

Laura Llobet Sesé

El sistema de fosforilación oxidativa en la adipogénesis: efecto de xenobióticos

Departamento
Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Director/es
Ruiz Pesini, Eduardo
López Gallardo, Ester

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

EL SISTEMA DE FOSFORILACIÓN OXIDATIVA EN LA ADIPOGÉNESIS: EFECTO DE XENOBIÓTICOS

Autor

Laura Llobet Sesé

Director/es

Ruiz Pesini, Eduardo
López Gallardo, Ester

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Bioquímica y Biología Molecular y Celular

2016



**Universidad
Zaragoza**

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

El sistema de fosforilación oxidativa en la adipogénesis: efecto de xenobióticos.

Memoria presentada por **Laura Llobet Sesé**

Licenciada en Bioquímica

para optar al Grado de Doctor

Tesis Doctoral dirigida por el Dr. Eduardo Ruiz Pesini y la Dra. Ester López
Gallardo

Zaragoza, Mayo de 2016



Departamento de
Bioquímica y Biología
Molecular y Celular
Universidad Zaragoza

D. Eduardo Ruiz Pesini, Investigador de la Fundación Agencia Aragonesa para la Investigación y el Desarrollo (ARAID)

y

Dña. Ester López Gallardo, Investigadora del Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER)

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral “**El sistema de fosforilación oxidativa en la adipogénesis: efecto de xenobióticos**”, ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza, bajo su dirección y tutela, y que ésta se ajusta al plan de investigación y reúne, a su juicio, las condiciones requeridas para optar al Grado de Doctor.

Zaragoza, Mayo de 2016

Fdo: Eduardo Ruiz Pesini

Fdo: Ester López Gallardo

Este trabajo ha sido financiado con fondos de los proyectos de investigación del Instituto de Salud Carlos III FIS PI14-00070 y PI11-01301, y del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud PIPAMER 09-01 y 10-010.

La doctoranda ha disfrutado de una beca predoctoral del Gobierno de Aragón (6 meses) y de una beca PFIS de formación de personal investigador del Instituto de Salud Carlos III (FI12/00217). Además, ha realizado una estancia de investigación de 2 meses en Göttingen (Alemania) gracias al programa Ibercaja-CAI.

Parte de este trabajo ha sido publicado en:

- López-Gallardo, E., **Llobet, L.**, Emperador, S., Montoya, J., Ruiz-Pesini, E. "Effects of tributyltin chloride on cybrids with or without an ATP synthase pathologic mutation." *Environmental Health Perspectives*, 2016. In press.
- **Llobet, L.**, Toivonen, J.M., Montoya, J., Ruiz-Pesini, E., López-Gallardo, E. "Xenobiotics that affect oxidative phosphorylation alter differentiation of human adipose-derived stem cells at concentrations that are found in human blood." *Disease Models and Mechanisms*, 8: 1441-1455, 2015. DOI: 10.1242/dmm.021774
- **Llobet, L.**, Montoya, J., López-Gallardo, E., Ruiz-Pesini, E. "Side effects of culture media antibiotics on cell differentiation." *Tissue Engineering Part C*, 21 (11): 1143-1147, 2015. DOI: 10.1089/ten.TEC.2015.0062
- López-Gallardo E., Emperador S., Solano A., **Llobet L.**, Martín-Navarro A., López-Pérez M.J., Briones P., Pineda M., Artuch R., Barraquer E., Jericó I., Ruiz-Pesini E., Montoya J. "Expanding the clinical phenotypes of Mt-ATP6 mutations" *Human Molecular Genetics*, 23 (23): 6191-6200, 2014.
- Martínez-Romero I., Herrero-Martín MD., **Llobet L.**, Emperador S., Martín-Navarro A., Narberhaus B., Ascaso FJ., López-Gallardo E., Montoya J., Ruiz-Pesini E. "A new MT-ND1 pathologic mutation for Leber hereditary optic neuropathy." *Clinical and Experimental Ophthalmology*, 42, 856-864, 2014. DOI: 10.1111/ceo.12355
- Tavira B., Gómez J., Díaz-Corte C., **Llobet L.**, Ruiz-Pesini E., Ortega F., Coto E. "Mitochondrial DNA haplogroups and risk of new-onset diabetes among tacrolimus-treated renal transplanted patients." *Gene* 538(1): 195-8, 2014.
- Palacin M., Coto E., **Llobet L.**, Pacheu-Grau D., Montoya, J., Ruiz-Pesini, E. "FK506 affects mitochondrial protein synthesis and oxygen consumption in human cells." *Cell Biol Toxicol* 29(6): 407-14, 2013.
- **Llobet L.**, Gómez-Durán A., Iceta R., Iglesias E., Montoya J., Martín-Martínez J., Ara J.R., Ruiz-Pesini E. "Stressed cybrids model demyelinated axons in multiple sclerosis". *Metab Brain Dis* 28(4): 639-45, 2013.
- Iglesias E., **Llobet L.**, Pacheu-Grau D., Gómez-Durán A., Ruiz-Pesini E. "Cybrids for Mitochondrial DNA Pharmacogenomics". *Drug development research* 73: 453-460, 2012.
- Martínez-Romero, I., Emperador, S., **Llobet, L.**, Montoya, J., Ruiz-Pesini, E. "Mitogenomics: Recognizing the Significance of Mitochondrial Genomic Variation for Personalized Medicine" *Curr. Pharmacogenomics and Person. Med* 9, 84-93, 2011.

“La diferencia entre ganar y perder consiste, a menudo, en no abandonar.”

Walt Disney

A mi Familia

ABREVIATURAS

ACN: acetonitrilo

AF: ácido fórmico

AMEL: amelogenina

ApoE: apolipoproteína E

APS: persulfato de amonio

ATP: adenosina trifosfato

BMI: índice de masa corporal

BSA: albúmina sérica bovina

CD: cluster de diferenciación

cDNA: DNA complementario

CO1: subunidad 1 de la citocromo c oxidasa

CO3: subunidad 3 de la citocromo c oxidasa

CoA: coenzima A

D4T: 3'-desoxi-2',3'-didehidrotimidina

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol

DCF: diclorofluoresceína

DCFH-DA: diacetato de dicloro-dihidro-fluoresceína

DCPIP: diclorofenol-indofenol

DMEM: medio Eagle modificado por Dubelcco

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

DTNB: 5,5'-ditio-bis-(ácido 2-nitrobenzoico)

DTT: ditioneitol

ECM: matriz extracelular

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EPSC: células madre progenitoras endoteliales

ESC: células madre embrionarias

ETC: cadena de transporte de electrones

FABP4: proteína de unión a ácidos grasos 4

FAM: 6-carboxyfluoresceína

FCCP: carbonil cianida-4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona

FDA: administración de alimentos y medicamentos

FGA: cadena alfa del fibrinógeno

HAART: terapia antirretroviral de gran actividad

hASC: células madre derivadas de tejido adiposo humanas

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

HRP: peroxidasa de rábano

IBM: membrana interna de unión

IP: inhibidor de proteasas

iPSC: células madre pluripotentes inducidas

LC-MS/MS: cromatografía líquida – espectrometría de masas en tándem

mASC: células madre murinas derivadas de tejido adiposo

MHC: cadena pesada de miosina

MHC-I: complejo mayor de histocompatibilidad I

MIMP: potencial de membrana interna mitocondrial

MIMS: superficie de membrana interna mitocondrial

MMTS: metil metanotiosulfonato

mRNA: RNA mensajero

MRP: proteína ribosomal mitocondrial

MRPS12: proteína ribosomal mitocondrial S12

MSC: células madre mesenquimales

mtDNA: DNA mitocondrial

MTP: productos de traducción mitocondrial

NAC: N-acetilcisteína

NAD-IDH: isocitrato deshidrogenasa dependiente de NAD

NAO: naranja nonil de acridina

ND2: cadena 2 de la NADH-ubiquinona oxidoreductasa

ND3: cadena 3 de la NADH-ubiquinona oxidoreductasa

ND5: cadena 5 de la NADH-ubiquinona oxidoreductasa

ND6: cadena 6 de la NADH-ubiquinona oxidoreductasa

nDNA: DNA nuclear

NEFA: ácidos grasos no esterificados

NRF: factor respiratorio nuclear

NRTI: análogo de nucleósido inhibidor de la transcriptasa reversa

OD: densidad óptica

OXPPOS: sistema de fosforilación oxidativa

PAI-1: inhibidor 1 del activador de plasminógeno

PBS: tampón fosfato salino

PBS-T: PBS-Tween

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PFKL: fosfofructoquinasa L

PGC-1 α : coactivador 1 α del PPAR γ

POLG: DNA polimerasa γ

POP: contaminante orgánico persistente

PPAR γ : receptor γ activado por el factor proliferador de peroxisomas

qRT-PCR: PCR cuantitativa a tiempo real

RFU: unidades relativas de fluorescencia

RNA: ácido ribonucleico

RNR1: RNA, cluster ribosomal 1

rpm: revoluciones por minuto

RXR α : receptor X retinoide α

SDH: succinato deshidrogenasa

SDS: dodecilsulfato sódico

SFB: suero fetal bovino

SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida

SOD2: superóxido dismutasa 2

STR: repetición corta en tandem

Taq: *Thermophilus aquaticus*

Tbx15: *T-box* 15

TCEP: tris(2-carboxietil)fosfina

TEAB: tampón bicarbonato de trietilamonio

TFA: ácido trifluoroacético

TFAM: factor de transcripción mitocondrial A

TFBM: factor de transcripción mitocondrial B

TGF β : factor de crecimiento transformante β

TH01: tirosina hidroxilasa (intrón 01)

Thy-1: antígeno de timocitos 1

TK2: timidina quinasa 2

TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

TMED: tetrametiletildiamina

TPOX: peroxidasa tiroidea

TRIS: 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol

TZD: tiazolidinedionas

UCP-1: proteína desacoplante-1

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

vWA: factor von Willebrand tipo A

WAT: tejido adiposo blanco

ÍNDICE

ÍNDICE

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
I. 1. La mitocondria y el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS)	3
I.1.1. La mitocondria.....	3
I.1.2. El sistema OXPHOS.....	4
I.1.3. El mtDNA	6
I.1.4. Replicación, transcripción y traducción del mtDNA.....	8
I.2. El tejido adiposo y los adipocitos	9
I.2.1. El tejido adiposo	9
I.2.2. Los adipocitos.....	11
I.2.3. Las adipoquinas	12
I.2.4. La diferenciación adipogénica.....	13
I.2.5. Modelos celulares para el estudio de la adipogénesis.....	15
I.2.5.1. 3T3-L1.....	16
I.2.5.2. hASC	16
I.2.5.3. Otros.....	18
I.3. Mitocondria y adipocitos.....	19
I.3.1. Papel de la mitocondria en la biología del adipocito	19
I.3.2. Papel de la mitocondria en la diferenciación adipogénica	20
I.4. El tejido adiposo en la patología mitocondrial.....	22
I.4.1. Alteraciones en el metabolismo lipídico causadas por mutaciones en genes nucleares relacionados con el sistema OXPHOS.....	23
I.4.2. Alteraciones en el tejido adiposo causadas por mutaciones en el mtDNA	23
I.4.3. mtDNA y lipodistrofias	24
I.4.3.1. NRTIs.....	25
I.5. Xenobióticos OXPHOS	27
I.5.1. Antibióticos	28
I.5.1.1. Antibióticos utilizados en el cultivo celular	28
I.5.1.2. Aminoglicósidos	29
I.5.1.3. Cloranfenicol	30
I.5.1.4. Linezolid	30
I.5.2. Inhibidores OXPHOS.....	31

I.5.2.1. Rotenona	32
I.5.2.2. Antimicina A	32
I.5.2.3. Oligomicina.....	33
I.5.3. Tóxicos medioambientales.....	33
I.5.3.1. Patología OXPHOS y tóxicos medioambientales	33
I.5.3.2. El tejido adiposo como almacén de tóxicos medioambientales	34
I.5.3.3. Obesógenos.....	34
I.5.3.3.1. TBTC.....	35
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	41
II.1. Hipótesis.....	41
II.2. Objetivos	41
III. RESULTADOS	45
III.1. Caracterización de las hASC	45
III.1.1. Caracterización genética	45
III.1.1.1. Huella genética.....	45
III.1.1.2. Cariotipado.....	46
III.1.1.3. Secuenciación completa del mtDNA	46
III.1.2. Comprobación de las características que definen a las hASC.....	47
III.1.2.1. Adherencia al plástico	48
III.1.2.2. Expresión de marcadores.....	48
III.1.2.3. Diferenciación <i>in vitro</i>	49
III.1.3. Estudio del estado metabólico.....	50
III.1.4. Cultivo de las hASC en hipoxia	52
III.2. Diferenciación de las hASC a adipocitos	55
III.2.1. Cambios morfológicos.....	55
III.2.2. Cambios en la expresión de marcadores	56
III.3. Papel del sistema OXPHOS en la diferenciación de las hASC a adipocitos	59
III.3.1. Morfología y localización mitocondrial	59
III.3.2. Parámetros bioquímicos mitocondriales	62
III.3.2.1. Potencial de membrana interna mitocondrial	62
III.3.2.2. Consumo de oxígeno.....	62
III.3.2.3. Actividades enzimáticas	63
III.3.2.4. Síntesis mitocondrial de proteínas.....	64
III.3.2.5. Niveles de mtRNA y mtDNA	65

III.3.2.6. Especies reactivas de oxígeno	66
III.4. Efecto de xenobióticos en la diferenciación de las hASC a adipocitos	67
III.4.1. Antibióticos comúnmente utilizados en el cultivo celular	67
III.4.1.1. Marcadores de diferenciación	68
III.4.1.2. Enzimas mitocondriales	70
III.4.1.3. Especies reactivas de oxígeno	71
III.4.2. Otros antibióticos	72
III.4.2.1. Marcadores de diferenciación	73
III.4.2.2. Enzimas mitocondriales	74
III.4.2.3. Especies reactivas de oxígeno	75
III.4.3. Análogos de nucleósidos inhibidores de la transcriptasa inversa.....	76
III.4.3.1. Marcadores de diferenciación	76
III.4.3.2. Especies reactivas de oxígeno	77
III.4.3.3. Parámetros mitocondriales.....	78
III.4.3.4. Efecto del tratamiento con ddC previo a la diferenciación.....	78
III.4.4. Antibióticos ribosomales inhibidores del centro peptidil transferasa.....	79
III.4.4.1. Marcadores de diferenciación	80
III.4.4.2. Especies reactivas de oxígeno	80
III.4.4.3. Parámetros mitocondriales.....	81
III.4.4.4. Efecto del tratamiento con linezolid previo a la diferenciación	85
III.4.4.5. Efecto del tratamiento con linezolid en hASC procedentes de distintos donantes.....	87
III.4.5. Tóxicos ambientales: cloruro de tributiltina	89
III.4.5.1. Cambios morfológicos y marcadores de diferenciación	90
III.4.5.2. Diana del TBTC y parámetros mitocondriales.....	91
III.5. Estudio del secretoma de las hASC	93
III.5.1. Cambios en el patrón de secreción entre las hASC sin diferenciar y diferenciadas a adipocitos	93
III.5.2. Efecto del linezolid sobre el secretoma de las hASC diferenciadas a adipocitos.....	96
III.5.2.1. Validación de los resultados por Western blot	98
III.5.2.2. Verificación de ApoE por huella peptídica	100
III.6. Cambios en la secreción de ApoE por alteración del sistema OXPHOS	101
III.6.1. Haplotipado del gen <i>APOE</i>	101
III.6.2. Efecto de distintos xenobióticos sobre la producción de ApoE.....	101
III.6.3. Efecto del linezolid sobre la producción de ApoE	102

III.6.3.1. Inmunodetección de la proteína.....	102
III.6.3.2. Expresión del mRNA.....	104
III.6.3.3. Estado de metilación del genoma.....	104
IV. DISCUSIÓN.....	109
IV.1. Las hASC como modelo celular para el estudio de la adipogénesis	109
IV.2. La diferenciación adipogénica incrementa la biogénesis del sistema OXPHOS.....	110
IV.3. Xenobióticos que afectan al sistema OXPHOS alteran la diferenciación de hASC a adipocitos.....	112
IV.3.1. Inhibidores de la actividad de los complejos OXPHOS afectan a la diferenciación adipogénica	112
IV.3.2. Inhibidores de la traducción mitocondrial afectan a la diferenciación adipogénica	113
IV.3.3. Inhibidores de la replicación del mtDNA afectan a la diferenciación adipogénica.....	116
IV.3.4. Los antibióticos que se utilizan en el cultivo celular afectan a la diferenciación adipogénica	117
IV.4. Una alteración del sistema OXPHOS por acción del linezolid provoca cambios en la expresión de ApoE.....	119
IV.5. Perspectivas futuras.....	121
V. CONCLUSIONES	125
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	129
VI.1. Material y reactivos	129
VI.1.1. Material biológico y líneas celulares.....	129
VI.1.2. Aparatos e instrumentos	130
VI.1.3. Reactivos	132
VI.1.3.1. Reactivos generales	132
VI.1.3.2. Medios de cultivo.....	132
VI.1.3.3. Reactivos para PCR.....	133
VI.1.3.4. Sondas fluorescentes	133
VI.1.3.5. Kits comerciales	133
VI.1.3.6. Geles, membranas y autorradiografías.....	134
VI.1.3.7. Anticuerpos.....	134
VI.2. Métodos.....	135
VI.2.1. Cultivos celulares	135
VI.2.1.1. Componentes y medios	135
VI.2.1.2. Siembra y cultivo celular.....	135

VI.2.1.3. Congelación y descongelación de células	136
VI.2.1.4. Obtención de hASC a partir de tejido adiposo.....	137
VI.2.1.5. Incubación con xenobióticos.....	137
VI.2.1.6. Recuento celular	137
VI.2.1.7. Análisis y tratamiento de contaminación por <i>Mycoplasma sp.</i>	138
VI.2.1.8. Cultivo en cámara de hipoxia.....	138
VI.2.1.9. Diferenciación	139
VI.2.1.9.1. Adipogénica	139
VI.2.1.9.2. Osteogénica	139
VI.2.1.9.3. Condrogénica	139
VI.2.1.10. Cariotipado de líneas celulares	139
VI.2.1.11. Estudios de proliferación celular: curvas de crecimiento	140
VI.2.1.12. Estudio del consumo de glucosa.....	140
VI.2.1.13. Tinciones específicas.....	141
VI.2.1.13.1. Oil Red O	141
VI.2.1.13.2. Alizarin Red	141
VI.2.1.13.3. Toluidine Blue	141
VI.2.1.14. Cuantificación de gotas lipídicas intracelulares.....	141
VI.2.1.15. Medida de la cantidad de triglicéridos totales	141
VI.2.1.16. Toma de imágenes mediante FLoId: inmunofluorescencia	142
VI.2.1.16.1. Tinción con MitoTracker® Red	142
VI.2.1.16.2. Inmunofluorescencia	143
VI.2.1.17. Microscopía electrónica.....	143
VI.2.2. Extracción, manipulación y análisis de ácidos nucleicos	144
VI.2.2.1. Aislamiento de DNA total a partir de cultivos celulares	144
VI.2.2.1.1. Con fenol-cloroformo.....	144
VI.2.2.1.2. En columna.....	144
VI.2.2.2. Aislamiento de RNA total a partir de cultivos celulares	144
VI.2.2.3. Cuantificación de ácidos nucleicos	145
VI.2.2.4. Huella genética.....	145
VI.2.2.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	146
VI.2.2.6. Separación electroforética de ácidos nucleicos: geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio	147
VI.2.2.7. Secuenciación completa del mtDNA.....	147

VI.2.2.8. Detección de polimorfismos en el mtDNA mediante PCR cuantitativa a tiempo real.....	149
VI.2.2.9. Cuantificación del número de copias de mtDNA mediante PCR cuantitativa a tiempo real	150
VI.2.2.10. Determinación del genotipo mitocondrial.....	151
VI.2.2.11. Haplotipado del gen <i>APOE</i>	152
VI.2.2.12. Retrotranscripción de RNA total	153
VI.2.2.13. Medida de expresión de transcritos mediante PCR cuantitativa a tiempo real	153
VI.2.2.14. Determinación del estado de metilación global	154
VI.2.3. Estudio funcional del sistema de fosforilación oxidativa.....	155
VI.2.3.1. Determinación de especies reactivas de oxígeno por citometría de flujo	155
VI.2.3.2. Medida de la superficie de membrana interna mitocondrial por citometría de flujo	155
VI.2.3.3. Determinación del potencial de membrana mitocondrial	156
VI.2.3.3.1. Por citometría de flujo	156
VI.2.3.3.2. Mediante microscopía de fluorescencia	156
VI.2.3.4. Determinaciones enzimáticas	156
VI.2.3.4.1. Determinación de la cantidad de proteínas totales por el método de Bradford	156
VI.2.3.4.2. Determinación de la actividad enzimática y cantidad del complejo respiratorio IV	157
VI.2.3.4.2.1. Preparación de las muestras.....	157
VI.2.3.4.2.2. Determinación de la actividad y cantidad de CIV	158
VI.2.3.4.3. Determinación de la actividad enzimática de la citrato sintasa	158
VI.2.3.4.4. Determinación de la actividad enzimática del complejo respiratorio II (succinato ubiquinona oxidorreductasa)	159
VI.2.3.4.5. Determinación de la actividad enzimática de la isocitrato deshidrogenasa	159
VI.2.3.5. Determinación de niveles de ATP	160
VI.2.3.6. Electrodo de oxígeno de alta resolución (Oroboros) en células intactas	161
VI.2.4. Manipulación y análisis de proteínas.....	162
VI.2.4.1. Ensayos ELISA.....	162
VI.2.4.1.1. Leptina	162
VI.2.4.1.2. Adiponectina	163
VI.2.4.1.3. FABP4	163

VI.2.4.2. Estudios del secretoma celular	163
VI.2.4.2.1. Preparación de las muestras.....	163
VI.2.4.2.2. Cuantificación de las muestras	164
VI.2.4.2.3. Experimento iTRAQ.....	164
VI.2.4.2.4. Análisis por espectrometría de masas (LC-MS/MS).....	165
VI.2.4.2.5. Identificación y cuantificación relativa de proteínas	166
VI.2.4.3. Huella peptídica	166
VI.2.4.3.1. Preparación de las muestras.....	166
VI.2.4.3.2. Análisis mediante MALDI-TOF/TOF.....	167
VI.2.4.3.3. Búsqueda en bases de datos.....	167
VI.2.4.4. Preparación de extractos celulares totales para Western blot en geles desnaturalizantes	168
VI.2.4.5. Preparación de extractos mitocondriales	168
VI.2.4.6. Síntesis <i>in vivo</i> de proteínas mitocondriales marcadas con ³⁵ S-Metionina	168
VI.2.4.7. Electroforesis de proteínas	169
VI.2.4.7.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	169
VI.2.4.7.2. Electroforesis en geles desnaturalizantes en gradiente de poliacrilamida	170
VI.2.4.7.2.1. Tinción de geles con azul de Coomassie	171
VI.2.4.7.2.2. Secado de geles.....	172
VI.2.4.7.2.3. Detección	172
VI.2.4.7.3. Electroforesis en geles TRIS-Tricina en gradiente de poliacrilamida	172
VI.2.4.7.4. Electroforesis en geles nativos: Blue Native-2D	173
VI.2.4.8. Transferencia a membranas PVDF.....	173
VI.2.4.9. Inmunodetección de proteínas mediante Western blot	174
VI.2.4.9.1. Incubación de los anticuerpos primario y secundario	174
VI.2.4.9.2. Detección de proteínas	174
VI.2.4.9.3. Reutilización de membranas.....	174
VI.2.5. Tratamientos estadísticos	175
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	179
VIII. ANEXOS	203
IX. PUBLICACIONES.....	207

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I. 1. La mitocondria y el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS)

I.1.1. La mitocondria

La mitocondria es un orgánulo celular productor de energía, presente en prácticamente todos los organismos eucariotas, si bien sus dimensiones, número y distribución son variables en función del tipo celular.

Su estructura fue visualizada por primera vez en 1952 mediante estudios de microscopía electrónica de alta resolución (Palade 1952). Dicha estructura se divide en cuatro compartimentos principales: membrana externa, espacio intermembrana, membrana interna y matriz (figura I.1). Esta doble membrana es reflejo del origen endosimbionte del orgánulo (Sagan 1967), ampliamente aceptado, a partir de una α -proteobacteria. La membrana externa permite el paso de metabolitos y proteínas, y participa en la interacción entre la mitocondria y otros orgánulos celulares. La membrana interna puede subdividirse en dos partes: la membrana interna de unión (IBM), que contiene translocasas para el importe de proteínas, y las crestas, que actualmente se consideran estructuras especializadas en forma de bolsa separadas del espacio intermembrana por uniones tubulares estrechas (Mannella, Marko et al. 1994). A su vez estas uniones separan el espacio intermembrana del espacio intracresta (Zick, Rabl et al. 2009).

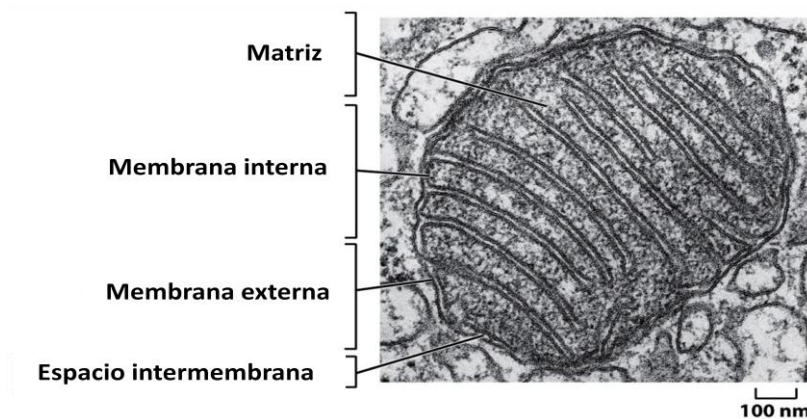


Figura I.1: Imagen de microscopía electrónica de una mitocondria. Se señalan sus cuatro compartimentos principales. Obtenido de (Alberts, Johnson et al. 2007).

Además, las mitocondrias son orgánulos muy dinámicos, que forman en la célula una red tubular en constante cambio, gracias a los procesos de división y fusión (Lackner 2014).

Asimismo, pueden reorganizar su estructura interna modificando la forma y conformación de sus crestas (Cogliati, Enriquez et al. 2016).

Además de las correspondientes a la obtención de energía, en la mitocondria tienen lugar un gran número de rutas metabólicas implicadas en una diversidad de procesos, incluyendo la biosíntesis de otros metabolitos (aminoácidos, nucleótidos, ácido fólico, urea y grupo hemo, entre otros). Estas rutas se representan de forma esquemática en la figura I.2.

