



Universidad
Zaragoza



Trabajo de Fin de Grado

Grado en Biotecnología

EFECTO DE FACTORES GENÉTICOS Y AMBIENTALES SOBRE LA ORGANIZACIÓN DEL SISTEMA OXPHOS EN CÉLULAS TUMORALES.

*“Effect of genetic and environmental factors on
the organization of the OXPHOS system in
tumor cells”*

Autora:

Alba Díaz San Martín

Directores:

Dra. Raquel Moreno Loshuertos

Dr. Patricio Fernández Silva

Grupo GENOXPHOS.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular.

Facultad de Ciencias.

Universidad de Zaragoza, curso 2023-2024.

Tabla de contenido

ABREVIATURAS	
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1 CARACTERÍSTICAS MOLECULARES Y CELULARES DEL CÁNCER .	2
2.2 MITOCONDRIAS Y SISTEMA OXPHOS	2
2.3 METABOLISMO DEL CÁNCER Y EFECTO WARBURG	4
2.4 CÁNCER Y MITOCONDRIAS	5
2.5 CÁNCER DE MAMA	6
3 ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	6
4. MATERIALES Y MÉTODOS	7
4.1 CULTIVOS CELULARES	7
4.1.1 LÍNEAS CELULARES	7
4.1.2 MEDIOS DE CULTIVO	7
4.1.3 CULTIVO CELULAR	7
4.1.4 CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN DE LÍNEAS CELULARES	8
4.1.5 RECuento CELULAR	8
4.2 ELABORACIÓN DE GELES DE AGAROSA Y ELECTROFORESIS	8
4.3 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	8
4.3.1 EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO	8
4.3.2 EXTRACCIÓN DE DNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSA	8
4.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	9
4.4.1 PCR	9
4.4.2 PCR EN TIEMPO REAL	9
4.5 GENERACIÓN DE CÍBRIDOS	9
4.5.1 GENERACIÓN DE LÍNEAS CARENTES DE DNA MITOCONDRIAL (p°)	9
4.5.2 ENUCLEACIÓN	10
4.5.3 FUSIÓN	10
4.5.4 SELECCIÓN	10
4.6 SECUENCIACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR MDA.MB468	10

4.6.1 ANÁLISIS DE LA MUTACIÓN m.4794G>A EN EL MTDNA MEDIANTE RFLP	10
4.7 MEDIDA DE RESPIRACIÓN CELULAR.....	11
4.8 MEDIDA DE LA CITOTOXICIDAD DE METFORMINA Y DICLOROACETATO.....	11
4.9 PURIFICACIÓN DE MITOCONDRIAS PARA ENSAYOS DE ELECTROFORESIS NATIVA	11
4.10 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA BLUE NATIVE	12
4.11 ENSAYO DE ACTIVIDAD EN GEL (IGA)	12
4.12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	12
4.13 HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS.....	12
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
5.1 SECUENCIACIÓN DE LA LÍNEA MDA.MB468.....	13
5.1.1 MUTACIÓN m.4794G>A E IMPACTO SOBRE LA ORGANIZACIÓN DEL SISTEMA OXPHOS.....	13
5.1.2 HETEROPLASMIA m.12385delC* E IMPACTO SOBRE LA ORGANIZACIÓN DEL SISTEMA OXPHOS.....	15
5.2 GENERACIÓN DE LÍNEAS ρ^0	16
5.3 GENERACIÓN DE CÍBRIDOS	18
5.4 RESPIRACIÓN CELULAR.....	18
5.5 ANÁLISIS DEL NÚMERO DE COPIAS DE DNA MITOCONDRIAL.....	19
5.6 MEDIDA DE CITOTOXICIDAD DE METFORMINA Y DICLOROACETATO.....	20
5.7 FUNCIONALIDAD Y ORGANIZACIÓN DEL SISTEMA OXPHOS	22
6. CONCLUSIONES	22
7. BIBLIOGRAFÍA	24
8. ANEXOS.....	

