



**Universidad**  
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

**Patogenicidad y penetrancia  
de mutaciones raras  
asociadas a la Neuropatía  
Óptica Hereditaria de Leber.**

Autor:

**Cristina Ruiz Ruiz**

Directores:

**Dr. Eduardo Ruiz Pesini**

**Dr. Julio Montoya Villaroya**

**Sonia Emperador Ortiz**

**Facultad de Ciencias**

**Junio, 2014**

## RESUMEN

La neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON) es una enfermedad mitocondrial que cursa con la pérdida de visión aguda en ambos ojos. La enfermedad se produce por mutaciones puntuales en el DNA mitocondrial (mtDNA), encontrándose en el 90% de los pacientes las mutaciones primarias m.3460G>A, m.11778G>A y m.14484T>C que afectan al complejo I mitocondrial (CI). El 10% restante posee diferentes mutaciones en genes mitocondriales que en su mayoría codifican subunidades del CI.

Este es el caso de las mutaciones m.13094T>C y m.3700G>A. La primera de ellas fue detectada en el paciente 2831, en el que no se encontró ninguna de las tres mutaciones principales. La mutación m.13094T>C que afecta a la subunidad NT-ND5 del CI se postula causante del fenotipo LHON del paciente.

Asimismo, la mutación m.3700G>A se ha detectado en diversos pacientes LHON carentes de las tres mutaciones principales. Esta mutación ha sido detectada en otra especie cercana filogenéticamente a los humanos (*Pongo pygmaeus*) como wild-type, y sin causar ningún fenotipo patológico, lo que indica que deben existir compensaciones en la cadena respiratoria que evitan el fenotipo patológico en el animal.

En el presente estudio se analizaron las dos mutaciones citadas en fibroblastos del paciente 2831, *P. pygmaeus* y humano control mediante distintos métodos; como PCR-RFLP, niveles de mtDNA y diferentes estudios de funcionalidad mitocondrial como la medida de síntesis de ATP mitocondrial o el consumo de oxígeno, entre otros.

Los resultados mostraron que la función mitocondrial de los fibroblastos del paciente 2831 presentaban un déficit estadísticamente significativo y por lo tanto la mutación m.13094T>C se presenta como “probablemente patológica”.

Sin embargo, la función mitocondrial de los fibroblastos de *P. pygmaeus* no mostraban una disminución de la función mitocondrial respecto los fibroblastos control, lo que indica que existen desviaciones patológicas compensadas en esta especie que evitan el fenotipo LHON.

## ABSTRACT

Leber hereditary optic neuropathy (LHON) is a mitochondrial pathology characterized by acute vision loss. This disorder is caused by mitochondrial DNA (mtDNA) point mutations. 90% of cases are due to primary mutations m.3460G>A, m.11778G>A and m.14484T>C affecting mitochondrial complex I (CI). The remaining 10% of the cases are caused by rare mutations on genes affecting CI subunits.

In this project we are studying two of these rare mutations: m.13094T>C and m.3700G>A. The first one was detected in a patient suffering from LHON, and none of the primary mutations were detected. m.13094T>C affecting NT-ND5 subunit of CI is proposed to be the cause of his LHON phenotype.

m.3700G>A mutation has been reported in some LHON patients. This pathological mutation is the wild-type allele in orangutan (*Pongo pygmaeus*) mtDNA. This fact suggests that this specie may have genetic compensations in their mtDNA which avoid pathological phenotype.

In this study both mtDNA mutations were analyzed on fibroblasts of patient, *P. pygmaeus* and healthy human as a control. PCR-RFLP, mtDNA levels and different mitochondrial function studies as mitochondrial ATP synthesis or oxygen consumption were used to analyze the functional affection of these mutations.

The results showed an accentuated decrease of mitochondrial function on patient's fibroblasts. Thus, m.13094T>C mutation can be defined as "probably pathological".

Nevertheless, mitochondrial function of *P. pygmaeus*'s fibroblasts was not decreased compared to control fibroblast. This fact suggests that there may be some compensated pathogenic deviations in this specie which avoids LHON phenotype.

# ÍNDICE

<b>GLOSARIO .....</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>8</b>
<b>HIPÓTESIS DE ESTUDIO.....</b>	<b>9</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>9</b>
<b>MATERIALES.....</b>	<b>9</b>
Informe del caso .....	9
Material Biológico .....	10
Instrumentación.....	11
Kits comerciales .....	11
<b>MÉTODOS.....</b>	<b>12</b>
Procedimientos de cultivo celular .....	12
Aislamiento de DNA a partir de células .....	12
Cuantificación de ácidos nucleicos .....	13
PCR-RFLP .....	13
Cuantificación de proteínas mediante el método Bradford .....	14
Enriquecido mitocondrial a partir de células cultivadas para electroforesis en condiciones no desnaturalizantes.....	15
Electroforesis de proteínas en condiciones no desnaturalizantes.....	16
Electrotransferencia de proteínas en gel a membrana .....	17
Western-Blot.....	17
Ensayo de las actividades de los Complejos Mitocondriales .....	18
Fusión de SH-SY5Y p° con plaquetas. Creación de líneas celulares transmitocondriales. ....	19

<b>Cultivo y selección de líneas celulares transmitocondriales (cíbridos)</b>	<b>19</b>
<b>Estudio de los niveles de mtDNA</b>	<b>20</b>
<b>Consumo de oxígeno</b>	<b>21</b>
<b>Determinación de especies reactivas de oxígeno</b>	<b>22</b>
<b>Determinación del potencial de membrana mitocondrial</b>	<b>22</b>
<b>Detección de la red mitocondrial celular</b>	<b>23</b>
<b>Medida de niveles de ATP mitocondrial</b>	<b>23</b>
<b>Análisis estadísticos</b>	<b>24</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>24</b>
<b>Detección de mutaciones en mtDNA mediante PCR-RFLP</b>	<b>24</b>
Estudio de la mutación m.3700G>A	24
Estudio de la mutación m.13094T>C	26
<b>Análisis de los niveles de mtDNA en cíbridos transmitocondriales</b>	<b>27</b>
<b>Análisis de la función mitocondrial</b>	<b>28</b>
Resultados	28
Análisis de niveles de ATP mitocondrial	28
Mutación m.13094T>C	29
Mutación m.3700G>A	29
Análisis de actividades enzimáticas de los complejos mitocondriales	29
Mutación m.13094T>C	30
Mutación m.3700G>A	30
Análisis de especies reactivas de oxígeno (ROS)	30
Mutación m.13094T>C	31
Mutación m.3700G>A	31
Potencial de membrana mitocondrial	31
Mutación m.13094T>C	32
Mutación m.3700G>A	32
Detección de la red mitocondrial celular	32
Mutación m.13094T>C	33
Mutación m.3700G>A	33
Consumo de oxígeno	33
Mutación m.13094T>C	33
Mutación m.3700G>A	34
Discusión	34
Mutación m.13094T>C	34
Mutación m.3700G>A	35
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>36</b>

<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>37</b>
<b>ANEXO 1 .....</b>	<b>39</b>
<b>ANEXO 2 .....</b>	<b>40</b>

## GLOSARIO

- BSA: albúmina sérica bovina.
- CI: complejo I mitocondrial.
- CII: complejo II mitocondrial.
- CIII: complejo III mitocondrial.
- CIV: complejo IV mitocondrial.
- CV: complejo V mitocondrial.
- DCFH-DA: 2',7'-diclorofluoresceína-diacetato.
- DDM: dodecil maltoside.
- DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium.
- DMSO: dimetilsulfóxido.
- EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.
- FBS: suero fetal bovino.
- FCCP: Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone.
- HBSS: Hank's Balanced Salt Solution.
- LHON: neuropatía óptica hereditaria de Leber.
- mtDNA: DNA mitocondrial.
- PBS: Phosphate buffered saline.
- PCR-RFLP: Polymerase Chain Reaction. Restriction Fragment Length Polymorphism.
- PEG: polietilenglicol.
- PVDF: Fluoruro de polivinilideno.
- ROS: especies reactivas de oxígeno.
- rRNA: RNA ribosómico.
- RT-PCR: Real Time PCR.
- SDS: dodecilsulfato sódico.
- SNP: Single Nucleotide Polymorphism.
- TBE: Tris, borato y EDTA.
- TE: Tris:EDTA, 10:1.

## INTRODUCCIÓN

La neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON) es una enfermedad mitocondrial de herencia materna que provoca pérdida de la visión por degeneración de las células ganglionares de la retina.

Los síntomas de la enfermedad suelen aparecer entre los 15 y los 30 años de edad, dándose el 95% de los casos antes de los 50 años <sup>1</sup>. Comienza con la pérdida de la visión aguda o subaguda en uno de los ojos, que poco más tarde aparece en el otro aunque en un 25% de los casos se produce simultáneamente en ambos ojos. Después de la fase aguda, la pérdida de visión se vuelve crónica, debido a una atrofia de los discos oculares, a pesar de que en algunos casos puede producirse una recuperación parcial de la visión. En raras ocasiones aparecen ciertas anormalidades neurológicas, como temblor postural, neuropatía periférica, miopatías inespecíficas y desórdenes del movimiento. En algunas personas la enfermedad se puede agravar cursando con un desorden neurológico similar a la esclerosis múltiple <sup>2</sup>.

Esta enfermedad se produce por mutaciones puntuales en el DNA mitocondrial (mtDNA). Las tres mutaciones más comunes, m.3460G>A, m.11778G>A, y m.14484T>C, llamadas también mutaciones primarias, están presentes en el 90% de los pacientes, y afectan respectivamente a los genes *MT-ND1*, *MT-ND4*, y *MT-ND6* que codifican las correspondientes subunidades del complejo I (CI) de la cadena de transporte electrónico mitocondrial <sup>3</sup>.

El 10% restante de los casos está causado por diferentes mutaciones en genes mitocondriales que fundamentalmente codifican subunidades del CI y en las que los genes *MT-ND1* y *MT-ND6* acumulan la mayor parte de las mutaciones patológicas <sup>4,5</sup>.

Aún así, la patogenicidad de muchas de estas mutaciones LHON no ha sido confirmada, puesto que su estudio conlleva grandes dificultades debido a que muy diversos factores influyen en las consecuencias patológicas de las mismas. Una de estas dificultades es debida a que LHON se caracteriza por presentar una penetrancia incompleta en mutaciones homoplásmicas, hecho que aparece reflejado en alguna de las características de la enfermedad.

En primer lugar, LHON presenta especificidad tisular, puesto que aunque la mutación se encuentra normalmente en todas las células del cuerpo, sólo las células ganglionares de la retina resultan afectadas. La penetrancia incompleta también influiría en el hecho de que la pérdida de visión no afecta por igual a hombre y a mujeres, afectando al 50% de los hombres y únicamente al 10% de las mujeres portadores de alguna de las mutaciones relacionadas con la enfermedad <sup>2</sup>. Además, han sido detectadas mutaciones relacionadas con LHON en



homoplasmia en individuos sanos, sin que éstos presentaran signo alguno de la enfermedad<sup>1</sup>.

