



Universidad
Zaragoza



Efecto fenotípico de variantes polimórficas del mtDNA

Trabajo Fin de Grado
Biotecnología



Autora
Isabel Franco Castillo

Directores
Raquel Moreno Loshuertos
Patricio Fernández Silva

Grupo GENOXPHOS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias
2014

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. La mitocondria y el DNA mitocondrial	2
2.2. El sistema de fosforilación oxidativa	3
2.3. Variabilidad poblacional del mtDNA	4
2.4. Ratón complástico	6
2.5. Especies reactivas de oxígeno (ROS)	7
3. PRESENTACIÓN Y OBJETIVOS	8
4. MATERIALES Y MÉTODOS	9
4.1. Medidas de la actividad enzimática	9
4.2. Manipulación y análisis de proteínas	10
4.2.1. Electroforesis de proteínas	11
4.2.1.1. Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE	11
4.2.1.2. Electroforesis en geles nativos de poliacrilamida “Blue Native”	12
4.2.2. Transferencia de proteínas a membranas de PVDF	13
4.2.3. Inmunodetección de proteínas mediante Western Blot	13
4.3. Manipulación y análisis de DNA	14
4.3.1. Extracción y cuantificación	14
4.3.2. Cuantificación del número de copias de mtDNA	14
4.4. Cultivo celular	15
4.4.1. Líneas celulares	15
4.4.2. Cultivo y siembra celular	15
4.5. Medidas de respiración endógena y desacoplada en fibroblastos inmortalizados	15
4.5.1. Electrodo de oxígeno	15
4.5.2. Medida de respiración endógena y desacoplada	16
4.6. Análisis estadístico	16
5. RESULTADOS	17
5.1. Evaluación de la actividad OXPHOS en homogenados de tejidos de ratones complásticos	17
5.2. Inmunodetección de proteínas mediante Western blot	18
5.3. Evaluación del ensamblaje de supercomplejos en geles nativos de PAA “Blue Native”	19
5.4. Cuantificación del número de copias de mtDNA por Real Time PCR	20
5.5. Evaluación de la actividad OXPHOS en fibroblastos inmortalizados	20
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	22
7. CONCLUSIONES	23
8. BIBLIOGRAFÍA	24
9. ANEXOS	26

1. RESUMEN

La extensa variabilidad de secuencia del mtDNA humano se ha considerado durante años como el resultado de sustituciones neutras acumuladas a lo largo de la evolución a causa de la deriva genética. Las asociaciones de los haplotipos mitocondriales con diversos fenotipos entre los que se encuentran la motilidad espermática o la longevidad, han hecho cambiar esta idea. La influencia de las variantes polimórficas del mtDNA sobre la función OXPHOS ha sido demostrada en células transmitocondriales humanas y de ratón.

Los ratones complásticos, portadores del mtDNA de una estirpe en el entorno nuclear de otra, constituyen una herramienta de estudio muy útil para trasladar los estudios de variabilidad genética mitocondrial a organismos completos. En este TFG se han evaluado distintos parámetros relacionados con la función mitocondrial en muestras procedentes de ratones NZB y su correspondiente línea complástica portadora del mtDNA de C57 (CN: NZBmt^{C57}) que había sido generada previamente en el grupo GENOXPHOS con el objetivo de confirmar los resultados obtenidos en líneas transmitocondriales. Los resultados obtenidos nos indican que el haplotipo del mtDNA modifica la función OXPHOS a pesar de que existe una respuesta compensatoria de aumento de la biogénesis mitocondrial mediada probablemente por ROS.

1. ABSTRACT

The large variability of the human mtDNA sequence has been considered for years the result of neutral substitutions accumulated during evolution due to genetic drift. The associations of mitochondrial haplotypes with diverse phenotypes such as sperm motility or longevity, among others, have changed this concept. The influence of polymorphic variants of mtDNA on the OXPHOS function has been demonstrated in human and mouse transmitochondrial cells.

Conplastic mice, which have the nuclear genome of one strain and the mitochondrial genome for another, are useful tools to transfer the mitochondrial genetic variability studies to whole organisms. In this TFG different parameters related to mitochondrial function in samples from NZB mice and their corresponding conplastic line carrying C57 mtDNA (CN: NZBmtC57) have been evaluated. The conplastic line had been previously generated by GENOXPHOS group in order to confirm the results obtained in transmitochondrial cell lines. The results indicate that the mtDNA haplotype modifies the OXPHOS function even though there is a compensatory response, probably mediated by ROS, that increases mitochondrial biogenesis.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. La mitocondria y el DNA mitocondrial

Las mitocondrias son orgánulos subcelulares de dimensiones y distribución variable, que se encuentran presentes en el citoplasma de la mayoría de las células eucariotas. Se caracterizan por poseer su propio genoma (mtDNA) así como la maquinaria necesaria para la transcripción y traducción de la información genética que codifica dicho genoma.

La mitocondria se compone de dos membranas, la externa, que la separa del citoplasma, y la interna, que define el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial. La membrana externa permite el paso de moléculas pequeñas (hasta 10 kDa) mientras la membrana interna constituye una barrera más selectiva, siendo esta restricción de paso indispensable para el mantenimiento del gradiente de protones necesario para la síntesis de ATP. La membrana interna presenta una serie de pliegues denominados crestas que le proporcionan una gran superficie (figura 1). Las mitocondrias son orgánulos plásticos capaces de cambiar de forma en función del estado metabólico de la célula o del tejido en el que se encuentren. Además, son capaces de moverse por el citoplasma asociados a microtúbulos, de fusionarse y de dividirse, generando retículos en función del estado metabólico de la célula.

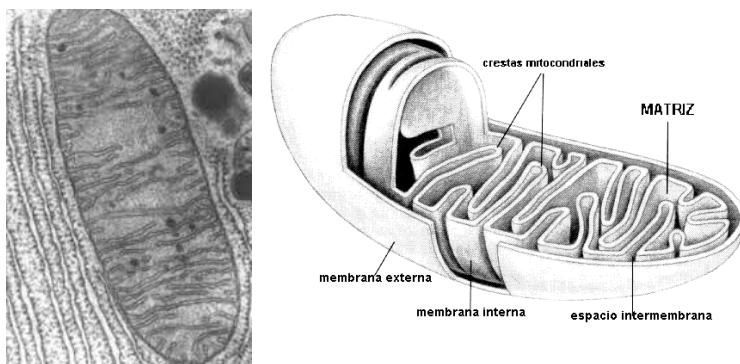


Figura 1: Mitocondria. La imagen de la izquierda corresponde a una mitocondria observada por microscopio electrónico y la imagen de la derecha ilustra las diferentes partes de la mitocondria

En la matriz mitocondrial se localizan las moléculas de mtDNA así como las proteínas necesarias para su replicación y transcripción, los ribosomas encargados de la traducción de las proteínas codificadas en dicho genoma, indispensables para la formación de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, así como el resto de proteínas implicadas en los procesos metabólicos que tienen lugar en el interior de la mitocondria, entre los que destacan el ciclo de Krebs, la β -oxidación de ácidos grasos, el ciclo de la urea o la biosíntesis de pirimidinas. La mayoría de las proteínas implicadas en procesos mitocondriales están codificadas en el DNA nuclear y deben ser importadas a las mitocondrias. Esto convierte a la biogénesis mitocondrial un caso único en la célula animal por estar bajo el control de dos sistemas genéticos distintos ^{1,2}.

El mtDNA, que constituye la característica más singular de las mitocondrias, es una molécula circular de doble cadena que se replica y transcribe en la matriz mitocondrial. En mamíferos, cada mitocondria contiene entre 2 y 10 copias de mtDNA y cada célula,

alrededor de 10^3 y 10^4 copias, dependiendo del tejido y de las necesidades energéticas de la célula. El mtDNA de mamíferos contiene información para 37 genes: 13 proteínas, constituyentes de la cadena de transporte electrónico, y 24 RNAs necesarios para su síntesis (2 RNAs ribosómicos y 22 tRNAs). Entre las características de este segundo genoma celular pueden destacarse las siguientes: el código genético mitocondrial difiere ligeramente del código genético universal, presenta una alta tasa de mutación (10 veces superior a la del DNA nuclear) debido a la exposición del mtDNA a las especies reactivas de oxígeno generadas en el interior de la mitocondria y a la ausencia de sistemas eficientes para su reparación, se transmite por herencia materna, no mendeliana, presenta una particular organización y expresión de sus genes puesto que no existen regiones intrónicas, y además, es posible la existencia de varias formas alélicas del mtDNA en un mismo individuo, pudiendo diferir su proporción relativa dependiendo del tejido. En una misma célula o tejido puede existir heteroplasmia (presencia de más de un tipo de mtDNA) u homoplasmia (presencia de mtDNAs idénticos). Pueden encontrarse distintos grados de heteroplasmia y es necesario alcanzar un determinado porcentaje de DNA mutado para que se manifiesten los efectos patológicos de la mutación.

La investigación sobre las mitocondrias y el DNA mitocondrial ha experimentado un gran impulso en los últimos años debido a varios descubrimientos tales como: las enfermedades provocadas por mutaciones en el DNA mitocondrial ³, el posible rol de este genoma en el proceso de envejecimiento ⁴ y la carcinogénesis ⁵ así como la implicación de la mitocondria en el proceso de apoptosis ⁶, entre otros.

2.2. El sistema de fosforilación oxidativa

El sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS), compuesto por la cadena de transporte electrónico mitocondrial y la ATP sintasa es el encargado de producir el 90% de la energía utilizada por la célula.

El piruvato obtenido en la glucólisis, los ácidos grasos o los aminoácidos son importados a la matriz mitocondrial donde, tras una serie de reacciones de oxidación, se transforman en acetil-coenzima A. La oxidación de este grupo mediante las reacciones que constituyen el ciclo de Krebs, genera NADH y FADH₂ que serán utilizados por la cadena de transporte electrónico como equivalentes de reducción. Los electrones de las moléculas de NADH y FADH₂ son movilizados a través de los distintos complejos que forman la cadena respiratoria mitocondrial hasta llegar al complejo IV, donde son cedidos al oxígeno molecular, generando un gradiente de protones que es utilizado por la ATP sintasa o complejo V para la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi.

Los electrones procedentes del NADH pasan secuencialmente a través del complejo I, la ubiquinona, el complejo III y el citocromo c para llegar al complejo IV que, finalmente, se los cederá al oxígeno molecular generando H₂O. De forma alternativa, los electrones del FADH₂, producido por la succinato deshidrogenasa o complejo II o por otras enzimas como la glicerol-3-P deshidrogenasa, la ETF-ubiquinona oxidoreductasa (primera enzima de la β -oxidación de los ácidos grasos) o la dihidroorotato deshidrogenasa (enzima implicada en la biosíntesis de pirimidinas),

pasan a la ubiquinona para que los transporte al complejo III y lleguen hasta la reducción del oxígeno molecular.

En los complejos I, III y IV de la cadena de transporte electrónico, se produce un bombeo de protones desde la matriz mitocondrial hasta el espacio intermembrana que genera un gradiente de pH o potencial de membrana que es aprovechado por la ATP sintasa o complejo V para impulsar la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi, completándose de este modo el proceso de fosforilación oxidativa.

El ATP generado en este proceso, es utilizado en los distintos tejidos para mantener las necesidades energéticas celulares. Así, aquellos tejidos que tengan mayor requerimiento de ATP serán los más afectados en el caso de producirse fallos en su generación.

