la mitocondria no es completamente reducido, generándose radicales de oxígeno (Boveris A & Chance B, 1973). En condiciones normales son neutralizados por enzimas antioxidantes, que actúan como un mecanismo de protección celular. La generación de estos radicales ocurre porque los complejos I (Boveris A & Chance B, 1973; Liu Y et al., 2002) y III (Boveris A & Chance B, 1973; Nohl H et al., 2003) pueden donar un electrón directamente al oxígeno generando el ion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), un potente agente oxidante. Este ion puede ser detoxificado por la enzima Mn-superóxido dismutasa (Mn-SOD) o la enzima Cu/Zn-superóxido dismutasa (Cu/Zn-SOD) que cataliza la conversión del O<sub>2</sub><sup>-</sup> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El peróxido de hidrógeno se puede convertir en agua por la enzima glutatión peroxidasa (GSH-PX) y/o la enzima catalasa, o puede atravesar la membrana mitocondrial hacia el citoplasma (Antunes F & Cadenas E, 2000) y si hay metales de transición reducidos en la matriz (por ejemplo, Fe<sup>2+</sup>) puede generar el radical hidroxilo (OH<sup>•</sup>), altamente reactivo. Cuando la producción de radicales libres es excesiva, los mecanismos de protección son insuficientes y se produce daño oxidativo mitocondrial, a nivel del ADNmt, lípidos de membrana y proteínas mitocondriales; por este motivo las defensas enzimáticas se encuentran presentes tanto dentro como fuera de la organela. El ADNmt es particularmente sensible a los ROS, ya que no dispone de la protección con histonas que posee el ADNn, ni tampoco de intrones así como de mecanismos tan desarrollados de reparación, lo que hace que las alteraciones genéticas que puedan resultar puedan ser deletéreas. Aunque es la mitocondria el orgánulo que genera más cantidad de ROS, la célula contiene oxidasas localizadas en el retículo endoplasmático, en los peroxisomas y asociadas a la membrana plasmática que también generan radicales libres.

Los ROS actúan en la célula como "segundos mensajeros" regulando numerosos procesos a través de la modificación de la expresión de proteínas o la variación de sus modificaciones post-traduccionales, así como

alterando su estabilidad. Ejemplos de estos cambios son la capacidad de los ROS para imitar y amplificar la acción de factores de crecimiento, activar kinasas (tirosina-kinasa, MAP-kinasas) y tirosina-fosfatasa o controlar la actividad de proteinasas. Numerosos factores de transcripción como NF- $\kappa$ B, AP-1, Nrf2, HIF-1 $\alpha$ , Hic5 y p53 se ven afectados por los ROS, además de modificar la actividad de proteínas involucradas en el transporte, especialmente aquellas que forman parte de canales de K<sup>+</sup> y Ca<sup>+</sup> (Trachootham et al., 2008; Bartosz G, 2009). En relación a la proliferación mitocondrial y a la producción de especies reactivas de oxígeno, se ha visto que el tratamiento de fibroblastos con bajas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce proliferación mitocondrial, como un evento molecular temprano ligado al estrés oxidativo generado (Lee HC et al., 2000; Lee HC et al., 2002; Lee CF et al., 2005).

## 5. Dinámica mitocondrial

Las mitocondrias no permanecen estáticas dentro de las células, al contrario, se mueven, cambian de tamaño y forma, se fusionan unas con otras o se dividen en otras más pequeñas encontrándose por tanto bajo repetidas rondas de fusión y fisión (Bereiter-Hahn J & Voth M, 1994). De esta forma se ha acuñado el término “dinámica mitocondrial” para englobar, al menos, tres procesos distintos: a) el remodelado del retículo mitocondrial mediante procesos de fusión/fisión, el cual se encuentra estrechamente vinculado al estado metabólico celular y es controlado por la actividad de un grupo de GTPasas relacionadas con la familia de las dinaminas y que manifiestan efectos opuestos (Fig. 4) b) la motilidad mitocondrial subcelular, particularmente relevante en células polarizadas y que corresponden al desplazamiento de las mitocondrias dependiente de las proteínas kinesina 1 y 3 y de adaptadores Milton y Miro (Hirokawa N & Takemura R, 2005), lo que asegura el suministro local de ATP en procesos biológicos con elevados requerimientos energéticos y el uso de estos organelos como tampones de calcio (Hollenbeck PJ & Saxton WM, 2005) y c) el remodelado de la ultraestructura mitocondrial y la condensación de su matriz, procesos considerados básicamente como un reflejo del estado metabólico mitocondrial (Scalettar BA et al., 1991).



**Figura 4. Fusión y fisión mitocondrial. (A) Representación del proceso de fusión mitocondrial.** Mfn1/2 son proteínas mitocondriales localizadas en la membrana mitocondrial externa (color morado) con un dominio GTPasa citosólico. El extremo C-terminal media la oligomerización entre moléculas de Mfn1/2 de mitocondrias adyacentes. OPA1 (elipse azul) es una GTPasa del espacio intermembrana. Mfn1/2 y OPA1 coordinan la fusión mitocondrial como se muestra en la figura: la mezcla de una matriz roja con una amarilla da lugar a una naranja. **(B) Representación del proceso de fisión mitocondrial.** Fis1 se localiza por toda la membrana externa mitocondrial de manera uniforme al contrario que Drp1 que está presente principalmente en el citosol y de forma puntual en la mitocondrias. En las zonas de la mitocondria donde se localiza Drp1 comienza la fisión mitocondrial.

Así un ejemplo de la interrelación entre los distintos estados funcionales de la mitocondria y su ultraestructura es el remodelado de las crestas mitocondriales observado en las transiciones entre los diferentes estados respiratorios o durante la apoptosis (Germain M et al., 2005). La dinámica mitocondrial es esencial para la segregación y la transmisión de las mitocondrias durante la mitosis. El proceso de fisión mitocondrial es un evento temprano de la mitosis que permite la distribución estocástica de las organelas (Margeanatu DH et al., 2000; Martínez-Díez M et al., 2006).

El balance entre la fusión y la fisión es necesario para una función mitocondrial y celular normal. Mediante la fusión se forman redes tubulares que permiten el intercambio de lípidos de membrana y contenidos mitocondriales mejorando así la actividad de las mitocondrias. Una continuidad física dentro de los filamentos mitocondriales puede ser beneficioso en términos de una mayor producción de ATP y amortiguamiento de calcio, permitiendo el intercambio de nutrientes y proteínas, así como un buen gradiente electroquímico, mientras que la fisión permite eliminar componentes dañados de manera irreversible. De esta forma se disminuye el porcentaje de mitocondrias defectuosas y se aumenta la estabilidad de la proliferación celular. Dada la importancia de la generación de energía para el funcionamiento celular y su dependencia de la distribución mitocondrial, el equilibrio entre la fisión y la fusión es fundamental. Un desequilibrio en este proceso disminuye la eficiencia del funcionamiento mitocondrial y aumenta el riesgo de muerte celular. La distribución mitocondrial es regulada por el citoesqueleto y proteínas asociadas. Esto permite aumentar la concentración de mitocondrias en las regiones celulares con mayor requerimiento energético. El transporte mitocondrial en las células de mamíferos depende del citoesqueleto de actina y de los microtúbulos. Por tanto, ni la distribución ni la apariencia de las mitocondrias en las células pueden estar al azar y sin control. La interrupción de la fusión hace que la red tubular normal se fragmente en varillas cortas o esferas y se produzca la reducción del consumo de oxígeno mitocondrial y el metabolismo energético, pudiendo afectar la propagación de ondas de calcio a la célula (Frieden M et al., 2004). Por el contrario, la interrupción de la fisión genera túbulos alargados, interconectados que a menudo se agrupan perinuclearmente y como consecuencia se produce un daño mitocondrial debido a una reducción del  $\Delta\Psi_m$ , un incremento en los niveles de ROS y una disminución de la mitofagia (Seo AY et al., 2010). Además de la regulación de la morfología mitocondrial, ahora está claro que la dinámica mitocondrial juega funciones adicionales en la función mitocondrial como la regulación del metabolismo, la producción energética y de ROS y la apoptosis, entre otros procesos celulares (Chen H & Chan D, 2005; Chan DC et al., 2006).

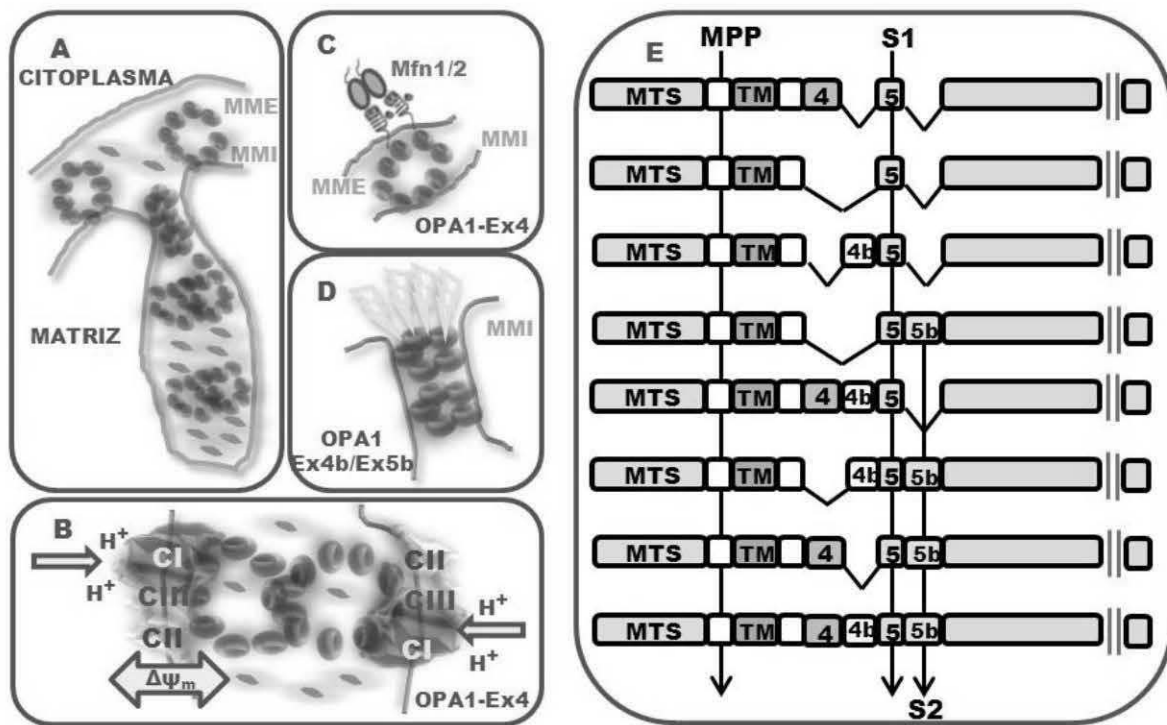
La fusión mitocondrial es un proceso en dos etapas, donde la fusión de las membranas mitocondriales exterior e interior son dos acontecimientos separables (Malka F et al., 2005). Esto es debido a que las proteínas más relevantes involucradas en dicho proceso tienen distinta sublocalización mitocondrial: Mitofusina 1 y 2 (Mfn1 y Mfn2) se encuentran en la membrana externa mitocondrial y explicarían la fusión de la membrana externa y OPA1 (*Optic Atrophy1*, proteína de la atrofia óptica 1) que se encuentra en la membrana interna, espacio intermembrana y en la base de los pliegues de las crestas (Misaka T et al., 2002; Olinchon A et al., 2002; Satoh M et al., 2003), participaría en la fusión de la membrana interna. Las 3 proteínas pertenecen a una superfamilia de dinaminas con un dominio GTPasa transmembrana cuya actividad es crucial para la

actividad de fusión. Mfn2 a diferencia de Mfn1 tiene funciones pleiotrópicas, estando involucrada en distintas funciones celulares claves como son el metabolismo oxidativo, ciclo celular, muerte celular y el transporte axonal mitocondrial (Bach D et al., 2003; Santel A et al., 2003). Estas funciones adicionales explicarían la participación específica de Mfn2 en patología pero no la de Mfn1 puesto que mutaciones en Mfn2 causan la enfermedad de Charcot-Marie Tooth tipo 2A (enfermedad neurodegenerativa autosómica dominante) (Zuchner S et al., 2004). OPA1 fue ampliamente estudiada es este trabajo por lo que le dedicamos un amplia apartado más adelante. El proceso de fisión mitocondrial ocurre habitualmente en todas las células en condiciones normales para mantener en equilibrio la dinámica mitocondrial. Las principales proteínas que controlan la fisión mitocondrial y peroxisomal en células eucariotas son Drp1 y Fis1 (Smirnova E et al., 1998; James DI et al., 2003). Drp1 es una proteína relacionada con las dinaminas y localizada en el citosol, que requiere la interacción con una proteína que esté anclada a las membranas mitocondriales o peroxisomales para poder llevar a cabo su función. La proteína de membrana que interactúa con Drp1 es Fis1, aunque diversos estudios confirman la presencia de dos proteínas adaptadoras (Mdv1 y Caf4) para enlazar indirectamente con Fis1 (Tieu Q et al., 2002; Griffin EE et al., 2005). Por lo tanto, Drp1 está en constante cambio desde el citosol a la mitocondria (Lee YJ et al., 2004). En condiciones basales el reclutamiento de Drp1 desde el citosol a la mitocondria está vehiculizado a través de los microtúbulos pero cuando la fisión es inducida el reclutamiento está mediado por el citoesqueleto de F-actina (De Vos KJ et al., 2005). Por lo tanto parece que los componentes del citoesqueleto necesarios para reclutar Drp1 varían dependiendo de si Drp1 cataliza la fisión mitocondrial basal o inducida (Smirnova E et al., 2001)

## 5.1. OPA1

OPA1 es una GTPasa perteneciente a la familia de las dinaminas involucrada en la respiración mitocondrial, en la dinámica de las mitocondrias y en la apoptosis. En humanos, el gen de *OPA1* consta de 31 exones que abarcan 100 Kb de la región telomérica del cromosoma 3. Mutaciones en *OPA1* han sido asociadas con la atrofia óptica dominante o DOA (*Dominant Optic Atrophy*), una neuropatía óptica de herencia dominante. Su expresión es ubicua pero cuantitativamente variable dependiendo del tejido analizado, con una mayor expresión en la retina, cerebro, testículos, hígado, corazón, músculo esquelético y páncreas (Alexander C et al., 2000; Delettre C et al., 2000; Olichon A et al., 2007b). *OPA1* presenta un dominio amino-terminal peculiar que incluye una pre-secuencia que le confiere la localización mitocondrial, que es eliminada por la peptidasa de procesamiento mitocondrial una vez que está dentro del orgánulo. *OPA1* tiene una modificación postraduccional muy compleja. Los ARNm transcritos de *OPA1* son diferentes en su región 3'-UTR y mediante el splicing alternativo de los exones 4, 4b y 5b (incluyéndolos o excluyéndolos) se generan 8 isoformas (Delettre C et al., 2001; Guillery O et al., 2008; Olichon A et al., 2007a). Las isoformas que a lo largo de la evolución han conservado el exón 4 modulan la fusión mitocondrial y mantienen el potencial de membrana, mientras que las isoformas que contienen el exón 4b y el 5b controlan la liberación del citocromo c y esto representa un paso específico de regulación de la apoptosis. Para hacer la situación más compleja, *OPA1* también es regulada por escisión proteolítica de su región amino-terminal que incluye los exones 4, 4b y 5b. Se han identificado dos de los sitios de corte de *OPA1*, denominados S1 y S2, que se localizan en los exones 5 (S1)

y 5b (S2). La primera escisión que se produce en OPA1 genera las isoformas L. El segundo corte ocurre en tres sitios diferentes, generándose las isoformas S. Análisis, mediante western-blot, de las distintas isoformas de OPA1 han mostrado 5 bandas de pesos moleculares que varían desde 96 a 84 KDa. Las dos bandas de mayor peso molecular son denominadas isoformas largas o isoformas L (L1 y L2) y las 3 isoformas de menor peso molecular o cortas son denominadas isoformas S (S3, S4 y S5), que surgen como resultado de un procesamiento proteolítico de las isoformas L (Ishihara N et al., 2006).



**Figura 5. Estructura, función e isoformas de OPA1 y posibles proteínas asociadas.** (A) Representación esquemática del papel de OPA1 en la estructura de las crestas y la interacción entre la membrana mitocondrial externa (MME) e interna (MMI). Las esferas rosa, ancladas a la membrana, representan las isoformas L de OPA1; Las esferas verde, que no interactúan con la membrana, representan las isoformas S de OPA1. Las esferas rojas representan las isoformas de OPA1 que forman la unión de las crestas. El citocromo c, representado como elipses naranjas está presente en el volumen de las crestas. (B) Las isoformas L y S de OPA1 que incluyen el exón 4, son requeridas para la estructura de las crestas y para interactuar con los complejos I, II y III para promover la transferencia de electrones en la MMI y mantener el  $\Delta\Psi_m$ . (C) Las isoformas-S de OPA1 (esferas verdes) interactúan con mitofusinas (ancladas en la MME) y con las isoformas L, incluyendo el exón 4 (esferas rosa), para promover la fusión de la red mitocondrial. (D) Las isoformas anti-apoptóticas de OPA1 (esferas rojas), que incluyen el exón 5b y/o el exón 4b, forman una estructura que impide la salida del citocromo c. Estas isoformas son el blanco de la proteína pro-apoptótica BH3 (rayos de color amarillo) que dismantelan la estructura de unión de las crestas y permiten la salida del citocromo c al citosol. (E) Esquema de las ocho isoformas de ARNm de OPA1. Las distintas isoformas difieren en la presencia o ausencia de los exones 4, 4b y 5b. El corte de la secuencia de localización mitocondrial (MTS) por MPP (peptidasa de procesamiento mitocondrial) conduce a las isoformas largas. Escisiones adicionales en los sitios S1 (exón 5) o S2 (exón 5b) conduce a las isoformas cortas. TM, transmembrana.

Hasta la fecha se han identificado tres tipos de proteasas en mamíferos, que rompen OPA1 en diferentes extensiones: m-AAA proteasas, la proteasa i-AAA Yme1L y la proteasa PARL (Gripic L et al, 2007; Song Z et al, 2007; Guillery O et al, 2008). Específicamente, OPA1 se sitúa en espacio intermembrana mitocondrial y en el interior de las crestas (Misaka T et al., 2002; Olinchon A et al., 2002; Satoh M et al., 2003). Existe una pequeña fracción, formada por la asociación de isoformas S, unida a la membrana interna mitocondrial (Satoh M et al., 2003). El dominio C-terminal se encuentra después del dominio GTPasa y se piensa que es el

dominio efector de la GTPasa (GED o dominio de montaje). Se cree que ambos dominios son los responsables de la formación de complejos homotípicos entre distintas moléculas de OPA1. El dominio GED podría ser el responsable de la interacción de OPA1 con las proteínas de membrana mitocondrial externa Mfn1 y Mfn2 (Cipolat S et al, 2004). OPA1 es requerida para el mantenimiento integro de la cadena respiratoria. Físicamente, OPA1 interactúa con los complejos I, II y III, pero no con el IV. Esto sugiere una posible unión entre la estructura de las crestas y la organización de los complejos I y III que intercambian electrones a través de la membrana, mientras que la transferencia de electrones del complejo III al IV ocurre fuera de la membrana mitocondrial interna vía citocromo c (Zanna C et al., 2008). Por lo tanto parece que OPA1 mantiene la integridad de la membrana interna mitocondrial, impidiendo la pérdida de protones y facilitando el transporte de electrones entre los complejos. Alteraciones en OPA1 conducen a la disipación del potencial de membrana mitocondrial y consecuentemente se disminuye el proceso de fusión (Legros F et al., 2002) Mitochondrias que tiene afectada la actividad de OPA1, con una disminución en el potencial de membrana y un reducido índice de fusión, pueden ser conducidas a una activa degradación por autofagia. (Twig G et al., 2008). Si se recupera el potencial de membrana se restaura la red mitocondrial y se produce una re-expresión de las isoformas largas, por lo tanto parece que dichas isoformas son cruciales para que OPA1 medie la fusión mitocondrial mientras que las isoformas pequeñas no son capaces de fusionar mitocondrias.

## **6. El citoesqueleto y su relación con la biogénesis mitocondrial**

El citoesqueleto es una compleja estructura intracelular de filamentos proteicos que se extiende por todo el citoplasma y que contribuye a determinar la forma y el tamaño celular. Interviene en multitud de procesos celulares que involucran el desplazamiento de vesículas de secreción, el movimiento de orgánulos, el transporte intracelular de sustancias, así como la división celular (mitosis y meiosis). Además, participa en la estructura interna de los cilios y los flagelos. La organización del citoesqueleto está basada en la interacción de un conjunto de proteínas, las cuales se asocian y forman una red intracelular tridimensional sumamente dinámica, que se reorganiza de manera continua a medida que la célula cambia de forma, se divide y responde a su medio ambiente. El citoesqueleto de las células eucariotas está basado principalmente en tres tipos de filamentos: microfilamentos o filamentos de actina, filamentos intermedios y microtúbulos.

### **6.1 Microfilamentos o filamentos de actina**

Los microfilamentos o filamentos de actina son polímeros de subunidades monoméricas de alfa ( $\alpha$ ) y beta ( $\beta$ ) actina. Las moléculas de actina o bien se encuentran formando parte de los filamentos (F-actina) o disueltas en el citosol (G-actina). La proporción F-actina/G-actina varía según las necesidades celulares, y el número y longitud de los filamentos de actina cambia por polimerización y despolimerización. Poseen entre 3 a 7 nm de diámetro, el valor más pequeño dentro de los filamentos que componen el citoesqueleto, por ello también se denominan microfilamentos. Son filamentos polarizados, poseen un extremo positivo (+) donde predomina la polimerización y otro negativo (-) donde predomina la despolimerización, creándose o destruyéndose microfilamentos continuamente. Son esenciales para la división celular ya que la separación com-

pleta de los citoplasmas de las células hijas se produce gracias a un anillo de actina.

## 6.2 Filamentos intermedios

Los filamentos intermedios se componen de proteínas en alfa-hélice agrupadas de forma jerárquica, que permiten a las células soportar tensiones mecánicas. Se denominan intermedios porque su diámetro es de aproximadamente 10 a 12 nm, que se encuentra entre los de los filamentos de actina (3 a 7 nm) y los microtúbulos (25 nm). Hay tres grandes familias de filamentos intermedios: filamentos de queratina en las células epiteliales, la vimentina y otros filamentos relacionados con la vimentina, que aparecen en las células del conjuntivo, células musculares y nerviosas, y los neurofilamentos, que se encuentran en las células nerviosas. No todas las células animales presentan filamentos intermedios. Éstos forman una red que contacta con el núcleo y se extiende hasta la periferia celular. Son flexibles y resistentes, dos propiedades óptimas para soportar las tensiones mecánicas. Además de intervenir en otros procesos celulares como lugar de anclaje de numerosas moléculas de señalización, interactúan directamente con orgánulos como las mitocondrias, el aparato de Golgi y los lisosomas, por lo que pueden afectar a su funcionamiento (Goldman RD et al., 2008) y pueden desorganizarse y volver a polimerizar bajo ciertas condiciones celulares: desplazamiento celular, división celular o cuando las fuerzas tensoras que soportan las células responden a cambios de dirección.

## 6.3 Microtúbulos o filamentos de tubulina

Los microtúbulos son estructuras tubulares que se extienden a lo largo de todo el citoplasma formados por la polimerización de un heterodímero de dos proteínas globulares, la alfa ( $\alpha$ ) y la beta ( $\beta$ ) tubulina. Estos heterodímeros se encuentran en un constante equilibrio de polimerización y despolimerización y su grado de crecimiento y acortamiento está regulado por modificaciones post-traduccionales de la  $\alpha$ -tubulina como la acetilación, fosforilación, poliglutamación, poliglicinación y detirosinación (MacRae TH, 1996), por su unión a proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) y por señales de moléculas citosólicas (Nogales E, 2000). En mamífero aparecen dos tipos de microtúbulos: microtúbulos dinámicos con una vida media de 5-10 minutos, y microtúbulos estables que tienen una vida media de horas y contienen uno o más tipos de modificaciones post-traduccionales como la detirosinación y acetilación de la  $\alpha$ -tubulina. Son los responsables de la regulación de la distribución de las mitocondrias en células de mamíferos (Heggeness MH et al, 1978). La unión entre los microtúbulos y las mitocondrias influye en la actividad respiratoria mitocondrial, fusión y fisión y en su herencia, así como la localización de mitocondrias en zonas de alto requerimiento energético, metabolitos y generación de ROS, homeostasis del  $\text{Ca}^{+2}$  y/o la diseminación de factores proapoptóticos (Boldogh IR, 2007). La interacción de los microtúbulos con las mitocondrias se realiza a través de dos proteínas motoras (quinesina y dineína) que aprovechan la hidrólisis de ATP para generar energía mecánica y desplazar sustancias sobre los microtúbulos. Si el contacto entre las mitocondrias se pierde como resultado de una despolimerización de los microtúbulos, se produce una alteración que conduce a un fallo mitocondrial, principalmente en su biogénesis. En cuanto a su relación con la biogénesis mitocondrial, se ha visto que el tratamiento de células con estabilizadores de microtúbulos (como el taxol, la herbinicina A o la leflunomida) induce

proliferación mitocondrial (Spodnik JH et al, 2002). Además, Arany y colaboradores (Arany Z et al, 2008) observaron que con una pequeña concentración de inhibidores de microtúbulos se induce la expresión de PGC-1 $\alpha$ .

### 6.3.1 Acetilación y deacetilación de $\alpha$ -tubulina

El primer hallazgo de la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina fue evidenciado en el alga unicelular *Polytomella* (L'Hernault SW & Rosenbaum JL, 1985). Dicha modificación también ha sido observada en vertebrados, insectos, nemátodos y plantas y todos ellos presentan acetilación en el grupo  $\epsilon$ -amino de la lisina 40. En general, la acetilación suele suceder casi de inmediato, y algunos autores han encontrado una correlación entre la acetilación de  $\alpha$ -tubulina y la estabilidad de los microtúbulos (Takemura R et al., 1992). Los microtúbulos estables suelen ser resistentes a drogas desestabilizantes de microtúbulos (LeDizet M & Piperno G, 1987) debido a la presencia de un mayor número de  $\alpha$ -tubulinas acetiladas que el resto de los microtúbulos celulares. Parece que unos niveles adecuados de  $\alpha$ -tubulina acetilada, regulados mediante un equilibrio entre su acetilación y su deacetilación, favorecen la interacción de los microtúbulos con otros elementos del citoesqueleto y con distintas organelas como la mitocondria. Por ejemplo, Kinesina-1, una de las proteínas motoras del axón, presenta una alta afinidad por microtúbulos acetilados frente a los no acetilados (Reed NA et al., 2006). Neuronas que sobreexpresan una  $\alpha$ -tubulina mutada (K40A), en las que por tanto no se acetila la proteína, muestran un defecto en el tráfico neuronal basado en proteínas motoras y en la diferenciación celular (Nakata T & Hirokawa N, 2003; Creppe C et al., 2009). La depleción de MEC-17, la  $\alpha$ -tubulina acetiltransferasa ( $\alpha$ TAT), en pez cebra conduce a un fenotipo con defectos neuromusculares (Akella J et al., 2010). Las enzimas encargadas de la deacetilación de  $\alpha$ -tubulina son las histonas deacetilasas HDAC6 y Sirt2 (Hubbert C et al., 2002; North BJ et al., 2003). En mamíferos, las histonas deacetilasas han sido identificadas y clasificadas en cuatro clases: las HDACs de clase I (HDAC1-3, HDAC8) están presentes en el núcleo a excepción de HDAC3 que está presente tanto en núcleo, citoplasma y asociado a membranas. Las HDACs de clase II entran y salen del núcleo dependiendo de las señales que reciban, y se han dividido a su vez en dos subclases. La clase IIa comprende HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9 y la clase IIb HDAC6 y HDAC10 (Schultz BE et al, 2004; Verdin E et al, 2003; Yang XJ & Gregoire S, 2005). La clase III de HDAC está formada por una familia de proteínas NAD<sup>+</sup>-dependientes conocidas como sirtuinas (Sirt1-7). La cuarta clase de HDACs está formada por solo un miembro, HDAC11, que tiene en común tanto con las HDAC de clase I como con las de clase II sus regiones catalíticas centrales.

### 6.3.2 Histona deacetilasa 6 (HDAC6)

HDAC6 es un miembro de la clase IIb de la gran familia de las histonas deacetilasas cuyo principal sustrato *in vivo* es la  $\alpha$ -tubulina aunque, en menor medida, también actúa sobre Hsp90 (proteína de choque térmico 90) y cortactina (un oncogen implicado en metástasis). *In vitro* también es capaz de deacetilar histonas (Zhang Y et al, 2003). HDAC6 es la única histona deacetilasa que posee dos dominios funcionales con actividad deacetilasa y un motivo de dedo de zinc. Juega un papel importante en la regulación redox y en la



tolerancia al estrés puesto que es capaz de deacetilar peroxiredoxinas, enzimas antioxidantes tiol-dependientes, presentes en todos los organismos, cuya función biológica es la reducción de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y peróxidos orgánicos (ROOH), a expensas de un reductor que en general es glutatión o tioredoxina (Parmigiani RB et al, 2008). HDAC6 está implicada en la regulación y funcionalidad de los microtúbulos, en el mantenimiento del citoesqueleto de actina y es un master regulador en el proceso de eliminación de agregados de proteínas mal plegadas (Li G et al., 2011). Además se sabe que los niveles de HDAC6 tienen un papel fundamental en la modulación del ciclo celular (Yuan LL et al., 2012). El quelante del Zn<sup>+2</sup>, tricostatina A (conocido como TSA) inhibe de manera reversible la actividad deacetilasa de HDAC6 (Haggarty SJ et al, 2003; Jose B et al, 2004; Brush MH et al, 2004) mientras que el *Epidermal Growth Factor* (EGF) la activa (Wang J et al, 2010).

### 6.3.3 HDAC6 y su relación con Hsp27


Hsp27 ("*Heat shock protein 27*") pertenece a la familia de proteínas de choque térmico que participa en varios procesos celulares entre los que destaca su implicación en la muerte celular mediada por mitocondria (Bruey JM et al, 2000). Actúa como chaperona en condiciones de estrés oxidativo, además de presentar propiedades anti-apoptóticas relacionadas con la supervivencia neuronal (Stetler RA et al., 2009). Su expresión aumenta en células de mamífero cuando son expuestas a agentes citotóxicos como agentes quimioterapéuticos o citocinas; cuando son sometidas a un choque térmico o a estrés oxidativo (Landry J et al., 1989; Huot J et al., 1996; Arrigo AP et al., 2005). Actúa como modulador del citoesqueleto, tanto de los microfilamentos (Lavoie JN et al., 1993), filamentos intermedios (Perng MD et al., 1999) y los microtúbulos (Hino M et al., 2000) de manera que pequeños oligómeros de Hsp27 mantienen su integridad. Se ha observado una disminución de la expresión de Hsp27 en células portadoras de la mutación m.8344A>G (Chen CY et al., 2011) debido a una alteración de la actividad autofágica-lisosomal. En otros estudios se ha observado que una disminución de Hsp27 está relacionada con la degradación de HDAC6, STAT2 (traductor de señales y activador de la transcripción 2) y procaspasa-3, tres polipéptidos que están implicados en la deacetilación del esqueleto, transducción de señales y apoptosis (Gibert B et al., 2012).

## 7. Ciclo celular y biogénesis mitocondrial

El ciclo celular es un complejo y ordenado conjunto de sucesos que permiten el crecimiento y división celular. Se diferencian dos estados, uno de no división o interfase y el estado de división o mitosis. La interfase, periodo en el que la célula realiza sus funciones específicas, comprende tres etapas: Fase G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub>. Durante la fase G<sub>1</sub>, la célula duplica su tamaño y volumen, acompañado de un aumento en la síntesis de proteínas y ARN. En la fase S se replica el ADN y en la G<sub>2</sub> la célula se prepara para la mitosis. El control del ciclo celular es ejercido por un grupo de proteínas quinasas dependientes de ciclina o CDKs (*Cyclin-dependent Kinases*) ya que su actividad depende de la asociación a una subunidad reguladora, denominada ciclina (Golias CH et al., 2004). Los niveles de las ciclinas fluctúan drásticamente en las distintas fases del ciclo celular. De este modo, la acumulación gradual de una ciclina y su rápida degradación tiene una gran importancia ya que así el ciclo celular sólo se mueve en una dirección. Por ser de nuestro interés, citamos a

la ciclina D1. Esta ciclina favorece la progresión celular, liberando a las células que están en fase G<sub>1</sub>, promocionando su entrada en la fase S.

Tanto la abundancia como la morfología y distribución de las mitocondrias se ve afectada durante el ciclo celular (Arakaki N et al., 2006; Lee S et al., 2007). Se ha observado un incremento en el número de mitocondrias en la fase G<sub>1</sub>/S del ciclo, además de un aumento de la actividad mitocondrial cuando las células entran en fase G<sub>1</sub> (Van den Bogert C et al., 1988; Herzig RP et al., 2000). Durante esta fase, la célula tiene una alta actividad, generando suficiente cantidad de ATP para la entrar en fase S y así poder replicar el genoma. Durante la replicación del ADN se produce una disminución en la fosforilación oxidativa. Se piensa que esta bajada de actividad es un mecanismo de protección que permite un descenso en el número de especies reactivas de oxígeno, evitando así mutaciones en el genoma nuclear, ya que en ese momento no se encuentra protegido por histonas (Chen Z et al., 2007). Por tanto parece que existe una regulación entre el metabolismo oxidativo y las funciones del ciclo celular mediado por el ambiente redox celular. Oscilaciones periódicas en el "ciclo redox", regulan la progresión del ciclo celular de quiescencia (G<sub>0</sub>) a proliferación (G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> y M). Este ciclo aumenta gradualmente hacia un ambiente más oxidante desde la fase G<sub>1</sub> hasta la fase M. Por tanto, parece que es esencial un correcto equilibrio entre la producción de ROS y su eliminación mediante enzimas detoxificadoras y pequeñas moléculas antioxidantes, ya que defectos en este proceso conduciría a una proliferación anormal, centro de una gran variedad de condiciones patológicas como cáncer, fibrosis, enfermedades cardiovasculares, diabetes y enfermedades neurodegenerativas (Sarsour EH et al., 2009).



# Hipótesis y Objetivos

---

La biogénesis mitocondrial es el proceso celular encargado de la formación de nuevas mitocondrias a partir de organelas preexistentes. Es complejo y altamente controlado. Cooperan dos genomas: el nuclear y el mitocondrial y factores, tanto exógenos como endógenos, influyen en dicho proceso. Determinadas mutaciones en el ADN mitocondrial se relacionan con la proliferación mitocondrial a nivel de músculo esquelético, durante el diagnóstico histoquímico de dicho tejido en pacientes portadores. Sin embargo, no se conoce muy bien la secuencia de eventos y los factores endógenos que se modifican y modulan en este proceso.

La hipótesis de esta tesis doctoral presupone que la proliferación mitocondrial asociada a ciertas mutaciones del ADN mitocondrial está, al menos en parte, condicionada por determinados fallos en la bioenergética mitocondrial que conducirían a una alteración de distintos procesos celulares, como la estructura de los microtúbulos, los procesos de fusión y fisión mitocondrial, la autofagia y el ciclo celular, permitiendo y favoreciendo la biogénesis de las organelas.

El **objetivo global** de este trabajo es estudiar qué factores pueden estar implicados en la inducción de la proliferación mitocondrial cuando existen mutaciones patogénicas en el ADN mitocondrial. Para ello fueron elegidos como modelo de estudio dos mutaciones: la mutación m.12300G>A, localizada en el gen que codifica el ARN<sup>t</sup><sub>eu</sub> (CUN), asociada a la presencia de FRR en la biopsia muscular del paciente y la mutación m.8993T>G, presente en el gen que codifica para la subunidad ATPasa6 del complejo V, en la que nunca se observan alteraciones histoquímicas relacionadas con la proliferación mitocondrial. Como **objetivos concretos** se plantean los siguientes:

**Demostrar** la patogenicidad de la mutación m.12300G>A, descrita por primera vez asociada a patología en humanos, haciendo estudios de funcionalidad mitocondrial en músculo, fibroblastos y en híbridos transmitocondriales.

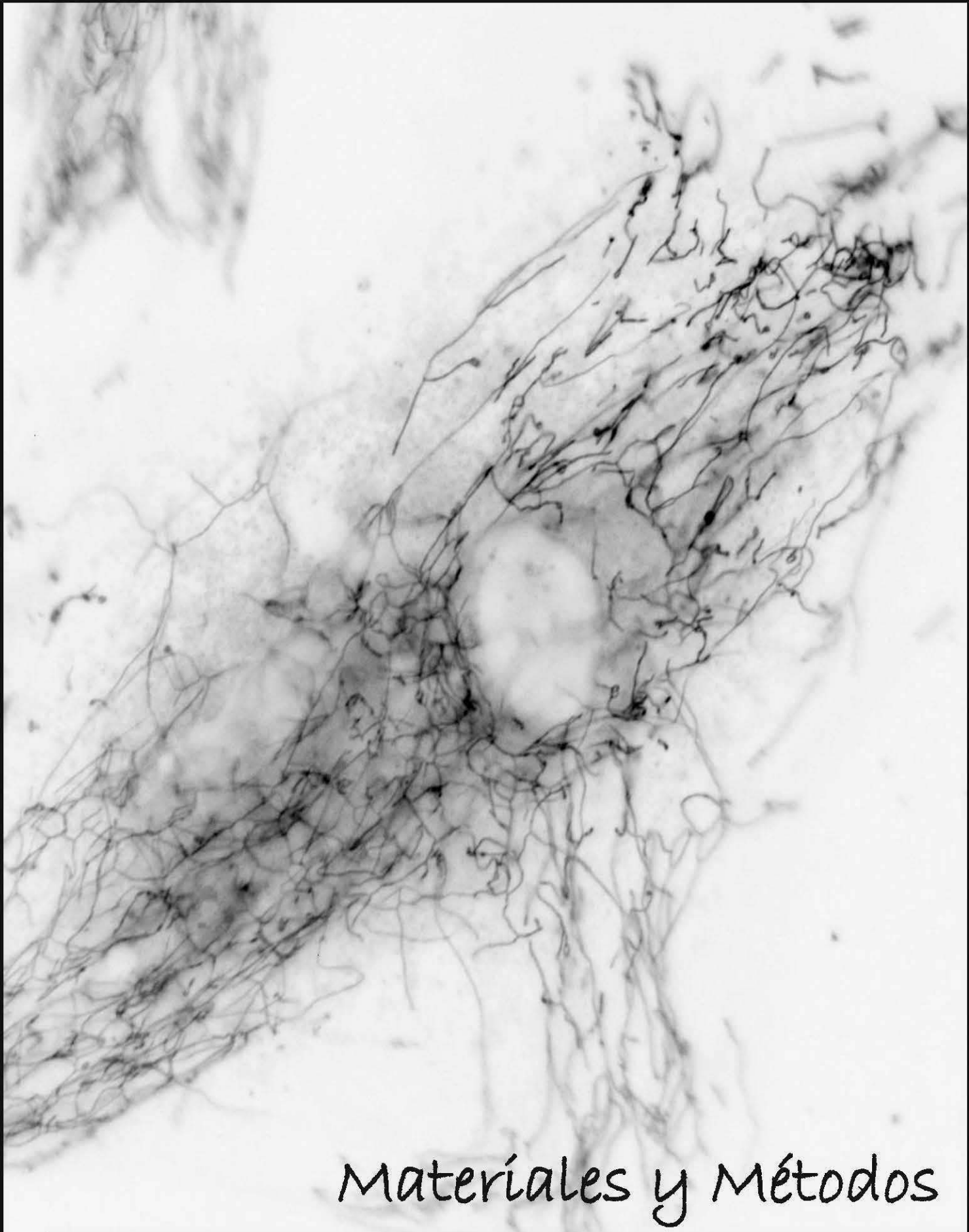
**Comprobar** si las diferencias en la proliferación mitocondrial observadas en músculo entre esas dos mutaciones se refleja también en fibroblastos portadores de las mismas.

**Determinar** si la producción de especies reactivas de oxígeno modulan la biogénesis mitocondrial. Valorar la red mitocondrial y si existen diferencias entre ambos fondos genéticos.

**Estudiar** la posible modificación de proteínas implicadas en la fusión y fisión mitocondrial en relación al proceso de biogénesis mitocondrial, analizando la influencia de la producción de ROS en este contexto.

**Analizar** la relación entre las modificaciones en el grado de acetilación de los microtúbulos y la proliferación mitocondrial, cómo influyen los niveles de ROS en estas modificaciones y como la modulación química de la acetilación modifica o no el volumen mitocondrial.

**Evaluar** si existen modificaciones en el ciclo celular que influyan en la proliferación mitocondrial y si la producción de ROS está relacionada con este proceso.



Materiales y Métodos

---

## **1. Materiales**

### **1.1 Muestras biológicas**

En este trabajo se han utilizado muestras procedentes de distintos tejidos de pacientes y controles: músculo esquelético (deltoides, bíceps brachii y bíceps femoral), sangre y piel. Las biopsias de músculo esquelético se congelaron inmediatamente tras su extracción, en nitrógeno líquido (-180 °C) y se conservaron a -80 °C hasta su análisis. Las muestras de sangre, se procesaron inmediatamente para obtener ADN total o se conservaron a -20 °C. Las líneas celulares se establecen a partir de biopsias de piel, tanto de pacientes como de controles. Dichas biopsias se procesaron inmediatamente para el cultivo de fibroblastos. Los fibroblastos obtenidos, fueron congelados en nitrógeno líquido hasta el momento de su utilización.

En todos los casos se solicitó el consentimiento informado del paciente siguiendo las normas establecidas por el comité ético del Hospital Universitario 12 de Octubre.

#### **1.1.1 Pacientes del estudio**

En este apartado hacemos una breve descripción clínica de los pacientes estudiados en este trabajo.

##### **1.1.1.1 Paciente 1 (m.12300G>A)**

La paciente es la segunda hija de padres no cosanguíneos. Durante el embarazo se observó un leve polihidramnios. Su desarrollo fue normal hasta los 4 años, cuando presentó pérdida progresiva de audición que evolucionó a sordera de origen neurosensorial durante el siguiente año. A los 6 años de edad recibió un implante coclear. En los meses siguientes desarrolló un síndrome cerebeloso y epilepsia mioclónica sin respuesta al tratamiento antiepiléptico. Además se observó un deterioro en el rendimiento psicomotor. También se detectó, tras una revisión del fondo de ojo, la existencia de retinopatía pigmentaria y pérdida de visión. El electroencefalograma (EEG) mostró un patrón difuso y de onda lenta. La tomografía computarizada mostró calcificaciones bilaterales de los ganglios de la base, particularmente en el núcleo lenticular.

A los 8 años de edad fue remitida al hospital 12 de Octubre para una evaluación adicional. En la exploración neurológica se encontró una hipotonía generalizada, rostro inexpresivo y debilidad muscular. También presentaba disartria, dismetría bilateral y marcha atáxica. Además, se observó un temblor intencional en las extremidades superiores y mioclonías multifocales múltiples. Los reflejos tendinosos profundos eran normales. Sabía leer y resolver problemas elementales. Los estudios cardiacos fueron normales. La exploración oftalmológica no mostró ptosis y la motilidad ocular extrínseca fue normal. La agudeza visual era de 0,3 en ambos ojos. Los análisis bioquímicos de rutina fueron normales, incluyendo la creatina quinasa, pero tenía hiperlactatemia (5,2 mmol/L) e hipercetonemia.

La exploración clínica de la madre evidenció la existencia de una pérdida parcial de audición de origen neurosensorial. Su hermana mayor era celiaca. Las exploraciones neurológicas, oftalmológicas y bioquímicas fueron normales en ambos casos.

### 1.1.1.2 Paciente 2 (m.8993T>G)

Se trataba de una niña que desde el primer mes de vida presentó una hipotonía generalizada y un severo retraso psicomotor. A los 4 meses de edad, durante una enfermedad febril, desarrolló acidosis metabólica, dificultad respiratoria y ataques mioclónicos generalizados. El examen neurológico mostró un bebé sin contacto visual con pequeños movimientos espontáneos y una hipotonía severa. El fondo de ojos fue normal. La concentración de lactato estaba elevada tanto en sangre (3,2 mmol/L) como en líquido cefalorraquídeo (4,8 mmol/L). La imagen de resonancia magnética mostró una hiperintensidad simétrica y bilateral de los ganglios basales implicadas en el putamen, el tálamo y el tronco cerebral. El EEG mostró un patrón enlentecido con un trazado de picos y ondas. La paciente murió por un fallo respiratorio a la edad de 6 meses, tras un rápido deterioro.

La abuela, la madre y una tía materna de la paciente eran sanas.

## 1.2 Líneas celulares

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron cultivos primarios de fibroblastos procedentes de biopsias de piel tanto de los pacientes como de controles. Para la generación de híbridos mitocondriales se usó la línea celular 143B 206 ( $\rho^0$ ) derivada de la línea de osteosarcoma humano 143B TK, células cedidas amablemente por el Dr. Rafael Garesse (IIB, Madrid), junto con la línea parental de la que deriva.

## 1.3 Reactivos, soluciones y tampones

Todos los reactivos utilizados en este trabajo fueron de grado analítico o de grado apto para la biología molecular. La composición, tanto de reactivos como de tampones empleados en los distintos experimentos aparece descrita en los métodos o bien, en la bibliografía correspondiente.

## 1.4 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo como cebadores se indican en la siguientes tabla, especificando el nombre, la secuencia en dirección 5'-3', la aplicación para la que fueron diseñados y su temperatura de *melting* ( $T_m$ ) o anillamiento.