Esto mismo ocurre en otras especies animales relacionadas filogenéticamente con los humanos, como es el caso del orangután (*Pongo pygmaeus*), que en varias posiciones de su mtDNA posee nucleótidos que en humano se relacionan con mutaciones patológicas asociadas con LHON. Dado que el genoma mitocondrial de *P. pygmaeus* y el de *Homo sapiens* tienen gran similitud de secuencia, se propone que en el primero de ellos puedan existir compensaciones en la deficiencia de la cadena respiratoria. Con el estudio de este modelo se podría conocer más información acerca de las desviaciones patogénicas compensadas. Aún así, el estudio de estas compensaciones es muy complejo, y se presenta como un importante reto en la investigación de las enfermedades mitocondriales, puesto que podría tener una aplicación clínica clara en la mejora del fenotipo de pacientes con este tipo de desórdenes<sup>6</sup>.

## HIPÓTESIS DE ESTUDIO

1. La mutación m.13094T>C es la causante del fenotipo LHON en el paciente 2831.
2. Desviaciones patológicas compensadas serían una vía eficiente para la búsqueda de factores que modifiquen la penetrancia de mutaciones patológicas en el mtDNA.

## OBJETIVOS

Los objetivos principales que se presentan en este proyecto son los siguientes:

1. Determinación de la patogenicidad de la mutación m.13094T>C.
2. Búsqueda de factores que podrían afectar a la penetrancia de la mutación patológica m.3700G>A.

## MATERIALES

### Informe del caso

El paciente 2831 es un varón que presenta una clínica compatible con LHON. Se analizó mediante PCR-RFLP la presencia de las mutaciones primarias asociadas a esta enfermedad, dando un resultado negativo. Por ello se realizó la secuenciación completa del mtDNA del paciente, encontrándose los siguientes cambios (Tabla 1):

	SNPs (Gen)
Complejo I	A4769G (ND2), <b>T13094C</b> (ND5)
Complejo III	A15326G, <b>C15527T</b> (cit. b)
Complejo IV	
Complejo V	A8860G
tRNAs	
rRNAs	A750G, T1113C, A1438G, G3010A,
Reg. control	A263G, Ins315C, T318C, C16295T, T16519C

Tabla 1: Resumen de las variantes del mtDNA del paciente 2831

Todas las mutaciones encontradas son polimorfismos descritos en la población que incluyen al paciente en el haplogrupo mitocondrial H1, excepto las mutaciones m.13094T>C y m.15527C>T que se postulan como posibles mutaciones patológicas. Dado que la mutación m.13094T>C se presenta en el paciente en heteroplasmia, y este es uno de los criterios usados para definir una mutación como patogénica, unido al hecho de que haya sido descrita en otro paciente con patología mitocondrial <sup>7,8</sup>, se seleccionó como posible candidata a ser la responsable de la patología del paciente. Aún así, la mutación m.15527C>T que se encontró en el paciente en homoplasmia no podría ser descartada como posible candidata.

### Material Biológico

En cuanto al material biológico, en este estudio se ha trabajado con 5 líneas celulares diferentes:

- Fibroblastos primarios humanos control.
- Fibroblastos primarios humanos de paciente LHON (2831) con mutación m.13094T>C.
- Fibroblastos primarios de orangután (*Pongo pygmaeus*).
- Línea celular p<sup>o</sup> de neuroblastoma SH-SY5Y.
- Cíbrido transmitocondrial producido tras la fusión línea SH-SY5Yp<sup>o</sup> con plaquetas del paciente 2831.

Cada línea celular ha sido mantenida en cultivo con distintos medios de cultivo:

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Invitrogen)
- Medio de cultivo de células p<sup>o</sup> y cíbridos: DMEM suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS) y 50 µg/ml de uridina.

- Medio de cultivo de fibroblastos: DMEM suplementado con un 20% de FBS.

Otros reactivos usados en mantenimiento de cultivos celulares:

- PBS, pH 7,4 (Invitrogen)
- Tripsina (0,05 p/v): preparada con tripsina (Sigma) disuelta en PBS (Sigma) y suplementada con EDTA (Sigma).
- Uridina (10 mg/ml)
- Piruvato (50 mg/ml)
- Dimetilsulfóxido (DMSO)

### Instrumentación

- Contador de células automático Beckman Coulter
- Lector de microplacas NOVOstar, BMG Labtech
- Real-Time PCR Applied Biosystems StepOne™
- Termocicladores: Veriti 96Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) y Biometriq® T3 Thermocycler
- Nanodrop ND-1000 spectrophotometer
- OROBOROS Oxygraph-2k
- FLoid Cell Imaging Station (Life Technologies)
- Sistema de electrotransferencia iBlot (Life Technologies)
- Transiluminador (Bio-Rad)
- Evaporador *SpeedVac* (Eppendorf)
- Estación de imagen Odyssey (Li-COR)

### Kits comerciales

- ExoSAP-IT® for PCR (Affymetrix)
- Cell-titer blue y Cell-titer-Glo luminescent (Promega)
- MitoTracker® Red CMXRos (Life Technologies)
- Mito-ID® Membrane potential Cytotoxicity Kit (Enzo Life Sciences)
- CellROX® Green (Life Technologies)
- Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells (Abcam)
- NativePAGE Sample Prep Kit (Life Technologies)
- NativePAGE Novex Bis-Tris Gel System (Life Technologies)
- Reactivo Bradford (Bio-Rad)

## MÉTODOS

### Procedimientos de cultivo celular

El medio de cultivo se cambió de forma periódica cada 2-3 días hasta que las células estuvieron a un 80% de confluencia en la placa, momento en que comienza la inhibición por contacto. En este punto las células se tripsinizaron.

Para llevar a cabo la tripsinización, se retiró el medio de cultivo, las células se lavaron con PBS para eliminar restos de medio (el suero inhibe la acción de la tripsina) y se añadió la tripsina. Pasados 5 minutos se comprobó que las células se hubieran despegado de la placa, se recogieron en un volumen de medio de cultivo 3-5 veces mayor al de tripsina, para evitar un posible daño de las células y se centrifugaron para obtener el pellet celular y eliminar la tripsina.

La congelación de las células se lleva a cabo en criotubos termo resistentes en los que el volumen final de la suspensión es de 1,5 ml. La cantidad aproximada de células congeladas es de  $10^6$  por vial, que son resuspendidas en DMEM suplementado con un FBS 20% y DMSO 10%, un crioprotector permeable que evita la formación de cristales de hielo en el interior de las células. Los viales se introducen dentro de un dispositivo lleno de isopropanol, que hace que la temperatura de las células no disminuya bruscamente al ser introducido dentro del congelador  $-80^{\circ}\text{C}$ . Una vez que las células se han congelado pueden ser almacenadas en un tanque de nitrógeno líquido.

### Aislamiento de DNA a partir de células

Se resuspende el pellet de células en 0,25 ml de TE (Tris:EDTA, 10:1), tras lo cual se añaden 5  $\mu\text{l}$  de dodecilsulfato sódico (SDS) al 25% que rompe las membranas celulares y de los orgánulos y 1,25  $\mu\text{l}$  de proteinasa K (20mg/ml) que degrada las proteínas presentes en las células. La solución se mezcla e incuba a  $37^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche (O/N).

Después se añade un volumen equivalente de fenol y se agita con “Vortex” hasta que las fases que han aparecido se mezclan. La solución se centrifuga 5 minutos a 600 xg antes de seleccionar la fase acuosa, que queda situada arriba y se trasvasa a otro eppendorf (estos últimos pasos se repiten el número de veces necesario para que la fase acuosa sea de la claridad deseada).

Al sobrenadante que se le añade un volumen de Cloroformo: Alcohol isoamílico 24:1. Se agita y se centrifuga 5 minutos a 600 xg para que el reactivo añadido arrastre los restos de fenol y lave la fase acuosa obtenida anteriormente, que contiene los ácidos nucleicos.

La fase acuosa se vuelve a recoger en un nuevo eppendorf y se le añaden dos volúmenes de etanol absoluto frío, que precipita el DNA al agitar el eppendorf suavemente (se observa un ovillo de color blanco). El ovillo de DNA se recoge con una pipeta Pasteur y se pasa a otro eppendorf con la mínima cantidad de etanol. El etanol se elimina en un evaporador. El DNA se resuspende en  $\text{H}_2\text{O}$  y se deja a  $37^{\circ}\text{C}$  en agitación O/N.

Nota: En ocasiones el DNA no precipita en forma de ovillo, puesto que su concentración puede ser muy baja. En este caso, el eppendorf al que se le ha añadido el etanol absoluto frío se deja O/N a -20°C o a -80°C durante una hora para favorecer la precipitación del DNA. Tras la precipitación en frío se lleva a cabo una centrifugación fuerte a 7400 xg durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante que contiene el etanol se desecha, y el precipitado (puede no observarse) se seca en el evaporador y se resuspende en H<sub>2</sub>O como en el caso anterior.

#### Cuantificación de ácidos nucleicos

Para la cuantificación de DNA se utilizó un espectofotómetro “Nanodrop”, que calcula la concentración de ácidos nucleicos midiendo la absorbancia a 260 nm. Para calcular la pureza de la muestra, se miden también las absorbancias a 230 y 280 nm, que indican si la muestra posee proteínas, fenol u otros contaminantes.

Para realizar la cuantificación se deposita sobre el orificio de medida 1 µl de muestra. En primer lugar se realizan dos medidas con agua destilada, que limpian el aparato y fijan el blanco para posteriores mediciones. Tras esto se añade la solución a cuantificar y el programa informático nos da los valores de concentración en ng/µl. Para finalizar se realizan dos medidas más con agua destilada.

#### PCR-RFLP

Este protocolo fue utilizado para comprobar que los fibroblastos de *P. pygmaeus* contenían en su secuencia la mutación m.3700G>A causante de LHON en humanos y que los tejidos estudiados del paciente 2831 (sangre, fibroblastos y cíbridos) portaba la mutación m.13094T>C.

En primer lugar se procede a la puesta a punto de la PCR. Los oligos utilizados en los dos experimentos fueron los siguientes (Tabla 2):

<u><b>m.3700G&gt;A</b></u>	
htmL3574	5'CTT CTA CTA TGA ACC CCC CTC C3'
hmtH4364	5'GGT GGC ACG GAG AAT TTT GG3'
<u><b>m.13094T&gt;C</b></u>	
12906Fw	5'CCT ACA CTC CAA CTC ATG AGA CCC A3'
13310Rc	5'TGC TAG GTG TGG TTG GTT GAT GCC G3'

Tabla 2: Oligos para PCR

El Mix necesario para la utilización de este kit es el siguiente (Tabla 3):

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

**Tabla 3: Mix de reacción para PCR**

Las muestras se amplificaron a cuatro temperaturas diferentes (56°C, 58°C, 60°C y 62°C) para optimizar la temperatura de *annealing* de los oligos con el siguiente programa de temperaturas:

- 95°C- 2 min
  - 95°C- 30 s
  - 60°C (Tª *annealing*)- 30 s
  - 72°C- 90 s
  - 72°C- 5 min
  - 4°C- ∞
- } 35 ciclos

Para comprobar que la amplificación se ha llevado a cabo correctamente se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 1%, realizado en buffer TBE 1X (Tris, borato y EDTA).