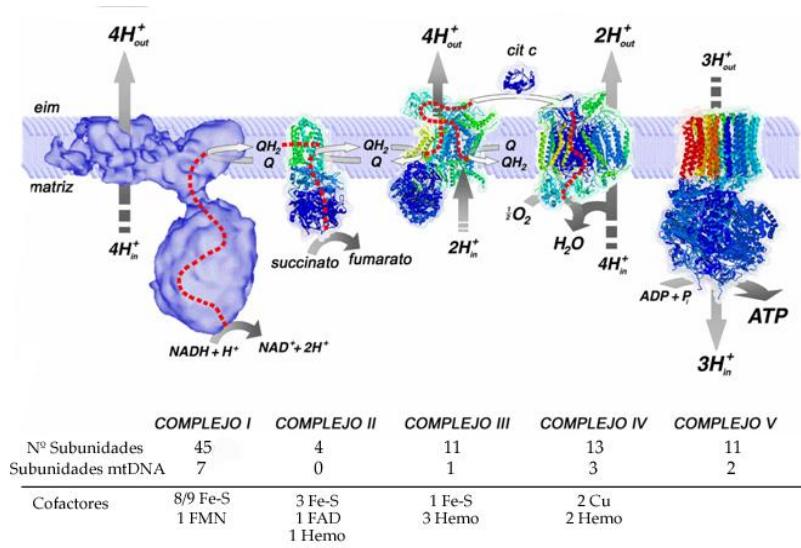


Figura 2: Esquema del sistema de fosforilación oxidativa.

En la imagen se observan los complejos de la cadena respiratoria y se señalan los puntos donde se produce bombeo de protones al espacio intermembrana.

2.3. Variabilidad poblacional del mtDNA

Haplogrupos mitocondriales

Desde que se conoció su secuencia completa en 1981, el mtDNA humano se ha utilizado como herramienta para el estudio de la evolución y la genética de poblaciones. Este hecho viene motivado por varias razones. La primera de ellas es la alta tasa de mutación que presenta el mtDNA, muy superior a la del DNA nuclear, otra es su herencia de tipo materno que permite reconstruir la historia evolutiva sin la complejidad que añade la recombinación biparental que se produce en el caso del DNA nuclear.

Los linajes de mtDNA se han distribuido radialmente desde África hasta los distintos continentes durante la historia. En este tiempo, se han ido acumulando mutaciones en el mtDNA que aparecen con alta frecuencia en la población y se conocen

como secuencias polimórficas del mtDNA específicas de los distintos continentes. Estudios de fragmentos polimórficos de restricción (RFLP) del mtDNA de un amplio rango de poblaciones humanas han puesto de manifiesto la existencia de un número estable de polimorfismos en regiones codificantes del mtDNA llamados haplogrupos mitocondriales^{7,8}.

La extensa variabilidad de secuencia que presenta el mtDNA humano se ha considerado como el resultado de sustituciones neutras que se han ido acumulando a lo largo de la historia de las mujeres en lugares geográficos discretos y a causa de la deriva genética. Sin embargo, varios trabajos han hecho cambiar esta forma de pensar puesto que se han encontrado asociaciones entre haplogrupos mitocondriales y diversos fenotipos como son la motilidad espermática⁹, la longevidad^{10,11}, la penetrancia de enfermedades ligadas al mtDNA¹² o la predisposición a una variedad de complejos fenotipos como la adaptación al frío o las enfermedades mitocondriales¹³.

A pesar de que todos los genes codificados en el mtDNA están implicados en la biogénesis del sistema OXPHOS, los estudios llevados a cabo utilizando líneas celulares portadoras de distintos haplotipos de mtDNA humanos habían concluido que la capacidad respiratoria no se veía influenciada, de manera sustancial, por ninguna de las variantes ensayadas¹⁴. Trabajos más recientes han aportado evidencia de que variantes polimórficas de mtDNA influyen sobre la capacidad respiratoria de células en cultivo, aunque estas diferencias se ven enmascaradas por un aumento de la biogénesis mitocondrial mediada por ROS (Especies reactivas de oxígeno)¹⁵. También se ha relacionado la variabilidad genética mitocondrial con la cinética de ensamblaje de los complejos de la cadena de transporte electrónico¹⁶.

Todas estas observaciones, reevaluadas utilizando una simulación estadística, nos llevan a concluir que los haplogrupos mitocondriales en humanos no siempre conllevan un fenotipo neutro.

Variantes genéticas mitocondriales en ratón

En el año 1981 se obtuvo la primera secuencia completa de un mtDNA de ratón. Desde su publicación fueron describiéndose nuevas secuencias que mostraban discrepancias que podían ser debidas tanto a polimorfismos existentes entre las distintas estirpes de ratón, como a mutaciones adquiridas tras 40 años de cultivo de la línea celular. Tras la revisión de la secuencia de la línea LA9 en el año 2003¹⁷ y tras descartar algunos cambios que se debían a errores de la primera secuenciación, se llegó a la conclusión de que sólo las secuencias de NZB/B1NJ y MilP divergían mucho de la considerada hasta entonces como secuencia de referencia. A partir de ese momento, la secuencia de C57BL/6J pasó a considerarse la secuencia de referencia para el mtDNA de ratón.

A excepción de las estirpes NZB/B1NJ y MilP las secuencias de los mtDNAs de los ratones consanguíneos utilizados en los laboratorios, son muy similares. Los mtDNAs de las estirpes Balb/cJ y CBA/J son idénticos entre sí¹⁸ y difieren de las líneas derivadas de C3H/He y NOD/LtJ en un único locus, en el gen del *mt-Tr*, posición 9821¹⁷. Esta

diferencia se debe a la variación en la longitud de una región de repeticiones de nucleótidos de adenina en el bucle DHU del tRNA^{Arg} que parece ser una región muy polimórfica en el mtDNA de ratón¹⁹ y que es la responsable de que el número de pares de bases de este genoma varíe entre 16299 y 16301. Además de este locus, otras estirpes de ratón difieren del grupo anterior en tan sólo una (AKR/J y SKH2/J), dos (SAMR1 y C57BL/6J), cuatro (SAMP1) o cinco (SAMP8) posiciones más. Además no existen variaciones de secuencia en las regiones no codificantes del mtDNA.

Al igual que en el caso de las variantes polimórficas humanas, se han encontrado asociaciones de los distintos haplotipos del mtDNA de ratón con diversos fenotipos. Así, se ha descrito que las variantes polimórficas del gen del *mt-Tr* parecen modular el fenotipo de sordera (*Age related Hearing Loss, AHL*) producido por mutaciones en el gen nuclear *Cdh23*¹⁹. Además, experimentos con embriones portadores de dos variantes de mtDNA (NZB/B1NJ y Balb/cJ) demostraron que algunos órganos (hígado y riñón) acumulaban sistemáticamente el mtDNA de NZB/B1NJ mientras otros como la sangre o el bazo preferían el de Balb/cJ y otras no acumulaban ninguno de ellos²⁰. Este hecho parece indicar la existencia de genes nucleares específicos de tejidos importantes para la interacción entre los genomas nuclear y mitocondrial. Por último, ratones con diferente mtDNA (CBA o NZB) difieren sustancialmente en su capacidad de aprendizaje, en su desarrollo sensorial y en su anatomía cerebral debido, en gran medida, a su haplotipo mitocondrial²¹.

Como en humanos, hasta el año 2006 tampoco se había podido demostrar la influencia de los haplotipos del mtDNA de ratón sobre la respiración celular. Trabajos del grupo GENOXPHOS han demostrado que la eficiencia del sistema OXPHOS está modulada por haplotipos mitocondriales del tRNA^{Arg}, codificado en el gen *mt-Tr*. Las variantes polimórficas en este gen afectan al tamaño del bucle de dihidrouridina (DHU) en el tRNA maduro, produciendo bucles de entre 5 y 7 nucleótidos¹⁸. El análisis de una nueva variante de *mt-Tr*, identificada de ratones C3H, dio como resultado que es el tamaño del bucle DHU del tRNA, y no la secuencia, el responsable de las diferencias en la respiración celular. También se confirmó que la variante de siete nucleótidos induce una síntesis de proteínas deficiente, lo que conduce a un mal funcionamiento del sistema OXPHOS²². Sin embargo, esta deficiencia se ve enmascarada por ROS, que actúa como segundo mensajero, induciendo la biogénesis mitocondrial y compensando así la deficiencia.

2.4. Ratón complástico

Los ratones complásticos constituyen una herramienta de estudio muy útil para trasladar los estudios de variabilidad genética mitocondrial a organismos completos²³. Se pueden definir como ratones con un genoma nuclear procedente de una línea y un genoma mitocondrial procedente de otra línea distinta. Esto se consigue mediante un mínimo de 10 retrocruzamientos entre una hembra donadora del material genético mitocondrial y un macho que aporta el genoma nuclear.

Hasta la fecha, se han publicado varios trabajos en los que se utilizan este tipo de ratones que han permitido demostrar que el mtDNA afecta a la capacidad de aprendizaje

y la función cognitiva²¹, modifica la susceptibilidad a padecer enfermedades como la esclerosis autoinmune experimental (EAE) o influye en conductas relacionadas con la ansiedad lo que se relaciona con observaciones hechas en humanos donde se asocian determinados haplogrupos con enfermedades como la esclerosis múltiple y conductas bipolares, respectivamente²³. También se ha observado la influencia de determinadas variantes no patológicas en la capacidad reproductiva y en el desarrollo de enfermedades como las autoinmunes, la diabetes mellitus tipo 2, neurodegenerativas o la colitis ulcerosa.

2.5. Especies reactivas de oxígeno (ROS)

Aunque la función más conocida de la mitocondria es la generación de ATP a través de la fosforilación oxidativa, el gradiente electroquímico generado mediante la transferencia de electrones de un complejo a otro de la cadena de transporte y el bombeo de protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana, puede disiparse en forma de calor, a través de las proteínas UCP, o bien liberar electrones para generar especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden actuar como segundos mensajeros intracelulares regulando la función celular y en especial la biogénesis mitocondrial o provocar efectos tóxicos en la célula dependiendo de su concentración²⁴.

En la actualidad existe evidencia de que los organismos vivos no sólo se han adaptado a la coexistencia con los radicales libres sino que han desarrollado mecanismos para usarlos de una manera ventajosa¹⁸. Entre las importantes funciones fisiológicas que implican a los radicales libres o sus derivados se encuentran la regulación del tono vascular, la regulación de funciones controladas por la concentración de oxígeno, la potenciación de la transducción de señales de receptores de membrana entre los que están los receptores de antígeno de los linfocitos y las respuestas frente al estrés oxidativo que aseguran el mantenimiento de la homeostasis redox²⁴. Sin embargo, la implicación de los radicales libres en patología²⁵ hace que se produzca un delicado balance entre los efectos beneficiosos y perjudiciales de los mismos.