8. ANEXOS

ANEXO I: TABLAS DE MATERIALES Y MÉTODOS

A. Secuenciación del genoma mitocondrial de la línea MDA.MB468.

Número de amplificado	Secuencia de los oligonucleótidos empleados 5'→3'	Coordenadas en pb del producto de PCR	Longitud del amplificado	Genes amplificados	Coordenadas en pb de cada gen
1	Directo: TATACCCACACCCACCCAAGA Reverso: TCAGGGATGGGTTCGATTCTC	3200-4359	1160	ND1	3307-4262
				TRNI	4263-4331
				TRNQ	4329-4400
2	Directo: GTGCCACCTATCACACCCCA Reverso: GAGTGGGGTTTTGCAGTCCTT	4376-5608	1233	ND1	3307-4262
				TRNI	4263-4331
				TRNQ	4329-4400
				TRNM	4402-4469
				ND2	4470-5511
3	Directo: GGTTTGACTATTCTGTATGTCTC Reverso: AATAATTAGGCTGTGGGTGGTT	9947-10861	915	TRNG	9991-10058
				ND3	10059-10404
				TRNR	10405-10469
				ND4L	10470-10766
				ND4	10760-12137
4	Directo: CGCTCACACCTCATATCCTCC Reverso: TTCTCGTGTGAATGAGGGTTTT	10536-12058	1523	ND4L	10470-10766
				ND4	10760-12137
5	Directo: CTCAACATACTAGTCACAGCCCTAT Reverso: GAGGGAGGTTGAAGTGAGAGGT	11951-13455	1505	ND4	10760-12137
				TRNH	12138-12206
				TRNS2	12207-12265
				TRNL2	12266-12336
				ND5	12337-14148

6	Directo: GCTCCGGGTCCATCATCCAC Reverso: GAATAGTCCTGTGGTGATTGGAG	13361-14896	1536	ND5	12337-14148
				ND6	14149-14673
				TRNE	14674-14742
				CYTB	14747-15887
7	Directo: ACGTTTTTCAC ACTTCTAGTA Reverso: GTCAAAACTAGTTAATTGGA	9161-10040	880	ATP6	8527-9207
				COX3	9207-9990
8	Directo: GGAGCTGGTA AAAAGAGGCC Reverso: CTTTTGA AAAAGTCATGGA	5821-7519	1699	TRNY	5826-5891
				COX1	5904-7445
				TRNS1	7446-7514
9	Directo: GTATTAGAAA AACCATTCA Reverso: AACTTAAAAGGTTAATGCTA	7521-8330	810	TRNS1	7446-7514
				TRND	7518-7585
				COX2	7586-8269
				TRNK	8295-8364

B. Oligonucleótidos empleados para RFLP y análisis de la mutación m.4794G>A.

Nombre del oligonucleótido	Longitud	Secuencia (5'-3')
h4741L	42	ATCATTAATA ATCATAATAG CTATAGCAATAAACTAGGATT
h5030H	20	TATGTGGGTAATTGAGGAGT

C. Programa PCR

Desnaturalización previa	95 °C	2m	1 ciclo
Desnaturalización	95 °C	30s	25 ciclos
Hibridación	55 °C	30s	
Extensión	72 °C	2m	
Final de la reacción	72 °C	5m	1 ciclo

D. PCR en tiempo real

i. Oligonucleótidos

Gen amplificado	Oligonucleótidos	Secuencia (5'-3')
hDloop	Directo	TATCTTTTGGCGGTATGCACTTTTAAACAGT
	Reverso	TGATGAGATTAGTAGTATGGGAGTGG
hβGlobina	Directo	GTGCATCTGACTCCTGAGGAGA
	Reverso	CCTTGATACCAACCTGCCCAG

ii. Programa de PCR en tiempo real

Desnaturalización previa	95 °C	10m	1 ciclo
Cuantificación	95 °C	10s	55 ciclos
	60 °C	10s	
	72 °C	10s	
Melting	95 °C	0s	1 ciclo
	65 °C	15s	
	98 °C	0s	
Enfriamiento	40 °C	30s	1 ciclo

ANEXO II: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

A. Generación de líneas ρ^0 .

	Šídák's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
MDA.MB231	0d vs. 37d	99,90	78,64 to 121,2	Yes	****	<0,0001
MDA.MB468	0d vs. 18d	89,77	65,99 to 113,5	Yes	****	<0,0001
	0d vs. 22d	99,60	75,83 to 123,4	Yes	****	<0,0001
MCF-7	0 vs. 9	92,25	70,99 to 113,5	Yes	****	<0,0001
	0 vs. 22	99,90	78,64 to 121,2	Yes	****	<0,0001

B. Análisis del número de copias del DNA mitocondrial.

i. Porcentaje del número de copias de DNA mitocondrial por cíbrido con respecto a la línea celular que ha aportado las mitocondrias en cada caso.