NOMBRE	SECUENCIA	APLICACIÓN	$T_m$
12106F 12413R	5'-CAACCCCGACATCATTACCGGGT-3' 5'-GGGTTAACGAGGGTGGTAAGG-3'	PCR para la detección de la mutación m.12300A>G	60 °C 25 ciclos
12106F 12640R	5'-CAACCCCGACATCATTACCGGGT-3' 5'-CTATGATGGACCATGTAACGTAACAA-3'	PCR en fibra aislada de la mutación m.12300A>G	60 °C 30 ciclos
8579F 9950R	5'-CGCCGCAGTACTGATCATTC-3' 5'-AACCATCTACAAAATGCCAG-3'	PCR para la detección de la mutación m.8993T>G	55 °C 30 ciclos
FQF FQR	5'-AGCAGAGTACCTGAAACAGGAA-3' 5'-AGCTTAC CCATAGAGGAAACATAA-3'	Cuantificación ADNmt (control ADNmt)	60 °C 55 ciclos
ND5F ND5R	5'-AGGCGCTATCACCACTCTGTTTCG-3' 5'-AACCTGTGAGGAAAGGTATTCTCG-3'	Cuantificación ADNmt (control ADNn)	60 °C 55 ciclos

**Tabla 1. Oligonucleótidos y condiciones de la amplificación de las regiones de interés.** Los oligonucleótidos sentido se indican con la letra "F" y los oligonucleótidos antisentido se indican con la letra "R".

## 1.5 Anticuerpos

Para la valoración mediante inmunofluorescencia de distintas proteínas implicadas en la constitución del citoesqueleto y la detección de proteínas relacionadas con la dinámica mitocondrial y biogénesis mitocondrial, mediante la técnica de western-blot, se utilizaron los anticuerpos primarios que se describen en la tabla 2. Los anticuerpos secundarios usados para ambas técnicas son descritos en la tabla 3.

MARCADOR	CASA COMERCIAL	APLICACIÓN	DILUCIÓN
Anti- $\beta$ -Actina (ratón mAb IgG1)	Sigma Aldrich	Western-blot	1/5000
Anti-LC3B (conejo mAb IgG)	Sigma Aldrich	Western-blot	1/5000
Anti-Drp1 (conejo mAb IgG)	Cell Signaling	Western-blot	1/1000
Anti-Fosfo-Drp1-Ser616 Anti-Fosfo-Drp1-Ser637 (conejo mAb IgG)	Cell Signaling	Western-blot	1/1000
Anti-Fis1 (conejo pAb IgG)	Thermo Scientific	Western-blot	1/5000
Anti-HDAC6 (conejo pAb IgG)	Calbiochem	Western-blot	1/500
Anti-HDAC6 (ratón mAb IgG1 Kappa)	Sigma Aldrich	Inmunofluorescencia	1/400
Anti-Hsp27 (ratón mAb IgG1)	Santa Cruz Biotechnology	Western-blot	1/250
Anti-CyclinD1 (conejo mAb IgG)	Santa Cruz Biotechnology	Western-blot	1/500
Anti-Mfn1 (conejo pAb)	Millipore	Western-blot	1/2000
Anti-Mfn2 (ratón mAb IgG2a)	Santa Cruz Biotechnology	Western-blot	1/250
Anti-OPA-1 (ratón mAb IgG1)	BD Bioscience	Western-blot	1/5000
Anti-OPA-1 (ratón mAb IgG2a Kappa)	Sigma Aldrich	Western-blot	1/1000
Anti- $\alpha$ -Tubulina (ratón mAb IgG1)	Sigma Aldrich	Western-blot / Inmunofluorescencia	1/5000 1/5500
Anti- $\alpha$ -Tubulina acetilada (ratón mAb IgG2b)	Sigma Aldrich	Western-blot / Inmunofluorescencia	1/1500 1/1500

**Tabla 2. Anticuerpos primarios.** Anticuerpos primarios usados en inmunofluorescencia y western-blot. Se indica el animal donde fueron hechos, isotipo, casa comercial y dilución de cada anticuerpo. mAb: anticuerpo monoclonal; pAb: anticuerpo policlonal

ANTICUERPO SECUNDARIO	HECHO EN	RECONOCE	CASA COMERCIAL	APLICACIÓN	DILUCIÓN
Dylight™ 488	Burro	Anti IgG de ratón	Jackson ImmunoResearch	Inmunofluorescencia	1/500
Acoplado a peroxidasa (HRP conjugated)	Burro	Anti IgG de ratón	Millipore	Western-blot	1/5000
Acoplado a peroxidasa (HRP conjugated)	Burro	Anti IgG de conejo	Millipore	Western-blot	1/2500

**Tabla 3. Anticuerpos secundarios.** Se indica el animal donde fueron hechos, animal e isotipo que reconocen, casa comercial, aplicación (inmunofluorescencia o western-blot) y dilución de cada anticuerpo.



## **2. Métodos**

### **2.1 Análisis genético del ADNmt**

A continuación se describen los métodos utilizados en el análisis del ADNmt de los pacientes del estudio.

#### **2.1.1 Extracción del ADN**

Se realizó la extracción del ADN total de diferentes tejidos: músculo esquelético, sangre y fibroblastos. Para la extracción del ADN de músculo esquelético se siguió el método descrito (Sambrook J & Russell D, 2000), con algunas modificaciones. Se partió de una cantidad variable de tejido congelado que se trituró en un mortero, evitando la descongelación. El pulverizado se depositó en tubo de polipropileno de 2 mL, al que se añadieron 180 µL de tampón TSE (Tris-HCl 100 mM pH=7,4, ClNa 10 mM, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 25 mM) y 20 µL de solución acuosa de proteinasa K (20 mg/mL). Se centrifugó brevemente a 14.000 rpm, se mezcló e incubó 5 minutos a 55 °C. Se añadieron otros 180 µL de tampón TSE, 20 µL de proteinasa K y 40 µL de dodecil sulfato sódico (SDS). Se mezcló e incubó 60 minutos a 55 °C. Posteriormente, se añadió 20 µL de proteinasa K y se incubó de nuevo a 55 °C durante 30 minutos. Se incorporaron 50 µL de ClNa 5 M, se mezcló, y se añadió 1 mL de una mezcla de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico en proporción 25: 24: 1. Se agitó y se centrifugó a 14000 rpm brevemente para separar las fases. Se recogió el sobrenadante y se lavó dos veces con 1 mL de éter dietílico. Una vez evaporado el éter, se añadieron 1,5 mL de etanol al 98%, lo que provocó el precipitado de las hebras de ADN, que se recogieron en un eppendorf de 1,5 mL estéril. Se eliminó el resto de etanol en un evaporador de vacío y el ADN se disolvió en 50-100 µL de Tris-EDTA (TE) 1X estéril (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH=7,4). La solución de ADN se conservó a -20 °C.

Para obtener ADN directamente de sangre se siguieron las instrucciones recomendadas por el fabricante del sistema de extracción nucleon BACC3 (Amersham Pharmacia Biotech), cuyo fundamento es la precipitación de proteínas con perclorato sódico y su separación del ADN mediante cloroformo y una resina patentada.

Para extraer el ADN de los fibroblastos, cibridos o sus líneas parentales éstos se tripsinizaron y lavaron 2 veces con PBS y se procedió a su extracción con el kit QIAamp® DNA Mini siguiendo las instrucciones del fabricante (QIAGEN GmbH).

La concentración de los ADN obtenidos fue determinada mediante espectrofotometría, determinando la absorbancia de las muestras a 260 nm y a 280 nm, a fin de valorar también la pureza de las mismas.

#### **2.1.2 Estudio y secuenciación del ADNmt**

Tras descartar la presencia de deleciones únicas o múltiples en el ADNmt de los pacientes mediante la técnica del Southern Blot (Campos Y et al, 1996), se procedió a la detección de las mutaciones puntuales más frecuentes en el ADNmt mediante la amplificación de una región de dicho genoma con la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) y análisis de restricción de los fragmentos generados tras una digestión enzimática (RFLP), según los métodos descritos en cada una de ellas: A3243G (Goto Y et al., 1990), A8344G

(Shoffner JM et al, 1990), T9176C (Thyagarajan D et al, 1995), T8993G (Holt IJ et al, 1990), T8993C (De Vries DD et al, 1993).

La secuenciación completa del ADNmt se realizó mediante la amplificación de fragmentos solapantes, utilizando un conjunto de oligonucleótidos específicos diseñados de acuerdo con la versión revisada de la secuencia de referencia del ADN mitocondrial humana de Cambridge. Los productos de PCR fueron secuenciados en un secuenciador Applied Biosystems 3730xl ADN Analyser con el kit de ciclo de secuenciación de ADN BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems).

### 2.1.3 Detección mediante PCR y RFLP de la mutación G12300A

Esta mutación consiste en una transición G>A localizada en la posición 12300 de la secuencia consenso del ADNmt, en el gen que codifica para el ARNt<sup>Leu (CUN)</sup> (*MT-TL2*). Como consecuencia de esta mutación se pierde un sitio de restricción para la enzima HaeIII que reconoce la secuencia 5'-GGCC/CCGG-3'. Para identificar la presencia de la mutación m. 12300G>A, tanto en las muestras de pacientes como de controles, se amplificó mediante PCR un fragmento de 307 pb, utilizando para ello los oligonucleótidos 12123F y 12406R con las condiciones descritas en la Tabla 1.

Con el fin de evitar un error de cuantificación debido a la formación de heteroduplex, tras la PCR se realizó, previa desnaturalización de los fragmentos amplificados, un ciclo de marcaje radiactivo, añadiendo 5 µCi de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP, 100 pmoles de cada oligonucleótido y 2,5 U de Taq polimerasa. Las condiciones del marcaje fueron las siguientes: 2 minutos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C y 12 minutos a 72 °C. 10 µL del producto de amplificación fueron digeridos con la enzima HaeIII, durante 2 horas a 37 °C. Como consecuencia de la digestión se generaron dos fragmentos de 194 y 113 pb en las muestras control. Estos fragmentos fueron separados mediante electroforesis en un gel de acrilamida-bisacrilamida al 8%. Tras la electroforesis el gel fue secado mediante vacío y se expuso a una placa radiográfica. La señal de cada banda se cuantificó mediante densitometría con el software Quantity One (Bio-Rad).

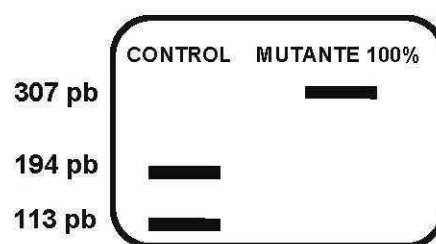


Figura 6. Patrón de restricción de la mutación m. 12300G>A en el gen ARNt<sup>Leu (CUN)</sup>. La enzima HaeIII corta en los controles y no lo hace en una muestra 100% mutante

### 2.1.4 Estudio de la mutación G12300A en fibra aislada a partir de la biopsia de músculo esquelético. PCR-RFLP

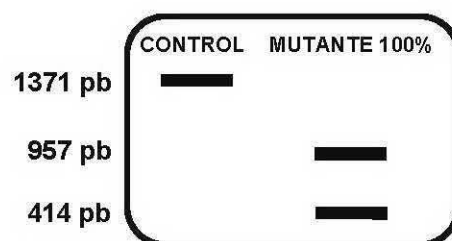
A partir de la biopsia muscular se obtuvieron secciones de 30 micras que fueron cortadas y depositadas en un portaobjetos tratado previamente con polilisina al 0,2%. El portaobjetos se colocó en una placa Petri a

la que se le añadió etanol al 50%. La recogida de la fibra se hizo con la ayuda de micropipetas de vidrio case-  
 ras utilizando un microscopio invertido. Una vez seleccionadas, las fibras se depositaron en un tubo de PCR  
 de 250  $\mu$ L con 20  $\mu$ L de agua estéril. Estos tubos fueron centrifugados a 14000 rpm, eliminándose el agua  
 con una pipeta. Tras este paso se procedió a la extracción del ADN total. Para ello se añadieron 5  $\mu$ L de una  
 solución de lisis (200 mM KOH, 50 mM DTT (ditiotreitól), en una proporción 9:1) y se incubó durante 1 hora a  
 65 °C. Pasado el tiempo de incubación se añadieron 5  $\mu$ L de tampón neutralizante (900 mM de Tris-HCl pH=  
 8,3 y 200 mM de HCl) y se realizó la reacción de PCR, en un volumen final de 50  $\mu$ L, con los oligonucleótidos  
 12106F y 12640R y con las condiciones que aparecen descritas en la Tabla 1. A partir de 30  $\mu$ L del producto  
 de PCR se realizó un marcaje radiactivo en el último ciclo añadiendo 2,5  $\mu$ Ci (Ci: Curios) de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP, 70  
 pmoles de cada oligonucleótido y 2,5 U (U: Unidades) de Taq polimerasa, en un volumen final de 50  $\mu$ L. Las  
 condiciones del marcaje fueron las siguientes: 2 minutos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C y 12 minutos a 72 °C. Una  
 vez realizado el marcaje se procedió a digerir las muestras con la enzima HaeIII, durante 2 horas a 37 °C.  
 Como consecuencia de la digestión se generaron dos fragmentos de 340 y 194 pb en las muestras control.  
 Estos fragmentos fueron separados mediante electroforesis en un gel de acrilamida-bisacrilamida al 8%. Tras  
 la electroforesis el gel fue secado mediante vacío y se expuso a una placa radiográfica. La señal de cada  
 banda se cuantificó mediante densitometría con el software Quantity One (Bio-Rad).

### 2.1.5 Detección mediante PCR y RFLP de la mutación T8993G

La transición T>G en la posición 8993 de la secuencia consenso del ADNmt, se encuentra localizada en  
 el gen que codifica para la ATPasa6 (*MT-ATP6*). Como consecuencia de esta mutación se gana un sitio de  
 restricción para la enzima Aval que reconoce la secuencia 5'-C<sup>^</sup>YCGRG/GRGCY<sup>^</sup>C-3'.

Para identificar la presencia de la mutación m. 8993T>G se amplificó, mediante PCR, un fragmento de  
 1307 pb utilizando para ello los oligonucleótidos 8579F y 9950R con las condiciones descritas en la Tabla 1.  
 Tras la amplificación, 10  $\mu$ L del producto de amplificación fueron digeridos con la enzima Aval, durante 2  
 horas a 37 °C. Como consecuencia de la digestión se generaron dos fragmentos de 957 y 414 pb en las  
 muestras mutantes 100%. Estos fragmentos fueron separados mediante electroforesis en un gel de agarosa  
 al 2% teñido con bromuro de etidio. La señal de cada banda se cuantificó mediante densitometría con el  
 software Quantity One (Bio-Rad).



**Figura 7. Patrón de restricción de la mutación m. 8993T>G en el gen ATPasa6.**  
 La enzima Aval no corta en los controles y lo hace en una muestra 100% mutante.

### 2.1.6 Cuantificación de la depleción de ADNmt mediante RT-PCR

La depleción de ADNmt en una muestra se puede detectar mediante la cuantificación de la variación de la fluorescencia en un producto amplificado por PCR a tiempo real. Para ello se siguieron los métodos descritos por Wong y Cortopassi (Wong A & Cortopassi G, 2002) y Navarro-Sastre (Navarro-Sastre A et al., 2008) con las modificaciones que se escriben a continuación:

La PCR se llevó a cabo en un LightCycler System (Roche) con el kit "LighCycler Fast Star DNA Master SYBR Green I" (Roche Applied Scientific), según las condiciones del fabricante. Se utilizaron 1, 2, 5 y 10 ng de ADN. Para cada muestra se llevó cabo una PCR para amplificación de una región del ADNmt (en el gen *ND5*, 326 pb) y otra para el ADNn (gen que codifica el Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator, *CFTR*, 460 pb). Los oligonucleótidos y las condiciones de la reacción utilizadas están descritos en la tabla 1. Se realizaron curvas estándar para el ADNmt y para el gen nuclear de referencia, a partir de un ADN control altamente purificado. Cada punto de la curva y cada muestra fueron valorados por duplicado. Los niveles de ADNmt se cuantificaron calculando el ratio ADNmt/ADNn en cada muestra, a partir de los valores de cada uno de ellos extrapolados en las curvas de calibración correspondientes. Todas las medidas se hicieron por triplicado en experimentos distintos.

### 2.2 Cultivo de líneas celulares

Las líneas celulares de fibroblastos se establecieron a partir de biopsias de piel de pacientes y de controles. Éstas, al igual que las líneas utilizadas para la construcción de los cibridos mitocondriales y las correspondientes líneas parentales fueron mantenidas a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub>. Los medios de cultivo utilizados se describen a continuación:

**Fibroblastos:** DMEM con 1 g/L de glucosa, suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, antibióticos (penicilina 100 µg/mL y estreptomycin 100 µg/mL) y antifúngico (fungizona 250 µg/mL).

**Medio 143B TK:** DMEM con 4,5 g/L de glucosa y 110 mg/L de piruvato de sodio, suplementado con 10 % FBS, bromodeoxiuridina 50 µg/mL, y antibióticos

**Medio 143B TK<sup>0</sup> (143B206):** DMEM con 4,5 g/L de glucosa y 110 mg/L de piruvato de sodio, suplementado con 5 % FBS, uridina 50 µg/mL, bromodeoxiuridina 100 µg/mL, y antibióticos.

**Medio selección cibridos:** DMEM con 4,5 g/L de glucosa y 110 mg/L de piruvato de sodio, 5% FBS dializado, bromodeoxiuridina 100 µg/mL y antibióticos.

**Medio cibridos:** DMEM con 4,5 g/L de glucosa y 110 mg/L de piruvato de sodio, 5% FBS, uridina 50 µg/mL y antibióticos.

## 2.3 Cíbridos transmitocondriales

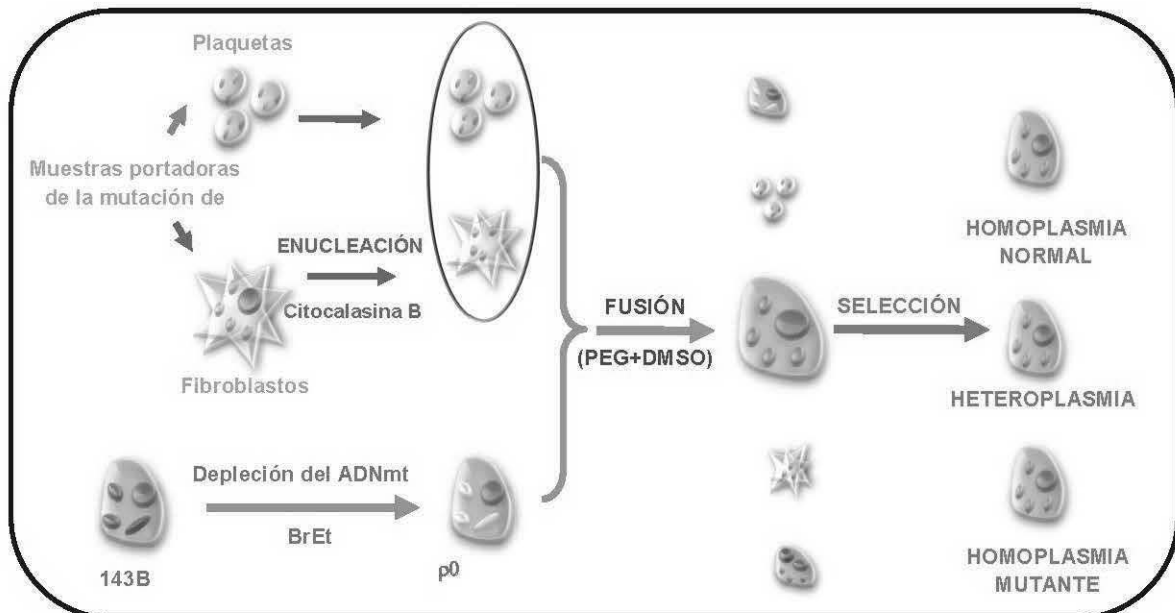
Para la generación de cíbridos transmitocondriales se siguió la técnica descrita por King y Attardi (King MP & Attardi G., 1989) con ligeras modificaciones.

### 2.3.1 Generación de cíbridos transmitocondriales

Para la generación de estas líneas celulares se utilizaron los fibroblastos del paciente portador de la mutación de interés y como línea celular carente de ADNmt se usó la línea 143B TK-  $\rho^0$  (143B206 o Rho<sup>0</sup>) generada a partir de un tratamiento prolongado con bromuro de etidio de la línea parental 143B TK- (King MP & Attardi G, 1989).

### 2.3.2 Enucleación de los fibroblastos de los pacientes en estudio y su fusión con células Rho<sup>0</sup> ( $\rho^0$ )

24 horas antes de la enucleación se sembraron  $0,5 \times 10^6$  fibroblastos en una placa de cultivo de 35 mm. Las células fueron enucleadas mediante centrifugación en presencia de citocalasina B (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Posteriormente, sobre las células enucleadas, se añadieron  $1 \times 10^6$  de células  $\rho^0$  y el conjunto fue incubado durante 3 horas en estufa a 37 °C en medio  $\rho^0$ . Las células fueron lavadas dos veces con medio mínimo esencial (MEM) y su fusión se realizó exponiéndolas durante 1 minuto a una mezcla de polietilenglicol (PEG) al 50% y dimetil sulfóxido (DMSO) al 10%. Inmediatamente después, se realizaron 3 lavados con MEM-DMSO 10% y fueron incubadas 24 horas en el medio adecuado para células  $\rho^0$ .



**Figura 8. Esquema de la técnica de generación de cíbridos transmitocondriales.** Las mitocondrias portadoras de las mutaciones en estudio proceden de fibroblastos. La enucleación, seguida de la fusión con las células  $\rho^0$  y la posterior selección de clones permite la obtención de líneas celulares portadoras de las mutaciones con distintos grados de carga mutacional: células heteroplásmicas, células homoplásmicas mutantes y células con la secuencia consenso.

Para la selección de los híbridos, las células fueron mantenidas durante 15 días en medio selectivo. La selección de clones a partir de célula aislada se realizó mediante la dilución de las células en placas de 96 pocillos a una concentración de una célula por pocillo.

### **2.3.3 Caracterización genética de los clones seleccionados**

De los clones seleccionados se extrajo el ADN y mediante PCR-RFLP se determinó si eran portadores de la mutación en estudio. Mediante PCR a tiempo real se cuantificó el número de copias de ADNmt en cada línea celular siguiendo los protocolos descritos anteriormente.

## **2.4 Estimación de la masa mitocondrial**

Para la valoración de la masa mitocondrial se utilizó el fluoroforo MitoTracker® Green FM (MTG; Molecular Probes), un marcador de mitocondrias independiente del potencial de membrana. Para ello las células ( $5 \times 10^5$ ) fueron tripsinizadas y resuspendidas en 200  $\mu\text{L}$  de DMEM, a las que se les añadió 125 nM de MTG (concentración final) y fueron incubadas durante 30 minutos a 37 °C en un incubador de CO<sub>2</sub>. Tras 2 lavados con DMEM, las células fueron resuspendidas en 500  $\mu\text{L}$  de PBS (tampón fosfato salino) y se procedió a su valoración mediante citometría de flujo en un citómetro FACScalibur (Becton Dickinson), utilizando un filtro a 585 nm. Mediante el uso del software Cell Quest (Becton Dickinson) fueron analizadas 10000 células por muestra.

## **2.5 Estudios de funcionalidad mitocondrial de las mutaciones del estudio**

En cada método utilizado se realizaron, al menos, tres experimentos distintos y por duplicado.

### **2.5.1 Valoración de la actividad enzimática de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial**

Para la valoración de los distintos complejos de la cadena respiratoria y la citrato sintasa en músculo se partió, aproximadamente de 30 mg de tejido libre de grasa y de tejido conjuntivo. Se homogeneizó la muestra en tampón KP 20 mM pH 7 (dilución 1/15 -p/v-) en un potter enfriado previamente. El homogenado se centrifugó a 800xg durante 10 minutos a 4°C. Se recogió el sobrenadante y se situó en hielo. La valoración enzimática en los fibroblastos se hizo a partir de  $5-10 \times 10^6$  células que tras ser levantadas mediante tripsinización, fueron resuspendidas en 200  $\mu\text{L}$  de tampón KP 20 mM pH 7 y sonicadas 3 veces con un sonicador UP50H Ultrasonic Processor (HIELSCHER Ultrasound Technology) durante 5 segundos, a intervalos de 15 segundos en cada ciclo. Para el estudio en híbridos transmitocondriales, partimos de  $5-10 \times 10^6$  células que tras ser levantadas mediante tripsinización, fueron resuspendidas en tampón A (75 mM de sacarosa, 5 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 40 mM KCl, 0,5 mM EDTA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 30 mM Tris-HCl, pH 7,4) suplementado con digitonina (400 mg/5 x 10<sup>6</sup> células). Después de 1-2 minutos, la suspensión fue diluida con nueve volúmenes del mismo tampón suplementado con 0,3% de BSA. Las muestras fueron centrifugadas y el sedimento fue resuspendido en un medio hipotónico (20 mM de KP, pH 7). Se hicieron tres ciclos de congelación y descongelación y

después las muestras fueron sonicadas tal y como se describió anteriormente. La actividad de las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial fue estudiada mediante técnicas cinético-colorimétricas, en un espectrofotómetro Evolution 300 (Thermo Scientific) con el software incorporado para la valoración de reacciones enzimáticas. El complejo I (NADH-CoQ oxidorreductasa), complejo III (ubiquinol-citocromo c oxidorreductasa) y la citrato sintasa se valoraron según describen Maneiro y colaboradores (Maneiro E et al., 2005). La actividad del complejo II (Succinato deshidrogenasa) y el complejo IV (citocromo c oxidasa) fue determinada según lo publicado (Seibel P et al, 2008). El complejo V (ATP sintasa) fue medido como describieron del Hoyo y colaboradores (del Hoyo P et al, 2006). La cantidad de proteínas de cada extracto celular se determinó utilizando el método colorímetro de Lowry (Lowry OH et al., 1951), usando BSA como estándar.

La temperatura de incubación fue de 30 °C para todas las reacciones a excepción de la valoración del complejo IV, tanto en músculo como en fibroblastos, que fue de 38 °C, utilizando 0,1-0,3 mg/mL de proteínas de lisado celular.

Los resultados de actividad enzimática de músculo fueron referenciados a la actividad de la citrato sintasa, enzima de matriz que constituye un marcador de la riqueza mitocondrial. Las actividades enzimáticas en fibroblastos, cíbridos y sus líneas parentales fueron referidas a los mg de proteína de cada muestra.

### **2.5.2 Cuantificación del ATP total en las líneas celulares**

Para la determinación cuantitativa del ATP total en las distintas líneas celulares se utilizó un método bioluminométrico basado en el Kit: ATP Bioluminescence Assay Kit HS II (Roche Applied Science). La determinación de ATP utilizando bioluminiscencia es una técnica ampliamente utilizada, basada en la siguiente reacción de oxidación catalizada por la luciferasa. De esta ecuación, se hace obvio que la salida de luz es directamente proporcional a la concentración de ATP.



Partimos de  $1 \times 10^6$  células en el caso de fibroblastos y de  $1,5 \times 10^5$  células en el caso de los cíbridos transmitocondriales, que fueron resuspendidas en 750  $\mu\text{L}$  de tampón A (Tris 100 mM y EDTA 4 mM pH 7,8). De esta solución celular se tomaron 100  $\mu\text{L}$  y se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de tampón de lisis (proporcionado por el kit) y se dejaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se centrifugaron 1 minuto a 10000 rpm y se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de cada muestra, por duplicado, en una placa de 96 pocillos de color negro. Inmediatamente antes de la lectura se añadió en cada pocillo 50  $\mu\text{L}$  del reactivo luciferasa y se procedió a la cuantificación de la luminiscencia en un lector de placas Infinite M200 (Tecan). La concentración de proteínas de la solución celular inicial se determinó tomando 200  $\mu\text{L}$  de misma, mediante el método de Lowry (Lowry OH et al, 1951). En paralelo se determinó igualmente la luminiscencia emitida por una curva patrón de ATP ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}\text{M}$ ) preparada en cada ensayo. Los resultados se expresaron como nmoles de ATP/mg de proteína.

### **2.5.3 Determinación del potencial de membrana mitocondrial mediante citometría de flujo**

El potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) fue medido utilizando el kit: MitoProbe™ JC-1 Assay Kit (Molecular Probes®). JC-1 es un reactivo que se presenta en forma de monómeros cuando el  $\Delta\Psi_m$  es bajo, emitiendo fluorescencia en verde, o en forma de agregados cuando el  $\Delta\Psi_m$  es alto, emitiendo fluorescencia en color rojo.

Para medir el  $\Delta\Psi_m$ , partimos de  $5 \times 10^5$  células que fueron tripsinizadas y resuspendidas en 200  $\mu\text{L}$  de DMEM a las que se les añadió el reactivo JC-1 a una concentración final de 7  $\mu\text{M}$  y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C en un incubador de  $\text{CO}_2$ . En paralelo fue medida la sensibilidad de la técnica y para cada muestra, se realizó un duplicado en el que las células fueron tratadas con CCCP (proporcionado por el kit, a una concentración final de 50  $\mu\text{M}$ ), un agente desacoplante que disipa el  $\Delta\Psi_m$ . Este duplicado se incubó durante 15 minutos a 37 °C en un incubador de  $\text{CO}_2$ . Tras los 15 minutos, se añadió JC-1 (7  $\mu\text{M}$  concentración final) y de nuevo se incubó durante 30 minutos a 37 °C y protegidas de la luz en un incubador de  $\text{CO}_2$ . Tras 2 lavados con DMEM, las células fueron resuspendidas en 500  $\mu\text{L}$  de PBS y se procedió a su valoración mediante citometría de flujo en un citómetro FACScalibur (Becton Dickinson). Las células fueron excitadas a 480 nm y la emisión fue registrada tanto en el espectro verde (530 nm) como el rojo (590 nm), a fin de distinguir los monómeros de los dímeros de JC-1. La relación entre la emisión en rojo y en verde depende únicamente del potencial de membrana y no de otros factores como el tamaño, forma o densidad de las mitocondrias. Mediante el uso del software Cell Quest (Becton Dickinson) fueron analizadas 10000 células por muestra.

### **2.5.4 Visualización del potencial de membrana mitocondrial mediante microscopía confocal**

Observamos el potencial de membrana mediante microscopía confocal de la siguiente forma: se sembraron en cubreobjetos de 24x24 mm  $75 \times 10^4$  células y a las 48 horas fueron incubadas con JC-1 a una concentración final de 2  $\mu\text{M}$ , en DMEM sin rojo fenol (Gibco®, invitrogen), a 37 °C durante 30 minutos en un incubador de  $\text{CO}_2$ . Pasado el tiempo, se lavaron los cubreobjetos 2 veces con PBS, y se añadió DMEM sin rojo fenol para montar los cubres; éstos fueron sellados al portaobjetos, con una mezcla de vaselina: lanolina: parafina en una proporción 1:1:1 e inmediatamente después fueron observados en un microscopio con un objetivo de inmersión en aceite 63x en un microscopio confocal (Leica microsystem TCS SP5; AOBS spectral).

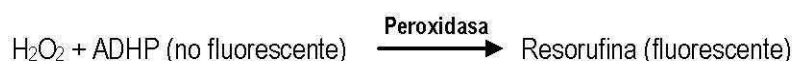
## **2.6 Medida de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)**

Las especies reactivas de oxígeno en los fibroblastos fueron medidas con el uso del reactivo diacetato de 5-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína (Carboxi- $\text{H}_2\text{DCFDA}$ , Molecular Probes) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este compuesto detecta peróxido de hidrógeno, radicales peróxido y aniones de peroxinitrilo. Una vez que penetra en las células es cortado por esterasas y posteriormente, al entrar en contacto con las



especies reactivas de oxígeno se oxida a 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCF), un compuesto que emite fluorescencia. La fluorescencia emitida por el DCF fue observada por microscopía de fluorescencia y cuantificada mediante citometría.

Para determinar los ROS en los híbridos mitocondriales se usó un kit de detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediante fluorimetría (Hydrogen Peroxide Fluorometric Detection Kit; Stessgen; Assay Designs) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit está basado en el uso de un sustrato no fluorescente (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxacina o ADHP) que al reaccionar con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se oxida (reacción catalizada por la peroxidasa) y en un ratio 1:1 produce un producto fluorescente, la resorufina:



En una placa de 96 pocillos de color negro se añadieron 1,5x10<sup>5</sup> células resuspendidas en 100 μL de PBS a las que se les incorporó 100 μL de cocktail de reacción (proporcionado por el kit) y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos al abrigo de la luz. La fluorescencia de las muestras fue medida en un lector de placas Infinite M200 (Tecan) con una excitación a 530-570 nm y una emisión de 590-600 nm. En paralelo se determinó igualmente la fluorescencia emitida por una curva patrón de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0; 0,5; 1; 2,5; 5; 7,5; 10 μM) preparada en cada ensayo y medida por duplicado. Los resultados se expresaron como μmoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/1,5x10<sup>5</sup> células.

### 2.6.1 Visualización de ROS mediante microscopía de fluorescencia

La determinación de la producción de especies reactivas de oxígeno mediante microscopía de fluorescencia se realizó de la siguiente manera: se sembraron en cubreobjetos de 24x24 mm 75x10<sup>4</sup> células y al día siguiente fueron incubadas con Carboxi-H<sub>2</sub>DCFDA a una concentración final de 15 μM, en DMEM sin rojo fenol, a 37 °C y protegidas de la luz durante 30 minutos en un incubador de CO<sub>2</sub>. Pasado el tiempo, se lavaron los cubreobjetos 2 veces con PBS, y se añadió DMEM sin rojo fenol para montar los cubres; éstos fueron sellados al portaobjetos, con una mezcla de vaselina: lanolina: parafina en una proporción 1:1:1 e inmediatamente después fueron observados en un microscopio de fluorescencia Axio Imager A1 (Carl Zeiss)

### 2.6.2 Determinación de ROS mediante citometría de flujo

Las células (5x10<sup>5</sup>) fueron recogidas mediante tripsinización y resuspendidas en 1 mL de PBS. Se hicieron dos alícuotas de 500 μL, en la primera se añadió Carboxi-H<sub>2</sub>DCFDA a una concentración final de 10 μM y en la segunda DMSO al 0,6%, como control de fluorescencia. Tras 30 minutos de incubación a 37 °C en un incubador de CO<sub>2</sub>, las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 3000 rpm. Las células fueron lavadas dos veces con PBS y se resuspendieron en 400 μL de PBS y se procedió a su valoración mediante citometría de flujo en un citómetro FACScalibur (Becton Dickinson) utilizando un filtro a 585 nm. Mediante el uso del software Cell Quest (Becton Dickinson) fueron analizadas 10000 células por muestra.

## 2.7. Análisis del ciclo celular

El ciclo celular fue medido para comprobar la sincronización celular en fase G<sub>1</sub> y como las mismas células entraron de nuevo en un ciclo celular normal.

### 2.7.1 Sincronización celular

La parada del ciclo celular se llevó a cabo cultivando las células con DMEM con 1 g/L de glucosa, suplementado con FBS al 0,5%, antibióticos (penicilina 100 µg/mL y estreptomina 100 µg/mL) y antifúngico (fungizona 250 µg/mL) durante 72 horas, que permite que las células queden sincronizadas en la frontera de la fase G<sub>1</sub>/S del ciclo celular. Para reactivar la proliferación las células crecieron de nuevo con DMEM al 10% de FBS y el ciclo fue determinado a las 96 horas.

### 2.7.2 Medida del ciclo celular

Para determinar el porcentaje de células que se encuentran en las distintas fases del ciclo celular, 5x10<sup>5</sup> células fueron recogidas mediante tripsinización y fijadas con etanol al 70%. Tras dos lavados con PBS, las células fueron tratadas con RNasa A (Roche Applied Scientific) a una concentración final de 1 mg/mL. Pasados 30 minutos de incubación a 37 °C y en agitación, se añadió Ioduro de propidio al 0,05%. Las muestras fueron valoradas mediante citometría de flujo en un citómetro FACScalibur (Becton Dickinson) Mediante el uso del software Cell Quest (Becton Dickinson) fueron analizadas 20000 células por muestra.

### 2.7.3 Determinación de la viabilidad celular y el tiempo de duplicación

En una placa de 6 pocillos, y por triplicado, se sembraron 2x10<sup>4</sup> que fueron recogidas mediante tripsinización a los 2, 4 y 6 días de crecimiento. Las células fueron resuspendidas en 250 µL y de esta suspensión celular se tomaron 100 µL que se llevaron a un eppendorf que contenían 300 µL de PBS y 500 µL de azul de tripán al 0,4%, colorante usado en ensayos de viabilidad celular ya que permite diferenciar células vivas de células muertas. Las células con la membrana celular intacta, o sea, las células vivas (viables), no incorporan el azul de tripán (Sigma-Aldrich), mientras que en las células muertas si penetra y muestran, bajo el microscopio, un distintivo color azul. La mezcla fue bien homogeneizada y se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente. Empleando una cámara de Neubauer, las células fueron observadas, para descartar las células vivas de las muertas y contadas todas. El tiempo de duplicación (TD) fue calculado aplicando la siguiente fórmula:

$$TD = \log 2 \times (t_1 - t_0) / (\log N_{t_1} - \log N_{t_0})$$

*Log* = Logaritmo en base 10  
*N*<sub>*t*0</sub> = número de células iniciales  
*N*<sub>*t*1</sub> = número de células finales  
*t*<sub>0</sub> = Tiempo inicial (medido en días)  
*t*<sub>1</sub> = Tiempo final (medido en días)

## 2.8 Tratamiento de las células con agentes químicos

Las células crecieron durante 24 o 48 horas en presencia de varios agentes químicos específicos: 1) TSA (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), un inhibidor de la actividad de las histonas deacetilasas (o HDAC, un tipo de enzimas implicadas en la eliminación de los grupo acetilo de los residuos de lisina en las histonas y en otras proteínas no histonas, como la tubulina) de clase I y II pero no de la clase III (Vanhaecke T, et al., 2004) a una concentración de 0,5  $\mu\text{M}$  24 horas. 2) EGF (Recombinat murine EGF, Peprotech, Rocky Hill, NJ), factor de crecimiento que juega un papel importante en la regulación del crecimiento celular, proliferación y diferenciación que aumenta la actividad de la histona deacetilasa HDAC6, a una concentración de 10 ng/mL 24 horas. 3) Peróxido de hidrógeno agente altamente oxidante utilizado para generar un aumento del estrés oxidativo celular, a una concentración de 180  $\mu\text{M}$  48 horas.

## 2.9 Valoración de la morfología de la red mitocondrial

Para la valoración de la morfología de la red mitocondrial, las células fueron visualizadas mediante microscopía confocal utilizando el marcado MitoTracker@Red<sub>560</sub> (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR) que marca las mitocondrias independientemente de su potencial de membrana. Para ello, se sembraron en cubreobjetos de 24x24 mm  $75 \times 10^4$  células y a las 48 horas se incubaron a una concentración final de 0,1  $\mu\text{M}$  de MitoTracker@Red<sub>560</sub> en DMEM sin rojo fenol. Las células fueron mantenidas a 37 °C y protegidas de la luz durante 30 minutos en un incubador de CO<sub>2</sub>. Pasado el tiempo, se lavaron los cubreobjetos 2 veces con PBS, y se añadió DMEM sin rojo fenol para montar los cubres; éstos fueron sellados al portaobjetos, con una mezcla de vaselina: lanolina: parafina en una proporción 1:1:1 e inmediatamente después fueron observados en un microscopio con un objetivo de inmersión en aceite 63x en un microscopio confocal (Leica microsystem TCS SP5; AOBS spectral)

## 2.10 Visualización de proteínas implicadas en la constitución del citoesqueleto mediante inmunofluorescencia

Para la visualización de proteínas implicadas en la constitución del citoesqueleto y la distribución de la mitocondrias, partimos de  $2,5 \times 10^4$  células que fueron sembradas en cubreobjetos estériles. Al día siguiente fueron lavadas con PBS y fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente y en agitación. Tras 3 lavados de 5 minutos con PBS, las células fueron permeabilizadas con 0,1% de Tritón X-100 en PBS durante 15 minutos temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente, las células fueron bloqueadas con BSA al 2% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. A continuación, fueron incubadas a 4 °C durante toda la noche con los anticuerpos primarios correspondientes (descritos en la tabla 2). Tras lavar el exceso de anticuerpos, las células fueron incubadas con el anticuerpo secundario Dylight™ 488 durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación. Tras lavar el exceso de anticuerpos secundarios, los núcleos celulares fueron marcados con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol; Sigma-Aldrich). Se hizo un lavado con PBS y los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos con Fluoromount-G (SouthernBiotech). Las células fueron observadas en un microscopio confocal con un objetivo de inmersión

en aceite 63x (Leica microsystem TCS SP5; AOBS spectral)

## **2.11 Inmunodetección de proteínas unidas a membrana (Western-blot)**

A través de la técnica de western-blot se detectaron proteínas implicadas en el mantenimiento de la red mitocondrial y en la dinámica mitocondrial ( $\alpha$ -tubulina,  $\alpha$ -tubulina acetilada, Drp1, Drp1 fosforilada en Ser 616, Drp1 fosforilada en Ser637, Fis1, Mfn1, Mfn2 y OPA1), la histona deacetilasa HDAC6, la proteína de choque térmico Hsp27, LC3B como marcador de autofagia y la ciclina D1, subunidad reguladora del complejo formado con cdk4 o cdk6, que regulan el tránsito de la fase G1 a la fase S, tal y como describen Spodnik y colaboradores (Spodnik JH et al, 2002) con las modificaciones que se relatan a continuación. Como control de carga se usó  $\beta$ -actina o  $\alpha$ -tubulina.

### **2.11.1 Extracción de proteínas**


Partimos de  $1-1,5 \times 10^6$  células que fueron tripsinizadas y lavadas dos veces con PBS. Tras estos lavados se realizaron otros dos con "MT-stabilizing buffer" que contiene: 80 mM de Pipes (ácido 1,4- piperacinetano-sulfónico), 1 mM de  $MgCl_2$ , 2 mM de EGTA (Ácido etilenglicoltetraacético) pH 6,9, suplementado con 1 mM de Fluoruro de fenilmetanosulfonilo e inhibidores de proteasas (1:100); Para la detección de Drp1 fosforilada en Ser 616 y Drp1 fosforilada en Ser637 el "MT-stabilizing buffer" fue suplementado además con Fluoruro de sodio 10mM y Ortovanadato de sodio 1mM. Tras estos lavados, las células fueron lisadas con tampón de lisis: "MT-stabilizing buffer" suplementado con 1% de SDS, en una cantidad 5x del volumen celular y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Tras los 30 minutos las células fueron centrifugadas a 14000 rpm a 4 °C durante 15 minutos y se recogió el sobrenadante. La concentración de proteínas fue determinada con el kit DC Protein assay (Bio-Rad).

### **2.11.2 Western-blot**

De acuerdo con protocolos rutinarios (Sambrook J & Russell D, 2000), 20  $\mu$ g de proteína de cada muestra fueron separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS a distinto % en función del tamaño de la proteína a detectar. Posteriormente fueron transferidas a membranas de polivinilideno fluoruro (PVDF, Millipore). Las membranas fueron bloqueadas durante 1 hora en solución de bloqueo: 5% de leche en polvo desnatada en TBS (NaCl 0,15 M, Tris-HCl 10 mM pH 7,5) suplementado con Tween 20 al 0,1%. Pasado el tiempo de bloqueo, las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios correspondientes, en las condiciones de dilución preestablecidas para cada uno de ellos, tal y como se describe en el apartado 1.5.2, durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, las membranas fueron lavadas tres veces con TBS Tween 20 al 0,1% y fueron incubadas con el anticuerpo secundario pertinente durante 1 hora a temperatura ambiente en TBS Tween 20 al 0,1%. La membrana se lavó tres veces con TBS Tween 20 al 0,1%, y otra con TBS. Como reactivo de revelado se utilizó el sustrato HRP para western: Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore). Las membranas fueron cuantificadas usando el software Quantity One (Bio-Rad).

## **2.12 Análisis estadístico**

Los datos son presentados como Medias  $\pm$  desviación estándar (DE) o Medias  $\pm$  error estándar de la media (S.E.M). Para las comparaciones estadísticas se utilizó el test U de Mann-Whitney. Un valor  $p < 0,05$  fue considerado indicador de significancia estadística. El grado de correlación o dependencia entre dos variables se determinó estimando el coeficiente de correlación  $r$  de Pearson, considerando valores de  $p < 0,05$  como estadísticamente significativos.



Resultados

---

## I. Estudios de funcionalidad mitocondrial y de estrés oxidativo en fibroblastos y en el modelo celular de cíbridos transmitocondriales portadores de las mutaciones m.12300G>A y m.8993T>G

Estos estudios, realizados en las distintas líneas celulares, nos permitieron demostrar la patogenicidad de la mutación m.12300G>A, descrita por primera vez asociada a patología en humanos por nuestro laboratorio (Martín-Jiménez R et al., 2011), y obtener una primera aproximación sobre las diferencias a nivel de funcionalidad mitocondrial y la generación de ROS entre una mutación asociada a proliferación mitocondrial (m.12300G>A) con respecto a otra que no lo está (m.8993T>G).