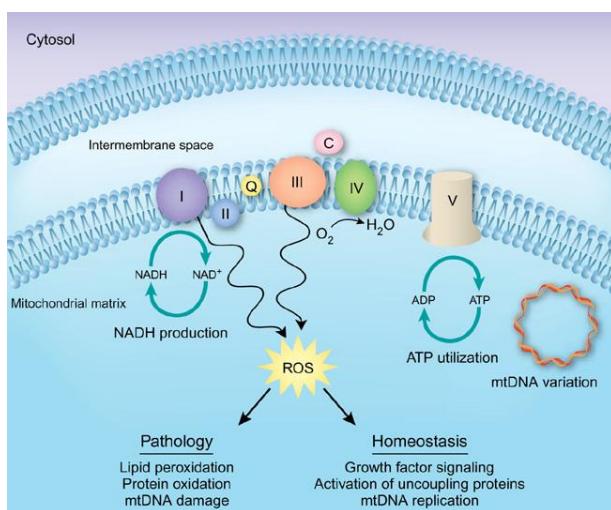


Figura 3: Generación y consecuencias de ROS en la mitocondria. Las diferencias entre la producción de NADH y el uso de ATP pueden alterar la cadena de transporte de electrones (complejos I-IV) y modular la producción de ROS. De acuerdo con Moreno-Loshuertos *et al.*, el haplotipo de mtDNA también puede influir en la generación de ROS a niveles basales en la célula. Aunque las ROS han sido percibidas tradicionalmente como agentes tóxicos que contribuyen a la patología celular, hay evidencias que sugieren que también influyen en la homeostasis celular²⁶

3. PRESENTACIÓN Y OBJETIVOS

El mtDNA presenta una gran variabilidad de secuencia, que durante años se ha considerado sustituciones neutras producto de la evolución. Diversos estudios han puesto de manifiesto que estas variantes, si bien no producen patologías en sí mismas, sí que parecen tener diferentes consecuencias fenotípicas. Así, se han asociado determinados fenotipos como la motilidad espermática, la longevidad o distintos grados de susceptibilidad a enfermedades entre otros.

En el grupo GENOXPHOS existe gran interés en descifrar las implicaciones funcionales de variantes polimórficas del mtDNA. Estudios previos del grupo han demostrado la influencia de los haplotipos de mtDNA sobre la función OXPHOS en líneas celulares transmitocondriales. Con el objetivo de confirmar estos resultados en organismos completos se han generado ratones complásticos.

Dentro de este marco general se sitúa el presente trabajo de fin de grado cuyo objetivo principal es demostrar las diferencias fenotípicas inducidas por las variantes polimórficas del mtDNA.

Los objetivos concretos que se pretenden alcanzar son:

1. Evaluar la función OXPHOS en diferentes tejidos de ratones portadores de distintas variantes de mtDNA en un mismo entorno nuclear, así como de fibroblastos inmortalizados preparados a partir de estos mismos ratones.
2. Estudiar la influencia de haplotipos de mtDNA sobre el ensamblaje de complejos respiratorios.
3. Analizar los mecanismos de biogénesis mitocondrial inducidos por ROS.
4. Valorar el efecto de antioxidantes sobre la mitocondria en función de la variante de mtDNA.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Medidas de la actividad enzimática

Las actividades enzimáticas de la citrato sintasa y la citocromo c oxidasa se evaluaron en muestras de homogenados de hígado y cerebro de ratones de la línea control NZB/B1NJ, adquirida en Harlan Ibérica, y la línea complástica NZBmt^{C57}, generada en el animalario de la Universidad de Zaragoza por el grupo GENOXPHOS mediante 10 generaciones de retrocruces entre hembras de la línea C57 y machos portadores del genoma nuclear de NZB. Los análisis se llevaron a cabo en muestras de ambas líneas de ratón sometidas a tratamiento control (dieta normal y agua corriente) y con antioxidantes (dieta normal y NAC (N-acetil cisteína) al 1% en agua corriente). Todos los homogenados habían sido preparados con anterioridad en el grupo y estaban almacenados a -80°C²⁷. Antes de llevar a cabo las medidas, hubo que romper las células. Para ello, se utilizó la técnica de Freeze-thawing que consiste en someter a los homogenados a tres ciclos de congelación en N₂ líquido y descongelación en un baño a 37°C

Todas las determinaciones se llevaron a cabo en un espectrofotómetro UV-Visible UV 500 de Unicam termostatizado mediante un sistema Peltier PCB150 de DBS y los datos se registraron utilizaron el software Vision 32, versión 1.05.

La fórmula que se usó para calcular las actividades, en UI/l, es la siguiente:

$$\frac{\Delta A/\text{min} * 10^3 (\mu\text{M}/\text{mM}) * \text{dilución}}{\epsilon (\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}) * L (1 \text{cm})}$$

- **ΔA/minuto:** Incremento de la absorbancia por minuto
- **ε:** Coeficiente de extinción molar
- **L:** Anchura del paso de luz (1 cm)
- **U.I.:** micromoles de sustrato transformados en un minuto

Citrato Sintasa

La actividad citrato sintasa se utiliza como una medida de la masa mitocondrial de una muestra por lo que nos sirve para normalizar los valores de actividad de las enzimas del sistema OXPHOS. Se mide por el incremento de la absorbancia a 412 nm producido por la formación de la forma aniónica del DTNB ($\epsilon = 13.6 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$) tras añadir 250 µmoles de oxalacetato como iniciador de la reacción. La medida se lleva a cabo a 30°C durante 2 minutos. Previamente la mezcla de reacción, a excepción de la muestra y el iniciador, se había incubado a la temperatura de trabajo para favorecer la reacción.

1. Preparación de reactivos:

- Tampón de medida: Tris-HCl 10 mM pH=8
- Acetil CoA: 7mg/ml
- DTNB: (Ácido 5,5-Ditio-bis-2-nitrobenzóico) 1 mM 2 mg en 5ml de tampón de medida (**FRESCO**)

- Oxalacetato 50mM (OAA) 33 mg en 5 ml de agua (**FRESCO**)
- Tritón X-100 10 %, 1 ml en 10 ml de agua

2. **Reacción:** La mezcla de reacción se preparó como indica la tabla S1 (anexo 1)

Citocromo c Oxidasa (COX, Complejo IV)

La actividad COX se mide como disminución de la absorbancia a 550 nm debido a la oxidación del citocromo c reducido ($\epsilon = 21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La reacción se siguió durante 2 minutos a 38°C.

Las muestras se depositaron en cubetas de plástico de 1 ml y se incubaron a la temperatura de medida durante un tiempo antes de añadir el iniciador de la reacción y registrar la actividad.

1. Preparación de reactivos:

- Tampón KP 100 mM pH=7: Para preparar 100 ml de tampón se añadieron 38.5 ml de K₂HPO₄ 100mM y se completó el volumen con KH₂PO₄ 100 mM, ajustando el pH.

- Citocromo C reducido 1% (10 mg/ml, **FRESCO**). Para preparar 4.5 ml se resuspendieron 45 mg de citocromo c en 3.5 ml de tampón KP 10mM pH=7. Para reducir el citocromo se añadió una punta de espátula de NaBH₄. La mezcla se agitó y se mantuvo en hielo 30 minutos. El pH se ajustó a 7-7.3 con HCl 1N. El volumen requerido se completó con agua destilada hasta 4.5 ml. La disolución se mantuvo en hielo todo el rato.

2. **Reacción:** La mezcla de reacción se preparó como indica la tabla S2 (anexo 1)

4.2. Manipulación y análisis de proteínas

El análisis de proteínas se llevó a cabo en condiciones nativas para valorar el ensamblaje de supercomplejos respiratorios en las dos líneas de ratón en ambos tratamientos y en condiciones desnaturalizantes, que nos permiten cuantificar los niveles de distintas proteínas en el estado estacionario.

Para la cuantificación de las subunidades de los distintos complejos respiratorios se utilizaron las muestras de homogenado tisular descritas anteriormente que se lisaron añadiendo tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM, pH=7.4, NACl 50 mM, Tritón X100 1%, Na-deoxicolato 0.5%, EDTA 5 mM) que contenía una mezcla de inhibidores de proteasas. A continuación se incubaron 15 min a 4°C en una rueda giratoria y se centrifugaron a 13000 rpm otros 15 minutos. Finalmente, se recogió el sobrenadante, se mezcló con tampón de carga y las proteínas se separaron por electroforesis.

La electroforesis nativa se llevó a cabo usando muestras de mitocondrias procedentes de hígado y cerebro de los ratones antes mencionados que se habían extraído anteriormente y se encontraban almacenadas a -80°C. 100 µg de proteína mitocondrial se lisaron con digitonina a una concentración de 4g de detergente por g de

proteína. Para ello, se añadió la cantidad necesaria de digitonina a la suspensión mitocondrial y se permitió el lisado incubando las muestras durante 5 min en hielo. A continuación, la mezcla se centrifugó durante 30 min a 13000 rpm 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio, se mezcló con tampón de carga y se procedió a la separación de los supercomplejos mitocondriales mediante electroforesis nativa (Blue Native).

4.2.1. Electroforesis de proteínas

4.2.1.1. Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE

La separación electroforética de las proteínas que componen los extractos celulares totales se llevó a cabo en geles desnaturalizantes de SDS:PAA (dodecilsulfato sódico:poliacrilamida). El sistema utilizado para este fin fue el Mini Protean III de BioRad y las disoluciones necesarias para preparar el gel fueron las siguientes:

- *Disolución stock de acrilamida-bisacrilamida*: acrilamida 30 %: bisacrilamida 0.8 % (p/v), que se filtró y se almacenó protegida de la luz a 4°C.
- *Tampón de electroforesis 10x*: Tris-HCl 250 mM, glicina 1.92 M, SDS 1 % (p/v).
- *Tampón del gel separador 4x*: Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, SDS 0.4%, EDTA 8 mM.
- *Tampón del gel concentrador 4x*: Tris-HCl 0.5 M pH=6.8, SDS 0.4%, EDTA 8 mM.
- *Tampón de carga 4x*: Glicerol 20 %, Tris- HCl 0.16 M pH=6.8, EDTA 20 mM, SDS 8 % (p/v), azul de bromofenol 0.4 % (p/v), β-mercaptopropano 4 % (v/v).
- *APS 20%* preparado en el momento.
- *TEMED*

Para preparar 5 ml de gel separador del 12.5%, de acrilamida y 2 ml de gel concentrador (5%), se mezclaron los componentes que se recogen en la tabla S3 (anexo 1).

El gel separador se vertió entre los cristales que forman el soporte, dejando unos 2 cm para el gel concentrador, espacio que se cubrió con isopropanol, evitando así la formación de menisco y la entrada de oxígeno que dificultaría la polimerización. Una vez polimerizado el gel se eliminó el isopropanol, se lavó su superficie con agua destilada y se vertió el gel concentrador.

Finalmente, se insertó el peine con cuidado y se retiró cuando el gel hubo polimerizado. Posteriormente, se lavaron los pocillos, la cubeta se llenó de tampón de electroforesis 1x y se procedió a cargar las muestras, mezcladas con tampón de carga. La electroforesis se desarrolló a una intensidad constante de 8-10 mA hasta que las muestras llegaron al gel separador, momento en el que se subió la intensidad de corriente a 15-20 mA hasta que las muestras llegaron al final del gel.

4.2.1.2. Electroforesis en geles nativos de poliacrilamida “Blue Native”. Determinación de actividad del complejo I en gel.

Los geles nativos en gradiente de poliacrilamida, descritos por primera vez por Schägger en 1991, permiten la resolución electroforética de complejos proteicos formados por más de una proteína. Esta metodología se puso a punto en 1996 para separar los complejos que integran la cadena de transporte electrónico ²⁸.