Šídák's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
MBA.MB231 vs. 231mt231	56,71	11,66 to 101,8	Yes	*	0,0134
613 vs. 231mt613	48,14	3,093 to 93,18	Yes	*	0,0353
MDA.MB468 vs.231mt468	-10,67	-55,71 to 34,38	No	ns	0,8923

ii. Porcentaje del número de copias de DNA mitocondrial por cíbrido con respecto a 231mt613

Šídák's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
231mt613 vs. 231mt468	-100,1	-167,1 to -33,10	Yes	**	0,0089
231mt613 vs.231mt231	9,310	-57,67 to 76,29	No	ns	0,9071

C. Medida de la citotoxicidad de la metformina y el dicloroacetato

i. Metformina

Línea celular	Šídák's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
231mt231	0mM vs. 5mM	0,09306	-0,1831 to 0,3693	No	ns	0,9604
	0mM vs. 10mM	0,2149	-0,06135 to 0,4911	No	ns	0,2029
	0mM vs. 20mM	0,248	-0,02822 to 0,5242	No	ns	0,0974
231mt468	0mM vs. 5mM	0,2334	-0,04277 to 0,5097	No	ns	0,1355
	0mM vs. 10mM	0,4025	0,1263 to 0,6787	Yes	**	0,0022
	0mM vs. 20mM	0,3833	0,1071 to 0,6595	Yes	**	0,0036
231mt613	0mM vs. 5mM	0,2289	-0,04730 to 0,5051	No	ns	0,1498
	0mM vs. 10mM	0,4612	0,1850 to 0,7374	Yes	***	0,0005
	0mM vs. 20mM	0,7028	0,4099 to 0,9958	Yes	****	<0,0001

ii. Dicloroacetato (DCA)

Línea celular	Šídák's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
231mt231	0mM vs. 5mM	-0,2886	-0,6330 to 0,05576	No	ns	0,1429
	0mM vs. 15mM	0,1293	-0,2150 to 0,4737	No	ns	0,9283
	0mM vs. 25mM	0,2626	-0,08172 to 0,6070	No	ns	0,2241
231mt468	0mM vs. 5mM	0,1266	-0,2177 to 0,4710	No	ns	0,9363
	0mM vs. 15mM	0,326	-0,01839 to 0,6703	No	ns	0,0714
	0mM vs. 25mM	0,641	0,2966 to 0,9853	Yes	***	0,0001
231mt613	0mM vs. 5mM	0,192	-0,1523 to 0,5364	No	ns	0,6014
	0mM vs. 15mM	0,4806	0,1363 to 0,8250	Yes	**	0,0032
	0mM vs. 25mM	0,8358	0,4914 to 1,180	Yes	****	<0,0001

D. Respiración celular

i. Respiración endógena y desacoplada por célula

Respiración	Šídák's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Endógena	231mt613 vs. 231mt468	4,887	0,4591 to 9,314	Yes	*	0,0284
	231mt613 vs. 231mt231	1,774	-2,653 to 6,202	No	ns	0,7133
Desacoplada	231mt613 vs. 231mt468	4,930	0,5026 to 9,358	Yes	*	0,0269
	231mt613 vs. 231mt231	2,076	-2,591 to 6,743	No	ns	0,6330

ii. Respiración endógena y desacoplada por copia de mtDNA

Respiración	Šídák's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Endógena	231mt613 vs. 231mt231	0,01595	-0,03088 to 0,06278	No	ns	0,8142
	231mt613 vs. 231mt468	0,1311	0,08423 to 0,1779	Yes	****	<0,0001
Desacoplada	231mt613 vs. 231mt231	0,01741	-0,03195 to 0,06678	No	ns	0,7951
	231mt613 vs. 231mt468	0,1526	0,1057 to 0,1994	Yes	****	<0,0001