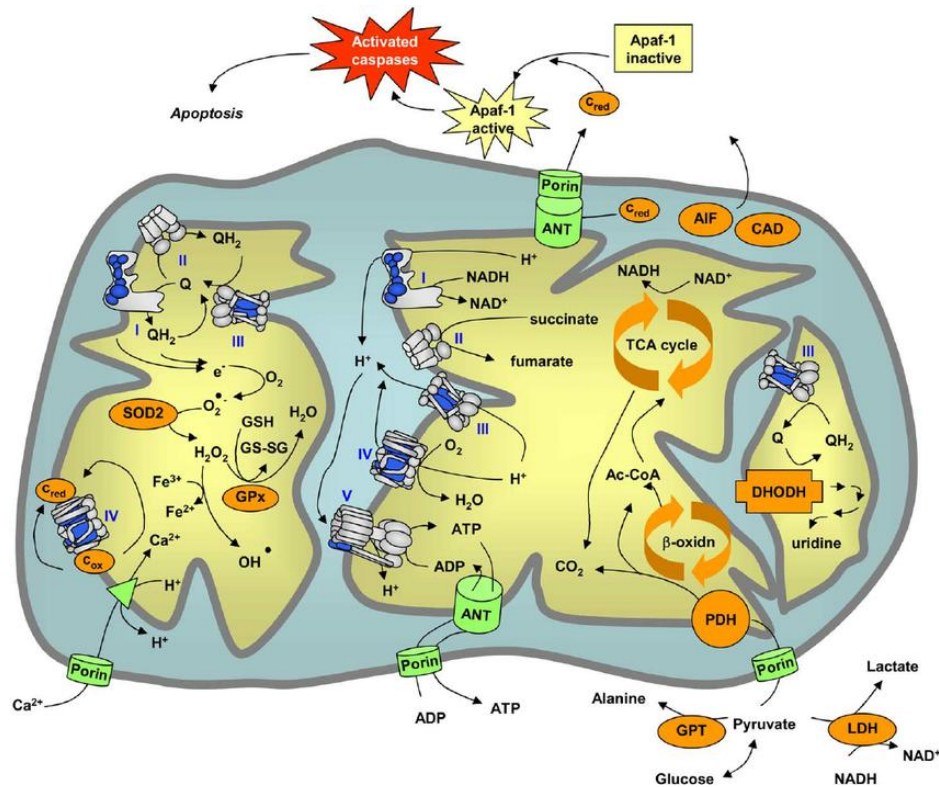


Figura I.2: Rutas metabólicas que tienen lugar en la mitocondria. Abreviaturas: ubiquinona (Q), ubiquinol (QH₂), citocromo c reducido y oxidado (C_{red} y C_{ox}), superóxido dismutasa 2 (SOD2), glutatión peroxidasa (GPx), translocasa de nucleótidos de adenina (ANT), ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), β-oxidación de los ácidos grasos (β-oxidn), complejo piruvato deshidrogenasa (PDH), acetil-coenzima A (Ac-CoA), dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH), transaminasa glutámico-pirúvica (GPT), lactato deshidrogenasa (LDH), factor de inducción de apoptosis (AIF), DNAsa activada por caspasas (CAD). Obtenido de (Smeitink, Zeviani et al. 2006).

I.1.2. El sistema OXPHOS

El sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) constituye una pieza clave en el metabolismo celular. Se localiza en la membrana interna mitocondrial, concretamente en las crestas, y está compuesto por la cadena de transporte de electrones (ETC), que incluye los complejos respiratorios (I, II, III y IV) y dos transportadores móviles de electrones (citocromo c y coenzima Q), y la ATP sintasa (complejo V) (Wallace, Fan et al. 2010) (figura I.3). De acuerdo al modelo actual (modelo de plasticidad), los complejos OXPHOS están presentes tanto en

forma de complejos individuales como de supercomplejos de diferente composición y estequiometría (Acin-Perez, Fernandez-Silva et al. 2008).

Para explicar la función de este sistema, podemos remontarnos a una de las funciones vitales de los seres vivos: la nutrición. Los nutrientes que ingerimos se procesan en el sistema digestivo y, a través de la sangre, son liberados en los tejidos que los requieren. Allí, penetran en las células donde se continúa con su digestión. Este proceso se denomina oxidación y requiere la extracción de los electrones de dichos nutrientes para pasarlos a la ETC. Por otro lado, el oxígeno que inhalamos a través de los pulmones difunde hacia la sangre y, consecutivamente, a tejidos y células, donde entra en la ETC para captar los electrones liberados por los nutrientes. Por tanto, comemos y respiramos principalmente para obtener dadores y aceptores de electrones para la ETC (Martínez-Romero, Emperador et al. 2011). Esto es importante porque la energía liberada durante el transporte de electrones se utiliza para el bombeo de protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana. Dicho bombeo genera un gradiente electroquímico que es aprovechado por la ATP sintasa para sintetizar ATP, molécula que almacena la energía necesaria para la vida (Elston, Wang et al. 1998). En un adulto sano, la cantidad de ATP generada es de unos 50 kg al día, que se utiliza para generar fuerzas motrices, en la biosíntesis de macromoléculas, en el plegamiento y degradación de proteínas y en la generación y mantenimiento de potenciales de membrana (Kuhlbrandt 2015).

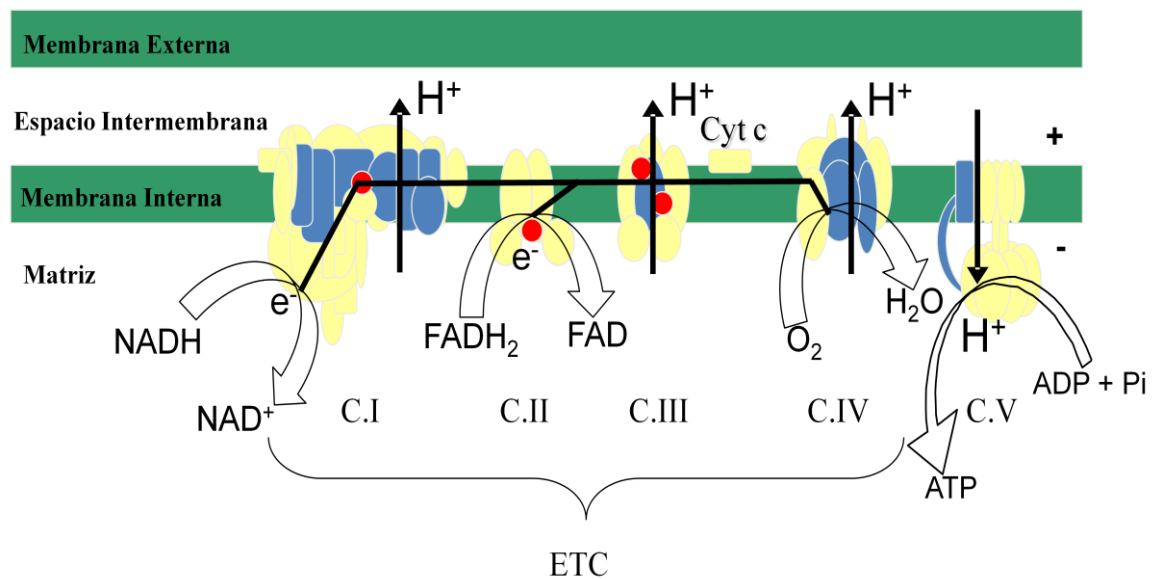


Figura I.3: Esquema del sistema de fosforilación oxidativa. Los electrones (e⁻) de los nutrientes van, a través de los complejos respiratorios (CI-CIV), hasta el oxígeno, que se reduce a agua. Este flujo de electrones va acompañado de un bombeo de protones (H⁺) al espacio intermembrana, que causa un gradiente electroquímico (+/-). La ATP sintasa (CV) utiliza este gradiente para producir ATP. Las subunidades OXPHOS codificadas en el DNA mitocondrial y nuclear se representan en azul y amarillo, respectivamente. Los círculos rojos representan el coenzima Q. Obtenido de (Martínez-Romero, Emperador et al. 2011).

Sin embargo, el sistema OXPHOS es mucho más que un generador de energía celular. De hecho, el gradiente de protones producido por el flujo de electrones se utiliza en una gran diversidad de procesos (Wallace, Fan et al. 2010) que se enumeran a continuación:

- Importe de sustratos (como por ejemplo el ADP necesario para la síntesis de ATP) y proteínas a la mitocondria.
- Regulación de la apoptosis, ya que la disipación de este gradiente es uno de las primeras señales para inducir la muerte celular.
- Generación de calor, por desacoplamiento entre el flujo de protones a través de la ATP sintasa y el transporte de electrones.
- Mantenimiento de los niveles de calcio citosólico mediante su importe a la mitocondria, donde es necesario para la actividad de varias enzimas mitocondriales.
- Producción de especies reactivas de oxígeno, ya que un ligero aumento de la fuerza protón motriz a través de la membrana interna incrementa la producción de ROS.

Tanto estas ROS, como el ATP, el calcio y el estado redox de la célula en general, se pueden comportar como segundos mensajeros y provocar distintas respuestas celulares, conectando de esta forma la función mitocondrial con la del resto del citoplasma (Finley and Haigis 2009). Del mismo modo pueden afectar a la expresión de genes cromosómicos (Butow and Avadhani 2004), de manera que también quedan relacionados el sistema OXPHOS y el núcleo.

Por otra parte, el sistema OXPHOS también participa en otros procesos como:

- Síntesis de pirimidinas *de novo*, requeridas no solo para la replicación y expresión del DNA, sino también para la síntesis de componentes de la membrana plasmática (Wurtman, Cansev et al. 2009).
- Dinámica tisular y diferenciación celular.
- Regulación del sistema inmunitario, ya que una mayor actividad respiratoria incrementa la expresión del MHC-I, molécula que media el auto-reconocimiento y la presentación de antígenos (Charni, de Bettignies et al. 2010).

I.1.3. El mtDNA

Como particularidad más destacable, y dado su origen endosimbionte, la mitocondria posee un genoma propio localizado en la matriz mitocondrial, el DNA mitocondrial (mtDNA). El mtDNA es una molécula circular, cerrada y superenrollada, de aproximadamente 16,5 kilobases que codifica para 37 genes (figura I.4): 22 tRNAs y 2 rRNAs (grande y pequeño) que participan en la síntesis de las proteínas codificadas en el propio genoma, y 13 polipéptidos que forman parte de cuatro de los cinco complejos multienzimáticos del sistema OXPHOS. De entre ellos, siete son componentes del complejo I (p.MT-ND1-6 y p.MT-ND4L), uno del complejo III (p.MT-CYB), tres del complejo IV (p.MT-CO1-3) y dos del complejo V o ATP sintasa (p.MT-ATP6 y 8), mientras que el resto de subunidades están codificadas en el DNA nuclear (nDNA). Además, el mtDNA contiene también una región no codificante, que incluye secuencias importantes para la regulación de su replicación y transcripción (Anderson, Bankier

et al. 1981). Por lo tanto, para la biogénesis del sistema OXPHOS se requiere la expresión coordinada de los dos sistemas genéticos de la célula, el nuclear y el mitocondrial.

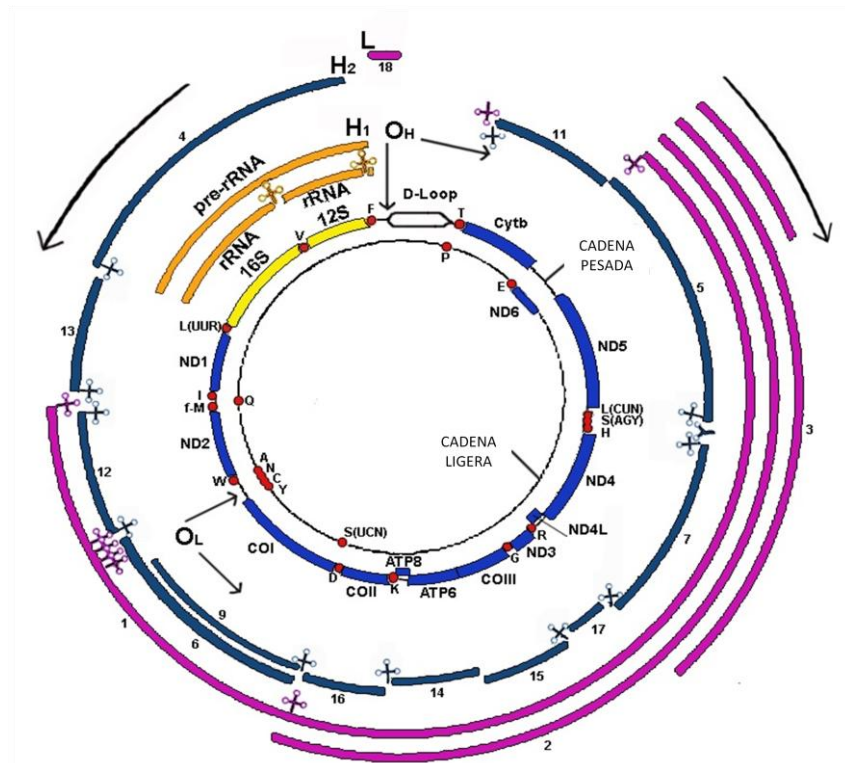


Figura I.4: Mapa genético y de transcripción del mtDNA humano. Los círculos interiores representan las dos cadenas de mtDNA (pesada y ligera), en las que se indican los genes que codifican. Los RNA que se transcriben se representan en los círculos exteriores con barras negras (transcritos de la cadena pesada) y moradas (transcritos de la cadena ligera). H₁, H₂ y L indican los lugares de iniciación de la transcripción de la cadena pesada y ligera, respectivamente. O_H y O_L simbolizan los orígenes de la replicación de la cadena pesada y ligera, respectivamente. Obtenido de (Montoya, Lopez-Perez et al. 2006).

El mtDNA presenta una serie de características propias que le diferencian del nDNA. Por un lado, presenta un gran número de copias por célula (lo que se denomina poliplasmia), entre 1.000 y 10.000 dependiendo del tejido y con 1-10 moléculas de DNA por mitocondria. Por otro lado, el mtDNA se hereda exclusivamente por vía materna, dada la destrucción selectiva del genoma mitocondrial procedente del espermatozoide (Sutovsky, Moreno et al. 1999). Además, su organización es extremadamente compacta (no presenta intrones) y utiliza un código genético diferente al universal (Clayton 2000). Por último, por su localización y particularidades genéticas, el mtDNA acumula mutaciones mucho más rápidamente que el nDNA (su tasa de mutación espontánea es 10-20 veces superior). Esto puede ser consecuencia de la alta y constante producción de ROS en la mitocondria, que dañan moléculas de DNA con información genética muy compacta, no protegidas por histonas y con mecanismos de reparación que resultan insuficientes (Michikawa, Mazzucchelli et al. 1999). Sin embargo,

investigaciones más recientes atribuyen esta alta tasa de mutación principalmente a errores en la replicación, por encima de la hipótesis clásica de las ROS (Kauppila and Stewart 2015).

Cuando estas mutaciones tienen lugar en la línea germinal y sobreviven en las poblaciones se originan nuevos fondos genéticos del mtDNA. Los grupos de genotipos del mtDNA filogenéticamente relacionados se conocen como haplogrupos mitocondriales, y las mutaciones que los definen pueden tener un efecto moderado en los individuos, modificando las características de sus sistemas OXPHOS. En otros casos, estas mutaciones pueden dar lugar a un cambio de aminoácido o del marco de lectura de la proteína, por lo que pueden considerarse patológicas siempre que cumplan unos criterios de patogenicidad establecidos (Montoya, Lopez-Gallardo et al. 2009). Por lo tanto, esta variación genética del mtDNA, que afecta a un gran número de procesos celulares antes mencionados, puede alterar la homeostasis celular, la dinámica tisular y el estado de salud de los individuos (Martínez-Romero, Emperador et al. 2011).

I.1.4. Replicación, transcripción y traducción del mtDNA

A pesar de que hace unos años surgió un nuevo modelo para explicar la replicación del mtDNA, el más aceptado es el modelo clásico, que data de los años setenta y está basado en experimentos de microscopía electrónica (Robberson, Kasamatsu et al. 1972, Kasamatsu and Vinograd 1974). De acuerdo con este modelo, la replicación es unidireccional y asimétrica, y se produce de forma continua en las dos hebras del mtDNA, a partir de dos orígenes de replicación distintos (Clayton 1982) (ver figura I.4). En este proceso, uno de los papeles principales recae en la DNA polimerasa- γ , que actúa en la extensión de la nueva hebra de DNA, así como en la reparación y recombinación del mtDNA. La polimerasa- γ es la única DNA polimerasa presente en la mitocondria y está formada por dos subunidades, una catalítica (α , POLG) y otra accesoria (β) (Fridlender, Fry et al. 1972). La replicación del mtDNA es esencial para la vida, como demuestra el hecho de que ratones *knock out* para POLG presenten letalidad embrionaria (Hance, Ekstrand et al. 2005). Por otro lado, se han descrito más de 200 mutaciones en POLG asociadas a distintas enfermedades mitocondriales (Stumpf, Saneto et al. 2013).

La transcripción del mtDNA se inicia a partir de tres promotores, generándose moléculas largas que serán procesadas por cortes endonucleolíticos antes y después de los tRNAs (Ojala, Montoya et al. 1981). La enzima responsable de este proceso es la RNA polimerasa mitocondrial, mientras que las proteínas TFAM y TFB2M son las principales implicadas en el control de estos procesos mediante su interacción con la región reguladora del lazo D (*D-loop*) (Scarpulla 1997).

Los mRNAs obtenidos tras la transcripción del mtDNA se traducen a proteínas en los ribosomas mitocondriales. En humanos, éstos están formados por una subunidad pequeña (28S) y una grande (39S), ambas constituidas por RNA y proteínas (O'Brien 1971). Los mitorribosomas se asemejan a los ribosomas bacterianos en sus funciones y masa, si bien difieren en su estructura y propiedades físico-químicas (O'Brien 2003). Como ribozimas, las funciones más importantes de los ribosomas mitocondriales están catalizadas por rRNAs, presentes en el sitio decodificante, en el centro peptidil transferasa (PTC) y en el túnel de

salida de proteínas (Pacheu-Grau, Gomez-Duran et al. 2010). Por otro lado, se conoce la secuencia de unas 78 proteínas ribosomales (MRPs), que se han adaptado para sustituir las estructuras de RNA perdidas en los mitorribosomas de mamíferos (O'Brien 2003).

I.2. El tejido adiposo y los adipocitos

I.2.1. El tejido adiposo

El tejido adiposo, conocido popularmente como “grasa”, es un tipo de tejido conectivo formado por células que almacenan lípidos, los adipocitos, rodeadas por una matriz de fibras de colágeno, vasos sanguíneos, fibroblastos, células madre preadipocíticas y células del sistema inmune (figura I.5). En adultos sanos, el tejido adiposo representa aproximadamente el 10 % de la masa corporal total, pudiendo llegar a alcanzar el 50 % en individuos obesos (Wang, Mariman et al. 2008).

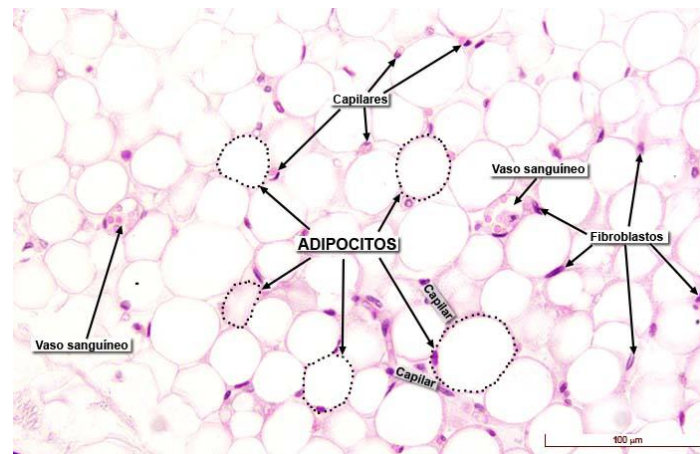


Figura I.5: Imagen de un corte histológico de tejido adiposo humano. Aparecen etiquetados sus componentes principales. Extraído de (<http://wzar.unizar.es>).

El tejido adiposo constituye la principal reserva energética en humanos sanos. De hecho, los adipocitos actúan como integradores y reguladores de la ingesta de alimentos y del consumo de energía, por mecanismos tanto endocrinos como no endocrinos (Rosen and Spiegelman 2006). Así, cuando los niveles de glucosa caen en periodos de ayuno, se liberan ácidos grasos como combustible para una gran variedad de tejidos. Este cambio en el metabolismo está mediado por una caída en la concentración de insulina, así como por un aumento de otras hormonas reguladoras como la epinefrina, la hormona de crecimiento o los glucocorticoides (Ahima and Flier 2000). Además de esto, los adipocitos están implicados en procesos fisiológicos tan dispares como la respuesta inmune, el control de la tensión arterial, la homeostasis, la composición de la masa ósea, el funcionamiento de la glándula tiroidea o la función reproductiva (Trayhurn 2005).

Desde un punto de vista clásico, existen dos tipos de tejido adiposo: el formado por grasa blanca y el formado por grasa parda o marrón, denominación que se adoptó por el color que presenta esta grasa en su estado fresco (figura I.6). El tejido adiposo blanco empieza su desarrollo en el primer trimestre de la gestación, expandiéndose de forma muy notoria en la etapa postnatal debido a una mayor disponibilidad de nutrientes (Kirtland and Harris 1980). En el humano, se localiza principalmente en las regiones subcutánea abdominal o visceral, retroperitoneal, inguinal y gonadal (Cinti 2012). Por el contrario, el tejido adiposo marrón se expande fundamentalmente *in utero*, posiblemente para mantener la temperatura corporal después del nacimiento (Frontini and Cinti 2010), y se localiza en pequeñas bolsas en regiones paravertebrales, supraclaviculares y periadrenales. No obstante, se ha demostrado que tras una exposición al frío prolongada o bien en respuesta a la señalización por β -adrenérgicos, los adipocitos blancos pueden pasar a presentar características de los marrones, como la expresión de la proteína desacoplante UCP-1 (Cousin, Cinti et al. 1992), cuya función se detallará más adelante.

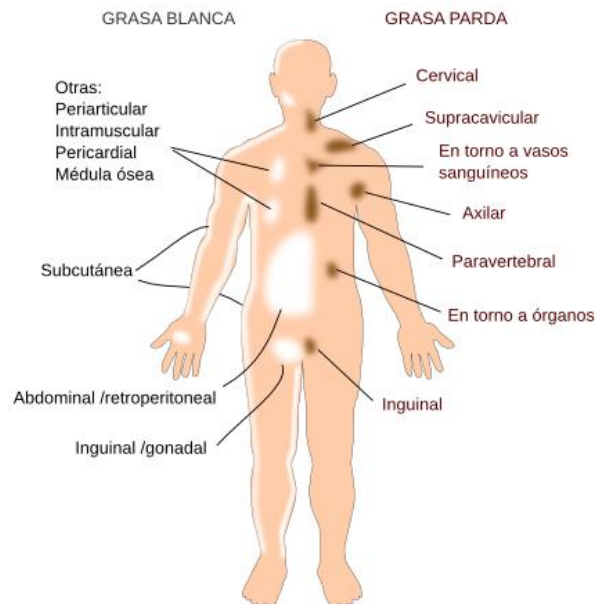


Figura I.6: Distribución del tejido adiposo blanco y pardo en el cuerpo humano. Modificado de (Gesta, Tseng et al. 2007).

Hasta hace relativamente pocos años, la fisiología del tejido adiposo blanco se centraba en la regulación de dos rutas metabólicas opuestas, la lipogénesis y la lipólisis. Sin embargo, en las dos últimas décadas, el papel biológico de este tejido ha pasado a reconocerse como el del principal órgano endocrino y señalizador en un gran número de procesos que controlan el metabolismo (Trayhurn 2005).

I.2.2. Los adipocitos

Aproximadamente el 50 % del tejido adiposo en humanos está formado por adipocitos (Cornelius, MacDougald et al. 1994). Como se ha dicho, dependiendo de sus características celulares y de su función fisiológica podemos distinguir dos tipos de adipocitos, los blancos (que tradicionalmente almacenan lípidos) y los marrones (que oxidan estos lípidos para producir calor, por lo que poseen más mitocondrias) (figura I.7). Ambos derivan de la misma célula madre mesenquimal que, durante el proceso de gastrulación, se diferencia en uno u otro tipo celular (Enerback 2009).

Los adipocitos blancos maduros se caracterizan por una gota lipídica interna grande, que distiende a la célula de manera que su citoplasma se compacta hasta ser una fina capa que rodea a dicha gota, mientras que el núcleo se desplaza hacia uno de los extremos (Ali, Hochfeld et al. 2013). Suelen ser células grandes y redondeadas, con un diámetro que varía desde los 25 hasta los 200 μm (Fruhbeck 2008). Sus funciones principales son el almacenamiento de energía en forma de grasa, la lipólisis y la secreción de adipocinas.

Los adipocitos marrones tienen en cambio una forma poligonal, con un citoplasma normal, múltiples gotas lipídicas pequeñas, núcleo central y redondeado y una gran cantidad de mitocondrias con crestas laminares (Giordano, Smorlesi et al. 2014). Se encuentran solo en mamíferos y su principal diferencia frente a los blancos es que expresan la proteína desacoplante 1 (UCP-1), que disipa el gradiente de protones, producido por la acción de la cadena de transporte de electrones, a través de la membrana interna mitocondrial, generando calor con coste de ATP (Rosen and Spiegelman 2006).

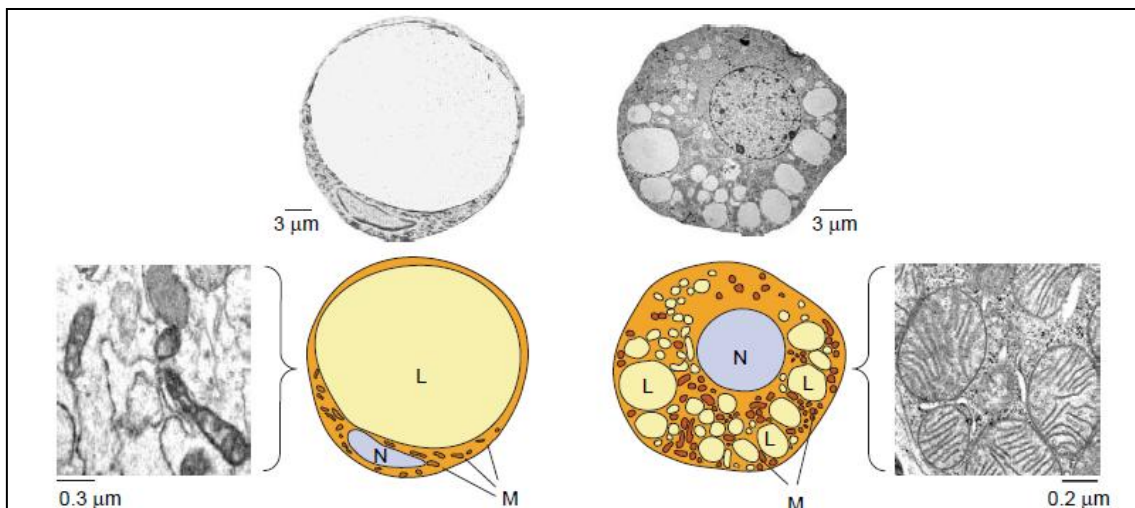


Figura I.7: Imágenes de microscopía y esquemas representativos de un adipocito blanco (izquierda) y un adipocito marrón (derecha). N denota núcleo, M mitocondria y L gota lipídica. Obtenido de (Villarroya, Domingo et al. 2005).

Actualmente se incluye una tercera categoría de adipocitos, los llamados adipocitos beige, que se consideran células inducibles similares a las marrones, ya que poseen propiedades termogénicas (Wu, Bostrom et al. 2012).

I.2.3. Las adipoquinas

Los adipocitos son considerados células secretoras, si bien los preadipocitos y otras células del tejido adiposo también pueden liberar determinados factores como citoquinas, quemoquinas y adipoquinas. La secreción cuantitativamente más importante es la de ácidos grasos, si bien los adipocitos liberan otros tipos de lípidos como los prostanoideos, el colesterol y el retinol. Por otro lado, ciertas hormonas esteroideas son activadas y secretadas por los adipocitos, como es el caso del cortisol. Por último, el principal componente del secretoma del tejido adiposo lo constituye un gran grupo de factores proteicos y de señalización, englobados bajo el nombre de adipoquinas, que está formado por más de 50 moléculas diferentes (Trayhurn 2005). Entre ellas pueden encontrarse ciertos factores del complemento, citoquinas pro-inflamatorias, el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), el inhibidor 1 del activador del plasminógeno (PAI-1), etc. (Ahima and Flier 2000).

La expresión de la mayoría de estos factores está determinada por varios aspectos como el tamaño de los adipocitos o su localización (Bahceci, Gokalp et al. 2007). A su vez, juegan un papel fundamental en la transformación de nuevos preadipocitos en adipocitos maduros (Mohamed-Ali, Pinkney et al. 1998).