Para favorecer la resolución de supercomplejos respiratorios se prepararon geles nativos en gradiente de poliacrilamida del 3 al 13%, utilizando el sistema de minigeles Mini Protean III de Biorad con dos cristales (uno de 10,1 x 8,3 cm y otro de 10,1 y 7,3 cm) y espaciadores unidos al cristal más alto de 1.5 mm.

Para la preparación de estos geles fueron necesarias las siguientes disoluciones:

- *Tampón de gel 3x*: Bis-Tris 150 mM, ácido aminocaproico 1.5 M, pH=7.0
- *Disolución stock de acrilamida: bisacrilamida* (48:1.5) (p/v), que se filtró y se almacenó protegida de la luz a 4° C.
- *APS al 10 %* (p/v) preparado en el momento.
- *Tampón del cátodo A*: Tricina 50 mM, Bis-Tris 15 mM pH=7.0, Serva blue G 0.02 %.
- *Tampón del cátodo B*: Tricina 50 mM, Bis-Tris 15 mM pH=7.0, Serva blue G 0.002 %.
- *Tampón del ánodo*: Bis-Tris 50 mM pH=7.0.
- *Tampón de carga BN*: Coomasie Blue-G al 5€ en ácido aminocaproico 1 M

Para la preparación del gradiente lineal del 3% al 13%, se utilizó un formador de gradientes de metacrilato (compuesto por dos cámaras conectadas entre sí) conectado a una bomba peristáltica de una sola vía, que bombea la disolución hasta la abertura superior entre los cristales. Una vez preparadas las mezclas de gel del 3% (5 ml) y del 13% (3.33 ml) de acrilamida (ver tabla S4, anexo 1), se vertieron en las cámaras del formador de gradientes, de forma que, mientras la mezcla del 13% tenía salida directa hacia los cristales, la mezcla del 3% se conectaba (mediante una llave) con la cámara que contenía la mezcla del 13%. Además, en la cámara que contenía la mezcla del 13 % se introdujo un pequeño imán, para que la disolución se mezclase continuamente, y el formador de gradientes se colocó sobre una placa agitadora que hacía girar dicho imán.

Una vez vertido el gel entre los cristales, se detuvo el bombeo y se añadió una fina capa de isopropanol para evitar la formación de menisco en el gel. En este momento se dejó polimerizar el gel. Cuando hubo polimerizado, se eliminó el isopropanol, se lavó con agua, se cubrió con tampón de BN 1x, se tapó con film de plástico y se mantuvo a 4° C hasta el día siguiente.

Al día siguiente, una vez atemperado el gel, se retiró el tampón 1x que lo cubría y se vertió el gel de apilamiento (*stacking*) del 5% de acrilamida. Rápidamente, se introdujo el peine y se dejó polimerizar a temperatura ambiente.

Para la preparación de 3 ml de gel *stacking* se mezclaron:

- 0.250 ml de la disolución *stock* de acrilamida-bisacrilamida
- 1.0 ml de tampón de BN 3x
- 1.75 ml de agua destilada
- 3 μ l de TEMED
- 25 μ l de APS 10%

Tras montar el gel en el soporte adecuado, en la cámara fría, se añadieron los tampones del cátodo A y del ánodo y se limpiaron los pocillos. Las mitocondrias permeabilizadas con digitonina, se mezclaron con 1/3 de su volumen de tampón de carga (Blue G 5%) y se cargaron en el gel. La electroforesis se desarrolló a voltaje constante de 100V hasta que las muestras hubieron entrado completamente en el gradiente del gel (~30 minutos). En ese momento, se limitó la corriente a 300V y 15 mA, y se mantuvo así hasta que el colorante azul llegó hasta el final del gel. Transcurridos otros 30 minutos, se cambió el tampón del cátodo A por el B para poder apreciar mejor las bandas de los complejos proteicos a lo largo del recorrido electroforético.

Una vez finalizada la electroforesis se preparó una disolución de Tris-HCl 0.1M pH 7.4 + NADH 10mM + NBT 1mg/ml para observar la actividad del complejo I.

4.2.2. Transferencia de proteínas a membranas de PVDF

Una vez finalizada la electroforesis se procede a la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF (Amersham HybondTM-P) mediante el sistema de transferencia húmeda MiniTrans-Blot Cell de BioRad. Se tratan las membranas con metanol durante 10 segundos y se lavan 5 minutos con agua destilada, posteriormente se mantienen en BSN (48 mM Tris, 39 mM glicina, 20% (v/v) metanol) durante 10 minutos. Los geles, por otra parte, se sumergen en BSN durante 10 minutos. El sándwich de transferencia se preparó sumergido en BSN siguiendo las instrucciones del fabricante. Todo el sándwich se prepara sumergido en BSN y la transferencia se lleva a cabo a 4°C a 30V durante toda la noche. Una vez completada la transferencia se dejan secar las membranas, se sumergen 10 segundos en metanol y se lavan con agua destilada. Las membranas se dejan a 4°C hasta su uso.

4.2.3. Inmunodetección de proteínas mediante Western Blot

Los anticuerpos empleados en las inmunodetecciones y la dilución adecuada de los mismos se resumen en la tabla S5 (anexo 1). Todas las incubaciones y lavados se llevaron a cabo en un agitador orbital, a la temperatura que se indica en cada caso.

Antes de proceder a la incubación con el anticuerpo primario la membrana bloqueó a temperatura ambiente durante al menos una hora con una disolución de PBS-T con leche en polvo al 5%. Seguidamente, se eliminó el exceso de agente bloqueante mediante varios lavados con PBS-T. A continuación, la membrana bloqueada se incubó toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario, preparado en PBS-T+0.1% leche en polvo (ver dilución en el anexo 1, tabla S5). Pasado este tiempo, la membrana se lavó con PBS-T varias veces (1x15 min+2x5min) y se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario (anti IgG de ratón o de conejo conjugado con peroxidasa de

rábano, en PBS-T+0,01% leche en polvo). Tras lavar la membrana varias veces con PBS-T (2 lavados de 10 minutos y 4 más de 5 minutos) se procedió a la detección de las proteínas de interés mediante la reacción de la peroxidasa de rábano conjugada con el anticuerpo secundario usando el kit EZ-ECL de Biological Industries y siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Con el fin de eliminar los anticuerpos unidos a las proteínas fijadas en la membrana y hacer posible la reutilización de esta en otra inmunodetección, la membrana se sumergió en solución de stripping (2-mercaptopropano 100 mM, SDS 2%, Tris-HCl 1 M pH=6.7) y se incubó a 58°C durante 30 minutos. A continuación, la membrana se lavó con PBS-T (3x 10 minutos) y se guardó a 4°C para su posterior uso.

4.3. Manipulación y análisis de DNA

4.3.1. Extracción y cuantificación

Las muestras de DNA se extrajeron a partir de homogenados de tejidos utilizando el kit comercial “QIAamp® DNA Mini Kit”, de la casa comercial Qiagen. Una vez extraído el DNA, se estimó su concentración mediante el sistema NanoDrop, que es un espectrofotómetro capaz de cuantificar muestras micro-volumétricas.

4.3.2. Cuantificación del número de copias de mtDNA

La cuantificación del número de copias de mtDNA por célula se lleva a cabo mediante PCR a tiempo real (Real Time PCR) y se compara con el contenido en nDNA. Para ello utilizamos un sistema capilar de Roche, modelo “LightCycler2.0” para el que se utilizó el kit “LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I” de Roche.

En cada capilar se mezclan los siguientes compuestos:

- H₂O 12.5 µl
- Primer Mix (5µM cada uno) 0.5 µl
- Master Mix 4 µl
- DNA (3ng/µl) 3 µl

El primer mix contiene los oligos directos (forward) y reversos (reverse) a una concentración de 5µM cada uno. La secuencia de los oligos, cuya eficiencia había sido demostrada previamente en el grupo GENOXPHOS, se recoge en la tabla S6 del anexo 1.

Los cálculos de la cantidad relativa del mtDNA se obtuvieron a partir de la diferencia entre los Ct mitocondrial y nuclear. El Ct (cycle threshold) se define como el ciclo a partir del cual la intensidad de emisión del fluoróforo aumenta con respecto al ruido de fondo y es el punto donde se quiere adquirir los datos de amplificación. El Ct es inversamente proporcional al número de copias de DNA, es decir, a mayor cantidad de DNA, menor Ct.

$$\text{Nº Copias mtDNA/nDNA} = 2(2^{\Delta\text{Ct}})$$
$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{nuclear}} - \text{Ct}_{\text{mt}}$$

El programa de amplificación se detalla en la tabla S7 del anexo 1.

Los valores de número de copias de mtDNA se representan como % de un control que se analizó en todas las PCRs para poder comparar los resultados de distintas reacciones.

4.4. Cultivo celular

4.4.1. Líneas celulares

Las células con las que se ha trabajado son fibroblastos de ratón generados en el grupo mediante explante de piel de la oreja de ratones NZB y NZBmt^{C57} y posterior inmortalización por transfección con el plásmido lentiviral pLOX-Ttag-iresTK (Tronolab).

Las células se crecieron en DMEM con alto contenido en glucosa (4.5 g/l) y piruvato (0.11 g/l) (GIBCO™) suplementado con un 5% de suero fetal bovino (SFB), como aporte de proteínas y factores de crecimiento y un 1% de una mezcla de antibióticos (AB), para prevenir contaminaciones por bacterias, compuesta por 10000 unidades/ml de penicilina G sódica y 10000 µg/ml de sulfato de estreptomicina, de Invitrogen.

4.4.2. Cultivo y siembra celular

Para las medidas de respiración, las células se sembraron en placas de cultivo con una densidad de 10000-100000 cél/ml de medio de cultivo, en placas petri de 150 mm de diámetro, a las que se añadió un volumen aproximado de 0.2 ml de medio de cultivo/cm² de superficie de la placa.

Los cultivos se mantuvieron durante su crecimiento en estufa a 37°C en atmósfera húmeda y con 5% de CO₂ cambiando el medio de forma periódica (cada dos o tres días). Cuando las células alcanzaron la confluencia deseada se eliminó el medio por succión y las células se lavaron con PBS (GIBCO™) para eliminar las proteínas del suero que inhiben el efecto de la tripsina. Una vez eliminado el PBS se añadió 1 ml de tripsina de origen pancreático (0.033 ml/cm² de una mezcla 0.05% tripsina (SIGMA) y 0.02% EDTA preparada en PBS y esterilizada por filtración) y se incubó durante 2-3 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo, se comprobó que las células se habían despegado de la placa, observándolas a través de un microscopio invertido. La acción de la tripsina se inhibió mediante adición de PBS suplementado con un 10% de SFB y las células, ya en suspensión, se trasvasaron a un tubo falcon de 15 ml y se centrifugaron 5 minutos a 1300-1500 rpm, lo que permitió su sedimentación.

4.5. Medidas de respiración endógena y desacoplada en fibroblastos inmortalizados

4.5.1. Electrodo de oxígeno

El consumo de oxígeno se midió en un electrodo tipo Clark termostatizado (Oxytherm, Hansatech Instruments) que permite mantener la temperatura a 37°C, que es

la adecuada para que la reacción sea favorable. Los datos obtenidos se registraron en un PC con el programa Oxygraph Plus V1.00 de Hansatech Instruments.

Antes de empezar cada sesión se fijó la temperatura del Oxytherm a 37°C y se calibró el aparato estableciendo el cero mediante adición de un agente oxidante como el ditionito de sodio.