### 1.1 Estudio histológico de la biopsia muscular

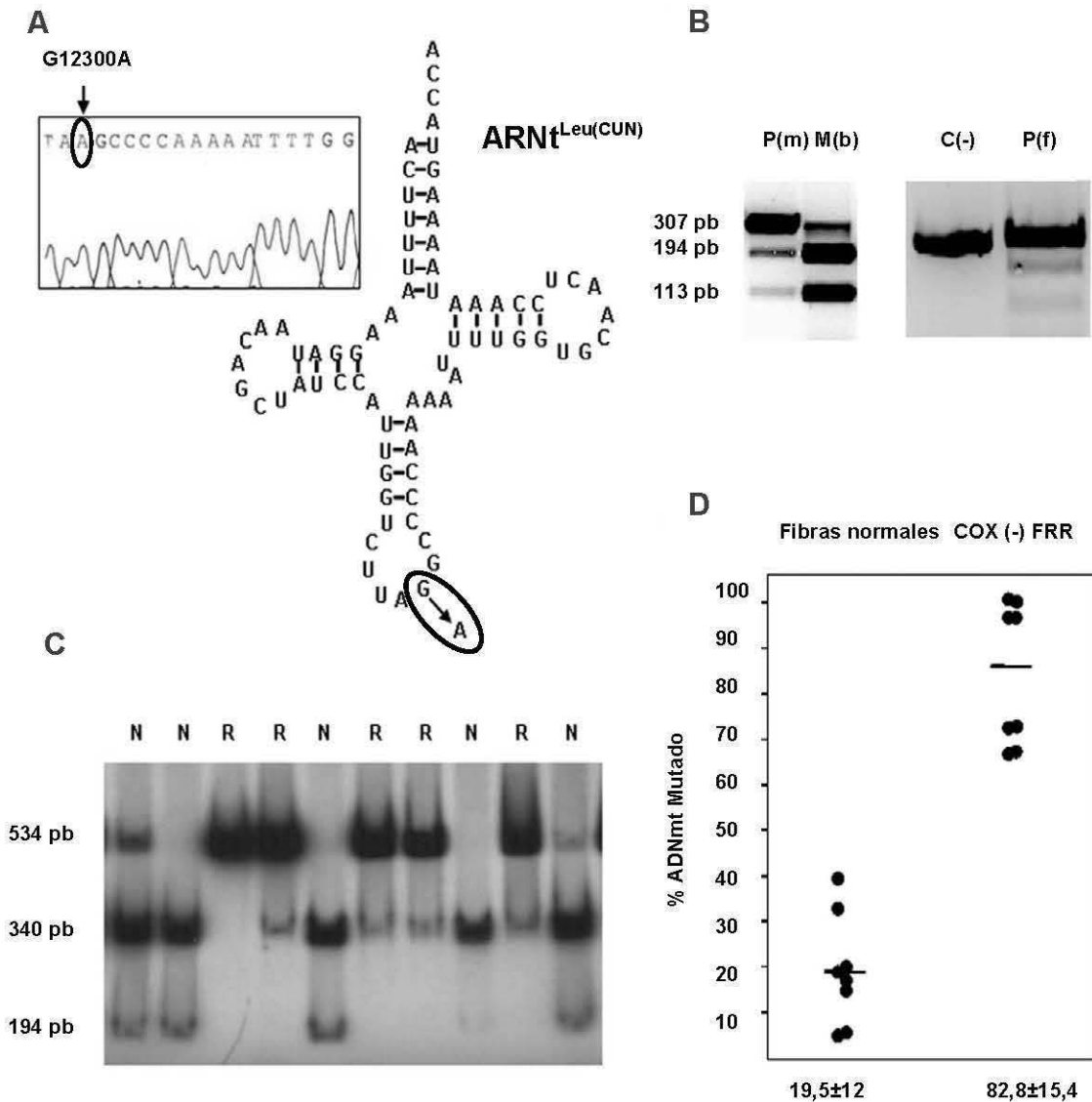
Un hallazgo frecuente en las miopatías mitocondriales es la presencia de una proliferación anormal de mitocondrias comúnmente representada, en músculo esquelético, por la presencia de las llamadas FRR pero, como se ha explicado anteriormente, esta característica no es común para todos estos tipos de enfermedades.

Mutaciones que afectan a los ARNt mitocondriales suelen ir asociadas de forma casi invariable (en más de un 90% de los casos) con la presencia de FRR en su biopsia muscular (Campos Y, 2002). El análisis histológico del paciente portador de la mutación m.12300G>A mostró la presencia de un **12,5% de FRR, COX negativas**. Normalmente, el examen histológico de pacientes con la mutación m.8993T>G sólo muestra, en algunas ocasiones, acumulación de gotas lipídicas neutras intracitoplasmáticas y, ocasionalmente, en pacientes con síndrome de Leigh se observa citocromo c oxidasa en las fibras negativas. El estudio histológico del paciente portador de la mutación m.8993T>G mostró una biopsia muscular sin alteraciones morfológicas ni acúmulos de mitocondrias con ausencia por tanto de FRR.

### 1.2 Estudio genético en músculo, sangre y fibroblastos. PCR en fibra aislada

Tras descartar la presencia de deleciones, el genoma mitocondrial del Paciente 1 (P<sub>1</sub>) fue secuenciado y se detectó una mutación en la posición m.12300G>A que afecta al gen *MT-TL2* que corresponde al ARNt<sup>Leu (CUN)</sup> (Fig. 9A). Mediante PCR y análisis de restricción (PCR-RFLP) se observó que en **músculo** el **84%** de las moléculas estaban mutadas. El mismo análisis fue realizado en **fibroblastos** siendo el porcentaje de ADNmt mutado del **89%**. Un estudio de la mutación en la sangre procedente de la madre del paciente reveló que ésta presentaba un 15% de moléculas mutadas (Fig. 9B). La mutación no estaba presente en 30 pacientes con otras enfermedades mitocondriales ni en 80 individuos control.

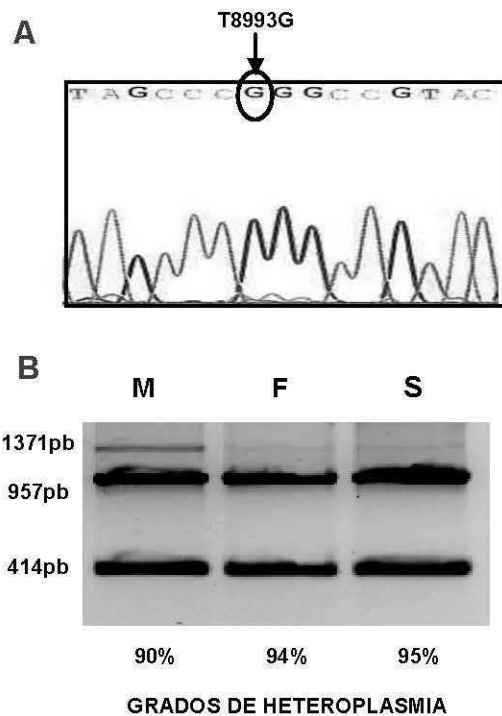
Para evaluar la correlación fenotipo-genotipo entre la histoquímica del músculo y los niveles de heteroplasmia, se estudió la distribución de la mutación en fibras musculares individuales, tanto en FRR como en fibras normales, utilizando la técnica de PCR en fibra aislada, tal y como se describe en el apartado 2.1.4 de Materiales y Métodos. El análisis mostró que la carga mutacional de las FRR COX negativas (n=8; 82,85% ± 15,4%) fue significativamente mayor que en las fibras normales (n=8; 19,50% ± 12%) (p<0,001) (Fig. 9 C y D).



**Figura 9. Electroferograma de la mutación detectada en el gen *MT-TL2* y análisis de PCR-RFLP.** (A) Secuencia del ADNmt del paciente donde se indica la mutación m.12300G>A. Estructura del ARNt<sup>Leu(CUN)</sup> mitocondrial indicando la posición donde aparece la mutación. (B) Análisis por PCR-RFLP del grado de heteroplasma en el músculo del paciente: P (m), sangre de la madre: M (s), fibroblastos del paciente: P (f) y un control sin cortar: C (-). El fragmento amplificado, de 307 pb es digerido en dos de 194 y 113 pb, separados en un gel de agarosa al 2% y teñido con bromuro de etidio. La mutación hace que se pierda un sitio de restricción para la enzima HaeIII. (C) Autorradiografía del análisis de PCR en fibra aislada. El fragmento amplificado, de 534 pb es digerido en dos de 340 y 194 pb. Los productos de la digestión se separaron en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante al 8%. FRR: (R); fibras normales (N). (D) Porcentaje de ADNmt mutante (Media ± DE) en las FRR COX (-) y en las fibras normales.

Para el estudio genético de la mutación m.8993T>G en el Paciente 2 (P<sub>2</sub>) seguimos el método descrito por Holt y colaboradores (Holt IJ et al, 1990) con las modificaciones descritas en Materiales y Métodos (apartado 2.1.5). Tras la secuenciación del fragmento amplificado se hizo un análisis de PCR-RFLP. En la Figura 10 se muestran los resultados obtenidos en el músculo, sangre y fibroblastos del paciente.





**Figura 10. Electroferograma de la mutación detectada en el gen *ATPasa 6* y análisis de PCR-RFLP.** (A) La secuencia del ADNmt del paciente muestra un cambio nucleotídico T>G en la posición 8993 del genoma mitocondrial. (B) Análisis de PCR-RFLP en músculo (M), fibroblastos (F) y sangre (S) del paciente. La mutación hace que se gane un sitio de restricción para la enzima Aval. El fragmento amplificado, de 1371 pb es digerido en dos de 957 y 414 pb, separados en un gel de agarosa al 2% y teñido con bromuro de etidio. En la figura se muestra el porcentaje de heteroplasma de las distintas muestras analizadas.

### 1.3 Generación de los cibridos transmitocondriales

Se generaron cibridos transmitocondriales en el fondo genético 143B TK- partiendo de los fibroblastos de los pacientes de este estudio, que una vez enucleados fueron fusionados con la línea celular 143B206, deplecionada de ADNmt. Tras un periodo de selección de 15 días, se eligieron 23 clones a partir de célula única para la mutación m.12300G>A y 21 clones para la mutación m.8993T>G.

#### 1.3.1 Estudio genético de los clones obtenidos y cuantificación de los niveles de ADNmt

De los clones obtenidos se hizo un análisis genético para comprobar la presencia de las mutaciones en estudio y el grado de heteroplasma que presentan los distintos clones. Los resultados del estudio se muestran en la tabla 4.

	CLONES m.12300G>A	CLONES m.8993T>G
HOMOPLÁSMICOS MUTANTES	6	12
HETEROPLÁSMICOS	17	7

**Tabla 4. Caracterización genética de los clones obtenidos.** En torno a un 75% de los clones que contienen la mutación m.12300G>A son heteroplásmicos, y el porcentaje de mutación varía de un 3% a un 81%. En el caso de la mutación m.8993T>G más del 50% de los clones son homoplásmicos mutantes ya que el porcentaje de mutación del paciente en fibroblastos es muy alta (94%). En los heteroplásmicos, el grado de heteroplasma varía de un 50 a un 80%. Es importante destacar que en dos de los clones no fue posible su caracterización debido, muy probablemente, a que en el proceso de cibrización se haya producido una pérdida completa del ADNmt, tal y como describen Vergani y colaboradores (Vergani L et al., 1999).

Los cultivos fueron expandidos durante 10 días y se volvió a analizar el grado de heteroplasmia. Observamos que en algunos de los clones, la PCR de amplificación no fue eficiente tal y como ocurrió al inicio de la caracterización de los mismos. Debido a que en el proceso de hibridación algunos clones podrían perder su ADNmt (Vergani L et al., 1999), decidimos cuantificar los niveles de ADNmt. Los clones homoplásmicos mutantes (en ambas mutaciones) conservaban su ADNmt mientras que algunos de los clones heteroplásmicos lo perdían. Los clones heteroplásmicos portadores de la mutación m.8993T>G presentaban la pérdida total de la molécula. Para facilitar el trabajo elegimos al azar 5 clones heteroplásmicos portadores de la mutación m.12300G>A y cuantificamos su ADNmt. En la tabla 5 se muestra el resultado del análisis para estos clones.

CLONES G12300A					
	1	2	3	4	5
% de mutación	3%	36%	49%	71%	78%
Pérdida de ADNmt	NO	SI	SI	NO	NO

**Tabla 5. Determinación del porcentaje de mutación y cuantificación del ADNmt en clones portadores de la mutación m.12300A>G.** Los clones que pierden el ADNmt presentan un grado de heteroplasmia en torno al 50%. El clon 1, aunque no pierde su genoma mitocondrial, presenta unos niveles de éste muy pequeños.

Para la caracterización de la mutación m.12300G>A se seleccionaron dos clones homoplásmicos mutantes (denominados de ahora en adelante clones A y B) y los clones heteroplásmicos 4 y 5 (denominados C y D, respectivamente). En el caso de la mutación m.8993T>G se seleccionaron dos clones homoplásmicos mutantes denominados E y F.

### 1.3.2 Análisis de la evolución del porcentaje de mutación en los clones heteroplásmicos y cuantificación de los niveles de ADNmt

En la década de los 90 algunos autores describieron que a lo largo del tiempo existe un cambio en el porcentaje de mutación en algunos clones heteroplásmicos (Yoneda M et al., 1992; Dunbar DR et al., 1995) y en el caso del fondo genético 143B la evolución era hacia la homoplasmia mutante. Este fenómeno, junto con el de la pérdida del ADNmt nos sugirió hacer el estudio funcional de estos clones a distintos tiempos de crecimiento (15, 30, 45 y 60 días). Como los clones heteroplásmicos elegidos para la caracterización de la mutación m.12300G>A portan un alto porcentaje de mutación, era de esperar que, de existir algún cambio en su porcentaje de heteroplasmia, este fuera en aumento y se transformaran en clones homoplásmicos mutantes. En el clon C fue así, y a los 45 días de crecimiento ya era 100% mutante, pero en el clon D observamos el fenómeno contrario y su evolución fue a un genotipo normal a los 60 días. La tabla 6 muestra estos cambios anteriormente descritos.

% MUTACIÓN					
Días de crecimiento	0	15	30	45	60
CLON C	71%	77%	78%	100%	100%
CLON D	78%	50%	30%	10%	0%

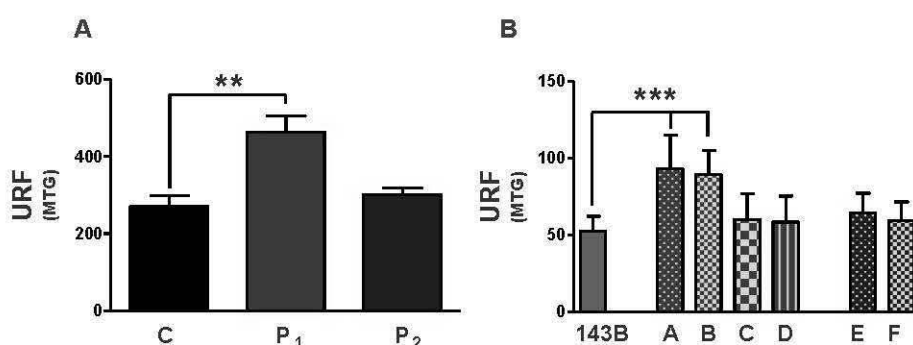
**Tabla 6. Evolución del grado de heteroplasmia.** Determinación del porcentaje de mutación de los clones C y D a distintos días de crecimiento.

La cuantificación del ADNmt en estos clones durante los 60 días de crecimiento mostró que no hay pérdida de genoma mitocondrial a lo largo del tiempo de estudio.

#### 1.4 Medida de la masa mitocondrial

La mutación m.12300G>A está asociada a proliferación mitocondrial en músculo mientras que la mutación m.8993T>G no lo está. Quisimos comprobar si este mismo hecho se producía tanto en los fibroblastos como en los cíbridos transmitocondriales portadores de las distintas mutaciones, mediante su estimación con citometría de flujo y el uso del marcador MitoTracker®Green. Los fibroblastos del paciente portador de la mutación m.12300G>A, mostraron un aumento significativo de su masa mitocondrial frente a los fibroblastos control ( $463,60 \pm 42,60$  Vs.  $270,80 \pm 27,50$ ;  $p < 0,01$ ) mientras que la masa de los fibroblastos del paciente portador de la mutación m.8993T>G era normal ( $300,50 \pm 18,70$  Vs.  $270,80 \pm 27,50$ ) (Figura 11A).

El estudio de la masa mitocondrial en los cíbridos transmitocondriales mostró los siguientes datos: 1) En el caso de la mutación m.12300G>A, los clones A y B (homoplásmicos mutantes) presentaron un aumento muy significativo de su masa mitocondrial con respecto a las células control 143B (clon A:  $93,16 \pm 22,06$ ; clon B:  $79,31 \pm 15,82$ ; 143B:  $52,37 \pm 9,89$ ;  $p < 0,001$ ). Los clones C (con un 78% de ADNmt mutado) y D (con un 30% de ADNmt mutado), a los 30 días de estudio, presentaron una masa mitocondrial normal (clon C:  $60,24 \pm 16,75$ ; clon D:  $58,39 \pm 16,98$ ; 143B:  $52,37 \pm 9,89$ ). 2) Los cíbridos E y F, portadores de la mutación m.8993T>G en homoplasma mutante, presentaron una masa mitocondrial similar a las de las células control (clon E:  $64,24 \pm 13,07$ ; clon F:  $59,59 \pm 11,84$ ;  $52,37 \pm 9,89$ ) (Figura 11B).



**Figura 11. Determinación de la masa mitocondrial.** (A) Valoración de la masa mitocondrial en los fibroblastos de los pacientes y controles. Se observa el incremento significativo de la masa mitocondrial en los fibroblastos del paciente P<sub>1</sub> con respecto a los fibroblastos control y los fibroblastos P<sub>2</sub>. (B) Valoración de la masa mitocondrial en los cíbridos transmitocondriales. Se observa un aumento significativo de la masa mitocondrial en los clones A, B (homoplásmicos mutantes para la mutación m.12300G>A). Los clones C y D (heteroplásmicos para la mutación m.12300G>A, a los 30 días de estudio) y los clones E y F (portadores de la mutación m.8993T>G en homoplasma mutante) presentan una masa mitocondrial normal. Los valores se presentan como Media ± DE (valor medio de cuatro determinaciones en los fibroblastos de pacientes y de 14 líneas control; cíbridos: media de 3 mediciones a 30 días de crecimiento; n=12 mediciones en las células 143B). URF: Unidades Relativas de Fluorescencia.

#### 1.5 Estudios de funcionalidad mitocondrial

A continuación se describen los resultados obtenidos en los distintos estudios de funcionalidad mitocondrial en los que se incluye la valoración enzimática de la cadena respiratoria mitocondrial, la medida del ATP total y el potencial de membrana mitocondrial.

### 1.5.1 Valoración enzimática de los complejos de la cadena respiratoria en músculo y en las líneas celulares en estudio

Las medidas de las actividades enzimáticas de la cadena respiratoria mitocondrial en el músculo del paciente P<sub>1</sub> evidenciaron la existencia de un déficit de los complejos I, III y IV, con signos claros de una proliferación mitocondrial. Las actividades enzimáticas en músculo del paciente P<sub>2</sub>, no fueron medidas por falta de muestra (Tabla 7).

La valoración enzimática en los fibroblastos mostró que el paciente P<sub>1</sub> un claro déficit de los complejos III y IV, siendo el complejo I completamente normal. El paciente P<sub>2</sub> mostró un déficit aislado de complejo V (Tabla 7).

Con respecto a los cibridos transmitocondriales, la valoración enzimática de los distintos complejos de la cadena respiratoria mitocondrial en los clones A y B, homoplásmicos para la mutación m.12300G>A, confirmaron la existencia de un déficit multienzimático en dichos clones. El comportamiento de los clones C (con un 78% de ADNmt mutado para la mutación m.12300G>A) y D (con un 30% de ADNmt mutado para la mutación m.12300G>A), a los 30 días de estudio, mostraron unos resultados muy similares a los de la línea control 143B. Las actividades enzimáticas en los clones E y F (homoplásmicos mutantes para la mutación m.8993T>G) fueron normales (Tabla 7).

MUESTRA		CI	CII	CIII	CIV	CV
Músculo	P <sub>1</sub>	8,2 <sup>a</sup>	7,9	20,6 <sup>a</sup>	7,2 <sup>a</sup>	-----
	Controles (n=100)	20±4,5	10,3±3,5	63±18	42±12	-----
Fibroblastos	P <sub>1</sub> (n=3)	32,7±6,8	15,3±2,5	13,4±5,2 <sup>a</sup>	11,5±3,4 <sup>a</sup>	71,7±7,6
	P <sub>2</sub> (n=3)	33,4	8,3	41,8	40,9	4,7±2 <sup>a</sup>
	Controles (n=15)	36,9±14	13,6±2,7	45,8±9,9	41,9±10	60,6±15,6
Cibridos	CLON A (n=4)	6,1±2,4 <sup>a</sup>	10,2±3,1	31,9±8,9 <sup>a</sup>	6,9±2,6 <sup>a</sup>	45,7±21,2
	CLON B (n=4)	6,7±2,2 <sup>a</sup>	7,41±3,6	35,7±4,9 <sup>a</sup>	6,7±4,3 <sup>a</sup>	30,5±6,1
	CLON C	11,2±1,7	27±2,8	76±2,9	44,6±19	95±20
	CLON D	11,6±1,6	29±2,1	77,3±2,4	75,9±2,4	81,3±29,4
	CLON E (n=4)	11,8±1,3	21,1±4,7	84,7±14,9	51,4±8,4	58,4±24,3
	CLON F (n=4)	13,9±1,5	31,2±3,9	87,5±17,7	66,6±16,1	63,6±26,9
	143B (n=4)	15,2±3,9	18,5±9,7	91±17,2	53,8±13,5	80,1±21,9

**Tabla 7. Medida de las actividades enzimáticas en músculo, fibroblastos y cibridos transmitocondriales de ambas mutaciones.** Los valores están representados como Media ± E.E.M. Las actividades enzimáticas en músculo (nmol<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína) están referidas al porcentaje de actividad de la CS. En fibroblastos y en cibridos transmitocondriales los datos son expresados como nmol<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína.

<sup>a</sup> p<0,01 (Test U de Mann-Whitney)

### 1.5.2 Medida del potencial de membrana y de los niveles de ATP total en las líneas celulares en estudio

Como complemento a los datos obtenidos en la medida de la actividad de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, y para comprobar si la disminución de las actividades de los complejos III y IV, en los fibroblastos del paciente P<sub>1</sub>, y de la actividad del complejo V, en los fibroblastos del paciente P<sub>2</sub>, afecta a la energización mitocondrial, medimos el potencial de membrana mitocondrial y la producción de ATP total en dichas líneas celulares. El  $\Delta\Psi_m$  fue medido con la sonda JC-1 mediante citometría de flujo. Los valores de  $\Delta\Psi_m$  representan el ratio entre la intensidad de fluorescencia a 590 nm (rojo, agregados) y a 527 nm (verde, monómeros) (ver apartado 2.5.3 de Materiales y Métodos). En los fibroblastos del paciente P<sub>1</sub> se determinó que el  $\Delta\Psi_m$  estaba reducido en un 60%, cuando se compara con las células control, mientras que el paciente P<sub>2</sub> presentaba un  $\Delta\Psi_m$  normal (Tabla 8). La medida del ATP total generado en los fibroblastos mostró un descenso significativo en ambos pacientes con respecto a los fibroblastos control (Tabla 8).

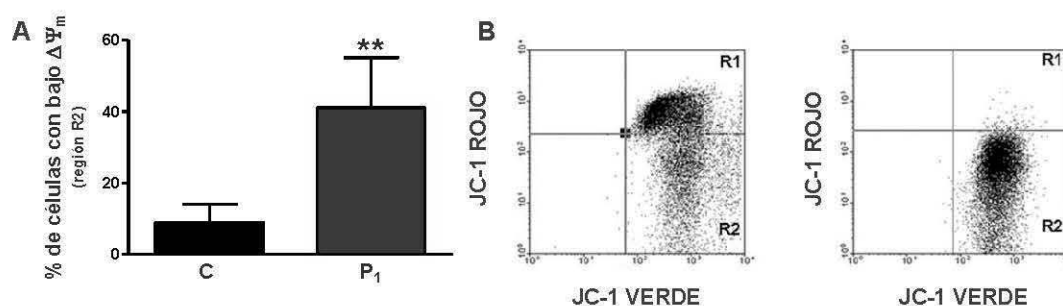
Ambos parámetros también fueron medidos en los híbridos transmitocondriales construidos. En los híbridos A y B, homoplásmicos mutantes para la mutación m.12300G>A, se observó un bajo  $\Delta\Psi_m$  en comparación con la línea control 143B. Los clones heteroplásmicos (para la mutación m.12300G>A) C (con un 78% de ADNmt mutado) y D (con un 30% de ADNmt mutado), a los 30 días de estudio, presentaron un  $\Delta\Psi_m$  normal. Los clones E y F, homoplásmicos mutantes para la mutación m.8993T>G, evidenciaron un  $\Delta\Psi_m$  normal (Tabla 8). Los niveles de ATP total en los híbridos homoplásmicos (clones A y B) tanto para la mutación m.12300G>A como para la mutación m.8993T>G (clones E y F) mostraron un descenso significativo de dicho parámetro mientras que los clones heteroplásmicos para la mutación m.12300G>A (clones C y D) a los 30 días de estudio, presentaron uno valores normales (Tabla 8).

MUESTRA		$\Delta\Psi_m$	ATP
Fibroblastos	P <sub>1</sub> (n=3)	1,7±0,5 <sup>a</sup>	20,0±1,2 <sup>a</sup>
	P <sub>2</sub> (CV n=3)	2,6±1,1	24,8±6,6 <sup>a</sup>
	Controles (n=15)	2,8±0,3	35,5±7,3
Cibridos m.12300G>A	CLON A (n=4)	0,9±0,3 <sup>a</sup>	3,6±2,2 <sup>a</sup>
	CLON B (n=4)	0,8±0,1 <sup>a</sup>	6,8±4,0 <sup>a</sup>
	CLON C (n=4)	2,3±1,1	28,4±2,8
	CLON D (n=4)	2,5±0,4	34,7±2,7
Cibridos m.8993T>G	CLON E (n=4)	2,3±0,4	23,0±1,0 <sup>a</sup>
	CLON F (n=4)	2,3±0,9	24,7±1,2 <sup>a</sup>
	143B (n=4)	2,8±0,3	29,5±2,6

**Tabla 8. Detección del  $\Delta\Psi_m$  mediante citometría de flujo y de los niveles de ATP total en las líneas celulares en estudio.** Los valores del  $\Delta\Psi_m$  se presentan como Media  $\pm$  DE de la relación de fluorescencia de color rojo/verde. Se observa la disminución significativa del  $\Delta\Psi_m$  del paciente P<sub>1</sub> y de los clones A y B y medida de la producción total de ATP en todas las líneas celulares en estudio, medido con un kit de bioluminiscencia. Los valores están representados como Media  $\pm$  E.E.M. Los datos son expresados como nmdes de ATP. mg<sup>-1</sup> de proteína.

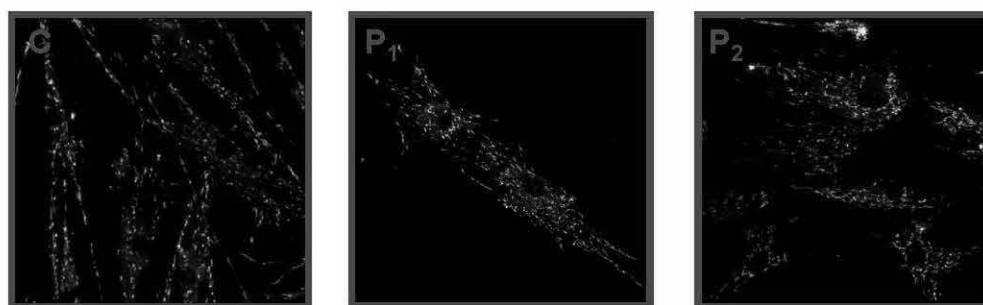
<sup>a</sup>p<0,01 (Test U de Mann-Whitney)

Además, observamos el hecho de que el porcentaje de células sin  $\Delta\Psi_m$  del paciente P<sub>1</sub> era significativamente más alto que en los controles (Fig. 12;  $41,1 \pm 14$  Vs.  $9 \pm 5$ ;  $p < 0,01$ ). Estos datos se obtuvieron después de la detección de las regiones ocupadas por las células con o sin  $\Delta\Psi_m$  a través del uso de un agente desacoplante CCCP.



**Figura 12. Determinación del porcentaje de células con bajo potencial de membrana (A)** Porcentaje de células del paciente P<sub>1</sub> sin  $\Delta\Psi_m$ . **(B)** Los gráficos de puntos (dot-plots) muestran los datos de los fibroblastos del paciente P<sub>1</sub> ilustrando el método para la detección de la región R1 y R2. El panel de la izquierda muestra el análisis de citometría de flujo después de incubar las células con JC-1. El panel derecho muestra la adquisición de fluorescencia después de la adición del agente desacoplante CCCP, que nos permiten distinguir entre las células con una alta fluorescencia en rojo y baja en verde (R1) o con una alta fluorescencia en verde y baja en rojo (R2). \*\* $p < 0,01$  (Test U de Mann-Whitney)

Por otra parte usamos la sonda JC-1 para observar el  $\Delta\Psi_m$  mediante microscopía confocal. Las imágenes de la figura 13 muestran el bajo  $\Delta\Psi_m$  del paciente P<sub>1</sub> y el  $\Delta\Psi_m$  normal del paciente P<sub>2</sub>, confirmando los resultados obtenidos mediante citometría de flujo.

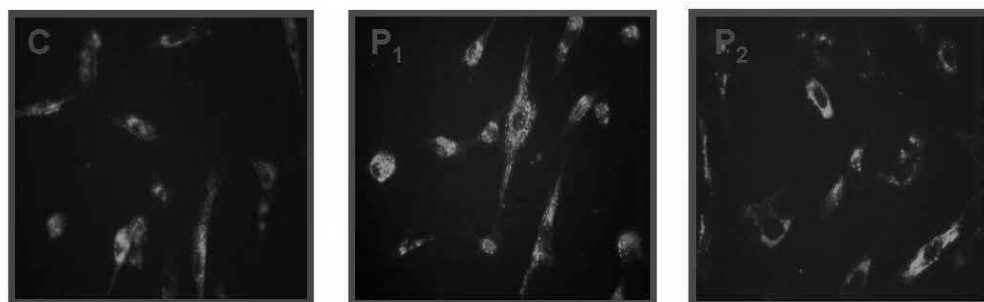


**Figura 13. Potencial de membrana observado mediante microscopía confocal.** Imágenes de microscopía confocal que muestran el potencial de membrana de fibroblastos control y de los pacientes. Tras 24 horas de crecimiento sobre cubreobjetos, las células fueron teñidas con  $7 \mu\text{M}$  de JC-1. Las regiones con un alto  $\Delta\Psi_m$  presentan un color rojo debido a la formación de dímeros del marcador. Regiones despolarizadas aparecen en color verde debido a la fluorescencia de JC-1 monomérico. Se observa el bajo  $\Delta\Psi_m$  que presenta el paciente P<sub>1</sub>. La tinción y captura de las imágenes fue *in vivo*.

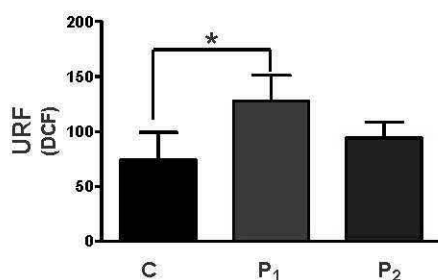
## 1.6. Medida de la producción de especies reactivas de oxígeno

Mutaciones en ARNt mitocondriales y deleciones del genoma mitocondrial están asociados a un aumento del estrés oxidativo celular (Indo HP et al., 2006; Wu SB et al., 2010) mientras que mutaciones en genes estructurales se asocian a una mayor sensibilidad al estrés oxidativo (Battisti C et al., 2004; Baracca A et al., 2007). Para comprobar si este efecto se producía en nuestros modelos celulares, en una primera aproximación las especies reactivas de oxígeno de los fibroblastos fueron observadas mediante microscopía de fluo-

rescencia (Fig. 14) y después cuantificadas mediante citometría de flujo (Fig. 15), usando para ello la sonda diacetato de 5-carboxi-2',7' diclorodihidrofluoresceína o Carboxi-H<sub>2</sub>DCFDA (descrito en el apartado 2.5.3 de Materiales y Métodos).

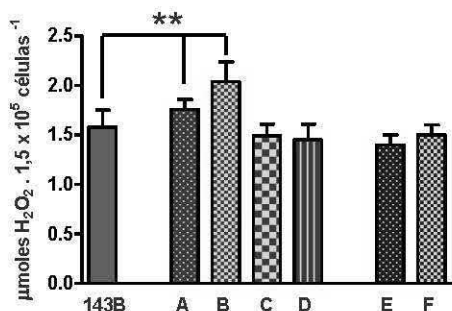


**Figura 14. Especies reactivas de oxígeno observadas mediante microscopía de fluorescencia.** Imágenes de microscopía de fluorescencia (20X) que muestran los ROS en fibroblastos control y de los pacientes. Tras 24 horas de crecimiento sobre cubreobjetos, las células fueron teñidas con Carboxi- H<sub>2</sub>DCFDA 15 μM. Se observa una mayor intensidad de fluorescencia de forma homogénea en todas sus células en el paciente P<sub>1</sub>, debido a la presencia de más especies reactivas de oxígeno. La tinción y captura de las imágenes fue *in vivo*.



**Figura 15. Aumento de los ROS en el paciente portador de la mutación m.12300G>A.** Medida de los ROS mediante citometría del flujo en los fibroblastos tratados con Carboxi- H<sub>2</sub>DCFDA. P<sub>1</sub>: 127,93 ± 23,31 P<sub>2</sub>: 94 ± 14,71; C: 73,99 ± 25,18 (Media ± DE; n=4 mediciones en los fibroblastos de pacientes y n=14 mediciones en las células control) \* p< 0,05 (Test U de Mann-Whitney)

Para determinar los ROS en los cíbridos transmitocondriales se utilizó un kit que detecta fluorométricamente la concentración de peróxido de hidrógeno (Hydrogen Peroxide Fluorometric Detection Kit; Assay Designs) que generan las distintas líneas celulares. Se observó un incremento significativo en los clones A, B respecto a las células 143B (homoplásmicos mutantes para la mutación m.12300G>A; clon A: 1,76 ± 0,1; clon B: 2,04 ± 0,2 Vs 1,58 ± 0,17; p< 0,01). Los clones heteroplásmicos C (con un 78% de ADNmt mutado para la mutación m.12300G>A) y D (con un 30% de ADNmt mutado para la mutación m.12300G>A), a los 30 días de estudio, presentaron unos niveles de ROS normales (clon C: 1,49 ± 0,12; clon D: 1,45 ± 0,16), al igual que los clones E y F (homoplásmicos mutantes para la mutación m.8993T>G; clon A: 1,40 ± 0,1; clon B: 1,50 ± 0,1).

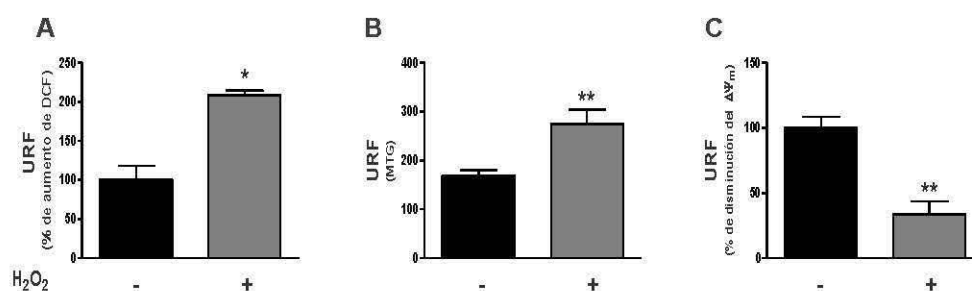


**Figura 16. Detección de los ROS en los cíbridos transmitocondriales.** Los datos indican los μmoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que generan 1,5 x 10<sup>5</sup> células. Los valores se presentan como Media ± DE (media de 3 estimaciones a los distintos días de crecimiento; n=12 mediciones en las células 143B). \*\* p< 0,01 (Test U de Mann-Whitney)

## 1.7 Medida de la masa mitocondrial, potencial de membrana y de las especies reactivas de oxígeno en fibroblastos control sometidos a estrés oxidativo.

Como resumen de los resultados obtenidos, la mutación m.12300G>A en fibroblastos provocaba una reducción en la actividad de los complejos III y IV de la cadena de transporte electrónico, una disminución significativa en los niveles de ATP total y del  $\Delta\Psi_m$ , un incremento de la masa mitocondrial y un aumento significativo en la producción de las especies reactivas de oxígeno. Por su parte la mutación m.8993T>G dio lugar a un fallo en el complejo V y como consecuencia una disminución significativa en los niveles de ATP total, siendo el  $\Delta\Psi_m$ , la masa mitocondrial y los niveles de ROS normales.

Puesto que una de las diferencias más significativas entre las dos mutaciones patogénicas es el incremento de producción de ROS en la línea m.12300G>A respecto a la línea portadora de la mutación m.8993T>G, y dado que se ha relacionado el estrés oxidativo con el incremento de la masa mitocondrial (Lee HC et al., 2000; Lee HC et al., 2002) quisimos comprobar si al someter a células control a este proceso se provocaba un incremento de la masa mitocondrial y una alteración del  $\Delta\Psi_m$ . Para ello añadimos al medio de crecimiento de peróxido de hidrógeno (180  $\mu\text{M}$ ) y valoramos la masa mitocondrial, el  $\Delta\Psi_m$  y los ROS a las 48 horas de tratamiento. Observamos un incremento significativo de la masa mitocondrial ( $275 \pm 29,9$  Vs.  $167,5 \pm 13,5$ ) y una disminución del 60% en el  $\Delta\Psi_m$  ( $33,5 \pm 10,0$  Vs.  $100 \pm 8,5$ ).



**Figura 17. Análisis de las especies reactivas de oxígeno, masa mitocondrial y potencial de membrana en fibroblastos control sometido a estrés oxidativo.** (A) Incremento de ROS tras el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dato expresado como la media del porcentaje de aumento de los ROS con respecto a las células sin tratar  $\pm$  E.E.M. ( $208,7 \pm 5,8$  Vs.  $100 \pm 18,0$ ) (B) Aumento de la masa mitocondrial tras el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dato expresado como Media  $\pm$  E.E.M (C) Disminución del potencial de membrana tras el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dato expresado como la media del porcentaje de disminución del  $\Delta\Psi_m$  con respecto a las células sin tratar  $\pm$  E.E.M.

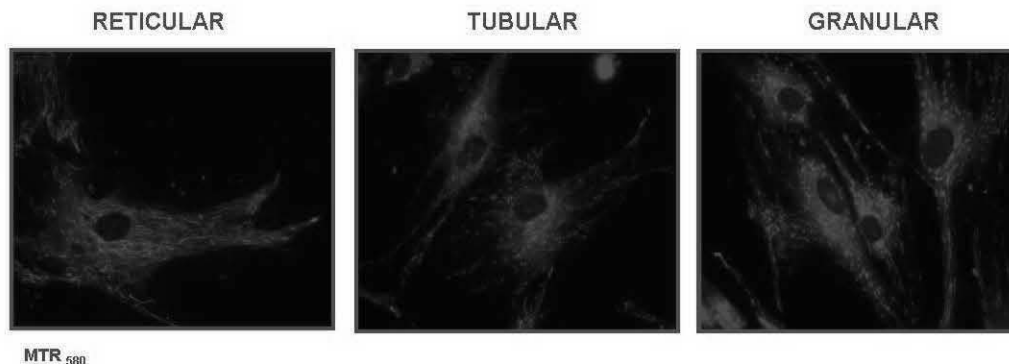
\*\* p < 0,01 \*\*\* p < 0,001 (Test U de Mann-Whitney)

## II. Análisis de la red mitocondrial en los fibroblastos de los pacientes

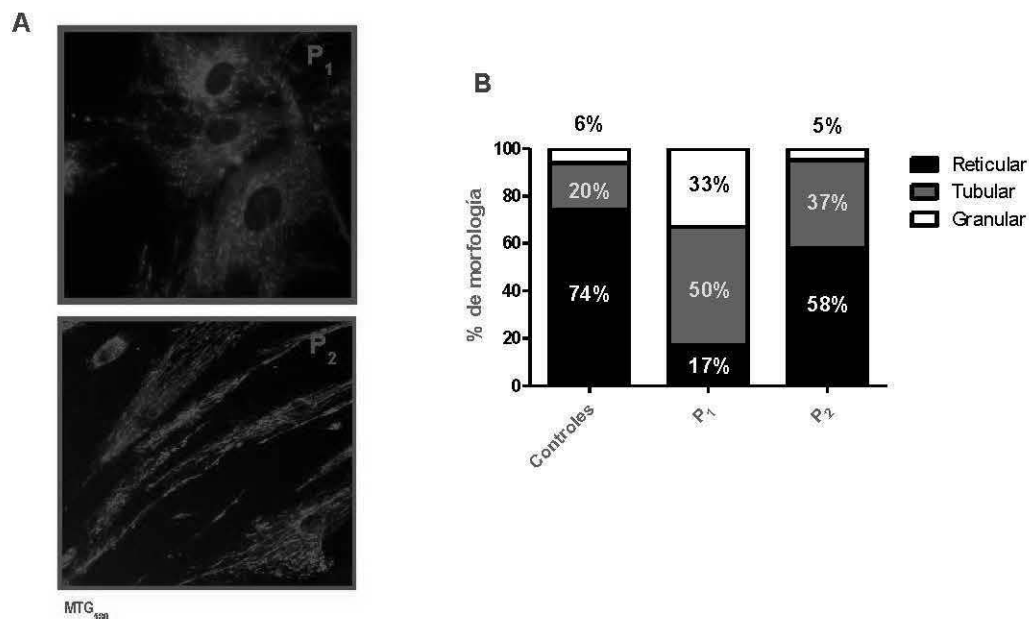
Las mitocondrias son organelos dinámicos, capaces de intercambiar su morfología entre redes elongadas e interconectadas o fragmentadas y desconectadas mediante los procesos de fusión y fisión mitocondrial, respectivamente (Westermann B, 2002). Esto eventos permiten sostener el equilibrio redox, preservar la integridad del ADNmt, modular la muerte celular y mantener la función mitocondrial formando más mitocondrias (biogénesis) o degradando, mediante autofagia (o mitofagia), aquellas mitocondrias que están dañadas. Los cambios en la morfología mitocondrial están fuertemente regulados y su forma puede cambiar desde unidades pequeñas (morfología granular), fragmentadas (morfología tubular) o grandes redes de forma alargada (morfología reticular) (Bereiter-Hahn J & Vöth M, 1994) en función de las necesidades celulares. En el



laboratorio hemos identificado estos tres tipos de morfologías (Fig. 18) y hemos cuantificado, tanto en fibroblastos control (n=150 células) como en los fibroblastos de los pacientes (n=50 células de ambos pacientes), el tipo de morfología mayoritaria. En los controles existe un predominio de la morfología reticular, mientras que el paciente P<sub>1</sub> presenta un alto porcentaje en el tipo granular. El paciente P<sub>2</sub> presenta un aumento de la morfología tubular frente a la morfología de los controles (Fig. 19).



**Figura 18. Ejemplos de los tres tipos de morfología de la red mitocondrial.** Imágenes de microscopía confocal (objetivo 63x) que muestra las tres morfologías en las que ha sido clasificada la red mitocondrial: reticular, tubular y granular. La células crecieron sobre cubreobjetos y fueron teñidas con MTR<sub>580</sub> 0,1 μM. La tinción y captura de las imágenes fue *in vivo*.



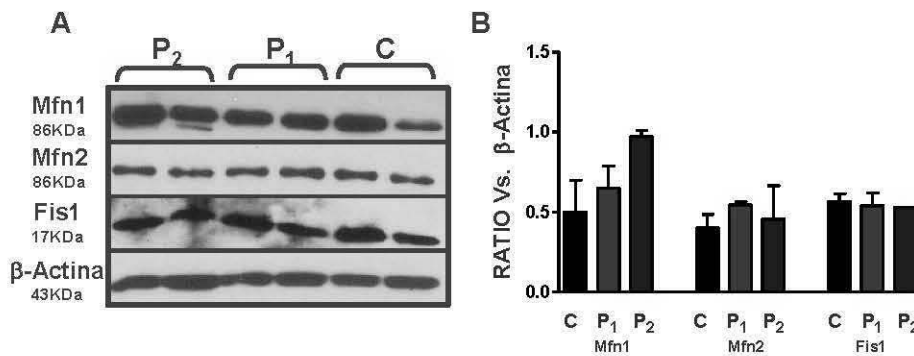
**Figura 19. Morfología de la red mitocondrial de los pacientes.** (A) Imágenes de microscopía confocal (objetivo 63x) de los fibroblastos de los pacientes teñidos con MTR<sub>580</sub> 0,1 μM. Se observa un aumento significativo de la morfología granular en el paciente P<sub>1</sub>, mientras que el paciente P<sub>2</sub> presenta un aumento de la morfología reticular. (B) Tabla resumen de la clasificación de la morfología tanto de controles como de pacientes.