La leptina es el ejemplo de adipoquina mejor estudiado, siendo la primera cuyo papel como modulador del tejido adiposo fue descubierto. Es secretada casi exclusivamente por los adipocitos y actúa a través del hipotálamo reprimiendo la ingesta de alimentos y promoviendo el gasto energético. Una deficiencia total de leptina causa hiperfagia, obesidad mórbida, diabetes, varias anomalías endocrinas y disfunción inmunitaria (Friedman 1999). Tanto en modelos animales como en pacientes humanos, mutaciones tanto en la leptina como en su receptor, que se expresa en grandes cantidades en el hipotálamo mediobasal, son causa de obesidad (Fei, Okano et al. 1997). Además, la leptina juega un papel importante en la homeostasis de la glucosa, revirtiendo la hiperglucemia en ratones *ob/ob* o incluso en humanos con lipodistrofia (Schwartz, Baskin et al. 1996, Oral, Simha et al. 2002).

Otro ejemplo es el de la adiponectina, producida exclusivamente por los adipocitos y, al contrario que la mayoría de adipoquinas, cuyos niveles caen en fenotipos de obesidad (Arita, Kihara et al. 1999). Se le ha atribuido un importante papel como moduladora de la respuesta a insulina, si bien también está implicada en la función vascular y se ha descrito su función anti-inflamatoria y anti-aterosclerótica (Berg, Combs et al. 2001). Además, la adiponectina ejerce un efecto autocrino en el tejido adiposo blanco, promoviendo la diferenciación de los adipocitos (Fu, Luo et al. 2005).

Por último, la proteína de unión a ácidos grasos 4 (FABP4, también conocida como proteína adipogénica-2 o aP2) se ha introducido recientemente en el grupo de proteínas circulantes derivadas del tejido adiposo. Aunque es producida también en macrófagos y células endoteliales, el adipocito es el único tipo celular capaz de liberarla al exterior (Kralisch

and Fasshauer 2013). Dado que los niveles de mRNA y de proteína se incrementan muy notablemente durante la adipogénesis, la FABP4 se utiliza frecuentemente como marcador de diferenciación (Christy, Yang et al. 1989). Su función es la de actuar como chaperona de unión a lípidos para ácidos grasos de cadena larga no esterificados (NEFA). Además, su acción incrementa la actividad hidrolítica de la lipasa sensible a hormonas (HSL), así como de otras proteínas que participan en el metabolismo lipídico (Shen, Liang et al. 2001).

1.2.4. La diferenciación adipogénica

El tejido adiposo blanco (WAT) está constituido mayoritariamente por adipocitos maduros. En humanos adultos el número de estas células, fijado durante la infancia y la adolescencia, permanece estable, de manera que constantemente se están diferenciando nuevos adipocitos para reemplazar a los adipocitos muertos o disfuncionales (Spalding, Arner et al. 2008).

Así, todos los adipocitos se diferencian a partir de células madre mesenquimales (MSC) en un proceso conocido como adipogénesis, que se divide en dos fases principales: compromiso y diferenciación terminal (Cristancho and Lazar 2011). El reclutamiento hacia el linaje adipogénico *in vivo* (compromiso) se produce por una ingesta excesiva de energía y de glucosa durante un periodo prolongado en el tiempo, y está caracterizado por altos niveles de actividad metabólica y, por tanto, por un gran consumo de energía (Shepherd, Gnudi et al. 1993). En cambio, los adipocitos ya diferenciados tan solo aumentan su tamaño (hipertrofia) y pierden la mayoría de su actividad funcional, como por ejemplo la síntesis de adiponectina (Koh, Park et al. 2007).

La diferenciación adipogénica *in vitro* sigue una secuencia temporal estrictamente ordenada y bien caracterizada (figura 1.8). Inicialmente se detiene el crecimiento de los preadipocitos por la adición de un régimen hormonal pro-diferenciación, fenómeno que puede favorecerse mediante la inhibición por contacto cuando el cultivo celular alcanza el estado de confluencia. El proceso continúa con una o dos rondas adicionales de división celular conocidas con el nombre de expansión clonal. Este paso se detiene coincidiendo con la expresión de los factores de transcripción clave que actúan de forma conjunta: el receptor γ activado por el proliferador peroxisomal (PPAR γ) y la proteína α de unión al CCAAT/enhancer (C/EBP α). La inducción de estas dos proteínas provoca un segundo y permanente periodo de detención del crecimiento, seguido de la expresión del fenotipo de diferenciación completa (Rosen, Walkey et al. 2000).

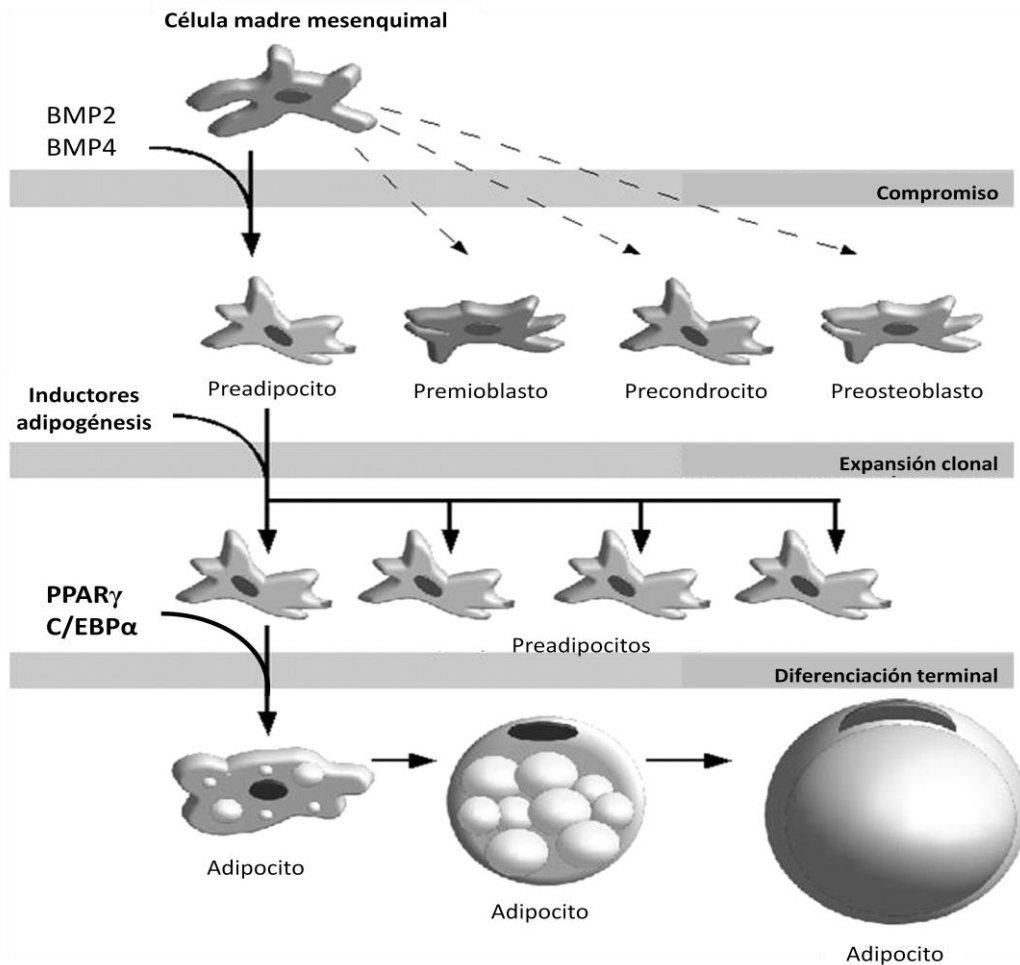


Figura I.8: Representación esquemática de la diferenciación adipogénica. Modificado de (Romao, Jin et al. 2011).

PPAR γ pertenece a la superfamilia de los receptores nucleares de los factores de transcripción activados por ligando. Además, el PPAR γ es la principal diana para los fármacos antidiabéticos, como por ejemplo las tiazolidinedionas (TZD) (Lehrke and Lazar 2005). Su función fisiológica es vital, ya que ratones con una deficiencia en PPAR γ en su línea germinal sufren letalidad embrionaria, mientras que células madre embrionarias sin PPAR γ no pueden contribuir a la formación de grasa, llevando a fenotipos de lipodistrofia, anomalías metabólicas y muerte prematura (Barak, Nelson et al. 1999). Sin embargo, a pesar de la importancia del PPAR γ en el proceso de adipogénesis, se han encontrado pocos genes regulados directamente por este factor. De hecho, PPAR γ suele actuar asociado a otros coactivadores transcripcionales, que conjuntamente inducen la expresión de algunos genes esenciales en los adipocitos como el de la FABP4 (Lefterova and Lazar 2009). Por otro lado, se sabe que la activación de PPAR γ estimula la adipogénesis al mismo tiempo que inhibe la diferenciación celular hacia otros linajes, como por ejemplo el osteogénico (Isenmann, Arthur et al. 2009).

En cambio la C/EBP α se induce más tarde en el proceso de adipogénesis, por lo que es más abundante en los adipocitos maduros. Se cree que su función es vital para la captación de glucosa dependiente de insulina (Wu, Rosen et al. 1999).

Una vez que los preadipocitos se definen hacia el programa de adipogénesis, se activa una cascada transcripcional que induce la expresión tanto de genes implicados en el metabolismo lipídico y glucídico, como de adipoquinas, tales como la FABP4, el transportador de glucosa 4 (GLUT4), la leptina o la adiponectina. Esta etapa se conoce con el nombre de diferenciación terminal (Lefterova and Lazar 2009).

En otro orden de cosas, la transformación de fibroblastos (con forma alargada) en adipocitos (más redondeados) requiere una importante remodelación de las estructuras que los componen, tanto intracelulares como extracelulares. Concretamente, se ha visto que es necesario un cambio de composición de la matriz extracelular (ECM) de estructura fibrilar a laminar, así como una alteración de su rigidez y su tensión (Nakajima, Yamaguchi et al. 1998). Precisamente la rigidez de la ECM juega un papel clave en la elección de linaje de las MSC humanas a la hora de diferenciarse. Por ejemplo, hMSCs cultivadas en geles de poliacrilamida flexibles se diferencian a adipocitos más fácilmente que aquellas cultivadas en matrices más rígidas (Winer, Janmey et al. 2009).

I.2.5. Modelos celulares para el estudio de la adipogénesis

Debido al aumento global de los problemas de salud relacionados con la obesidad, cada vez se está estudiando con mayor profundidad la biología del adipocito. Por ello, la comunidad científica ha realizado un gran esfuerzo en la búsqueda del modelo más adecuado, que no limite el valor de las técnicas genómicas y proteicas utilizadas para la comprensión de este complejo órgano.

Dado que los adipocitos contienen una gran gota lipídica que hace que la célula flote, los métodos más comunes de cultivo celular resultan inefectivos, ya que las células dejan de ser adherentes al soporte utilizado. Aunque se ha publicado algún estudio sobre adipocitos en suspensión (Fernyhough, Vierck et al. 2004), su mantenimiento se reduce a unas pocas horas, insuficientes para el análisis de la mayoría de parámetros metabólicos.

Por tanto, lo más frecuente es el cultivo de preadipocitos, que todavía no contienen una gran cantidad de lípidos por lo que su apariencia es fibroblastoide, de manera que puede inducirse su diferenciación y utilizar ese cultivo celular para los estudios procedentes. Aunque actualmente existen preadipocitos primarios disponibles comercialmente, de forma equivalente pueden utilizarse las células de la llamada fracción vascular-estromal (SV), aisladas tras la digestión enzimática y centrifugación del tejido adiposo. Sin embargo, la proporción de estas células que son capaces de diferenciarse depende de la especie de la que se obtiene, edad y peso (obeso o no) del donante y localización del tejido (Poulos, Dodson et al. 2010, Perez, Suarez et al. 2016). Asimismo, dicha proporción puede alterarse modificando los cócteles de medios de diferenciación o los componentes de la matriz extracelular artificial utilizada para el cultivo (Hausman, Wright et al. 1996).

No obstante, el tipo celular más clásicamente aceptado para el estudio de la adipogénesis es el de las líneas celulares establecidas, como por ejemplo la 3T3-L1 de ratón.

I.2.5.1. 3T3-L1

Uno de los modelos mejor caracterizados para el estudio de la adipogénesis es el de preadipocitos de ratón 3T3-L1. Este clon deriva de la línea de fibroblastos 3T3 inmortalizada, que puede ser expandida indefinidamente en cultivo y acumular triglicéridos cuando se induce la detención de su crecimiento, ya que se trata de una línea ya comprometida hacia el linaje adipogénico (Green and Kehinde 1975). Otro clon derivado de la misma línea, el 3T3-F422A se utiliza también como modelo de adipogénesis (Chen, Teicher et al. 1989).

La diferenciación de estas células *in vitro* puede conseguirse mediante la adición de estímulos de adipogénesis que incluyen glucocorticoides, AMP cíclico e insulina, tras un periodo de unos 4 a 6 días (Chang and Polakis 1978). Además, el tratamiento de estas células con hormonas o drogas lipogénicas o lipolíticas modula la tasa de síntesis y acumulación de triglicéridos del mismo modo que ocurre en células de grasa aisladas directamente de tejidos animales (Green and Kehinde 1975).

Aunque este modelo comparte gran parte de sus características con los adipocitos primarios, como la respuesta a insulina, la expresión de genes específicos y la secreción de determinados factores, presentan algunas diferencias importantes a tener en cuenta. Por ejemplo, en las células 3T3-L1 los triglicéridos se almacenan en múltiples gotas lipídicas, mientras que los adipocitos blancos contienen una única y de gran tamaño (Green and Kehinde 1975). Por otro lado, las 3T3-L1 expresan y secretan leptina en niveles mucho menores que los adipocitos primarios (Mandrup, Loftus et al. 1997).

Otras desventajas de este modelo celular son: su aneuploidía, que puede influir en su capacidad de diferenciación, la falta de potencial de diferenciación a adipocito marrón, la carencia del contexto extracelular propio del tejido adiposo y la imposibilidad de encontrar diferencias entre los distintos tipos de tejido adiposo específicos según su localización (subcutáneo o visceral), que se sabe que difieren tanto en su potencial adipogénico como en su comportamiento metabólico en general (Rosen, Walkey et al. 2000).

Como alternativa a este modelo, recientemente se han empezado a utilizar células madre aisladas a partir del tejido adiposo del ratón (mASC), con potencial de diferenciación a adipocitos maduros, entre otros linajes (Lasrich, Bartelt et al. 2015). En el siguiente apartado se detallarán sus principales características para el caso de células humanas, más interesantes para el estudio de mecanismos fisiológicos y patológicos en nuestra especie.

I.2.5.2. hASC

Las células madre se dividen tradicionalmente en embrionarias (ESC), obtenidas a partir de blastocistos y con capacidad de diferenciación hacia todos los tipos celulares, y adultas, derivadas de diferentes tejidos del individuo ya desarrollado y que se pueden

diferenciar solo hacia unos determinados tipos de células. Estas últimas se dividen para reemplazar células muertas y para regenerar tejidos dañados (Lin, Xin et al. 2010).

Las células madre mesenquimales humanas (hMSC) son células madre somáticas, procedentes del mesodermo embrionario, que residen en una gran variedad de tejidos. Aunque originalmente se aislaron del estroma de la médula ósea y Friedenstein las denominó “mecanocitos” (Friedenstein 1976), también se encuentran en el tejido adiposo, sangre del cordón umbilical, fluido amniótico, placenta, tendones, membrana sinovial, músculo esquelético, etc. Éstas presentan un cariotipo normal (euploide) y una alta capacidad de autorrenovación, a pesar de no ser tumorales. Además, pueden diferenciarse en distintas progenies de múltiples linajes, incluyendo osteoblastos, condrocitos y adipocitos (Chen, Shih et al. 2008, Schipani and Kronenberg 2008).

De entre ellas, la población que se encuentra en el estroma vascular del tejido adiposo se engloba bajo el nombre de células madre derivadas de tejido adiposo (ASC, según la nomenclatura estándar propuesta por la *International Fat Applied Technology Society*) (Gimble, Katz et al. 2007). Se calcula que un 1 % de las células del tejido adiposo blanco presentan las propiedades básicas de las MSC (Ong and Sugii 2013). Además de la diferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica, se ha descrito que estas células pueden diferenciarse a músculo esquelético (Mizuno, Zuk et al. 2002) e incluso hacia tejidos procedentes de linajes no mesenquimales como cardiomiocitos (Planat-Benard, Menard et al. 2004), neuronas (Ashjian, Elbarbary et al. 2003), células pancreáticas (Timper, Seboek et al. 2006), hepatocitos (Bonora-Centelles, Jover et al. 2009), células endoteliales (Auxenfans, Lequeux et al. 2012), etc. (figura I.9).

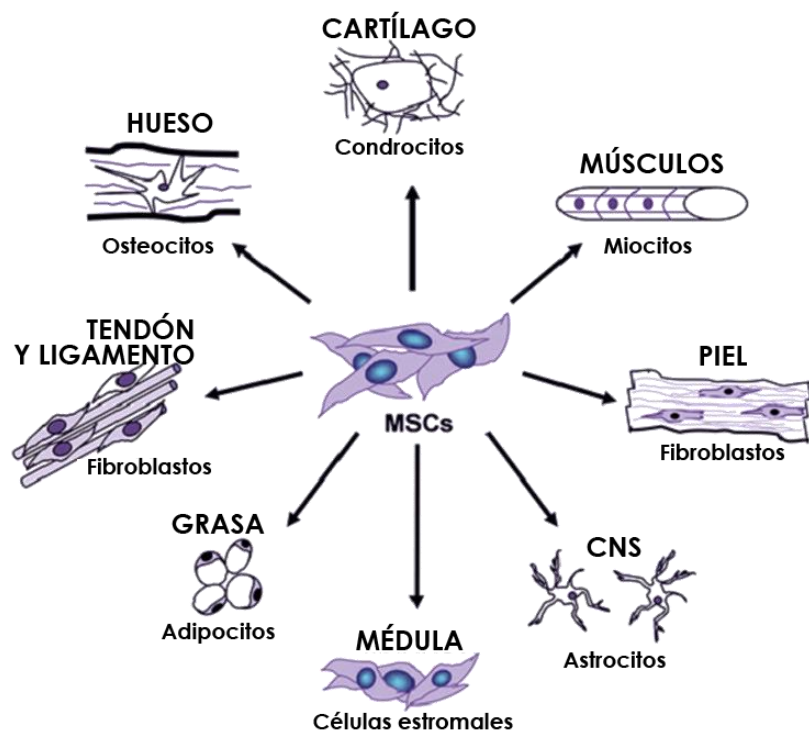


Figura I.9: Potencial de diferenciación de las MSC. Extraído de (<http://factorstem.es>).

La capacidad de diferenciación de las ASC, unida a su abundancia (si se compara con las MSC obtenidas de médula ósea) y a la facilidad de su extracción (generalmente a partir de procedimientos de liposucción), hace de estas células una prometedora opción para su aplicación en ingeniería de tejidos. De hecho, se ha propuesto su potencial terapéutico para una notable variedad de enfermedades como el infarto de miocardio (Joggerst and Hatzopoulos 2009), enfermedades neurológicas (Martino, Franklin et al. 2010), apoplejía (Liao, Xie et al. 2009), cicatrización de heridas (Wu, Zhao et al. 2010), etc.

Sin embargo, su uso real para éste y otros estudios genéticos y bioquímicos se ve limitado por su rápido envejecimiento en cultivo (senescencia), causante de cambios considerables en sus propiedades moleculares y fenotípicas (Tang and Lane 2012). Concretamente, se ha demostrado que las alteraciones morfológicas y el declive en el potencial de diferenciación se deben a un acortamiento prematuro de los telómeros (Bonab, Alimoghaddam et al. 2006). Además, el cultivo prolongado de estas células también incrementa las posibilidades de una transformación maligna de las mismas (Rosland, Svendsen et al. 2009).

En cuanto a la capacidad de diferenciación adipogénica de las ASC hay que tener en cuenta que ésta depende del origen de las células así como de las características del donante (edad, sexo y estado metabólico), diferenciándose mejor aquellas procedentes de grasa subcutánea frente a las de grasa visceral (Macotela, Emanuelli et al. 2012).

Como conclusión y a modo de resumen, las hASC constituyen un buen modelo de célula humana con capacidad de diferenciación, euploide y de relativamente fácil obtención, destacando como principal inconveniente la senescencia celular que imposibilita la realización de experimentos muy prolongados en el tiempo.

I.2.5.3. Otros

Como alternativa a las hASC, en los últimos años se han realizado algunos estudios con una línea de preadipocitos aislados del tejido adiposo de un paciente con el síndrome de Simpson-Golabi-Behmel (SGBS), síndrome asociado al cromosoma X que se caracteriza por un crecimiento acelerado. Estas células, no inmortalizadas, poseen la capacidad de proliferar hasta las 50 generaciones sin perder su potencial de diferenciación adipogénica (Fischer-Posovszky, Newell et al. 2008).

Aunque mucho menos utilizadas, una última opción para el estudio de la adipogénesis en células humanas lo constituyen las células LiSa-2 (Wabitsch, Bruderlein et al. 2000). Sin embargo, dado que fueron aisladas a partir de un liposarcoma, con ellas no se evitan las desventajas asociadas a las líneas celulares de origen tumoral.

En cuanto a células de ratón, otros modelos disponibles son las células embrionarias multipotentes 10T1/2 (Rong, Klein et al. 2011), las células TA1, derivadas de las 10T1/2 tras el tratamiento con 5-azacitidina (Chapman, Knight et al. 1984), y la línea celular establecida a partir de grasa epididimal Ob17 (Grimaldi, Djian et al. 1982).

Para finalizar este capítulo, es necesario destacar que las nuevas tendencias en cuanto a terapia celular y medicina regenerativa pasan por el uso de células madre pluripotentes inducidas (iPSC), que pueden generarse a partir de células somáticas adultas mediante técnicas de reprogramación (Takahashi, Tanabe et al. 2007). Así, una fuente alternativa para la obtención de grandes poblaciones de MSC puede ser la diferenciación controlada de estas iPSC, que a su vez pueden diferenciarse hacia el linaje adipogénico (Xiong, LaDana et al. 2013, Hynes, Menicanin et al. 2014). En esta línea, las iPSC se postulan incluso, en un futuro, como herramienta de una posible terapia de sustitución para enfermedades mitocondriales (Galera, Zurita-Diaz et al. 2016).

I.3. Mitocondria y adipocitos

I.3.1. Papel de la mitocondria en la biología del adipocito

El metabolismo lipídico, así como el de la glucosa, depende en gran medida de la mitocondria, ya que la célula necesita metabolizar estos nutrientes para generar energía en forma de ATP. Aunque todas las células se ven alteradas por una disfunción mitocondrial, los tejidos primarios más afectados son aquellos más dependientes de la actividad de dicho orgánulo, como el músculo esquelético y cardíaco, el cerebro, el hígado y también el tejido adiposo (Kusminski and Scherer 2012).

A pesar de contener relativamente pocas mitocondrias respecto a su gran tamaño, los adipocitos interpretan las señales nutricionales y hormonales y coordinan la respuesta mitocondrial más adecuada. Dicha respuesta consistirá en, o bien oxidar los ácidos grasos y carbohidratos de la dieta a través del ciclo de Krebs y la cadena respiratoria, o bien almacenar estos combustibles en forma de triglicéridos hasta que el requerimiento energético del organismo exija su liberación (Sun, Kusminski et al. 2011).

Por tanto, la mitocondria es esencial para el mantenimiento de la función del tejido adiposo blanco, incluyendo la secreción de adipoquinas (Koh, Park et al. 2007, Kusminski and Scherer 2012). Por un lado, juega un papel clave en la lipogénesis, proporcionando los intermediarios necesarios (acetil-CoA y glicerol-3-fosfato, derivados del metabolismo glucídico) para la síntesis de triglicéridos. Por otro lado, participa también en la regulación de la lipólisis, ya que los ácidos grasos resultantes se oxidan en este orgánulo (β -oxidación) y se utilizan como fuente de energía para la producción de ATP (De Pauw, Tejerina et al. 2009) (figura I.10).

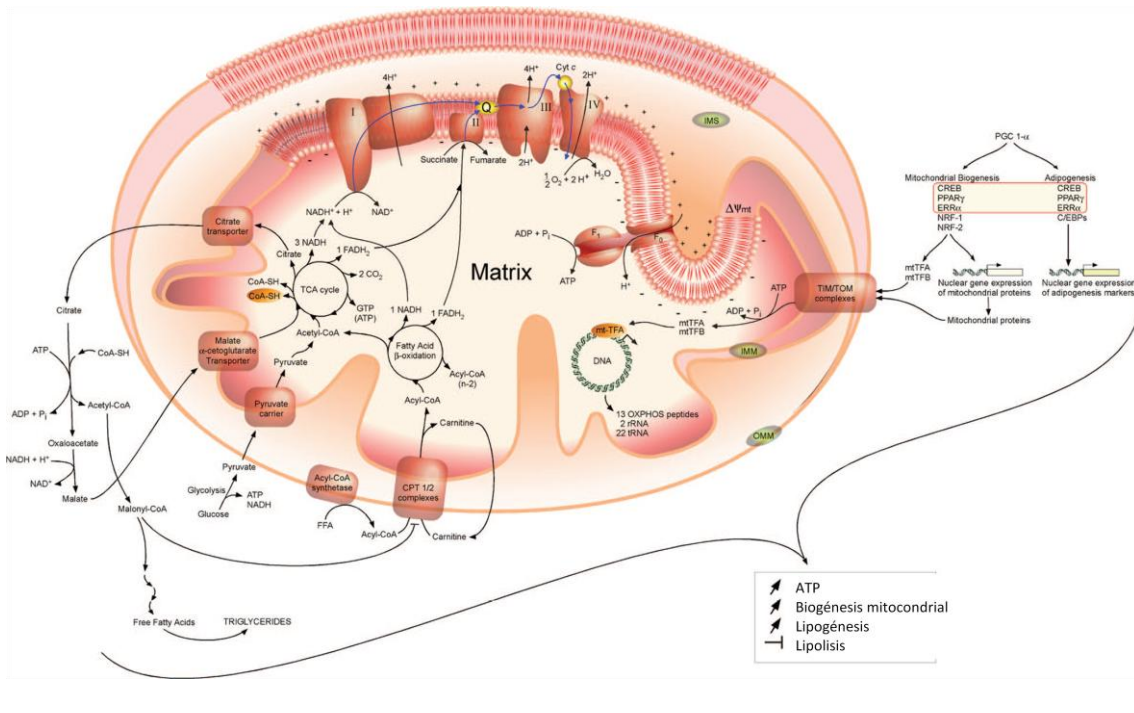


Figura 1.10: Principales funciones de la mitocondria en los adipocitos. El piruvato obtenido por glucólisis en el citosol se convierte en acetil-CoA en la matriz. Los grupos acetilo salen de la mitocondria en forma de citrato, que al metabolizarse libera acetil-CoA para la síntesis de ácidos grasos. Alternativamente, los ácidos grasos libres entran a la mitocondria a través de los complejos carnitina-palmitoil-transferasa-1 (CPT-1), donde son oxidados mediante el proceso de la β-oxidación. Los electrones derivados de las reacciones de óxido-reducción son aceptados finalmente por el O₂, y la energía desprendida se utiliza en la síntesis de ATP. Por otro lado, PGC1-α contribuye tanto a la biogénesis mitocondrial como a la adipogénesis, activando factores de transcripción específicos implicados en la expresión de genes nucleares codificantes de proteínas mitocondriales y marcadores adipogénicos. La biogénesis mitocondrial va acompañada de un incremento en la producción de ATP y en la lipogénesis, mientras que la lipólisis se encuentra inhibida. Modificado de (De Pauw, Tejerina et al. 2009).

Los adipocitos blancos maduros pueden ver reducido su número de mitocondrias, especialmente con la edad, o debido a patologías como la diabetes tipo 2 o la obesidad, llegando a una hipertrofia que lleva a la pérdida de la mayor parte de su potencial metabólico y funcional (Choo, Kim et al. 2006).