La adición de sustratos e inhibidores de la cadena de transporte electrónico se realizó usando jeringas Hamilton de 10 o 25 μ l.

4.5.2. Medida de respiración endógena y desacoplada

1. Preparación de reactivos:

El dinitrofenol (DNP) usado como **desacoplante** se preparó a una concentración de 6.5 mM. Para preparar 10 ml, se pesaron 12 mg de DNP (184.1 g/mol) y se disolvieron en 4 ml de NaOH 1M. La mezcla se calentó durante 20 minutos a 50°C y se ajustó su pH a 7.0 añadiendo HCl 1M (aprox. 3 ml). El volumen final se ajustó a 10 ml con H₂O, se alicuotó y se congeló a -20°C.

El KCN usado como **inhibidor** se preparó a una concentración de 400 mM en agua.

2. Procedimiento experimental:

Para las medidas de respiración endógena, las células se recogieron por tripsinización de una placa de cultivo de 150 mm de diámetro, se contaron utilizando una cámara de Neubauer y 5×10^6 células se separaron para cada medida. Las células se resuspendieron en 1 ml de medio de cultivo completo (5×10^6 cél/ml) y se introdujeron en la cámara del electrodo para registrar su tasa de respiración endógena, es decir, cuando la respiración está acoplada a la síntesis de ATP. Transcurridos 2-3 minutos, se añadieron 10 μ l de una solución de DNP 6.5 mM, para desacoplar la cadena respiratoria y detectar la máxima capacidad OXPHOS de las células. Transcurridos otros 2-3 minutos, se añadieron 10 μ l de KCN 400 mM para inhibir el consumo de oxígeno asociado a la cadena de transporte electrónico. Un ejemplo de gráfica obtenida se recoge en la figura S1 en el anexo 1.

4.6. Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante análisis de varianza (ANOVA). Para encontrar diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) se utilizó el Post-hoc Fisher's PLSD test. Todos los cálculos fueron realizados con el programa estadístico StatView 5.0.

5. RESULTADOS

5.1. Evaluación de la actividad OXPHOS en homogenados de tejidos de ratones complásticos

Con el fin de evaluar las diferencias en la función OXPHOS inducidas por variantes polimórficas del mtDNA, se determinó la actividad enzimática de la Citocromo c oxidasa (COX) en muestras de homogenados de cerebro e hígado de ratones complásticos en presencia y ausencia del antioxidante N-acetil cisteína (NAC).

La Citocromo c oxidasa o complejo IV es el último de los complejos de la cadena de transporte electrónico y su función es la de catalizar la oxidación del citocromo c con la consiguiente reducción del oxígeno molecular para dar H_2O por lo que es un buen indicador de la eficiencia de la respiración mitocondrial.

Los datos de actividad COX obtenidos se normalizaron frente a la actividad CS, que es una enzima del ciclo de Krebs que nos indica la masa mitocondrial.

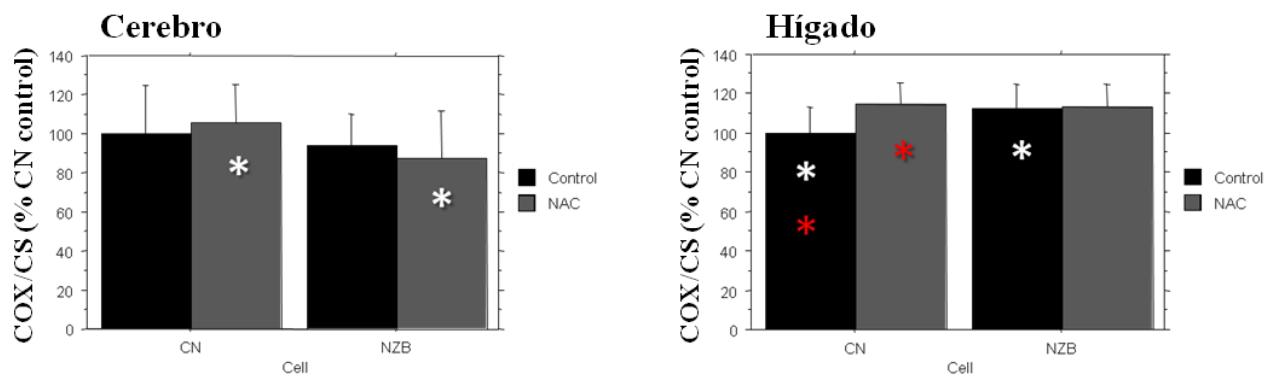


Figura 4: Determinación de la actividad COX/CS en homogenados de cerebro (izquierda) e hígado (derecha) en ratones portadores del mtDNA de C57 (CN) y NZB. La actividad se determinó en muestras de ratones tratados con NAC (gris) y en situación control (negro). Los datos se expresan como la media ± desviación estándar. Los valores de n y de p se recogen en el anexo 2. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) y su color ilustra los grupos que se comparan.

Como se observa en la figura 4, el haplotipo del mtDNA influye en la actividad COX en homogenados de hígado pero no se observan diferencias estadísticamente significativas en muestras de homogenados de cerebro de ratones no tratados. El tratamiento con NAC pone de manifiesto diferencias en actividad entre las distintas líneas de ratón en muestras de cerebro. En el caso del hígado, el tratamiento induce un aumento en la actividad COX/CS de los ratones complásticos que los iguala a la de la línea parental que no se ve afectada por el tratamiento.

5.2. Inmunodetección de proteínas mediante Western blot

Para determinar si las diferencias en función OXPHOS se debían a diferencias en los niveles de expresión de proteínas de los distintos complejos respiratorios, analizamos el contenido de dichas proteínas mediante SDS-PAGE seguida de WB utilizando anticuerpos específicos de proteínas de los distintos complejos respiratorios normalizados por el valor de actina que utilizamos como control de carga (figura 5).

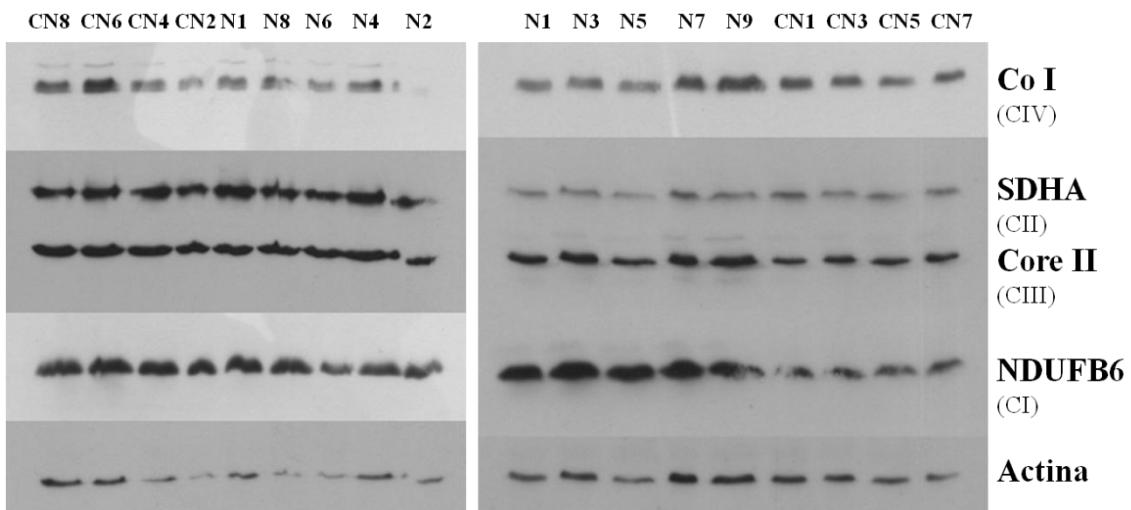


Figura 5: Cuantificación de niveles relativos de proteínas del sistema OXPHOS mediante electroforesis desnaturalizante y western blot. La imagen de la izquierda corresponde a las muestras tratadas con NAC (numeración par) y la imagen de la derecha a las muestras control (números impares). En ambos casos se ha incluido una muestra control (N1) para normalizar los datos por ese valor.

La cuantificación de las proteínas se realizó con el programa Quantity One de BioRad. Los datos se representan normalizados por el valor de intensidad de actina y el valor de una muestra que se cargó en todos los geles (N1). Una vez obtenidos estos datos se analizaron estadísticamente con el programa StatView como se representan en la figura 6.

Las gráficas obtenidas representan la cantidad de proteínas de los diferentes complejos en las líneas CN y NZB en muestras obtenidas de ratones control y tratados con NAC. En este caso hay diferencias estadísticamente significativas para:

- ✓ **Proteína SDHA del complejo II:**
 - Diferencias entre las muestras control CN y NZB
 - Diferencias entre las muestras CN control y tratadas con NAC
- ✓ **Proteína Co I del complejo IV:**
 - Diferencias entre las muestras control CN y NZB
 - Diferencias entre las muestras CN control y tratadas con NAC

Este experimento fue realizado en su totalidad con muestras de cerebro.

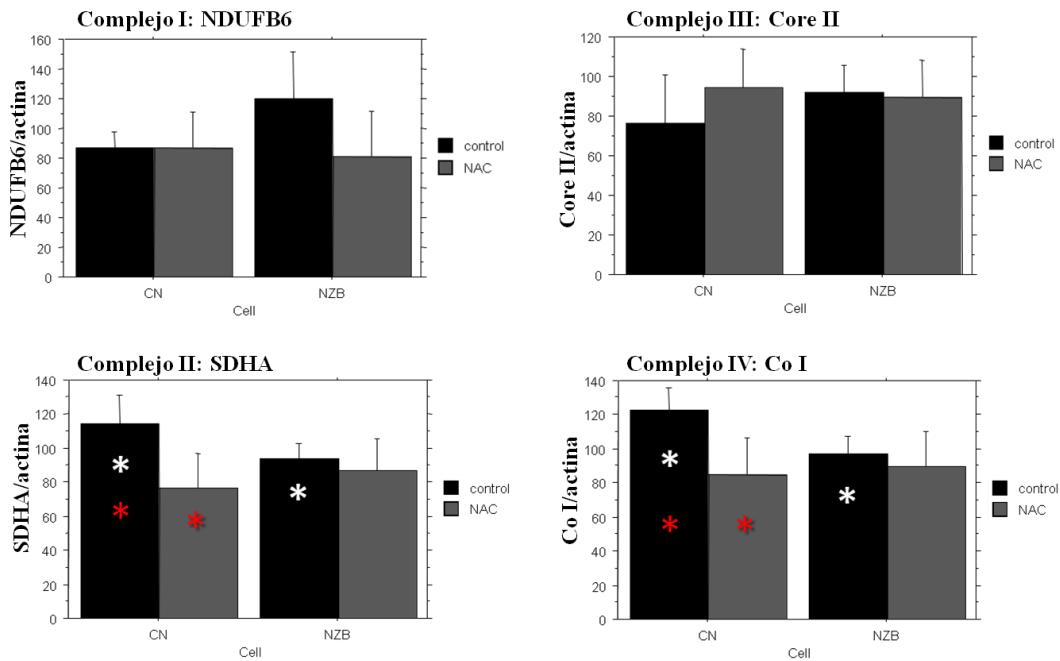


Figura 6: Determinación de la cantidad de proteína/actina en homogenados de cerebro, para los complejos I, II, III y IV de la cadena respiratoria, en ratones portadores del mtDNA de C57 (CN) y NZB. Los niveles de proteínas de los complejos respiratorios se determinaron en muestras de cerebro de ratones tratados con NAC (gris) y en situación control (negro). Los datos se expresan como la media \pm desviación estándar. Los valores de n y de p se recogen en el anexo 2. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) y su color ilustra los grupos que se comparan.