ANEXO III: INFORMACIÓN ESTRUCTURAL DEL COMPLEJO I

A. Clasificación de todas las subunidades del complejo I

Clasificación	Subunidad	Módulo funcional	Posición
Subunidades centrales hidrofílicas	NDUFV1	M _D	Matriz
	NDUFV2	M _D	Matriz
	NDUFS1	M _D	Matriz
	NDUFS2	M _P , P _P , P _D	Matriz
	NDUFS3	M _P	Matriz
	NDUFS7	M _P	Matriz
	NDUFS8	M _P	Matriz
Subunidades centrales de membrana	ND1	P _P	Transmembrana
	ND2	P _P	Transmembrana
	ND3	P _P	Transmembrana
	ND4	P _D	Transmembrana
	ND4L	P _P	Transmembrana
	ND5	P _D , P _P	Transmembrana
	ND6	P _P	Transmembrana
Subunidades supernumerarias	NDUFA1	P _P	Transmembrana
	NDUFA2	M _D	Matriz
	NDUFA3	P _P	Transmembrana
	NDUFA5	M _P	Matriz
	NDUFA6	M _P	Matriz
	NDUFA7	M _P	Matriz
	NDUFA8	P _P , P _D	Intermembrana
	NDUFA9	M _P	Matriz
	NDUFA10	P _P	Matriz
	NDUFA11	P _P	Transmembrana
	NDUFA12	M _P	Matriz
	NDUFA13	P _P , M _P	Transmembrana

Subunidades supernumerarias	NDUFAB1	M _P and P _D	Matriz
	NDUFB1	P _D	Transmembrana
	NDUFB2	P _D	Transmembrana
	NDUFB3	P _D	Transmembrana
	NDUFB4	P _D	Transmembrana
	NDUFB5	P _D , P _P	Transmembrana
	NDUFB6	P _D	Transmembrana
	NDUFB7	P _D	Intermembrana
	NDUFB8	P _D	Transmembrana
	NDUFB9	P _D	Matriz
	NDUFB10	P _D	Intermembrana
	NDUFB11	P _D , P _P	Transmembrana
	NDUFC1	P _P	Transmembrana
	NDUFC2	P _P , P _D	Transmembrana
	NDUFS4	M _P , M _D	Matriz
	NDUFS5	P _P	Intermembrana
	NDUFS6	M _D	Matriz
	NDUFV3	M _D	Matriz

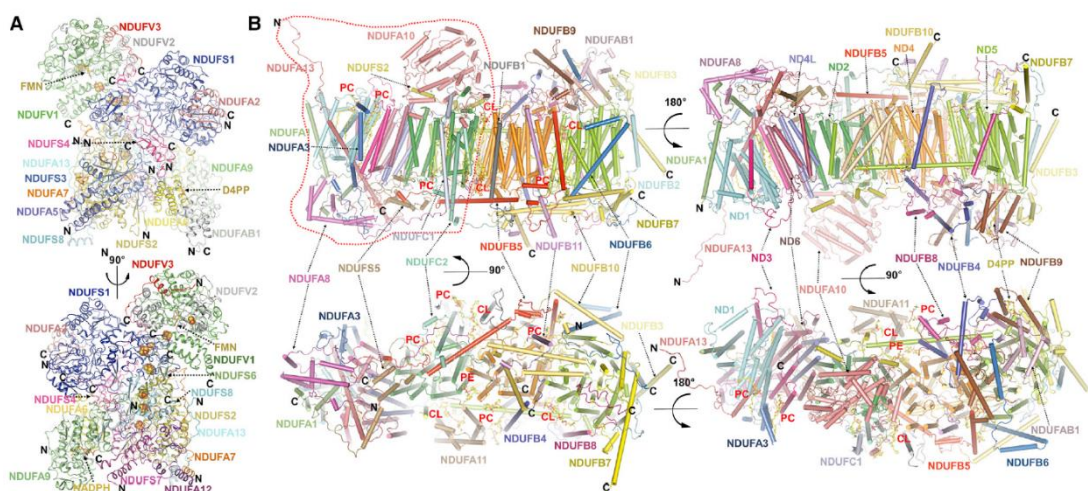


Figura 1: **A)** Estructura completa de la región de matriz del complejo I. Se representa el complejo I en 2 vistas rotadas. Se distinguen las 17 subunidades (7 subunidades centrales hidrofílicas y 10 subunidades supernumerarias), los clusters FeS se representan como esferas y FMN se representa en “sticks” amarillos. **B)** Estructura completa de la región de membrana del complejo CI en 4 vistas rotadas. Se muestran las 7 subunidades ND, las 21 subunidades supernumerarias y los fosfolípidos se representan como “sticks” amarillos con el texto en color rojo. La región rodeada en color rojo corresponde a P_P(9).