Tras la visualización del gel, las muestras amplificadas a 60°C, que aparentemente es la temperatura óptima, se cortan con la enzima de restricción HhaI (Fermentas) en el caso de la mutación m.3700G>A y AluI (Fermentas) para la mutación m.13094T>C, utilizando su buffer correspondiente y según marca el protocolo comercial de cada enzima. Se deja incubando O/N a 37°C, temperatura óptima de las enzimas.

Pasado el tiempo de incubación, se realiza una nueva electroforesis en gel de agarosa al 2% para observar los fragmentos de restricción.

#### Cuantificación de proteínas mediante el método Bradford

Esta técnica permite cuantificar la cantidad de proteína total presente en una muestra mediante una reacción colorimétrica.

En primer lugar se realiza una recta de calibrado con albúmina sérica bovina (BSA) partiendo de un stock de 1 mg/ml, para lo cual se preparan una serie de diluciones de concentración conocida con agua destilada como se indica en la siguiente tabla (Tabla 4):

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

**Tabla 4: Recta de calibrado para Bradford**

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

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

#### Enriquecido mitocondrial a partir de células cultivadas para electroforesis en condiciones no desnaturalizantes

Este protocolo fue utilizado para extraer las proteínas mitocondriales de las líneas celulares de fibroblastos.

Son necesarias 5 placas de 150 mm a un 80% de confluencia. La extracción se realiza con el kit “Mitochondria Isolation Kit for Culture Cells” de Abcam y el kit “NativePAGE Sample Prep Kit” de Life Technology. Una vez que se han obtenido las células de las placas, todo el protocolo se realiza en hielo y todas las centrifugaciones son a 4°C para evitar la degradación de las proteínas.

Antes de comenzar el protocolo de extracción se deben recoger las células con “scrapers” o raspadores con los que se recogen las células de manera mecánica y se resuspenden en PBS. Se obtiene el pellet de células mediante centrifugación y se congela a -80°C. Con la congelación y posterior descongelación de los pellet celulares se consigue la ruptura de las membranas celulares.

Una vez descongelado, el pellet celular se resuspende en 750 µl de Reagent A (kit Abcam), se cuantifica la cantidad aproximada de proteína mediante Bradford y se ajusta la concentración a 5 mg/ml de proteína, tras lo cual las muestras se incuban en hielo 10 minutos.

Las células resuspendidas en Reagent A se transfieren a un homogenizador tipo “potter” y se someten a 10 golpes de 500 rpm, que van a lisar las células por cizallamiento. Para eliminar estos restos celulares (núcleos y restos de membrana) se centrifuga el homogenado a 1000 xg durante 10 minutos.

El sobrenadante se recoge y se rotula como SN1, mientras que el precipitado se resuspende en Reagent B (kit Abcam) en el mismo volumen que hay de Reagent A (se debe tener en cuenta que al ajustar la concentración en el Bradford se ha modificado el volumen de Reagent A). Esta suspensión se centrifuga a 1000 xg durante 10 minutos igual que en el caso anterior y se vuelve a recoger el sobrenadante, que se mezcla con SN1. Con este paso se consigue de nuevo eliminar cualquier resto de núcleos o de membranas que pudiera quedar en la muestra.

Ambos sobrenadantes se someten a una centrifugación fuerte a 12000 xg durante 5 minutos, tras lo que cual se descarta el sobrenadante y los pellets se vuelven a resuspender en Reagent B y a centrifugar a 12000 xg durante 15 minutos. Con estas centrifugaciones fuertes se consigue que las mitocondrias queden en el pellet, por lo que el sobrenadante se descarta y el pellet se resuspende en NativePAGE 1X Sample Buffer (kit Life Technology), al que se le añade inhibidor de proteasas.

La cantidad de proteína aislada (se trata de un enriquecido de mitocondrias) se cuantifica mediante un Bradford y se añade dodecil maltoside (DDM) al 10% (kit Life Technology) para tener en la disolución 2,5 g de este detergente por cada gramo de proteína. Con la adición de este compuesto se consigue romper las membranas mitocondriales y liberar de ese modo los complejos de la cadena respiratoria. La solución se incuba 15 minutos en hielo y se lleva a cabo una centrifugación a alta velocidad (20000 xg durante 30 minutos).

El sobrenadante contiene las proteínas mitocondriales, que se cuantifican con un último Bradford para guardar alícuotas a la concentración deseada a -80°C.

#### Electroforesis de proteínas en condiciones no desnaturizantes

Este protocolo de electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes fue llevado a cabo para analizar posteriormente la presencia y actividad de los complejos mitocondriales en las diferentes muestras proteicas obtenidas mediante los protocolos detallados anteriormente.



Para llevar a cabo este experimento se utiliza el Kit NativePAGE Novex Bis-Tris System (Life Technologies). Las muestras de proteínas, que se encontraban congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , deben ser acondicionadas para poder ser cargadas en el gel, para lo cual se les añade tampón de carga en una proporción de un cuarto respecto a la cantidad de detergente DDM que se adicionó a cada muestra.

El gel en el que se cargan las muestras se trata de un gel de poliacrilamida en gradiente. El hecho de que dentro del mismo gel haya diferentes porcentajes de poliacrilamida favorece la correcta separación de los complejos mitocondriales, puesto que cada uno tiene un peso molecular diferente, y de este modo, tanto los de alto peso como los de bajo peso molecular podrían separarse adecuadamente. Antes de cargar las muestras, los pocillos del gel deben ser lavados con abundante agua destilada y con la solución del cátodo para eliminar los posibles restos de poliacrilamida restantes.

Los tampones a preparar para poner en marcha la electroforesis son diferentes para el ánodo y el cátodo, y son marcados en el protocolo de la casa comercial.

Las muestras se cargan en el gel por duplicado, puesto que la mitad del gel será utilizada para Western-Blot y la mitad restante será utilizada para medir las actividades enzimáticas de los complejos mitocondriales. La cantidad de proteína necesaria para la detección mediante Western-Blot es de  $20\text{ }\mu\text{g/pocillo}$  y para en ensayo de las actividades es de  $40\text{ }\mu\text{g/pocillo}$ .

#### Electrotransferencia de proteínas en gel a membrana

Continuando con el protocolo anterior, la mitad del gel destinada al revelado mediante Western-Blot se transfiere a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) con el sistema iBlot de Life Technologies, de modo que las proteínas se encontrarán entonces en la membrana.

Una vez realizada la transferencia la membrana se incuba en una solución al 8% de ácido acético durante 5 minutos y en agitación para fijar las proteínas, tras lo cual se incuba otros 5 minutos en agua destilada y se seca al aire.

#### Western-Blot

Continuando con el protocolo anterior, una vez que las proteínas se encuentran fijadas a la membrana, se realiza un Western-Blot.

La membrana se activa para permitir la inmunodetección mediante 3 incubaciones en metanol con una duración de 30 segundos, seguidas de un lavado con agua destilada durante 5 minutos. Una vez activada, la membrana debe ser bloqueada para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos a ésta con una solución de leche al 5% (en PBS) que se deja en contacto con la membrana durante 60 minutos en agitación.

Los anticuerpos primarios que se unirán específicamente a los complejos mitocondriales se preparan en una solución de PBS-Tween al 1% de leche y una vez añadidos a la membrana se incuba O/N.

Al día siguiente se realizan 4 lavados con PBS-Tween y se prepara el anticuerpo secundario en esta misma solución al 0,1% de leche. La membrana se incuba con esta anticuerpo durante una hora y se escanea entonces utilizando la estación de imagen Odyssey.

#### Ensayo de las actividades de los Complejos Mitocondriales

Una vez realizada la electroforesis no desnaturizante de las proteínas mitocondriales, con este protocolo se ensayó la actividad enzimática de los complejos de la cadena respiratoria <sup>9</sup>. En primer lugar, el fragmento del gel destinado al ensayo de los complejos CI+CII, CIV y CV se separan, puesto que cada uno tiene un tratamiento diferente. Para la detección de los complejos CI+CII se incuba un mínimo de 10 minutos en tampón TRIS/HCl 5mM pH 7,2, mientras que para la detección de la actividad de los complejos CIV y CV la incubación se realiza en tampón fosfato 50 mM pH 7,2 durante el mismo tiempo. Una vez realizada la incubación, la actividad de los distintos complejos se ensaya con las siguientes soluciones de detección (Tabla 5):

<b>CI+CII</b>	CI	Nitro Blue tetrazolium chloride (NTB) (2,5 mg/ml) + NADH (10 mg/ml)
	CII	Succinato (1M) + Metasulfato de feniaccina (250 mM en DMSO) + NTB (2 mg/ml)
<b>CIV</b>	CIV	Diaminobenzidina (1 mg/ml) + Citocromo c (5 mM)
<b>CV</b>	CV	ATP (8 mM) + Nitrato de plomo (0,2%)

**Tabla 5: Soluciones de revelado para actividades de complejos mitocondriales**

Los geles se incuban O/N con las soluciones citadas a Tª ambiente y seguidamente se visualiza la tinción. En el gel de los complejos CI+CII se debe parar la reacción enzimática mediante la adición de una solución de metanol (50%) y ácido acético (10%). Esta misma solución se utiliza para desteñir el gel debido a que presenta color azul. Para el análisis de los geles se realiza un escaneado del gel y se cuantifica la actividad por análisis de la intensidad de la tinción con el programa QuantityOne.

### Fusión de SH-SY5Y p° con plaquetas. Creación de líneas celulares transmitocondriales.

Se llevó a cabo la fusión de plaquetas del paciente con mutación m.13094T>C con la línea celular SH-SY5Yp° para la creación de líneas celulares transmitocondriales o cíbridos<sup>10,11</sup>.

Las plaquetas se descongelan y se centrifugan, obteniendo un pequeño pellet. La línea p° en la que se va a llevar a cabo la fusión se debe encontrar en un 80% de confluencia, para que las células se encuentren en condiciones de crecimiento y no secreten factores inhibidores o de muerte. La placa con las células se tripsiniza y se procede al conteo de las células. Es necesario contar con una concentración aproximada de  $0,5 \times 10^6$  cel/ml para cada fusión (en el caso del estudio se obtuvieron 2 ml de células SH-SY5Yp° para cada cíbrido), que se añaden suavemente a cada pellet de plaquetas, de modo que quedan en contacto ambos tipos celulares.

Para favorecer la fusión de las membranas se añade polietilenglicol (PEG) y medio p° (DMEM suplementado con uridina y 10% FBS). Se realiza una centrifugación para que los dos tipos celulares queden estrechamente en contacto, que se lleva a cabo sin deceleración para evitar que las células se puedan dañar y posteriormente se siembran en placa de 100 mm de diámetro.

Se debe tener en cuenta que en esta placa no sólo habrá cíbridos, sino que también puede haber células p°, por lo que se debe realizar una selección de los primeros.

### Cultivo y selección de líneas celulares transmitocondriales (cíbridos)

Una vez realizada la fusión de plaquetas del paciente 2831 y células SH-SY5Yp°, las células se separan mediante citometría de flujo y se obtienen dos placas multipocillo de 96 con una única célula por pocillo.