5.3. Evaluación del ensamblaje de supercomplejos en geles nativos de PAA “Blue Native”

Para determinar si las variantes polimórficas de mtDNA influyen en la capacidad de ensamblaje de supercomplejos respiratorios, llevamos a cabo experimentos de actividad enzimática del complejo I (CI) en geles nativos, utilizando muestras de mitocondrias aisladas de cerebro e hígado de los cuatro grupos de estudio permeabilizadas con digitonina.

En el gel se puede observar que no existen diferencias en los patrones electroforéticos entre las distintas muestras, aunque sí parece que la presencia de NAC en cerebro afecta a la cantidad de supercomplejos ensamblados.

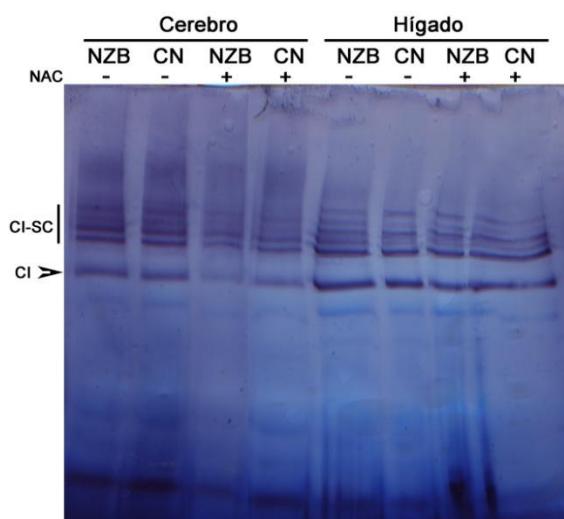


Figura 7: Estudio del ensamblaje de complejos respiratorios mediante “Blue Native” seguida de actividad en gel del complejo I.

5.4. Cuantificación del número de copias de mtDNA por Real Time PCR

Con el fin de determinar si los haplotipos mitocondriales influyen en la biogénesis mitocondrial, evaluamos el número de copias de mtDNA en muestras de cerebro e hígado mediante PCR cuantitativa.

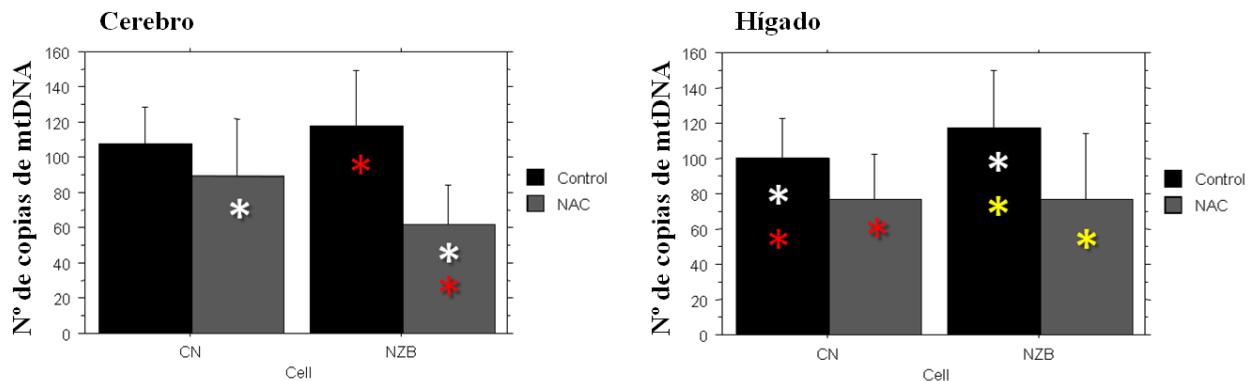


Figura 8: Evaluación de la biogénesis mitocondrial en ratones portadores de distintas variantes de mtDNA. Determinación del número de copias de mtDNA en homogenados de cerebro (izquierda) e hígado (derecha) en ratones portadores del mtDNA de C57 (CN) y NZB, tratados con NAC (gris) y en situación control (negro), mediante PCR cuantitativa. Los datos se expresan como la media ± desviación estándar. Los valores de n y de p se recogen en el anexo 2. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) y su color ilustra los grupos que se comparan.

Como se observa en la figura 8, el haplotipo del mtDNA influye en el número de copias de mtDNA en homogenados de hígado control, pero no ocurre lo mismo con las muestras de cerebro, que no presentan diferencias estadísticamente significativas. En cerebro, el tratamiento con NAC pone de manifiesto diferencias en la cantidad de mtDNA, en la línea parental NZB, que sufre una disminución del contenido en mtDNA cuando es tratada con el antioxidante. En el caso del hígado, el tratamiento con NAC también induce una disminución del número de copias de mtDNA, en este caso para ambas líneas. En resumen, ambas líneas (CN y NZB), tanto de cerebro como de hígado, ven reducido su número de copias de mtDNA al ser tratadas con un antioxidante.

5.5. Evaluación de la actividad OXPHOS en fibroblastos inmortalizados

Estudios previos del grupo GENOXPHOS determinaron que existe diferencia en la actividad OXPHOS debidas a haplotipos mitocondriales en células de ratón en cultivo^{18,22}. Con el fin de confirmar estos datos sin los problemas de aneuploidía que presentan las líneas celulares inmortalizadas tras años de cultivo, se llevó a cabo el establecimiento de fibroblastos primarios a partir de células epiteliales de las líneas de ratón NZB y CN y su posterior inmortalización. Para evaluar la actividad OXPHOS de estas líneas medimos la respiración endógena y desacoplada en células intactas, utilizando un electrodo de oxígeno tipo Clark.

Como se observa en la gráfica (figura 9) en estas líneas celulares menos adaptadas al cultivo que las utilizadas en los estudios previos, observamos diferencias estadísticamente significativas tanto en la respiración endógena como en la desacoplada.

Así, la cadena respiratoria de la línea complástica que es portadora del mtDNA de C57, parece presentar una mayor eficiencia en el consumo de oxígeno.

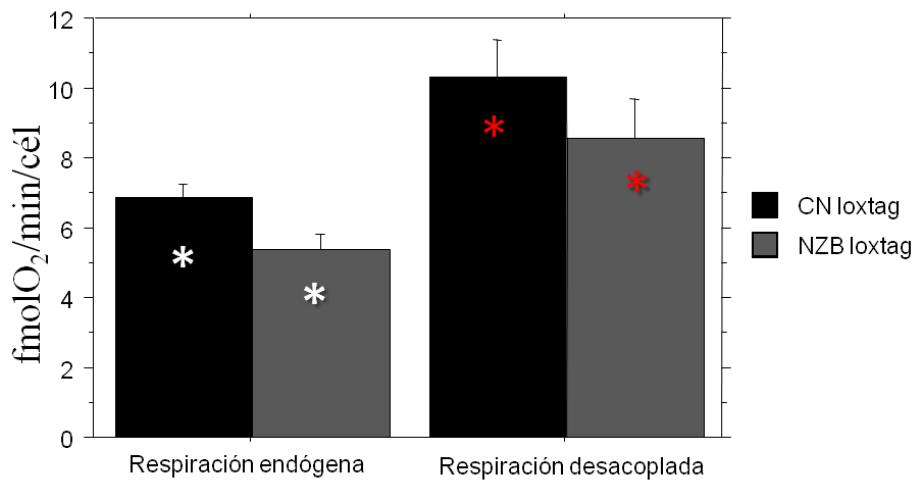


Figura 9: Medidas de la respiración endógena y desacoplada en fibroblastos inmortalizados.

Se puede observar que la línea complástica CN presenta valores mayores de respiración, tanto endógena como desacoplada. Los datos se expresan como la media \pm desviación estándar. Los valores de n y de p se recogen en el anexo 2. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) y su color ilustra los grupos que se comparan.

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El objetivo principal de este trabajo consistía en evaluar las posibles diferencias fenotípicas inducidas por las variantes polimórficas del mtDNA. Los experimentos llevados a cabo confirman que la sustitución del mtDNA en un mismo fondo genético es suficiente para inducir diferencias medibles en la función mitocondrial. Estos efectos son moderados y no patológicos, pero son capaces de afectar el comportamiento celular y el metabolismo general del organismo. La combinación genética utilizada en este trabajo, mtDNA de C57 en el fondo nuclear de NZB, genera diversos efectos, como son: una disminución en la actividad de la enzima COX y en la biogénesis mitocondrial en hígado, un aumento en la síntesis de los complejos II y IV de la cadena respiratoria en cerebro y un aumento de la respiración, tanto endógena como desacoplada, en fibroblastos primarios de ratón.

Trabajos previos del grupo habían demostrado que estas diferencias fenotípicas van acompañadas por una producción ligeramente superior de ROS, que alteran la célula activando la biogénesis mitocondrial, como un mecanismo de compensación. Los niveles basales de ROS continuamente elevados no promueven el daño oxidativo, sino que constituyen una forma de combatirlo, activando los genes implicados en la biogénesis mitocondrial. Este efecto compensatorio se puede eliminar al tratar los ratones con un antioxidante (NAC), que nos permite observar el comportamiento de la célula en ausencia de dicha compensación.

En muestras de homogenado de cerebro, la actividad COX no presenta diferencias significativas entre ambas líneas de ratón. Sin embargo, al evaluar el número de copias de mtDNA, observamos que la Línea parental, NZB, presenta un incremento en los niveles de mtDNA lo que confirmaría que posee un sistema OXPHOS menos eficiente pues se necesitan más mitocondrias para alcanzar la misma actividad. Si reducimos el número de copias de mtDNA mediante tratamiento con NAC, ya se observan diferencias estadísticamente significativas entre ratones portadores de ambas variantes.

En el caso de muestras de hígado, el comportamiento es diferente pero, al igual que en cerebro, la actividad COX correlaciona con el número de copias de mtDNA.

7. CONCLUSIONES

Una vez analizados los resultados obtenidos en los distintos experimentos realizados se puede concluir que:

1. El haplotipo de mtDNA influye en el fenotipo OXPHOS de los ratones.
2. Las variantes polimórficas del mtDNA inducen cambios en la biogénesis mitocondrial en hígado y cerebro de ratón.
3. El haplotipo de mtDNA no parece afectar de modo notable al ensamblaje de supercomplejos en las variantes y tejidos analizados.
4. El antioxidante NAC desenmascara el efecto compensatorio de las ROS poniendo en evidencia la actividad real del sistema OXPHOS. Al tratar con NAC y disminuir ROS se elimina el efecto biogénico sobre las mitocondrias.
5. La línea de fibroblastos inmortalizados portadora del mtDNA de C57 presenta mayor tasa de respiración endógena y desacoplada que su línea parental correspondiente (NZB).