### III. Estudio de las proteínas implicadas en la fusión y fisión mitocondrial

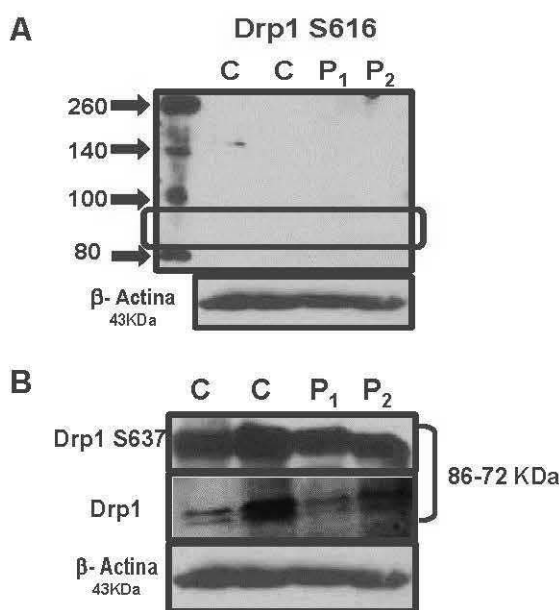
Los procesos de fusión y fisión mitocondrial son controlados por la actividad de un grupo de GTPasas relacionadas con la familia de las dinaminas que manifiestan efectos opuestos. La fusión mitocondrial está regulada por tres proteínas: Mitofusina 1, Mitofusina 2 y OPA1, mientras que la fisión está mediada por Drp1 y Fis1. Un perfecto equilibrio entre la fusión y la fisión se consigue mediante una correcta funcionalidad mitocondrial: una precisa síntesis de ATP (Mitra K et al., 2009; Tondera D et al., 2009) y un  $\Delta\Psi_m$  adecuado (Chen H et al., 2003) manteniendo unos bajos niveles de ROS (Jendrach M et al., 2008). La variación en la expre-

sión en alguna de estas proteínas junto con la disfunción mitocondrial observada podrían ser claves para explicar los cambios observados en la morfología de la red mitocondrial. Por ello, dichas proteínas fueron inmunodetectadas y cuantificadas tal y como muestra la Figura 21. No encontramos diferencias significativas en los niveles de Mfn1, Mfn2 y Fis1 con respecto a las líneas control.

En cuanto a la proteína Drp1, se ha descrito que su fosforilación en la posición S616 induce su incorporación a la mitocondria y un incremento de la fisión vía Cdk1/Ciclina B durante la mitosis (Taguchi N et al., 2007), y por el contrario, un aumento de la fosforilación, vía 3PK, en la posición S637 provoca una disminución de la fisión favoreciendo su retención en el citosol (Cribbs JT & Strack S, 2007). En nuestro estudio no encontramos diferencias significativas entre los pacientes ni frente a los controles en los niveles de Drp1 o su grado de fosforilación. En todos los casos las muestras presentaban ausencia de fosforilación en S616 y fosforilación en el sitio S637 (Figura 21).

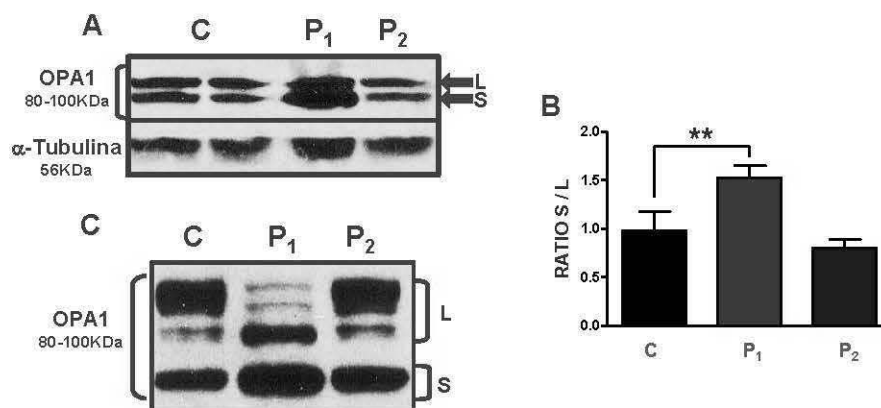


**Figura 20. Proteínas implicadas en la fusión y en la fisión mitocondrial.** (A) Detección de distintas proteínas implicadas en la fusión y fisión mitocondrial mediante western-blot. Se analizaron 20 µg de proteína total en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 15%. (B) Gráfica que representa la relación de las distintas proteínas estudiadas y su control de carga (β-actina). No se aprecian diferencias en ninguna de las proteínas analizadas (Media ± DE; n=3 experimentos independientes).



**Figura 21. Drp1 fosforilada en S616 y en S637 (A).** Detección de Drp1 fosforilada el S616 mediante western-blot. Se analizaron 40 µg de proteína total en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 10%. Se observa en la imagen que las muestras no están fosforiladas. (B) Detección de Drp1 total y fosforilada el S637 mediante western-blot. Se analizaron 40 µg de proteína total en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 10%. Se observa la fosforilación de Drp1 en la serina 637.

Con respecto a OPA1, proteína implicada en la fusión mitocondrial, no detectamos diferencias en los niveles de expresión de la proteína total en las muestras de los pacientes con respecto a las células control. Sin embargo, observamos un aumento significativo de las isoformas S con respecto a las isoformas L en el paciente P<sub>1</sub> (Fig. 22A y 22B). Para confirmar esta observación, utilizamos un anticuerpo que nos permitió determinar las 5 isoformas descritas por Ishihara y colaboradores (Ishihara N et al., 2006) tal y como muestra la figura 22C.

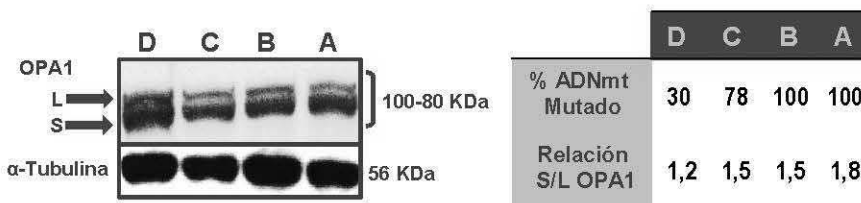


**Figura 22. OPA1.** (A) Detección de las isoformas L y S de OPA1 mediante western-blot. Se analizaron 20 µg de proteína total en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 8%. Se realizó el western-blot con un anticuerpo que agrupa en dos las isoformas de OPA1 (B) Gráfica que representa el ratio entre las isoformas S con respecto a las isoformas L de OPA1 observada en el western-blot (Media ± DE; n=3 mediciones en los fibroblastos de pacientes y n=6 controles) (C) Detección de las distintas isoformas S y L de OPA1 mediante western-blot. Se analizaron 20 µg de proteína total en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 8%. Se realizó el western-blot con un anticuerpo que diferencia las 5 isoformas de OPA1.

\*\* p= 0,018 (Test U de Mann-Whitney)

### 3.1 Determinación de las isoformas de OPA1 en los cibridos portadores de la mutación m.12300A>G

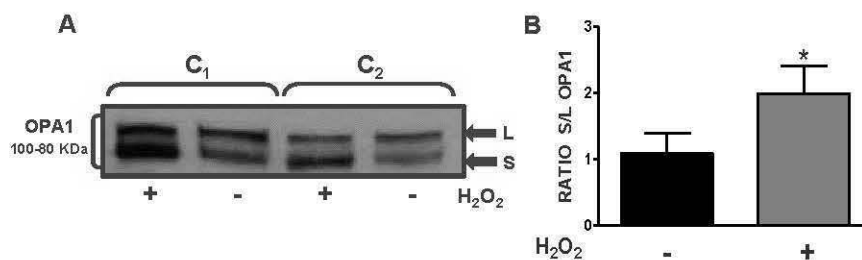
Aunque la morfología de la red mitocondrial en los cibridos portadores de la mutación m. 12300G>A no fue observada, quisimos comprobar si también se producía una disminución de las isoformas L de OPA1, tal como habíamos observado en los fibroblastos portadores de esta mutación. Con proteínas extraídas a los 30 días de crecimiento, pudimos observar un aumento en los niveles de las isoformas S de OPA1 respecto a las isoformas L en los clones A, B y C y además ese aumento parece correlacionar con el aumento en el porcentaje de ADNmt mutado (Fig. 23).



**Figura 23. Relación entre las isoformas de OPA1 y el porcentaje de mutación m.12300G>A.** (A) Detección de las isoformas S y L de OPA1 mediante western-blot de los cibridos transmitocondriales portadores de la mutación m.12300G>A a los 30 días de crecimiento. Se analizaron 20 µg de proteína total en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 8%. (B) La relación entre las isoformas S con respecto a las L aumenta en relación al aumento del porcentaje de mutación.

### 3.2 Determinación de las isoformas de OPA1 en fibroblastos control sometidos a estrés oxidativo.

Tras comprobar el incremento de la masa mitocondrial y la disminución del  $\Delta\Psi_m$  en fibroblastos control sometidos a estrés oxidativo (estudio realizado en el apartado 1.7) quisimos determinar si dicho estrés afectaba a los niveles de las fracciones S y L de OPA1, tal como habíamos observado en el paciente P<sub>1</sub>. Para ello, las distintas isoformas de OPA1 fueron determinadas mediante western-blot, y como se puede observar en la Figura 26 se produce una disminución de las isoforma L, aumentando así el ratio S/L (Fig. 24B).



**Figura 24. Variación de la relación entre las isoformas de OPA1 en fibroblastos sometidos a estrés oxidativo.** (A) Detección de las isoformas S y L de OPA1 mediante western-blot de controles sometidos a estrés oxidativo. Se analizaron 20  $\mu$ g de proteína total en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 8%. (B) Aumento de la relación entre las isoformas S con respecto a las L tras el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Media  $\pm$  DE; n=3 mediciones independientes). \* p= 0,028 (Test U de Mann-Whitney)

## IV. Relación entre los microtúbulos y la proliferación mitocondrial

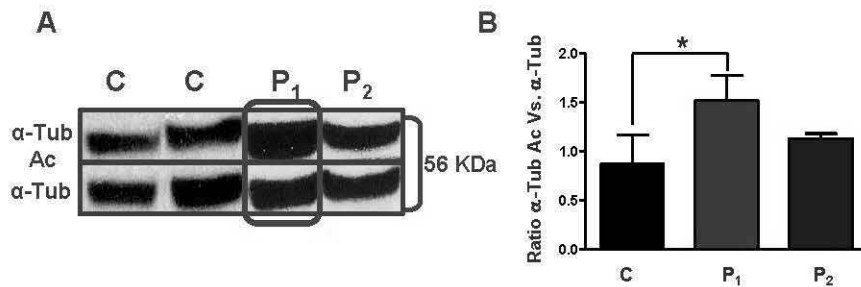
Los microtúbulos son los responsables de la regulación de la distribución de las mitocondrias en células de mamíferos (Heggeness MH et al, 1978). La unión MTs-mitocondria influye en muchos procesos celulares (Boldogh IR, 2007). Su estabilidad está relacionada con un aumento en la acetilación de  $\alpha$ -tubulina (Takemura R et al., 1992). Con estos antecedentes quisimos determinar los niveles de expresión de  $\alpha$ -tubulina acetilada en las distintas líneas celulares para así poder establecer una posible relación entre la proliferación mitocondrial y el grado de acetilación de  $\alpha$ -tubulina.

### 4.1 Inmunodetección de $\alpha$ -tubulina acetilada

$\alpha$ -Tubulina acetilada fue detectada en todas las líneas celulares del estudio (fibroblastos y cíbridos transmitocondriales) y en fibroblastos control sometidos a estrés oxidativo.

#### 4.1.1 Inmunodetección de $\alpha$ -tubulina acetilada en fibroblastos

La expresión de  $\alpha$ -tubulina acetilada en los fibroblastos, tanto de pacientes como de controles, fue determinada mediante western-blot. El paciente P<sub>1</sub>, portador de una mutación asociada a proliferación mitocondrial, presenta un aumento significativo de  $\alpha$ -tubulina acetilada en relación a la  $\alpha$ -tubulina total (Fig. 25).

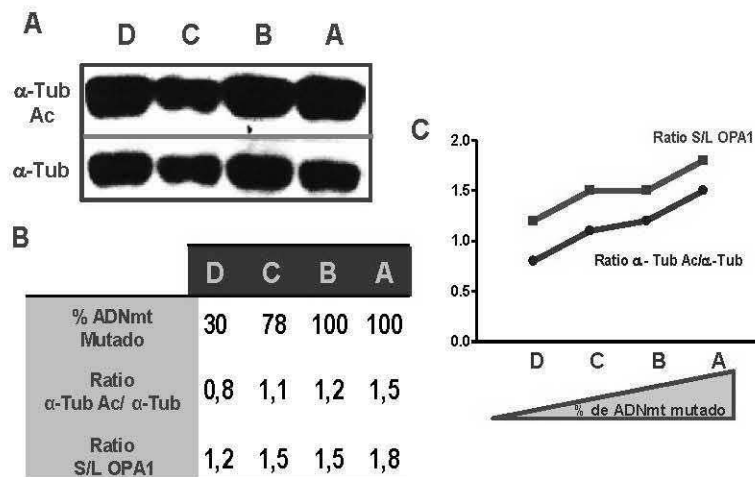


**Figura 25. Determinación de  $\alpha$ -tubulina acetilada en fibroblastos.** (A) Detección de  $\alpha$ -tubulina acetilada mediante western-blot. Se analizaron 20  $\mu$ g de proteína total en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 10%. Se realizó el western-blot con el anticuerpo correspondiente. (B) Gráfica que representa el aumento de expresión de  $\alpha$ -tubulina acetilada en el paciente P1 observada en el western-blot (media  $\pm$  DE; n=3 mediciones en los fibroblastos de pacientes y n=6 controles).

\* p=0,03 (Test U de Mann-Whitney)

#### 4.1.2 Inmunodetección de $\alpha$ -tubulina acetilada en los cíbridos portadores de la mutación m.12300A>G

También fueron medidos los niveles de  $\alpha$ -tubulina acetilada en los cíbridos portadores de la mutación m.12300G>A, ya que todos los clones, a excepción del clon D, se había observado un aumento de la masa mitocondrial. Usamos proteínas extraídas a los 30 días de crecimiento, al igual que hicimos para la determinación de las fracciones de OPA1 y comprobamos que también existía un aumento de  $\alpha$ -tubulina acetilada y que al igual que en el aumento de las fracciones S de OPA1, éste dependía del porcentaje de mutación que portaban dichas líneas celulares (Fig. 26)

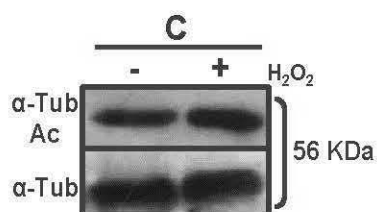


**Figura 26. Relación entre aumento en el porcentaje de mutación m.12300G>A, el aumento de  $\alpha$  tubulina acetilada y la modificación de las isoformas de OPA1.** (A) Detección de  $\alpha$ -tubulina acetilada mediante western-blot en los cíbridos portadores la mutación m. 12300G>A. Se analizaron 20  $\mu$ g de proteína total en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 10% y se realizó el western-blot con el anticuerpo correspondiente. (B y C) Tabla y representación gráfica mostrando la aparente relación entre el incremento del porcentaje de ADNmt mutado y el incremento de los niveles de  $\alpha$ -tubulina acetilada y las isoformas S de OPA1.

#### 4.1.2 Inmunodetección de $\alpha$ -tubulina acetilada en fibroblastos control sometidos a estrés oxidativo

Un incremento del estrés oxidativo celular, además de provocar un incremento de la masa mitocondrial, una disminución del  $\Delta\Psi_m$  y un incremento de las isoformas S de OPA1, también ha sido relacionado con un aumento en la acetilación de  $\alpha$ -tubulina (Spodnik JH et al, 2002), tal y como ocurría en el paciente P1.

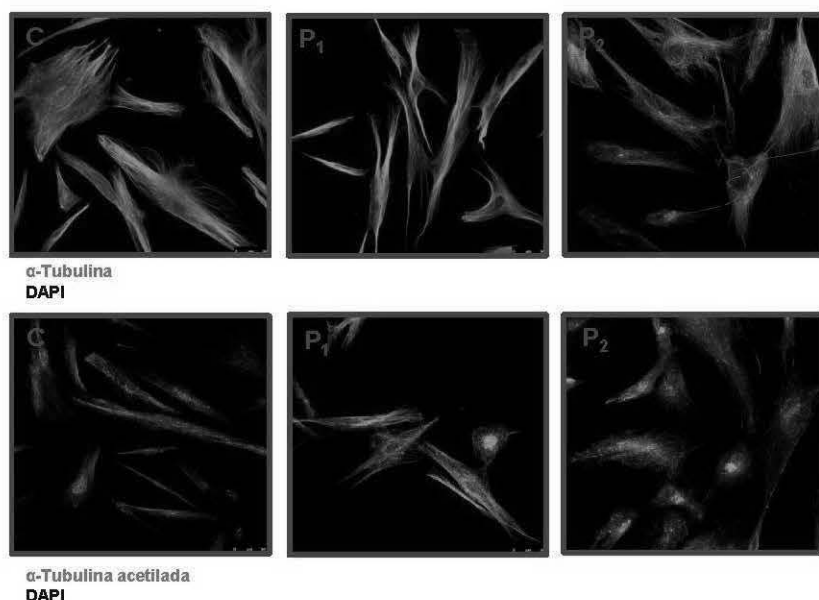
También en los controles que fueron sometidos a estrés oxidativo dicho incremento fue hallado, como se puede observar en la figura 27.



**Figura 27. Determinación de  $\alpha$ -tubulina acetilada en fibroblastos control sometidos a estrés oxidativo.** Tras el tratamiento de 48 horas con 180  $\mu$ M de  $H_2O_2$ , se analizaron 20  $\mu$ g de proteína total en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 10%. Se realizó el western-blot con el anticuerpo correspondiente

## 4.2 Visualización de $\alpha$ -tubulina y $\alpha$ -tubulina acetilada mediante microscopía confocal

Quisimos observar mediante microscopía confocal la expresión de  $\alpha$ -tubulina acetilada en los fibroblastos, tanto de los pacientes como de los controles. Las imágenes muestran un claro aumento de  $\alpha$ -tubulina acetilada en el paciente  $P_1$ , corroborando los resultados obtenidos mediante western-blot.



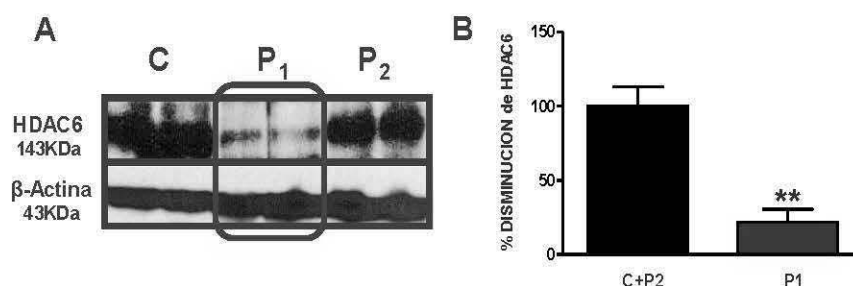
**Figura 28. Distribución de  $\alpha$ -tubulina y de  $\alpha$ -tubulina acetilada en fibroblastos.** Las células crecieron durante 48 horas en cubreobjetos y fueron fijadas (con PFA al 4%), permeabilizadas y teñidas con los anticuerpos correspondientes (ambos en color verde). Para el marcaje del núcleo se usó del fluorocromógeno DAPI (azul). Se puede observar el aumento de  $\alpha$ -tubulina acetilada en el paciente  $P_1$ . Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal (63X).

## 4.3 HDAC6

El proceso de acetilación y desacetilación de los MTs debe estar estrechamente regulado en las células. La  $\alpha$ -tubulina puede ser acetilada en el extremo N-terminal del residuo lisina de la posición 40. MEC-17 es la  $\alpha$ -tubulina acetiltransferasa ( $\alpha$ TAT) que se encarga de realizar este proceso, mientras que HDAC6 y Sirt2 se encargan de la deacetilación de  $\alpha$ -tubulina (Hubbert C et al., 2002; North BJ et al., 2003; Zhang Y et al., 2003; Akella J et al., 2010). HDAC6, es una histona deacetilasa de la clase IIb, cuya función parece ser específica para  $\alpha$ -tubulina (Zhang Y et al., 2003). Una sobreexpresión de HDAC6 conllevaría a una hipoacetilación de  $\alpha$ -tubulina mientras que la inhibición conduciría a una hiperacetilación.

### 4.3.1 Inmunodetección de HDAC6 en fibroblastos

Con los resultados obtenidos en el abordaje anterior nos propusimos determinar la expresión de HDAC6, mediante wester-blot, para comprobar si el aumento de  $\alpha$ -tubulina acetilada en el paciente P<sub>1</sub> se debía a una disminución en los niveles de dicha enzima. Como muestra la figura 31, el paciente P<sub>1</sub> muestra una disminución significativa en la expresión de HDAC6, lo que podría dar lugar a un incremento en la acetilación de  $\alpha$ -tubulina.



**Figura 29. Disminución de los niveles de HDAC6 en el paciente portador de la mutación m.12300G>A.** (A) Detección de HDAC6 mediante western-blot. Se analizaron 20  $\mu$ g de proteína total en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 6%. Se realizó el western-blot con el anticuerpo correspondiente. (B) Gráfica que representa el porcentaje de disminución de HDAC6 en el paciente P<sub>1</sub> observada mediante western-blot  $\pm$  DE (n=4 mediciones en los fibroblastos del paciente P<sub>1</sub> y n=8 muestras control más paciente P<sub>2</sub>, ya que entre los valores de los controles y del paciente P<sub>2</sub> no existían diferencias).

\*\* p=0,002 (Test U de Mann-Whitney)

### 4.3.2 Visualización de HDAC6 mediante microscopía confocal

HDAC6 fue observada mediante microscopía confocal. Como muestran las imágenes de la figura 30 se aprecia la disminución de HDAC6 en el paciente P<sub>1</sub>.



**Figura 30. Imágenes de HDAC6.** Las células crecieron durante 48 horas en cubreobjetos y fueron fijadas (con PFA al 4%), permeabilizadas y teñidas con el anticuerpo correspondiente. Para el marcaje del núcleo se usó del fluorescente DAPI (azul). Se puede observar la disminución de HDAC6 en el paciente P<sub>1</sub>. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal (63X).

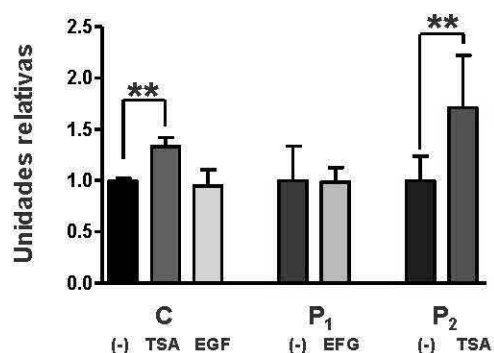
## 4.4 Estudio de la modulación de la actividad de HDAC6 mediante activadores o inhibidores enzimáticos y su relación con el proceso de biogénesis mitocondrial

La actividad enzimática de HDAC6 puede ser modulada químicamente. En el laboratorio hemos utilizado como inhibidor de la actividad de HDCA6 la tricostatina A (TSA) y como activador de la misma el EGF, con el fin de modificar el grado de acetilación de  $\alpha$ -tubulina y comprobar si dicha modulación es capaz de modificar la masa mitocondrial de las células tratadas. Los fibroblastos del paciente P<sub>1</sub> fueron tratados con EGF con el fin de hipoacetilar su  $\alpha$ -tubulina y así disminuir o al menos impedir el aumento de su masa mitocondrial,

mientras que los fibroblastos del paciente P<sub>2</sub> fueron tratados con TSA, a fin de provocar una hiperacetilación de  $\alpha$ -tubulina que conduzca a un aumento de la masa mitocondrial. En el caso de células control, el tratamiento se hizo con ambos reactivos.

#### 4.4.1 Medida de la masa mitocondrial de las células tratadas

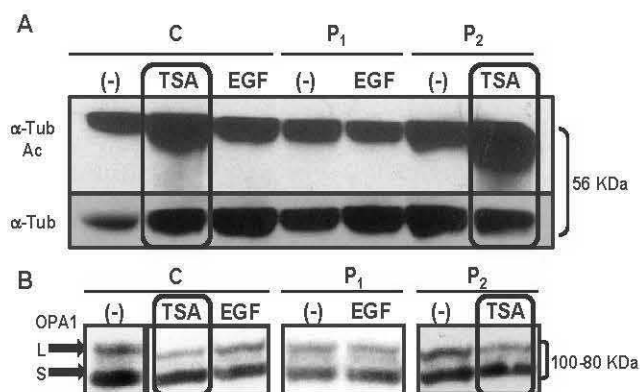
La masa mitocondrial de células tratadas y sin tratar fue medida mediante citometría de flujo, con el uso de la sonda MitoTracker®Green. En los controles se observó un incremento significativo de la masa mitocondrial tras el tratamiento con TSA ( $1,33 \pm 0,09$  Vs.  $0,99 \pm 0,03$ ) mientras que el tratamiento con EGF no modifica dicho parámetro ( $0,95 \pm 0,16$  Vs.  $0,99 \pm 0,03$ ). Los fibroblastos del paciente P<sub>1</sub> tratados con EGF presenta una masa mitocondrial similar a la de los fibroblastos sin tratar ( $0,98 \pm 0,14$  Vs.  $0,99 \pm 0,34$ ), al igual que ocurre en los fibroblastos control. El tratamiento con TSA en los fibroblastos del paciente P<sub>2</sub> conduce a un aumento de la masa mitocondrial como sucede en los controles tratados con dicha droga ( $1,71 \pm 0,24$  Vs.  $0,99 \pm 0,24$ ).



**Figura 31. Medida de la masa mitocondrial tras el tratamiento con TSA y con EGF.** La masa mitocondrial fue determinada mediante citometría de flujo. La gráfica muestra el aumento significativo de la masa mitocondrial cuando las células son tratadas con TSA. Las células tratadas con EGF presentan una proliferación normal. Los datos son expresados como valor relativo con respecto a la masa de las células sin tratar en cada caso. (n=3 mediciones en los fibroblastos de pacientes y n=6 muestras control sin tratar y tratados con la correspondiente droga). \*\* p < 0,01 (Test U de Mann-Whitney)

#### 4.4.2 Inmunodetección de $\alpha$ -tubulina acetilada y de las isoformas de OPA1 en las células tratadas

Quisimos ver si la modulación química de HDAC6 estaba relacionada con los cambios de las isoformas de OPA1 que habían sido observadas en el paciente P<sub>1</sub>, asociado a proliferación mitocondrial. El tratamiento de las células con TSA provocó un incremento de los niveles de  $\alpha$ -tubulina acetilada mientras que el tratamiento con EGF mantenía los niveles similares a las células sin tratar. En paralelo, el tratamiento con TSA iba acompañado de un incremento de la fracción S de OPA1 en relación a la fracción L cuando se comparaba con las células sin tratar o con el activador EGF.

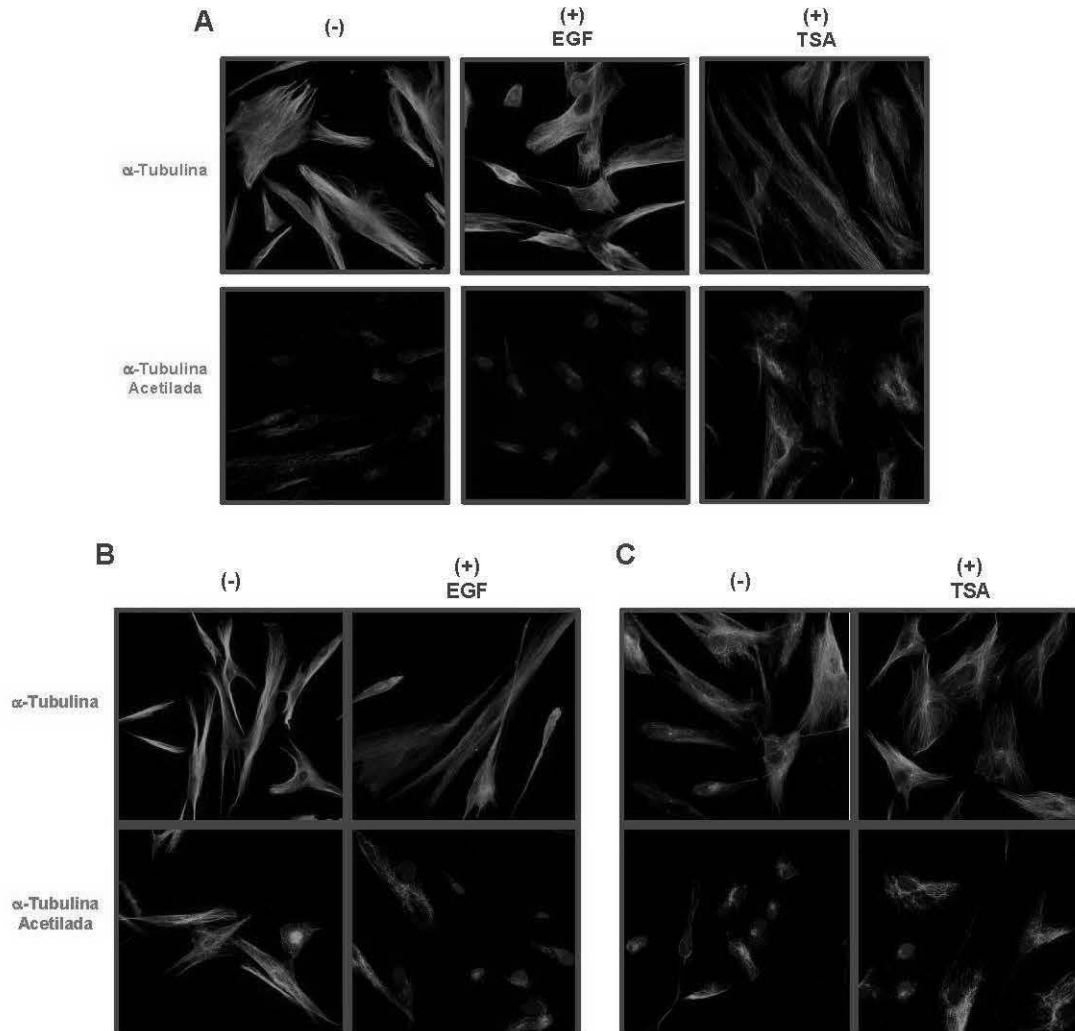


**Figura 32. Variación de los niveles de  $\alpha$ -tubulina acetilada y de las isoformas de OPA1 tras el tratamiento con TSA o con EGF.** (A) Detección de  $\alpha$ -tubulina acetilada mediante western-blot tras el tratamiento durante 24 horas con TSA o con EGF. Se analizaron 20  $\mu$ g de proteína total en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 10%. Se realizó el western-blot con el anticuerpo correspondiente. (B) Detección de las isoformas L y S de OPA1 mediante western-blot en las mismas células. Se analizaron 20  $\mu$ g de proteína total en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 8%. Se realizó el western-blot con el anticuerpo correspondiente.



#### 4.4.3 Visualización de $\alpha$ -tubulina / $\alpha$ -tubulina acetilada mediante microscopía confocal en las células tratadas

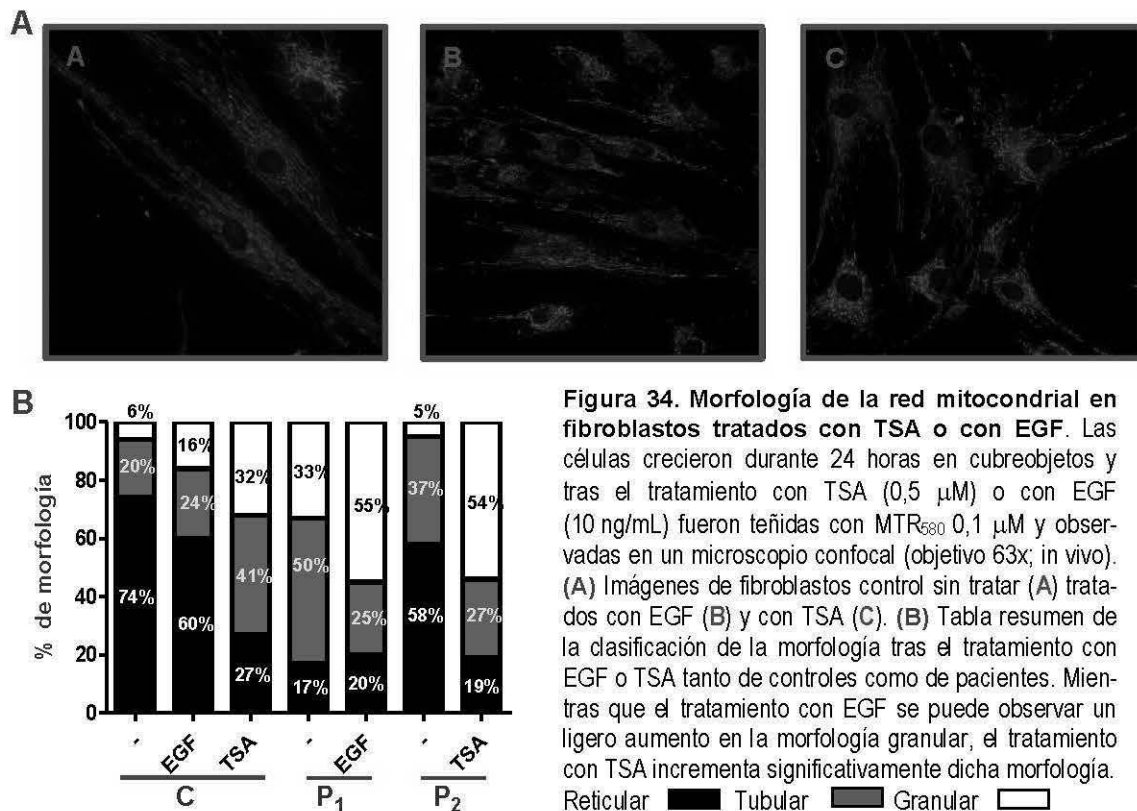
Corroboramos los resultados obtenidos mediante western-blot en las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal.



**Figura 33. Distribución de  $\alpha$ -tubulina y de  $\alpha$ -tubulina acetilada en fibroblastos tratados con TSA o con EGF.** Las células crecieron durante 24 horas en cubreobjetos y tras el tratamiento con TSA (0,5  $\mu$ M) o con EGF (10 ng/mL) fueron fijadas con paraformaldehído al 4%, permeabilizadas y teñidas con los anticuerpos correspondientes (ambos en color verde). Para el marcaje del núcleo se usó del fluorescente DAPI (azul). Se observa el aumento en la acetilación de  $\alpha$ -tubulina tras el tratamiento con TSA. (A) Imágenes de fibroblastos control, sin tratar y tratados con EGF y con TSA. (B) Fibroblastos del paciente P1 sin tratar y tratados con EGF. (C) Fibroblastos del paciente P2 sin tratar y tratados con TSA. Imágenes de microscopía confocal

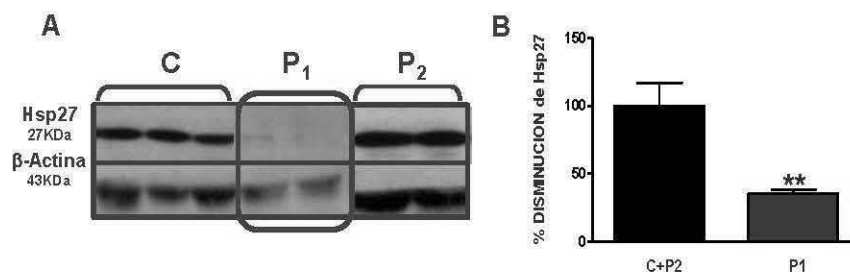
#### 4.4.4 Visualización de la red mitocondrial mediante microscopía confocal en las células tratadas

Tras determinar variaciones en la masa mitocondrial y en los niveles de  $\alpha$ -tubulina acetilada después del tratamiento con EGF o TSA, quisimos comprobar si dichos cambios había alterado la red mitocondrial. Como se puede ver en las imágenes, con ambos tratamientos se produce una alteración en la morfología de la red, produciéndose un incremento de la morfología granular en detrimento de la reticular.



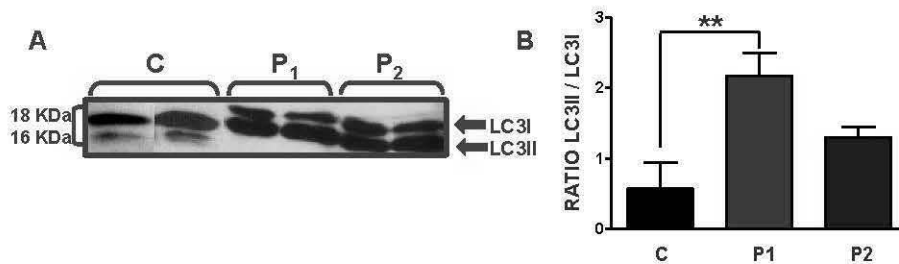
#### 4.5 Relación entre HDAC6 y Hsp27

Hsp27 es una proteína con multitud de funciones de la que destacamos, por ser de nuestro interés, su papel como regulador de los niveles de HDAC6. Su expresión se ve aumentada cuando las células son sometidas a estrés oxidativo o a un choque térmico (Landry J et al., 1989; Huot J et al., 1996; Arrigo AP et al., 2005), y disminuye cuando se produce una alteración de la actividad autofágica-lisosomal (Chen CY et al., 2011). Hsp27 fue inmunodetectada y comprobamos que el paciente P<sub>1</sub>, cuyos niveles HDAC6 eran muy bajos, carecía prácticamente de Hsp27 (Fig. 35). Además quisimos determinar si se estaba produciendo una alteración en la autofagia midiendo mediante western-blot los niveles de LC3 (proteína 1A-1B de cadena ligera 3 asociada a microtúbulos), en sus dos formas LC3I y LC3II que es ampliamente utilizado como un marcador de autofagia. Un incremento del ratio LC3II/LC3I es indicativo de un aumento de la actividad autofágica celular. La inmunodetección de LC3I-II nos mostró un incremento de la autofagia en el paciente P<sub>1</sub>.



**Figura 35. Disminución de los niveles de Hsp27 en el paciente portador de la mutación m.12300G>A** (A) Detección de HDAC6 mediante western-blot. Se analizaron 20  $\mu$ g de proteína total en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 12%. Se realizó el western-blot con el anticuerpo correspondiente. (B) Gráfica que representa el porcentaje de disminución de HDAC6 en el paciente P<sub>1</sub> observada mediante western-blot  $\pm$  DE (n=3 mediciones en los fibroblastos del paciente P<sub>1</sub> y n=7 muestras control + paciente P<sub>2</sub>, ya que entre los valores de los controles y del paciente P<sub>2</sub> no existían diferencias).

\*\* p=0,01 (Test U de Mann-Whitney)



**Figura 36. Medida de la autofagia.** (A) Detección de LC3II-I mediante western-blot. Se analizaron 20  $\mu$ g de proteína total en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 20%. Se realizó el western-blot con el anticuerpo correspondiente. (B) Gráfica que representa el ratio entre LC3II y LC3I (Media  $\pm$  DE; n=3 mediciones en los fibroblastos de los pacientes y n=8 fibroblastos control).

\*\* p=0,01 (Test U de Mann-Whitney)

## V. Relación entre el ciclo celular y la biogénesis mitocondrial

La biogénesis mitocondrial es un proceso celular altamente regulado que no siempre depende del ciclo celular. Aunque ha sido observado un incremento del volumen mitocondrial durante la fase G<sub>1</sub>/S (Van den Bogert C et al., 1988; Herzig RP et al., 2000), se sabe que distintas condiciones fisiológicas y tanto factores endógenos como exógenos (Ventura-Clapier R, 2008), el estrés oxidativo (Lee HC et al., 2000; Lee HC et al., 2002), incluso modificaciones en los microtúbulos (Karbowski M et al., 2001) y en la dinámica mitocondrial (López-Lluch G et al., 2008) pueden variar el contenido mitocondrial. Con todos estos antecedentes y los resultados obtenidos anteriormente, quisimos analizar el ciclo celular de las líneas de fibroblastos en estudio. Las células fueron sincronizadas durante 72 horas creciendo en un medio de cultivo suplementado con 0,5% de FBS. Pasadas estas 72 horas su ciclo fue reactivado creciendo las células con un medio de cultivo suplementado con 10% de FBS durante 96 horas más. Observamos que el paciente P<sub>1</sub> tenía más células en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> cuando fue comparado con los controles, además cuando medimos su tiempo de duplicación (TD) éste era muy superior al de las células control, por lo tanto su crecimiento en cultivo era mucho más lento. El paciente P<sub>2</sub> muestra unos valores de ciclo celular similares a las células control al igual que su TD (Tabla 9).

MUESTRA	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M	TD
Controles	75,2%	6,9%	17,9%	3,29 $\pm$ 0,6
P <sub>1</sub>	84,2% <sup>a</sup>	4,6%	11,2%	5,14 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>
P <sub>2</sub>	78,6%	6,7%	14,7%	3,14 $\pm$ 0,1

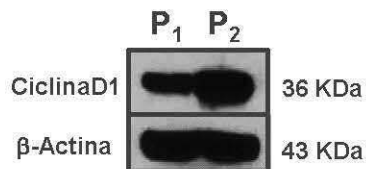
**Tabla 9. Ciclo celular.** Tras parar el ciclo celular y reanudarlo, el paciente P1 presentó más células en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, además de tener un tiempo de duplicación mayor.

<sup>a</sup> p=0,02 (Test U de Mann-Whitney)

<sup>b</sup> p=0,03 (Test U de Mann-Whitney)

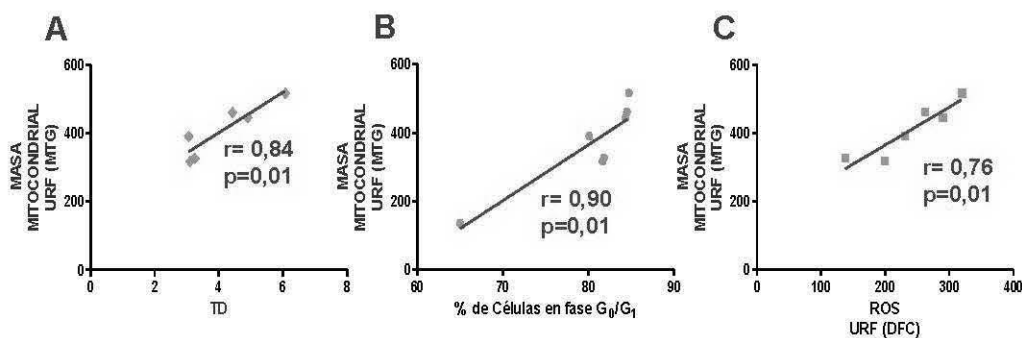
Este retraso en el ciclo puede ser debido a un fallo en la expresión de alguna de las proteínas que permiten la transición G<sub>1</sub>/S. Ciclina D1 es una de ellas y además está implicada en la regulación de la función mitocondrial *in vivo* (Sakamaki T et al., 2006), por eso era un buen candidato de estudio.

De células sincronizadas durante 72 horas y después activadas 96 horas fueron extraídas las proteínas y determinada ciclina D1. Como se puede observar en la figura 37, el paciente P<sub>1</sub> presenta unos niveles de ciclina D1 sensiblemente inferiores en comparación con el paciente P<sub>2</sub>. Este hallazgo explicaría tanto el tiempo de duplicación tan significativamente largo y el retraso en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>.



**Figura 37. Determinación de los niveles de ciclina D1.** 30 μg de proteínas fueron analizadas en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 12%. Se realizó el western-blot con el anticuerpo correspondiente.

En estas mismas células fueron medidas las especies de oxígeno y la masa mitocondrial y pudimos establecer una correlación entre ambos parámetros (Fig. 38 C) y entre la masa mitocondrial, el tiempo de duplicación y el porcentaje de células en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (Fig. 38 A y B respectivamente).



**Figura 38. Relación entre la masa mitocondrial y el tiempo de duplicación, la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> y los ROS.** (A) Un mayor tiempo de duplicación está relacionado con un incremento de la masa mitocondrial. (B) Clara relación entre la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> del ciclo celular con la masa mitocondrial. (C) El incremento de la masa mitocondrial se ve reflejado en un incremento de las especies reactivas de oxígeno.



DÍSCUSIÓN

---

## I. Funcionalidad mitocondrial y estrés oxidativo presente en los fibroblastos y en el modelo celular de cíbridos transmitocondriales portadores de las mutaciones m.12300G>A y m.8993T>G

El paciente P<sub>1</sub> presentaba un síndrome progresivo que sugería un trastorno mitocondrial (Bernier FP et al., 2002), caracterizado por hipotonía, pérdida de audición, ataxia, epilepsia mioclónica, la calcificación bilateral de los ganglios basales, retinopatía pigmentaria y acidosis láctica. La biopsia muscular mostró abundantes FRR y el análisis bioquímico de la cadena respiratoria evidenció un defecto combinado de los complejos I, III y IV. Después de excluir la mayoría de las mutaciones más conocidas del ADNmt, se secuenciaron los 22 genes que codifican los ARN de transferencia mitocondriales y se detectó la mutación m.12300G>A en el gen que codifica para el ARN<sup>Leu (CUN)</sup> (*MT-TL2*). Esta transición fue heteroplásmica en músculo y en los fibroblastos del paciente y más significativamente abundante que en la sangre de su madre oligosintomática. La mutación no estaba presente en controles o en pacientes portadores de otras mutaciones puntuales del ADNmt. Además, se encontró una correlación entre la carga mutacional y la alteración histoquímica de las fibras musculares, un fuerte marcador de patogenicidad. El estudio enzimático de la cadena respiratoria mitocondrial en fibroblastos del paciente mostró un defecto combinado de los complejos III y IV. Se realizaron estudios adicionales funcionales con el fin de caracterizar el impacto de la mutación en el metabolismo mitocondrial. Se determinó una reducción significativa del ATP total y del  $\Delta\Psi_m$ , y una mayor producción de ROS en comparación con las células control. Estos resultados son similares a los observados en otros estudios realizados en fibroblastos que contienen mutaciones en ARNt mitocondriales, donde hay una disminución en el contenido de ATP y una reducción paralela en el potencial de membrana mitocondrial cuando se exponen a alta demanda de energía (James AM et al., 1999). En nuestro caso, los fibroblastos no se sometieron a una alta demanda energética, pero mostraron una reducción del 57% del ATP total cuando crecieron en un medio con baja concentración de glucosa. Probablemente, en estas condiciones de cultivo, la producción de ATP por la vía glucolítica no es suficiente para compensar la reducción de la síntesis de ATP por la cadena respiratoria en los fibroblastos portadores de la mutación, de forma que no se puede enmascarar la baja concentración del sustrato. Por tanto, el crecimiento de los fibroblastos en un medio con baja concentración de glucosa puede ser un método efectivo para la detección de alteraciones mitocondriales que no son evidentes cuando hay una alta disponibilidad de la molécula. La reducción del  $\Delta\Psi_m$  observada está de acuerdo con otros estudios realizados en fibroblastos de pacientes con mutaciones en el gen *MT-TK* o en el gen *MT-ND5* (Antonická H et al., 1999) y puede ser una consecuencia directa de la reducción de los niveles de ATP en las células con alteraciones en la respiración mitocondrial (Chalmers-Redman RM et al, 1999; McKenzie M et al., 2007). Por otra parte la medida de la masa mitocondrial en los fibroblastos del paciente reveló un aumento significativo de dicho parámetro, estableciendo una clara asociación de la mutación m.12300G>A con la existencia de proliferación mitocondrial en distintos tejidos.