Las células se cultivan con 200 µl de medio p° suplementado con antibiótico, que se cambia semanalmente. Los cíbridos tienen en este punto un desarrollo muy lento, debido a que no detectan factores estimulantes del crecimiento secretados por células vecinas. Por esta razón, es muy probable que en la mayoría de los pocillos no lleguen a desarrollarse los clones. Una vez que en un pocillo han crecido las células y se están desarrollando correctamente, se tripsinizan y transfieren a una placa multipocillo de 48 con 500 µl de medio de cultivo suplementado con antibiótico.

El siguiente paso es la transferencia de estos clones a placas de 6 pocillos. Una vez que las células se encuentran en estado de confluencia en estas placas, se tripsinizan y se obtiene mediante centrifugación el pellet de células. La mitad de estas células se resiembran en placas de 6 pocillos, mientras que las células restantes son utilizadas para extracción de DNA, que será utilizado para comprobar que esos clones son cíbridos con la mutación y no células SH-SY5Yp°.

### Estudio de los niveles de mtDNA

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

Para poder conocer cuantitativamente la cantidad de mtDNA de las muestras se contruye una recta patrón utilizando una solución que contiene un número conocido de plásmidos. Uno de los plásmidos contiene el fragmento del gen mitocondrial mientras que el otro lleva insertado un fragmento del gen nuclear. Realizando el cociente entre el valor obtenido con la sonda mitocondrial y el de la nuclear para cada una de las muestras y comparándolo con los valores de la recta patrón se consigue el número de copias de mtDNA por número de copias del gen nuclear. Las amplificaciones se realizan con el mix comercial “TaqMan® Gene Expression Master Mix” de Applied Biosystems, que contiene los dNTPS, la enzima Taq polimerasa y el buffer de reacción.

A cada pocillo se le añaden 20 µl de mezcla de reacción, que tiene la siguiente composición (Tabla 6):

MIX	10 µl
Sonda FAM	0,5 µl
Oligo L (5 µM)	0,5 µl
Oligo H (5 µM)	0,5 µl
RNAasa P	1 µl
DNA (10 ng aprox)	5 µl
PCR Grade Water (Roche)	2,5 µl

**Tabla 6: Mix de reacción para RT-PCR.**

La reacción se lleva a cabo en un aparato StepOne™ utilizando placas de 96 pocillos y con las condiciones indicadas a continuación:

- 50°C- 2 min
  - 95°C- 10 min
  - 95°C- 15 seg
  - 60°C- 1 min
  - 4°C- ∞
- } 40 ciclos

### Consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno se midió en las diferentes estirpes celulares utilizadas para observar el comportamiento de su cadena respiratoria mitocondrial. Se mide en un sistema de alta resolución llamado Oroboros®, que utiliza electrodos muy sensibles para detectar la velocidad de consumo de oxígeno de un tipo celular. Se basa en que una muestra celular en una cámara cerrada, hará disminuir el oxígeno presente en la misma. Al representar esta disminución frente al tiempo, se obtiene la velocidad de consumo de oxígeno por esa muestra. El sistema de medida está acoplado a un software llamado DatLab4 que nos aporta información sobre las velocidades de consumo de oxígeno, así como de la estabilidad de la señal.

Para llevar a cabo el estudio, las células no deben encontrarse en un nivel de confluencia mayor al 80%, puesto que en este punto el crecimiento celular comienza a inhibirse y los resultados obtenidos podrían no ser fiables. Una vez que se encuentran al nivel de crecimiento adecuado, las células se tripsinizan y se cuentan. La concentración de células adecuada para realizar el estudio es de  $2 \times 10^6$  células, que se encuentran suspendidas en 2 ml de medio DMEM sin FBS para evitar la formación de burbujas dentro de la cámara.

La suspensión celular se carga en la cámara y ésta se cierra para evitar la entrada de más oxígeno al interior. Se debe esperar a que el flujo de oxígeno se estabilice para obtener el valor de respiración endógena de las células. A continuación se añade oligomicina (la dosis depende de la línea celular de la que se trate) que inhibe la ATP sintasa y permite determinar el consumo de oxígeno en estas condiciones o consumo de oxígeno filtrante. Una vez que el consumo de oxígeno se estabiliza, se procede a añadir FCCP, que desacopla la cadena transportadora de electrones mitocondrial. De este modo se mide la respiración desacoplada, que representa la máxima capacidad del sistema de transporte en estudio. Para finalizar se inhibe el consumo de oxígeno utilizando un inhibidor del complejo IV (KCN), que da un valor de la respiración no dependiente de cadena respiratoria, y que se restará a todos los demás valores obtenidos.

Se debe tener en cuenta que previa realización de estos estudios, deben ser tituladas las concentraciones de todas las drogas a utilizar para cada línea celular. Las concentraciones utilizadas en cada línea fueron las siguientes (Tabla 7):

	Fibroblastos humanos	Fibroblastos <i>P. pygmaeus</i>
Oligomicina	36 nM	54 nM
FCCP	0,1375 µM, 0,28 µM, 0,84 µM, 1,69 µM, 2,53 µM	0,28 µM, 0,84 µM, 1,69 µM, 2,53 µM

Tabla 7: Concentraciones de drogas tituladas para líneas celulares de Fibroblasto humano y *P. pygmaeus*

### Determinación de especies reactivas de oxígeno

La generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la mitocondria puede determinarse utilizando el compuesto 2',7'-diclorofluoresceína-diacetato (DCFH-DA), que permite cuantificar la concentración de  $H_2O_2$  producido dentro de la célula. La sonda en la forma DCFH-DA no emite fluorescencia y entra a las células atravesando la membrana plasmática de forma libre. Una vez dentro es deacetilada y transformada a la forma DCFH, que no puede atravesar la membrana plasmática, por lo que queda retenida intracelularmente. La molécula de DCFH reacciona con el  $H_2O_2$  presente en la célula oxidándose y se convierte en DCF, que cuando es excitada con una longitud de onda de 504 nm, emite a 529 nm.

Para llevar a cabo el experimento, el medio de cultivo se retira de las placas, se realiza un lavado con PBS y posteriormente las células se tripsinizan, y se cuentan. El pellet celular se tiñe con la solución que contiene el DCFH-DA y se incuba a 37°C durante 30 minutos. Pasado este tiempo, las células se centrifugan y se lavan con PBS. Una vez se ha llevado a cabo la tinción, el pellet se resuspende en 3 ml de Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), con los que se realizan medidas por triplicado mediante citometría de flujo.

Además de la determinación de ROS mediante citometría de flujo, también se realizó una tinción en placa en la que la visualización se llevó a cabo mediante el aparato "Floid Cell Imaging Station", que permite detectar fluorescencia tanto en el verde como en el rojo o el azul.

### Determinación del potencial de membrana mitocondrial

Este protocolo se realizó siguiendo el protocolo del kit comercial "Mito-ID® Membrane Potential Cytotoxicity Kit", que se basa en la adición de una sonda catiónica fluorescente a las células que emite en dos longitudes de onda diferentes, cuando se acumula en forma de monómeros en el citosol emite fluorescencia verde mientras que cuando se acumula en forma de agregados dentro de la mitocondria emite fluorescencia roja/ naranja. Las mitocondrias que posean un bajo potencial de membrana, es decir, que se encuentren despolarizadas emitirán fluorescencia verde mientras que las mitocondrias más polarizadas emiten fluorescencia roja. Esto se debe a que dado que la sonda es de naturaleza catiónica, tiende a desplazarse hacia las zonas más negativas o de mayor potencial dentro de la célula y se introduce en la mitocondria.

Al igual que para el cuantificar las ROS en la célula, para determinar el potencial de membrana también se utiliza el citómetro de flujo, puesto que las células emiten fluorescencia. Además de realizar la detección de las células mediante esta técnica también se realizó una tinción en placa de las líneas celulares que se visualizó con "Floid Cell Imaging Station".

### Detección de la red mitocondrial celular

La detección de la red mitocondrial celular se realiza con el kit comercial MitoTracker® Red CMXRos.

Para llevar a cabo el ensayo se debe tener un cultivo de las líneas celulares a un nivel bajo de confluencia, para que la visualización de las células sea mejor. Se realiza una dilución 1:10000 de la solución Stock del kit (1 mM), trabajando a una concentración final de 0,1  $\mu$ M. La solución se añade a las placas de cultivo (una vez retirado su medio y lavado con PBS) y se cultiva durante 45 minutos a 37°C. Pasado el tiempo de incubación la tinción fluorescente se visualiza con el “Floid Cell Imaging Station”.

### Medida de niveles de ATP mitocondrial

Para realizar el experimento se deben sembrar  $10^4$  células en cada pocillo de en una placa de 96 en medio DMEM 25 mM y se dejan en cultivo 24 horas. Cada una de las tres líneas celulares se siembra en 12 pocillos, para poder realizar un número elevado de mediciones que permita obtener datos fiables. Además, para poder referenciar los niveles de ATP observados en cada línea celular a un número concreto de células, se siembran otros 12 pocillos por línea en los que se llevará a cabo un recuento celular. El reactivo añadido es parte del kit de viabilidad celular CellTiter-Blue, que se basa en la capacidad de las células viables de convertir una sustancia incolora (resazurina) en una molécula fluorescente (resorufina). Una vez transcurridas las 24 horas de cultivo deben prepararse los medios de incubación que serán añadidos a las células. Las composiciones son las siguientes (Tabla 8):

<b>Reactivo Blue</b>	Medio DMEM free (sin glucosa)
	Piruvato 50 mg/ml
	CellTiter-Blue
<b>Reactivo ATP</b>	Medio DMEM free
	Piruvato 50 mg/ml
	Deoxiglucosa 1M

Tabla 8: Composición de reactivos para medida de niveles de ATP mitocondriales.

Se añade medio sin glucosa y suplementado con piruvato de modo que las células no puedan llevar a cabo la glucólisis y todo el ATP provenga de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Además, la adición de deoxiglucosa hace que la glucólisis quede inhibida por completo, puesto que al encontrarse en exceso en el medio, es captada por las

enzimas glucolíticas en favor de la glucosa, y al no poder ser degradada puesto que posee un grupo deoxi-, las enzimas quedan inhibidas y no se produce ATP por medio de la glucólisis.

Una vez preparados los reactivos, el medio de cultivo se elimina y se realiza un lavado de los pocillos con PBS. Posteriormente se añaden 100 µl por pocillos de los medios de incubación. En la mitad de los pocillos se añade el reactivo CellTiter-Blue<sup>R</sup>, a los que también se echarán 20 µl de tinción Blue. A la otra mitad de los pocillos se les añade el reactivo de ATP. Las células se incuban durante 2 horas con estos reactivos a una temperatura de 37 °C, tras lo cual se realizan las medidas en el lector de microplacas NOVOstar.

En primer lugar se realiza una medida de fluorescencia para ajustar la saturación de las muestras, tras lo cual se añade a cada pocillo 100 µl de reactivo de luminiscencia. En segundo lugar se agita la placa durante aproximadamente 2 minutos, antes de realizar la medición de luminiscencia de los pocillos, que nos dará los valores del ATP sintetizado por cada célula.