ANEXO IV: RESULTADOS DE SECUENCIACIÓN Y MODELADO

A. Secuencia del gen y de la proteína ND2 original y m.4794G>A.

i. Secuencia del gen ND2 original

```
>NC_012920.1:4470-5511 Homo sapiens mitochondrion,
complete genome
ATTAATCCCCTGGCCCAACCCGTCATCTACTCTACCATCTTTGCAGGCACACTCATC
ACAGCGCTAAGCTCGCACTGATTTTTTTACCTGAGTAGGCCTAGAAATAAACATGCTA
GCTTTTATTCCAGTTCTAACCACAAAAAATAAACCCCTCGTTCCACAGAAGCTGCCATC
AAGTATTTTCCTCACGCAAGCAACCGCATCCATAATCCTTCTAATAGCTATCCTCTTC
AACAATATACTCTCCGGACAATGAACCATAACCAATACTACCAATCAATACTCATCA
TTAATAATCATAATAGCTATAGCAATAAACTAGGAATAGCCCCCTTTCACTTCTGA
GTCCCAGAGGTTACCCAAGGCACCCCTCTGACATCCGGCCTGCTTCTTCTCACATGA
CAAAAACCTAGCCCCCATCTCAATCATATACCAAATCTCTCCCTCACTAAACGTAAGC
CTTCTCCTCACTCTCTCAATCTTATCCATCATAGCAGGCAGTTGAGGTGGATTAAAC
CAAACCCAGCTACGCAAAATCTTAGCATACTCCTCAATTACCCACATAGGATGAATA
ATAGCAGTTCTACCGTACAACCCTAACATAACCATTCTTAATTTAACTATTTTATATT
ATCCTAATACTACTACCGCATTCCTACTACTCAACTTAACTCCAGCACCACGACCCTA
CTACTATCTCGCACCTGAAACAAGCTAACATGACTAACACCCCTTAATTCCATCCACC
CTCCTCTCCCTAGGAGGCCTGCCCCGCTAACCGGCTTTTTTGCCCAAATGGGCCATT
ATCGAAGAATTCACAAAAACAATAGCCTCATCATCCCCACCATCATAGCCACCATC
ACCCCTCCTTAACCTCTACTTCTACCTACGCCTAATCTACTCCACCTCAATCACACTA
CTCCCCATATCTAACAACGTAAAAATAAAATGACAGTTTGAACATACAAAACCCACC
CCATTCTCCCCACACTCATCGCCCTTACCACGCTACTCCTACCTATCTCCCCTTTT
ATACTAATAATCTTAT
```

Se indica subrayada y en negrita la G que se modifica en ND2 con la mutación m.4794G>A.

ii. Secuencia del gen ND2 m.4794G>A.

```
ATTAATCCCCTGGCCCAACCCGTCATCTACTCTACCATCTTTGCAGGCACACTCATC
ACAGCGCTAAGCTCGCACTGATTTTTTTACCTGAGTAGGCCTAGAAATAAACATGCTA
GCTTTTATTCCAGTTCTAACCACAAAAAATAAACCCCTCGTTCCACAGAAGCTGCCATC
AAGTATTTTCCTCACGCAAGCAACCGCATCCATAATCCTTCTAATAGCTATCCTCTTC
AACAATATACTCTCCGGACAATGAACCATAACCAATACTACCAATCAATACTCATCA
TTAATAATCATAATAGCTATAGCAATAAACTAGGAATAACCCCCTTTCACTTCTGA
GTCCCAGAGGTTACCCAAGGCACCCCTCTGACATCCGGCCTGCTTCTTCTCACATGA
CAAAAACCTAGCCCCCATCTCAATCATATACCAAATCTCTCCCTCACTAAACGTAAGC
CTTCTCCTCACTCTCTCAATCTTATCCATCATAGCAGGCAGTTGAGGTGGATTAAAC
CAAACCCAGCTACGCAAAATCTTAGCATACTCCTCAATTACCCACATAGGATGAATA
ATAGCAGTTCTACCGTACAACCCTAACATAACCATTCTTAATTTAACTATTTTATATT
ATCCTAATACTACTACCGCATTCCTACTACTCAACTTAACTCCAGCACCACGACCCTA
CTACTATCTCGCACCTGAAACAAGCTAACATGACTAACACCCCTTAATTCCATCCACC
CTCCTCTCCCTAGGAGGCCTGCCCCGCTAACCGGCTTTTTTGCCCAAATGGGCCATT
ATCGAAGAATTCACAAAAACAATAGCCTCATCATCCCCACCATCATAGCCACCATC
ACCCCTCCTTAACCTCTACTTCTACCTACGCCTAATCTACTCCACCTCAATCACACTA
CTCCCCATATCTAACAACGTAAAAATAAAATGACAGTTTGAACATACAAAACCCACC
CCATTCTCCCCACACTCATCGCCCTTACCACGCTACTCCTACCTATCTCCCCTTTT
ATACTAATAATCTTAT
```