Resultados similares se obtuvieron en el modelo celular de cíbridos transmitocondriales, a los 30 días de crecimiento. Las actividades de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, el ATP total y el  $\Delta\Psi_m$  se encontraban reducidos en los clones homoplásmicos mutantes (clones A y B). En clon C, con una carga

mutacional del 78%, dichos parámetros de estudio fueron normales, al igual que en el clon D, con un 30% de ADNmt mutado en ese mismo momento de estudio. Este hecho podría estar relacionado con el umbral de expresión fenotípica en este contexto celular, ya que detectamos fibras musculares rojo-rasgadas COX negativas con un 65% de ADNmt mutante, evidenciando el hecho conocido de que cada tejido o tipo celular posee un umbral de expresión de patología diferente (Schon EA et al., 1994) Con respecto a la medida de la masa mitocondrial, confirmamos el aumento significativo de la misma en los clones A y B, mientras que la medida en los clones C y D fue similar a la de las células control 143B. De forma paralela a estos hallazgos, se incrementaba la producción de ROS en las líneas indicadas.

Son pocas las mutaciones descritas las que afectan al anticodón de los ARNt, presumiblemente porque los cambios en los nucleótidos de un anticodón darían lugar a graves problemas de decodificación y/o defectos de aminoacilación. El primer caso descrito fue de un paciente con una miopatía leve que portaba la mutación m.15990G>A en el gen *MT-TP* (Moraes CT et al., 1993). Aunque la mutación cambia el anticodón del ARNt<sup>Pro</sup>(UGG) por el anticodón del ARNt<sup>Ser</sup>(UGG), los autores sugieren que, probablemente, esta mutación podría haber surgido de novo durante el desarrollo ya que solo fue detectada en músculo, lo que justifica el fenotipo leve del paciente. En nuestro caso, la mutación fue heredada de la madre, por lo tanto presente en el óvulo, y de ahí que se haya detectado en varios órganos y tejidos, y que el fenotipo clínico sea grave. Como ocurre en otras mutaciones puntuales del ADNmt, esta mutación parece comportarse funcionalmente como una mutación recesiva, debido a que el umbral de expresión para la mutación en cíbridos está por encima de 78% de moléculas con ADNmt mutado. En contraste, la transición m.5545C>T, que se encuentra en el gen *MT-TW* se ha descrito como una mutación dominante (Sacconi S et al., 2008). Afecta a la base central del triplete del anticodón del ARNt<sup>Trp</sup>(ACU) y le permite descodificar señales de terminación y reconocer los codones correspondientes a la tirosina, lo que aumenta su patogenicidad. Finalmente, la mutación m.661G>A en el gen *MT-TF* (ARNt<sup>Phe</sup>(AAA)) se detectó en un paciente con síndrome de MERRF (Mancuso M et al., 2004). Nuestro paciente tiene un fenotipo superpuesto entre el síndrome MERRF y el síndrome NARP, probablemente más severo que el anterior debido a la extensión de los tejidos afectados y su alta carga mutacional. La transición m.12300G>A fue descrita por primera vez en cíbridos que portaban la mutación m.3243A>G en el gen *MT-TL1* (ARNt<sup>Leu</sup>(UUR)). Esta mutación se encuentra en la secuencia del anticodón del ARNt<sup>Leu</sup>(CUN), cambiando el triplete UAG por UAA (El Meziane A et al., 1998a). Cíbridos con ambas mutaciones no mostraron disfunción en la respiración mitocondrial. Parecía, por tanto, que la transición m.12300G>A era una mutación supresora. Más adelante, el mismo grupo demostró que la aminoacilación del llamado ARNt<sup>Leu</sup>(CUN) supresor era eficaz y mostraba especificidad para la decodificación de los codones UUR de leucina (El Meziane A et al., 1998b). Además, Kirino y colaboradores confirmaron la funcionalidad del ARNt supresor para decodificación de los codones UUG debido a la adquisición de una modificación en la "wobble" uridina de tipo  $\tau\text{m}^5\text{U}$  (Kirino Y et al., 2006). Aunque leucina es el aminoácido más frecuente en las proteínas codificadas por el ADNmt, los codones UUR son menos frecuentes que los codones CUN (12% frente a 88%, respectivamente) (Wittenhagen ML & Kelley SO, 2003). Como resultado, es fácil de entender el impacto que la mutación m.12300G>A puede tener en la función de la cadena respiratoria mitocondrial.

Hasta ahora, ningún fenotipo clínico había sido descrito en relación con esta mutación. El estudio de PCR en fibra aislada y los análisis de funcionalidad mitocondrial en varias líneas celulares confirmaron que la mutación es patogénica y se asocia con un fenotipo clínico grave de una enfermedad mitocondrial multisistémica.

Desde el primer mes de vida el paciente P<sub>2</sub> presentó una hipotonía generalizada y un severo retraso psicomotor. A los 4 meses de edad, durante una enfermedad febril, desarrolló acidosis láctica, dificultad respiratoria y ataques mioclónicos generalizados, síntomas que recordaban a un síndrome NARP (Holt IJ, 1990). La mutación m.8993T>G fue detectada en músculo, fibroblastos y sangre del paciente con un grado de heteroplasmia superior al 90%. La abuela, madre y tía materna eran sanas, aunque portadoras de la mutación 12%, 16% y 20% de heteroplasmia respectivamente, lo que sugería que la mutación m.8993T>G estaba asociada a un síndrome de Leigh de herencia materna. Además estos datos indicaban una suave segregación de la mutación entre la primera y la segunda generación y un rápido cambio, cercano a la homoplasmia mutante, en la tercera generación (Martín MA et al., 1999). La paciente murió a los 6 meses de edad por un fallo respiratorio tras un rápido deterioro. La biopsia muscular del paciente no mostró alteraciones morfológicas ni acúmulos de mitocondrias, como es habitual en los pacientes portadores de la mutación m.8993T>G.

El cambio m.8993T>G convierte una leucina altamente conservada en arginina (L156R) en la ATPasa  $\delta$ , una de las dos subunidades codificadas por el ADNmt que forman parte de la porción F<sub>0</sub> del complejo F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP sintasa mitocondrial (Tatuch Y et al., 1992). Esta enzima es la encargada de la producción de ATP en las células de mamíferos. Cataliza la fosforilación del ADP usando el gradiente electroquímico de protones generado por la cadena de transporte electrónico, para generar ATP, y su hidrólisis dando lugar a ADP y la liberación de gran cantidad de energía. Está formada por dos principales complejos de estructura y funcionalidad diferentes llamados F<sub>0</sub> y F<sub>1</sub>. F<sub>0</sub> es el motor impulsador de protones y F<sub>1</sub> es el dominio catalítico. La mutación m.8993T>G da lugar a un cambio estructural en el cuarto dominio  $\alpha$ -hélice transmembrana que genera un defecto en la función de síntesis de ATP (Manfredi G et al., 1999) causando un desacople entre la translocación de protones a través de F<sub>0</sub> y la síntesis de ATP en F<sub>1</sub> (García JJ et al., 2000; Sgarbi G et al., 2006). Este defecto estructural en la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP sintasa causa una severa disfunción en la síntesis de ATP, mientras que la hidrólisis del ATP, en la que está involucrado el flujo de protones de la matriz mitocondrial al citosol, no está afectada.

La masa mitocondrial de los fibroblastos de paciente P<sub>2</sub> era normal, corroborando los hallazgos en músculo donde la mutación m.8993T>G no está asociada a proliferación mitocondrial. Los estudios de funcionalidad mitocondrial mostraron un descenso significativo en la actividad de la ATPasa (o complejo V de la cadena respiratoria), en torno al 82%. En la medida del ATP total se observó una reducción del 33%. Sin embargo tanto el  $\Delta\Psi_m$  como la medida de las especies reactivas de oxígeno fue normal con respecto a las células control, como ya habían observado otros autores (García JJ et al., 2000), y en divergencia con otros que detectan un incremento de los ROS (Lebiedzinska M et al., 2012; Soto IC et al., 2009). Este desacuerdo en resultados puede ser debido a que el fondo genético de ADNmt influye en la bioenergética de células portadoras de la mutación m.8993T>G como demostraron D'Aurelio y colaboradores (D'Aurelio M et al.,



2010).

Al analizar estos parámetros en el modelo celular de híbridos transmitocondriales portadores de la mutación m.8993T>G, vimos que las actividades de la cadena respiratoria eran similares a las obtenidas en las células control 143B. Cabría esperar un déficit del complejo V, al igual que sucede en los fibroblastos del paciente, pero la disminución que presentan los clones no es significativa, tal y como ya habían observado Vazquez-Memije y colaboradores (Vazquez-Memije ME et al., 2009). Ellos explican esta falta de disminución de actividad del complejo V (medido según nuestra metodología como la capacidad de hidrólisis del holoenzima) por una menor fortaleza en la unión de las dos fracciones  $F_0$  y  $F_1$ , que forman el complejo, cuando está presente la mutación en este fondo celular, de forma que la fracción  $F_1$  se separaría fácilmente de la  $F_0$  dejando de ser sensible a oligomicina, la fracción valorada en este estudio. Aproximadamente un 20% de la producción total de ATP se encontraba reducido en los clones estudiados. El potencial de membrana fue normal, tal como han descrito algunos autores (Szczepanowska J et al., 2004) y en discrepancia con la hiperpolarización vista por Carrozzo y colaboradores (Carrozzo R et al., 2004). La masa mitocondrial no presentaba diferencias con respecto a las células control, tal como describen Wojewoda y colaboradores (Wojewoda M et al., 2011) y los ROS mostraban unos valores normales.

En fibroblastos, ambas mutaciones tiene en común fallos en el sistema OXPHOS (la mutación m.12300G>A en los complejos III y IV y la mutación m.8993T>G en el complejo V) y una disminución del ATP total. Mientras que la mutación m.12300G>A mostró una disminución del  $\Delta\Psi_m$ , un aumento de la masa mitocondrial y de las especies reactivas de oxígeno, la valoración en la mutación m.8993T>G de dichos parámetros fue normal. Basándonos en anteriores estudios, que demostraban que las especies reactivas de oxígeno alteraban la masa mitocondrial (Lee CH, 2005) y el  $\Delta\Psi_m$  (Jing XB et al., 2007), decidimos estudiar estos aspectos en mayor profundidad. Mediante el incremento del estrés oxidativo, añadiendo  $H_2O_2$  al medio de cultivo en fibroblastos control, demostramos que un exceso de ROS conducía a un incremento significativo de la masa mitocondrial y a una clara disminución del potencial de membrana mitocondrial, siendo, por tanto, el incremento de las especies reactivas de oxígeno provocado por la mutación m.12300G>A una posible causa de la proliferación mitocondrial observada.

Con estos datos, nos planteamos que el análisis en paralelo de ambas mutaciones podría servir de modelo de estudio para conocer más en profundidad aquellos factores endógenos que influyen en la biogénesis de la organela.

## II. Análisis de la red mitocondrial en los fibroblastos de los pacientes

Las mitocondrias son organelas dinámicas, capaces de intercambiar su morfología mostrándose como un sistema elongado e interconectado o como una estructura con una distribución más fragmentada y desconectada. La fusión y fisión mitocondrial son los procesos opuestos que dan lugar a una red mitocondrial en continuo movimiento (Westerman B, 2002). Las mitocondrias presentan un ciclo de vida en el que la mayor parte del tiempo se encuentran en solitario (Twig G et al., 2011) y en función de determinados estímulos ambienta-

les o en función de las necesidades energéticas celulares, se fusionan permitiendo la transmisión de moléculas de señalización y el intercambio de metabolitos, uniéndose de forma reticular que irradia desde el núcleo, creando así un sistema interconectado (Palmer CS et al., 2011). Durante este periodo “en red” es esencial el mantenimiento del  $\Delta\Psi_m$  (Amchenkova AA et al., 1988; Skulachev, VP et al., 2001) puesto que mitocondrias con un potencial de membrana disipado son marcadas para ser eliminadas por autofagia (Twig G et al., 2008b). Pero no solo es importante conservar un correcto  $\Delta\Psi_m$  para el mantenimiento de una red altamente conectada ya que un incremento en los ROS, generados por un defecto en el sistema OXPHOS, da lugar a cambios en la morfología de la red que conlleva a un aumento de la fisión y por último un incremento de la apoptosis (Koopman WJ et al., 2005; Verkaart S et al., 2007; Koopman WJ et al., 2007; Suen DF et al., 2008; Kwong JQ et al., 2007). La maquinaria de fusión/fisión mitocondrial responde de forma distinta a diferentes tipos de estrés: unos niveles altos o prolongados favorecen la fisión, mientras que con unos niveles bajos, las mitocondrias permanecen fusionadas (Van der Bliek AM et al., 2009). Las mitocondrias dañadas se escinden de la red de la que forman parte mediante fisión y como consecuencia se inhibe su maquinaria de fusión, por una disminución de los niveles de OPA1 (Twig G et al., 2008a). Estos autores observaron, en células de mamífero, que durante la fisión mitocondrial se producen subpoblaciones desiguales en función de su  $\Delta\Psi_m$ . Una población exhibía un aumento del potencial de membrana, incrementándose la probabilidad de fusionarse. La otra población presentaba un  $\Delta\Psi_m$  reducido, así como una disminución en OPA1, proteína implicada en la fusión mitocondrial. Estas mitocondrias presentaron una baja probabilidad de fusionarse después y fueron señaladas para ser posteriormente degradadas por mitofagia (Twig G et al., 2008b). Por lo tanto, sólo las mitocondrias vitales se fusionan. Esta separación es un requisito previo para su degradación mediante mitofagia. Parece que la fisión es un punto de chequeo que determina la degradación de las mitocondrias por mitofagia y que la fusión es un mecanismo de rescate, y ambos procesos son esenciales para la homeostasis mitocondrial.

La morfología tan disgregada de la red vista en fibroblastos del paciente P<sub>1</sub> ha sido observada con anterioridad en otros estudios (Duvezin-Caubet S et al., 2006) y como en nuestro caso parece estar relacionada con la severa disminución de la actividad de varios complejos de la cadena respiratoria y, como consecuencia, una baja producción de ATP y una significativa disminución del  $\Delta\Psi_m$ . En este sentido, el incremento en la generación de radicales libres detectado, que ha sido relacionado también con una alteración en la red mitocondrial (Fan X et al., 2010), pueden haber contribuido a que los mecanismos de fusión y/o fisión se encontrasen alterados y no fueran capaces de mantener largas redes interconectadas para mejorar la funcionalidad mitocondrial.

El paciente P<sub>2</sub> mostró una red en la que se incrementó la morfología tubular en detrimento de la reticular, hecho que ya había sido observado por otros autores (Szczepanowska J et al., 2004; Wojewoda M et al., 2011; Lebiezinska M et al., 2012), como consecuencia de la disminución de los niveles de ATP provocado por la mutación m.8993T>G.

Parece, por tanto, que existe una relación bidireccional entre la red mitocondrial y la bioenergética y que un fenotipo granular es un indicador de un déficit energético que incluye una disminución en el  $\Delta\Psi_m$  y un fallo en la síntesis de ATP (Reis Y et al., 2012), lo que permitiría la eliminación de mitocondrias disfuncionales por autofagia (Rugarli El & Langer T, 2012). En este sentido, podemos destacar que en los fibroblastos del paciente P<sub>1</sub> nuestros estudios también confirmaron un incremento de la autofagia, mientras que el paciente P<sub>2</sub> presentaba un ratio LC3II/LC3I similar a las células control.

### III. Estudio de las proteínas implicadas en la fusión y fisión mitocondrial

Para el correcto funcionamiento de las mitocondrias debe existir un exhaustivo control entre las fuerzas antagónicas de fisión y fusión que actúan sobre las membranas mitocondriales, permitiendo así un adecuado equilibrio dinámico que dependen de diferentes complejos proteicos altamente conservados durante la evolución. Drp1 y Fis1 son unos de los actores clave en el proceso de fisión, mientras que Mfn1, Mfn2 y OPA1 controlan la fusión. Cuando la fusión prevalece sobre la fisión, las mitocondrias aparecen como una red altamente interconectada de filamentos, mientras que cuando ocurre el suceso contrario, la red se convierte en una multitud de organelas aisladas. Diferentes estudios han demostrado que la morfología mitocondrial cambia durante la apoptosis. Se observa un incremento de la fisión que da lugar a un aumento en el número de mitocondrias de pequeño tamaño y de forma esférica (Mancini M et al., 1997; Desagher S & Martinou JC, 2000; Frank S et al., 2001; Jagasia R et al., 2005). En la célula muscular, tanto señales celulares como ambientales pueden desencadenar en forma directa la división mitocondrial; por ejemplo, se ha observado que las mitocondrias de estas células son capaces de proliferar durante la biogénesis, pero también tras el ejercicio (Brunk CF, 1981; Moyes CD et al., 1997). En otros tipos celulares, la división mitocondrial puede ser inducida por un amplio espectro de compuestos, entre los que se cuentan a las benzodiazepinas, inhibidores de la fosforilación oxidativa, ésteres de forbol, entre otros (Vorobjev IA & Zorov DB, 1983). Finalmente, en vertebrados, el número de mitocondrias puede ser controlado adicionalmente por la hormona tiroidea, la cual se relaciona con la tasa metabólica (Goglia F et al., 1999).

Las alteraciones en la morfología de los pacientes de este estudio nos sugirieron analizar con detalle las proteínas que forman parte de la fusión y de la fisión, por si su alteración influía en la desestructuración de la red mitocondrial observada. El incremento de la morfología granular en el paciente P<sub>1</sub> y de la tubular en el paciente P<sub>2</sub>, además de poder ser debidas a fallos en la funcionalidad mitocondrial, podrían deberse a un incremento de los niveles de proteínas implicados en la fisión. Los resultados de western-blot mostraron unos niveles normales de Drp1 y de Fis1 en ambos pacientes, y con respecto a los controles. La fisión mitocondrial es esencial para un reparto equitativo de las mitocondrias durante la mitosis y debe estar muy controlada (Rube DA & van der Bliek AM, 2004). Este control se lleva a cabo mediante la fosforilación y desfosforilación de Drp1 (Cribbs JT & Strack S, 2009). La fosforilación en la posición S616 favorece la fisión durante la mitosis. En las células tanto de pacientes como de controles, Drp1 no estaba fosforilada en dicho residuo, lo que indicaba que las células no se encontraban en una constante proliferación que explicara los hallazgos en la morfología de la red en ambos pacientes. Por otra parte, la fosforilación en el residuo S637 favorece la pre-

sencia de Drp1 en el citosol, inhibiendo la fisión. Esta modificación si se encontraba presente en todas las células analizadas, por lo que el incremento de una morfología tubular o granular no es debida a un incremento en el proceso de fisión.

Cuando estudiamos las proteínas que controlan la fusión: Mfn1/Mfn2 y OPA1, estas presentaron unos niveles normales en ambos pacientes con respecto a los controles, pero observamos que el paciente P<sub>1</sub> mostraba un incremento de las isoformas S de OPA1 en detrimento de las isoformas L. Las isoformas L son esenciales para que se lleve a cabo una correcta fusión entre las mitocondrias. Se ha visto que una reducción en el  $\Delta\Psi_m$  y en el ATP incrementan el procesamiento proteolítico de las isoformas L, bloqueando la fusión mitocondrial (Baricault L et al., 2007). Además otros autores han descrito que la pérdida del  $\Delta\Psi_m$  conduce a un incremento de las isoformas S (Ishihara N et al., 2006), que se sabe está relacionado con la fragmentación de la red mitocondrial (Duvezin-Caubet S et al., 2006). Estos últimos lo observaron en pacientes con desordenes mitocondriales, y en particular en aquellos con depleción o mutaciones en el ADNmt como la mutación m.3243A>G, asociada al síndrome MELAS o la mutación m.8344A>G, asociada al síndrome MERRF. Estas mutaciones están relacionadas con la presencia de FRR en las biopsias musculares, al igual que la mutación m.12300G>A, en la que se basa este trabajo. Basándonos en que el paciente P<sub>2</sub>, portador de la mutación m.8993T>G situada en el gen que codifica para la ATPasa6, no presenta ni un bajo  $\Delta\Psi_m$  ni un fallo en el procesamiento de OPA1 y que las mutaciones m.3243A>G, m.8344A>G y m.12300G>A, localizadas en genes que codifican ARNts, si presentan ambos defectos (James AM et al., 1996; Duvezin-Caubet S et al., 2006) parece que mutaciones en estos genes estarían relacionados con un incremento de las isoformas S de OPA1 debido a una despolarización de sus mitocondrias junto con una disminución en los niveles de ATP, lo que podría tener un papel esencial en el incremento de la masa mitocondrial observado en todas ellas.

Diferencias entre las distintas isoformas de OPA1 también fueron observadas en los híbridos transmitocondriales portadores de la mutación m.12300G>A. En los 4 clones estudiados se observó un incremento de las isoformas S con respecto a las L a medida que aumentaba la carga mutacional en los mismos, de forma que a mayor porcentaje de mutación la disfunción mitocondrial aumenta y esto conlleva a una modificación en las fracciones de OPA1.

Como la disfunción mitocondrial existente en el paciente P<sub>1</sub> dio lugar a un incremento de las especies reactivas de oxígeno, a una disminución en el  $\Delta\Psi_m$  y a un incremento en las fracciones S de OPA1, quisimos ver si los ROS tenían relación con lo observado. Vimos que fibroblastos control que sometidos a estrés oxidativo presentaban una reducción de su  $\Delta\Psi_m$ , incrementaron las isoformas S de OPA1. Aunque nosotros no valoramos la morfología de la red, es de suponer que se produzca también una modificación de la red mitocondrial tal como han observado otros autores (Fan X et al., 2010)

Con los datos aportados hasta ahora, sugerimos que fallos en el metabolismo energético, y como consecuencia una disminución del  $\Delta\Psi_m$ , de los niveles de ATP y un incremento en la producción de ROS, están

relacionados con una alteración en el proceso de fusión mitocondrial, vía OPA1. Además, puesto que al someter a células control a estrés oxidativo se observa un incremento de la masa mitocondrial, parece que dichos aspectos puedan estar favoreciendo el incremento de las organelas.

#### IV. Relación entre los microtúbulos y la proliferación mitocondrial

La distribución de la mitocondrias así como de otras organelas como peroxisomas o lisosomas, en células de mamíferos, es regulada por los microtúbulos (Heggeness MH et al., 1978). Una alteración en la estabilidad de los MT debida o bien a drogas estabilizadoras como el taxol o desestabilizadoras como el nocodazol (Karbowski M et al., 2001), o bien a un aumento del estrés oxidativo (Spodnik JH et al., 2002; Lee CF et al, 2005) está relacionada con una proliferación mitocondrial junto con un aumento en los niveles de  $\alpha$ -tubulina acetilada. La  $\alpha$ -tubulina es uno de los principales componentes de los microtúbulos, que junto con la  $\beta$ -tubulina forman unas estructuras tubulares que recorren todo el citoplasma. La acetilación de  $\alpha$ -tubulina está relacionada con un incremento de los denominados microtúbulos estables, y esto a su vez con un aumento en la biogénesis mitocondrial (Karbowski M et al., 2001).

En el paciente P<sub>1</sub>, el incremento de la masa mitocondrial correlacionaba con un aumento en la  $\alpha$ -tubulina acetilada, mientras que el paciente P<sub>2</sub> mostró unos niveles normales, con respecto a los controles. Un hallazgo similar fue encontrado cuando fueron medidos los niveles de  $\alpha$ -tubulina acetilada en los cibridos transmi-tocondriales portadores de la mutación m.12300G>A. Los niveles de  $\alpha$ -tubulina acetilada estaban aumentados, y dicho aumento correlacionaba con el incremento de ADNmt mutado, al igual que sucedía con respecto a la variación de las isoformas de OPA1. Por otra parte, fue comprobado que las especies reactivas de oxígeno incrementaron los niveles de  $\alpha$ -tubulina acetilada. Por tanto, estos datos sugieren que una disfunción mitocondrial con incremento en las especies reactivas de oxígeno conllevan a un aumento de la acetilación de  $\alpha$ -tubulina, una variación en la isoformas de OPA1 y la proliferación mitocondrial.

Además, el aumento de acetilación de tubulina y el incremento de su estabilidad podría estar también en relación con el aumento de la actividad autofágica ligada a esta mutación, puesto que se ha visto que los MT acetilados son necesarios para la fusión de los autofagosomas con los lisosomas durante este proceso (Xie R et al., 2010).

La acetilación de  $\alpha$ -tubulina es llevada a cabo por la  $\alpha$ -tubulina acetiltransferasa MEC-17 (Akella JS et al., 2010) mientras que HDAC6 (Zhang Y et al., 2003) y Sirt2 (North BJ et al., 2003) se encargan de su desacetilación. En concreto, HDAC6 se ha visto que es la principal deacetilasa de  $\alpha$ -tubulina (Hubbert C et al., 2002). De localización citoplasmática, regula importantes procesos celulares de los que destacamos la motilidad celular mediada por microtúbulos (Valenzuela-Fernández A et al, 2008), así como la estabilidad de los mismos y su papel en el transporte de organelas, el mantenimiento del citoesqueleto de actina y la degradación de proteínas mal plegadas (Li G et al., 2011). Dado que habíamos visto un incremento de la acetilación de  $\alpha$ -tubulina en el paciente P<sub>1</sub>, respecto al paciente P<sub>2</sub> y las células control, decidimos analizar los

niveles de la histona. Observamos una disminución muy significativa de su expresión en las células portadoras de la mutación m.12300G>A. Puesto que se ha descrito que una inhibición de HDAC6 está relacionada con un incremento del número de mitocondrias (d'Ydewalle C et al., 2011), esta disminución de los niveles de HDAC6 en nuestro paciente podrían justificar el incremento de la masa mitocondrial observada en el mismo. Es por ello que decidimos modificar la actividad enzimática de la histona, a fin de tratar de reproducir lo observado en nuestras líneas celulares. La modulación química de la actividad de las HDACs es un proceso muy utilizado en el tratamiento de determinadas patologías como el cáncer (Schrumpp DS, 2009) o enfermedades neurodegenerativas (Li G et al., 2011). Utilizando TSA como inhibidor de la actividad química de HDAC6 en fibroblastos control y en los fibroblastos del paciente P<sub>2</sub>, se produjo un incremento en la acetilación de  $\alpha$ -tubulina que estaba acompañado de una proliferación mitocondrial. Además también se observó un aumento en la isoforma S de OPA1 acompañado de un incremento de la morfología granular de la red mitocondrial. El tratamiento con EGF como activador, en fibroblastos control y en los fibroblastos del paciente P<sub>1</sub>, evidenció que no existían diferencias significativas en los niveles de  $\alpha$ -tubulina acetilada y la masa mitocondrial, al igual que en las isoformas de OPA1.

Gibert y colaboradores relacionaron una hiperacetilación de  $\alpha$ -tubulina con un incremento en la degradación de HDAC6, tal y como sucedía en el paciente P<sub>1</sub> pero además, esta degradación está acompañada de la ausencia de Hsp27, proteína esencial para el mantenimiento de la integridad del citoesqueleto y que parece regular los niveles de HDAC6 (Gibert B et al., 2012). Puesto que además se había visto una disminución de Hsp27, debido a un incremento en su degradación, en pacientes portadores de la mutación 8344A>G (Chen CY et al., 2011), decidimos estudiar sus niveles en nuestras líneas celulares. Vimos, como en el caso descrito, unos niveles significativamente disminuidos de Hsp27 en el paciente P<sub>1</sub>, relacionados probablemente con el incremento de autofagia detectado en sus células, y que podría justificar los bajos niveles de HDAC6 observados en dicha muestra.

Con todos estos resultado podemos concluir que mutaciones puntuales en el ADNmt que dan lugar a una disfuncionalidad mitocondrial con una despolarización del potencial de membrana y un descenso en los niveles de ATP, como lo son las mutaciones m.8344A>G y la m.12300G>A, incrementan su actividad autofágica, dando lugar a una disminución de Hsp27, por un aumento en su degradación. La disminución de Hsp27 induce la degradación de HDAC6, incrementando los niveles de  $\alpha$ -tubulina acetilada y ello parece predisponer a estas células a una proliferación mitocondrial.

## V. Relación entre el ciclo celular y la biogénesis mitocondrial

Aunque la biogénesis mitocondrial parece ser un proceso independiente del ciclo celular, hoy sabemos que durante las distintas fases del ciclo se producen alteraciones tanto en la funcionalidad mitocondrial (Van den Bogert C et al., 1988; Herzy RT et al., 2000) como en la morfología de la red (Margeant DH et al., 2002). Dentro del ciclo celular se distingue otro ciclo que influye considerablemente sobre la biogénesis mitocondrial conocido como "ciclo metabólico". En él se diferencian dos fases: una primera fase, oxidativa, carac-

terizada por la biosíntesis de la mayoría de los componentes celulares que es sustentada por la energía derivada de la actividad mitocondrial y está asociada a la fase  $G_1$  del ciclo celular. La segunda fase o fase reductora está asociada a las fases S/ $G_2$ /M y su función principal es la replicación del ADNn y la preparación de la célula para dividirse a las células hijas (Martínez-Díez M et al., 2006). Esta oscilación en el estado redox celular establece una relación entre el ciclo metabólico y el ciclo redox celular, y ambos podrían estar jugando un papel regulador en la progresión del ciclo celular (Menon SG & Goswani PC, 2007)

Ya en 1977 fue observado que durante la interfase se producía un incremento en el volumen total de mitocondrias (Posakony JW et al., 1977) y esa proliferación está asociada a la fase  $G_1$ /S (Van den Bogert C et al., 1988; Herzy RT et al., 2000; Arakaki N et al., 2006). Parece que los cambios observados en la funcionalidad mitocondrial están relacionados con la variación de la morfología de la red a lo largo del ciclo celular. En la fase  $G_1$ , fase en la que la célula está centrada en obtener energía, la morfología es reticular. Antes de la entrada en fase S se produce una hiperfusión de la red, que permite la rápida transmisión de la energía generada a través del potencial de membrana generado. Desde la fase S hasta  $G_0$ , pasando por M, la red aparece fragmentada (Margineantu DH et al., 2002; Mitra K et al., 2009).

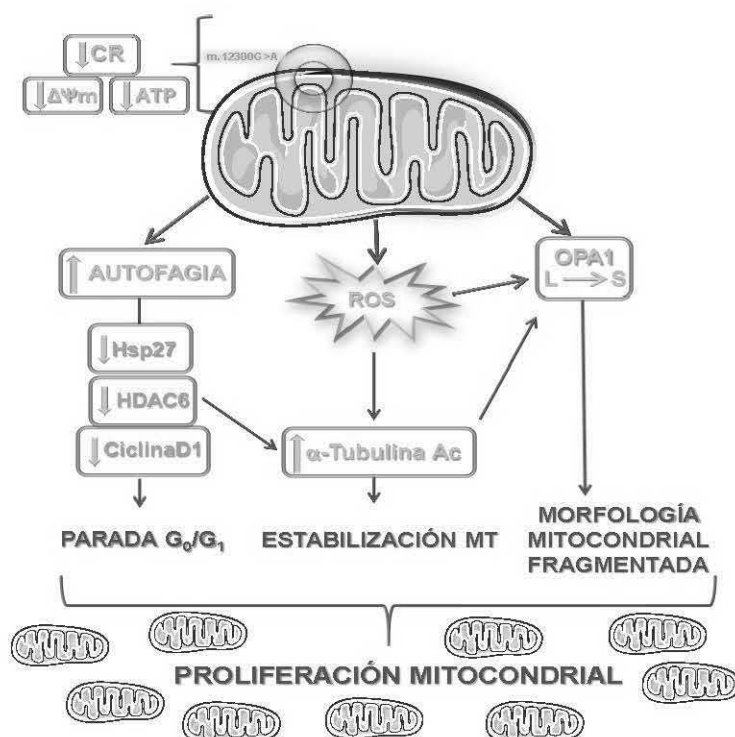
La distribución de las mitocondrias se lleva a cabo a través de los microtúbulos (Heggeness MH et al., 1978) y, además, como hemos resaltado anteriormente, su grado de acetilación está relacionado con el volumen mitocondrial en la célula. Por otro lado, existen evidencias de que el aumento de acetilación de los mismos está relacionado con una parada en el ciclo en fase  $G_1$  vía inhibición de HDAC6 (Schofield AV et al., 2013). Además, se ha comprobado que el estrés oxidativo modifica la capacidad proliferativa de las células, provocando una parada del ciclo en fase  $G_0$ / $G_1$  e incrementando en paralelo la masa mitocondrial (Lee HC et al., 2000). Como el paciente  $P_1$  mostraba una red mitocondrial fragmentada, un incremento de la producción de ROS, un aumento en la acetilación de  $\alpha$ -tubulina, y una disminución de HDAC6, parece que todo ello en relación con el aumento mitocondrial observado, quisimos analizar el ciclo celular en nuestras líneas de estudio. Para ello, a partir de células sincronizadas y permitiendo de nuevo su entrada en ciclo, analizamos este aspecto. Observamos que paciente  $P_1$  presentaba diferencias significativas en cuanto al tiempo de duplicación, que era superior a las líneas restantes. Este aumento en el tiempo de duplicación (TD) se reflejaba en el análisis del ciclo celular, observándose un incremento del porcentaje de células en fase  $G_0$ / $G_1$  frente al resto. Analizando todas las líneas en estudio, además, se vio que existía una correlación entre el TD, entre las distintas fases del ciclo y entre los ROS con la masa mitocondrial. Por tanto, se deduce que la modificación en el grado de acetilación de  $\alpha$ -tubulina, junto con el incremento de la producción de ROS en el paciente  $P_1$ , contribuirían a la parada en el ciclo, el cual también está relacionado con el incremento de la masa observado en esta muestra.

Se ha determinado que la función mitocondrial está regulada por ciclina D1, proteína que forma parte de la subunidad reguladora de la holoenzima que fosforila a la proteína del retinoblastoma y permite la entrada en fase S del ciclo a las células (Sakamaki T et al., 2006). Este hallazgo nos sugirió estudiar con más detenimiento esta proteína, por si existían diferencias en su expresión que justificaran el aumento del porcentaje

de células del paciente P<sub>1</sub> en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. Nuestros resultados muestran una expresión de ciclina D1 sensiblemente inferior al del paciente P<sub>2</sub>, con quien fue comparado. La disminución en ciclina D1 podría contribuir a retraso en el ciclo celular observado en el paciente P<sub>1</sub> y a su vez al incremento de la masa mitocondrial, visto cuando las células son paradas en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (Lee HC et al., 2000).

## VI. Resumen global

Como resumen de todo lo expuesto anteriormente, proponemos que en el modelo de estudio utilizado de fibroblastos humanos, el incremento de la masa mitocondrial observada en la línea portadora de la mutación m.12300 G>A frente a la línea m.8993T>G, parece estar condicionada por diversos factores relacionados con la fisiopatología de la propia mutación y su influencia en distintos aspectos de la función celular. Por un lado, de forma diferencial, esta mutación provoca una disminución de la actividad de varios complejos de la cadena respiratoria, lo que se traduce en una disminución de los niveles de ATP y del potencial de membrana mitocondrial. Junto a ello, y en contraste con la otra mutación en estudio, se produce un incremento de las especies reactivas de oxígeno. La disminución de los niveles de ATP y  $\Delta\Psi_m$  podrían estar activando la autofagia en estas células. Como consecuencia, se podría producir la degradación de la chaperona Hsp27 y en relación con ello la disminución de HDAC6 observada. La reducción de esta última podría estar en relación con dos aspectos. Por un lado, el aumento de acetilación de  $\alpha$ -tubulina, lo que estabilizaría los microtúbulos y por otro, la parada del ciclo celular en G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, ambos aspectos, al parecer, íntimamente relacionados con la proliferación mitocondrial. Además, tanto la disminución del potencial, como el incremento de ROS y la modificación de acetilación de  $\alpha$ -tubulina, favorecerían el procesamiento de isoformas L de OPA1 a las S, lo que justificaría la disgregación de la red mitocondrial en organelas individuales, siendo esta morfología un probable reflejo de procesamiento mitocondrial necesario para la proliferación de mitocondrias detectado en el fondo celular m.12300G>A (Fig. 39).



**Figura 39. Posibles factores endógenos que están influyendo sobre la biogénesis mitocondrial en la mutación m.12300G>A.** El déficit enzimático de la cadena respiratoria (CR) que provoca la mutación m.12300G>A da lugar a una disminución en el ATP y  $\Delta\Psi_m$ . Como consecuencia se incrementa la autofagia, los ROS y las isoformas S de OPA1. Estos hechos conducen a una parada en el ciclo celular, un incremento de la acetilación de  $\alpha$ -tubulina y una disgregación de la red mitocondrial. Estos tres factores conducen a un aumento del volumen mitocondrial.



A black and white micrograph of skeletal muscle tissue. The image shows several parallel muscle fibers with a highly organized, striated appearance. The fibers are separated by connective tissue. Numerous nuclei are visible, located peripherally along the length of the fibers. The overall structure is highly organized and shows clear signs of striation.

CONCLUSIONES

---

1. Los resultados del estudio genético y funcional de la mutación m.12300G>A en el gen que codifica el ARN<sup>t</sup><sub>Leu(CUN)</sub>(*MT-TL2*) en músculo, fibroblastos y cibridos transmitocondriales demuestran la patogeneicidad de la mutación. Esta mutación está asociada con un severo fenotipo con características clínicas de un síndrome MERRF y de un síndrome NARP y, hasta la fecha, no ha sido descrito ningún fenotipo similar. El hecho de que la proliferación mitocondrial se exprese en los fibroblastos portadores de la mutación m.12300G>A, cuando se compara con las líneas control y con la línea portadora de la mutación m.8993T>G, garantiza que sean un modelo apropiado para determinar factores diferenciales que influyan en dicho proceso.
2. Los estudios de funcionalidad mitocondrial en fibroblastos y cibridos transmitocondriales de las dos mutaciones de este estudio, muestran diferencias significativas. Mientras que la mutación m.12300G>A está asociada a un déficit combinado del complejo III y IV, la disminución del  $\Delta\Psi_m$  y de los niveles de ATP, con un incremento de las especies reactivas de oxígeno, la mutación m.8993T>G presenta un déficit del complejo V asociado a la disminución de los niveles de ATP.
3. La producción significativamente mayor de especies reactivas de oxígeno de la mutación m.12300G>A parece influir en la modificación del grado de acetilación de  $\alpha$ -tubulina y en el incremento de las isoformas S de OPA1. Además, a medida que se acetila tubulina se incrementan las isoformas S. En fibroblastos sometidos a estrés oxidativo también se produce un incremento de  $\alpha$ -tubulina y se modifican las isoformas de OPA1, lo que en conjunto podría estar contribuyendo a favorecer el incremento de la masa mitocondrial observada.
4. La disminución conjunta de los niveles de ATP y el potencial de membrana, conlleva a un incremento de la autofagia, a fin de eliminar las mitocondrias dañadas. Como consecuencia, podría verse afectado el reciclaje de proteínas como la chaperona Hsp27 y en consecuencia los niveles de la deacetilasa HDAC6.
5. De hecho, el tratamiento químico con tricostatina A, un inhibidor de la actividad de la HDAC6 incrementa la capacidad de proliferación de las mitocondrias en paralelo con un incremento de la acetilación de  $\alpha$ -tubulina y un aumento de las isoformas S de OPA1, tanto en células control como en la línea portadora de la mutación m.8993T>G, además de dar lugar a una fragmentación de la red mitocondrial. El tratamiento con el activador EGF, sin embargo, impide la proliferación, manteniendo los niveles basales de tubulina acetilada aunque si se modifica la red, incrementándose el número de mitocondrias aisladas debido al efecto proliferativo de EGF.
6. El aumento del estrés oxidativo de la mutación m.12300G>A y la disminución de los niveles de HDAC6 probablemente contribuyen a un retardo en el tiempo de duplicación de la línea celular y este factor parece correlacionar con el incremento del volumen organelar.



Bibliografía

---

**Acin-Perez R, Bayona-Bafaluy MP, Fernandez-Silva P, Moreno-Loshuertos R, Perez-Martos A, Bruno C, Moraes CT, Enriquez JA.** 2004. Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria. *Mol Cell* 13(6):805-15.

**Akella JS, Wloga D, Kim J, Starostina NG, Lyons-Abbott S, Morrisette NS, Dougan ST, Kipreos ET, Gaertig J.** 2010. MEC-17 is an alpha-tubulin acetyltransferase. *Nature* 467(7312):218-22.

**Alexander C, Votruba M, Pesch UE, Thiselton DL, Mayer S, Moore A, Rodriguez M, Kellner U, Leo-Kottler B, Auburger G et al.** 2000. OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet* 26(2):211-5.

**Amchenkova AA, Bakeeva LE, Chentsov YS, Skulachev VP, Zorov DB.** 1988. Coupling membranes as energy-transmitting cables. I. Filamentous mitochondria in fibroblasts and mitochondrial clusters in cardiomyocytes. *J Cell Biol* 107(2):481-95.

**Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F et al.** 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290(5806):457-65.

**Antonicka H, Floryk D, Klement P, Stratilova L, Hermanska J, Houstkova H, Kalous M, Drahota Z, Zeman J, Houstek J.** 1999. Defective kinetics of cytochrome c oxidase and alteration of mitochondrial membrane potential in fibroblasts and cytoplasmic hybrid cells with the mutation for myoclonus epilepsy with ragged-red fibres ('MERRF') at position 8344 nt. *Biochem J* 342 Pt 3:537-44.

**Antunes F, Cadenas E.** 2000. Estimation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gradients across biomembranes. *FEBS Lett* 475(2):121-6.

**Arakaki N, Nishihama T, Owaki H, Kuramoto Y, Suenaga M, Miyoshi E, Emoto Y, Shibata H, Shono M, Higuti T.** 2006. Dynamics of mitochondria during the cell cycle. *Biol Pharm Bull* 29(9):1962-5.

**Arany Z, Wagner BK, Ma Y, Chinsomboon J, Laznik D, Spiegelman BM.** 2008. Gene expression-based screening identifies microtubule inhibitors as inducers of PGC-1alpha and oxidative phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(12):4721-6.

**Arrigo AP, Virost S, Chaufour S, Firdaus W, Kretz-Remy C, Diaz-Latoud C.** 2005. Hsp27 consolidates intracellular redox homeostasis by upholding glutathione in its reduced form and by decreasing iron intracellular levels. *Antioxid Redox Signal* 7(3-4):414-22.

**Ashley MV, Laipis PJ, Hauswirth WW.** 1989. Rapid segregation of heteroplasmic bovine mitochondria. *Nucleic Acids Res* 17(18):7325-31.

**Bach D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Baumgartner B, Oriola J, Dugaard JR, Lloberas J, Camps M, Zierath JR et al.** 2003. Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J Biol Chem* 278(19):17190-7.

**Baracca A, Sgarbi G, Mattiazi M, Casalena G, Pagnotta E, Valentino ML, Moggio M, Lenaz G, Carelli V, Solaini G.** 2007. Biochemical phenotypes associated with the mitochondrial ATP6 gene mutations at nt8993. *Biochim Biophys Acta* 1767(7):913-9.

**Baricault L, Segui B, Guegant L, Olichon A, Valette A, Larminat F, Lenaers G.** 2007. OPA1 cleavage depends on decreased mitochondrial ATP level and bivalent metals. *Exp Cell Res* 313(17):3800-8.