7. CONCLUSIONS

Once the results obtained in the diverse experiments have been analyzed, it can be concluded that:

1. *mtDNA haplotypes influence the OXPHOS phenotype in mice.*
2. *mtDNA polymorphic variants induce changes in mitochondrial biogenesis in mouse brain and liver.*
3. *The mtDNA haplotype doesn't seem to affect the assembly of supercomplex in the analyzed variants and tissues.*
4. *NAC antioxidant unmasks the compensatory effect of ROS highlighting the actual activity of the OXPHOS system. Treating with NAC and decreasing ROS eliminates the biogenic effect on mitochondria.*
5. *Immortalized fibroblasts carrying the C57 mtDNA present higher rate of endogenous and uncoupled respiration than their corresponding parental cells (NZB).*

8. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Goffart, S. & Wiesner, R. J. Regulation and co-ordination of nuclear gene expression during mitochondrial biogenesis. *Exp Physiol* 88, 33-40 (2003).
- 2 Kelly, D. P. & Scarpulla, R. C. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev* 18, 357-368 (2004).
- 3 Borisov, V. B. Mutations in respiratory chain complexes and human diseases. *Ital J Biochem* 53, 34-40 (2004).
- 4 Trifunovic, A. Mitochondrial DNA and ageing. *Biochim Biophys Acta* 1757, 611-617 (2006).
- 5 Carew, J. S. & Huang, P. Mitochondrial defects in cancer. *Mol Cancer* 1, 9 (2002).
- 6 Kroemer, G. & Reed, J. C. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 6, 513-519 (2000).
- 7 Torroni, A. *et al.* Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics* 144, 1835-1850 (1996).
- 8 Wallace, D. C., Brown, M. D. & Lott, M. T. Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene* 238, 211-230 (1999).
- 9 Ruiz-Pesini, E. *et al.* Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *Am J Hum Genet* 67, 682-696 (2000).
- 10 De Benedictis, G. *et al.* Mitochondrial DNA inherited variants are associated with successful aging and longevity in humans. *Faseb J* 13, 1532-1536 (1999).
- 11 Tanaka, M., Gong, J. S., Zhang, J., Yoneda, M. & Yagi, K. Mitochondrial genotype associated with longevity. *Lancet* 351, 185-186 (1998).
- 12 Howell, N., Herrnstadt, C., Shults, C. & Mackey, D. A. Low penetrance of the 14484 LHON mutation when it arises in a non-haplogroup J mtDNA background. *Am J Med Genet A* 119, 147-151 (2003).
- 13 Wallace, D. C., Ruiz-Pesini, E. & Mishmar, D. mtDNA variation, climatic adaptation, degenerative diseases, and longevity. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 68, 479-486 (2003).
- 14 Carelli, V. *et al.* Respiratory function in cybrid cell lines carrying European mtDNA haplogroups: implications for Leber's hereditary optic neuropathy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1588, 7-14 (2002).
- 15 Gomez-Duran, A. *et al.* Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups. *Hum Mol Genet* 19, 3343-3353, doi:ddq246 (2010).
- 16 Pello, R. *et al.* Mitochondrial DNA background modulates the assembly kinetics of OXPHOS complexes in a cellular model of mitochondrial disease. *Hum Mol Genet* 17, 4001-4011, (2008).

- 17 Bayona-Bafaluy, M. P. *et al.* Revisiting the mouse mitochondrial DNA sequence. *Nucleic Acids Res* 31, 5349-5355 (2003).
- 18 Moreno-Loshuertos, R. *et al.* Differences in reactive oxygen species production explain the phenotypes associated with common mouse mitochondrial DNA variants. *Nat Genet* 38, 1261-1268, (2006).
- 19 Johnson, K. R., Zheng, Q. Y., Bykhovskaya, Y., Spirina, O. & Fischel-Ghodsian, N. A nuclear-mitochondrial DNA interaction affecting hearing impairment in mice. *Nat Genet* 27, 191-194 (2001).
- 20 Jenuth, J. P., Peterson, A. C. & Shoubridge, E. A. Tissue-specific selection for different mtDNA genotypes in heteroplasmic mice. *Nat Genet* 16, 93-95 (1997).
- 21 Roubertoux, P. L. *et al.* Mitochondrial DNA modifies cognition in interaction with the nuclear genome and age in mice. *Nat Genet* 35, 65-69 (2003).
- 22 Moreno-Loshuertos, R., Perez-Martos, A., Fernandez-Silva, P. & Enriquez, J. A. Length variation in the mouse mitochondrial tRNA(Arg) DHU loop size promotes oxidative phosphorylation functional differences. *FEBS J* 280, 4983-4998, (2013).
- 23 Yu, X. *et al.* Dissecting the effects of mtDNA variations on complex traits using mouse conplastic strains. *Genome Res* 19, 159-165, (2009).
- 24 Droke, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82, 47-95 (2002).
- 25 Monsalve, M., Borniquel, S., Valle, I. & Lamas, S. Mitochondrial dysfunction in human pathologies. *Front Biosci* 12, 1131-1153, (2007).
- 26 Baughman, J. M. & Mootha, V. K. Buffering mitochondrial DNA variation. *Nat Genet* 38, 1232-1233, (2006).
- 27 Fernandez-Vizarra, E., Enriquez, J. A., Perez-Martos, A., Montoya, J. & Fernandez-Silva, P. Tissue-specific differences in mitochondrial activity and biogenesis. *Mitochondrion* 11, 207-213, (2011).
- 28 Schagger, H. *et al.* Electrophoretic separation of multiprotein complexes from blood platelets and cell lines: technique for the analysis of diseases with defects in oxidative phosphorylation. *Electrophoresis* 17, 709-714 (1996).

9. ANEXOS

Anexo 1. Tablas Materiales y Métodos

A. Reacción citrato sintasa:

Tabla S1

	Concentración stock	Volumen (μl)	Concentración final
Tampón	10 mM	876.7	~10 mM
Acetil-CoA	7 mg/ml	3.3	0.023 mg/ml
DTNB	1 mM	100	0.1 mM
Muestra	----	5	----
Tritón X-100	10%	10	0.1%
OAA	50 mM	5	0.25 mM

Tabla S1. Volumen y concentración de los compuestos utilizados en la reacción de la citrato sintasa.

B. Reacción citocromo c oxidasa:

Tabla S2

	Concentración stock	Volumen (μl)	Concentración final
H₂O destilada	----	795	----
KP(pH=7.0)	100 mM	100	10 mM
Muestra	----	5	----
Cit. C red. 1%	10 mg/ml	100	1 mg/ml

Tabla S2. Volumen y concentración de los compuestos utilizados en la reacción de COX.

C. Composición del gel separador y concentrador:

Tabla S3

Componente	Gel separador	Gel concentrador
Tampón (4X)	1.25 ml (pH 1.25)	0.5 ml (pH 6.7)
AA:BA (30%)	2.084 ml	0.333 ml
H₂O destilada	1.641 ml	1.167 ml
SDS 20%	25 μl	10 μl
APS 20%	15 μl	10 μl
TEMED	5 μl	5 μl

Tabla S3. Composición de las disoluciones para la preparación de los geles separador (12.5%) y concentrador para electroforesis de proteínas en SDS-PAGE.

D. Composición para la preparación del gel en gradiente 3 → 13%:

Tabla S4

Componente	Acrilamida 3%	Acrilamida 13%
AA:BA (48.5:1.5)	305 µl	866 µl
Tampón BN (3X)	1.667 ml	1.111 ml
H₂O destilada	3 ml	796 µl
Glicerol	-	560 µl
APS 10%	40 µl	14 µl
TEMED	4 µl	3 µl

Tabla S4. Composición de las disoluciones para la preparación de un gel de Blue Native para la separación de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial.

E. Anticuerpos empleados en las inmunodetecciones:

Tabla S5

	<i>Ab Primario</i> (dilución)	Proteína	<i>Ab Secundario</i> (dilución)	Origen
Complejo I	Anti-17 KDa (1/10000)	NDUFB6	Anti-ratón (1/5000)	Molecular Probes
Complejo II	Anti-70 KDa (1/5000)	SDHA	Anti-ratón (1/5000)	Molecular Probes
Complejo III	Anti-Core2 (1/5000)	UQCRC2	Anti-ratón (1/5000)	Mitosciences
Complejo IV	Anti-COI (1/5000)	MT-CO1	Anti-ratón (1/5000)	Mitosciences
Control de carga	Anti-Actina (1/5000)	β-Actina	Anti-conejo (1/6000)	SIGMA

Tabla S5. Tabla resumen de los anticuerpos utilizados en las inmunodetecciones, dilución a la que se han sido utilizados y proteínas a las que se unen específicamente.

F. Oligos utilizados:

Tabla S6

	Gen	Oligo	Posición	Secuencia
Oligos mitocondriales	<i>mt-Co2</i> ratón (NC_005089)	<i>COII RTF</i>	7037-7052	CTACAAGACGCCACAT
		<i>COII RTR</i>	7253-7238	GAGAGGGGAGAGCAAT
Oligos nucleares	<i>SdhA</i> ratón (AK049441)	<i>SDH RTF</i>	1026-1043	TAATACAGCCCCAAGTCT
		<i>SDH RTR</i>	1219-1202	TGGACCCATCTTCTATGC

Tabla S6. Primers utilizados para cuantificar el número de copias de mtDNA en muestras murinas por Real Time PCR

G. Programa de amplificación:

Tabla S7

Desnaturalización	95°C	10 minutos	1 ciclo
Cuantificación	95 °C	10 segundos	55 ciclos
	60°C (*)	10 segundos	
	72°C	10 segundos	
Melting	95°C	0 segundos	1 ciclo
	65°C	15 segundos	
	98°C	0 segundos (0.1°C/s)	
Enfriamiento	40°C	30 segundo	1 ciclo

(*) Esta temperatura depende de los primers utilizados.

H. Gráfica de respiración:

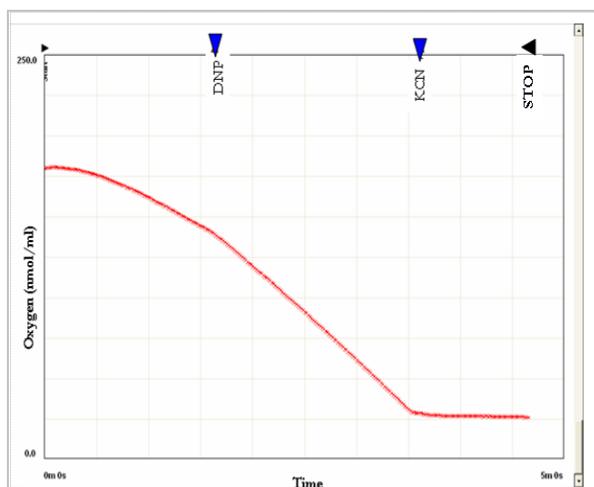


Figura S1: Medida de respiración en células intactas.

Gráfica correspondiente a la respiración endógena y desacoplada de 5 millones de células de ratón. Observamos el cambio de pendiente tras la adición de DNP que provoca el desacoplamiento entre la respiración y la síntesis de ATP mostrándose la tasa de respiración celular máxima. El KCN inhibe totalmente la actividad respiratoria.