1.3.2. Papel de la mitocondria en la diferenciación adipogénica

Los diferentes factores de transcripción, mencionados anteriormente, necesarios para la diferenciación adipogénica, requieren ser activados secuencialmente mediante la participación del coactivador 1α del PPARγ (PGC-1α), uno de los principales coactivadores de receptores nucleares que regulan varios componentes del metabolismo energético, y que por tanto están implicados tanto en la adipogénesis como en la biogénesis mitocondrial (Scarpulla 2011). En concreto, PGC-1α interactúa con los factores respiratorios nucleares (NRF) 1 y 2, y con TFAM, que es responsable directo de la replicación y transcripción del mtDNA (Wu, Puigserver et al. 1999). Esto constituye un argumento importante que apoya el hecho de que debe existir una coordinación entre la biogénesis del orgánulo y el balance energético (De Pauw, Tejerina et al. 2009).

Las células madre en general poseen un número reducido de mitocondrias así como una baja actividad enzimática mitocondrial, posiblemente como mecanismo para contrarrestar la acumulación de daño oxidativo causado por las ROS producidas en la ETC mitocondrial (Chen, Hsu et al. 2010). De hecho, se sabe que la mitocondria se mantiene en un estado *naïve* durante el desarrollo embrionario temprano (Van Blerkom 2009).

Sin embargo, durante la diferenciación adipogénica se produce una marcada biogénesis mitocondrial (Wilson-Fritch, Burkart et al. 2003, Newton, Cologna et al. 2011), al igual que ocurre en otros tipos de procesos de diferenciación como la osteogénesis (Chen, Shih et al. 2008), la miogénesis (Moyes, Mathieu-Costello et al. 1997) o la cardiomiogénesis (Spitkovsky, Sasse et al. 2004). Esta biogénesis mitocondrial es un proceso complejo que incluye tanto un incremento en la masa mitocondrial (proliferación) como un cambio en sus funciones biológicas (diferenciación) (Attardi and Schatz 1988).

Concretamente, se sabe que la diferenciación *in vitro* de preadipocitos murinos 3T3-L1 está acompañada de un importante incremento en la expresión de un gran número de proteínas mitocondriales, implicadas en el ciclo de Krebs, la β -oxidación de los ácidos grasos, la generación de ATP y la función antioxidante (Newton, Cologna et al. 2011). De hecho, el programa de diferenciación a adipocito requiere grandes cantidades de ATP para que las células lleguen a ser metabólicamente activas, si bien el contenido de ATP total disminuye como resultado de un balance negativo entre su producción y su consumo en procesos de alta demanda energética como es el caso de la lipogénesis. Del mismo modo, se ha demostrado un incremento en la tasa de consumo de oxígeno de los adipocitos frente a la de los preadipocitos, lo que podría ser una clara manifestación de un aumento en la biogénesis del sistema OXPHOS durante la diferenciación adipogénica (Wilson-Fritch, Burkart et al. 2003). Además, tanto los niveles de los complejos OXPHOS como el número de copias de mtDNA aumentan con la diferenciación a adipocito en otros estudios (Shi, Burkart et al. 2008, Ryu, Kim et al. 2013). Del mismo modo, el tratamiento de preadipocitos humanos con agentes que facilitan la diferenciación *in vitro* a adipocitos blancos, incrementan también los niveles de mtDNA (Bogacka, Ukropcova et al. 2005). Por último, se ha demostrado que la diferenciación adipogénica de hMSC derivadas de médula ósea se acompaña de un incremento en la complejidad de las estructuras supramoleculares en las que se organizan los complejos del sistema OXPHOS, conocidas bajo el nombre de supercomplejos o respirasomas (Hofmann, Beyer et al. 2012).

Por otra parte, la diferenciación adipogénica puede verse afectada al manipular genéticamente el sistema OXPHOS. Por ejemplo, la sobreexpresión del factor de transcripción de desarrollo mesodérmico Tbx15 en preadipocitos de ratón lleva a una reducción de masa mitocondrial, respiración y expresión de genes codificados en el mtDNA. Como consecuencia, la diferenciación a adipocito de estas células se ve interrumpida y se reduce la acumulación de triglicéridos (Gesta, Bezy et al. 2011). Así mismo, se han estudiado células madre derivadas del tejido adiposo (mASC) aisladas a partir de un ratón *Crif1 knock out*. Crif1 es un factor traduccional del mtDNA cuya depleción causa una caída en los niveles de las subunidades OXPHOS codificadas por el mtDNA a la vez que una alteración en la diferenciación adipogénica (Ryu, Kim et al. 2013). Otro ejemplo es el de la supresión, mediante RNAs de interferencia pequeños, del factor de transcripción mitocondrial A (TFAM), un factor clave para la

transcripción y replicación del mtDNA cuya expresión aumenta con la diferenciación adipogénica. Las hASC con esta modificación genética sufren una disminución en la expresión del gen *MT-ND2* y una disminución de la conversión a adipocito, determinada por los niveles de mRNA de la adiponectina (Zhang, Marsboom et al. 2013). Por otro lado, se han diseñado ratones que expresan una forma mutante de la enzima timidina quinasa 2 (TK2) que lleva a la pérdida de función de la misma. La TK2 es la responsable de proporcionar desoxitimidina fosforilada a la mitocondria en células diferenciadas, y su actividad es esencial en el mantenimiento de los niveles de mtDNA. Este modelo con depleción mitocondrial presenta una reducción de los acúmulos de grasa y de la expresión de leptina (Villarroya, Dorado et al. 2011). Finalmente, ratones carentes del receptor nuclear de estrógenos α (ERR α), que controla la expresión de genes nucleares implicados en la biogénesis mitocondrial, presentan una depleción del mtDNA acompañada de niveles bajos de tejido adiposo blanco y acumulación anormal de grasa marrón (Luo, Sladek et al. 2003).

La manipulación fisiológica o farmacológica del sistema OXPHOS puede afectar también a la diferenciación adipogénica. Por ejemplo, cultivar las células en condiciones de hipoxia (1 % O₂), siendo el oxígeno el último aceptor de electrones de la cadena de transporte mitocondrial, inhibe la conversión a adipocito tanto de preadipocitos murinos como de hMSC, (Carriere, Carmona et al. 2004, Zhang, Marsboom et al. 2013). Otros estudios llevados a cabo con preadipocitos murinos 3T3-L1 demuestran que inhibidores del sistema OXPHOS como la antimicina A, inducen la acumulación de triglicéridos, si bien estas células no expresan marcadores de adipocitos maduros (Vankoningsloo, Piens et al. 2005, Vankoningsloo, De Pauw et al. 2006).

I.4. El tejido adiposo en la patología mitocondrial

Las enfermedades mitocondriales comprenden un grupo muy heterogéneo y complejo de enfermedades genéticas causadas por mutaciones tanto en el mtDNA como en el nDNA. Aunque, como se ha visto, la mitocondria abarca un extenso número de rutas metabólicas, tradicionalmente el término de patología mitocondrial se ha utilizado para denominar aquellas enfermedades causadas por defectos en el sistema OXPHOS. Así, los fallos en OXPHOS representan una de las principales causas de trastornos metabólicos, con una prevalencia de 1/4.300 nacimientos (Gorman, Schaefer et al. 2015). Por otra parte, hoy en día se considera que la mitocondria, ya sea directa o indirectamente, está implicada en más de la mitad de las enfermedades humanas (Wallace, Ruiz-Pesini et al. 2003).

Asimismo, las enfermedades del tejido adiposo conforman un amplio espectro de desórdenes tanto cualitativos como cuantitativos y de distribución. Por un lado, los lipomas son los tumores benignos más frecuentes en los tejidos blandos. Cuando estos son muy numerosos se habla de lipomatosis, que pueden ser hereditarias o adquiridas. Por otro lado, las lipodistrofias son síndromes en los que se produce una alteración en la distribución del tejido adiposo y complicaciones metabólicas, pudiendo ser congénitas o adquiridas, parciales o generalizadas. Por último, tras un proceso inflamatorio o como efecto secundario a determinados fármacos puede aparecer una atrofia adiposa o lipoatrofia (Delgado and Ingen-Housz-Oro 2012).

Aunque históricamente se ha prestado poca atención al papel de la mitocondria en el tejido adiposo blanco, en los últimos años un gran número de estudios acerca de la obesidad, la diabetes tipo 2 o las lipodistrofias han llevado a un mayor reconocimiento de la función mitocondrial en la biología del tejido adiposo y de su regulación metabólica (Villarroya, Giralt et al. 2009). Si bien se sabe que ocurre una disfunción mitocondrial en el tejido adiposo de estos pacientes, todavía se desconoce si esta disfunción contribuye o bien es el resultado de estas alteraciones metabólicas (Vernochet, Damilano et al. 2014).

I.4.1. Alteraciones en el metabolismo lipídico causadas por mutaciones en genes nucleares relacionados con el sistema OXPHOS

Como se ha dicho, determinadas enfermedades genéticas mitocondriales están causadas por mutaciones en el nDNA, ya que éstas afectan a la codificación de proteínas implicadas en el funcionamiento de este orgánulo. Si la función mitocondrial juega un papel importante en la diferenciación adipogénica, defectos en estos genes pueden tener su reflejo en el tejido adiposo o los adipocitos.

Recientemente se ha visto que un grupo de pacientes con síndrome de Leigh causado por una mutación en el gen LRPPRC (*leucine-rich-pentatricopeptide-repeat-motif-containing*) (Merante, Petrova-Benedict et al. 1993), que codifica para una proteína de unión a RNA localizada en la mitocondria, presentan un aumento significativo en sus niveles de triglicéridos, así como una menor producción de adiponectina, respecto al grupo de controles sanos (Thompson Legault 2015). Del mismo modo, la concentración de triglicéridos en plasma se encontró aumentada en enfermos mitocondriales con mutaciones en los genes nucleares FBXL4, POLG, MPV17 y RRM2B (Clarke, Xiao et al. 2013).

Asimismo, existen también enfermedades mitocondriales causadas por mutaciones en genes nucleares implicados en la replicación/transcripción del mtDNA y que pueden alterar el tejido adiposo blanco. Por ejemplo, mutaciones en la DNA polimerasa- γ mitocondrial presentes en pacientes con ataxia se han asociado con obesidad (Hakonen, Heiskanen et al. 2005). Del mismo modo, pacientes con mutaciones en TK2, además de un fenotipo de patología neuromuscular, presentan también un tejido adiposo fuertemente afectado (Villarroya, Giralt et al. 2009).

I.4.2. Alteraciones en el tejido adiposo causadas por mutaciones en el mtDNA

Se sabe, desde los años 80, que deleciones y mutaciones puntuales en el mtDNA pueden ser causantes de determinadas enfermedades humanas, si bien el concepto de enfermedad mitocondrial ya había sido introducido en 1962 (Luft, Ikkos et al. 1962). Estas mutaciones pueden clasificarse en dos tipos: las que afectan a la síntesis proteica y las que se dan sobre genes codificantes de proteínas. Así, mutaciones en cualquiera de los componentes de la maquinaria de replicación, transcripción y traducción mitocondrial (tRNAs y rRNAs) de proteínas, así como en la de su plegamiento, importe o ensamblaje, resultan en un sistema OXPHOS deficiente en cualquiera de sus complejos con subunidades codificadas en el mtDNA. De hecho, desde que se describió la primera mutación en un tRNA hace 25 años (Goto, Nonaka

et al. 1990), se han encontrado más de 150 mutaciones en estos genes asociadas a varias manifestaciones clínicas (Rotig 2011).

Aunque la mayoría de estas mutaciones implican defectos en los tejidos neural y muscular, algunas de ellas, concretamente las localizadas en el tRNA^{Lys} codificado por el mtDNA, pueden causar lipomatosis. La lipomatosis simétrica múltiple se caracteriza por depósitos de tejido adiposo alrededor del cuello, hombros u otras partes del tronco, pero sin lipoatrofia. La mayoría de los pacientes portadores de las mutaciones m.8344A>G, m.8356T>C, m.8361G>A o m.8363G>A presentan el síndrome de epilepsia mioclónica asociada a fibras rojo-rasgadas (MERRF), que cursa con neuropatía y miopatía, pero en otros casos se observan depósitos extensos de tejido adiposo en el área dorsal, similares a los que se producen en el síndrome de Madelung (DiMauro 2004). Incluso la mutación m.8344A>G se ha encontrado asociada a un pedigrí de lipomatosis simétrica múltiple familiar pero en ausencia de las manifestaciones clínicas típicas del síndrome de MERRF, resultando mayor el porcentaje de mutación en los lipomas que en el propio tejido muscular (Gamez, Playan et al. 1998). Estos tejidos lipomatosos no muestran cambios en los niveles de mtDNA o en la expresión de los genes codificados por el mismo, pero sí en aquellos genes reguladores de la adipogénesis. Además, los patrones de expresión génica de los adipocitos blancos frente a los marrones quedan distorsionados, ya que dichos tejidos expresan la proteína desacoplante 1 (UCP-1) específica del tejido adiposo marrón, pero sin la adquisición completa de este fenotipo (Vila, Gamez et al. 2000, Guallar, Vila et al. 2006). Fenotipos similares se han asociado a deleciones múltiples del mtDNA (Klopstock, Naumann et al. 1997) e incluso a una gran deleción única que abarca el 47 % del genoma mitocondrial (Campos, Martin et al. 1996). Más recientemente se han encontrado casos de pacientes con la mutación m.3291T>C en el tRNA^{Leu(UUR)}, asociada al síndrome de MELAS (*Mitochondrial Encephalomyopathy with Lactic Acidosis and Stroke-like episodes*), que también presentan lipomas (Yarham, Blakely et al. 2013).

Por otra parte, algunas mutaciones patológicas en el mtDNA están fuertemente asociadas con la diabetes, enfermedad metabólica íntimamente relacionada con la fisiología del tejido adiposo. En particular, la m.3243A>G y la m.3271T>C en el gen tRNA^{Leu(UUR)} causan, además de diabetes, un bajo índice de masa corporal (BMI) y lipomatosis en algunos pacientes (Suzuki, Tsukuda et al. 2002, Suzuki, Nishimaki et al. 2004). Así mismo, se han hallado pedigrís de diabetes mellitus transmitida por herencia materna y sordera asociados a una deleción de 10,4 Kb en el mtDNA (Ballinger, Shoffner et al. 1992). Más recientemente, se ha publicado un estudio en el que una serie de pacientes con miopatía causada por una variedad de defectos mitocondriales heredados (incluyendo deleciones, mutaciones puntuales en el mtDNA y en el nDNA), presentan una sensibilidad reducida a la insulina en músculo, células A pancreáticas y tejido adiposo (Rue, Vissing et al. 2014).

I.4.3. mtDNA y lipodistrofias

Las llamadas lipodistrofias hacen referencia a un grupo de enfermedades raras, congénitas o adquiridas, que se caracterizan por la ausencia parcial o general de tejido adiposo, con un alto grado de hipertrofia del mismo en lugares poco comunes (Garg 2011,

Vantghem, Balavoine et al. 2012). Tanto sus causas como sus manifestaciones clínicas son diversas, pudiendo dar lugar a graves complicaciones de tipo metabólico.

Algunos tipos de disfunción mitocondrial se han asociado a la aparición del síndrome lipodistrófico. Por ejemplo, ratones *KO* para el factor de transcripción mitocondrial TFAM son resistentes al aumento de peso (debido a la muerte de los adipocitos y a la inflamación del tejido adiposo) y presentan complicaciones metabólicas asociadas (Vernochet, Damilano et al. 2014).

Un fenotipo lipodistrófico similar se ha encontrado en individuos de edad avanzada. De hecho, el modelo de ratón portador de una versión deficiente en la actividad correctora de errores de la POLGA (subunidad catalítica codificada por el nDNA), presenta un depósito de grasa subcutánea reducido así como un incremento en la acumulación de lípidos en tejidos no adiposos (Trifunovic, Wredenberg et al. 2004).

Existen otras formas raras de lipodistrofias como el síndrome de Barraquer-Simons o lipodistrofia parcial adquirida, en el que la expresión de genes relacionados con la función mitocondrial se encuentra reducida en el tejido adiposo, a pesar de presentar niveles de mtDNA inalterados (Guallar, Rojas-Garcia et al. 2008).

No obstante, de entre todas ellas, una de las lipodistrofias más estudiada es aquella que se asocia al tratamiento antirretroviral contra el virus de la inmunodeficiencia humana o VIH, virus de la familia de los retrovirus causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida o SIDA.

La lipodistrofia asociada al VIH afecta a un importante grupo de pacientes infectados y bajo tratamiento antirretroviral (abreviado como HAART, terapia antirretroviral de gran actividad), consistente en lipoatrofia de la grasa subcutánea, obesidad visceral y, en ocasiones, lipomatosis en la región dorso-cervical (Villarroya, Giralto et al. 2009). La HAART se basa en la acción de dos grandes familias de drogas, inhibidores de la transcriptasa reversa (que pueden ser análogos nucleósidos o NRTIs, o no-nucleósidos), e inhibidores de proteasas (IPs). A pesar de su efectividad, el uso a largo plazo de estos compuestos causa los mencionados efectos secundarios a un 25-50 % de los pacientes. La principal hipótesis propuesta se basa en la toxicidad mitocondrial por acción de los NRTIs, uno de cuyos efectos colaterales es la inhibición de la DNA polimerasa- γ responsable de la replicación del mtDNA (Villarroya, Domingo et al. 2005).

I.4.3.1. NRTIs

Como se ha dicho, el uso de análogos de nucleósidos inhibidores de la transcriptasa reversa (NRTIs) induce la pérdida de grasa por la inhibición de la DNA polimerasa- γ mitocondrial, llevando a anomalías en cuanto a la distribución del tejido adiposo y a diversas alteraciones metabólicas (Lee, Hanes et al. 2003).

Así, los pacientes VIH positivos tratados presentan una depleción de su mtDNA así como una expresión disminuida de los genes relacionados con la diferenciación adipogénica, el almacenamiento de lípidos y la secreción de adipocinas (Pace, Martin et al. 2003, Caron,

Auclair et al. 2004, Giralt, Domingo et al. 2006). Asimismo, sus adipocitos se encuentran en un amplio rango de tamaños, con un citoplasma abundante y rico en mitocondrias y múltiples gotas lipídicas (Lloreta, Domingo et al. 2002). Además, el estudio de biopsias extraídas de lipomas dorso-cervicales (conocidos bajo el nombre en inglés de *buffalo-hump*) presentes en algunos pacientes con lipodistrofia asociada a VIH, muestra una depleción del mtDNA similar a la encontrada en el tejido adiposo subcutáneo y visceral atrofiado (Guallar, Gallego-Escuredo et al. 2008).

En concreto, la azidotimidina (zidovudina, AZT) fue la primera droga antirretroviral autorizada en el año 1987, sentando las bases de la terapia HAART que, desde su implantación hace 20 años, constituye el principal tratamiento anti-VIH en la actualidad (Rodríguez-Novoa, Barreiro et al. 2006). Describiendo brevemente su modo de acción, cuando el VIH entra en la célula empieza a transcribir su RNA monohebra en un DNA proviral, utilizando para ello la enzima transcriptasa reversa del propio virus. Los NRTIs, al ser análogos de nucleótidos, se incorporan en la elongación de este DNA y causan una terminación prematura de la cadena. Además de la AZT, los NRTIs permitidos para su uso clínico actualmente son didanosina (ddl), estavudina (d4T), lamivudina (3TC), emtricitabina (FTC) y abacavir (ABC). En cambio, la dideoxicitidina (zalcitabina, ddC) ya no está autorizada (Gardner, Hall et al. 2014) (figura I.11).

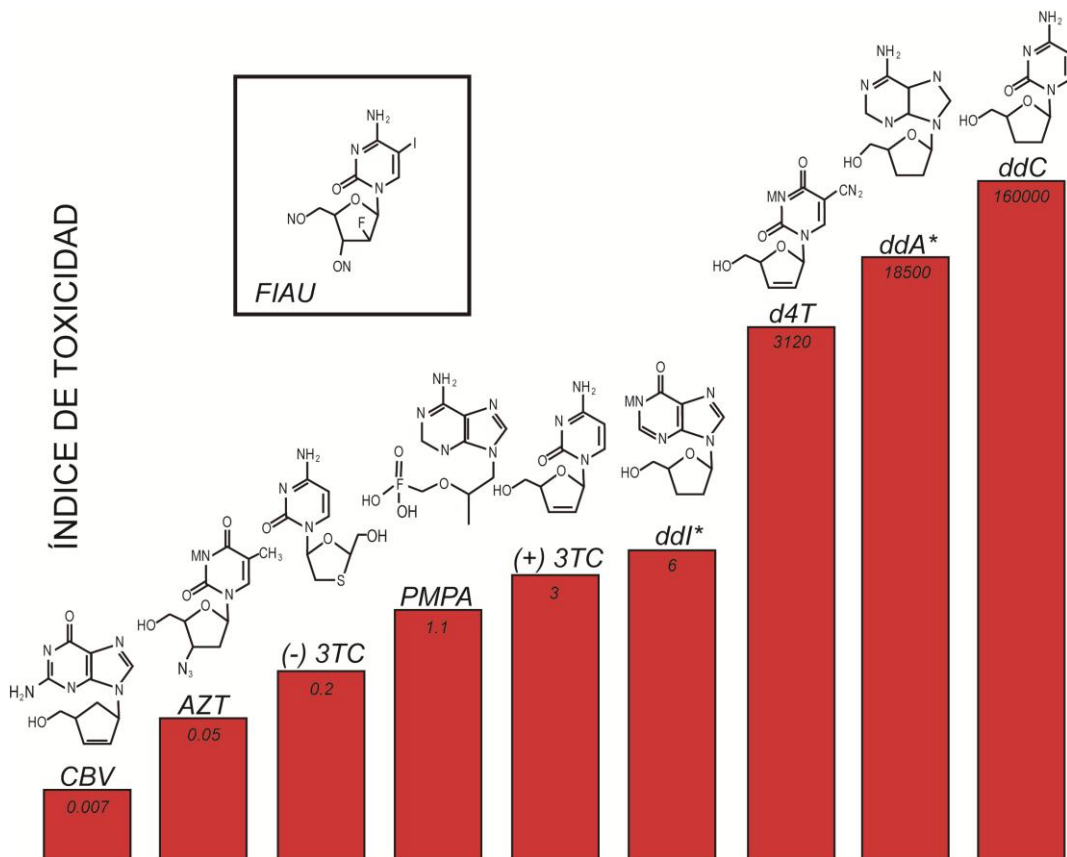


Figura I.11: Estructura y toxicidad de los análogos de nucleósidos. Se muestran los datos disponibles de zalcitabina (ddC), lamivudina (3TC), didanosina (ddl, que se metaboliza a ddA), zidovudina (AZT), estavudina (D4T), abacavir (CBV), tenofovir (PMPA), y 1-(2-deoxy-2-fluoro- β -D-arabinofuranosyl)-5-iodoracil (FIAU), que causó la muerte de varios pacientes en sus ensayos clínicos. Obtenido de (Lee, Hanes et al. 2003).

Los NRTIs se fosforilan intracelularmente (Janneh, Hoggard et al. 2003), siendo los NRTIs-trifosfato los que inhiben la polimerasa- γ mitocondrial, causando una disminución en la cantidad de mtDNA en células de sangre periférica, músculo y tejido adiposo de pacientes tratados (Cossarizza, Mussini et al. 2001). Asociado a esto, también se ha demostrado una reducción en la actividad de la cadena respiratoria tras el tratamiento con NRTIs (Hammond, Nolan et al. 2004), y la aparición de deleciones múltiples en su mtDNA (Miro, Gomez et al. 2000, Zaera, Miro et al. 2001).

Del mismo modo y más concretamente, preadipocitos tratados *in vitro* con NRTIs, tanto murinos como humanos, presentan una depleción de su mtDNA, así como una adipogénesis disminuida (Caron, Auclair et al. 2004, Walker, Auclair et al. 2006, Stankov, Schmidt et al. 2008, Stankov, Lucke et al. 2010, Stankov, Panayotova-Dimitrova et al. 2013).

Por otra parte se ha visto que, en células de hepatocarcinoma HepG2, el tratamiento con AZT causa otras alteraciones metabólicas, como el aumento en los niveles de lactato y de anión superóxido, pero sin depleción del mtDNA, mientras que ddC y ddl no provocan estos trastornos pero sí que hacen disminuir la cantidad de mtDNA (Lund, Peterson et al. 2007). Esto sugiere que, aunque similares en estructura, existen diferencias entre los mecanismos de toxicidad de los distintos NRTIs. De hecho, se han propuesto otras vías de citotoxicidad además de la inhibición de la POLG, como la inhibición de nucleótido quinasa endógenas (Lynx, Bentley et al. 2006), la inhibición directa de la fosforilación oxidativa (Lund and Wallace 2004), generación de ROS (Mak, Nedelec et al. 2004) y mutaciones tanto en el mtDNA como en el nDNA (Sussman, Olivero et al. 1999).

Dado que no todos los pacientes tratados con NRTIs experimentan esta toxicidad, se cree que determinados factores genéticos deben estar implicados en este proceso. Por ejemplo, un paciente con acidosis láctica grave, con la mutación homocigótica R964C en el gen de la POLG, localizada en una región muy conservada en la familia de las polimerasas A, mostró tan solo un 14 % de actividad enzimática, además de una caída significativamente mayor en los niveles de mtDNA al ser tratado con el NRTI estavudina (d4T) (Yamanaka, Gatanaga et al. 2007, Bailey, Kasiviswanathan et al. 2009). La susceptibilidad a esta droga también se ha asociado a la presencia de la mutación E1143G en heterocigosis en el mismo gen (Chiappini, Teicher et al. 2009).

Por otra parte, se han observado efectos similares producidos por otros análogos de nucleósidos utilizados en el tratamiento contra diversos virus, como por ejemplo el de la hepatitis B crónica (McKenzie, Fried et al. 1995).

Por último, se ha demostrado que los NRTIs también pueden desencadenar la aparición de una de las enfermedades mitocondriales más frecuentes, como es el caso de la neuropatía óptica hereditaria de Leber o LHON (Mackey, Fingert et al. 2003).

I.5. Xenobióticos OXPHOS

Por otra parte, considerando el sistema OXPHOS importante para la diferenciación adipogénica, numerosos compuestos químicos utilizados en medicina, agricultura u otras

actividades humanas que pueden afectar a la función OXPHOS (Degli Esposti 1998, Wallace 2008, Nadanaciva and Will 2011), podrían alterar también la adipogénesis. Existen varios mecanismos mediante los cuales determinadas drogas pueden causar una disfunción mitocondrial: inhibir de forma individual cada uno de los complejos del sistema OXPHOS, desacoplar el transporte de electrones de la síntesis de ATP, inhibir los transportadores o translocadores mitocondriales, impedir la replicación del mtDNA o la síntesis mitocondrial de proteínas, causar estrés oxidativo, abrir de forma irreversible el poro de transición de permeabilidad mitocondrial, o inhibir enzimas implicadas en la oxidación de los ácidos grasos o en el ciclo de Krebs (Nadanaciva and Will 2011).

I.5.1. Antibióticos

Aproximadamente el 40 % de los antibióticos interfieren con el proceso de síntesis de proteínas de las bacterias uniéndose a sitios funcionalmente importantes dentro del ribosoma (Bashan, Zarivach et al. 2003). Considerando el origen bacteriano de la mitocondria, uno de los principios mínimos del tratamiento con antibióticos como es la toxicidad selectiva no siempre se cumple, de manera que pueden afectar también a la síntesis mitocondrial de proteínas y por tanto provocar efectos secundarios en los seres humanos (Pacheu-Grau, Gomez-Duran et al. 2010).