- Bartosz G.** 2009. Reactive oxygen species: destroyers or messengers? *Biochem Pharmacol* 77(8):1303-15.
- Battisti C, Formichi P, Cardaioli E, Bianchi S, Mangiavacchi P, Tripodi SA, Tosi P, Federico A.** 2004. Cell response to oxidative stress induced apoptosis in patients with Leber's hereditary optic neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75(12):1731-6.
- Bentlage HA, Attardi G.** 1996. Relationship of genotype to phenotype in fibroblast-derived trans-mitochondrial cell lines carrying the 3243 mutation associated with the MELAS encephalomyopathy: shift towards mutant genotype and role of mtDNA copy number. *Hum Mol Genet* 5(2):197-205.
- Bereiter-Hahn J, Voth M.** 1994. Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc Res Tech* 27(3):198-219.
- Bernier FP, Boneh A, Dennett X, Chow CW, Cleary MA, Thorburn DR.** 2002. Diagnostic criteria for respiratory chain disorders in adults and children. *Neurology* 59(9):1406-11.
- Bogenhagen DF, Wang Y, Shen EL, Kobayashi R.** 2003. Protein components of mitochondrial DNA nucleoids in higher eukaryotes. *Mol Cell Proteomics* 2(11):1205-16.
- Boldogh IR, Pon LA.** 2007. Mitochondria on the move. *Trends Cell Biol* 17(10):502-10.
- Boveris A, Chance B.** 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 134(3):707-16.
- Bowmaker M, Yang MY, Yasukawa T, Reyes A, Jacobs HT, Huberman JA, Holt IJ.** 2003. Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone. *J Biol Chem* 278(51):50961-9.
- Brown DT, Samuels DC, Michael EM, Turnbull DM, Chinnery PF.** 2001. Random genetic drift determines the level of mutant mtDNA in human primary oocytes. *Am J Hum Genet* 68(2):533-6.
- Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA, Diaz-Latoud C, Gurbuxani S, Arrigo AP, Kroemer G, Solary E et al.** 2000. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol* 2(9):645-52.
- Brunk CF.** 1981. Mitochondrial proliferation during myogenesis. *Exp Cell Res* 136(2):305-9.
- Brush MH, Guardiola A, Connor JH, Yao TP, Shenolikar S.** 2004. Deacetylase inhibitors disrupt cellular complexes containing protein phosphatases and deacetylases. *J Biol Chem* 279(9):7685-91.
- Campos Y, Arenas J, Cabello A, Gomez-Reino JJ.** 1995. Respiratory chain enzyme defects in patients with idiopathic inflammatory myopathy. *Ann Rheum Dis* 54(6):491-3.
- Campos Y, Martín MA, Navarro C, Gordo P, Arenas J.** 1996. Single large-scale mitochondrial DNA deletion in a patient with mitochondrial myopathy associated with multiple symmetric lipomatosis. *Neurology* 47(4):1012-4.
- Campos Y.** 2002. Estudio del ADN mitocondrial en miopatías mitocondriales. Biblioteca Universidad Complutense de Madrid.
- Carrozzo R, Rizza T, Stringaro A, Pierini R, Momone E, Santorelli FM, Malorni W, Matarrese P.** 2004. Maternally-inherited Leigh syndrome-related mutations bolster mitochondrial-mediated apoptosis. *J Neurochem* 90(2):490-501.

- Casademont J, Barrientos A, Cardellach F, Rotig A, Grau JM, Montoya J, Beltran B, Cervantes F, Rozman C, Estivill X et al.** 1994. Multiple deletions of mtDNA in two brothers with sideroblastic anemia and mitochondrial myopathy and in their asymptomatic mother. *Hum Mol Genet* 3(11):1945-9.
- Ciafaloni E, Ricci E, Shanske S, Moraes CT, Silvestri G, Hirano M, Simonetti S, Angelini C, Donati MA, Garcia C et al.** 1992. MELAS: clinical features, biochemistry, and molecular genetics. *Ann Neurol* 31(4):391-8.
- Cipolat S, Martins de Brito O, Dal Zilio B, Scorrano L.** 2004. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(45):15927-32.
- Clayton DA.** 1982. Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* 28(4):693-705.
- Cribbs JT, Strack S.** 2007. Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Rep* 8(10):939-44.
- Cribbs JT, Strack S.** 2009. Functional characterization of phosphorylation sites in dynamin-related protein 1. *Methods Enzymol* 457:231-53.
- Chalmers-Redman RM, Fraser AD, Carlile GW, Pong A, Tatton WG.** 1999. Glucose protection from MPP<sup>+</sup>-induced apoptosis depends on mitochondrial membrane potential and ATP synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 257(2):440-7.
- Chan DC.** 2006. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* 125(7):1241-52.
- Chen CY, Chen HF, Gi SJ, Chi TH, Cheng CK, Hsu CF, Ma YS, Wei YH, Liu CS, Hsieh M.** 2011. Decreased heat shock protein 27 expression and altered autophagy in human cells harboring A8344G mitochondrial DNA mutation. *Mitochondrion* 11(5):739-49.
- Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC.** 2003. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* 160(2):189-200.
- Chen H, Chan DC.** 2005. Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Hum Mol Genet* 14 Spec No. 2:R283-9.
- Chen Z, Odstrcil EA, Tu BP, McKnight SL.** 2007. Restriction of DNA replication to the reductive phase of the metabolic cycle protects genome integrity. *Science* 316(5833):1916-9.
- Chinnery PF, Thorburn DR, Samuels DC, White SL, Dahl HM, Turnbull DM, Lightowlers RN, Howell N.** 2000. The inheritance of mitochondrial DNA heteroplasmy: random drift, selection or both? *Trends Genet* 16(11):500-5.
- de Vos KJ, Allan VJ, Grierson AJ, Sheetz MP.** 2005. Mitochondrial function and actin regulate dynamin-related protein 1-dependent mitochondrial fission. *Curr Biol* 15(7):678-83.
- de Vries DD, van Engelen BG, Gabreels FJ, Ruitenbeek W, van Oost BA.** 1993. A second missense mutation in the mitochondrial ATPase 6 gene in Leigh's syndrome. *Ann Neurol* 34(3):410-2.
- del Hoyo P, Garcia-Redondo A, de Bustos F, Molina JA, Sayed Y, Alonso-Navarro H, Caballero L, Arenas J, Jimenez-Jimenez FJ.** 2006. Oxidative stress in skin fibroblasts cultures of patients with Huntington's disease. *Neurochem Res* 31(9):1103-9.

**Delettre C, Lenaers G, Griffoin JM, Gigarel N, Lorenzo C, Belenguer P, Pelloquin L, Grosgeorge J, Turc-Carel C, Perret E et al.** 2000. Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* 26(2):207-10.

**Delettre C, Griffoin JM, Kaplan J, Dollfus H, Lorenz B, Faivre L, Lenaers G, Belenguer P, Hamel CP.** 2001. Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene. *Hum Genet* 109(6):584-91.

**Desagher S, Martinou JC.** 2000. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 10(9):369-77.

**Detmer SA, Chan DC.** 2007. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(11):870-9.

**DiMauro S, Schon EA.** 2008. Mitochondrial disorders in the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 31:91-123.

**Dunbar DR, Moonie PA, Jacobs HT, Holt IJ.** 1995. Different cellular backgrounds confer a marked advantage to either mutant or wild-type mitochondrial genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(14):6562-6.

**Duvezin-Caubet S, Jagasia R, Wagener J, Hofmann S, Trifunovic A, Hansson A, Chomyn A, Bauer MF, Attardi G, Larsson NG et al.** 2006. Proteolytic processing of OPA1 links mitochondrial dysfunction to alterations in mitochondrial morphology. *J Biol Chem* 281(49):37972-9.

**Duvezin-Caubet S, Koppen M, Wagener J, Zick M, Israel L, Bernacchia A, Jagasia R, Rugari EI, Imhof A, Neupert W et al.** 2007. OPA1 processing reconstituted in yeast depends on the subunit composition of the m-AAA protease in mitochondria. *Mol Biol Cell* 18(9):3582-90.

**d'Ydewalle C, Krishnan J, Chiheb DM, Van Damme P, Irobi J, Kozikowski AP, Vanden Berghe P, Timmerman V, Robberecht W, Van Den Bosch L.** 2011. HDAC6 inhibitors reverse axonal loss in a mouse model of mutant HSPB1-induced Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Med* 17(8):968-74.

**El Meziane A, Lehtinen SK, Holt IJ, Jacobs HT.** 1998a. Mitochondrial tRNA<sup>Leu</sup> isoforms in lung carcinoma cybrid cells containing the np 3243 mtDNA mutation. *Hum Mol Genet* 7(13):2141-7.

**El Meziane A, Lehtinen SK, Hance N, Nijtmans LG, Dunbar D, Holt IJ, Jacobs HT.** 1998b. A tRNA suppressor mutation in human mitochondria. *Nat Genet* 18(4):350-3.

**Engel WK, Cunningham GG.** 1963. Rapid Examination of Muscle Tissue. An Improved Trichrome Method for Fresh-Frozen Biopsy Sections. *Neurology* 13:919-23.

**Fan X, Hussien R, Brooks GA.** 2010 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced mitochondrial fragmentation in C2C12 myocytes. *Free Radic Biol Med* 49(11):1646-54.

**Finsterer J.** 2004. Mitochondriopathies. *Eur J Neurol* 11(3):163-86.

**Fischel-Ghodsian N.** 1999. Mitochondrial deafness mutations reviewed. *Hum Mutat* 13(4):261-70.

**Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, Leitner WW, Robert EG, Catez F, Smith CL, Youle RJ.** 2001. The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell* 1(4):515-25.

- Frieden M, James D, Castelbou C, Danckaert A, Martinou JC, Demaurex N.** 2004. Ca(2+) homeostasis during mitochondrial fragmentation and perinuclear clustering induced by hFis1. *J Biol Chem* 279(21):22704-14.
- Garcia JJ, Ogilvie I, Robinson BH, Capaldi RA.** 2000. 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* 275(15):11075-81.
- Garesse R, Vallejo CG.** 2001. Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. *Gene* 263(1-2):1-16.
- Garrido N, Griparic L, Jokitalo E, Wartiovaara J, van der Bliek AM, Spelbrink JN.** 2003. Composition and dynamics of human mitochondrial nucleoids. *Mol Biol Cell* 14(4):1583-96.
- Germain M, Mathai JP, McBride HM, Shore GC.** 2005. Endoplasmic reticulum BIK initiates DRP1-regulated remodelling of mitochondrial cristae during apoptosis. *EMBO J* 24(8):1546-56.
- Gibert B, Eckel B, Fasquelle L, Moulin M, Bouhallier F, Gonin V, Mellier G, Simon S, Kretz-Remy C, Arrigo AP et al.** 2012 Knock down of heat shock protein 27 (HspB1) induces degradation of several putative client proteins. *PLoS One* 7(1):e29719.
- Goglia F, Moreno M, Lanni A.** 1999. Action of thyroid hormones at the cellular level: the mitochondrial target. *FEBS Lett* 452(3):115-20.
- Goldman RD, Grin B, Mendez MG, Kuczmarski ER.** 2008. Intermediate filaments: versatile building blocks of cell structure. *Curr Opin Cell Biol* 20(1):28-34.
- Gonzalez-Crespo MR, Arenas J, Gomez-Reino JJ, Campos Y, Borstein B, Martin MA, Cabello A, Garcia-Rayo R, Ricoy JR.** 1999. Muscle dysfunction in elderly individuals with hip fracture. *J Rheumatol* 26(10):2229-32.
- Goto Y, Nonaka I, Horai S.** 1990. A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* 348(6302):651-3.
- Griffin EE, Graumann J, Chan DC.** 2005. The WD40 protein Caf4p is a component of the mitochondrial fission machinery and recruits Dnm1p to mitochondria. *J Cell Biol* 170(2):237-48.
- Griparic L, Kanazawa T, van der Bliek AM.** 2007. Regulation of the mitochondrial dynamin-like protein Opa1 by proteolytic cleavage. *J Cell Biol* 178(5):757-64.
- Guillery O, Malka F, Landes T, Guillou E, Blackstone C, Lombes A, Belenguer P, Arnoult D, Rojo M.** 2008. Metalloprotease-mediated OPA1 processing is modulated by the mitochondrial membrane potential. *Biol Cell* 100(5):315-25.
- Haggarty SJ, Koeller KM, Wong JC, Grozinger CM, Schreiber SL.** 2003. Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(8):4389-94.
- Heggeness MH, Simon M, Singer SJ.** 1978. Association of mitochondria with microtubules in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(8):3863-6.



- Herzig RP, Scacco S, Scarpulla RC.** 2000. Sequential serum-dependent activation of CREB and NRF-1 leads to enhanced mitochondrial respiration through the induction of cytochrome c. *J Biol Chem* 275(17):13134-41.
- Hino M, Kurogi K, Okubo MA, Murata-Hori M, Hosoya H.** 2000. Small heat shock protein 27 (HSP27) associates with tubulin/microtubules in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 271(1):164-9.
- Hirokawa N, Takemura R.** 2005. Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nat Rev Neurosci* 6(3):201-14.
- Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA.** 1988. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 331(6158):717-9.
- Holt IJ, Harding AE, Petty RK, Morgan-Hughes JA.** 1990. A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am J Hum Genet* 46(3):428-33.
- Holt IJ, Lorimer HE, Jacobs HT.** 2000. Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell* 100(5):515-24.
- Hollenbeck PJ, Saxton WM.** 2005. The axonal transport of mitochondria. *J Cell Sci* 118(Pt 23):5411-9.
- Horvath R, Gorman G, Chinnery PF.** 2008. How can we treat mitochondrial encephalomyopathies? Approaches to therapy. *Neurotherapeutics* 5(4):558-68.
- Hubbert C, Guardiola A, Shao R, Kawaguchi Y, Ito A, Nixon A, Yoshida M, Wang XF, Yao TP.** 2002. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 417(6887):455-8.
- Huot J, Houle F, Spitz DR, Landry J.** 1996. HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress. *Cancer Res* 56(2):273-9.
- Indo HP, Davidson M, Yen HC, Suenaga S, Tomita K, Nishii T, Higuchi M, Koga Y, Ozawa T, Majima HJ.** 2007. Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage. *Mitochondrion* 7(1-2):106-18.
- Ishihara N, Fujita Y, Oka T, Mihara K.** 2006. Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *EMBO J* 25(13):2966-77.
- Jagasia R, Grote P, Westermann B, Conradt B.** 2005. DRP-1-mediated mitochondrial fragmentation during EGL-1-induced cell death in *C. elegans*. *Nature* 433(7027):754-60.
- James AM, Sheard PW, Wei YH, Murphy MP.** 1999. Decreased ATP synthesis is phenotypically expressed during increased energy demand in fibroblasts containing mitochondrial tRNA mutations. *Eur J Biochem* 259(1-2):462-9.
- James DI, Parone PA, Mattenberger Y, Martinou JC.** 2003. hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *J Biol Chem* 278(38):36373-9.
- Jendrach M, Mai S, Pohl S, Voth M, Bereiter-Hahn J.** 2008. Short- and long-term alterations of mitochondrial morphology, dynamics and mtDNA after transient oxidative stress. *Mitochondrion* 8(4):293-304.
- Jenuth JP, Peterson AC, Fu K, Shoubridge EA.** 1996. Random genetic drift in the female germline explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial DNA. *Nat Genet* 14(2):146-51.

**Jing XB, Cai XB, Hu H, Chen SZ, Chen BM, Cai JY.** 2007. Reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential are modulated during CDDP-induced apoptosis in EC-109 cells. *Biochem Cell Biol* 85(2):265-71.

**Johns DR, Neufeld MJ, Park RD.** 1992. An ND-6 mitochondrial DNA mutation associated with Leber hereditary optic neuropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 187(3):1551-7.

**Jose B, Okamura S, Kato T, Nishino N, Sumida Y, Yoshida M.** 2004. Toward an HDAC6 inhibitor: synthesis and conformational analysis of cyclic hexapeptide hydroxamic acid designed from alpha-tubulin sequence. *Bioorg Med Chem* 12(6):1351-6.

**Karbowski M, Spodnik JH, Teranishi M, Wozniak M, Nishizawa Y, Usukura J, Wakabayashi T.** 2001. Opposite effects of microtubule-stabilizing and microtubule-destabilizing drugs on biogenesis of mitochondria in mammalian cells. *J Cell Sci* 114(Pt 2):281-91.

**Kasamatsu H, Vinograd J.** 1973. Unidirectionality of replication in mouse mitochondrial DNA. *Nat New Biol* 241(108):103-5.

**King MP, Attardi G.** 1989. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* 246(4929):500-3.

**Kirino Y, Yasukawa T, Marjavaara SK, Jacobs HT, Holt IJ, Watanabe K, Suzuki T.** 2006. Acquisition of the wobble modification in mitochondrial tRNA<sup>Leu</sup>(CUN) bearing the G12300A mutation suppresses the MELAS molecular defect. *Hum Mol Genet* 15(6):897-904.

**Koopman WJ, Visch HJ, Verkaart S, van den Heuvel LW, Smeitink JA, Willems PH.** 2005. Mitochondrial network complexity and pathological decrease in complex I activity are tightly correlated in isolated human complex I deficiency. *Am J Physiol Cell Physiol* 289(4):C881-90.

**Koopman WJ, Verkaart S, Visch HJ, van Emst-de Vries S, Nijtmans LG, Smeitink JA, Willems PH.** 2007. Human NADH:ubiquinone oxidoreductase deficiency: radical changes in mitochondrial morphology? *Am J Physiol Cell Physiol* 293(1):C22-9.

**Kwong JQ, Henning MS, Starkov AA, Manfredi G.** 2007. The mitochondrial respiratory chain is a modulator of apoptosis. *J Cell Biol* 179(6):1163-77.

**Landry J, Chretien P, Lambert H, Hickey E, Weber LA.** 1989. Heat shock resistance conferred by expression of the human HSP27 gene in rodent cells. *J Cell Biol* 109(1):7-15.

**Larsson NG, Clayton DA.** 1995. Molecular genetic aspects of human mitochondrial disorders. *Annu Rev Genet* 29:151-78.

**Lavoie JN, Gingras-Breton G, Tanguay RM, Landry J.** 1993. Induction of Chinese hamster HSP27 gene expression in mouse cells confers resistance to heat shock. HSP27 stabilization of the microfilament organization. *J Biol Chem* 268(5):3420-9.

**Lebiedzinska M, Karkucinska-Wieckowska A, Wojtala A, Suski JM, Szabadkai G, Wilczynski G, Wlodarczyk J, Diogo CV, Oliveira PJ, Tauber J et al.** 2012 Disrupted ATP synthase activity and mitochondrial hyperpolarisation-dependent oxidative stress is associated with p66Shc phosphorylation in fibroblasts of NARP patients. *Int J Biochem Cell Biol* 45(1):141-50.

- LeDizet M, Piperno G.** 1987. Identification of an acetylation site of *Chlamydomonas* alpha-tubulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(16):5720-4.
- Lee HC, Yin PH, Lu CY, Chi CW, Wei YH.** 2000. Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. *Biochem J* 348 Pt 2:425-32.
- Lee HC, Yin PH, Chi CW, Wei YH.** 2002. Increase in mitochondrial mass in human fibroblasts under oxidative stress and during replicative cell senescence. *J Biomed Sci* 9(6 Pt 1):517-26.
- Lee S, Jeong SY, Lim WC, Kim S, Park YY, Sun X, Youle RJ, Cho H.** 2007. Mitochondrial fission and fusion mediators, hFis1 and OPA1, modulate cellular senescence. *J Biol Chem* 282(31):22977-83.
- Lee YJ, Jeong SY, Karbowski M, Smith CL, Youle RJ.** 2004. Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol Biol Cell* 15(11):5001-11.
- Legros F, Lombes A, Frachon P, Rojo M.** 2002. Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol Biol Cell* 13(12):4343-54.
- Legros F, Malka F, Frachon P, Lombes A, Rojo M.** 2004. Organization and dynamics of human mitochondrial DNA. *J Cell Sci* 117(Pt 13):2653-62.
- Lenaers G, Reynier P, Elachouri G, Soukkaiech C, Olichon A, Belenguer P, Baricault L, Ducommun B, Hamel C, Delettre C.** 2009. OPA1 functions in mitochondria and dysfunctions in optic nerve. *Int J Biochem Cell Biol* 41(10):1866-74.
- Leonard JV, Schapira AH.** 2000. Mitochondrial respiratory chain disorders I: mitochondrial DNA defects. *Lancet* 355(9200):299-304.
- Leonard JV, Schapira AH.** 2000. Mitochondrial respiratory chain disorders II: neurodegenerative disorders and nuclear gene defects. *Lancet* 355(9201):389-94.
- L'Hernault SW, Rosenbaum JL.** 1985. *Chlamydomonas* alpha-tubulin is posttranslationally modified by acetylation on the epsilon-amino group of a lysine. *Biochemistry* 24(2):473-8.
- Li G, Jiang H, Chang M, Xie H, Hu L.** 2011. HDAC6 alpha-tubulin deacetylase: a potential therapeutic target in neurodegenerative diseases. *J Neurol Sci* 304(1-2):1-8.
- Lopez-Lluch G, Iruستا PM, Navas P, de Cabo R.** 2008. Mitochondrial biogenesis and healthy aging. *Exp Gerontol* 43(9):813-9.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1):265-75.
- Luft R, Ikkos D, Palmieri G, Ernster L, Afzelius B.** 1962. A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study. *J Clin Invest* 41:1776-804.
- MacRae TH.** 1997. Tubulin post-translational modifications--enzymes and their mechanisms of action. *Eur J Biochem* 244(2):265-78.
- Malka F, Guillery O, Cifuentes-Diaz C, Guillou E, Belenguer P, Lombes A, Rojo M.** 2005. Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes. *EMBO Rep* 6(9):853-9.

- Mancini M, Anderson BO, Caldwell E, Sedghinasab M, Paty PB, Hockenbery DM.** 1997. Mitochondrial proliferation and paradoxical membrane depolarization during terminal differentiation and apoptosis in a human colon carcinoma cell line. *J Cell Biol* 138(2):449-69.
- Mancuso M, Filosto M, Mootha VK, Rocchi A, Pistolesi S, Murri L, DiMauro S, Siciliano G.** 2004. A novel mitochondrial tRNAPhe mutation causes MERRF syndrome. *Neurology* 62(11):2119-21.
- Maneiro E, Lopez-Armada MJ, de Andres MC, Carames B, Martín MA, Bonilla A, Del Hoyo P, Galdo F, Arenas J, Blanco FJ.** 2005. Effect of nitric oxide on mitochondrial respiratory activity of human articular chondrocytes. *Ann Rheum Dis* 64(3):388-95.
- Manfredi G, Vu T, Bonilla E, Schon EA, DiMauro S, Arnaudo E, Zhang L, Rowland LP, Hirano M.** 1997. Association of myopathy with large-scale mitochondrial DNA duplications and deletions: which is pathogenic? *Ann Neurol* 42(2):180-8.
- Manfredi G, Gupta N, Vazquez-Memije ME, Sadlock JE, Spinazzola A, De Vivo DC, Schon EA.** 1999. Oligomycin induces a decrease in the cellular content of a pathogenic mutation in the human mitochondrial ATPase 6 gene. *J Biol Chem* 274(14):9386-91.
- Margineantu DH, Gregory Cox W, Sundell L, Sherwood SW, Beechem JM, Capaldi RA.** 2002. Cell cycle dependent morphology changes and associated mitochondrial DNA redistribution in mitochondria of human cell lines. *Mitochondrion* 1(5):425-35.
- Margulis L.** 1975. Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof. *Symp Soc Exp Biol*(29):21-38.
- Martin MA, Campos Y, Garcia-Silva MT, Rubio JC, Del Hoyo P, de Bustos F, Garcia A, Arenas J.** 1999. Slow segregation and rapid shift to homoplasmy coexist in a family with the T8993 > G mutation. *J Inherit Metab Dis* 22(8):939-40.
- Martinez-Diez M, Santamaria G, Ortega AD, Cuezva JM.** 2006. Biogenesis and dynamics of mitochondria during the cell cycle: significance of 3'UTRs. *PLoS One* 1:e107.
- Martin-Jimenez R, Martín-Hernandez E, Cabello A, Garcia-Silva MT, Arenas J, Campos Y.** 2012. Clinical and cellular consequences of the mutation m.12300G>A in the mitochondrial tRNA(Leu(CUN)) gene. *Mitochondrion* 12(2):288-93.
- McKenzie M, Liolitsa D, Akinshina N, Campanella M, Sisodiya S, Hargreaves I, Nimalanathan N, Sweeney MG, Abou-Sleiman PM, Wood NW et al.** 2007. Mitochondrial ND5 gene variation associated with encephalomyopathy and mitochondrial ATP consumption. *J Biol Chem* 282(51):36845-52.
- Menon SG, Sarsour EH, Kalen AL, Venkataraman S, Hitchler MJ, Domann FE, Oberley LW, Goswami PC.** 2007. Superoxide signaling mediates N-acetyl-L-cysteine-induced G1 arrest: regulatory role of cyclin D1 and manganese superoxide dismutase. *Cancer Res* 67(13):6392-9.
- Misaka T, Miyashita T, Kubo Y.** 2002. Primary structure of a dynamin-related mouse mitochondrial GTPase and its distribution in brain, subcellular localization, and effect on mitochondrial morphology. *J Biol Chem* 277(18):15834-42.
- Mitra K, Wunder C, Roysam B, Lin G, Lippincott-Schwartz J.** 2009. A hyperfused mitochondrial state achieved at G1-S regulates cyclin E buildup and entry into S phase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(29):11960-5.

- Montoya J, Ojala D, Attardi G.** 1981. Distinctive features of the 5'-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs. *Nature* 290(5806):465-70.
- Moraes CT, DiMauro S, Zeviani M, Lombes A, Shanske S, Miranda AF, Nakase H, Bonilla E, Werneck LC, Servidei S et al.** 1989. Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *N Engl J Med* 320(20):1293-9.
- Moraes CT, Ciacci F, Bonilla E, Ionasescu V, Schon EA, DiMauro S.** 1993. A mitochondrial tRNA anticodon swap associated with a muscle disease. *Nat Genet* 4(3):284-8.
- Moyes CD, Mathieu-Costello OA, Tsuchiya N, Filburn C, Hansford RG.** 1997. Mitochondrial biogenesis during cellular differentiation. *Am J Physiol* 272(4 Pt 1):C1345-51.
- Nakata T, Hirokawa N.** 2003. Microtubules provide directional cues for polarized axonal transport through interaction with kinesin motor head. *J Cell Biol* 162(6):1045-55.
- Nass MM, Nass S.** 1963. Intramitochondrial Fibers with DNA Characteristics. I. Fixation and Electron Staining Reactions. *J Cell Biol* 19:593-611.
- Navarro-Sastre A, Martín-Hernandez E, Campos Y, Quintana E, Medina E, de Las Heras RS, Lluch M, Munoz A, del Hoyo P, Martín R et al.** 2008. Lethal hepatopathy and leukodystrophy caused by a novel mutation in MPV17 gene: description of an alternative MPV17 spliced form. *Mol Genet Metab* 94(2):234-9.
- Naviaux RK.** 2000. Mitochondrial DNA disorders. *Eur J Pediatr* 159 Suppl 3:S219-26.
- Nogales E.** 2000. Structural insights into microtubule function. *Annu Rev Biochem* 69:277-302.
- Nohl H, Kozlov AV, Gille L, Staniek K.** 2003. Cell respiration and formation of reactive oxygen species: facts and artefacts. *Biochem Soc Trans* 31(Pt 6):1308-11.
- North BJ, Marshall BL, Borra MT, Denu JM, Verdin E.** 2003. The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD<sup>+</sup>-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell* 11(2):437-44.
- Olichon A, Emorine LJ, Descoins E, Pelloquin L, Bricchese L, Gas N, Guillou E, Delettre C, Valette A, Hamel CP et al.** 2002. The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Lett* 523(1-3):171-6.
- Olichon A, Elachouri G, Baricault L, Delettre C, Belenguer P, Lenaers G.** 2007a. OPA1 alternate splicing uncouples an evolutionary conserved function in mitochondrial fusion from a vertebrate restricted function in apoptosis. *Cell Death Differ* 14(4):682-92.
- Olichon A, Landes T, Arnaune-Pelloquin L, Emorine LJ, Mils V, Guichet A, Delettre C, Hamel C, Amati-Bonneau P, Bonneau D et al.** 2007b. Effects of OPA1 mutations on mitochondrial morphology and apoptosis: relevance to ADOA pathogenesis. *J Cell Physiol* 211(2):423-30.
- Palmer CS, Osellame LD, Stojanovski D, Ryan MT.** 2011. The regulation of mitochondrial morphology: intricate mechanisms and dynamic machinery. *Cell Signal* 23(10):1534-45.
- Parmigiani RB, Xu WS, Venta-Perez G, Erdjument-Bromage H, Yaneva M, Tempst P, Marks PA.** 2008. HDAC6 is a specific deacetylase of peroxiredoxins and is involved in redox regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(28):9633-8.

- Perng MD, Cairns L, van den IP, Prescott A, Hutcheson AM, Quinlan RA.** 1999. Intermediate filament interactions can be altered by HSP27 and alphaB-crystallin. *J Cell Sci* 112 ( Pt 13):2099-112.
- Posakony JW, England JM, Attardi G.** 1977. Mitochondrial growth and division during the cell cycle in HeLa cells. *J Cell Biol* 74(2):468-91.
- Poulton J, Macaulay V, Marchington DR.** 1998. Mitochondrial genetics '98 is the bottleneck cracked? *Am J Hum Genet* 62(4):752-7.
- Prezant TR, Agopian JV, Bohlman MC, Bu X, Oztas S, Qiu WQ, Arnos KS, Cortopassi GA, Jaber L, Rotter JI et al.** 1993. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat Genet* 4(3):289-94.
- Reed NA, Cai D, Blasius TL, Jih GT, Meyhofer E, Gaertig J, Verhey KJ.** 2006. Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr Biol* 16(21):2166-72.
- Reis Y, Bernardo-Faura M, Richter D, Wolf T, Brors B, Hamacher-Brady A, Eils R, Brady NR.** 2012. Multi-parametric analysis and modeling of relationships between mitochondrial morphology and apoptosis. *PLoS One* 7(1):e28694.
- Rotig A, Goutieres F, Niaudet P, Rustin P, Chretien D, Guest G, Mikol J, Gubler MC, Munnich A.** 1995. Deletion of mitochondrial DNA in patient with chronic tubulointerstitial nephritis. *J Pediatr* 126(4):597-601.
- Rube DA, van der Blik AM.** 2004. Mitochondrial morphology is dynamic and varied. *Mol Cell Biochem* 256-257(1-2):331-9.
- Rugarli EI, Langer T.** 2012. Mitochondrial quality control: a matter of life and death for neurons. *EMBO J* 31(6):1336-49.
- Sacconi S, Salviati L, Nishigaki Y, Walker WF, Hernandez-Rosa E, Trevisson E, Delplace S, Desnuelle C, Shanske S, Hirano M et al.** 2008. A functionally dominant mitochondrial DNA mutation. *Hum Mol Genet* 17(12):1814-20.
- Sakamaki T, Casimiro MC, Ju X, Quong AA, Katiyar S, Liu M, Jiao X, Li A, Zhang X, Lu Y, Wang C, Byers S, Nicholson R, Link T, Shemluck M, Yang J, Fricke ST, Novikoff PM, Papanikolaou A, Arnold A, Albanese C, Pestell R.** 2006. Cyclin D1 determines mitochondrial function in vivo. *Mol Cell Biol* (14):5449-69
- Santel A, Frank S, Gaume B, Herrler M, Youle RJ, Fuller MT.** 2003. Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. *J Cell Sci* 116(Pt 13):2763-74.
- Sarsour EH, Kumar MG, Chaudhuri L, Kalen AL, Goswami PC.** 2009. Redox control of the cell cycle in health and disease. *Antioxid Redox Signal* 11(12):2985-3011.
- Satoh M, Hamamoto T, Seo N, Kagawa Y, Endo H.** 2003. Differential sublocalization of the dynamin-related protein OPA1 isoforms in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 300(2):482-93.
- Scalettar BA, Abney JR, Hackenbrock CR.** 1991. Dynamics, structure, and function are coupled in the mitochondrial matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(18):8057-61.
- Schagger H, Pfeiffer K.** 2000. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J* 19(8):1777-83.

- Schagger H, de Coo R, Bauer MF, Hofmann S, Godinot C, Brandt U.** 2004. Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I. *J Biol Chem* 279(35):36349-53.
- Schofield AV, Gamell C, Suryadinata R, Sarcevic B, Bernard O.** 2013. Tubulin polymerization promoting protein 1 (Tppp1) phosphorylation by Rho-associated coiled-coil kinase (rock) and cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1) inhibits microtubule dynamics to increase cell proliferation. *J Biol Chem.* 288(11) 7907-17.
- Schon EA, Koga Y, Davidson M, Moraes CT, King MP.** 1992. The mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) mutation in MELAS: a model for pathogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1101(2):206-9.
- Schon EA, Hirano M, DiMauro S.** 1994. Mitochondrial encephalomyopathies: clinical and molecular analysis. *J Bioenerg Biomembr* 26(3):291-9.
- Schon EA, DiMauro S.** 2007. Mitochondrial mutations: genotype to phenotype. *Novartis Found Symp* 287:214-25; discussion 226-33.
- Schrump DS.** 2009. Cytotoxicity mediated by histone deacetylase inhibitors in cancer cells: mechanisms and potential clinical implications. *Clin Cancer Res* 15(12):3947-57.
- Schultz BE, Misialek S, Wu J, Tang J, Conn MT, Tahilramani R, Wong L.** 2004. Kinetics and comparative reactivity of human class I and class IIb histone deacetylases. *Biochemistry* 43(34):11083-91.
- Schwartz M, Vissing J.** 2002. Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N Engl J Med* 347(8):576-80.
- Seibel P, Di Nunno C, Kukat C, Schafer I, Del Bo R, Bordoni A, Comi GP, Schon A, Capuano F, Latorre D et al.** 2008. Cosegregation of novel mitochondrial 16S rRNA gene mutations with the age-associated T414G variant in human cybrids. *Nucleic Acids Res* 36(18):5872-81.
- Seo AY, Joseph AM, Dutta D, Hwang JC, Aris JP, Leeuwenburgh C.** 2010. New insights into the role of mitochondria in aging: mitochondrial dynamics and more. *J Cell Sci* 123(Pt 15):2533-42.
- Sgarbi G, Baracca A, Lenaz G, Valentino LM, Carelli V, Solaini G.** 2006. Inefficient coupling between proton transport and ATP synthesis may be the pathogenic mechanism for NARP and Leigh syndrome resulting from the T8993G mutation in mtDNA. *Biochem J* 395(3):493-500.
- Shoffner JM, Lott MT, Lezza AM, Seibel P, Ballinger SW, Wallace DC.** 1990. Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. *Cell* 61(6):931-7.
- Shoffner JM, Wallace DC.** 1992. Mitochondrial genetics: principles and practice. *Am J Hum Genet* 51(6):1179-86.
- Skulachev VP.** 2001. Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends Biochem Sci* 26(1):23-9.
- Smirnova E, Shurland DL, Ryazantsev SN, van der Bliek AM.** 1998. A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *J Cell Biol* 143(2):351-8.
- Smirnova E, Griparic L, Shurland DL, van der Bliek AM.** 2001. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 12(8):2245-56.
- Song Z, Chen H, Fiket M, Alexander C, Chan DC.** 2007. OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *J Cell Biol* 178(5):749-55.

- Soto IC, Fontanesi F, Valledor M, Horn D, Singh R, Barrientos A.** 2009. Synthesis of cytochrome c oxidase subunit 1 is translationally downregulated in the absence of functional F1F0-ATP synthase. *Biochim Biophys Acta* 1793(11):1776-86.
- Spodnik JH, Wozniak M, Budzko D, Teranishi MA, Karbowski M, Nishizawa Y, Usukura J, Wakabayashi T.** 2002. Mechanism of leflunomide-induced proliferation of mitochondria in mammalian cells. *Mitochondrion* 2(3):163-79.
- Spremulli LL, Coursey A, Navratil T, Hunter SE.** 2004. Initiation and elongation factors in mammalian mitochondrial protein biosynthesis. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 77:211-61.
- Stetler RA, Gao Y, Signore AP, Cao G, Chen J.** 2009. HSP27: mechanisms of cellular protection against neuronal injury. *Curr Mol Med* 9(7):863-72.
- Strachan T, Read AP.** Human Molecular Genetic 1999.
- Suen DF, Norris KL, Youle RJ.** 2008. Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev* 22(12):1577-90.
- Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G.** 1999. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature* 402(6760):371-2.
- Szczepanowska J, Zablocki K, Duszynski J.** 2004. Influence of a mitochondrial genetic defect on capacitative calcium entry and mitochondrial organization in the osteosarcoma cells. *FEBS Lett* 578(3):316-22.
- Taguchi N, Ishihara N, Jofuku A, Oka T, Mihara K.** 2007. Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *J Biol Chem* 282(15):11521-9.
- Takemura R, Okabe S, Umeyama T, Kanai Y, Cowan NJ, Hirokawa N.** 1992. Increased microtubule stability and alpha tubulin acetylation in cells transfected with microtubule-associated proteins MAP1B, MAP2 or tau. *J Cell Sci* 103 ( Pt 4):953-64.
- Tatuch Y, Christodoulou J, Feigenbaum A, Clarke JT, Wherret J, Smith C, Rudd N, Petrova-Benedict R, Robinson BH.** 1992. Heteroplasmic mtDNA mutation (T---G) at 8993 can cause Leigh disease when the percentage of abnormal mtDNA is high. *Am J Hum Genet* 50(4):852-8.
- Thyagarajan D, Shanske S, Vazquez-Memije M, De Vivo D, DiMauro S.** 1995. A novel mitochondrial ATPase 6 point mutation in familial bilateral striatal necrosis. *Ann Neurol* 38(3):468-72.
- Tieu Q, Okreglak V, Naylor K, Nunnari J.** 2002. The WD repeat protein, Mdv1p, functions as a molecular adaptor by interacting with Dnm1p and Fis1p during mitochondrial fission. *J Cell Biol* 158(3):445-52.
- Tiranti V, Hoertnagel K, Carrozzo R, Galimberti C, Munaro M, Granatiero M, Zelante L, Gasparini P, Marzella R, Rocchi M et al.** 1998. Mutations of SURF-1 in Leigh disease associated with cytochrome c oxidase deficiency. *Am J Hum Genet* 63(6):1609-21.
- Tondera D, Grandemange S, Jourdain A, Karbowski M, Mattenberger Y, Herzig S, Da Cruz S, Clerc P, Raschke I, Merkwirth C et al.** 2009. SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *EMBO J* 28(11):1589-600.
- Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD, Huang P.** 2008. Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal* 10(8):1343-74.



- Twig G, Elorza A, Molina AJ, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, Stiles L, Haigh SE, Katz S, Las G et al.** 2008a. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J* 27(2):433-46.
- Twig G, Hyde B, Shirihai OS.** 2008b. Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: the bioenergetic view. *Biochim Biophys Acta* 1777(9):1092-7.
- Twig G, Shirihai OS.** 2011. The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy. *Antioxid Redox Signal* 14(10):1939-51.
- Valenzuela-Fernandez A, Cabrero JR, Serrador JM, Sanchez-Madrid F.** 2008. HDAC6: a key regulator of cytoskeleton, cell migration and cell-cell interactions. *Trends Cell Biol* 18(6):291-7.
- Van den Bogert C, van Kernebeek G, de Leij L, Kroon AM.** 1986. Inhibition of mitochondrial protein synthesis leads to proliferation arrest in the G1-phase of the cell cycle. *Cancer Lett* 32(1):41-51.
- Van den Bogert C, Muus P, Haanen C, Pennings A, Melis TE, Kroon AM.** 1988. Mitochondrial biogenesis and mitochondrial activity during the progression of the cell cycle of human leukemic cells. *Exp Cell Res* 178(1):143-53.
- Vanhaecke T, Papeleu P, Elaut G, Rogiers V.** 2004. Trichostatin A-like hydroxamate histone deacetylase inhibitors as therapeutic agents: toxicological point of view. *Curr Med Chem* 11(12):1629-43.
- Vazquez-Memije ME, Rizza T, Meschini MC, Nesti C, Santorelli FM, Carrozzo R.** 2009. Cellular and functional analysis of four mutations located in the mitochondrial ATPase6 gene. *J Cell Biochem* 106(5):878-86.
- Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V.** 2008. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. *Cardiovasc Res* 79(2):208-17.
- Verdin E, Dequiedt F, Kasler HG.** 2003. Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet* 19(5):286-93.
- Vergani L, Martinuzzi A, Carelli V, Cortelli P, Montagna P, Schievano G, Carrozzo R, Angelini C, Lugaresi E.** 1995. MtDNA mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy: studies on cytoplasmic hybrid (cybrid) cells. *Biochem Biophys Res Commun* 210(3):880-8.
- Vergani L, Rossi R, Brierley CH, Hanna M, Holt IJ.** 1999. Introduction of heteroplasmic mitochondrial DNA (mtDNA) from a patient with NARP into two human rho degrees cell lines is associated either with selection and maintenance of NARP mutant mtDNA or failure to maintain mtDNA. *Hum Mol Genet* 8(9):1751-5.
- Verkaart S, Koopman WJ, Cheek J, van Ernst-de Vries SE, van den Heuvel LW, Smeitink JA, Willem PH.** 2007. Mitochondrial and cytosolic thiol redox state are not detectably altered in isolated human NADH:ubiquinone oxidoreductase deficiency. *Biochim Biophys Acta* 1772(9):1041-51.
- Vonck J, Schafer E.** 2009. Supramolecular organization of protein complexes in the mitochondrial inner membrane. *Biochim Biophys Acta* 1793(1):117-24.
- Vorobjev IA, Zorov DB.** 1983. Diazepam inhibits cell respiration and induces fragmentation of mitochondrial reticulum. *FEBS Lett* 163(2):311-4.

**Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM, Elsas LJ, 2nd, Nikoskelainen EK.** 1988. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 242(4884):1427-30.

**Wallace DC.** 2005. Mitochondria and cancer: Warburg addressed. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 70:363-74.

**Wang J, Lin A, Lu L.** 2010. Effect of EGF-induced HDAC6 activation on corneal epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51(6):2943-8.

**Wenz T, Wang X, Marini M, Moraes CT.** 2011. A metabolic shift induced by a PPAR panagonist markedly reduces the effects of pathogenic mitochondrial tRNA mutations. *J Cell Mol Med* 15(11):2317-25.

**Westermann B.** 2002. Merging mitochondria matters: cellular role and molecular machinery of mitochondrial fusion. *EMBO Rep* 3(6):527-31.

**Wittenhagen LM, Kelley SO.** 2003. Impact of disease-related mitochondrial mutations on tRNA structure and function. *Trends Biochem Sci* 28(11):605-11.

**Wojewoda M, Duszynski J, Szczepanowska J.** 2011. NARP mutation and mtDNA depletion trigger mitochondrial biogenesis which can be modulated by selenite supplementation. *Int J Biochem Cell Biol* 43(8):1178-86.

**Wong A, Cortopassi G.** 2002. Reproducible quantitative PCR of mitochondrial and nuclear DNA copy number using the LightCycler. *Methods Mol Biol* 197:129-37.

**Wu SB, Ma YS, Wu YT, Chen YC, Wei YH.** 2010. Mitochondrial DNA mutation-elicited oxidative stress, oxidative damage, and altered gene expression in cultured cells of patients with MERRF syndrome. *Mol Neurobiol* 41(2-3):256-66.

**Xie R, Nguyen S, McKeehan WL, Liu L.** 2010. Acetylated microtubules are required for fusion of autophagosomes with lysosomes. *BMC Cell Biol* 11:89.

**Yang XJ, Gregoire S.** 2005. Class II histone deacetylases: from sequence to function, regulation, and clinical implication. *Mol Cell Biol* 25(8):2873-84.

**Yoneda M, Chomyn A, Martinuzzi A, Hurko O, Attardi G.** 1992. Marked replicative advantage of human mtDNA carrying a point mutation that causes the MELAS encephalomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(23):11164-8.

**Yoon YS, Yoon DS, Lim IK, Yoon SH, Chung HY, Rojo M, Malka F, Jou MJ, Martinou JC, Yoon G.** 2006. Formation of elongated giant mitochondria in DFO-induced cellular senescence: involvement of enhanced fusion process through modulation of Fis1. *J Cell Physiol* 209(2):468-80.

**Yu T, Robotham JL, Yoon Y.** 2006. Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(8):2653-8.

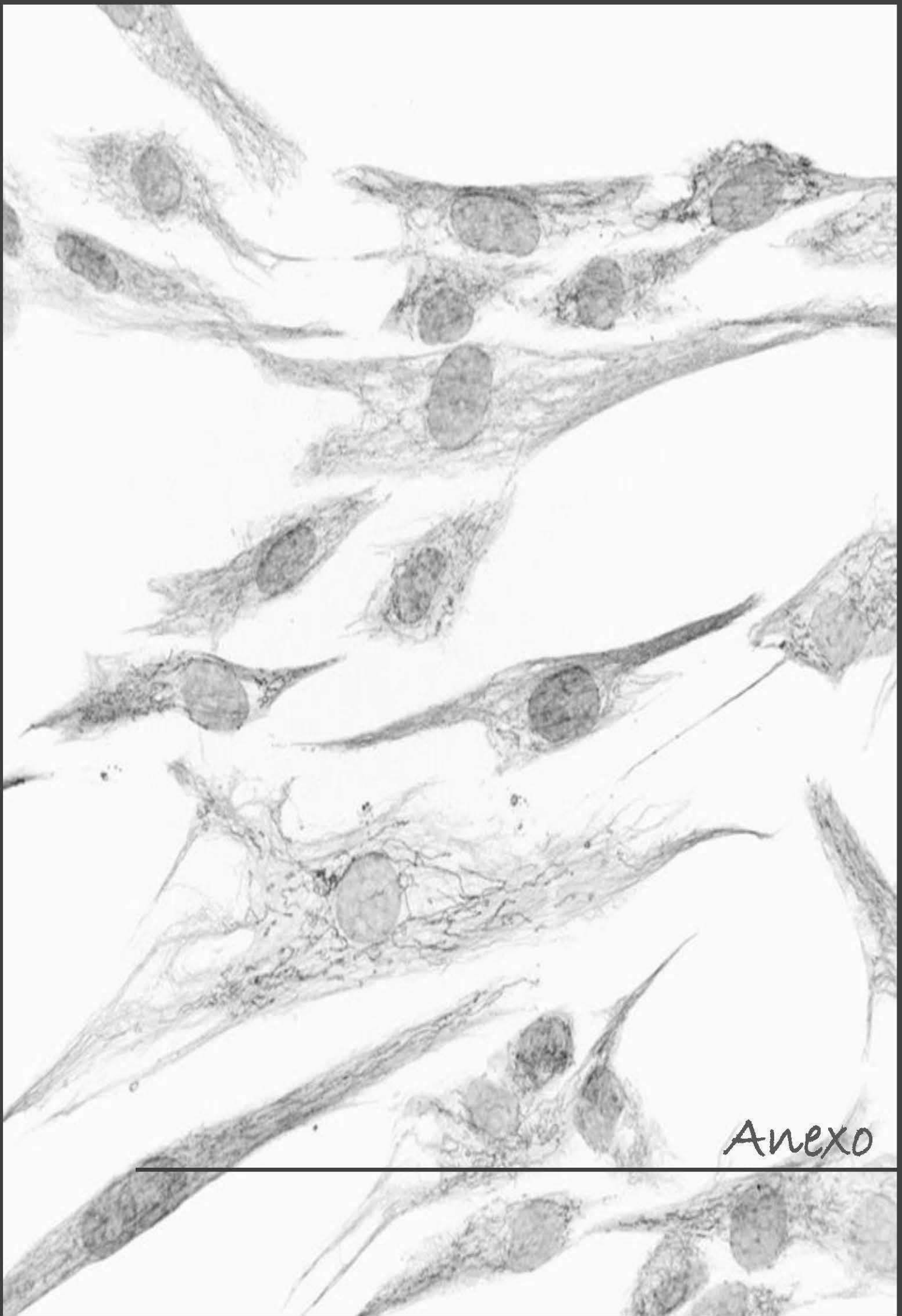
**Zanna C, Ghelli A, Porcelli AM, Karbowski M, Youle RJ, Schimpf S, Wissinger B, Pinti M, Cosarizza A, Vidoni S et al.** 2008. OPA1 mutations associated with dominant optic atrophy impair oxidative phosphorylation and mitochondrial fusion. *Brain* 131(Pt 2):352-67.