Se indica subrayada y en negrita la mutación m.4794G>A.

iii. Secuencia de aminoácidos de ND2 original

>YP_003024027.1 NADH dehydrogenase subunit 2
(mitochondrion) [Homo sapiens]
MNPLAQPVIIYSTIFAGTLITALSSHWFFTWVGLEMNMLAFIPVLTKKMNPRSTEAAI
KYFLTQATASMILLMAILFNMLSGQWTMTNTTNQYSSLMIMMAMAMKLGMA^{**A**}PFHFW
VPEVTQGTPLTSGLLLLTWQKLAPISIMYQISPSLNVSLLLTSLISIMAGSWGGLN
QTQLRKILAYSSITHMGWMMAVLPYNPNMTILNLTIIYIILTTTAFLLLNLSSTTTL
LLSRTWNKLTWLTPLIPSTLLSLGGLPPLTGFLPKWAIIEEFTKNNSLIIPTIMATI
TLLNLYFYLRLLIYSTSITLLPMSNNVKMKWQFEHTKPTPFLPTLIALTTLLLPISPF
MLMIL

Se indica subrayada y en negrita el aminoácido A (Alanina) que varía con respecto a ND2 con la mutación m.4794G>A.

iv. Secuencia de aminoácidos de ND2 m.4794G>A.

MNPLAQPVIIYSTIFAGTLITALSSHWFFTWVGLEMNMLAFIPVLTKKMNPRSTEAAI
KYFLTQATASMILLMAILFNMLSGQWTMTNTTNQYSSLMIMMAMAMKLGMT^{**T**}PFHFW
VPEVTQGTPLTSGLLLLTWQKLAPISIMYQISPSLNVSLLLTSLISIMAGSWGGLN
QTQLRKILAYSSITHMGWMMAVLPYNPNMTILNLTIIYIILTTTAFLLLNLSSTTTL
LLSRTWNKLTWLTPLIPSTLLSLGGLPPLTGFLPKWAIIEEFTKNNSLIIPTIMATI
TLLNLYFYLRLLIYSTSITLLPMSNNVKMKWQFEHTKPTPFLPTLIALTTLLLPISPF
MLMIL

Se indica subrayada y en negrita el aminoácido T (Treonina) que aparece en ND2 con la mutación m.4794G>A.