#### Análisis estadísticos

Para la realización de los análisis estadísticos se ha utilizado el programa informático StatView 6.0. En los gráficos se representan los valores medios en porcentaje respecto a la media del control y la desviación estándar. Mediante el test de Kolmogorov-Smirnov se comprueba si la distribución de las variables es normal, tras lo cual se realiza un test *t* desapareado en el que se comparan los distintos parámetros. Los resultados se consideran estadísticamente significativos con un *P-valor* inferior a 0,05.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Detección de mutaciones en mtDNA mediante PCR-RFLP

Antes de llevar a cabo las pruebas bioquímicas con las diferentes líneas celulares en estudio en el proyecto se debe llevar a cabo un análisis de las mutaciones presentes en las mismas. Para esto, se realizó un análisis mediante PCR-RFLP de las muestras de DNA obtenidas de las diferentes líneas celulares.

#### *Estudio de la mutación m.3700G>A*

Como ya se ha comentado previamente en la introducción de este mismo trabajo, la mutación m.3700G>A se postula causante de la enfermedad de LHON en humanos y sin embargo la adenina aparece en el genoma de *P. pygmaeus* como wild-type.

Para comprobar que este animal posee realmente esa base en la posición equivalente de su mtDNA se realizó un estudio mediante PCR-RFLP.



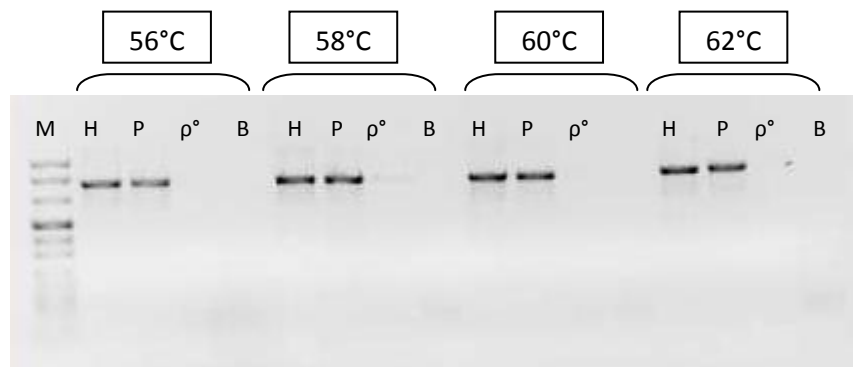


Figura 1: Gel de agarosa con muestras de DNA de fibroblastos humanos control (H), fibroblastos de *P. pygmaeus* (P), células 143Bp° (ρ°) y Blanco (B). Las amplificaciones se llevan a cabo a las temperaturas de 56, 58, 60 y 62°C. El marcador de peso molecular (M) es de 1 kb.

El patrón de bandas de la amplificación (Figura 1) muestra que a las cuatro temperaturas testadas únicamente amplifican las muestras de humano y *P. pygmaeus*, salvo a 58°C, que se observa una pequeña amplificación del control negativo ρ°. Al ser más intensas y definidas las bandas de las muestras amplificadas a 60°C, son éstas las que se toman para realizar el corte con la enzima HhaI. Realizado el corte con esta enzima, los fragmentos esperados para las muestras son los siguientes (Figura 2):

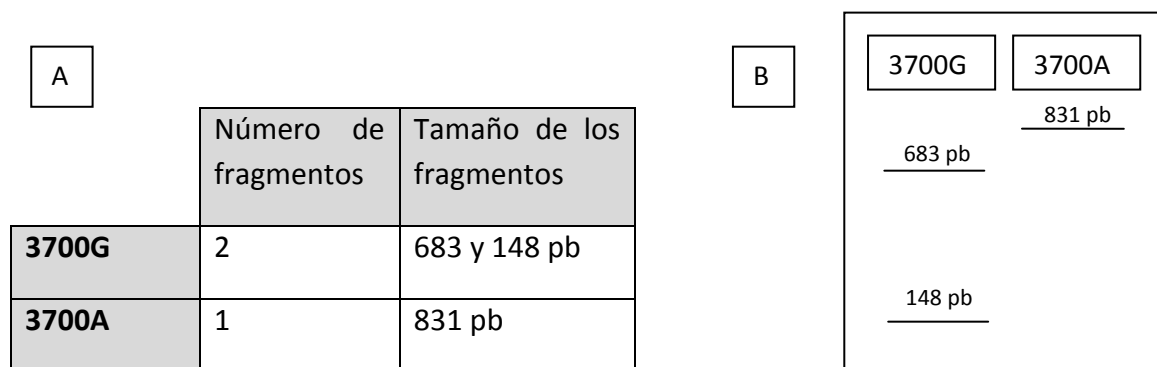


Figura 2: Corte con enzima de restricción HhaI el fragmento amplificado con oligos htmL3574 y hmtH4364. A) Número y tamaño de los fragmentos resultantes. B) Patrón de corte de la enzima tras electroforesis en gel de agarosa.

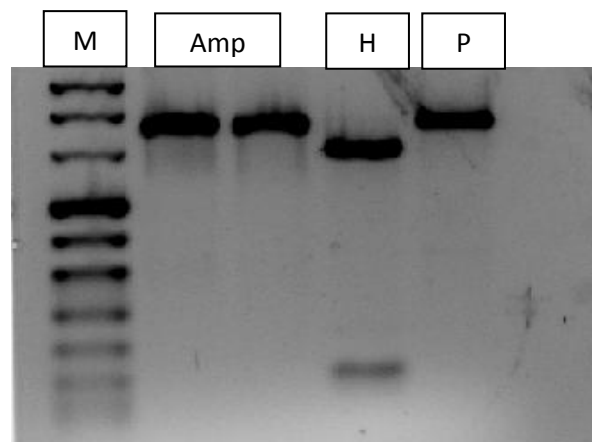


Figura 3: Gel de electroforesis de muestras digeridas con enzima HhaI. El marcador de peso molecular es de 1 kb. Se cargaron los amplificadores (AMP) de humano (izq.) y de *P. pygmaeus* (drcha.) para observar el tamaño del fragmento sin cortar. A la derecha están las bandas correspondientes al corte de la muestra de humano (H) y *P. pygmaeus* (P).

Tras la digestión con la enzima HhaI (Figura 3) se observa que en la muestra de humano control aparecen dos bandas, correspondientes con los fragmentos de 683 y 148 pb, mientras que la muestra de *P. pygmaeus* no fue cortada por la enzima de restricción, lo que indica que tal y como se esperaba, éste animal posee en la posición 3700 del mtDNA adenina en lugar de guanina.

#### *Estudio de la mutación m.13094T>C*

Para corroborar que las muestras del paciente 2831 poseían la mutación m.13094T>C se realizó al igual que en caso anterior un análisis mediante PCR-RFLP. Primeramente se amplificaron las muestras de estudio con los oligos correspondientes a una temperatura de *annealing* de 62°C. Es a esta temperatura a la que la amplificación se lleva a cabo de la manera más específica. Aún así, el control negativo  $\rho^0$  amplifica, debido posiblemente a la existencia de un pseudogen nuclear reconocido por los oligos.

La digestión del fragmento amplificado, que tiene una longitud de 304 pb, se lleva a cabo con la enzima AluI, que corta las muestras mutantes (13094C) pero no las normales (13094T).

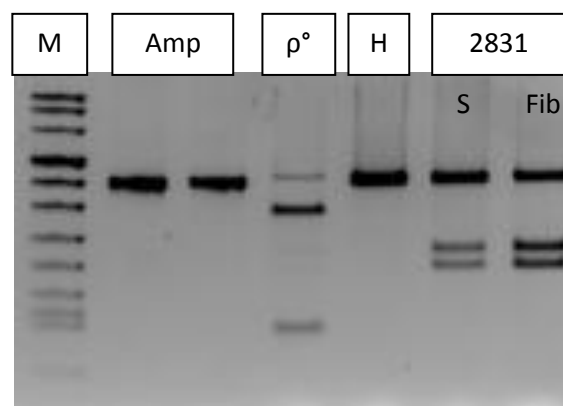


Figura 4: Gel de electroforesis de muestras digeridas con enzima AluI. El marcador de peso molecular es de 1 kb. Se cargaron los amplificados (AMP) de humano (izq.) y de mutante 2831 (drcha.) para observar el tamaño del fragmento sin cortar. A la derecha están las bandas correspondientes al corte del control  $\rho^0$ , fibroblasto humano (control negativo de corte) (H) y las correspondientes al mutante 2831 (muestras de sangre y fibroblastos).

Tras llevar a cabo la digestión con la enzima AluI en el gel de electroforesis (Figura 4) se observa que el control negativo de fibroblastos humanos no ha cortado, tal y como se esperaba, y que tanto la muestra de sangre como la de fibroblastos del paciente 2831 sí lo ha hecho. Por la intensidad de estas bandas se puede deducir que el paciente presenta un nivel mayor de mutación en fibroblastos que en sangre, tejido posee un 50% de mitocondrias mutadas. Cabe destacar que el hecho de que al amplificar las muestras no se consiga eliminar la amplificación de la línea  $\rho^0$  no afecta a la detección de la mutación mediante RFLP, puesto que como se observa en la imagen, esta muestra corta con otro patrón de bandas totalmente diferente al del mutante.

Esta misma técnica fue también utilizada para determinar si los cíbridos creados con la fusión de plaquetas del paciente 2831 y células SHp° poseían mtDNA con la mutación. Las muestras de DNA de los diferentes cíbridos fueron amplificadas igual que en el caso anterior y se realizó el corte con la enzima de restricción AluI.

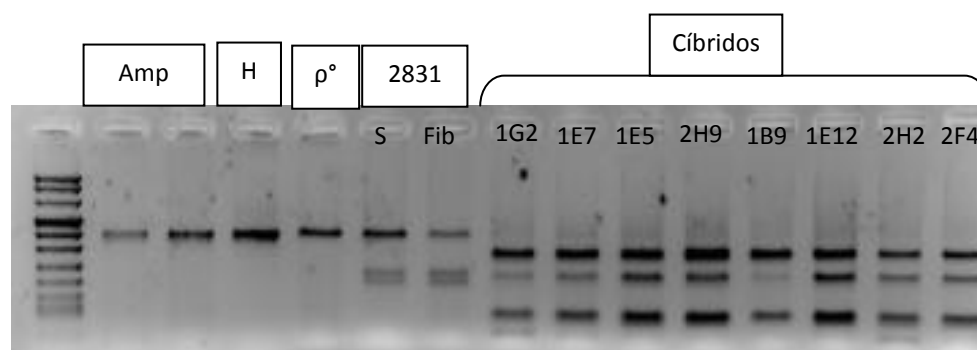


Figura 5: Gel de electroforesis de muestras digeridas con enzima AluI. El marcador de peso molecular es de 1 kb. La muestra H (fibroblastos humanos control) representa el control negativo de corte. Las muestras del paciente 2831 representan el control positivo de corte. Las muestras de cíbridos presentan un patrón de corte diferente al del control positivo.