**Zeviani M, Servidei S, Gellera C, Bertini E, DiMauro S, DiDonato S.** 1989. An autosomal dominant disorder with multiple deletions of mitochondrial DNA starting at the D-loop region. *Nature* 339(6222):309-11.

**Zhang Y, Spremulli LL.** 1998. Identification and cloning of human mitochondrial translational release factor 1 and the ribosome recycling factor. *Biochim Biophys Acta* 1443(1-2):245-50.

**Zhang Y, Li N, Caron C, Matthias G, Hess D, Khochbin S, Matthias P.** 2003. HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *EMBO J* 22(5):1168-79.

**Zuchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL, Zappia M, Nelis E, Pafitucci A, Senderek J et al.** 2004. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet* 36(5):449-51.



ANEXO

## PUBLICACIONES QUE FORMAN PARTE DE LA TESIS

**Martín-Jiménez R**, Martín-Hernández E, Cabello A, García-Silva MT, Arenas J, Campos Y. "Clinical and cellular consequences of the mutation m.12300G>A in the mitochondrial tRNA (Leu (CUN)) gene". Mitochondrion. 2011 Nov 7

## OTRAS PUBLICACIONES

Navarro-Sastre A, Martín-Hernández E, Campos Y, Quintana E, Medina E, de Las Heras RS, Lluch M, Muñoz A, del Hoyo P, **Martín R**, Gort L, Briones P, Ribes A. "Lethal hepatopathy and leukodystrophy caused by a novel mutation in MPV17 gene: description of an alternative MPV17 spliced form". Mol Genet Metab. 2008; 94(2):234-239.

Maeso E, Rueda A, Jiménez S, Del Hoyo P, **Martín R**, Cabello A, Mendoza LM, Arenas J, Campos Y. "A novel mutation in the mitochondrial DNA tRNA Leu (UUR) gene associated with late-onset ocular myopathy". Neuromuscular Disorders. 2007. 17 (5):415-418.



## Clinical and cellular consequences of the mutation m.12300G>A in the mitochondrial tRNA<sup>Leu(CUN)</sup> gene

Rebeca Martín-Jiménez<sup>a</sup>, Elena Martín-Hernández<sup>b</sup>, Ana Cabello<sup>c</sup>, María Teresa García-Silva<sup>b</sup>, Joaquín Arenas<sup>d</sup>, Yolanda Campos<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Unidad de Patología Mitocondrial, CNM, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Pediatría, Unidad de Enfermedades Metabólicas Hereditarias y Mitocondriales, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

<sup>c</sup> Departamento de Neuropatología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

<sup>d</sup> Subdirección General para la Evaluación y Promoción de la Investigación, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 13 April 2011

Received in revised form 27 October 2011

Accepted 28 October 2011

Available online 7 November 2011

#### Keywords:

Mitochondrial disease

Mitochondrial DNA tRNA<sup>Leu(CUN)</sup> gene

Cybrid

ATP

Mitochondrial membrane potential

Reactive oxygen species

### ABSTRACT

We report, for the first time, a patient with an overlap MERRF–NARP syndrome who carries the mutation m.12300G>A in the mitochondrial tRNA<sup>Leu(CUN)</sup> gene. The mutation was heteroplasmic and more abundant in her muscle and fibroblast than in blood from her oligosymptomatic mother. Single muscle fiber analysis revealed that the proportion of mutant mtDNA in ragged red fibers was higher than that in normal fibers. Combined defects of mitochondrial respiratory chain complexes were detected in muscle, fibroblasts and transmittochondrial hybrid cells. Significant reduction of total ATP and mitochondrial membrane potential and an increased production of reactive oxygen species were observed.

© 2011 Elsevier B.V. and Mitochondria Research Society. All rights reserved.

## 1. Introduction

Until now, more than 200 mitochondrial DNA (mtDNA) mutations have been described, including large mtDNA rearrangements and point mutations in mitochondrial transfer RNAs (mt-tRNA), ribosomal RNAs, and protein-coding genes (Schon et al., 2010). However, anticodon mutations are rarely found; to date only three of them have been described in association with mitochondrial disorders (Mancuso et al., 2004; Moraes et al., 1993; Sacconi et al., 2008).

One of the most frequently detected point mutation in mtDNA is the transition m.3243A>G in the mt-tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> (*MT-TL1*) gene. Cellular phenotypes associated with this and other mitochondrial point mutations have been studied in cytoplasmic hybrids, cellular models in which patient-derived mitochondria have been transferred to ρ<sup>0</sup> cells (Bentlage and Attardi, 1996; Schon et al., 1992). El Meziane and coworkers found in cybrids containing high levels of mutated mtDNA for the m.3243A>G transition some sub-clones that exhibited

normal mitochondrial respiratory metabolism (El Meziane et al., 1998a). Sequencing analysis showed that such cells were heteroplasmic (10% of mutated mtDNA) for a novel m.12300G>A mutation in the mt-tRNA<sup>Leu(CUN)</sup> (*MT-TL2*) gene. This transition introduced a change in the mt-tRNA anticodon, transforming it from UAG to UAA, which corresponds to the mt-tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>, providing a compelling logical explanation for the restoration of phenotype. This was the first report of a tRNA suppressor mutation in human cells.

Here, we describe a girl with a severe mitochondrial encephalomyopathy carrying high levels of the m.12300G>A point mutation in muscle and fibroblasts. Her mother, with partial sensorineural hearing loss, had low levels of the mutation in blood. We prove that the m.12300G>A point mutation fulfils accepted criteria for pathogenicity by single muscle PCR and by mitochondrial functional studies in muscle, fibroblasts and transmittochondrial hybrid cells.

## 2. Material and methods

### 2.1. Case report

The patient was the second daughter of unrelated parents. In the pregnancy a mild polyhydramnios was observed. Developmental milestones were normal and she was well until the age of 4 years, when she presented progressive sensorineural hearing loss that evolved to deafness in the next year. At 6 years old she received a

\* Corresponding author at: Unidad de Patología Mitocondrial, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III; Ctra. Majadahonda a Pozuelo Km 2, 28220 Madrid, Spain. Tel.: +34 918 223 264; fax: +34 918 223 269.

E-mail addresses: [rmartin@isciii.es](mailto:rmartin@isciii.es) (R. Martín-Jiménez), [emartin@salud.madrid.org](mailto:emartin@salud.madrid.org) (E. Martín-Hernández), [acabello@salud.madrid.org](mailto:acabello@salud.madrid.org) (A. Cabello), [mgarcias@salud.madrid.org](mailto:mgarcias@salud.madrid.org) (M.T. García-Silva), [jarenas@isciii.es](mailto:jarenas@isciii.es) (J. Arenas), [ycampos@isciii.es](mailto:ycampos@isciii.es) (Y. Campos).

cochlear implant. In the following months she developed cerebellar syndrome and myoclonus epilepsy with no response to the antiepileptic treatment. In addition she presented a deterioration of psychomotor performances. At that time pigmentary retinopathy and visual loss were documented. The EEG showed diffuse slow spike and wave pattern. The computed tomography brain scanning showed bilateral calcifications of basal ganglia, particularly in lenticular nucleus.

At 8 years old she was referred to our hospital for further evaluation. On neurological examination she had generalized hypotonia, inexpressive face and muscle weakness; she was unable to get up from a lying position. She showed dysarthria, bilateral dysmetria and ataxic gait. In addition, she presented intentional tremor in upper extremities and multiple multifocal myoclonia. Deep tendon reflexes were normal. She could read and resolve elemental problems. Cardiac studies were normal. Ophthalmologic evaluation showed no ptosis, normal extrinsic ocular motility and retinitis pigmentosa. The visual acuity was 0.3 in both eyes. Routine biochemical investigations revealed normal results, including creatine kinase, but she had hyperlactatemia (5.2 mmol/l) and hyperketonemia.

Her mother showed partial sensorineural hearing loss and her older sister had celiac disease. Neurological, ophthalmologic and biochemical investigations were normal in both cases.

## 2.2. Histopathological and biochemical studies in muscle biopsy

Cross-frozen sections of skeletal muscle from patient's biopsy were stained for cytochrome c oxidase (COX) and succinate dehydrogenase (SDH) activities as described (Sciaccio and Bonilla, 1996).

Mitochondrial respiratory chain enzyme activities were determined in muscle homogenate as described (Tiranti et al., 1995) and referred to that of citrate synthase (CS) to correct for mitochondrial volume.

## 2.3. Molecular genetic studies

Total DNA was isolated from frozen muscle by standard methods. DNA from fibroblasts and cybrids was extracted with the QIAmp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). Southern blot analysis was used to exclude the presence of large-scale rearrangements (Campos et al., 1996) and real-time PCR analysis to detect mtDNA depletion (Navarro-Sastre et al., 2008).

The complete mtDNA was amplified in overlapping fragments, by using a set of specific primers designed in accordance to the revised human mitochondrial DNA Cambridge reference sequence. PCR products were sequenced in an Applied Biosystems 3730xl DNA Analyser with the BigDye Terminator v3.1 Cycle DNA Sequencing Kit (Applied Biosystems, Bedford, U.S.A.).

To screen for the m.12300G>A mutation in muscle and fibroblasts from the patient and blood from the mother we used primers corresponding to mitochondrial DNA sequence HmtL12106 (CAACCCCGA-CATCATTACCGGT) and HmtH 12413 (GGGTAAACGAGGTGGTAAGG) to PCR-amplify a 307 base pairs (bps) fragment. PCR conditions were 94 °C for 5 min, 30 cycles of 94 °C 1 min, 60 °C 1 min and 72 °C 1 min, and a final extension step of 72 °C for 10 min. Digestion with the endonuclease HaeIII cleaves the amplified product into two fragment sized 194 and 113 bps in wild-type mtDNA but not in mutant genomes.

Muscular fibers were isolated from 30- $\mu$ m-thick cryostat cross section after combined SDH-COX staining. Selected normal and COX negative ragged-red fibers were processed as reported (Moraes et al., 1992) and subjected to PCR-RFLP analysis. To quantify the proportion of mutant mtDNA, 0.5  $\mu$ l of  $\alpha$ - $P^{32}$  dATP (10 mCi/ml) was added in the last PCR cycle. A fragment of 534 bps was obtained by using HmtL12106 as forward primer and HmtH 12640 (CTATGATGGAC-CATGTAACGAACAA) as reverse primer. The amplified product was digested with HaeIII, yielding two fragment sized 340 and 194 bps in wild-type mtDNA but not in mutant molecules. Products were

run through a 10% nondenaturing polyacrylamide gel, subjected to autoradiography and quantified with a Bio-Rad Gel-Doc image analysis system and the QuantityOne software (Bio-Rad, Hercules, U.S.A.).

## 2.4. Biochemical studies of primary cultures and transmitochondrial cell lines

Fibroblast cultures were established from skin biopsies of controls and the proposita. Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.), with 1 g/l of glucose, supplemented with L-glutamine (4 mM), 10% heat-inactivated fetal calf serum, 100 IU/ml penicillin and 100 IU/ml streptomycin, in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C.

To confirm the pathogenic role of the m.12300G>A mutation, we generated transmitochondrial cybrids by fusing fibroblasts of the patient with the human mtDNA-depleted 143B206 cell line (King and Attardi, 1989). Ten clones were selected from a uridine-lacking medium and their mutational load was checked.

Activities of respiratory chain complexes in fibroblasts and cybrids were done as reported with modifications. Briefly, trypsinized fibroblasts were resuspended in hypotonic medium (20 mM KP, pH 7) and sonicated 3 times for 5 s at intervals of 15 s in each cycle. Cybrids were resuspended in buffer A (75 mM sucrose, 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 40 mM KCl, 0.5 mM EDTA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 30 mM Tris-HCl, pH 7.4) and supplemented with digitonin (400 mg/5  $\times$  10<sup>6</sup> cells). After 1–2 min, cellular suspension was diluted by adding nine volumes of the same buffer supplemented with 0.3% fatty-acid-free bovine serum albumin and centrifuged; the pellet was resuspended in hypotonic medium (20 mM KP, pH 7), freeze-thawed three times and sonicated as described previously. All enzyme activities were measured at 30 °C, using 0.1–0.3 mg/ml of lysate proteins, in a Thermo Scientific Evolution 300 spectrophotometer. NADH-CoQ oxidoreductase (complex I), Ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase (complex III) and citrate synthase were assayed as described (Maneiro et al., 2005). Succinate dehydrogenase (complex II) and COX (complex IV) activities were determined as published (Seibel et al., 2008). ATP synthase (complex V) activity was done as reported elsewhere (del Hoyo et al., 2006). Total protein concentration was estimated by the method of Lowry (Lowry et al., 1951).

Quantity of total ATP was determined by the ATP Bioluminescence Assay Kit HS II (Roche, Mannheim, Germany) following the manufacturer's instruction. ATP content was analyzed by measuring the luminescence in an Infinite M200 multifunctional microplate reader (TECAN Group, Männedorf, Switzerland).

## 2.5. Mitochondrial membrane potential assay

Mitochondrial membrane potential (MMP) was measured using JC-1 (Molecular Probes, Eugene, U.S.A.). JC-1 exists as a monomer at low values of MMP (green fluorescence) or forms aggregates in the presence of high MMP (red fluorescence). Cells (1  $\times$  10<sup>6</sup>) were resuspended in 1 ml of DMEM without phenol red. They were incubated with JC-1 (4.5  $\mu$ g/ml) for 30 min at 37 °C in the dark. To confirm that the JC-1 probe was responding to changes in MMP, parallel experiment was done by cells' incubation with 50  $\mu$ M CCCP (supplied with the kit) and JC-1. After two washes with DMEM, cells were resuspended in 500  $\mu$ l Phosphate Buffered Saline and immediately analyzed by flow cytometry on a FACScan flow cytometer and the CellQuest Software (Becton-Dickinson, Bedford, U.S.A.). In each experiment at least 10,000 events were collected.

## 2.6. Measurement of reactive oxygen species (ROS)

To assess cellular production of ROS, concentrations of hydrogen peroxide were measured using the Hydrogen Peroxide Fluorometric Detection Kit (Assay Designs, Inc., Ann Arbor, U.S.A.), following the

**Table 1**  
Activities of respiratory chain complexes and total ATP levels in skeletal muscle and fibroblasts.

Sample		CI <sup>a</sup>	CII <sup>a</sup>	CIII <sup>a</sup>	CIV <sup>a</sup>	CV <sup>a</sup>	ATP <sup>b</sup>
Muscle	Patient	8.2 <sup>c</sup>	7.9	20.6 <sup>c</sup>	7.2 <sup>c</sup>	n.d.	n.d.
	Controls (n=100)	20 ± 4.5	10.3 ± 3.5	63 ± 18	42 ± 12	n.d.	n.d.
Fibroblast	Patient (n=3)	32.7 ± 6.8	15.3 ± 2.5	13.4 ± 5.2 <sup>c</sup>	11.5 ± 3.4 <sup>c</sup>	71.7 ± 7.6	20 ± 1.2 <sup>d</sup>
	Controls (n=15)	36.9 ± 14	13.6 ± 2.7	45.8 ± 9.9	41.9 ± 10	60.6 ± 15.6	35.5 ± 7.3

<sup>a</sup> CI = respiratory chain complex I; CII = complex II; CIII = complex III; CIV = complex IV; CV = complex V; n.d. = not determined. Values are presented as mean ± SD. Muscle enzyme activities (nmol/min/mg protein) are referred as percentage of citrate synthase activity. Mitochondrial respiratory chain complex activities in fibroblasts are expressed as nmol/min/mg of protein.  
<sup>b</sup> ATP levels are expressed as nmol of total ATP/mg protein.  
<sup>c</sup> p < 0.01 (Mann–Whitney U test).  
<sup>d</sup> p = 0.012.

manufacturer's instructions. The fluorescence was measured in an Infinite M200 microplate reader (TECAN) with an excitation wavelength of 570 nm and an emission wavelength of 600 nm.

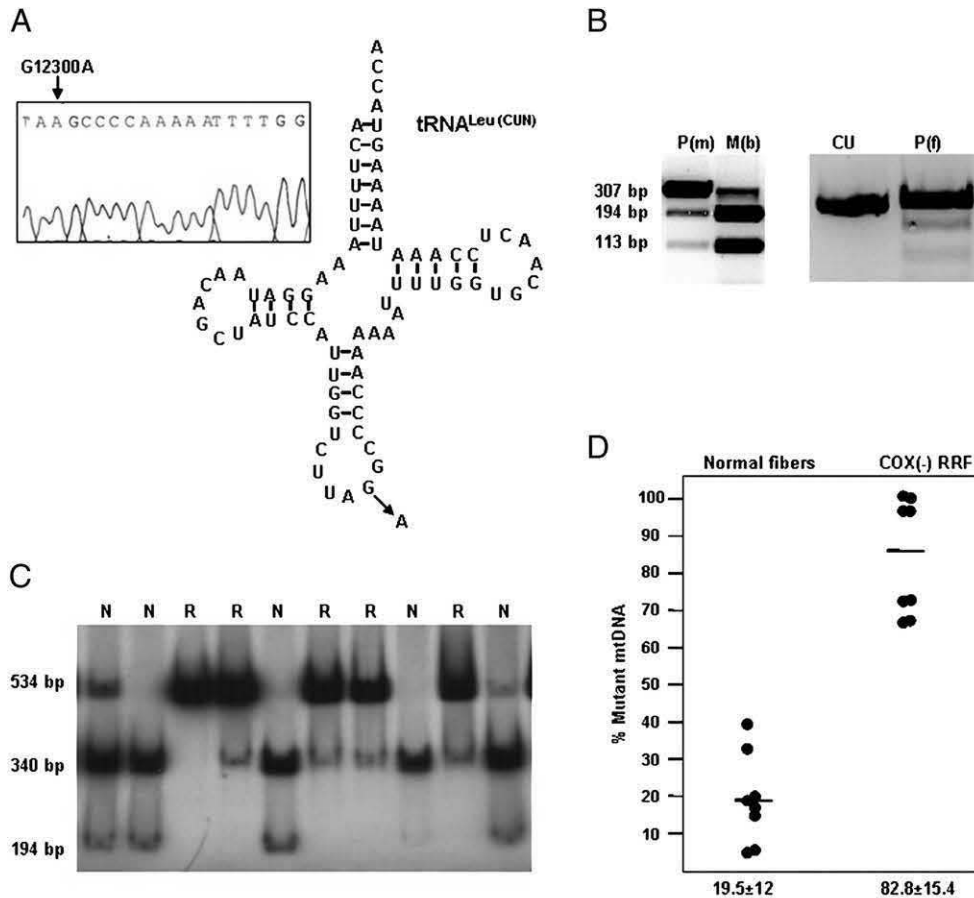
2.7. Statistical analysis

Data are presented as means ± standard deviation (SD). The Mann–Whitney U-test was used for statistical comparisons. A p-value of <0.05 was considered to indicate statistical significance.

3. Results

Histochemical analysis of the muscle biopsy showed the presence of abundant COX-negative RRFs (12.5%). Enzymatic measurement of the respiratory chain complex activities revealed a combined defect of complexes I, III and IV in muscle and III and IV in fibroblasts (Table 1).

Because mitochondrial proliferation with RRF is usually found in patients with deletions, depletion or point mutations in tRNA genes (DiMauro, 2006) we excluded large-scale rearrangements,



**Fig. 1.** Electropherogram of the detected mutation in the *MT-TL2* gene and PCR-RFLP analysis. (A) mtDNA sequence of the patient showing the m.12300G>A mutation and the structure of the mitochondrial tRNA<sup>Leu(CUU)</sup> with the mutated site indicated. (B) \*PCR-RFLP analysis of mtDNA heteroplasmy in patient's muscle: P(m), mother's blood; M(b), patient's fibroblasts; P(f) and uncut control: CU. Products of the enzymatic digestion were run in a 2% agarose gel and stained with ethidium bromide. (C) \*Autoradiography showing the single muscle fiber analysis. Products of the digestion were separated in a 10% nondenaturing polyacrylamide gel. The undigested product (mutant DNA molecules) was significantly higher in ragged-red fibers (R) than in normal fibers (N). (D) Percentage of mutant mtDNA (mean ± SD) in normal fibers and in COX negative ragged-red fibers (COX (-) RRF). Mean value of mutant genomes is indicated by a horizontal bar.\* Two different sets of primers were used to amplify surrounding region of the mutation (see Molecular genetic studies section).



mitochondrial DNA depletion or any of the most commonly encountered pathogenic mtDNA point mutations in muscle's mtDNA from the proband. Direct sequencing of mtDNA revealed the presence of the m.12300G>A point mutation in the *MT-TL2* gene (Fig. 1A). A PCR-RFLP assay was designed to verify independently the presence of the mutation and to measure the relative proportions of mutant and wild-type genomes in different tissues. Quantitative analysis showed that the mutation was heteroplasmic in muscle (84%) and fibroblasts (89%) from the patient, and was present in her mother's blood (15%) (Fig. 1B). The mutation was not present in 30 patients with other mitochondrial diseases, with or without known point mutation, and in 80 normal controls.

To assess the phenotype–genotype correlation between muscle histochemistry and levels of heteroplasmy, we studied the distribution of mutation in individual muscular fibers by single-fiber PCR-RFLP method. The analysis showed that the mutant load in COX-negative RRF (n=8;  $82.8 \pm 15.4$ ) was significantly higher than in normal fibers (n=8;  $19.5 \pm 12$ ) ( $p < 0.001$ ) (Fig. 1C, D).

To determine whether the decrease of complexes III and IV activities in fibroblasts from the patient affects the mitochondrial energization, we measured the mitochondrial membrane potential with the potential sensitive probe JC-1. We observed that the MMP (red/green ratio) was reduced to 60% in patient's fibroblasts when compared to control cells (Fig. 2A;  $1.7 \pm 0.5$  vs  $2.8 \pm 0.35$ ;  $p < 0.01$ ). We also found that the percentage of cells without MMP was significantly higher than in controls (Fig. 2B;  $41.1 \pm 14$  vs  $9 \pm 5$ ;  $p < 0.01$ ). These data were obtained after detecting the regions occupied by cells with or without MMP through the use of the uncoupling agent CCCP (Fig. 2C). Total ATP levels in fibroblasts from the patient were also

significantly decreased ( $p = 0.012$ ) (Table 1). Reactive oxygen species production, determined by quantification of hydrogen peroxide production by the cells, showed that fibroblasts with the mutation m.12300G>A had a significant increase of  $H_2O_2$  when compared with control cells (Fig. 3A;  $6.94 \pm 0.54$  vs  $5.71 \pm 0.18$ ;  $p < 0.01$ ).

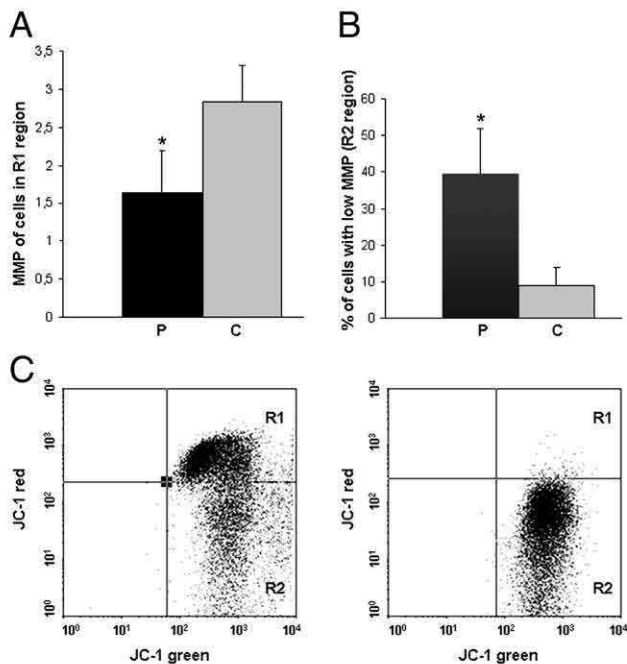
To confirm the pathogenic role of the m.12300G>A mutation, we generated trans-mitochondrial cybrids by fusing fibroblasts of the patient with the human mtDNA-depleted 143B206 cell line. We selected and analyzed the mutation load in 10 clones; five of them were homoplasmic for the mutation and the others had different levels of heteroplasmy (78%, 74%, 50%, 33%, 3%). Following ten days of culture we checked again the percentage of mutant mtDNA. We observed that PCR amplification was not efficient in 2 of 5 heteroplasmic clones (those with 50 and 40% of mutated mtDNA). Because it has been described the existence of transient mitochondrial transformed cells in the cybridization process (Vergani et al., 1999) we measured levels of mtDNA by quantitative PCR and detected no mtDNA in such clones. Moreover, a clone with 78% of mutated mtDNA at initial moment changed its mutant load to 60% at day 10, to 50% at day 15 and so on until wild-type genotype was reached at day 60. Other clone with starting mutant load of 74% evolved to 100% mutant genotype at day 45. For this reason, we decided to select for functional studies three clones: C1 (100% mutant), C2 (pool of two clones, with 50% and 33% of mutant load) and C3 (78% mutant) and to compare them with the parental line 143B. Mitochondrial respiratory chain analysis showed a defect of complexes I, III, IV and V in clone 1 and no significant differences between clones C2 and C3 or with the parental 143B line (Table 2). Total ATP levels were not significantly reduced in clones C2 and C3, but clone 1 had a significant reduction ( $p < 0.001$ ) when compared with heteroplasmic or 143B lines (Table 2). Mitochondrial membrane potential confirmed the respiratory chain dysfunction because it was significantly reduced in cybrids with 100% mutated mtDNA (Table 2;  $p < 0.01$ ). Moreover, the hydrogen peroxide generated was higher in C1 clone when compared with 143B cells or cybrids with less than 50% of mutated mtDNA (Fig. 3B;  $1.9 \pm 0.2$  vs  $1.58 \pm 0.17$  or  $1.45 \pm 0.16$ ;  $p < 0.01$ ).

#### 4. Discussion

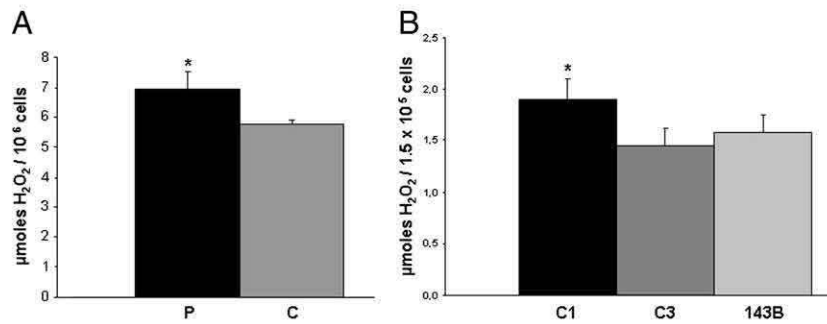
The patient showed a progressive syndrome highly reminiscent of a mitochondrial disorder (Bernier et al., 2002). It included hypotonia, hearing loss, ataxia, myoclonus epilepsy, bilateral calcification of basal ganglia, pigmentary retinopathy and lactic acidosis. Muscle biopsy showed abundant RRF and biochemical analysis of the respiratory chain revealed a combined defect of complexes I, III and IV.

After excluding most of known mitochondrial DNA mutations and to sequence all 22 mt-tRNA genes, we detected the mutation m.12300G>A in the *MT-TL2* gene. This transition was heteroplasmic in muscle and fibroblasts from the patient and significantly more abundant than in her oligosymptomatic mother's blood. The mutation was not present in controls or in patients with other known mitochondrial point mutations. In addition, we found a correlation between the mutation load and the histochemical alteration in muscular fibers, a strong marker of pathogenicity.

Enzymatic study of mitochondrial respiratory chain in fibroblasts from the patient showed a combined defect of complexes III and IV. We performed additional functional studies in order to characterize the impact of the mutation in mitochondrial metabolism. We detected a significant reduction of total ATP and the MMP, and an increased ROS production when compared with control cells. These results are similar to those observed in other studies in fibroblasts containing mt-tRNA mutations, where there is a decrease in ATP content and a parallel reduction in mitochondrial membrane potential when they are exposed to high energy demand (James et al., 1999). In our case, fibroblast were not subjected to high energy demand but showed a reduction of 57% of total ATP when they were grown



**Fig. 2.** Detection of mitochondrial membrane potential (MMP) with the JC-1 fluorophore by flow cytometry. (A) Histogram showing the MMP from the patient (P) and control fibroblasts (C). Photomultiplier settings were adjusted to detect JC-1 monomeric fluorescence signals on the FL1 detector (green fluorescence) and JC-1 aggregate fluorescence signals on the FL2 detector (red fluorescence). Data are presented as mean  $\pm$  SD of the red/green fluorescence ratio from cells include in R1 region (n=4 duplicated measurements from patient's fibroblasts and n=14 duplicated measurements from control cells). (B) Percentage of cells without MMP. (C) The dot plots show representative data from the patient's fibroblasts illustrating the method to detect R1 and R2 region. Left panel shows flow cytometry analysis after incubate cells with JC-1, as described in the Material and methods section. Right panel shows fluorescence acquisition after the addition of the uncoupler agent CCCP, which allow us to distinguish between cells with high red and low green fluorescence (R1) or with low red and high green fluorescence (R2). \* $p < 0.01$  (Mann–Whitney U test).



**Fig. 3.** Reactive oxygen species (ROS) in fibroblasts, cybrids and the 143B cell line. (A) ROS, expressed as the µmol of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced per 10<sup>6</sup> cells, in patient's fibroblasts (P) and control cells (C). Data are presented as mean ± SD of patient cells (n = 6) and control cells (n = 7). (B) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced per 1.5 × 10<sup>5</sup> cybrids or 143B cells. C1 = cybrid clone with 100% of mutated mtDNA; C2 = cybrid clone with 50% to 33% of mutated mtDNA; 143B = wild type 143B osteosarcoma cell line. Data represent mean values of 6 independent experiments. \*p < 0.01 (Mann–Whitney U test).

in low glucose medium. Probably, the production of glycolytic ATP in fibroblasts with mitochondrial respiratory chain defects is not enough to compensate for the reduced ATP synthesis by the respiratory chain and to mask the low concentration of the substrate. Moreover, we think the growth of fibroblasts in a medium with low glucose concentration may be an effective method for the detection of mitochondrial alterations that are not apparent when there is high availability of glucose. The observed reduction of MMP is in agreement with other studies performed in fibroblasts from patients with mutations in the *MITK* or in *MTND5* genes (Antonická et al., 1999) and it may be a direct consequence of the reduction of ATP levels in cells with impaired respiration (Chalmers-Redman et al., 1999; McKenzie et al., 2007).

Similar results were obtained in cybrid cells. The activities of respiratory chain complexes, total ATP and MMP were reduced in clone C1, with 100% of mutant mtDNA molecules. In parallel, ROS production was increased. However, cells with a mutation load below 78% revealed no mitochondrial alteration. This could be related to the threshold for phenotypic expression in this cellular background, because we detected muscular fibers with phenotype of COX negative-RRF and 65% of mutant mtDNA.

There are few described mutations that affect anticodon mt-tRNAs, presumably because changes in the anticodon nucleotides would result in severe decoding problems and/or aminoacylation defects. The first case described was a patient with a myopathy and the m.15990G>A mutation in the *MT-TP* gene (Moraes et al., 1993). Although the mutation changes the proline tRNA anticodon to the serine 1, probably this mutation may have arisen de novo later in development and may be present only in certain tissues, justifying the mild phenotype of the proposita. In our case the mutation was maternally-inherited, thus presents in the ovum, and therefore may be the cause of involvement of several organs and tissues and of the observed severe clinical phenotype. As it occurs in other mitochondrial point mutation, this mutation appears to behave as a functionally

recessive mutation, because the pathogenic threshold for the mutation in cybrids is above 78% of mutated mtDNA molecules. In contrast, the transition m.5545C>T, located in the *MT-TW* gene has been described as a dominant mutation (Sacconi et al., 2008). It affects the central base of the anticodon triplet of mt-tRNA tryptophan and allows it to decode termination signals and probably to recognize codons corresponding to tyrosine, thus increasing its pathogenicity. Finally, the m.661G>A mutation in the *MT-TF* gene was detected in a patient with MERRF syndrome (Mancuso et al., 2004). Our patient has an overlap phenotype between MERRF and NARP syndromes, probably more severe than the former due to the extension of affected tissues and their mtDNA mutational load.

The m.12300G>A transition was first described in cybrids carrying the mutation m.3243A>G in the *MT-TL1* gene. It is located in the anticodon sequence of the tRNA<sup>Leu(CUN)</sup>, changing it from UAG to UAA (El Meziane et al., 1998a). Cybrids with both mutations showed no dysfunction in mitochondrial respiratory metabolism. After that, it has been proved that the so called suppressor mt-tRNA<sup>Leu(CUN)</sup> is efficiently aminoacylated and displays decoding specificity to UUR leucine codons (El Meziane et al., 1998b). Moreover, Kirino and coworkers confirmed the functionality of the suppressor tRNA for decoding UUG codons by acquisition of the wobble modification (Kirino et al., 2006). Although leucine is the most frequent amino acid in proteins codified by mitochondrial DNA, the UUR codons are less frequent than CUN codons (12% versus 88%, respectively) (Wittenhagen and Kelley, 2003). As a result, it is easy to understand the impact that the mutation m.12300G>A may have in the function of mitochondrial respiratory chain.

Until now, no clinical phenotype had been described in relation with this mutation. Our single-fiber PCR study and mitochondrial function analyses in several cell lines confirm that the mutation is pathogenic and is associated with a severe clinical phenotype of multisystemic mitochondrial disorder.

**Table 2**

Activities of respiratory chain complexes, total ATP and MMP in cybrids and the 143B cell line.

		C1	C2	C3	CIV	CV	ATP <sup>a</sup>	MMP <sup>b</sup>
Cybrids	C1 <sup>c</sup>	5.1 ± 1.5 <sup>d</sup>	16.9 ± 6.9	34.3 ± 9.6 <sup>d</sup>	3.5 ± 3.6	36.3 ± 15 <sup>d</sup>	3.8 ± 1.9 <sup>d</sup>	1.6 ± 0.1 <sup>d</sup>
	C2 <sup>c</sup>	11.6 ± 1.6	29 ± 2.1	77.3 ± 24	75.9 ± 2.4	81.3 ± 29.4	26.7 ± 6.4	3.1 ± 0.4
	C3 <sup>c</sup>	11.2 ± 1.7	27 ± 2.8	76 ± 2.9	44.6 ± 1.9	95 ± 20	28.3 ± 4.2	3.5 ± 0.4
143B		15.2 ± 3.9	18.5 ± 9.7	91 ± 17.2	53.8 ± 13.5	80.1 ± 21.9	29.5 ± 2.6	2.8 ± 0.3

p < 0.01 (Mann–Whitney U test).

<sup>a</sup> ATP levels are expressed as nmol of ATP/mg of protein.

<sup>b</sup> Mitochondrial membrane potential (MMP) is presented as the ratio of red/green fluorescence intensity (JC-1 aggregate fluorescence signal/JC-1 monomer fluorescence signal) after exclude cells without MMP.

<sup>c</sup> C1 = cybrid clone with 100% of mutated mtDNA; C2 = cybrid clone with 50% to 33% of mutated mtDNA; C3 = clone with 78% of mutated mtDNA; 143B = wild type 143B osteosarcoma cell line. Mitochondrial respiratory chain complex activities in cybrids are expressed as nmol/min/mg of protein.

<sup>d</sup> Data are presented as mean ± SD of 3 values obtained in three independent experiments for mitochondrial respiratory chain enzyme activities and seven determinations for ATP and MMP.

## Acknowledgments

This work was supported by grants from Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) (PI 06/1030; PS09/2341) and Instituto de Salud Carlos III (UIPY 07/1464), Spanish Ministry of Science and Innovation. R. Martín was supported by grants from FIS (PI 06/1030, PS09/2341). We want to acknowledge the excellent technical assistance of Eva María Fernández, Verónica Merino, Ainhoa Martínez and José Luis Álvarez. We would like to thank Rafael Garesse and Emiliano González-Vioque for their assistance in the generation of cybrid cells.

## References

- Antonická, H., Floryk, D., Klement, P., Stratilová, L., Hermanská, J., Houstková, H., Kalous, M., Drahota, Z., Zeman, J., Houstek, J., 1999. Defective kinetics of cytochrome c oxidase and alteration of mitochondrial membrane potential in fibroblasts and cytoplasmic hybrid cells with the mutation for myoclonus epilepsy with ragged-red fibres ("MERRF") at position 8344 nt. *Biochem. J.* 342 (3), 537–544.
- Bentlage, H.A., Attardi, G., 1996. Relationship of genotype to phenotype in fibroblast-derived trans-mitochondrial cell-lines carrying the 3243-mutation associated with the MELAS encephalomyopathy: shift towards mutant genotype and role of mtDNA copy number. *Hum. Mol. Genet.* 5 (2), 197–205.
- Bernier, F.P., Boneh, A., Dennett, X., Chow, C.W., Cleary, M.A., Thorburn, D.R., 2002. Diagnostic criteria for respiratory chain disorders in adults and children. *Neurology* 59 (9), 1406–1411.
- Campos, Y., Martín, M.A., Navarro, C., Gordo, P., Arenas, J., 1996. Single large mitochondrial DNA deletion in a patient with mitochondrial myopathy associated with multiple symmetric lipomatosis. *Neurology* 47 (4), 1012–1014.
- Chalmers-Redman, R.M., MacLean Fraser, A.D., Carlile, G.W., Pong, A., Tatton, W.G., 1999. Glucose protection from MPP<sup>+</sup>-induced apoptosis depends on mitochondrial membrane potential and ATP synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257 (2), 440–447.
- del Hoyo, P., García-Redondo, A., de Bustos, F., Molina, J.A., Sayed, Y., Alonso-Navarro, H., Caballero, L., Arenas, J., Jiménez-Jiménez, F.J., 2006. Oxidative stress in skin fibroblasts cultures of patients with Huntington's disease. *Neurochem. Res.* 31 (9), 1103–1109.
- DiMauro, S., 2006. Mitochondrial myopathies. *Curr. Opin. Rheumatol.* 18 (6), 636–641.
- El Meziane, A., Lehtinen, S.K., Hance, N., Nijtmans, L.G., Dunbar, D., Holt, I.J., Jacobs, H.T., 1998a. A tRNA suppressor mutation in human mitochondria. *Nat. Genet.* 18 (4), 350–353.
- El Meziane, A., Lehtinen, S., Holt, I.J., Jacobs, H.T., 1998b. Mitochondrial tRNA<sup>Leu</sup> isoforms in lung carcinoma cybrid cells containing the np 3243 mtDNA mutation. *Hum. Mol. Genet.* 7 (13), 2141–2147.
- James, A.M., Sheard, P.W., Wei, Y.H., Murphy, M.P., 1999. Decreased ATP synthesis is phenotypically expressed during increased energy demand in fibroblast containing mitochondrial tRNA mutations. Implications for neurodegenerative and mitochondrial diseases. *Eur. J. Biochem.* 259 (1–2), 462–469.
- King, M.P., Attardi, G., 1989. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* 246 (4929), 500–503.
- Kirino, Y., Yasukawa, T., Marjawaara, S.K., Jacobs, H.T., Holt, I.J., Watanabe, K., Suzuki, T., 2006. Acquisition of the wobble modification in mitochondrial tRNA<sup>Leu(CUN)</sup> bearing the G12300A mutation suppresses the MELAS molecular defect. *Hum. Mol. Genet.* 15 (6), 897–904.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1), 265–275.
- Mancuso, M., Filosto, M., Mootha, V.K., Rocchi, A., Pistolesi, S., Murri, L., Dimauro, S., Siciliano, G., 2004. A novel mitochondrial tRNA<sup>Phe</sup> mutation causes MERRF syndrome. *Neurology* 62 (11), 2119–2121.
- Maneiro, E., López-Armada, M.J., De Andrés, M.C., Caramés, B., Martín, M.A., Bonilla, A., del Hoyo, P., Galdo, F., Arenas, Blanco, F.J., 2005. Effect of nitric oxide on mitochondrial respiratory activity of human articular chondrocytes. *Ann. Rheum. Dis.* 64 (3), 388–395.
- McKenzie, M., Liolitsa, D., Akinshina, N., Campanella, M., Sisodiya, S., Hargreaves, I., Nirmalanathan, N., Sweeney, M.G., Abou-Sleiman, P.M., Wood, N.W., Hanna, M.G., Duchon, M.R., 2007. Mitochondrial ND5 gene variation associated with encephalomyopathy and mitochondrial ATP consumption. *J. Biol. Chem.* 282 (51), 36845–36852.
- Moraes, C.T., Ricci, E., Bonilla, E., DiMauro, S., Schon, E., 1992. The mitochondrial tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> mutation in MELAS: genetic, biochemical and morphological correlations in skeletal muscle. *Am. J. Hum. Genet.* 50 (5), 934–949.
- Moraes, C.T., Ciacci, F., Bonilla, E., Ionasescu, V., Schon, E.A., DiMauro, S., 1993. A mitochondrial tRNA anticodon swap associated with a muscle disease. *Nat. Genet.* 4 (3), 284–288.
- Navarro-Sastre, A., Martín-Hernández, E., Campos, Y., Quintana, E., Medina, E., de las Heras, R.S., Lluch, M., Muñoz, A., del Hoyo, P., Martín, R., Gort, L., Briones, P., Ribes, A., 2008. Lethal hepatopathy and leukodystrophy caused by a novel mutation in MPV17 gene: description of an alternative MPV17 spliced form. *Mol. Genet. Metab.* 94 (2), 234–239.
- Sacconi, S., Salviati, L., Nishigaki, Y., Walker, W.F., Hernandez-Rosa, E., Trevisson, E., Delplace, S., Desnuelle, C., Shanske, S., Hirano, M., Schon, E.A., Bonilla, E., Vivo, D.C., DiMauro, S., Davidson, M.M., 2008. A functionally dominant mitochondrial DNA mutation. *Hum. Mol. Genet.* 17 (12), 1814–1820.
- Schon, E.A., Koga, Y., Davison, M., Moraes, C.T., King, M.P., 1992. The mitochondrial transfer RNA-leu(UUR) mutation in MELAS— a model for pathogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1011 (2), 206–209.
- Schon, E.A., DiMauro, S., Hirano, M., Gilkerson, R.W., 2010. Therapeutic prospects for mitochondrial disease. *Trends Mol. Med.* 16 (1), 268–276.
- Sciaccio, M., Bonilla, E., 1996. Cytochemistry and immunocytochemistry of mitochondria in tissue sections. In: Attardi, G.M., Chomyn, A. (Eds.), *Methods in Enzymology: Mitochondrial Biogenesis and Genetics*. Academic Press, San Diego, pp. 509–521.
- Seibel, P., Di Nunno, C., Kukat, C., Schäfer, I., Del Bo, R., Bordini, A., Comi, G.P., Schön, A., Capuano, F., Latorre, D., Villani, G., 2008. Cosegregation of novel mitochondrial 16S rRNA gene mutations with the age-associated T414G variant in human cybrids. *Nucleic Acids Res.* 36 (18), 5872–5881.
- Tiranti, V., Chariot, P., Carella, A., Toscano, A., Soliveri, P., Girlanda, P., Carrara, F., Fratta, G.M., Reid, F.M., Mariotti, C., Zeviani, M., 1995. Maternally inherited hearing loss, ataxia and myoclonus associated with a novel point mutation in mitochondrial tRNA<sup>Ser(UCN)</sup> gene. *Hum. Mol. Genet.* 4 (8), 1421–1427.
- Vergani, L., Rossi, R., Brierley, C.H., Hanna, M., Holt, I.J., 1999. Introduction of heteroplasmic mitochondrial DNA (mtDNA) from a patient with NARP into two human  $\rho^0$  cell lines is associated either with selection and maintenance of NARP mutant mtDNA or failure to maintain mtDNA. *Hum. Mol. Genet.* 8 (9), 1751–1755.
- Wittenhagen, L.M., Kelley, S.O., 2003. Impact of disease-related mitochondrial mutations on tRNA structure and function. *Trends Biochem. Sci.* 28 (11), 605–611.