I.5.1.1. Antibióticos utilizados en el cultivo celular

A pesar de su efectividad para evitar la contaminación bacteriana y fúngica en los cultivos celulares *in vitro*, los antibióticos (generalmente gentamicina o la combinación de penicilina y estreptomycin) presentan un gran número de inconvenientes. Por un lado, cuando se usan de forma rutinaria, los agentes contaminantes de crecimiento lento, como micoplasmas o virus, son más proclives a aparecer, además de favorecer la formación de bacterias resistentes. Otro aspecto a tener en cuenta es que, debido a la excesiva confianza depositada en el uso de antibióticos, se tienden a promover modos poco asépticos para trabajar en instalaciones de cultivo celular (Cohen, Samadikuchaksaraei et al. 2006).

Por otra parte, dada la estructura y propiedades fisicoquímicas de los antibióticos, pueden unirse a distintos componentes de la célula en cultivo y ejercer una influencia sobre sus rutas bioquímicas. Sin embargo, tras una extensa búsqueda bibliográfica, tan solo se ha encontrado un pequeño número de trabajos que hagan referencia a este tema. Concretamente para el caso de las células madre adultas, con gran potencial para la investigación biomédica y la ingeniería regenerativa, se ha dedicado un gran esfuerzo a la hora de definir las condiciones óptimas de cultivo, pero llamativamente no se ha tenido en cuenta la influencia de los antibióticos que se introducen de forma rutinaria en dichos protocolos. Debido a este desconocimiento, el uso de antibióticos en los laboratorios de cultivo celular está muy extendido, no prestándose atención a los efectos secundarios que éstos pudieran tener sobre distintos procesos metabólicos como la diferenciación.

Por ejemplo, se ha visto que cultivos de hepatocitos primarios de rata tratados con penicilina/estreptomycin presentan una inhibición de la síntesis proteica (Schwarze and

Seglen 1981). Por otra parte, la administración de la misma mezcla de antibióticos a adipoblastos primarios de ratas obesas *Zucker*, modifica la actividad lipasa de la lipoproteína liberadora de heparina (Goldstein and Johnson 1982). Asimismo, en células de melanoma de ratón B16/F10, el antibiótico causa la estimulación de las actividades DOPA oxidasa y tirosina hidroxilasa, además de una leve inactivación de la actividad dopacromo tautomerasa (Martinez-Liarte, Solano et al. 1995).

I.5.1.2. Aminoglicósidos

Los aminoglicósidos son una familia de antibióticos que provocan la incorporación de aminoácidos erróneos durante la síntesis de proteínas (Pape, Wintermeyer et al. 2000). A esta familia pertenecen la paromomicina, la gentamicina y la estreptomicina entre otros (figura I.12), y todos ellos se unen al sitio decodificante de la subunidad ribosomal pequeña (Wilson 2009).

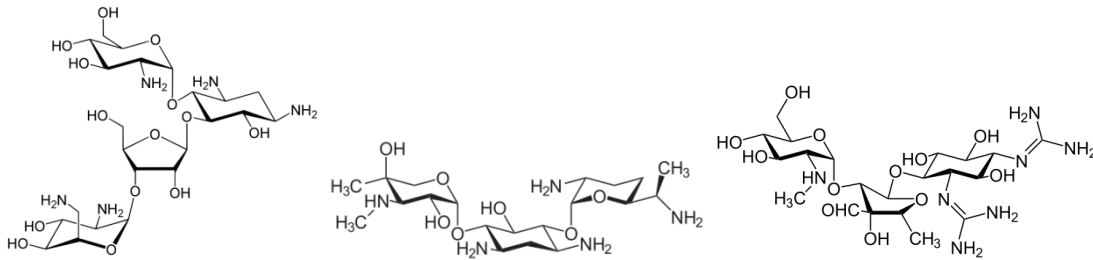


Figura I.12: Estructura química de algunos aminoglicósidos. De izquierda a derecha: paromomicina, gentamicina y estreptomicina.

La selectividad de los aminoglicósidos depende fundamentalmente de un único nucleótido dentro del rRNA, presente en el rRNA 12S mitocondrial humano que le confiere sensibilidad a los mismos, de manera que resultan neurotóxicos y ototóxicos para nuestra especie (Forge and Schacht 2000). Además, dos mutaciones en el mt-rRNA (m.1494C>T y m.1555A>G), que se asocian a sordera familiar vinculada al tratamiento con aminoglicósidos, se dan en posiciones importantes para la unión del antibiótico en el equivalente rRNA 16S bacteriano (Prezant, Agapian et al. 1993, Zhao, Li et al. 2004).

Por otro lado, el tratamiento con aminoglicósidos en una línea celular humana del epitelio mamario causa un incremento en la producción de ROS así como una disfunción mitocondrial marcada por la inhibición de los complejos respiratorios, el potencial de membrana y los niveles de ATP (Kalghatgi, Spina et al. 2013).

I.5.1.3. Cloranfenicol

El cloranfenicol (figura I.13) es un antibiótico de amplio espectro que se une al sitio A del centro peptidil transferasa del ribosoma bacteriano inhibiendo la elongación (Schlunzen, Zarivach et al. 2001). Además, se ha visto que el cloranfenicol inhibe el proceso de traducción mitocondrial, dando lugar a fenotipos frecuentes en patologías mitocondriales como la neuropatía óptica y periférica (Carelli, Ross-Cisneros et al. 2002).

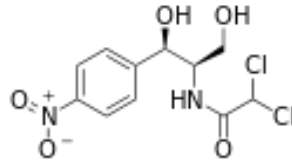


Figura I.13: Estructura química del cloranfenicol.

I.5.1.4. Linezolid

El linezolid es un antibiótico sintético, el primero del grupo de las oxazolidinonas en recibir la aprobación, en el año 2000, de la *Food and Drug Administration* (FDA), utilizado contra numerosas infecciones bacterianas, especialmente para el tratamiento de enterococos resistentes a vancomicina (Birmingham, Rayner et al. 2003). Sin embargo, a pesar de su eficacia, su uso es limitado debido a su toxicidad, causante de mielosupresión, neuropatía periférica y síndrome serotoninérgico. Recientemente, su uso también se ha asociado a hipoglucemia, acidosis láctica y pancreatitis aguda, entre otros efectos secundarios (Johnson, Vaduganathan et al. 2015).

Estudios cristalográficos han demostrado que el linezolid se une al sitio A del centro peptidil transferasa (PTC) de la subunidad grande ribosomal, al igual que lo hace el cloranfenicol (Wilson, Schlunzen et al. 2008) (figura I.14).

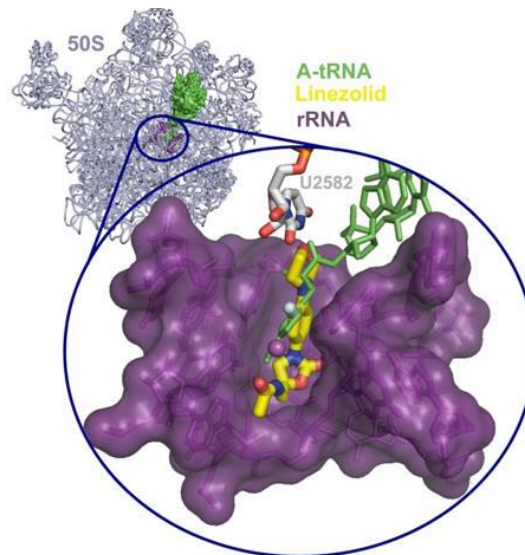


Figura I.14: Sitio de unión del linezolid al centro peptidil transferasa de la subunidad grande ribosomal. Obtenido de (Wilson, Schluenzen et al. 2008).

Así, el linezolid ha demostrado ser un potente inhibidor de la traducción mitocondrial en numerosos tejidos de mamíferos (McKee, Ferguson et al. 2006), demostrándose que su administración *in vitro* a células humanas causa una disminución en la proliferación celular, masa mitocondrial, actividades enzimáticas y niveles de los complejos respiratorios (Garrabou, Soriano et al. 2007).

I.5.2. Inhibidores OXPHOS

Al igual que ocurre de forma indirecta con los antibióticos, existen ciertos inhibidores clásicos del sistema OXPHOS que, aunque actúen directamente solo sobre una de las enzimas de la ETC, detienen todo el mecanismo (figura I.15). La utilización de estos compuestos en experimentos de diferenciación permite un estudio más específico de la importancia de la cadena respiratoria mitocondrial en dicho proceso. Sin embargo, los datos publicados sobre el efecto de estos inhibidores recogen resultados contradictorios, por lo que sería necesario un trabajo más detallado para evaluar el potencial adipogénico o antiadipogénico de los mismos en varios tipos celulares.

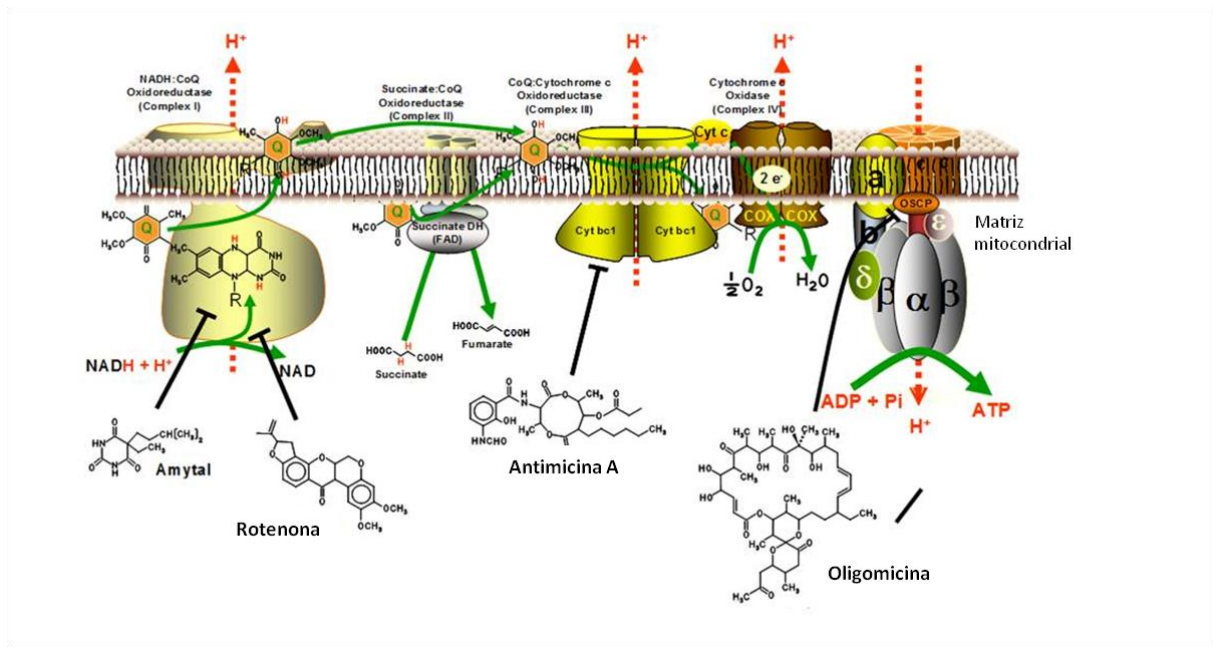


Figura I.15: Inhibidores del sistema OXPHOS. Se muestra su estructura química así como su sitio de acción sobre los complejos proteicos del sistema OXPHOS. Modificado de (www.molgen.mpg.de).

I.5.2.1. Rotenona

La rotenona es un insecticida isoflavonoide de origen vegetal que ha demostrado ser un inhibidor mitocondrial altamente específico del complejo I. Concretamente, este tóxico se une al CI inhibiendo la oxidación del NADH, lo que provoca la fuga de electrones que se combinan con oxígeno dando lugar a ROS (Li, Ragheb et al. 2003). Como efecto secundario destacable, la exposición crónica a este pesticida puede reproducir características de la enfermedad de Parkinson (Degli Esposti 1998).

Respecto a la diferenciación adipogénica, la rotenona disminuyó la tinción con Oil Red O y los niveles de mRNA de adiponectina en hMSC diferenciadas a adipocitos (Zhang, Marsboom et al. 2013), pero indujo la acumulación lipídica en hASC a través de la activación de PPAR γ (Kim, Kim et al. 2014).

I.5.2.2. Antimicina A

Las antimicinas son antibióticos producidos como metabolitos secundarios por las bacterias del género *Streptomyces*. La antimicina A es un inhibidor del complejo III que actúa bloqueando la transferencia de electrones entre el citocromo b y el citocromo c₁ (Rieske, Lipton et al. 1967).

Al igual que en el caso de la rotenona, la antimicina A disminuyó la diferenciación adipogénica de preadipocitos 3T3-F442A de ratón (Carriere, Carmona et al. 2004), pero indujo la adipogénesis en hASC (Kim, Kim et al. 2014). En esta misma dirección, el tratamiento de células 3T3-L1 con antimicina A y con otros inhibidores del CIII (estigmatelina y mixotiazol) indujo la acumulación de triglicéridos (Vankoningsloo, Piens et al. 2005).

I.5.2.3. Oligomicina

La oligomicina es un macrólido producido por bacterias del género *Streptomyces*. Es un inhibidor de la ATP sintasa mitocondrial o CV, ya que actúa bloqueando el canal protónico de su fracción F_0 (Penefsky 1985).

De forma similar a lo que ocurre con otros inhibidores del sistema OXPHOS, se ha descrito que la oligomicina induce la acumulación de triglicéridos en preadipocitos 3T3-L1 de ratón (Vankoningsloo, Piens et al. 2005).

I.5.3. Tóxicos medioambientales

Además de los mencionados, restringidos prácticamente a su uso en el laboratorio, existen numerosos tóxicos ambientales que interactúan con los complejos del sistema OXPHOS. Además, hay que tener en cuenta que el elevado contenido lipídico de las membranas mitocondriales facilita la acumulación de compuestos lipofílicos (Meyer, Leung et al. 2013), que es la naturaleza química de la mayoría de estas sustancias. Por ejemplo, el complejo I de la cadena respiratoria es la diana de sustancias tanto naturales como artificiales utilizadas en el sector agroalimentario (insecticidas, acaricidas, pesticidas, antifúngicos) y en el sanitario (sedantes, analgésicos, antihistamínicos, antisépticos bucales), por lo que la exposición humana a este tipo de inhibidores es elevada (Degli Esposti 1998).

Por lo tanto, dichos contaminantes ambientales podrían tener también un efecto en el potencial de diferenciación adipogénica de las células madre que se encuentran en este tejido.

I.5.3.1. Patología OXPHOS y tóxicos medioambientales

En relación a las enfermedades mitocondriales, se han identificado varias interacciones gen-ambiente que potencialmente modifican el desarrollo de las mismas. Por ejemplo, el consumo de alcohol o de tabaco son dos de los principales factores de riesgo para la pérdida de visión de pacientes con neuropatía óptica hereditaria de Leber o LHON (Kirkman, Yu-Wai-Man et al. 2009). Asimismo, existen casos publicados en los que el paciente desencadena los primeros síntomas de dicha enfermedad tras la exposición a vapores industriales como el n-hexano u otros disolventes (Carelli, Franceschini et al. 2007).

En otro orden de cosas, se ha visto que la exposición a bajas concentraciones de lindano, un insecticida extensamente utilizado en agricultura y ganadería, actúa como disruptor endocrino a través de la alteración de la función mitocondrial, provocando un notable incremento en la biogénesis de dicho orgánulo (Benarbia Mel, Macherel et al. 2013). Otro ejemplo es el de la toxicidad provocada por el sulfonato de perfluorooctano (PFOS), utilizado en una gran cantidad de procesos industriales. Su administración prenatal en ratas ha demostrado causar daños en la ultraestructura mitocondrial así como en la expresión de proteínas esenciales para el funcionamiento del sistema OXPHOS (Xia, Wan et al. 2011).

Para explicar cómo un tóxico ambiental puede afectar a la función OXPHOS pueden considerarse diferentes factores. En primer lugar, la dosis necesaria para que una alteración de

este tipo sea visible debería ser alta. Esto se daría o bien tras un pico agudo de administración o bien mediante la exposición continua a dichos compuestos. El mismo efecto se produciría si el tóxico se almacenase en alguno de los tejidos del cuerpo y se fuese liberando lentamente de forma continua. Por otro lado, el sistema OXPHOS también se vería afectado si el tóxico fuese capaz de provocar una modificación en el genoma, probablemente mediante mecanismos epigenéticos como la metilación del DNA (Tabb and Blumberg 2006).

I.5.3.2. El tejido adiposo como almacén de tóxicos medioambientales

Recientemente se ha visto que el tejido adiposo juega un papel importante en la alteración de las propiedades toxicológicas y cinéticas de los llamados contaminantes orgánicos persistentes (o POPs, del inglés *persistent organic pollutants*) (Kim, Marchand et al. 2011, Kim, Pelloux et al. 2012).

Algunas particularidades de este tipo de contaminantes son su bioacumulación a través de la cadena alimentaria, sobretodo en alimentos grasos de origen animal (Bergkvist, Oberg et al. 2008), y su resistencia a las enzimas encargadas de metabolizar la mayor parte de los xenobióticos químicos (Barouki 2010).

Dado su carácter hidrofóbico, el tejido adiposo puede almacenar una gran variedad de estos xenobióticos de manera que, mediante su lenta liberación, el resto de tejidos sufriría una exposición continua a dichas sustancias (La Merrill, Emond et al. 2013). Sin embargo, puesto que se sabe que los POPs se localizan entre las gotas lipídicas de los adipocitos (Bourez, Le Lay et al. 2012), la hipótesis contraria también sería posible: su acumulación reduciría la disponibilidad de estos contaminantes al resto de tejidos, limitando así su toxicidad sistémica.

Por otra parte, el tejido adiposo en sí mismo puede ser la diana de estos xenobióticos, pudiendo causar así una alteración de sus funciones o una modulación en la diferenciación de sus células precursoras (La Merrill, Emond et al. 2013). Por ejemplo, un estudio reciente muestra que el bisfenol-A, a bajas concentraciones, incrementa de forma significativa la diferenciación adipogénica de células 3T3-L1 (Ariemma, D'Esposito et al. 2016).

I.5.3.3. Obesógenos

La hipótesis de los obesógenos consiste en explicar el papel que juegan algunos contaminantes químicos medioambientales como disruptores de determinados controles homeostáticos presentes en el cuerpo humano, de manera que pueden provocar un aumento de peso (grasa) que lleva a obesidad, así como a otras complicaciones metabólicas (Thayer, Heindel et al. 2012, Grun 2014). Las etapas más críticas de susceptibilidad a los obesógenos se dan durante el desarrollo (prenatal, postnatal y pubertal), ya que sus efectos se atribuyen a mecanismos de regulación epigenética sobre determinados genes (Barouki, Gluckman et al. 2012).

Así, la lista de contaminantes químicos con pruebas o sospechas de ser disruptores endocrinos es extensa, incluyéndose derivados plásticos, pesticidas, herbicidas, fungicidas, estrógenos sintéticos, antibióticos, etc. (Vandenberg, Colborn et al. 2012).

1.5.3.3.1. **TBTC**

El cloruro de tributiltina (TBTC) pertenece a la familia de las organotininas (figura I.16), incluidas en la lista de los POPs antes mencionados, cuyas aplicaciones en procesos industriales son diversas: como catalizadores, para la fabricación de PVC y otros plásticos, en un amplio espectro de biocidas, etc. De hecho, la producción mundial de estos compuestos ha crecido desde las 5.000 hasta las 30.000 toneladas/año en los últimos 60 años (Grun 2014).

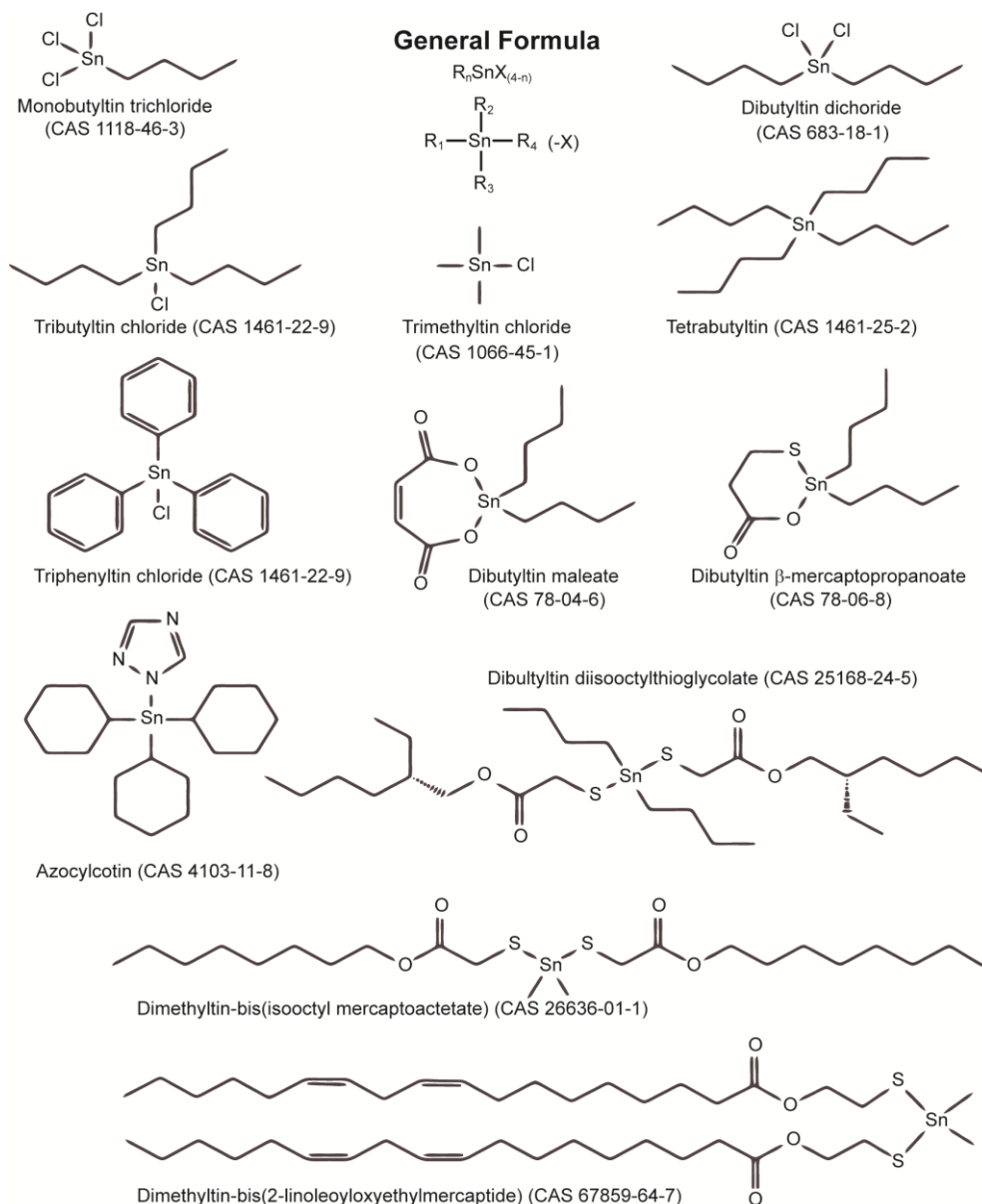


Figura I.16: Derivados más comunes de las organotininas. Se muestra la fórmula general así como la estructura química de cada una. Obtenido de (Grun 2014).

Los efectos biológicos de las organotinas han sido exhaustivamente estudiados desde hace más de 40 años, aunque fue hace 10 cuando se centró la atención en su posible potencial como obesógeno (Grun and Blumberg 2006). Hasta entonces, dado el uso extendido de las triorganotinas como componente alguicida y molusquicida de las pinturas para barcos, se habían observado determinados efectos fenotípicos en moluscos, como imposex (masculinización de organismos hermafroditas), esterilidad y malformaciones en las conchas, lo que sugería una señalización hormonal incorrecta (Smith 1981). Además, las tributiltinas (TBT) tienen una tasa muy lenta de degradación ambiental y un gran potencial de bioacumulación, por lo que su efecto se extiende a otras especies superiores en la cadena trófica. Por ello, su uso en este tipo de pinturas fue prohibido de forma global por la Organización Marítima Internacional en 2003 (Champ 2003), siendo calificadas por la *World Wildlife Fund* como “el químico más tóxico que se ha liberado nunca de forma deliberada a los océanos”.

Los mecanismos de toxicidad de las organotinas son muy variados. Dada su habilidad para asociarse a membranas celulares y para alterar la fluidez y estado de peroxidación de los lípidos, provoca daños en dichas membranas y estimula determinadas rutas de señalización de lípidos (Chicano, Ortiz et al. 2001). Además, son capaces de unirse y activar al PPAR γ que, como ya se ha dicho, es la principal regulador transcripcional de la adipogénesis (Grun and Blumberg 2006).

Otras líneas de investigación demuestran que la exposición a organotinas lleva a una desregulación de la homeostasis del calcio (Chow, Kass et al. 1992), que interacciona con componentes del poro de permeabilidad mitocondrial causando apoptosis (Nishikimi, Kira et al. 2001). Más recientemente, otros autores han propuesto que el TBT inhibe la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NAD (Yamada, Kotake et al. 2014), de manera que llevaría a cabo un mecanismo de disrupción endocrina no genómico.

Por otro lado, las triorganotinas afectan al acoplamiento energético mitocondrial interactuando directamente con la F_1F_0 -ATP sintasa tanto en procariotas como eucariotas, inhibiendo el flujo de protones y reduciendo así los niveles de ATP intracelular (Matsuno-Yagi and Hatefi 1993). Concretamente, la diana de las organotinas para la inhibición de la ATP sintasa sería la subunidad α del canal iónico (p.MT-ATP6 en mitocondrias), cuya entrada quedaría bloqueada por la unión del TBTC tal y como exponen estudios posteriores (von Ballmoos, Brunner et al. 2004) (figura I.17). Por todo ello, la respuesta a cómo un tóxico ambiental como la tributiltina promueve la obesidad es complicada y todavía incompleta.

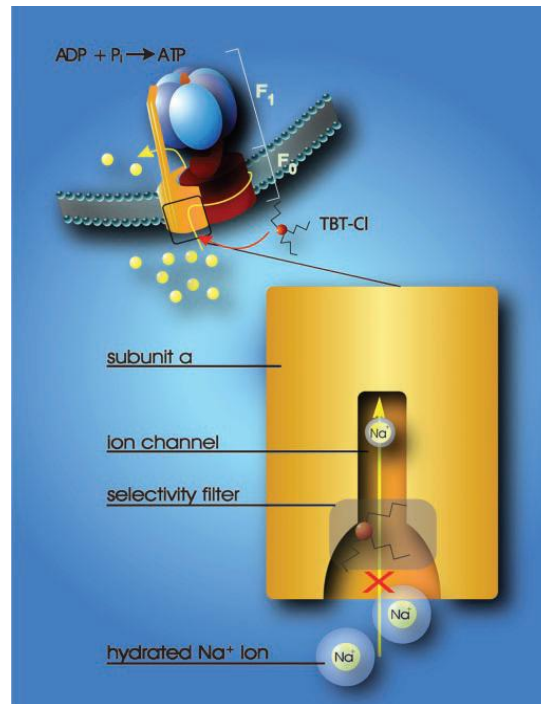


Figura I.17: Modelo de interacción entre el TBTC y la ATP sintasa. La síntesis de ATP está acoplada al flujo de iones a través de la subunidad F_0 . Las organotinas se acumulan en la membrana y penetran fácilmente hasta la entrada del canal, impidiendo el paso de iones. Como consecuencia, la síntesis de ATP queda bloqueada. Obtenido de (von Ballmoos, Brunner et al. 2004).

Por otra parte, recientemente se ha demostrado que el TBTC puede agravar el efecto de mutaciones patológicas en la subunidad ATP6 de la ATP sintasa, como es el caso de la m.8993T>G (Lopez-Gallardo, Llobet et al. 2016), que generalmente se asocia a la enfermedad de NARP (debilidad muscular neurogénica, ataxia y retinitis pigmentosa) a niveles bajos o a la de MILS (síndrome de Leigh de herencia materna) cuando el porcentaje de mutación es muy elevado (Tatuch, Christodoulou et al. 1992). Por lo tanto, la combinación de la mutación patológica con este contaminante ambiental podría modificar la expresión fenotípica de la misma.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II.1. Hipótesis

Existen cientos de xenobióticos que afectan al funcionamiento del sistema OXPHOS y a los que el ser humano puede estar expuesto a lo largo de su vida.