B. Secuencia del gen y de la proteína ND5 original y mutado

i. Secuencia del gen ND5 original

>NC_012920.1:12337-14148 Homo sapiens mitochondrion,
complete genome
ATAACCATGCACACTACTATAACCACCCTAACCTGACTTCCCTAATTCCCCC^{**ATC**}
CTTACCACCCTCGTTAACCCCTAACAAAAAACTCATACCCCATTATGTAAATCC
ATTGTCGCATCCACCTTTATTATCAGTCTCTTCCCCACAACAATATTCATGTGCCTA
GACCAAGAAGTTATTATCTCGAACTGACACTGAGCCACAACCCAAACAACCCAGCTC
TCCCTAAGCTTCAAACCTAGACTACTTCTCCATAATATTCATCCCTGTAGCATTGTTT
GTTACATGGTCCATCATAGAATTCTCACTGTGATATATAAACTCAGACCCAAACATT
AATCAGTTCTTCAAATATCTACTCATCTTCCTAATTACCATACTAATCTTAGTTACC
GCTAACAACTTATCCAACTGTTTCATCGGCTGAGAGGGCGTAGGAATTATATCCTTC
TTGCTCATCAGTTGATGATACGCCCGAGCAGATGCCAACACAGCAGCCATTCAAGCA
ATCCTATACAACCGTATCGGCGATATCGGTTTCATCCTCGCCTTAGCATGATTTATC
CTACACTCCAACCTCATGAGACCCACAACAATAGCCCTCTAAACGCTAATCCAAGCC
TCACCCCACTACTAGGCCTCCTCCTAGCAGCAGCAGGCAAATCAGCCCAATTAGGTC
TCCACCCCTGACTCCCCTCAGCCATAGAAGGCCACCCAGTCTCAGCCCTACTCCA
CTCAAGCACTATAGTTGTAGCAGGAATCTTCTTACTCATCCGCTTCCACCCCTAGC
AGAAAATAGCCCACTAATCCAACTCTAACACTATGCTTAGGCGCTATCACCCTCT
GTTTCGCAGCAGTCTGCGCCCTTACACAAAATGACATCAAAAAAATCGTAGCCTTCTC
CACTTCAAGTCAACTAGGACTCATAATAGTTACAATCGGCATCAACCAACCACACCT
AGCATTTCCTGCACATCTGTACCCACGCCTTCTTCAAAGCCATACTATTTATGTGCTC
CGGGTCCATCATCCACAACCTTAACAATGAACAAGATATTCGAAAAATAGGAGGACT
ACTCAAACCATACCTCTCACTTCAACCTCCCTCACCATTGGCAGCCTAGCATTAGC
AGGAATACCTTTCCTCACAGGTTTCTACTCCAAAGACCACATCATCGAAACCGCAAA
CATATCATACACAAACGCCTGAGCCCTATCTATTACTCTCATCGCTACCTCCCTGAC

AAGCGCCTATAGCACTCGAATAATTCTTCTCACCCCTAACAGGTCAACCTCGCTTCCC
 CACCCTTACTAACATTAACGAAAATAACCCACCCCTACTAAACCCCATTAACGCCT
 GGCAGCCGGAAGCCTATTTCGCAGGATTTCTCATTACTAACAACATTTCCCCCGCATC
 CCCCTTCCAAACAACAATCCCCCTCTACCTAAAACTCACAGCCCTCGCTGTCACTTT
 CCTAGGACTTCTAACAGCCCTAGACCTCAACTACCTAACCAACAACTTAAAATAAA
 ATCCCCACTATGCACATTTTATTTCTCCAACATACTCGGATTCTACCCTAGCATCAC
 ACACCGCACAAATCCCCTATCTAGGCCTTCTTACGAGCCAAAACCTGCCCCTACTCCT
 CCTAGACCTAACCTGACTAGAAAAGCTATTACCTAAAACAATTTACAGCACCAAAAT
 CTCCACCTCCATCATCACCTCAACCCAAAAAGGCATAATTAACTTTACTTCCTCTC
 TTTCTTCTTCCCCTCATCCTAACCCCTACTCCTAATCACATAA

Se indican subrayadas y en negrita las 6C de la región Poli C 12385-12390.