En este caso (Figura 5) la muestra p° no ha cortado, probablemente debido a una mala preparación de esta muestra, mientras que los controles positivos de la mutación sí lo han hecho. Se puede observar que todos los cíbridos han cortado, pero no lo han hecho con el patrón de bandas del mutante sino que lo han hecho con uno similar al de la muestra p° (Figura 4). De estos resultados se deduce que lo que ha amplificado en los cíbridos no es realmente el fragmento del mtDNA deseado, sino un pseudogen nuclear.

Para evitar este problema se podría hacer una PCR anidada en la que se amplifique inicialmente un fragmento más largo que contenga el de interés, y que con los amplificadores de esta primera PCR se haga una segunda con los oligos utilizados anteriormente. La primera PCR se realizó, pero no se consiguió que ninguna de las muestras de cíbridos amplificara, que podría deberse al hecho de que los cíbridos no posean realmente mtDNA o a que aún no hayan recuperado los niveles normales de mtDNA.

#### Análisis de los niveles de mtDNA en cíbridos transmitocondriales

Para comprobar que los cíbridos transmitocondriales realmente habían adquirido mtDNA del paciente 2831 se realizó una RT-PCR para detectar niveles de mtDNA. Esta técnica es mucho más sensible que una PCR convencional, por lo que permite detectar valores mucho menores de mtDNA.

A						
Línea celular	SHp°	Fb hum	Fb 2831	Sangre 2831	FUS SH 2831 (ab)	FUS SH 2831 (sin ab)
MT/NUC	0,90	463,53	448,94	131,90	21,73	30,77

B

Línea celular	2F4	2H2	1E12	1B9	2H9	1E5	1E7	1G2	1G7	1H5
MT/NUC	0,90	1,07	1,67	0,92	1,25	1,29	0,91	0,89	1,44	0,85

Tabla 9: Resultados de medida de niveles de mtDNA. Los resultados muestran los niveles de fluorescencia emitidos por sonda mitocondrial (FAM) respecto a sonda nuclear (VIC). A) Medidas en líneas celulares control. B) Medidas en híbridos.

Los resultados obtenidos (Tabla 9) reflejaron que los híbridos no poseen mtDNA, puesto que los valores son similares a los que posee la célula SH-SY5Yp°. Únicamente el híbrido 1E12 posee valores ligeramente más altos de mtDNA, aunque éstos tampoco son muy elevados.

Estos resultados pueden deberse a que los híbridos normalmente necesitan 40 pases en cultivo para que sus niveles de mtDNA se estabilicen y alcancen niveles normales. Sin embargo, los híbridos del estudio llevaban en cultivo muy poco tiempo y habían sido duplicados 5 veces. Por lo tanto, esta prueba debería realizarse más adelante, cuando los híbridos se hayan duplicado más veces y su mtDNA se haya recuperado.

#### Análisis de la función mitocondrial

#### **Resultados**

##### ***Análisis de niveles de ATP mitocondrial***

Como parte del estudio de la implicación de las mutaciones en estudio en la patogenicidad mitocondrial se analizaron los niveles de ATP producidos por los diferentes tipos celulares mediante la cadena de transporte mitocondrial. La siguiente gráfica refleja los resultados obtenidos en este experimento:

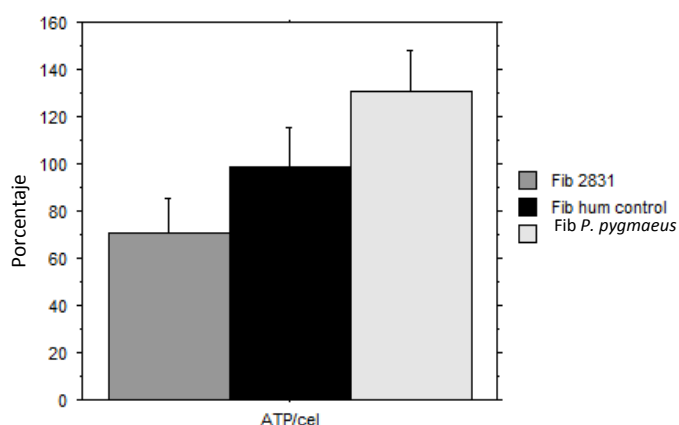


Figura 6: Producción de ATP mitocondrial de fibroblastos 2831 y *P. pygmaeus*. El valor de los niveles de ATP mitocondrial de la línea celular Fibroblastos control se estableció como el 100%. Fb control, 100±16,94. Fb 2831, 70,36±14,65. Fb *P. pygmaeus*, 130,76±17,09.

#### *Mutación m.13094T>C*

Como se puede observar en la gráfica (Figura 6), la producción de ATP en los fibroblastos del mutante se ha visto disminuida en un 30% respecto de los fibroblastos control.

El análisis estadístico de los datos obtenidos en el ensayo para fibroblastos 2831 y fibroblastos humano control determina que existen diferencias estadísticamente significativas en la reducción de la cantidad de ATP sintetizada en la mitocondria entre ambos tipos celulares, siendo el dato del *p*-valor de 0,0002.

#### *Mutación m.3700G>A*

En este caso la producción de ATP se encuentra aumentada aproximadamente en un 30% respecto del control (Figura 6), y en el análisis estadístico el *p*-valor obtenido fue de 0,0001. De estos resultados se puede deducir que la mutación en estudio no afecta negativamente a las células de *P. pygmaeus* para la producción de ATP.

#### **Análisis de actividades enzimáticas de los complejos mitocondriales**

Dado que las mutaciones en estudio en el presente proyecto afectan a las subunidades MT-ND1 y MT-ND5 que forman parte del CI de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, se realizó un análisis de las actividades de los distintos complejos mitocondriales para estudiar su viabilidad.

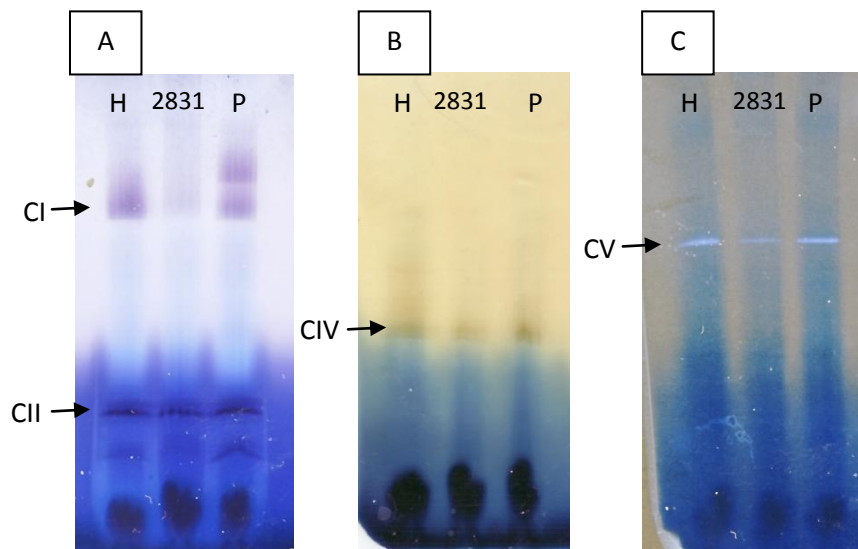
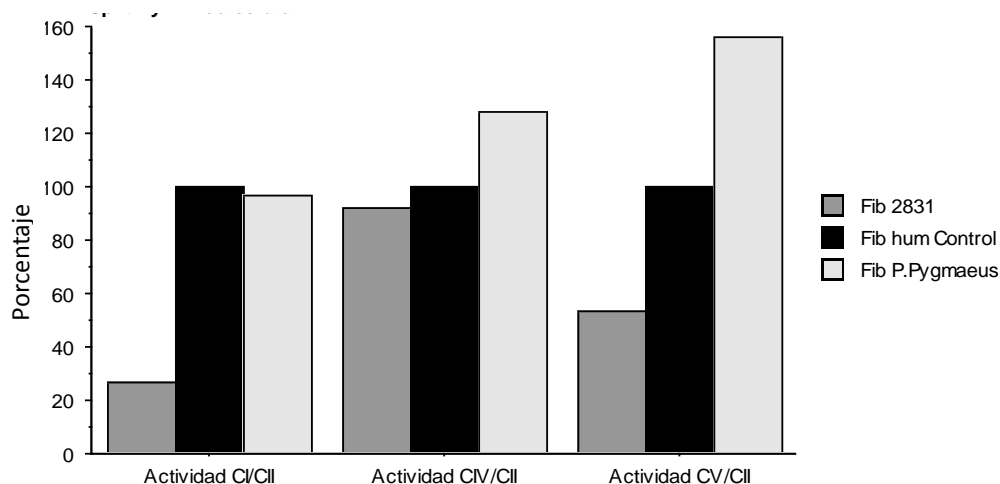


Figura 7: Geles de electroforesis nativa con revelado de actividades de complejos mitocondriales. Las muestras analizadas son fibroblasto humano control (H), fibroblasto 2831 (2831) y fibroblasto de *P. pygmaeus* (P). A) Complejos I y II. B) Complejo IV. C) Complejo V.



**Figura 8:** Actividades de los complejos mitocondriales (CI, CIV y CV) referidas a la actividad del CII. El valor de las actividades de la línea celular Fibroblastos control se estableció como el 100%.

La cuantificación de las actividades enzimáticas de los complejos mitocondriales se realizó con el programa QuantityOne mediante el análisis de las intensidades de las bandas obtenidas en los geles revelados (Figura 7).

#### *Mutación m.13094T>C*

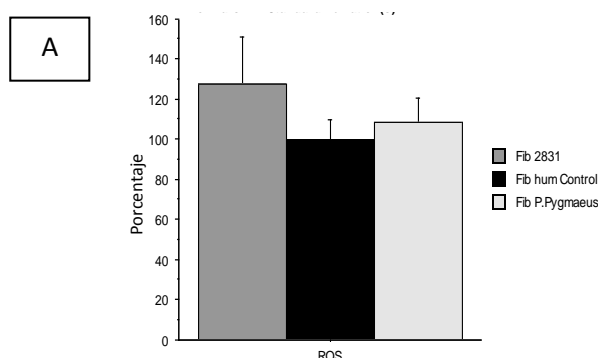
La actividad de CI, al cual afecta la mutación en estudio, se ve claramente reducida respecto al control humano (Figura 8), mientras que la actividad del CIV no se ve apenas modificada. La actividad de CV también se ve modificada, aunque la reducción de la actividad es menor que para el caso del CI.

#### *Mutación m.3700G>A*

En el caso de esta mutación, las actividades de los complejos mitocondriales en estudio en la línea celular de fibroblastos de *P. pygmaeus* no se ven afectadas por la mutación (Figura 8) e incluso en los caso del CIV y el CV éstas se ven aumentadas respecto al control humano.

#### **Análisis de especies reactivas de oxígeno (ROS)**

El análisis de la cantidad de especies reactivas de oxígeno en las diferentes líneas celulares se realizó para observar la implicación de las mutaciones en estudio en el estrés oxidativo en las células.