Por otro lado, parece ser que el sistema OXPHOS es importante para la diferenciación de las células madre adultas, concretamente hacia el linaje adipogénico, tejido que hoy en día es considerado uno de los mayores órganos endocrinos del organismo y que está implicado en un gran número de enfermedades metabólicas emergentes, como la obesidad y la diabetes. Además, varias patologías mitocondriales causadas por mutaciones en el mtDNA cursan con alteraciones en el tejido adiposo, por lo que debe existir una relación entre la biología del adipocito como célula diferenciada madura y el sistema OXPHOS.

Por lo tanto, la hipótesis de esta tesis doctoral es que xenobióticos que afectan al sistema OXPHOS pueden alterar la diferenciación de los adipocitos, lo que podría conllevar consecuencias patológicas en el individuo.

II.2. Objetivos

Objetivo general:

Estudiar el papel del sistema OXPHOS en la diferenciación celular de las hASC a adipocitos.

Objetivos específicos:

- Caracterizar las hASC como modelo celular para el estudio de la adipogénesis.
- Conocer los cambios que se producen en cuanto a la función mitocondrial de las hASC al diferenciarse a adipocitos.
- Analizar el efecto de distintos xenobióticos OXPHOS sobre la diferenciación adipogénica.
- Evaluar las posibles consecuencias patológicas de una alteración en la adipogénesis causada por defectos en el sistema OXPHOS.

III. RESULTADOS

III. RESULTADOS

III.1. Caracterización de las hASC

Para el desarrollo de esta tesis doctoral se han utilizado principalmente células madre derivadas de tejido adiposo humanas (hASC, del inglés *human Adipose-derived Stem Cells*) obtenidas comercialmente de la firma *Life Technologies (ThermoFischer Scientific)*. Concretamente, se adquirieron tres viales procedentes de tres donantes distintos, en adelante hASC-1, hASC-2 y hASC-3. La mayoría de los experimentos se realizaron con las hASC-1 aunque, tal y como se indicará, en algunos de ellos se utilizaron también las hASC-2.

III.1.1. Caracterización genética

III.1.1.1. Huella genética

Para caracterizar genéticamente las células utilizadas en esta tesis, se analizó la huella genética de 16 secuencias cortas repetidas en tándem (STR, del inglés *short tandem repeats*), altamente polimórficas y dispersas por todo el genoma. En la tabla III.1 se muestran los resultados obtenidos para las hASC-1 y las hASC-2, procedentes de dos donantes diferentes.

Marcador	Cromosoma	Alelos	
		hASC-1	hASC-2
TPOX	2	8, 11	8, 11
D2S1338	2	25	16, 17
D3S1358	3	16, 17	14, 15
FGA	4	21, 23	21, 24
D5S818	5	12	12, 13
CSF1PO	5	11, 12	11, 12
D7S820	7	10, 11	10, 11
D8S1179	8	13, 14	13, 14
TH01	11	6	6
vWA	12	15	17
D13S317	13	11, 12	11, 13
D16S539	16	12	9, 11
D18S51	18	12, 13	13, 18
D19S433	19	13, 15	15
D21S11	21	31.2, 33	29, 30
AMEL	X	X	X

Tabla III.1: Perfiles STR de las células utilizadas. Se muestran los loci amplificados y los alelos obtenidos.

Esta técnica permite comprobar en todo momento la autenticidad de las células utilizadas en los diferentes estudios, evitando así uno de los problemas más comunes en los laboratorios en los que se trabaja con cultivos celulares, como es la contaminación cruzada entre células de distintos linajes o incluso especies (Yu, Selvaraj et al. 2015).

III.1.1.2. Cariotipado

Se sabe que las líneas celulares cultivadas durante periodos de tiempo prolongados pueden sufrir alteraciones en su cariotipo, ya no solo por sus características genéticas sino por las propias condiciones de cultivo (Mamaeva 1998). Dado que las hASC constituyen un cultivo primario, de envejecimiento rápido, todos los experimentos se llevaron a cabo en un pase inferior a 10 (Wagner, Ho et al. 2010). Por ello, el análisis citogenético de las células utilizadas se realizó en este pase, comprobando así que mantenían su cariotipo euploide.

Se analizaron un total de 20 metafases de cada cultivo celular, obteniéndose en todos los casos un número de cromosomas igual a 46, sin alteraciones cromosómicas reseñables. En la figura III.1 se muestran imágenes representativas de los cariotipos obtenidos, con los pares de cromosomas ordenados de acuerdo a su morfología y tamaño.

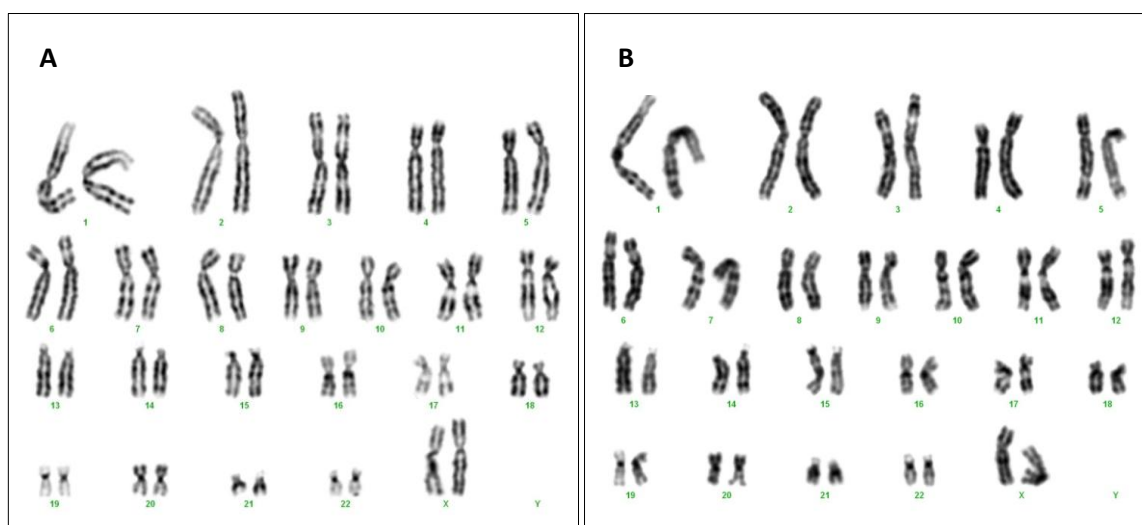


Figura III.1: Cariotipos de las células utilizadas. A) hASC-1. B) hASC-2.

III.1.1.3. Secuenciación completa del mtDNA

Para la caracterización genética mitocondrial de las células de esta tesis, se secuenció su mtDNA completo. La especial localización y características del mtDNA lo hacen particularmente susceptible a la acumulación de mutaciones puntuales que dan lugar a un gran número de variantes. Muchas de estas mutaciones no tienen efecto fenotípico o éste es muy suave, pero otras son la causa de enfermedades muy graves conocidas como mitocondriopatías (Montoya, Lopez-Gallardo et al. 2009). Por lo tanto, todo el genoma

mitocondrial ha de ser secuenciado para descartar la existencia de mutaciones de este tipo que puedan alterar la funcionalidad del sistema OXPHOS. Asimismo, la secuenciación completa del mtDNA permite encuadrar a las células dentro de un haplogrupo mitocondrial, definido por un conjunto de mutaciones de efecto moderado que modifican algunas características de su sistema OXPHOS (Montoya, Lopez-Gallardo et al. 2009).

Las secuencias obtenidas se analizaron mediante el programa informático *Sequencher* tomando como referencia la secuencia de Cambridge revisada (rCRS). En la tabla III.2 se muestran los polimorfismos encontrados en tres hASC diferentes (procedentes de distinto donante). Las variantes en el mtDNA de la muestra se compararon con un árbol filogenético que incluye más de 20.000 secuencias (<http://www.phylotree.org>). La mayor parte de las mutaciones de la muestra de estudio son comunes en la población, por lo que se trata de mutaciones antiguas. Además, todas ellas han sido descritas anteriormente como variantes poblacionales, aparentemente no patológicas (van Oven and Kayser 2009).

Genes mtDNA	SNP		
	hASC-1	hASC-2	hASC-3
MT-ND1	T4216C		
MT-ND2	A4769G, A4917G, C5187T	A4769G, T4823C	A4529T, A4769G
MT-ND3			T10238C, A10398G
MT-ND4	C10822T, A11251G, G11719A, A11812G, G11914A		A10819G, G11719A
MT-ND5	C12363T, G13368A		G12501A, C12705T, A13780G
MT-ND6	A14233G	T14470A, A14602G	
MT-CYB	C14766T, G14905A, A15326G, C15452A, A15607G	A15326G	G15043A, A15326G
MT-CO1	G6261A, C7028T		C7028T
MT-CO2	C7873T		G8251A
MT-CO3			T9540C
MT-ATP6	G8697A, A8860G	A8860G	A8860G
MT-ATP8			G8519A
MT-TG			T10034C
MT-TR	T10463C		
MT-TT	G15928A		A15924G
MT-RNR1	G709A, A750G, A1438G	A750G, A1438G	A750G, A1438G
MT-RNR2	G1888A, A2706G		G1719A, A2706G
MT-DLOOP	A73G, T146C, A263G, T279C, 309Ci, 315Ci, T16126C, C16292T, C16294T, T16519C	A263G, 309Ci, 315Ci, T16093, C16221T	A73G, T199C, T204C, T250C, A263G, 309Ci, 315Ci, 514CAi, 567CCci, G16129A, C16223A, G16391A, T16519C

Tabla III.2: Polimorfismos mitocondriales encontrados en las hASC.

Según los polimorfismos encontrados, las células hASC-1, 2 y 3 están incluidas en los haplogrupos T2c1d1a, H10e2 e I4a, respectivamente.

III.1.2. Comprobación de las características que definen a las hASC

El Comité de Células Madre Mesenquimales y de Tejidos, como parte de la Sociedad Internacional de Terapia Celular, propone unos criterios mínimos que definen este tipo de células. En primer lugar, las hASC deben ser adherentes al plástico en las condiciones de cultivo celular estándar. En segundo lugar, las hASC deben expresar los marcadores de superficie CD73, CD90 y CD105 y no expresar CD34, CD45, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 ni HLA-DR. Por

último, las hASC deben poder diferenciarse *in vitro* a osteoblastos, adipocitos y condroblastos (Dominici, Le Blanc et al. 2006, Gir, Oni et al. 2012).

III.1.2.1. Adherencia al plástico

Las hASC, unas 3-4 horas después de su descongelación, quedaron completamente adheridas a la placa de cultivo. Las células mantuvieron su morfología característica, mostrada en la figura III.2, durante más de 10 pases.

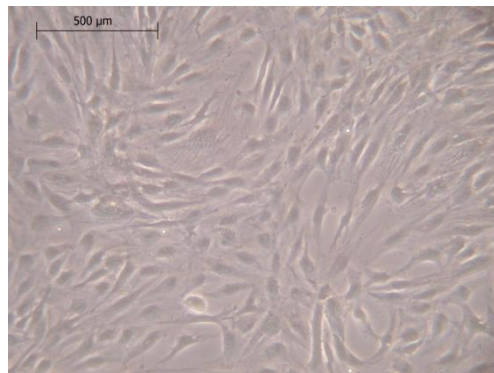


Figura III.2: Adhesión al plástico de hASC. Imagen de microscopía óptica. 10 X.

III.1.2.2. Expresión de marcadores

Para confirmar que las hASC eran células madre, se midió la expresión de mRNAs que codifican para algunas de las proteínas de superficie que se encuentran en la lista de marcadores que definen este linaje celular. Los marcadores elegidos fueron el CD90 o Thy-1 (antígeno de diferenciación de timocitos 1) y el CD105 o endoglina. Como control negativo se utilizó una línea celular de neuroblastoma que, al ser tumoral, no expresa los marcadores propios de las células madre. Los resultados se muestran en la figura III.3.

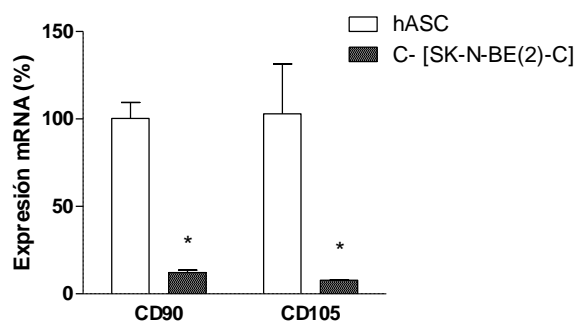


Figura III.3: Expresión de marcadores característicos de las hASC. CD90) hASC: $100 \pm 9,1$ (3); C-: $12,2 \pm 1,4$ (3). CD105) hASC: $100 \pm 28,4$ (3); C-: $7,8 \pm 0,2$ (3). * $P \leq 0,0044$ (vs. hASC).

III.1.2.3. Diferenciación *in vitro*

La diferenciación de las hASC hacia los tres linajes más comunes se indujo mediante medios de diferenciación comerciales siguiendo las indicaciones del fabricante (*ThermoFisher Scientific*). Pasado el tiempo de diferenciación, se llevaron a cabo tinciones específicas: el colorante lipofílico Oil Red O tiñe las gotas lipídicas de los adipocitos, la Alizarina se une a depósitos de calcio en células de la línea osteogénica, mientras que la Toluidina tiñe la matriz extracelular cartilaginosa del pellet de condrocitos. De esta manera, se comprobó la diferenciación de las hASC utilizadas en esta tesis a los tres linajes mencionados, como puede observarse en la figura III.4.

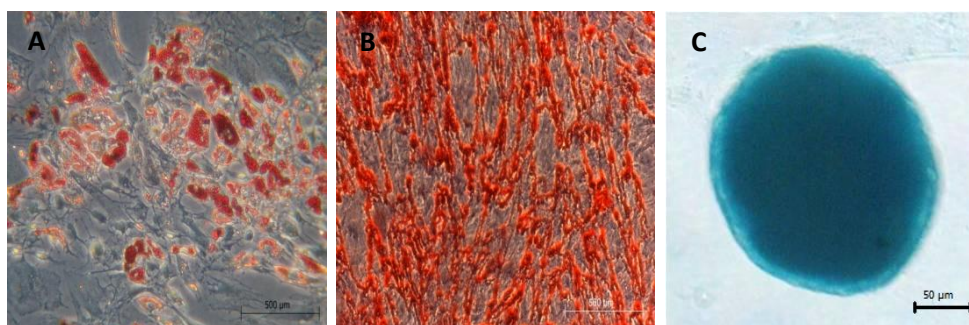


Figura III.4: hASC diferenciadas. A) Adipocitos teñidos con Oil Red O. B) Osteocitos teñidos con Alizarin Red. C) Condrocitos teñidos con Toluidine Blue (cultivo en micromasas). Microscopía óptica, 10 X.

III.1.3. Estudio del estado metabólico

Como previamente se ha demostrado (Weber, Ridderskamp et al. 2002), la concentración de glucosa en el medio de cultivo puede afectar a diferentes parámetros mitocondriales.

En el desarrollo de esta tesis, se observó que líneas celulares tumorales muy glicolíticas, como los cíbridos construidos a partir de la línea celular de osteosarcoma 143B, consumían toda la glucosa del medio cuando se cultivaban a baja concentración de la misma (5 mM) durante 48 h, y presentaban una marcada disminución al cultivarlas a alta glucosa (25 mM) durante el mismo tiempo (figura III.5).

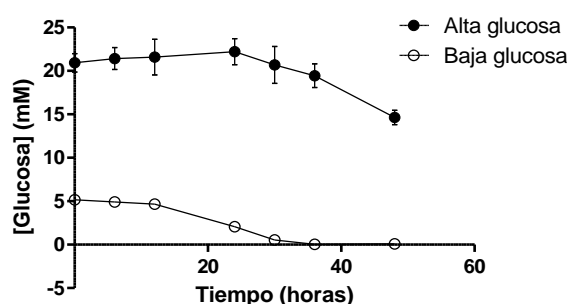


Figura III.5: Concentración de glucosa en el medio de cultivo de células con fondo nuclear de osteosarcoma 143B. Alta glucosa: 0 h, $20,9 \pm 1,1$ (9); 6 h, $21,4 \pm 1,3$ (9); 12 h, $21,6 \pm 2,1$ (9); 24 h, $22,2 \pm 1,5$ (9); 30 h, $20,7 \pm 2,1$ (9); 36 h, $19,4 \pm 1,4$ (9); 48 h, $14,6 \pm 0,8$ (9). Baja glucosa: 0 h, $5,2 \pm 0,3$ (9); 6 h, $4,9 \pm 0,3$ (9); 12 h, $4,7 \pm 0,4$ (9); 24 h, $2,1 \pm 0,3$ (9); 30 h, $0,5 \pm 0,4$ (9); 36 h, $0,03 \pm 0,1$ (9); 48 h, $0,08 \pm 0,2$ (9).

Como puede observarse en la figura III.6, las células cultivadas a baja concentración de glucosa mostraron, respecto a aquellas cultivadas a alta glucosa, una mayor cantidad de complejo IV (CIV) y una mayor actividad específica de la enzima citrato sintasa (CS), un marcador volumétrico de la fracción celular ocupada por mitocondrias. Al cultivar las células en ausencia de glucosa, éstas mostraron una mayor actividad y cantidad de CIV respecto a las mismas cultivadas a altas concentraciones de azúcar.

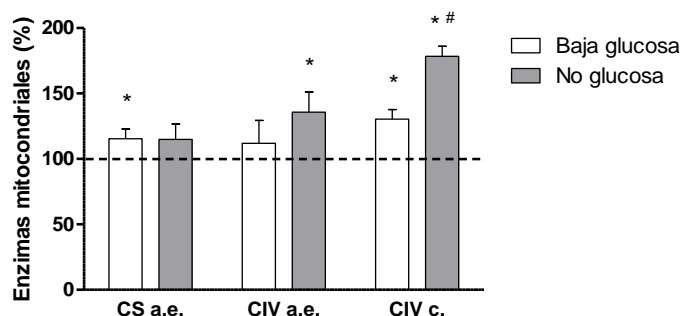


Figura III.6: Efecto de la concentración de glucosa en el medio de cultivo sobre enzimas mitocondriales en células con fondo nuclear de osteosarcoma 143B. Actividad específica (a.e.) CS: Baja glucosa, $115,5 \pm 7,4$ (3); No glucosa, $115 \pm 11,8$ (3). Actividad específica CIV (a.e.): Baja glucosa, $111,9 \pm 17,6$ (3); No glucosa, $135,8 \pm 15,3$ (3). Cantidad (c.) CIV: Baja glucosa, $130,4 \pm 7,4$ (3); No glucosa, $178,4 \pm 7,6$ (3). La línea discontinua representa los valores de Alta glucosa, que se consideraron el 100 %. * $P \leq 0,0276$ (vs. Alta glucosa), # $P \leq 0,0014$ (vs. Baja glucosa).

En cambio, cuando se repitió el mismo experimento con las hASC, se vio que el consumo de glucosa era prácticamente nulo durante un tiempo de 72 h, tanto si se cultivaban las células con un medio alto en glucosa (25 mM) como bajo en glucosa (5 mM), tal y como se muestra en la figura III.7.

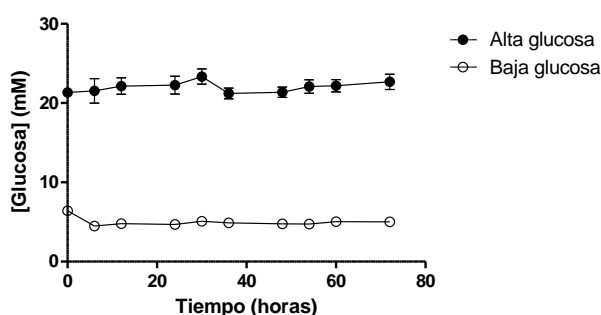


Figura III.7: Concentración de glucosa en el medio de cultivo de hASC. Alta glucosa: 0 h, $21,3 \pm 0,5$ (9); 6 h, $21,5 \pm 1,6$ (9); 12 h, $22,1 \pm 1,0$ (9); 24 h, $22,3 \pm 1,1$ (9); 30 h, $23,4 \pm 1,0$ (9); 36 h, $21,2 \pm 0,7$ (9); 48 h, $21,4 \pm 0,7$ (9); 54 h, $22,1 \pm 0,8$ (9); 60 h, $22,2 \pm 0,8$ (9); 72 h, $22,7 \pm 1,0$ (9). Baja glucosa: 0 h, $6,4 \pm 0,3$ (9); 6 h, $4,5 \pm 0,3$ (9); 12 h, $4,8 \pm 0,3$ (9); 24 h, $4,7 \pm 0,3$ (9); 30 h, $5,1 \pm 0,4$ (9); 36 h, $4,9 \pm 0,5$ (9); 48 h, $4,8 \pm 0,4$ (9); 54 h, $4,7 \pm 0,3$ (9); 60 h, $5,0 \pm 0,4$ (9); 72 h, $5,0 \pm 0,5$ (9).

De estos resultados se deduce que quizás las hASC utilicen preferentemente otros sustratos como fuente de energía, como podrían ser el piruvato o la glutamina (Reitzer, Wice et al. 1979).

Como era de esperar, y de forma similar a otros estudios (Keuper, Jastroch et al. 2014), parámetros mitocondriales como la actividad específica de la CS, la actividad y cantidad del CIV (figura III.8A) y el consumo de oxígeno (figura III.8B), no se vieron afectados por la concentración de glucosa en el medio de cultivo de las hASC.

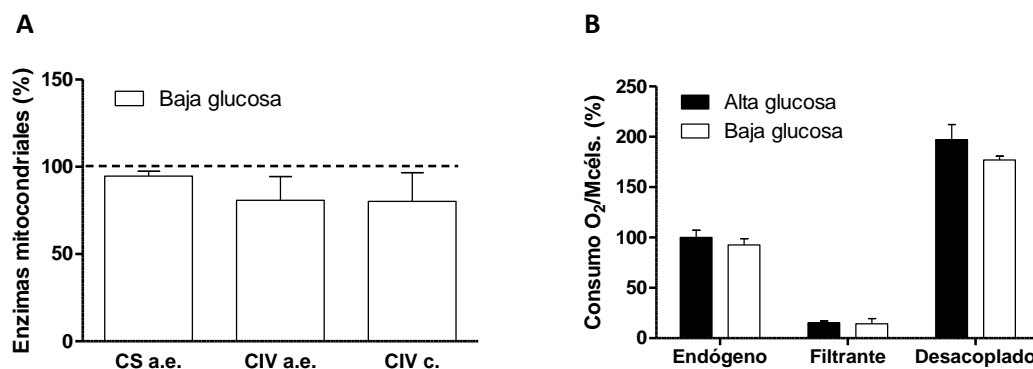


Figura III.8: Efecto de la concentración de glucosa en el medio de cultivo sobre parámetros mitocondriales en células hASC. A) Enzimas mitocondriales. Baja glucosa: Actividad específica (a.e.) CS, $94,7 \pm 2,7$ (3); actividad específica (a.e.) CIV, $80,8 \pm 13,6$ (3); cantidad (c.) CIV, $80,2 \pm 16,5$ (3). La línea discontinua representa los valores de Alta glucosa, que se consideraron el 100 %. B) Consumo de oxígeno. Alta glucosa: Endógeno, $100 \pm 7,1$ (3); Filtrante, $15,4 \pm 1,6$ (3); Desacoplado, $197,2 \pm 15,0$ (3). Baja glucosa: Endógeno, $92,5 \pm 6,4$ (3); Filtrante, $14,3 \pm 5,2$ (3); Desacoplado, $176,9 \pm 3,9$ (3).

Al no observar diferencias entre ambas concentraciones de glucosa en el medio, y dado que ya había sido demostrado que la reducción de glucosa lleva a un retraso del compromiso hacia el linaje adipogénico (Lo, Ho et al. 2011), todos los experimentos de diferenciación de esta tesis se llevaron a cabo a 25 mM de glucosa, a pesar de que ésta no es la concentración fisiológica.

III.1.4. Cultivo de las hASC en hipoxia

Numerosos estudios proponen el uso de la hipoxia para mantener el estado indiferenciado de las células madre, evitando así los problemas de diferenciación inespecífica que sufren estas células cuando se mantienen en cultivo durante largos periodos de tiempo. No obstante, otros autores demuestran que la hipoxia también puede estimular la diferenciación (Abdollahi, Harris et al. 2011).

Cultivando las hASC a una concentración de oxígeno del 3 % se comprobó que los niveles de mRNA de los genes marcadores de hipoxia aumentaban significativamente respecto a los de las células cultivadas al 20 % de oxígeno (normoxia), tal y como se muestra en la figura III.9. Dichos genes fueron los que codifican para la fosfofructoquinasa L (PFKL), una de las principales enzimas reguladoras de la glucólisis, y para el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), factor de angiogénesis cuya liberación se estimula por acción del factor inducible por hipoxia 1 (HIF) (Lee, Xia et al. 2009). En cambio, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de la enzima antioxidante superóxido dismutasa 2 (SOD2) debido a la gran dispersión de los datos obtenidos, lo que podría corresponderse con la compleja regulación de esta enzima en condiciones de hipoxia (Gao, Li et al. 2013).

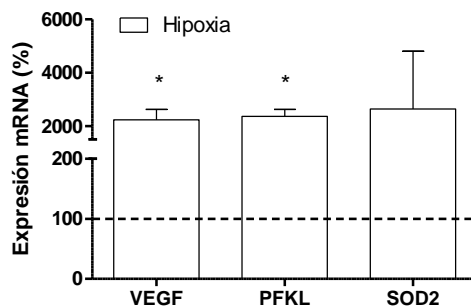


Figura III.9: Expresión de marcadores de hipoxia (3 % O₂). VEGF: 2231,1 ± 388,7 (3); PFKL: 2362,3 ± 262 (3); SOD2: 2638,9 ± 2165,8 (3). La línea discontinua representa el valor de estas variables a 20 % O₂, que se ha considerado el 100 %. *P ≤ 0,0162 (vs. Normoxia).

En cuanto a los parámetros mitocondriales, representados en la figura III.10, el mayor número de copias de mtDNA y el incremento de actividad de la enzima CS sugieren una biogénesis mitocondrial al cultivar las células en hipoxia. Sin embargo, aunque la cantidad de CIV también tendió a aumentar, su actividad disminuyó significativamente (normalizando estos valores frente a la actividad CS).

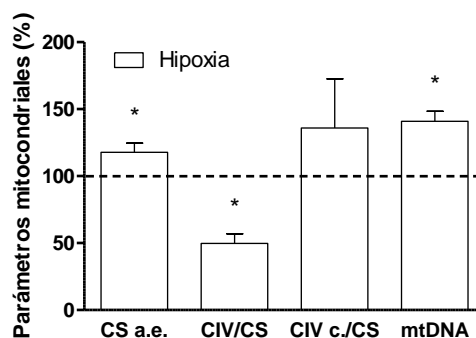


Figura III.10: Efectos del cultivo en hipoxia sobre parámetros mitocondriales. CS a.e.: 117,7 ± 6,8 (4); CIV/CS: 49,8 ± 7,2 (4); CIV c./CS: 135,9 ± 36,7 (4); mtDNA: 141 ± 7,4 (2). La línea discontinua representa el valor de estas variables a 20 % O₂, que se ha considerado el 100 %. *P ≤ 0,0178.

Este efecto opuesto de mayor biogénesis mitocondrial frente a una menor actividad del CIV podría explicarse a través de las especies reactivas de oxígeno (ROS), que podrían alterar negativamente dicha actividad enzimática (Campian, Gao et al. 2007).