ii. Secuencia del gen ND5 m.12385delC*

ATAACCATGCACACTACTATAACCACCCCTAACCCCTGACTTCCCTAATT**CCCCC**ATCC
 TTACCACCCCTCGTTAACCCCTAACAAAAAAACTCATACCCCATTTATGTAAAATCCA
 TTGTGCGCATCCACCTTTATTATCAGTCTCTTCCCCACAACAATATTCATGTGCCTAG
 ACCAAGAAGTTATTATCTCGAACTGACACTGAGCCACAACCCAAACAACCCAGCTCT
 CCCTAAGCTTCAAACCTAGACTACTTCTCCATAATATTCATCCCTGTAGCATTGTTCTG
 TTACATGGTCCATCATAGAATTCTCACTGTGATATATAAACTCAGACCCAAACATTA
 ATCAGTTCTTCAAATATCTACTCATCTTCCCTAATTACCATACTAATCTTAGTTACCG
 CTAACAACCTATTCCAACCTGTTTCATCGGCTGAGAGGGCGTAGGAATTATATCCTTCT
 TGCTCATCAGTTGATGATACGCCCCGAGCAGATGCCAACACAGCAGCCATTCAAGCAA
 TCCTATACAACCGTATCGGCGATATCGGTTTCATCCTCGCCTTAGCATGATTTATCC
 TACACTCCAACCTCATGAGACCCACAACAAATAGCCCTTCTAAACGCTAATCCAAGCC
 TCACCCCACTACTAGGCCTCCTCCTAGCAGCAGCAGGCAAATCAGCCCAATTAGGTC
 TCCACCCCTGACTCCCTCAGCCATAGAAGGCCCCACCCAGTCTCAGCCCTACTCC
 ACTCAAGCACTATAGTTGTAGCAGGAATCTTCTTACTCATCCGCTTCCACCCCTAG
 CAGAAAATAGCCCACTAATCCAAACTCTAACACTATGCTTAGGCGCTATCACCCTC
 TGTTGCGCAGCAGTCTGCGCCCTTACACAAAATGACATCAAAAAAATCGTAGCCTTCT
 CCACTTCAAGTCAACTAGGACTCATAATAGTTACAATCGGCATCAACCAACCACACC
 TAGCATTCCCTGCACATCTGTACCCACGCCTTCTTCAAAGCCATACTATTTATGTGCT
 CCGGGTCCATCATCCACAACCTTAACAATGAACAAGATATTGAAAAATAGGAGGAC
 TACTCAAACCATACCTCTCACTTCAACCTCCCTCACCATTGGCAGCCTAGCATTAG
 CAGGAATACCTTTCTCCTCACAGGTTTCTACTCCAAAGACCACATCATCGAAACCGCAA
 ACATATCATACACAAACGCCTGAGCCCTATCTATTACTCTCATCGCTACCTCCCTGA
 CAAGCGCCTATAGCACTCGAATAATTCTTCTCACCCCTAACAGGTCAACCTCGCTTCC
 CCACCCCTTACTAACATTAACGAAAATAACCCACCCCTACTAAACCCCATTAACGCC
 TGGCAGCCGGAAGCCTATTTCGCAGGATTTCTCATTACTAACAACATTTCCCCCGCAT
 CCCCTTCCAAACAACAATCCCCCTCTACCTAAAACTCACAGCCCTCGCTGTCACTT
 TCCTAGGACTTCTAACAGCCCTAGACCTCAACTACCTAACCAACAACTTAAAATAA
 AATCCCCACTATGCACATTTTATTTCTCCAACATACTCGGATTCTACCCTAGCATCA
 CACACCGCACAAATCCCCTATCTAGGCCTTCTTACGAGCCAAAACCTGCCCCTACTCC
 TCCTAGACCTAACCTGACTAGAAAAGCTATTACCTAAAACAATTTACAGCACCAAA
 TCTCCACCTCCATCATCACCTCAACCCAAAAAGGCATAATTAACTTTACTTCCTCT
 CTTTCTTCTTCCCCTCATCCTAACCCCTACTCCTAATCACATAA

Se indican subrayadas y en negrita las 5C restantes tras la delección de una de ellas.

iii. Secuencia de aminoácidos de ND5 original

```
>YP_003024036.1      NADH      dehydrogenase      subunit      5
(mitochondrion) [Homo sapiens]
MTMHTTMTTLTSLIPPILTTLVNPNNKNSYPHYVKSIVASTFIISLFPTTMFMCL
DQEVIIISNWHWATTQTTQLSLSFKLDYFSMMFIPVALFVTWSIMEFSLWYMNSDPNI
NQFFKYLLIFLITMLILVTANNLFQLFIGWEGVGIMSFLLISWWYARADANTAAIQA
ILYNRIGDIGFILALAWFILHSNSWDPQQMALLNANPSLTPLLGLLLAAAGKSAQLG
LHPWLPSAMEGPTPVSALLHSSTMVVAGIFLLIRFHPLAENSPLIQTLTLCLGAITT
LFAAVCALTQNDIKKIVAFSTSSQLGLMMVTIGINQPHLAFLHICTHAFFKAMLFMC
SGSIIHNLNNEQDIRKMGGLLKTMPLTSTSLTIGSLALAGMPFLTGFYSKDHIIETA
NMSYTNAWALSITLIATSLTSAYSTRMILLTLTGQPRFPTLTNNINENNPTLLNPIKR
LAAGSLFAGFLITNNISPSPFQTTIPLYLKLTALAVTFLGLLTALDLNYLTNKLKM
KSPLCTFYFSNMLGFYPSITHRTIPYLGLLTSQNLPLLLLDLTWLEKLLPKTISQHQ
ISTSIITSTQKGMIKLYFLSFFFPLILTLLIT
```

iv. Secuencia de aminoácidos de ND5 m.12385delC*

```
MTMHTTMTTLTSLIPPSLPPSLTLTKKTHTPIM
```