Anexo 2. Análisis estadístico

A. Estadística del ensayo de medida de actividades COX (Figura 4)

A.1) Valores de n, medias y desviaciones estándar

Cerebro

Means Table for COX/CS normalizado
Effect: Línea * Tratamiento
Split By: Tejido
Cell: Cerebro

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
CN, Control	21	100,000	24,963	5,447
CN, NAC	21	105,382	20,062	4,378
NZB, Control	21	94,408	15,671	3,420
NZB, NAC	21	87,474	24,361	5,316

Hígado

Means Table for COX/CS normalizado
Effect: Línea * Tratamiento
Split By: Tejido
Cell: Hígado

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
CN, Control	12	100,000	12,832	3,704
CN, NAC	9	114,839	10,852	3,617
NZB, Control	12	111,942	12,807	3,697
NZB, NAC	9	113,146	11,283	3,761

A.2) Análisis estadístico t de Student

A.2.1. Efecto del haplotipo mitocondrial sobre la actividad COX/CS

Cerebro control

Fisher's PLSD for COX/CS normalizado
Effect: Línea
Significance Level: 5 %
Split By: Tejido, Tratamiento
Cell: Cerebro, Control

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
CN, NZB	5,592	12,999	,3898

Hígado control

Fisher's PLSD for COX/CS normalizado
Effect: Línea
Significance Level: 5 %
Split By: Tejido, Tratamiento
Cell: Hígado, Control

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
CN, NZB	-11,942	10,854	,0325

Cerebro NAC

Fisher's PLSD for COX/CS normalizado
Effect: Línea
Significance Level: 5 %
Split By: Tejido, Tratamiento
Cell: Cerebro, NAC

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
CN, NZB	17,908	13,918	,0130

Hígado NAC

Fisher's PLSD for COX/CS normalizado
Effect: Línea
Significance Level: 5 %
Split By: Tejido, Tratamiento
Cell: Hígado, NAC

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
CN, NZB	1,694	11,063	,7497

A.2.2. Efecto del NAC sobre la actividad COX/CS

Cerebro CN

Fisher's PLSD for COX/CS normalizado
Effect: Tratamiento
Significance Level: 5 %
Split By: Tejido, Línea
Cell: Cerebro, CN

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
Control, NAC	-5,382	14,124	,4457

Cerebro NZB

Fisher's PLSD for COX/CS normalizado
Effect: Tratamiento
Significance Level: 5 %
Split By: Tejido, Línea
Cell: Cerebro, NZB

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
Control, NAC	6,933	12,775	,2793

Hígado CN

Fisher's PLSD for COX/CS normalizado

Effect: Tratamiento

Significance Level: 5 %

Split By: Tejido, Línea

Cell: Hígado, CN

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
Control, NAC	-14,839	11,111	,0115

Hígado NZB

Fisher's PLSD for COX/CS normalizado

Effect: Tratamiento

Significance Level: 5 %

Split By: Tejido, Línea

Cell: Hígado, NZB

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
Control, NAC	-1,204	11,250	,8252

B. Estadística del análisis de proteínas OXPHOS por Western Blot (Figura 6)

B.1) Valores de n, medias y desviaciones estándar

Ndufb6 vs actina

Means Table for NDUFB6/actina

Effect: Línea * Tratamiento

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
CN, control	4	86,722	10,947	5,473
CN, NAC	4	86,655	23,877	11,939
NZB, control	6	119,893	31,762	12,967
NZB, NAC	4	80,898	30,969	15,484

Core 2 vs actina

Means Table for Core2/actina

Effect: Línea * Tratamiento

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
CN, control	4	76,513	24,151	12,075
CN, NAC	4	94,635	19,018	9,509
NZB, control	6	92,122	13,451	5,491
NZB, NAC	4	89,067	19,124	9,562

SDHA vs actina

Means Table for SDHA/actina

Effect: Línea * Tratamiento

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
CN, control	4	114,565	16,701	8,351
CN, NAC	4	76,500	20,622	10,311
NZB, control	6	93,812	8,858	3,616
NZB, NAC	4	86,968	19,118	9,559

Co1 vs actina

Means Table for Co1/actina

Effect: Línea * Tratamiento

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
CN, control	4	122,810	12,800	6,400
CN, NAC	4	84,385	22,013	11,007
NZB, control	6	97,168	10,039	4,098
NZB, NAC	4	89,975	20,004	10,002

B.2) Análisis estadístico t de Student

B.2.1. Efecto del haplotipo mitocondrial sobre los niveles de proteínas OXPHOS

Ndufb6 control

Fisher's PLSD for NDUFB6/actina

Effect: Línea

Significance Level: 5 %

Split By: Tratamiento

Cell: control

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
CN, NZB	-33,171	38,686	,0834

Ndufb6 NAC

Fisher's PLSD for NDUFB6/actina

Effect: Línea

Significance Level: 5 %

Split By: Tratamiento

Cell: NAC

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
CN, NZB	5,757	47,843	,7783

Core 2 control

Fisher's PLSD for Core2/actina
Effect: Línea
Significance Level: 5 %
Split By: Tratamiento
Cell: control

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
CN, NZB	-15,609	27,114	,2210

Core 2 NAC

Fisher's PLSD for Core2/actina
Effect: Línea
Significance Level: 5 %
Split By: Tratamiento
Cell: NAC

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
CN, NZB	5,568	32,997	,6941

SDHA control

Fisher's PLSD for SDHA/actina
Effect: Línea
Significance Level: 5 %
Split By: Tratamiento
Cell: control

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
CN, NZB	20,753	18,450	,0319

SDHA NAC

Fisher's PLSD for SDHA/actina
Effect: Línea
Significance Level: 5 %
Split By: Tratamiento
Cell: NAC

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
CN, NZB	-10,468	34,404	,4847

Co1 control

Fisher's PLSD for Co1/actina
Effect: Línea
Significance Level: 5 %
Split By: Tratamiento
Cell: control

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
CN, NZB	25,642	16,604	,0074

Co1 NAC

Fisher's PLSD for Co1/actina
Effect: Línea
Significance Level: 5 %
Split By: Tratamiento
Cell: NAC

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
CN, NZB	-5,590	36,391	,7199

B.2.2. Efecto del NAC sobre los niveles de proteínas OXPHOS

Ndufb6 CN

Fisher's PLSD for NDUFB6/actina
Effect: Tratamiento
Significance Level: 5 %
Split By: Línea
Cell: CN

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
control, NAC	,067	32,137	,9961

Ndufb6 NZB

Fisher's PLSD for NDUFB6/actina
Effect: Tratamiento
Significance Level: 5 %
Split By: Línea
Cell: NZB

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
control, NAC	38,996	46,839	,0911

Core 2 CN

Fisher's PLSD for Core2/actina
Effect: Tratamiento
Significance Level: 5 %
Split By: Línea
Cell: CN

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
control, NAC	-18,123	37,609	,2830

Core 2 NZB

Fisher's PLSD for Core2/actina
Effect: Tratamiento
Significance Level: 5 %
Split By: Línea
Cell: NZB

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
control, NAC	3,054	23,546	,7725

SDHA CN

Fisher's PLSD for SDHA/actina
Effect: Tratamiento
Significance Level: 5 %
Split By: Línea
Cell: CN

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
control, NAC	38,065	32,467	,0285

SDHA NZB

Fisher's PLSD for SDHA/actina
Effect: Tratamiento
Significance Level: 5 %
Split By: Línea
Cell: NZB

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
control, NAC	6,844	20,306	,4594

Co1 CN

Fisher's PLSD for Co1/actina
Effect: Tratamiento
Significance Level: 5 %
Split By: Línea
Cell: CN

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
control, NAC	38,425	31,154	,0235

Co1 NZB

Fisher's PLSD for Co1/actina
Effect: Tratamiento
Significance Level: 5 %
Split By: Línea
Cell: NZB

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
control, NAC	7,193	21,727	,4671

C. Estadística del análisis del número de copias de mtDNA(Figura 6)

C.1) Valores de n, medias y desviaciones estándar

Cerebro

Means Table for Nº copias mtDNA
Effect: Línea * Tratamiento
Split By: Tejido
Cell: Cerebro

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
NZB, Control	21	117,224	31,627	6,902
NZB, NAC	16	62,061	22,478	5,620
NZBmTC57, Control	18	107,411	21,126	4,979
NZBmTC57, NAC	15	89,481	32,469	8,383

Hígado

Means Table for Nº copias mtDNA
Effect: Línea * Tratamiento
Split By: Tejido
Cell: Hígado

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
NZB, Control	24	117,798	32,474	6,629
NZB, NAC	16	76,276	37,766	9,441
NZBmTC57, Control	19	100,000	22,107	5,072
NZBmTC57, NAC	10	76,750	25,444	8,046

C.2) Análisis estadístico t de Student

C.2.1. Efecto del haplotipo mitocondrial sobre la el número de copias de mtDNA

Cerebro control

Fisher's PLSD for Nº copias mtDNA
Effect: Línea
Significance Level: 5 %
Split By: Tejido, Tratamiento
Cell: Cerebro, Control

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
NZB, NZBmTC57	9,813	17,773	,2705

Hígado control

Fisher's PLSD for Nº copias mtDNA
Effect: Línea
Significance Level: 5 %
Split By: Tejido, Tratamiento
Cell: Hígado, Control

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
NZB, NZBmTC57	17,798	17,608	,0477

Cerebro NAC

Fisher's PLSD for Nº copias mtDNA

Effect: Línea

Significance Level: 5 %

Split By: Tejido, Tratamiento

Cell: Cerebro, NAC

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
NZB, NZBmtC57	-27,420	20,401	,0102

Hígado NAC

Fisher's PLSD for Nº copias mtDNA

Effect: Línea

Significance Level: 5 %

Split By: Tejido, Tratamiento

Cell: Hígado, NAC

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
NZB, NZBmtC57	-,474	28,019	,9725

C.2.2. Efecto del NAC sobre el número de copias de mtDNA

Cerebro CN

Fisher's PLSD for Nº copias mtDNA

Effect: Tratamiento

Significance Level: 5 %

Split By: Tejido, Línea

Cell: Cerebro, NZBmtC57

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
Control, NAC	17,929	19,143	,0654

Cerebro NZB

Fisher's PLSD for Nº copias mtDNA

Effect: Tratamiento

Significance Level: 5 %

Split By: Tejido, Línea

Cell: Cerebro, NZB

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
Control, NAC	55,163	18,913	<,0001

Hígado CN

Fisher's PLSD for Nº copias mtDNA

Effect: Tratamiento

Significance Level: 5 %

Split By: Tejido, Línea

Cell: Hígado, NZBmtC57

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
Control, NAC	23,250	18,655	,0165

Hígado NZB

Fisher's PLSD for Nº copias mtDNA

Effect: Tratamiento

Significance Level: 5 %

Split By: Tejido, Línea

Cell: Hígado, NZB

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
Control, NAC	41,521	22,645	,0007

D. Estadística de la evaluación de la actividad OXPHOS en fibroblastos inmortalizados

D.1) Valores de n, medias y desviaciones estándar

Respiración endógena

Means Table for Endogenous Resp

Effect: Cell line

Row exclusion: Respiracion total.ssd

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
CN loxtag	5	6,856	,393	,176
NZB loxtag	7	5,399	,409	,154

Respiración desacoplada

Means Table for Maximal respiration

Effect: Cell line

Row exclusion: Respiracion total.ssd

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
CN loxtag	5	10,304	1,044	,467
NZB loxtag	7	8,533	1,172	,443

D.2) Análisis estadístico t de Student

Respiración endógena

Fisher's PLSD for Endogenous Resp

Effect: Cell line

Significance Level: 5 %

Row exclusion: Respiracion total.ssd

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value	
CN loxtag, NZB loxtag	1,456	,525	,0001	S

Respiración desacoplada

Fisher's PLSD for Maximal respiration

Effect: Cell line

Significance Level: 5 %

Row exclusion: Respiracion total.ssd

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value	
CN loxtag, NZB loxtag	1,772	1,465	,0225	S