Por otro lado, el tiempo de duplicación de las hASC en hipoxia resultó ser de 45,8 horas, casi el doble del calculado para las células cultivadas en normoxia, que fue de 26,3 horas. La comparación entre ambas curvas de crecimiento puede verse en la figura III.11.

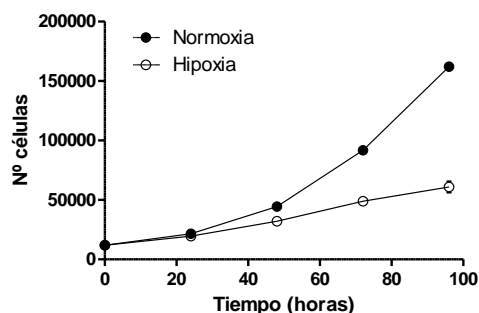


Figura III.11: Tiempo de duplicación de las hASC. Normoxia: 0 h, 11.870 ± 550 (3); 24 h, 21.587 ± 1.443 (3); 48 h, 44.413 ± 2.352 (3); 72 h, 91.668 ± 2.646 (3); 96 h, 162.033 ± 3.107 (3); $y = 12.975 \cdot e^{0,0264x}$. Hipoxia: 0 h, 11.870 ± 550 (3); 24 h, 19.547 ± 869 (3); 48 h, 32.084 ± 2.440 (3); 72 h, 48.864 ± 1.313 (3); 96 h, 60.917 ± 4.868 (3); $y = 14.841 \cdot e^{0,01515x}$.

Además, tal y como se aprecia en la figura III.12, al aplicar el protocolo de diferenciación adipogénica en condiciones de hipoxia, ésta se vio negativamente afectada como muestra la tinción difusa proporcionada por el Nile Red (A), al mismo tiempo que, sorprendentemente, se favoreció la diferenciación osteogénica (depósitos de calcio, B) y condrogénica (C) (Wang, Fermor et al. 2005, Choi, Pingguan-Murphy et al. 2014).

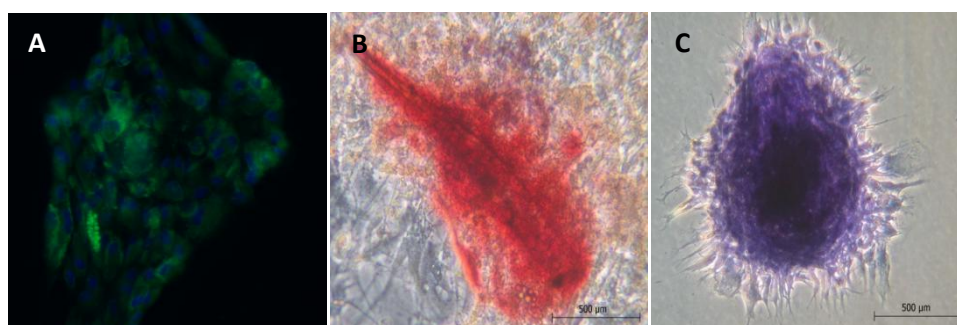


Figura III.12: Diferenciación adipogénica de las hASC en hipoxia (3 % O₂). A) Tinción con Nile Red (verde) y Hoechst (azul). Imagen de microscopía de fluorescencia. B) Tinción con Alizarin Red. C) Tinción con Toluidine Blue (cultivo normal). Imágenes de microscopía óptica, 10 X.

Debido a la lenta tasa de proliferación y a la aparente dificultad para inducir la diferenciación adipogénica en hipoxia, todos los experimentos de esta tesis, de ahora en adelante, fueron llevados a cabo a una concentración de oxígeno del 20 %, si bien se sabe que estas condiciones no reproducen exactamente las condiciones fisiológicas en las que se encuentran las hASC *in vivo*.

III.2. Diferenciación de las hASC a adipocitos

III.2.1. Cambios morfológicos

Como era de esperar, la inducción de la diferenciación adipogénica detuvo inmediatamente el crecimiento celular, consiguiéndose en 3 semanas el máximo de diferenciación. Al igual que en estudios previos (Hofmann, Beyer et al. 2012, Keuper, Jastroch et al. 2014), la diferenciación en ningún caso fue total, sino de aproximadamente el 50 % de las células.

Así, las hASC diferenciadas mostraron un incremento de tamaño, de hasta 20 veces según algunos autores (von Heimburg, Hemmrich et al. 2005), y un cambio morfológico respecto a las células sin diferenciar, tal y como puede apreciarse en la figura III.13.

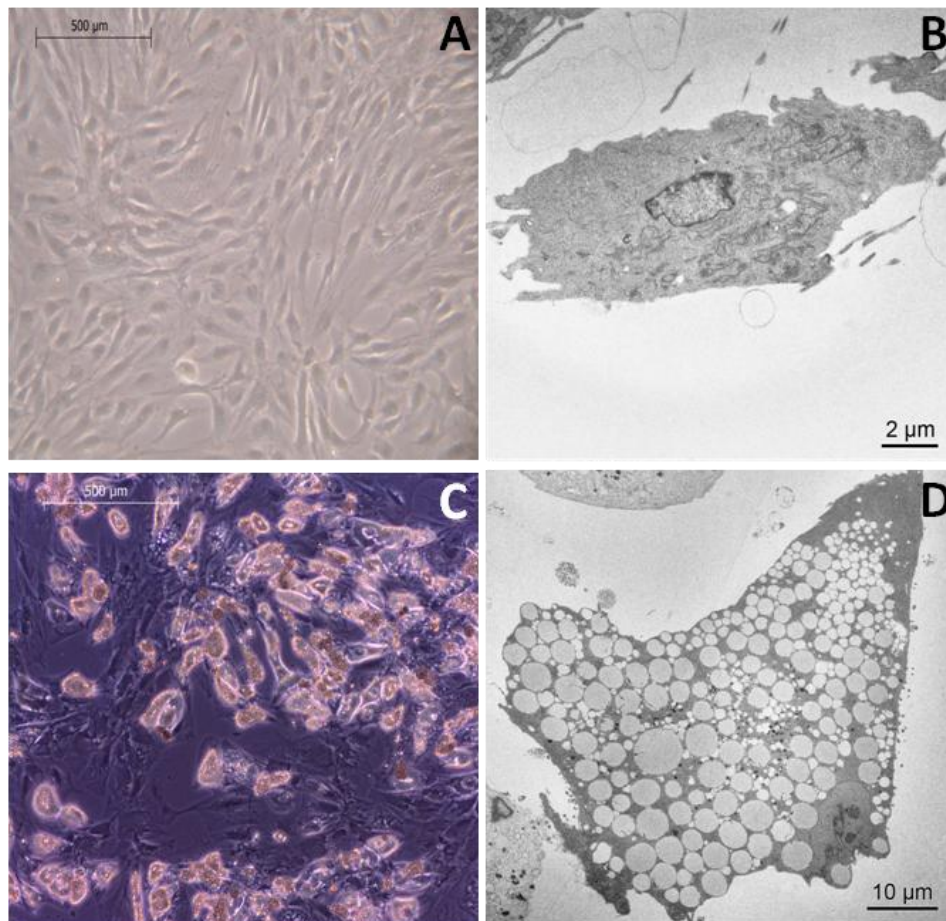


Figura III.13: hASC sin diferenciar y diferenciadas a adipocito. A) hASC sin diferenciar. Microscopía óptica, 10 X. B) hASC sin diferenciar. Microscopía electrónica. C) hASC diferenciadas a adipocito. Microscopía óptica, 10 X. D) hASC diferenciadas a adipocito. Microscopía electrónica.

Este cambio morfológico está representado principalmente por una acumulación de gotas lipídicas, tal y como quedó reflejado en la figura III.14A-B mediante las tinciones lipofílicas con Oil Red O y Nile Red, así como con la medida de la cantidad de triglicéridos totales, que se representa en la figura III.14C.

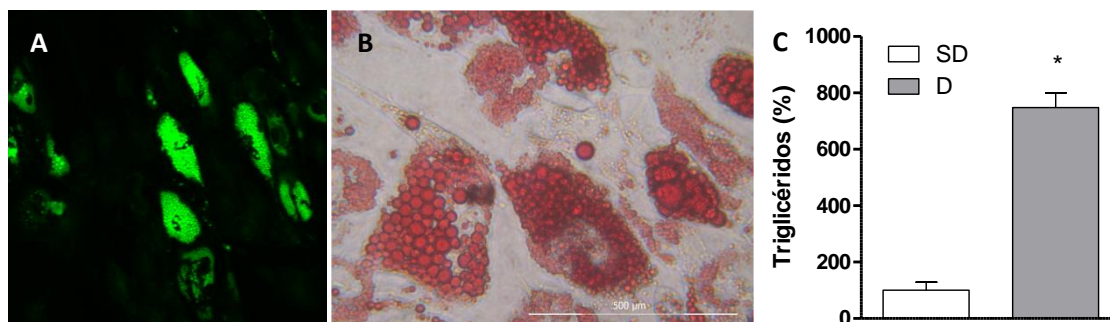


Figura III.14: Acumulación de lípidos en las hASC diferenciadas a adipocitos. A) Tinción con Nile Red. Microscopía de fluorescencia. B) Tinción con Oil Red O. Microscopía óptica, 20 X. C) Niveles de triglicéridos totales. SD (hASC sin diferenciar): $100 \pm 28,7$ (3); D (hASC diferenciadas a adipocito): $747,8 \pm 52,7$ (3). *P < 0,0001.

La aparición de estas gotas lipídicas constituye un claro indicador de la diferenciación adipogénica. Su presencia hace que el cambio de tamaño no sea proporcional al aumento de proteína celular total, cuantificada en la figura III.15.

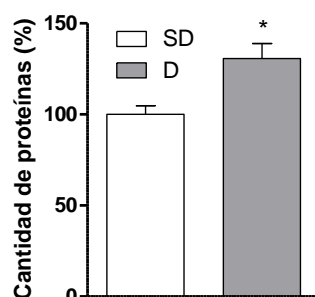


Figura III.15: Cantidad de proteína celular. SD y D denotan hASC sin diferenciar y diferenciadas a adipocitos, respectivamente. SD: $100 \pm 8,2$ (3); D: $130,7 \pm 14,2$ (3). *P = 0,0314.

III.2.2. Cambios en la expresión de marcadores

Para verificar que las hASC, tras aplicar el protocolo de diferenciación, perdían sus características de célula madre para pasar a ser células diferenciadas maduras, se midió en primer lugar la expresión de los marcadores de superficie anteriormente citados, CD90 y CD105, viendo que sus niveles disminuían con la diferenciación (figura III.16).

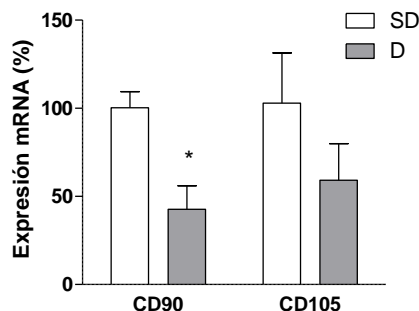


Figura III.16: Expresión de marcadores característicos de las hASC. SD y D denotan hASC sin diferenciar y diferenciadas a adipocitos, respectivamente. CD90: SD, $100 \pm 9,1$ (3); D, $42,6 \pm 13,4$ (3). *P = 0,0035. CD105: SD, $100 \pm 28,4$ (3); D, $59,2 \pm 20,8$ (3).

Por otro lado, y de forma similar a otros estudios (Vankoningsloo, Piens et al. 2005, Gesta, Bezy et al. 2011, Hofmann, Beyer et al. 2012, Zhang, Marsboom et al. 2013, Keuper, Jastroch et al. 2014), se vio que la inducción de la diferenciación adipogénica conlleva la expresión de determinados marcadores propios de los adipocitos: adiponectina, leptina, FABP4, PGC1 α y PPAR γ .

La adiponectina es una hormona sintetizada exclusivamente por el tejido adiposo que participa en el metabolismo de la glucosa y los ácidos grasos. La leptina es otra hormona producida principalmente por los adipocitos (aunque también se expresa en otros tejidos) que actúa como indicador del estado de saciedad. La proteína de unión a ácidos grasos 4 (FABP4) es una proteína transportadora específica para este tipo de macromoléculas. El coactivador 1 α del receptor γ activado por el proliferador peroxisomal (PPAR γ) PGC1 α ha demostrado ser un regulador principal tanto de la biogénesis mitocondrial como del metabolismo energético celular. El PPAR γ es un miembro de la subfamilia de los receptores nucleares que regula la diferenciación de los adipocitos.

A excepción del PPAR γ , ninguno de estos mRNA se expresó en las células hASC sin diferenciar, por lo que cuantificar la diferencia de expresión respecto a las células diferenciadas resultó imposible. En la figura III.17 se muestra una imagen representativa de las curvas de amplificación por qRT-PCR de uno de esos genes (A), así como la cuantificación del PPAR γ (B).

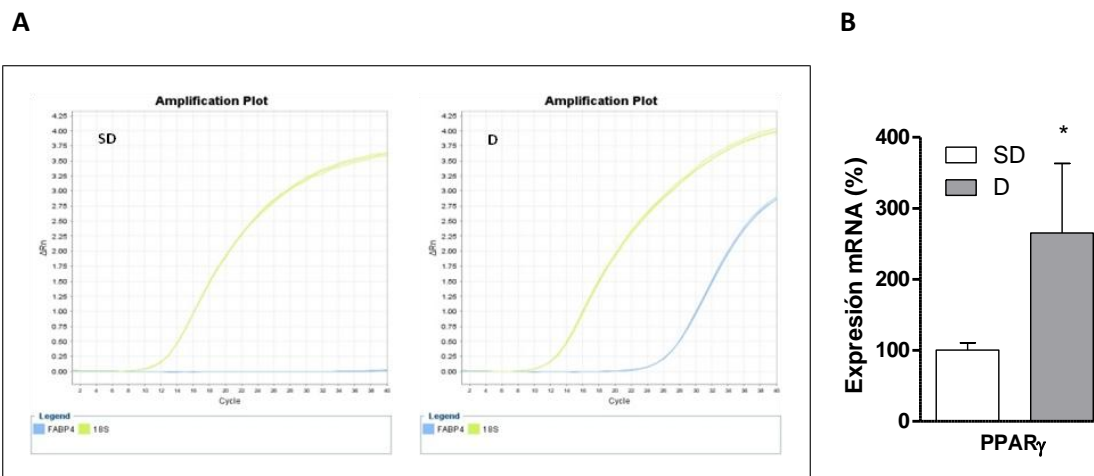


Figura III.17: Expresión de marcadores de adipogénesis. A) Expresión del mRNA de FABP4 (azul) frente al del gen de normalización rRNA 18S (verde). Imagen representativa de las curvas de amplificación obtenidas por qRT-PCR para las hASC sin diferenciar (panel izquierdo) y diferenciadas a adipocitos (panel derecho). La amplificación del mRNA FABP4 en las células SD no es cuantificable. Gráficos similares se obtuvieron para adiponectina, leptina y PGC1 α . B) Expresión del mRNA de PPAR γ . SD: 100 \pm 10,3 (3); D: 265,2 \pm 98,0 (3). *P = 0,0442. SD y D denotan hASC sin diferenciar y diferenciadas a adipocitos, respectivamente.

Como se observa en las figuras III.18 y 19, algunos de estos marcadores se estudiaron también mediante técnicas de análisis de proteínas. Para el caso de la FABP4, se comprobó su presencia intracelular en las células diferenciadas tanto por inmunocitoquímica como por Western blot (figura III.18).

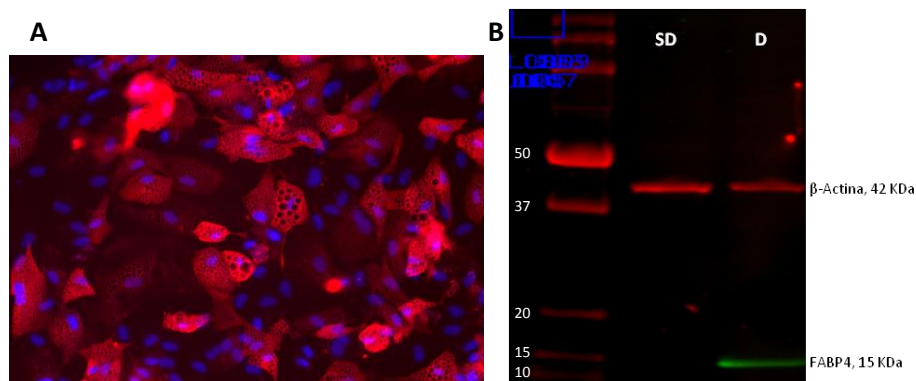


Figura III.18: FABP4 intracelular. A) Determinación inmunocitoquímica de FABP4 (rojo) y DAPI (azul) en adipocitos. B) Determinación por Western blot de FABP4 (verde) y β -actina como proteína de normalización (rojo), en hASC sin diferenciar (SD) y diferenciadas a adipocito (D).

Por otra parte, se estudió mediante ensayos tipo ELISA la secreción al medio extracelular de las principales adipocinas FABP4, adiponectina y leptina que, tal y como se

muestra en la figura III.19, se vio fuertemente inducida en los tres casos (Dicker, Le Blanc et al. 2005).

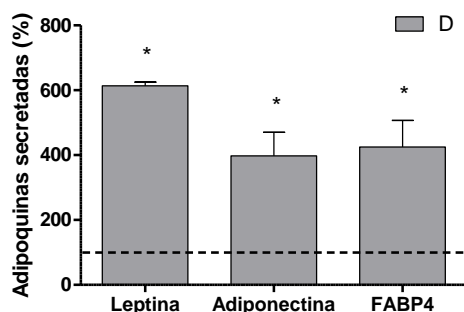


Figura III.19: Niveles de adipoquinas secretadas por los adipocitos. Leptina: $613,7 \pm 11,5$ (3); Adiponectina: $397,9 \pm 72,3$ (3); FABP4: $425,1 \pm 82,2$ (3). La línea discontinua representa los valores encontrados en el medio de cultivo de las hASC sin diferenciar, que se consideraron el 100 %. * $P \leq 0,0117$. D denota hASC diferenciadas a adipocitos.

III.3. Papel del sistema OXPHOS en la diferenciación de las hASC a adipocitos

Aunque la principal función de la mitocondria sea su participación en el metabolismo energético, recientemente se ha incrementado el número de datos que demuestran el papel de este orgánulo en los procesos de diferenciación celular. Las diferencias metabólicas entre las células madre y las células maduras derivadas de las mismas requieren de una adaptación de la función mitocondrial durante la diferenciación (De Pauw, Tejerina et al. 2009).

III.3.1. Morfología y localización mitocondrial

En primer lugar, se tomaron fotografías de microscopía electrónica de las hASC sin diferenciar y diferenciadas a adipocitos, para determinar así si existían diferencias en cuanto a la morfología y/o localización de las mitocondrias.

Como puede verse en las imágenes mostradas en la figura III.20, las hASC sin diferenciar (A y B) poseen pocas mitocondrias, pequeñas y redondeadas, con pocas crestas y situadas preferentemente en regiones perinucleares. Por el contrario, las hASC diferenciadas a adipocitos (C y D) presentan numerosas mitocondrias, largas y extendidas, con numerosas crestas y mayoritariamente distribuidas alrededor de las gotas lipídicas citoplasmáticas.

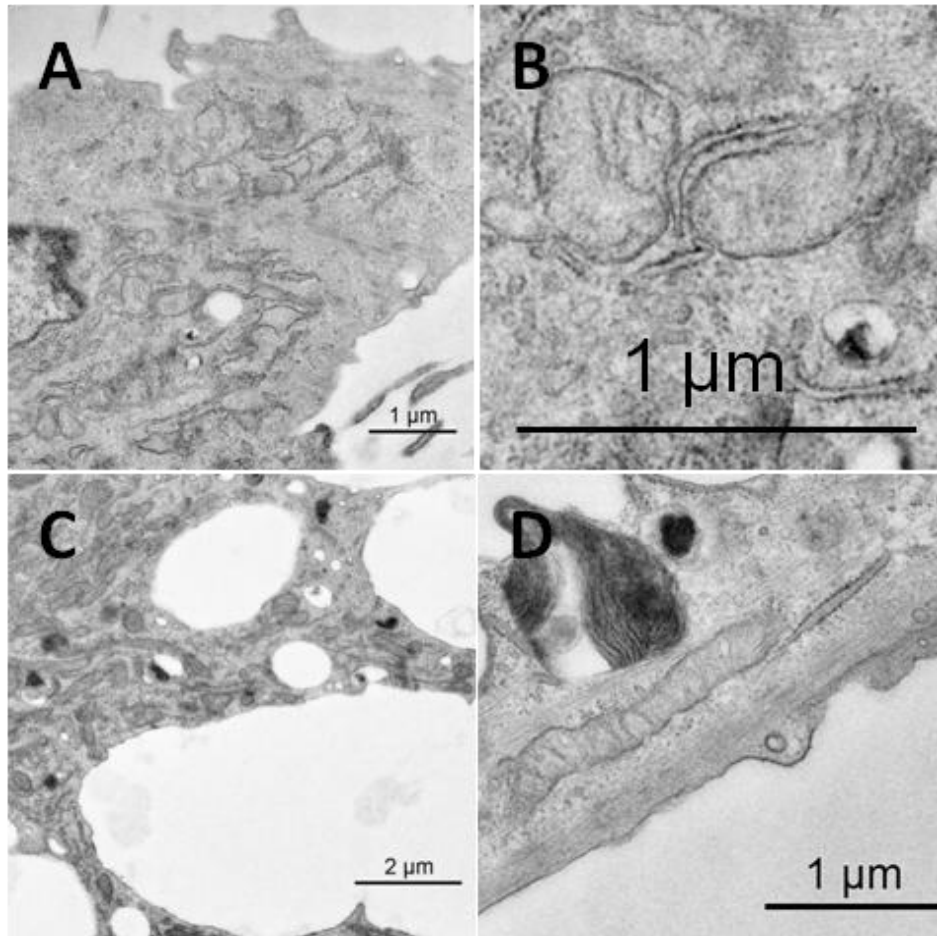


Figura III.20: Microscopía electrónica de las hASC sin diferenciar y diferenciadas a adipocito. A) hASC sin diferenciar. B) Detalle de las mitocondrias de las hASC. C) hASC diferenciadas. D) Detalle de las mitocondrias de los adipocitos.

Para confirmar estos resultados en células vivas, se utilizó el colorante fluorescente *MitoTracker*, que tiñe de forma específica las mitocondrias. En la figura III.21 se aprecian tanto hASC diferenciadas a adipocitos (flecha verde), con múltiples gotas lipídicas y mitocondrias a su alrededor, como hASC que han quedado sin diferenciar (flecha amarilla), observándose la acumulación de mitocondrias en torno al núcleo.

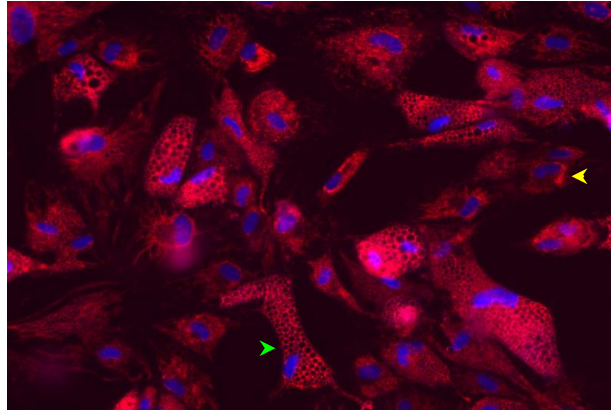


Figura III.21: Disposición de las mitocondrias en las hASC. MitoTracker (rojo, mitocondrias) y Hoechst (azul, núcleos). Flecha amarilla: hASC sin diferenciar. Flecha verde: hASC diferenciadas.

A pesar de que la simple observación microscópica ya sugiere una mayor cantidad de mitocondrias y por tanto una mayor superficie de membrana interna mitocondrial (MIMS) en las células diferenciadas, se cuantificó este incremento por citometría de flujo mediante la sonda fluorescente nonil-naranja de acridina (NAO), que se une específicamente al fosfolípido cardiolipina (mayoritario de la membrana interna de la mitocondria e íntimamente ligado a los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria). La figura III.22 muestra un aumento de dicho marcador en las células diferenciadas. Sin embargo, este aumento no resultó estadísticamente significativo, probablemente debido a que, como ya se ha comentado, solo la mitad de las células utilizadas en los ensayos cuantitativos están completamente diferenciadas.

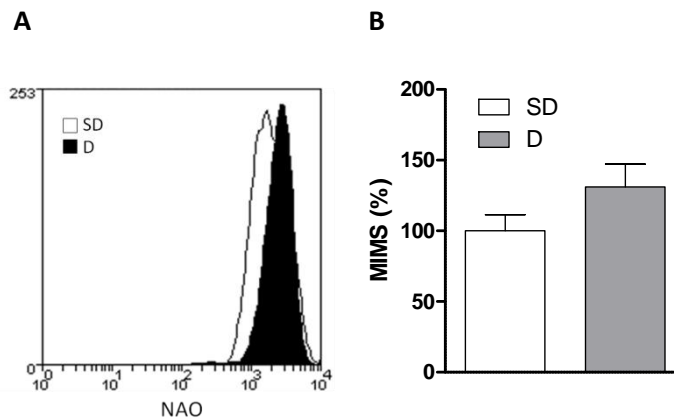


Figura III.22: Superficie de membrana interna mitocondrial. A) Histograma representativo de citometría de flujo con la sonda NAO. B) Cuantificación. SD: $100 \pm 19,7$ (3). D: $131,0 \pm 28,0$ (3). SD y D denotan hASC sin diferenciar y diferenciadas a adipocitos, respectivamente.

III.3.2. Parámetros bioquímicos mitocondriales

III.3.2.1. Potencial de membrana interna mitocondrial

Uno de los principales parámetros que dirigen el funcionamiento del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) es el potencial de membrana interna mitocondrial (MIMP), como importante indicador del estado energético mitocondrial de la célula (Rottenberg and Wu 1998).

Como se muestra en la figura III.23, tanto cualitativamente por microscopía de fluorescencia (A y B), como al cuantificar dicha fluorescencia por citometría de flujo, se vio que el MIMP aumentaba significativamente con la diferenciación a adipocitos de las hASC.

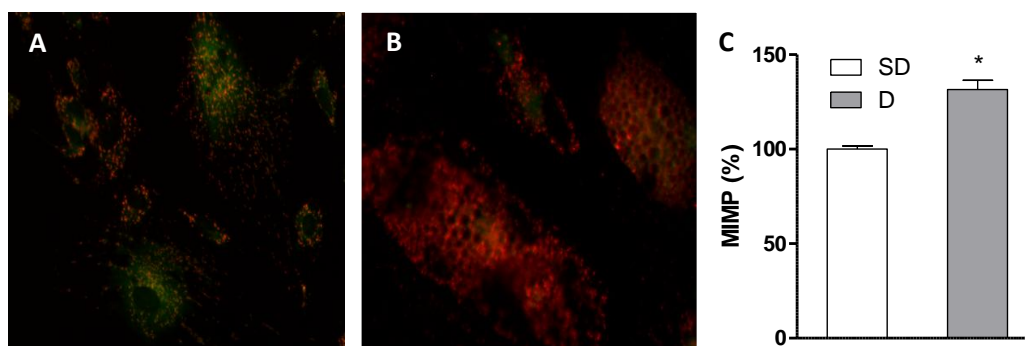


Figura III.23: Potencial de membrana interna mitocondrial. A) hASC sin diferenciar. Imagen de microscopía de fluorescencia en la que predomina el color verde, lo que indica un bajo potencial de membrana. B) hASC diferenciadas a adipocitos. Imagen de microscopía de fluorescencia en la que predomina el color naranja, indicador de un potencial de membrana más alto. C) Cuantificación mediante citometría de flujo. SD: $100 \pm 2,9$ (3); D: $131,6 \pm 8,3$ (3). *P = 0,0034. SD y D denotan hASC sin diferenciar y diferenciadas a adipocitos, respectivamente.