## Lethal hepatopathy and leukodystrophy caused by a novel mutation in *MPV17* gene: Description of an alternative *MPV17* spliced form

Aleix Navarro-Sastre<sup>a</sup>, Elena Martín-Hernández<sup>b</sup>, Yolanda Campos<sup>c</sup>, Ester Quintana<sup>a</sup>, Enrique Medina<sup>d</sup>, Rogelio Simón de las Heras<sup>e</sup>, Montserrat Lluch<sup>a</sup>, Alberto Muñoz<sup>f</sup>, Pilar del Hoyo<sup>c</sup>, Rebeca Martín<sup>c</sup>, Laura Gort<sup>a</sup>, Paz Briones<sup>a,g</sup>, Antonia Ribes<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Division of Inborn Errors of Metabolism (IBC), Department of Biochemistry and Molecular Genetics, Hospital Clinic and CIBERER, Edifici Helios III, planta baja, Cl Mejà Lequerica s/n, 08028 Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Mitochondrial and Inherited Metabolic Diseases, Pediatrics Department, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

<sup>c</sup> Centro de Investigación, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

<sup>d</sup> Pediatric Gastroenterology, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

<sup>e</sup> Pediatric Neurology, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

<sup>f</sup> Pediatric Neuroradiology, Department of Radiology, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

<sup>g</sup> CSIC, Barcelona, Spain

Received 10 December 2007; received in revised form 29 January 2008; accepted 29 January 2008

Available online 10 March 2008

### Abstract

It has recently been reported that mutations in *MPV17* gene may be causative of mtDNA depletion syndrome (MDS). Patients with this alteration presented with severe liver failure, hypoglycemia, growth retardation and neurological symptoms during the first year of life. We report on the clinical, biochemical and molecular findings of a patient presenting with lethal hepatopathy, polyneuropathy, neurological regression and leukodystrophy associated with mutations in *MPV17*. Mitochondrial respiratory chain activities were low in liver and within reference values in muscle. However, levels of mtDNA were markedly reduced both in muscle and liver. A novel homozygous mutation in *MPV17*, c.70+5G>A (IVS1+5G>A), was identified. This intronic change causes the full-length cDNA loss, probably due to loss of strength of the splice donor site of exon 1. Western blot analysis, performed in liver homogenates, further corroborates these results as the amount of patient's protein was highly reduced, or almost absent, compared with that of controls. We also identified an additional alternative spliced form in controls and in the patient, due to exon 2 skipping, that has not previously been reported.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** *MPV17* gene; mtDNA depletion; Hepatocerebral; Leukodystrophy; Splicing

Mitochondrial DNA (mtDNA) depletion syndrome (MDS; MIM 251880) is clinically a heterogeneous group of disorders characterized by a severe reduction of mtDNA copy number [1]. Replication and maintenance of mtDNA depend upon numerous nuclear DNA-encoded enzymes and also require a balanced nucleotide pool, which is maintained by either import of cytosolic dNTPs through dedicated transporters, or by dNTP synthesis via the

mitochondria salvage pathway [2]. A defect in one of those factors, resulting in a replication failure or imbalanced pool of nucleotides, leads to severe mtDNA depletion and a decrease in the activity of mtDNA-encoded respiratory chain complexes [3].

In the last years, several genes have been identified as responsible for MDS: the myopathic form, characterized by a severe proximal muscle atrophy and weakness, has been associated with mutations in the mitochondrial thymidine kinase 2 gene (*TK2*; RefSeq NM\_004614, MIM 188250) [4]; the encephalomyopathic form has been associated with mutations in the gene encoding for the  $\beta$  subunit

\* Corresponding author. Fax: +34 93 227 56 68.

E-mail address: [aribes@clinic.ub.es](mailto:aribes@clinic.ub.es) (A. Ribes).

of the ADP-forming succinyl-CoA synthase (*SUCLA2*; RefSeq NM\_003850, MIM 603921) [5]; and MDS causing the hepatocerebral form has been associated with alterations in the genes for mitochondrial deoxyguanosine kinase (*DGUOK*; RefSeq NM\_080915, MIM 601465) [6], DNA polymerase  $\gamma$  (*POLG*; RefSeq NM\_002693, MIM 174763) [7] or *MPV17* (RefSeq NM\_002437, MIM 137960) [8]. However, the number of genes known to cause MDS is still increasing; during the present year three additional associated genes have been reported: *RRM2B* (RefSeq NM\_015713, MIM 604712) [9], *SUCLG1* (RefSeq NM\_003849, MIM 611224) [10] and *PEO1* (RefSeq NM\_021830, MIM 606075) [11,12].

We report here a new patient with MDS caused by a novel pathogenic mutation (IVS1+5G>A) in *MPV17*, and describe an additional alternative spliced form in controls that has not previously been reported.

## Materials and methods

### Patient

The patient was a boy, the first child of healthy consanguineous parents. Pregnancy, delivery and neonatal period were normal. He presented at 2 months of age with vomiting, jaundice, hypertransaminasemia and failure to thrive. Biochemical studies including  $\alpha$ -1-antitripsin, sweat test, metabolism of iron, ammonia, succinylacetone, free- and total-carnitine, acylcarnitines, galactose-1-phosphate, very long chain fatty acids, sterols, lactate and organic acids were all normal. Amino acids were also normal except for an increase of methionine, and the study of serum sialotransferrins showed an increase of the less sialylated bands (corresponding to asialo-, monosialo- and disialo-transferrins), probably secondary to the hepatopathy. Nieman Pick type C was also discarded.

At 13 months of age, he started with hypoglycemia and hepatic insufficiency, apparently triggered by an intercurrent illness. At this age he was admitted to our hospital. Physical examination showed global hypotonia and decreased motility of the lower limbs with absent deep tendon reflexes. Motor and sensitive conduction velocity was 40% of normal values, consistent with polyneuropathy. Due to his clinical condition the psychomotor development was difficult to evaluate, although a mild delay in some acquisitions was noticed. At this time, amino acids, organic acids and bile acids studies showed alterations secondary to hepatic damage. Few days later he underwent emergency liver transplantation. The explanted liver showed micronodular cholestatic cirrhosis with giant-cell transformation and low grade dysplasia. Muscle biopsy showed abundant vacuoles PAS+ and glycogen+ of small to medium size in the muscle fibres. Ultrastructural analysis of liver and muscle was unspecific. Respiratory chain activities in muscle were normal (Table 2). His transplanted liver functioned adequately and he was discharged from hospital at 15 months of age. During the following 3 months clinical evolution was favourable.

At 18 months of age, during the course of gastroenteritis, he was readmitted with lactic acidosis, hyponatremia, hypocalcemia, seizures and encephalopathy. Brain MRI showed leukodystrophy (Fig. 1). Due to these clinical features MDS was suspected, and the muscle biopsy performed at 13 months of age was reanalyzed showing high levels of mtDNA depletion; the depletion was also evident in a frozen sample of the explanted liver (Table 2). Afterwards, the patient presented a multi-systemic affection including psychomotor regression, tubulopathy with loss of sodium, intestinal dysmotility, hypoparathyroidism and pigmentary retinopathy. Apnoeas of central origin were also observed. He died at the age of 22 months.

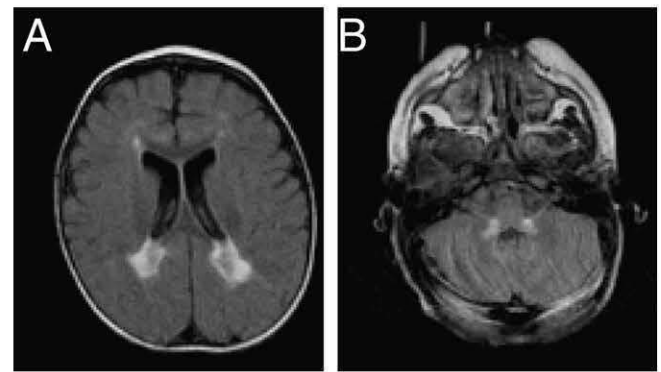


Fig. 1. MR imaging in FLAIR sequence acquisition (10,000/150/80;TR/TI/TE). (A) Axial scan through mid ventricular level shows posterior periventricular deep white matter hyperintense lesions. (B) Axial scan through the lower pons level shows symmetric middle cerebellar peduncles white matter hyperintense lesions.

### Biochemical studies

Urine organic acids were analyzed as TMS-derivatives by gas chromatography mass spectrometry as previously described [13]. Respiratory chain activities were determined on skeletal muscle and liver extracts (800g supernatants) as reported elsewhere [14,15].

### mtDNA studies

Total DNA was isolated from peripheral blood cells using standard protocols. The relative amount of mitochondrial versus nuclear DNA was determined by real-time PCR as described [16], with some modifications. Primer sequences for the mitochondrial (*MT-ND5* gene, 326 bp) and nuclear (*CFTR* gene, 460 bp) fragments were: forward: 5'-AGGCGC-TATCACCACCTCTGTTCG-3', reverse: 5'-AACCTGTGAGGAAAGG-TATTCTG-3' and forward: 5'-AGCAGAGTACCTGAAACAGGAA-3', reverse: 5'-AGCTTACCCATAGAGGAAACATAA-3', respectively. PCR was performed in a 10  $\mu$ l reaction volume containing 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5  $\mu$ M each of the forward and reverse primers, 2  $\mu$ l of DNA and 1  $\mu$ l of master mixture (LightCycler-Fast Start DNA master SYBR Green I; Roche Diagnostics) containing TaqDNA polymerase, deoxynucleotide triphosphates and SYBR Green I. The same DNA dilutions were used for both nuclear DNA (nDNA) and mtDNA calibration curves with a standard DNA. The reaction was conducted as follows: an initial denaturing step at 95 °C for 10 min, followed by 55 cycles at 95 °C for 10 s, 60 °C for 5 s and 72 °C for 18 s, with acquisition mode at segment 3. Samples were analyzed in triplicate, and average mtDNA:nDNA ratio was calculated.

Single or multiple mitochondrial DNA (mtDNA) deletions were excluded by Southern blot analysis as previously described [17].

### MPV17 analysis

Exons and intron boundaries of the *MPV17* gene were PCR-amplified using standard conditions. The PCR program was performed with an initial denaturing step at 96 °C for 5 min, followed by 35 cycles at 96 °C for 30 s and 60 °C for 30 s and a final extension step at 72 °C for 10 min. We used specific primers described elsewhere [8], except for those fragments corresponding to exons 3 4 and 5 6 (Table 1). Fragments were then sequenced.

The analysis of changes in the consensus sequence in healthy controls was carried out by SSCP (Single Chain Conformational Polymorphism) technique.

Cultured skin fibroblasts were treated with a solution containing cycloheximide (CHX), which is an inhibitor of RNA degradation by nonsense-mediated decay (NMD) [18]. The reagent was diluted to a final concentra-

Table 1  
Primers used to amplify the whole coding sequence of *MPV17*, as well as for RT-PCR

Amplified fragment	Length	Forward primer	Reverse primer
Exon 1*	248 bp	5'-tgcccccttaagtcaattg	5'-cttccaaatcagctgcc
Exon 2*	248 bp	5'-aatggcagccccatcccagga	5'-gtccaagggaagccaaagga
Exon 3–4	480 bp	5'-tgccacttcccctattctga	5'-acctgcacttaccctttt
Exon 5–6	568 bp	5'-agggttatggcgaggaatgt	5'-tccgtttgggggtctaag
Exon 7*	628 bp	5'-gccatttcattgctccat	5'-ctctagaaatgactccce
cDNA**	490 bp	5'-ctcttggcttgacaggaagc	5'-acggccaacctgtaataag

\* Reported by Spinazzola et al. [8].

\*\* The cDNA fragment encompasses from the 5' UTR to the beginning of exon 7.

tion of 500 µg/ml in DMEM medium containing 10% bovine fetal serum, penicillin and streptomycin. After 7 h of incubation, fibroblasts were harvested after trypsin treatment and total RNA extraction was carried out by standard procedures; cDNA was obtained in a modified two-step protocol, first-strand synthesis was performed using oligo-d(T)<sub>18</sub> primers and MMLV-RT Plus retrotranscriptase (Epicentre, Madison, USA). The first-strand PCR programme consisted of one-step at 41 °C for 30 min, then we added the specific primers (Table 1) and MasterAmp TAQurate DNA Polymerase (Epicentre, Madison, USA) to the whole first-strand reaction. The second-strand PCR program was performed with an initial denaturation step at 96 °C for 1 min, followed by 35 cycles at 96 °C for 30 s, 55 °C for 30 s and 72 °C for 45 s, with a final extension step at 72 °C for 10 min.

#### Western blot

One hundred micrograms of liver extract (800g supernatants) were separated in a 15% SDS polyacrylamide gel. The samples were then transferred to nitrocellulose membranes, incubated with the primary rabbit MPV17 antibody (Proteintech, Chicago, USA) and finally detected with OPTI-4CN Detection Kit (Bio-Rad Laboratories, Italy).

#### Splicing software

To clarify the potential significance of splicing mutation we used the Splice Site Score Calculator ([www.rulai.cshl.edu/new\\_alt\\_exon\\_db2/HTLM/score.html](http://www.rulai.cshl.edu/new_alt_exon_db2/HTLM/score.html)) and splice-prediction programs as Splice Site Finder ([www.violin.genet.sickkids.on.ca/~ali/splicesitefinder.html](http://www.violin.genet.sickkids.on.ca/~ali/splicesitefinder.html)), NetGene2 ([www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/)) and BDGP Splice Site Prediction ([www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)).

## Results and discussion

### Clinical features

There are few reports describing patients associated with alterations in *MPV17*, and only seven different mutations have been reported [8,19,20]. The first patients presented with lethal early-onset hepatopathy, but liver transplantation in one child and dietary control in another led them to long survival [8]. Nevertheless, one of them had delayed growth and the other developed multiple brain lesions, progressive spino-cerebellar ataxia, myoclonus of hands and feet, mental retardation and severe neurogenic kyphoscoliosis. The other report [19] showed that homozygosity for mutation p.R50Q in *MPV17* was the cause of Navajo Neurohepatopathy (NNH; MIM 256810) presenting three different phenotypes: infantile, childhood and classic

forms. The infantile and childhood forms are dominated by severe hepatopathy and early death, while the classic form is characterized by moderate liver dysfunction and progressive neuropathy. As they all presented the same mutation, the genotype is not able to predict the phenotype, which suggests that other factors may contribute to the severity of the disease. Four patients carrying mutations in *MPV17* have recently been described [20] and, like the first cases [8], all presented with progressive liver failure during infancy. It is important to remark that two of the four cases presented with isolated liver failure without noticeable neurologic dysfunction, although neurological deterioration would likely have occurred if these patients had survived through infancy [20].

The most significant clinical features of our patient were severe hepatopathy, polyneuropathy and neurological regression with leukodystrophy (Fig. 1A and B). In addition, other characteristic symptoms of mitochondrial diseases such as hypoparathyroidism, tubulopathy, intestinal dysmotility and pigmentary retinopathy, were also present, and were not described in the other reported patients [8,19,20].

### Biochemical data

When our patient was first studied, the normal levels of urine and plasma lactate as well as the normal respiratory chain activities in muscle were not suggestive of MDS (Table 2). However, the clinical evolution as well as the biochemical data, including increased plasma lactate at 18 months of age, prompted us to perform mtDNA depletion studies that led us to demonstrate a marked reduction of mtDNA both in muscle and liver (Table 2). The decreased mtDNA content versus normal respiratory chain activities in the same muscle biopsy is surprising and difficult to explain, but similar results have also been found by other authors [20,21]. Respiratory chain activities in liver were low, including complex II activity (Table 2) that should be normal, because its subunits are exclusively encoded by nuclear DNA. Such multiple deficiencies have also been observed in other patients with MDS, suggesting that primary mtDNA depletion may secondarily trigger complex II deficiency [21]. Therefore, muscle respiratory chain investigations are not always useful for the diagnosis

Table 2  
mtDNA depletion and respiratory chain activities in liver and muscle homogenates

	CI + III	CI	CII + CIII	CII	SDH	CIII	CIV	% mtDNA
<i>Liver</i>								
Patient	480		46	154	460		233	20
Parallel control	1726		102	815	1438		981	100
<i>Muscle</i>								
Patient	32	22	8		12	75	50	20
Control mean (SD) $n = 100$	24 (6)	20 (4.5)	9.2 (5.8)		10.3 (3.5)	63 (18)	42 (12)	100

Respiratory chain activities are referred to citrate synthase (mUnits/Unit CS). CI + III, rotenone-sensitive NADH-cytochrome *c* reductase; CI, NADH-decylubiquinone reductase; CII + CIII, succinate cytochrome *c* reductase; CII, succinate-dichlorophenol indophenol reductase; SDH, succinate dehydrogenase; CIII, decylubiquinol-cytochrome *c* reductase; CIV, cytochrome *c* oxidase (COX); mtDNA quantification is reported as % of the control mean.

of the hepatocerebral forms of MDS and liver biopsy may be necessary; alternatively, direct mutational study of the known associated genes could be useful in the identification of the disease.

#### Molecular and protein studies

Analysis of the genes involved in the hepatocerebral form of MDS, showed no alterations in *DGUOK* or *POLG*, while a homozygous transition in *MPV17* gene in position +5 in intron 1, c.70+5G>A (IVS1+5G>A) was found (Fig. 2). No other mutations within the coding sequence or within the flanking intronic sequences of *MPV17* were identified. The parents were heterozygous, and none of

100 control alleles carried the alteration, suggesting it could be a disease-causing variant.

To know the possible effect of the c.70+5G>A change on the protein, we analyzed the cDNA. After RT-PCR, controls showed the expected 490 bp fragment, but also an additional band of 374 bp (Fig. 3A). Subsequent sequencing of these two fragments demonstrated the normal product (490 bp) and an alternative spliced product due to exon 2 skipping (374 bp) (Fig. 3B). This alternative spliced fragment was seen as a minor form, but was always present in controls. We also observed a third band immediately below the full-length cDNA that was the result of heteroduplex formation between wild-type *MPV17* and exon 2 skipped fragments (Fig. 3A). *MPV17* cDNA of the patient showed only the fragment corresponding to this minor form, and the whole coding *MPV17* fragment was absent, while *GCDH* (glutaryl-CoA dehydrogenase gene) cDNA, used as control for RNA extraction and cDNA synthesis, was successfully amplified (Fig. 4A).

The Splice Site Score Calculator gave a 10.2 score to the donor splice site of intron 1 in the wild-type *MPV17* sequence, while when the c.70+5G>A change was introduced the calculator gave a score of 6.7. Maximum score is 12.6 and average score for constitutive exons is 8.1. When the molecular change was introduced in the sequence and was loaded on the three different splice site prediction programs, all of them predicted that the *MPV17* gene would completely lose the constitutive intron 1 donor splice site. In fact, the absence of the full-length transcript in the patient was in agreement with the prediction and the loss of intron 1 donor splice site probably causes the addition of part of intron 1. Taking into account that there is an in-frame TGA-stop codon after eight “intronic codons”, it would probably result in a truncated *MPV17* protein of about 31 amino acids. However, despite we performed the cDNA analysis in CHX treated fibroblast (Fig. 4B) we could not demonstrate the presence of such mRNA species. Therefore, the hypothetical aberrant transcript was probably degraded by a mechanism other than NMD.

The alternative *MPV17* mRNA is not degraded via NMD (Fig. 4B), maybe because the premature stop codon

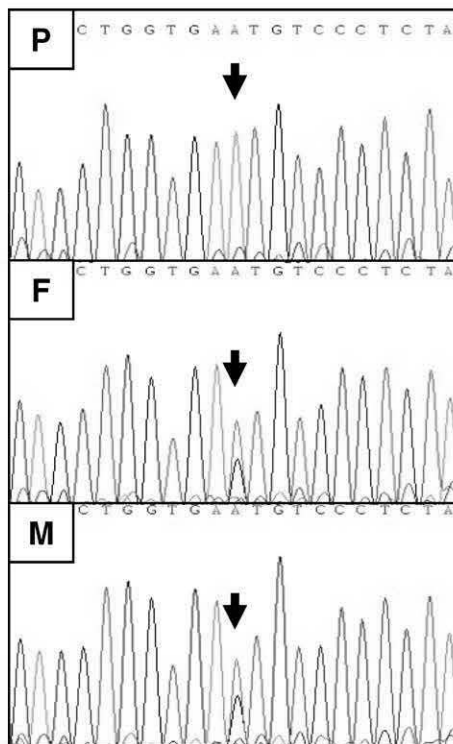


Fig. 2. Mutation analysis of *MPV17* showing the homozygous c.70+5G>A mutation in the patient (P), and the heterozygosity of his father (F) and mother (M).

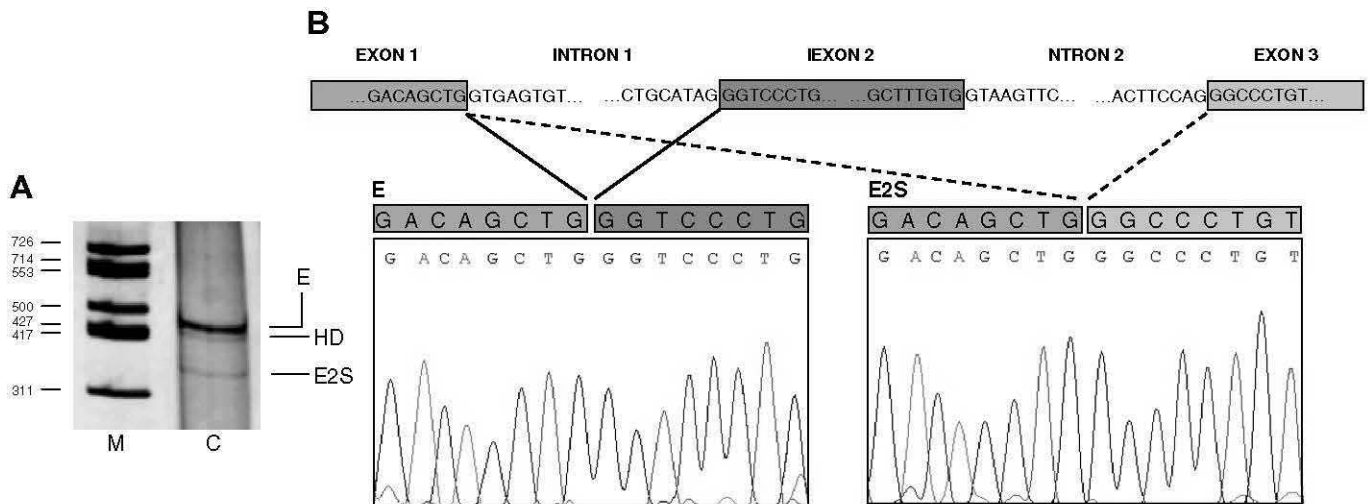


Fig. 3. (A) RT-PCR of control sample using specific primers in 12% polyacrylamide gel. (B) Direct sequences of extracted polyacrylamide gel bands showing exon skipping of exon 2. E, expected RT-PCR fragment of *MPV17* gene; HD, heteroduplex; E2S, exon 2 skipped fragment; C, control; M, molecular weight marker (expressed in bp).

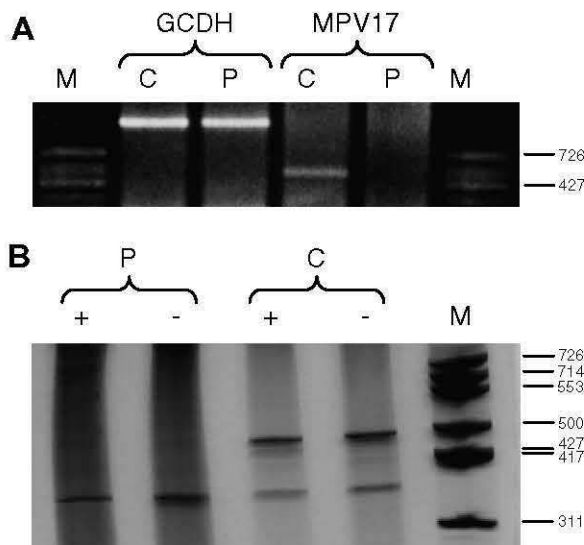


Fig. 4. (A) Agarose gel of *GCDH* and *MPV17* cDNA of the patient and control. (B) Polyacrylamide gel of cDNA amplified fragment in CHX treated (+) and nontreated (-) fibroblasts of patient (P) and control (C). M, molecular weight marker (expressed in bp).

does not follow the 55 bp-NMD rule [22,23]. Theoretically, the change c.70+5G>A would affect both spliced transcripts, but the reason or the mechanism to explain the presence of the alternative spliced form in the patient remains to be elucidated.

Western blot analysis, performed in liver homogenates, further corroborates previous molecular results. In fact, the amount of patient's protein is highly reduced, or almost absent, compared with that of controls (Fig. 5).

We conclude that, analysis of *MPV17* should be included in the differential diagnosis of patients with MDS presenting particular neurological symptoms, such as those reported in our patient. The knowledge of the

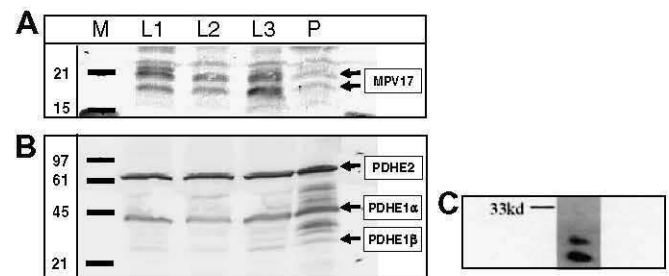


Fig. 5. *MPV17* Western blot. (A) One hundred micrograms of mitochondrial enriched preparation from liver in 15% SDS polyacrylamide gel. (B) The same Western blot stripped and blotted again with PDH antibody. (C) *MPV17* antibody signal in a mouse heart lysate (provided by Proteintech, Chicago). L1/2/3, hepatic samples of controls; P, hepatic sample of the patient; M, protein weight marker (expressed in kDa).

*MPV17* genotype is the only tool to perform further prenatal diagnosis in these families.

## Acknowledgments

The excellent technical assistance of Patricia Alcalá, Sonia Moliner and Lotti Ogg is acknowledged. Supported by Grants from Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) Nos. 03/0283, 06/1030 and 04/1351. Ministerio de Sanidad, Spain. Y. Campos is the recipient of a fellowship by the Programa de Estabilización de Investigadores del Sistema Nacional de Salud from Instituto de Salud Carlos III and Comunidad de Madrid (Fundación para la Investigación Biomédica, Hospital 12 de Octubre).

## References

- [1] M. Hirano, T.H. Vu, Defects of intergenomic communication: where do we stand? *Brain Pathol.* 10 (2000) 451–461.



- [2] C.K. Mathews, S. Song, Maintaining precursor pools for mitochondrial DNA replication, *FASEB J.* 21 (2007) 2294–2303.
- [3] S. DiMauro, E.A. Schon, Mitochondrial respiratory-chain diseases, *N. Engl. J. Med.* 348 (2003) 2656–2668.
- [4] A. Saada, A. Shaag, H. Mandel, Y. Nevo, S. Eriksson, O. Elpeleg, Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy, *Nat. Genet.* 29 (2001) 342–344.
- [5] O. Elpeleg, C. Miller, E. Hershkovitz, M. Bitner-Glindzicz, G. Bondi-Rubinstein, S. Rahman, A. Pagnamenta, S. Eshhar, A. Saada, Deficiency of the ADP-forming succinyl-CoA synthase activity is associated with encephalomyopathy and mitochondrial DNA depletion, *Am. J. Hum. Genet.* 76 (2005) 1081–1086.
- [6] H. Mandel, R. Szargel, V. Labay, O. Elpeleg, A. Saada, A. Shalata, Y. Anbinder, D. Berkowitz, C. Hartman, M. Barak, S. Eriksson, N. Cohen, The deoxyguanosine kinase gene is mutated in individuals with depleted hepatocerebral mitochondrial DNA, *Nat. Genet.* 29 (2001) 337–341.
- [7] R.K. Naviaux, K.V. Nguyen, POLG mutations associated with Alpers syndrome and mitochondrial DNA depletion, *Ann. Neurol.* 55 (2004) 706–712.
- [8] A. Spinazzola, C. Viscomi, E. Fernandez-Vizarra, F. Carrara, P. D'Adamo, S. Calvo, R.M. Marsano, C. Donnini, H. Weiher, P. Strisciuglio, R. Parini, E. Sarzi, A. Chan, S. DiMauro, A. Rötig, P. Gasparini, I. Ferrero, V.K. Mootha, V. Tiranti, M. Zeviani, MPV17 encodes an inner mitochondrial membrane protein and is mutated in infantile hepatic mitochondrial DNA depletion, *Nat. Genet.* 38 (2006) 570–575.
- [9] A. Bourdon, L. Minai, V. Serre, J.P. Jais, E. Sarzi, S. Aubert, D. Chrétien, P. De Lonlay, V. Paquis-Flucklinger, H. Arakawa, Y. Nakamura, A. Munnich, A. Rötig, Mutation of RRM2B encoding p53-controlled ribonucleotide reductase (p53R2), cause severe mitochondrial DNA depletion, *Nat. Genet.* 39 (2007) 776–780.
- [10] E. Ostergaard, E. Christensen, E. Kristensen, B. Mogensen, M. Duno, E.A. Shoubridge, F. Wibrand, Deficiency of the alpha subunit of succinate-coenzyme A ligase causes fatal infantile lactic acidosis with mitochondrial DNA depletion, *Am. J. Hum. Genet.* 81 (2007) 383–387.
- [11] E. Sarzi, S. Goffart, V. Serre, D. Chrétien, A. Slama, A. Munnich, J. Spelbrink, A. Rötig, Twinkle helicase (PEO1) gene mutation causes mitochondrial DNA depletion, *Ann. Neurol.* (2007) (Epub ahead of print).
- [12] A.H. Hakonen, P. Isohanni, A. Paetau, R. Herva, A. Suomalainen, T. Lönnqvist, Recessive Twinkle mutations in early onset encephalopathy with mtDNA depletion, *Brain* 130 (2007) 3032–3040.
- [13] A. Ribes, E. Riudor, P. Briones, E. Christensen, J. Campistol, D.S. Millington, Significance of bound glutarate in the diagnosis of glutaric aciduria type I, *J. Inher. Metab. Dis.* 15 (1992) 367–370.
- [14] P. Briones, M.A. Vilaseca, A. Ribes, A. Vernet, M. Lluch, V. Cusi, A. Huckriede, E. Aqsteribbe, A new case of multiple mitochondrial enzyme deficiencies with decrease amount of heat shock protein 60, *J. Inher. Metab. Dis.* 20 (1997) 569–577.
- [15] V. Tiranti, P. Chariot, F. Carella, A. Toscano, P. Soliveri, P. Girlanda, F. Carrara, G.M. Fratta, F.M. Reid, C. Mariotti, M. Zeviani, Maternally inherited hearing loss, ataxia and myoclonus associated with a novel point mutation in mitochondrial tRNA<sup>Ser(UCN)</sup> gene, *Hum. Mol. Genet.* 4 (1995) 1421–1427.
- [16] A. Wong, G. Cortopassi, Reproducible quantitative PCR of mitochondrial and nuclear DNA copy number using the Light Cycler, *Methods Mol. Biol.* 197 (2002) 129–137.
- [17] Y. Campos, M.A. Martín, C. Navarro, P. Gordo, J. Arenas, Single-large mitochondrial DNA deletion in a patient with mitochondrial myopathy associated with multiple symmetric lipomatosis, *Neurology* 47 (1996) 1012–1014.
- [18] C.A. Beelman, R. Parker, Differential effects of translational inhibition in *cis* and in *trans* on the decay of the unstable yeast MFA mRNA, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 9687–9692.
- [19] C.L. Karadimas, T.H. Vu, S.A. Holve, P. Chronopoulou, C. Quinzii, S.D. Johnsen, J. Kurth, E. Eggers, L. Palenzuela, K. Tanji, E. Bonilla, D.C. De Vivo, S. DiMauro, M. Hirano, Navajo neurohepatopathy is caused by a mutation in the MPV17 Gene, *Am. J. Hum. Genet.* 79 (2006) 544–548.
- [20] L.J. Wong, N. Brunetti-Pierri, Q. Zhang, N. Yazigi, K.E. Bove, B.B. Dahms, M.A. Puchowicz, I. Gonzalez-Gomez, E.S. Schmitt, C.K. Truong, C.L. Hoppel, P.C. Chou, J. Wang, E.E. Baldwin, D. Adams, N. Leslie, R.G. Boles, D.S. Kerr, W.J. Graigen, Mutations in the MPV17 gene are responsible for rapidly progressive liver failure in infancy, *Hepatology* 46 (2007) 1218–1227.
- [21] E. Sarzi, A. Bourdon, D. Chrétien, M. Zarhrate, J. Corcos, A. Slama, V. Cormier-Daire, P. De Lonlay, A. Munnich, A. Rötig, Mitochondrial DNA depletion is a prevalent cause of multiple respiratory chain deficiency in childhood, *J. Pediatr.* 150 (2007) 531–534.
- [22] L.E. Maquat, Nonsense-mediated mRNA decay, *Curr. Biol.* 12 (2002) 196–197.
- [23] H.A. Kuzmiak, L.E. Maquat, Applying nonsense-mediated mRNA decay research to the clinic: progress and challenges, *Trends Mol. Med.* 12 (2006) 306–316.



## Case report

# A novel mutation in the mitochondrial DNA tRNA<sup>Leu</sup> (UUR) gene associated with late-onset ocular myopathy

E. Maeso<sup>a</sup>, A. Rueda<sup>b</sup>, S. Jiménez<sup>a</sup>, P. del Hoyo<sup>a</sup>, R. Martín<sup>a</sup>, A. Cabello<sup>c</sup>,  
L.M. Mendoza<sup>c</sup>, J. Arenas<sup>a</sup>, Y. Campos<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Investigación, Hospital 12 de Octubre, Avda. de Córdoba km 5.4, 28041 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Servicio de Neurología, Hospital Universitario de Getafe, Ctra. de Toledo km 12.5, 28905 Getafe, Madrid, Spain

<sup>c</sup> Servicio de Anatomía Patológica, Hospital 12 de Octubre, Avda. de Córdoba km 5.4, 28041 Madrid, Spain

Received 18 September 2006; received in revised form 29 November 2006; accepted 30 January 2007

## Abstract

We identified a novel G3283A transition in the mitochondrial DNA tRNA<sup>Leu</sup> (UUR) gene in a patient with ptosis, ophthalmoparesis and hyporeflexia. Muscle biopsy showed cytochrome oxidase positive ragged-red fibers, and defects of complexes I, III and IV of the mitochondrial respiratory chain. The mutation was heteroplasmic in muscle of the proband, being absent in her blood. Ragged-red fibers harbored greater levels of mutant genomes than normal fibers. The G3283A mutation affects a strictly conserved base pair in the TΨC stem of the gene and was not found in controls, thus satisfying the accepted criteria for pathogenicity. © 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Mitochondrial diseases; Mitochondrial DNA; Transfer RNA Leu (UUR); Ocular myopathy; Mitochondria

## 1. Introduction

Impairment of oxidative phosphorylation is a frequent cause of progressive external ophthalmoplegia (PEO). PEO, alone or in combination with other symptoms, can be associated either with large-scale mitochondrial DNA (mtDNA) rearrangements [1] or with point mutations in the tRNA genes [1,2]. Patients with these mutations usually display in muscle ragged-red fibers (RRF) and defects of one or more of the mitochondrial respiratory chain complexes.

Mitochondrial tRNA<sup>Leu</sup> (UUR) gene is a recognized hot-spot for pathogenic mtDNA point mutations. Since the A3243G transition was identified [3] more than a dozen novel mutations have been described, associated with variable clinical phenotypes as diverse as mitochon-

drial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS), cardiomyopathy, PEO, diabetes and deafness, and more complex syndromes [2]. Despite cytochrome *c* oxidase (COX)-negative RRF are present in most patients with tRNA point mutations, the presence of COX-positive RRF is the most prominent histochemical feature of some mutations in the tRNA<sup>Leu</sup> (UUR) gene, particularly the MELAS-associated A3243G mutation [4].

We report a novel G3283A transition in the mitochondrial tRNA<sup>Leu</sup> (UUR) gene in a patient with ptosis and PEO, COX-positive RRF and respiratory chain dysfunction.

## 2. Patient and methods

### 2.1. Case report

A 80-year-old woman came to the attention of our neurologist because in the last few years she suffered

\* Corresponding author. Tel.: +34 91 3908001; fax: +34 91 39085544.

E-mail address: ycamposg@yahoo.es (Y. Campos).



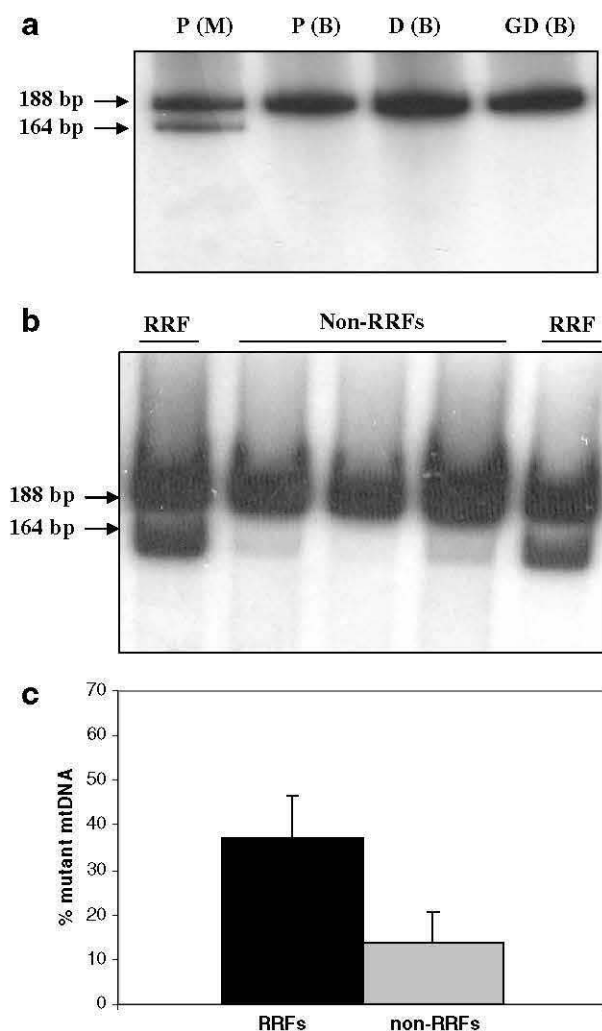


Fig. 2. (a) Restriction fragment-length polymorphism (RFLP) analysis of the G3283A mutation. Last cycle hot PCR yields a 188-bp fragment. The G3283A transition creates a restriction site for *AhaI*, giving two fragments sized 164 and 24 bp (not shown). P(M), patient muscle; P(B), patient blood; D(B), daughter blood; GD(B), grand-daughter blood. (b) Single-muscle fiber PCR-RFLP analysis. (c) Percentage of mutant mtDNA in RRFs and normal fibers (non-RRFs).

mutant genomes in muscle of the proband, whereas the mutation was absent in her blood as well as in blood from her maternal relatives (Fig. 2a).

The G3283A point mutation was not detected in 100 patients with other mitochondrial diseases with or without known point mutations and in 100 normal controls.

Single-muscle fiber PCR analysis showed that RRF had significantly higher levels of mutant mtDNA ( $n = 11$ ;  $37 \pm 13.6\%$ ) compared to normal muscle fibers ( $n = 8$ ;  $9.5 \pm 6.9\%$ ;  $P < 0.01$ , Mann-Whitney's *U*-test) (Fig. 2b and c).

#### 4. Discussion

The proband had a late-onset phenotype characterized by ptosis, PEO, hyporeflexia, COX-positive RRF,

and defects of complexes I, III and IV of the respiratory chain. The combination of clinical, biochemical and morphological findings led us to suspect of a mtDNA mutation as the cause of the disease.

Molecular analysis revealed a novel G3283A point mutation in the TΨC stem of the tRNA<sup>Leu (UUR)</sup> gene. Several lines of evidence suggest the pathogenicity of this mutation:

First, it was absent in 200 normal and disease control subjects, indicating that it is unlikely to occur in the general population or associated with other known mtDNA alterations. Furthermore, it was accompanied by abnormal morphological and biochemical mitochondrial function in the proband. Second, the mutation was heteroplasmic in the proband's muscle, and it was not observed in her blood and in blood from her asymptomatic maternal relatives, which is a feature that can be observed in association with some pathogenic mtDNA mutations (e.g. A3243G mutation). Moreover, when we studied the relationship between histochemical abnormalities and abundance of mutant genomes in individual muscle fibers, we found substantially greater levels in RRF as compared to normal fibers. And, third, this change disrupts an evolutionarily conserved G–C base pair in the TΨC stem (Fig. 1b), that may alter the stability or secondary structure of tRNA, or both.

The relatively low abundance of mutant mtDNA genomes in muscle and its association with a mild late-onset phenotype suggest a low threshold for phenotypic expression of the G3283A mutation. Therefore, clinical mitochondrial myopathy in our patient would have been apparent as the age-dependent decline in oxidative phosphorylation had been added to the deleterious effect of the G3283A mutation on respiratory chain function. Given that the patient was 80-year-old, the presence of noninsulin-dependent diabetes mellitus may or may not be related to the mtDNA mutation. In addition, we cannot rule out the possibility that greater levels of the G3283A mutation may result in more severe mitochondrial phenotypes such as MELAS.

Although the absence of COX-negative fibers in the presence of a COX biochemical defect seems contradictory, it could be related to the partial nature of the COX defect (46% of mean control). These findings are similar to those documented in patients harboring the A3243G or the A3280G mutations [4,10]. Moreover, the average of mutant genomes in muscle was around 37% and this proportion could not be sufficient to cause a lack of COX histochemical reaction. However, this small proportion of G3283A mutation seemed to be able to trigger the formation of RRF, which contrasts with about 70% of mutant A3243G genomes needed to induce mitochondrial proliferation (i.e. RRF) [4]. These data suggest that the G3283A mutation could result in drastic

alterations on mitochondrial function in muscle. The demonstration of how this mutation could result in a dominant phenotype should have been relied upon the analysis of the steady state level of the tRNA, but unfortunately muscle sample was not available for this experiment. The low content of mutant load in muscle and its absence in blood, may be consistent with a de novo origin of the mutation in the muscle lineage of the patient, or with a negative selection against rapidly-dividing cells (e.g. blood cells) containing more abundant mutant genomes.

The G3283A mutation adds to the growing list of pathogenic mutations within the tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> gene. Mutations in this mtDNA gene display remarkable clinical variability. Five of them, the A3243G, the A3251G, the C3256T and the T3273C and the novel G3283A cause PEO, alone or taking part of a more complex disorder [2]. These data illustrate the clinical and genetic heterogeneity of mitochondrial disorders due to mutations in the tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> gene. Further work in trans-mitochondrial cybrid cells will help address the effect of this mutation on mitochondrial metabolism and function.

#### Acknowledgements

Supported by grant from Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) number 03/0283 (to Y.C.), Ministerio de Sanidad, Spain. Y. Campos was supported by The Programa de Estabilización de Investigadores del Sistema Nacional de Salud from Instituto de Salud Carlos III and Comunidad de Madrid (Fundación para la Investigación Biomédica Hospital 12 de Octubre).

#### References

- [1] DiMauro S, Bonilla E. Mitochondrial encephalomyopathies. In: Rosenberg RN, Prusiner SB, DiMauro S, Barchi RL, editors. *The molecular and genetic basis of neurological diseases*. Boston (MA): Butterworth-Heinemann; 1997. p. 201–35.
- [2] Servidei S. Mitochondrial encephalomyopathies: gene mutation. *Neuromusc Disord* 2004;14:107–16.
- [3] Goto Y, Nonaka I, Horai S. A mutation in the tRNA<sup>(Leu)(UUR)</sup> gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* 1990;348:651–3.
- [4] Petruzzella V, Moraes CT, Sano MC, Bonilla E, DiMauro S, Schon EA. Extremely high levels of mutant mtDNAs co-localize with cytochrome *c* oxidase negative ragged-red fibers in patients harboring a point mutation at nt 3243. *Hum Mol Genet* 1994;3:449–54.
- [5] Sciacco M, Bonilla E. Cytochemistry and immunocytochemistry of mitochondria in tissue sections. In: Attardi GM, Chomyn A, editors. *Mitochondrial biogenesis and genetics. Part B. Methods in enzymology*, vol. 264. San Diego (CA): Academic Press; 1996. p. 509–21.
- [6] Tiranti V, Chariot P, Carella F, Toscana A, Soliveri P, Girlanda P, et al. Maternally inherited hearing loss, ataxia and myoclonus associated with a novel point mutation in mitochondrial tRNA<sup>Ser(UCN)</sup> gene. *Hum Mol Genet* 1995;4:1421–7.
- [7] Campos Y, Martín MA, García-Silva MT, del Hoyo P, Rubio JC, Castro-Gago M, et al. Clinical heterogeneity associated with mitochondrial DNA depletion in muscle. *Neuromusc Disord* 1998;8:568–73.
- [8] Rieder MJ, Taylor SL, Tobe V, Nickerson DA. Automatic identification of DNA variations using quality-based fluorescence re-sequencing: analysis of the human mitochondrial genome. *Nucleic Acids Res* 1998;26:967–73.
- [9] Moraes CT, Ricci E, Bonilla E, DiMauro S, Schon E. The mitochondrial tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> mutation in MELAS: genetic, biochemical and morphological correlations in skeletal muscle. *Am J Hum Genet* 1992;50:934–49.
- [10] Campos Y, García A, del Hoyo P, Jara P, Martín MA, Rubio JC, et al. Two pathogenic mutations in the mitochondrial DNA tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> gene (T3258C and A3280G) resulting in variable clinical phenotypes. *Neuromusc Disord* 2003;13:416–20.