B

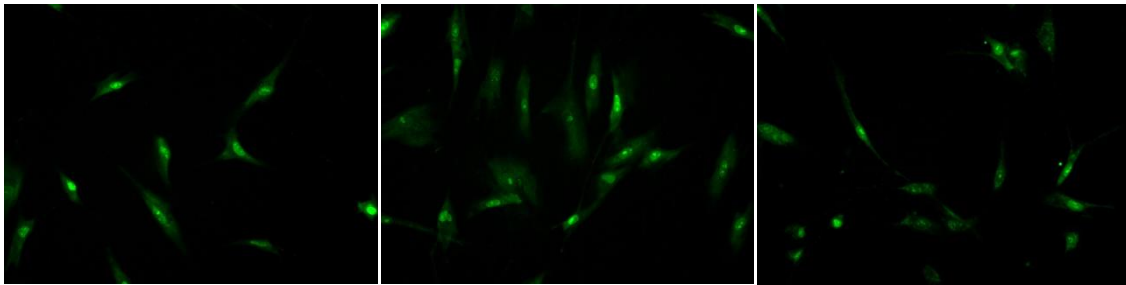


Figura 9: A) Análisis de la presencia de ROS en las líneas celulares en estudio. El valor de la cantidad de ROS en la línea celular Fibroblastos control se estableció como el 100%. Fb control,  $100 \pm 9,66$ . Fb 2831,  $127,6 \pm 23,6$ . Fb *P. pygmaeus*,  $108,29 \pm 12,38$ . B) Imágenes de microscopía de fluorescencia con tinción con diclorofluoresceína. 1) Fib 2831. 2) Fib humano control. 3) Fib *P. pygmaeus*.

#### *Mutación m.13094T>C*

La cantidad de ROS presente en la línea celular de fibroblastos mutantes es un 30% superior a la detectada para fibroblastos control (Figura 9.A). Aún así, el análisis estadístico de los datos determina que no hay diferencias estadísticamente significativas en el aumento de estas especies en el mutante, puesto que el *p*-valor obtenido en este caso es de 0,13.

En las imágenes de microscopía de fluorescencia no se observan diferencias apreciables en la cantidad de ROS (Figuras 9.B.1 y 9.B.2).

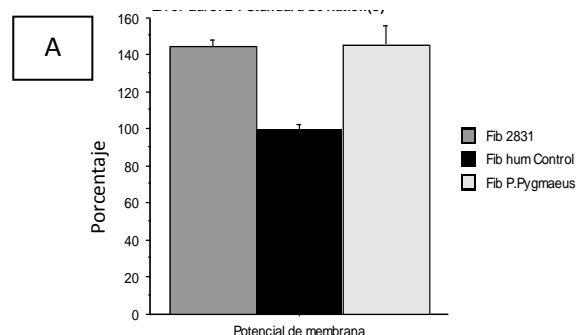
#### *Mutación m.3700G>A*

En este caso el aumento de ROS en los fibroblastos de *P. pygmaeus* respecto del control es menor al 10% (Figura 9.A), y tampoco hay diferencias estadísticamente significativas en este aumento, puesto que el *p*-valor es de 0,41.

Tampoco en este caso se observan diferencias notables en las imágenes de microscopía de fluorescencia (Figuras 9.B.2 y 9.B.3).

#### **Potencial de membrana mitocondrial**

La mitocondria presenta potencial de membrana debido a que las cargas negativas se acumulan en la matriz mitocondrial mientras que gracias a la acción de los complejos mitocondriales se bombean protones hacia el espacio intermembrana. El potencial de membrana mitocondrial creado representa un parámetro importante en la viabilidad y funcionalidad de las mitocondrias y un fallo en la cadena de transporte puede verse reflejado en este valor.



B

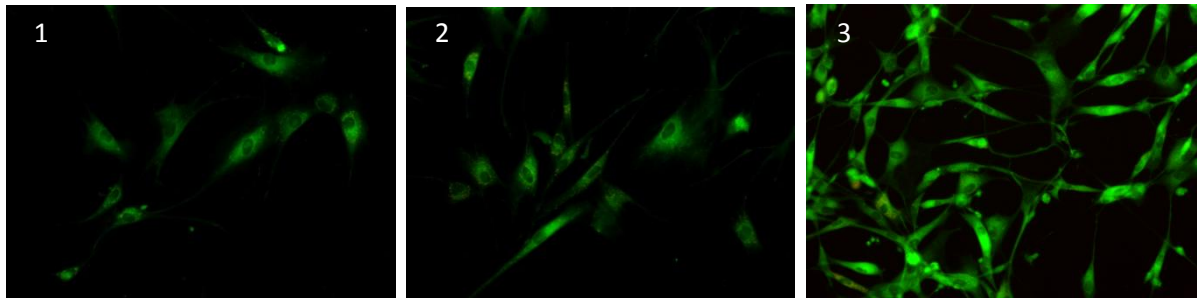


Figura 10: A) Análisis del potencial de membrana mitocondrial en las líneas celulares en estudio. El valor del potencial de membrana en la línea celular Fibroblastos control se estableció como el 100%. Fb control,  $100 \pm 2,16$ . Fb 2831,  $144,32 \pm 3,72$ . Fb *P. pygmaeus*,  $145,1 \pm 10,64$ . B) Imágenes de microscopía de fluorescencia (en verde sonda citosólica, en rojo sonda mitocondrial). 1) Fib 2831. 2) Fib humano control. 3) Fib *P. pygmaeus*.

#### *Mutación m.13094T>C*

El análisis por citometría de flujo de la muestra de fibroblastos 2831 reflejó un aumento del potencial de membrana respecto de los fibroblastos control (Figura 10.A). Este aumento es estadísticamente significativo, con un *p*-valor menor a 0,0001.

Sin embargo, las imágenes tomadas por microscopía de fluorescencia (Figuras 10B.1 y 10.B.2) muestran un resultado poco claro. Esto probablemente se deba a un fallo en la tinción.

#### *Mutación m.3700G>A*

Los fibroblastos de *P. pygmaeus* mostraron en el análisis por citometría de flujo un potencial de membrana muy superior al de fibroblastos control (Figura 10.A). Este aumento es también en este caso estadísticamente significativo con un *p*-valor inferior a 0,0001.

Las imágenes de microscopía (Figuras 10.B. y 10.B.3) tampoco aportan ninguna evidencia de este aumento significativo en el potencial de membrana mitocondrial.

#### **Detección de la red mitocondrial celular**

Las mitocondrias se disponen en la célula en forma de una gran red continua que se distribuye a lo largo de todo el citoplasma. Ha sido demostrado que en mutantes con deficiencias mitocondriales presentan cambios en la estructura de esta red mitocondrial, que deja de ser continua.

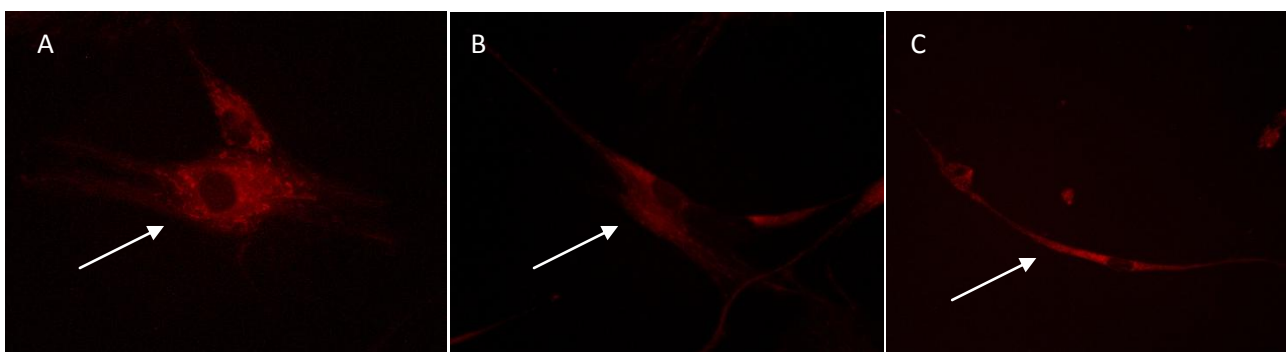


Figura 11: A) Análisis de red mitocondrial intracelular. Tinción con MitoTracker® Red. A) Fib 2831. B) Fib humano control. C) Fib *P. pygmaeus*.



#### *Mutación m.13094T>C*

En las imágenes de microscopía de fluorescencia (Figura 11.A y 11.B) se puede observar cómo la red mitocondrial de los fibroblastos del paciente 2831 no se encuentra totalmente interconectada como ocurre en el caso de los fibroblastos control, y en algunos puntos del citoplasma las mitocondrias se acumulan en grumos.

#### *Mutación m.3700G>A*

En el caso de los fibroblastos de *P. pygmaeus* (Figura 11.B y 11.C), la red mitocondrial se encuentra aparentemente intacta y presenta un aspecto muy similar al de los fibroblastos humanos control.

#### **Consumo de oxígeno**

La medida del consumo de oxígeno en las células es un parámetro directamente relacionado con la viabilidad mitocondrial y celular y dado que un fallo en el CI podría afectar directamente a estos valores, se realizaron ensayos de consumo de oxígeno.

Se realizó el estudio de la capacidad respiratoria endógena, de la filtrante (al inhibir la ATP sintasa con oligomicina) y de la desacoplada (resultante de añadir el desacoplante FCCP) y a todos los valores se les restó el de la respiración no dependiente de la cadena de transporte mitocondrial (cuando ésta se inhibe con cianuro).

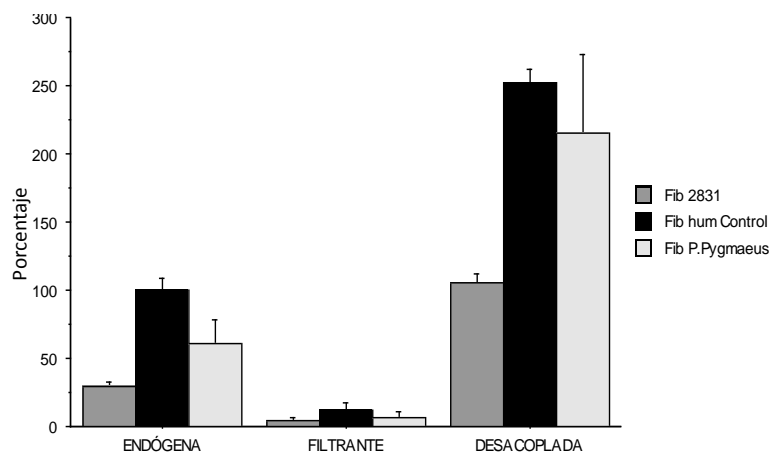


Figura 12: Análisis del consumo de oxígeno en las diferentes líneas celulares (respiración endógena, filtrante y desacoplada). Los valores de la respiración endógena en la línea celular Fibroblastos control se establecieron como el 100%. El consumo de oxígeno se refirió a la cantidad de proteína presente en cada muestra. Respiración endógena: Fb control, 100±8,96. Fb 2831, 29,15±3,51. Fb *P. pygmaeus*, 61,2±17,5. Respiración filtrante: Fb control, 11,54±5,99. Fb 2831, 4,15±2,50. Fb *P. pygmaeus*, 6,88±4,45. Respiración desacoplada: Fb control, 252,60±9,67. Fb 2831, 105,45±6,86. Fb *P. pygmaeus*, 215,12±57,7.

#### *Mutación m.13094T>C*

En el análisis del consumo de oxígeno para la línea celular fibroblastos 2831 (Figura 12) se observó una clara disminución tanto en la respiración endógena, filtrante y desacoplada respecto la respiración de los fibroblastos humanos control. Esta disminución es estadísticamente significativa en el caso de la respiración endógena, con un *p*-valor de

0,0002 y en la respiración desacoplada, con un  $p$ -valor inferior a 0,0001. Sin embargo la disminución de los valores en la respiración filtrante respecto al control presenta un  $p$ -valor de 0,12.

#### *Mutación m.3700G>A*

Los valores de consumo de oxígeno por parte de la línea celular de fibroblastos de *P. pygmaeus* (Figura 12) también aparecen en este caso disminuidos respecto los valores de fibroblastos control. La disminución de la respiración endógena es también en este caso estadísticamente significativa ( $p$ -valor de 0,027), pero no lo es la disminución de la respiración filtrante ( $p$ -valor de 0,340) ni la de la respiración desacoplada ( $p$ -valor de 0,329).

### **Discusión**

#### *Mutación m.13094T>C*

En este estudio se ha descrito la mutación m.13094T>C, candidata a ser la etiología del fenotipo LHON del paciente 2831, que produce el cambio de una valina por alanina en la posición 253 de MT-ND5.

Uno de los criterios descritos para confirmar la patogenicidad de la mutación es que ésta se encuentre presente en el paciente pero no en controles sanos, además de que afecte a una posición de la secuencia de aminoácidos de la proteína altamente conservada<sup>12</sup>. En las 24.364 secuencias humanas comparadas no se ha detectado en ningún caso el cambio producido por la mutación en estudio. Además, en el análisis de 4.111 secuencias eucariotas de la proteína p.MT-ND5 la posición se encuentra conservada en el 99,8% de los casos, al igual que en el 97% de las 631 secuencias de la proteína ortóloga bacteriana analizada. Los análisis de las secuencias determinan que la posición se encuentra altamente conservada y que la mutación no se encuentra en individuos sanos.

Un segundo criterio de patogenicidad para una mutación en mtDNA es que se encuentre en heteroplasmia, hecho que sí ocurre en el caso del paciente. Aún así, la heteroplasmia únicamente está presente en el 15% de los individuos con fenotipo LHON<sup>12</sup>.

Otro dato que apoya la hipótesis de que la mutación en estudio puede ser patológica es el hecho de que la mutación segrega con el fenotipo, es decir, que a más mutación presente en el paciente, más fenotipo se produce. El paciente 2831 posee la mutación en un 50% de heteroplasmia y presenta un fenotipo LHON y sin embargo su madre, con un 10% de heteroplasmia no presenta ningún fenotipo patológico.

Tal como se ha visto en los resultados de este mismo apartado, existen claras deficiencias en la función mitocondrial del paciente en estudio. La disminución en la producción de ATP y la ruptura de la red mitocondrial han sido identificadas en otras deficiencias mitocondriales con un fenotipo patológico<sup>13</sup>. Asimismo, la reducción en la actividad del CI, así como en el consumo de oxígeno endógeno y desacoplado son indicativos

de la existencia de una deficiencia en ese complejo mitocondrial <sup>2,14</sup>. Aunque el potencial de membrana suele encontrarse disminuido en la mayoría de las mutaciones que afectan al CI <sup>12</sup>, en las deficiencias de otros complejos mitocondriales se ha observado un aumento de este parámetro en fenotipos patológicos como es el caso de la mutación en estudio <sup>15</sup>. A pesar de que no se han visto aumentadas significativamente las ROS en las células del paciente, todos los demás parámetros bioenergéticos analizados indican que la mutación m.13094T>C podía afectar a la función mitocondrial.

Cabe destacar que esta mutación no ha sido únicamente encontrada en el paciente 2831 (fenotipo LHON), sino que también ha sido asociada en otros dos casos a fenotipos de ataxia y oftalmoplegia progresiva externa (PEO) <sup>7</sup> y encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y accidente cerebrovascular (MELAS) y síndrome de Leigh <sup>8</sup>.

Para evaluar la posible patogenicidad de la mutación según los resultados obtenidos en el estudio se aplicaron los criterios del test de Mitchell <sup>16</sup> para los que la mutación obtuvo una puntuación de 25, lo que la clasifica como “probablemente patológica” (Anexo 1). Los estudios llevados a cabo en el presente proyecto han conseguido elevar la puntuación obtenida para esta misma mutación en los otros casos descritos <sup>7,8</sup>.

A pesar de que todos los estudios realizados indican que la mutación m.13094T>C es la causante del fenotipo LHON del paciente, sería interesante llevar a cabo los mismos análisis en híbridos con fondo nuclear definido, que permitan realizar una correlación directa de la mutación con su patogenicidad.

Además, se debe tener en cuenta que el paciente 2831 poseía la mutación m.15527C>T que debería ser descartada como causante del fenotipo LHON.

#### *Mutación m.3700G>A*

La mutación m.3700G>A ha sido asociada en varias ocasiones con LHON en humanos <sup>3,17</sup> y sin embargo se presenta como alelo *wild-type* en orangután (*P. pygmaeus*). Los resultados obtenidos durante el presente proyecto indican que este animal no presenta ninguna deficiencia significativa en la cadena de transporte mitocondrial y que no presenta ningún déficit bioenergético, a pesar de poseer el alelo mutante.

Este hecho evidencia que debe existir algún mecanismo compensatorio en la cadena respiratoria de *P. pygmaeus*. El estudio de estas desviaciones patológicas compensadas es muy complejo y ya se ha llevado a cabo en otras ocasiones con este mismo animal, sin obtener ningún resultado esclarecedor <sup>6</sup>.

Aún así, el estudio de estas mutaciones LHON presentes en *P. pygmaeus* en su forma *wild-type* podría utilizarse como un buen modelo de estudio *in vitro* para la búsqueda de factores genéticos compensatorios asociados a una mutación, dado que los factores

ambientales se eliminan en cultivo. Además también podrían ayudar a comprender la penetrancia incompleta de estas mutaciones.

## CONCLUSIONES

Del presente trabajo se han obtenido las siguientes ideas o conclusiones:

1. Según los criterios para considerar una mutación en el mtDNA como patológica, se podría determinar que la mutación m.13094T>C hallada en el paciente 2831 es la causante del fenotipo LHON que éste presenta.
2. La especie *P. pygmaeus* presenta compensaciones de la mutación m.3700G>A que hacen que su función mitocondrial sea normal.

## CONCLUSIONS

The following ideas are obtained from this essay:

1. Following the pathogenicity criterion of mtDNA mutations, we could state that m.13094T>C mutation found in patient 2831 is causing his LHON phenotype.
2. *P. pygmaeus* specie has genetic compensations on m.3700G>C which makes their mitochondrial function normal.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Chinnery PF. Inherited mitochondrial optic neuropathies. *J Med Genet* 2009; 46:145-158.
2. Yu-Wai-Man P, Chinnery PF. Leber Hereditary Optic Neuropathy. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Bird TD, Dolan CR, Fong C, et al, editors. *GeneReviews*®: University of Washington, Seattle; 2000.
3. Achilli A, Lommarini L, Olivieri A, Pala M, Kashani BH, La Morgia C, et al. Rare Primary Mitochondrial DNA Mutations and probable Synergistic Variants in Leber's Hereditary Optic neuropathy. *PLoS ONE* 2012; 7(8):e42242. doi:10.1371/journal.pone.0042242.
4. Chinnery PF, Brown DT, Andrews RM, Singh-Kler R, Riordan-Eva P, Lindley J, et al. The mitochondrial ND6 gene is a hot spot for mutations that cause Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain* 2001; 124:209-218.
5. Valentino ML, Barboni P, Ghelli A, Bucchi L, Rengo C, Achilli A, et al. The ND1 gene of complex I is a mutational hot spot for Leber's hereditary optic neuropathy. *Ann. Neurol.* 2004; 56:631-641.
6. Pacheu-Grau D, Gómez-Durán A, López-Gallardo E, Pinós T, Andreu AL, López-Pérez MJ, et al. "Progress" renders detrimental an ancient mitochondrial DNA genetic variant. *Human Molecular Genetics* 2011; 20(21):4224-4231.
7. Valente L, Piga D, Lamantea E, Carrara F, Uziel G, Cudia P. Identification of novel mutations in five patients with mitochondrial encephalomyopathy. *Biochimica et Biophysica Acta* 2009; 1787:491-501.
8. Lax NZ, Pienaar IS, Reeve AK, Hepplewhite PD, Jaros E, Taylor RW, et al. Microangiopathy in the cerebellum of patients with mitochondrial DNA disease. *Brain* 2012; 135:1736-1750.
9. Wittig I, Karas M, Schägger H. High resolution native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Mol Cell Proteomics* 2007; 6(7):1215-1225.
10. Miller SW, Trimmer PA, Parker WD, Davis RE. Creation and characterization of mitochondrial DNA-depleted cell lines with "Neuronal-Like" properties. *Journal of Neurochemistry* 1996; 67:1897-1907.
11. Chomyn A, Lai ST, Shakeley R, Bresolin N, Scarlato G, Attardi G. Platelet-mediated transformation of mtDNA-less human cells: analysis of phenotypic variability among clones from normal individuals and complementation behavior of the tRNA<sup>Lys</sup> mutation causing myoclonic epilepsy and ragged red fibers. *Am J Hum Genet* 1994; 54:966-974.
12. Martínez-Romero I, Herrero-Martín MD, Llobet L, Emperador S, Martín A, Narberhaus B, et al. A new *MT-ND1* pathologic mutation for Leber's hereditary optic neuropathy. *Clin Experiment Ophthalmol* 2014; 7.

13. Grünewald A, Arns B, Seibler P, Rakovic A, Münchau A, Ramirez A, et al. ATP13A2 mutations impair mitochondrial function in fibroblasts from patients with Kufor-Rakeb syndrome. *Neurobiology of Aging* 2012; 33:1843.e1-1843.e7.
14. Brown MD, Trounce IA, Jun AS, Allen JC, Wallace DC. Functional analysis of lymphoblast and cybrid mitochondria containing the 3460, 11778, or 14484 Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA mutation. *J. Biol. Chem* 2000; 275:39831-39836.
15. Vojtíšková A, Ješina P, Kalous M, Kaplanová V, Houštěk J, Tesařová M, et al. Mitochondrial Membrane Potential and ATP Production in Primary Disorders of ATP Synthase. *Toxicol. Mech. Methods* 2004; 14(1-2):7-11.
16. Mitchell AL, Elson JL, Howell N, Taylor RW, Yumbull DM. Sequence variation in mitochondrial complex I genes: mutation or polymorphism? *J. Med. Genet* 2006; 43:175-179.
17. Fauser S, Lubrichs J, Besch D, Leo-Kottler B. Sequence analysis of the complete mitochondrial genome in patients with LHON lacking the three most common pathogenic DNA mutations. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002; 295:342-347.