III.3.2.2. Consumo de oxígeno

Como medida indicativa del funcionamiento de la cadena de transporte de electrones (ETC) se llevó a cabo el estudio del consumo de oxígeno a partir de células intactas utilizando un oxígrafo de alta resolución (Oroboros). Tanto para las hASC sin diferenciar como para las diferenciadas a adipocitos, se determinó la respiración endógena o basal, la filtrante y la desacoplada o capacidad máxima respiratoria, adicionando oligomicina como inhibidor de la ATP sintasa y el desacoplante FCCP respectivamente. A todos los valores se les restó el obtenido al añadir KCN como inhibidor del CIV, descartando así el consumo de oxígeno no dependiente de la ETC.

Tal y como se aprecia en la figura III.24, el consumo de oxígeno endógeno, filtrante y desacoplado por célula, se incrementó significativamente con la diferenciación de las hASC (A).

Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas cuando estos valores se normalizaron por la cantidad de proteínas o por la actividad específica de la CS (B y C).

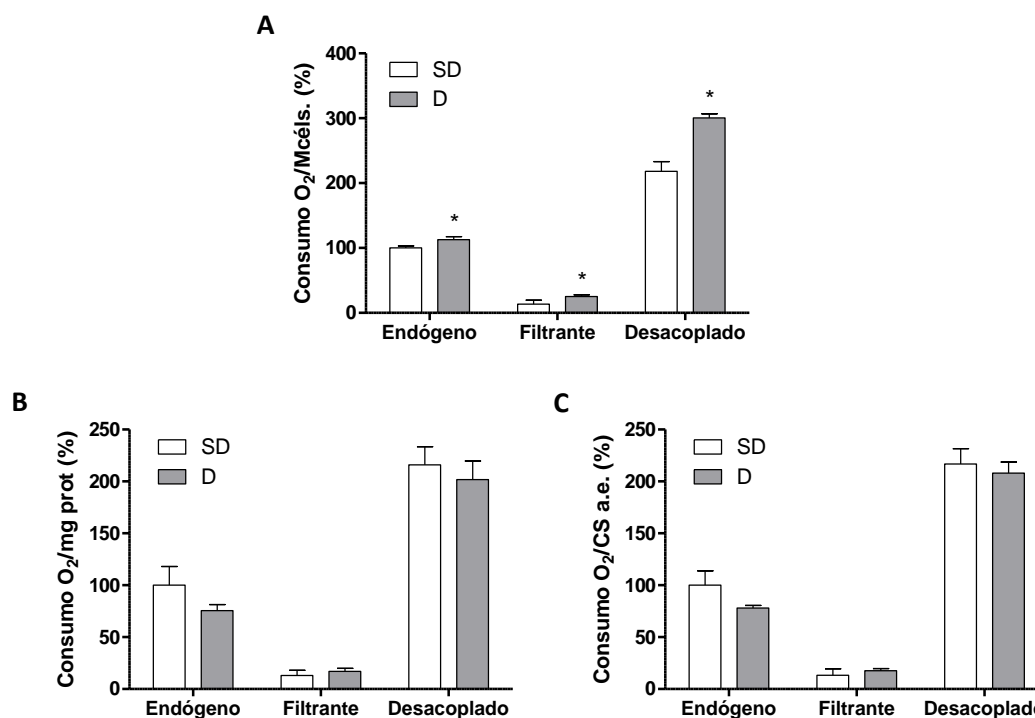


Figura III.24: Consumo de oxígeno. A) Consumo O₂ por célula. SD: Endógeno, 100 ± 3,1 (3); Filtrante, 13,4 ± 6,2 (3); Desacoplado, 218,0 ± 15,0 (3). D: Endógeno, 112,7 ± 4,8 (3); Filtrante, 25,3 ± 2,5 (3); Desacoplado, 300,6 ± 6,1 (3). *P ≤ 0,0361. B) Consumo O₂ por mg de proteína. SD: Endógeno, 100 ± 18,0 (3); Filtrante, 13,1 ± 5,0 (3); Desacoplado, 216,0 ± 17,4 (3). D: Endógeno, 75,6 ± 5,8 (3); Filtrante, 17,1 ± 2,8 (3); Desacoplado, 201,8 ± 17,9 (3). C) Consumo O₂ por actividad específica de la CS. SD: Endógeno, 100 ± 13,8 (3); Filtrante, 13,3 ± 6,1 (3); Desacoplado, 216,7 ± 14,9 (3). D: Endógeno, 77,9 ± 2,7 (3); Filtrante, 17,6 ± 2,2 (3); Desacoplado, 208,1 ± 10,5 (3). SD y D denotan hASC sin diferenciar y diferenciadas a adipocitos, respectivamente.

III.3.2.3. Actividades enzimáticas

Los resultados anteriores parecen sugerir un incremento en el número de mitocondrias paralelo a la diferenciación de las hASC a adipocitos. Para confirmarlo, se llevó a cabo la medida de las actividades específicas de la CS, del CII y del CIV, así como de la cantidad de CIV, referidas al número total de células. La CS es una enzima del ciclo de Krebs, situada en la matriz mitocondrial y codificada por el nDNA, por lo que se utiliza habitualmente como medida del contenido mitocondrial. Del mismo modo, la enzima succinato deshidrogenasa (SDH o CII) es el único complejo de la cadena respiratoria mitocondrial codificado exclusivamente por el nDNA, por lo que se usa también como marcador de la superficie de membrana interna mitocondrial. En cuanto a niveles de funcionalidad del sistema OXPPOS,

uno de las determinaciones más utilizadas es la de la actividad y cantidad de la citocromo c oxidasa o CIV.

Los resultados representados en la figura III.25A confirman una biogénesis mitocondrial durante la diferenciación, ya que todos los parámetros evaluados aumentan significativamente (a excepción del CII, que tiende a aumentar pero no alcanza la significación estadística). Además, los cambios en actividad y cantidad de CIV se anulan al normalizarlos por la actividad CS (B).

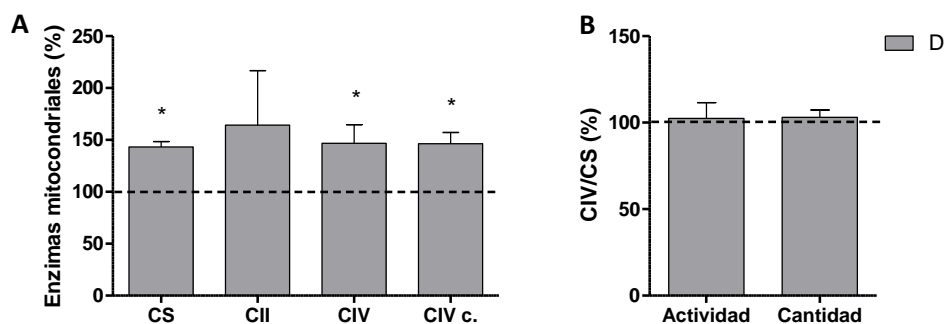


Figura III.25: Actividades específicas y cantidad de enzimas mitocondriales en las hASC diferenciadas a adipocitos. A) Enzimas mitocondriales (por millón de células). CS: $143,2 \pm 5,2$ (3); CII: $164,3 \pm 52,4$ (3); CIV: $146,9 \pm 17,8$ (3); cantidad (c.) CIV: $146,4 \pm 10,9$ (3). La línea discontinua representa los valores encontrados en las hASC sin diferenciar, que se han considerado el 100%. * $P \leq 0,0388$. B) CIV/CS. Actividad CIV/CS: $102,4 \pm 9,2$ (3); Cantidad CIV/CS: $103,1 \pm 4,2$ (3). D denota hASC diferenciadas a adipocitos.

III.3.2.4. Síntesis mitocondrial de proteínas

El efecto de biogénesis mitocondrial durante la diferenciación de las hASC a adipocitos podría deberse a una mayor tasa de síntesis mitocondrial de proteínas. Para evaluar este fenómeno, se cuantificaron los productos de traducción mitocondrial (MTP) *in vivo* mediante el método de la metionina marcada radiactivamente con ^{35}S (Chomyn 1996).

Concretamente, se cuantificaron las bandas correspondientes a las subunidades p.MT-CO1, p.MT-ND2 y p.MT-ND3, situadas en distintas zonas del gel y pertenecientes a complejos respiratorios diferentes. Todas ellas se normalizaron por la cuantificación densitométrica de una de las bandas del gel teñido con Azul de Coomassie, para descartar así cualquier error en la cantidad de proteína total cargada.

Sorprendentemente, la síntesis mitocondrial de proteínas en las células diferenciadas resultó ser menor que en las hASC sin diferenciar, aspecto que se muestra en la figura III.26.

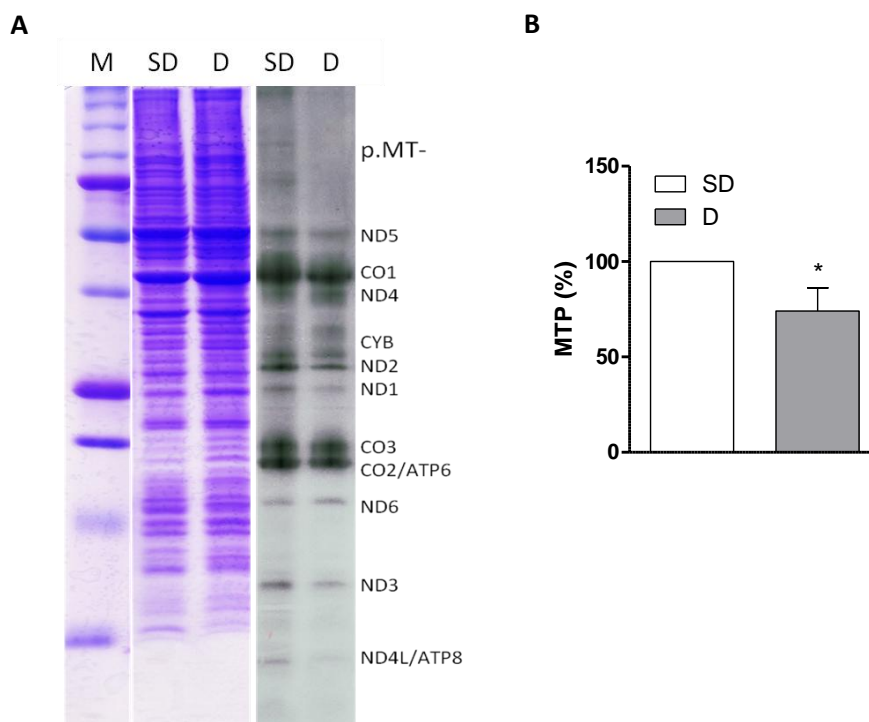


Figura III.26: Síntesis mitocondrial de proteínas. A) Imagen representativa del gel-autorradiografía que muestra los patrones electroforéticos de los productos de traducción mitocondrial (derecha) así como el control de carga (izquierda). M, SD y D indican marcador de pesos moleculares, hASC sin diferenciar y diferenciadas a adipocitos respectivamente. B) Cuantificación de los productos de traducción mitocondrial por densitometría. Se representa la media de las 3 bandas cuantificadas en 3 geles independientes. SD: 100 (3); D: $74,0 \pm 12,2$ (3). *P = 0,0210.

Este resultado podría ser explicado mediante la hipótesis de que las células indiferenciadas, activas en cuanto a la división celular, requieren una síntesis mitocondrial de proteínas continua, necesaria para producir las nuevas mitocondrias de las células hijas. Sin embargo, las células diferenciadas, no proliferantes, tan solo necesitarían reemplazar aquellas mitocondrias que hubiesen sido degradadas en las células ya existentes. Por lo tanto, la biogénesis mitocondrial observada probablemente se deba a un pico muy localizado en el tiempo, que parece no corresponderse con el momento post-diferenciación en el que se lleva a cabo el experimento de síntesis mitocondrial de proteínas.

III.3.2.5. Niveles de mtRNA y mtDNA

Para confirmar esta hipótesis, se determinaron los niveles de expresión de algunos mtRNA así como del número de copias de mtDNA por célula, ya que existen numerosas evidencias de que los niveles de mtDNA y mtRNA condicionan la cantidad de proteínas mitocondriales sintetizadas (Zhao, Young et al. 2005).

Mediante PCR cuantitativa se analizaron tres genes codificados en el mtDNA, como representantes de los RNAs correspondientes a las tres unidades de transcripción: *MT-RNR1* o 12S rRNA (hebra pesada 1, H1), *MT-CO1* (hebra pesada 2, H2) y *MT-ND6* (hebra ligera, L). En la figura III.27 que se representa a continuación puede verse que, de acuerdo con los niveles de

proteína sintetizada, la expresión de estos tres RNAs también disminuye con la diferenciación de las hASC a adipocitos.

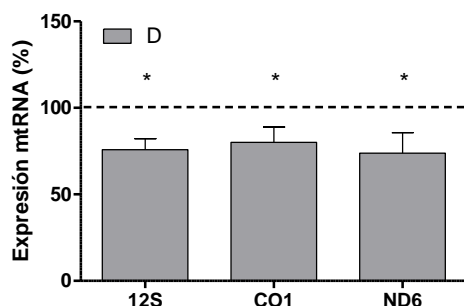


Figura III.27: Niveles de mtRNA. 12S: 75,8 ± 6,4 (4); CO1: 80,1 ± 8,8 (4); ND6: 73,8 ± 11,9 (4). La línea discontinua representa los valores obtenidos en las hASC sin diferenciar, que se han considerado el 100 %. *P ≤ 0,0104. D denota hASC diferenciadas a adipocitos.

Del mismo modo, se determinó el número de copias de mtDNA por PCR cuantitativa, viendo que, a pesar de la disminución en la traducción y transcripción mitocondrial, éste permanecía inalterado con la diferenciación de las hASC a adipocitos (figura III.28).

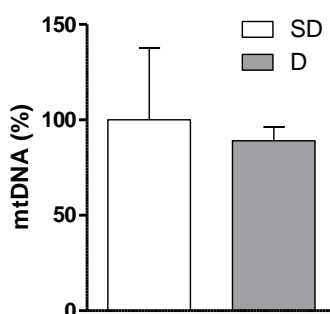


Figura III.28: Niveles de mtDNA. SD: 100 ± 37,7 (3); D: 89,1 ± 7,3 (3). SD y D denotan hASC sin diferenciar y diferenciadas a adipocitos, respectivamente.

III.3.2.6. Especies reactivas de oxígeno

Para cuantificar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), se midieron los niveles de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) por citometría de flujo mediante la sonda 2',7'-diclorofluoresceína-diacetato (DCFH-DA).

Como se muestra en la figura III.29, a pesar del incremento observado en el potencial de membrana interna mitocondrial durante la diferenciación, el H₂O₂ se encontró

significativamente reducido. Esto podría ser una consecuencia de un incremento en la expresión de enzimas antioxidantes (Higuchi, Dusing et al. 2013), hecho que queda demostrado mediante la amplificación por PCR cuantitativa de la superóxido dismutasa mitocondrial (SOD2), cuyos niveles se vieron aumentados en las hASC diferenciadas a adipocitos.

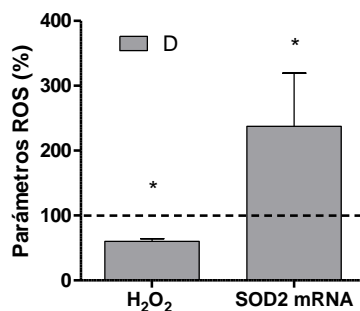


Figura III.29: Variables relacionadas con ROS. Cantidad de H₂O₂: 60,0 ± 4,0 (3), *P = 0,0353. Niveles de SOD2 mRNA: 237,4 ± 82,0 (3), *P = 0,0463. La línea discontinua representa los valores obtenidos en las hASC sin diferenciar, que se han considerado el 100 %. D denota hASC diferenciadas a adipocitos.

III.4. Efecto de xenobióticos en la diferenciación de las hASC a adipocitos

Una gran variedad de compuestos químicos utilizados en medicina, agricultura u otras actividades humanas afectan a la función del sistema de fosforilación oxidativa por lo que, dado lo anteriormente expuesto, también podrían alterar la adipogénesis.

III.4.1. Antibióticos comúnmente utilizados en el cultivo celular

Los antibióticos se introducen de forma frecuente en los medios de cultivo para reducir la frecuencia de contaminación microbiana, especialmente en el caso de los protocolos de diferenciación para los que, al requerir tiempos de cultivo muy largos, el riesgo se ve notablemente incrementado.

La mezcla de antibióticos más utilizada en el cultivo celular contiene 100 U/ml de penicilina, un β-lactámico inhibidor de la síntesis de la pared celular bacteriana, 100 μg/ml de estreptomina, un aminoglicósido inhibidor de la síntesis proteica bacteriana, y en algunos casos el antifúngico anfotericina B, un polieno-macrólido que desintegra las membranas lipídicas de los hongos (Piraino and Abel 1964, Ellison, Rigg et al. 1965).

Otro aminoglicósido, la gentamicina, también se usa habitualmente en protocolos de cultivo celular (Casemore 1967, Rudin, Healey et al. 1970). De hecho, la casa comercial *Life Technologies (ThermoFisher Scientific)* recomienda adicionar 5 μg/ml de gentamicina a sus

medios de diferenciación (adipogénica, osteogénica y condrogénica), todos ellos utilizados en esta tesis. No obstante, hay que recordar que, excepto para los experimentos correspondientes a este apartado, ningún antibiótico se ha añadido a los medios de diferenciación.

III.4.1.1. Marcadores de diferenciación

Para evaluar el efecto de estos antibióticos sobre la diferenciación de las hASC a adipocitos, se cuantificó la fluorescencia emitida por el colorante Nile Red, se midieron los niveles de leptina secretada y se determinó la cantidad de triglicéridos totales. Todos los experimentos se realizaron tras tres semanas de diferenciación, adicionando al medio de cultivo específico cada uno de los compuestos a estudiar.

Como se muestra en la figura III.30, la mezcla penicilina-estreptomicina-anfotericina (PEA), a las concentraciones utilizadas normalmente en el cultivo celular, aumentó significativamente la tinción con Nile Red. Sin embargo, el aumento al tratar las hASC con gentamicina (GEN) no resultó estadísticamente significativo.

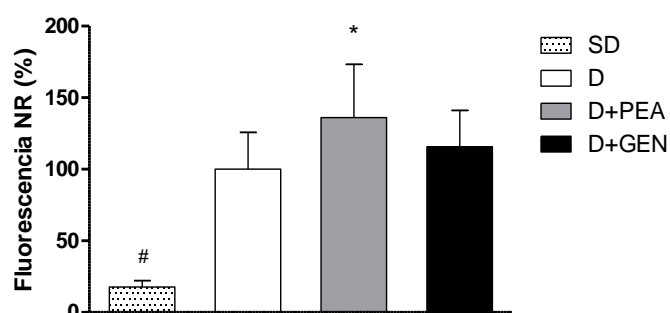


Figura III.30: Tinción con Nile Red (NR). Cuantificación de la intensidad de fluorescencia. Los valores medios para las hASC diferenciadas se han considerado el 100 %. SD: 17,7 ± 4,6 (9), #P < 0,0001 (vs. D); D: 100 ± 25,8 (12); D+PEA: 136,2 ± 37,1 (6), *P = 0,0274 (vs. D); D+GEN: 115,7 ± 25,3 (6). SD y D denotan hASC sin diferenciar y diferenciadas a adipocitos, respectivamente. D+PEA y D+GEN denotan hASC diferenciadas en presencia de penicilina/estreptomicina/anfotericina o gentamicina, respectivamente.

En cuanto a la secreción de leptina, la figura III.31 demuestra que la mezcla PEA incrementó en gran medida la concentración de esta adipoquina en el medio extracelular, al igual que lo hizo el tratamiento con GEN. Esta concentración de GEN (5 µg/ml) se encuentra dentro del rango de concentraciones encontradas en la sangre de pacientes tratados (0,9-11,4 µg/ml), por lo que este resultado podría conllevar consecuencias fisiológicas en dichos individuos.

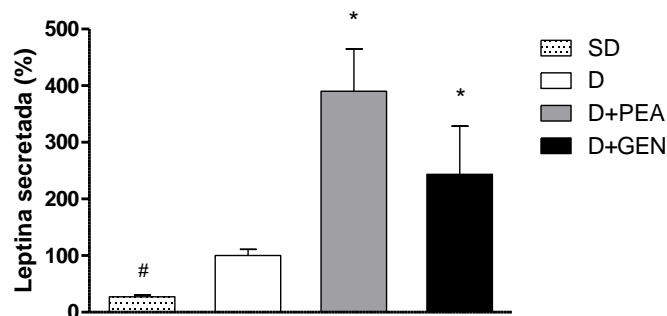


Figura III.31: Niveles de leptina secretada. Los valores medios para las hASC diferenciadas se han considerado el 100 %. SD: $27,5 \pm 3,1$ (3), $^{\#}P = 0,0004$ (vs. D); D: $100 \pm 11,0$ (3); D+PEA: $390,0 \pm 74,7$ (3), $^*P = 0,0027$ (vs. D); D+GEN: $243,6 \pm 85,0$ (3), $^*P = 0,0441$ (vs. D). SD y D denotan hASC sin diferenciar y diferenciadas a adipocitos, respectivamente. D+PEA y D+GEN denotan hASC diferenciadas en presencia de penicilina/estreptomocina/anfotericina o gentamicina, respectivamente.

Al contrario de lo que cabría esperar en relación a los dos resultados anteriores, no se observaron diferencias significativas en los niveles de triglicéridos totales al diferenciar las hASC en presencia de PEA ni de GEN (figura III.32).

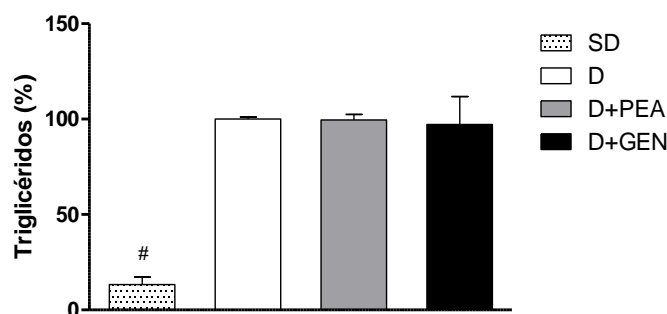


Figura III.32: Cantidad de triglicéridos. Los valores medios para las hASC diferenciadas se han considerado el 100 %. SD: $13,4 \pm 3,8$ (3), $^{\#}P < 0,0001$ (vs. D); D: $100 \pm 1,1$ (3); D+PEA: $99,5 \pm 2,9$ (3); D+GEN: $97,2 \pm 14,6$ (3). SD y D denotan hASC sin diferenciar y diferenciadas a adipocitos, respectivamente. D+PEA y D+GEN denotan hASC diferenciadas en presencia de penicilina/estreptomocina/anfotericina o gentamicina, respectivamente.

En relación a estos resultados contradictorios, existen algunos datos que indican que la tinción con Nile Red no siempre se corresponde con los ensayos cuantitativos de cantidad de triglicéridos. Esto podría ser debido, al menos parcialmente, a otros orgánulos de las hASC teñidos inespecíficamente, como ocurre en el caso de *Caenorhabditis elegans*, cuyos depósitos de grasa no suelen teñirse con Nile Red, sino que la tinción se encuentra exclusivamente en orgánulos relacionados con los lisosomas (O'Rourke, Soukas et al. 2009, Zhang, Trimble et al. 2010).

III.4.1.2. Enzimas mitocondriales

Aunque los aminoglicósidos se consideran específicos para el sitio A del ribosoma procarionta, la mayoría de ellos también se unen, aunque con menos afinidad, al sitio A del ribosoma eucariota citosólico. Teniendo esto en cuenta, su unión al sitio A del ribosoma eucariota mitocondrial, cuya secuencia es muy similar al bacteriano, podría inhibir la síntesis mitocondrial de proteínas y afectar negativamente a las células de mamífero (Pacheu-Grau, Gomez-Duran et al. 2010).

Para averiguar si se producía este efecto al diferenciar las hASC en presencia de PEA (que contiene el aminoglicósido estreptomicina) o GEN, se midió la actividad (A) y cantidad (B) del CIV, por ser un complejo con subunidades codificadas por el mtDNA y por tanto potencialmente más susceptibles a los aminoglicósidos. Sin embargo, tal y como representa la figura III.33, no se observaron diferencias significativas en estos parámetros.

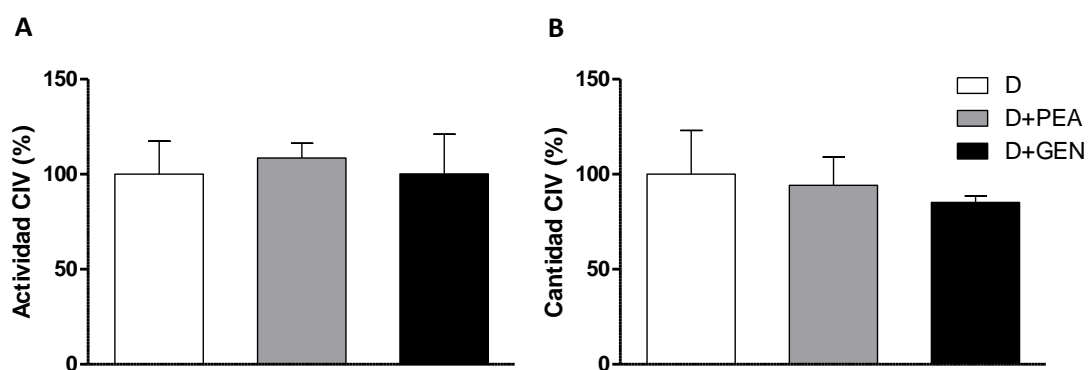


Figura III.33: Actividad y cantidad del complejo IV. A) Actividad específica CIV. D: $100 \pm 17,4$ (3); D+PEA: $108,5 \pm 7,8$ (3); D+GEN: $100,1 \pm 20,9$ (3). B) Cantidad CIV. D: 100 ± 23 (3); D+PEA: $94,2 \pm 14,8$ (3); D+GEN: $85,2 \pm 3,3$ (3). Los valores medios para las hASC diferenciadas se han considerado el 100 %. D denota diferenciadas a adipocitos. D+PEA y D+GEN denotan hASC diferenciadas en presencia de penicilina/estreptomicina/anfotericina o gentamicina, respectivamente.

A la vista de estos resultados, se pensó que quizás existiera un descenso relativo en la actividad y cantidad de CIV pero compensado de algún modo por una biogénesis mitocondrial general. Sin embargo, como se aprecia en la figura III.34, los antibióticos no afectaron a la actividad específica de la CS, enzima codificada en el nDNA y utilizada como marcador de biogénesis mitocondrial.

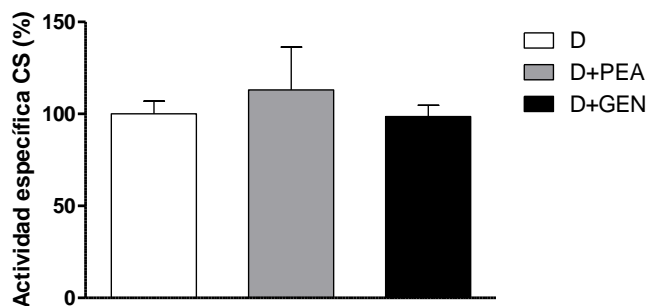


Figura III.34: Actividad específica de la enzima Citrato Sintasa. D: $100 \pm 6,9$ (3); D+PEA: $113,0 \pm 23,3$ (3); D+GEN: $98,5 \pm 6,2$ (3). Los valores medios para las hASC diferenciadas se han considerado el 100 %. D denota diferenciadas a adipocitos. D+PEA y D+GEN denotan hASC diferenciadas en presencia de penicilina/estreptomicina/anfotericina o gentamicina, respectivamente.

III.4.1.3. Especies reactivas de oxígeno

Uno de los factores responsables de la toxicidad de los aminoglicósidos podrían ser, según experimentos con animales, las especies reactivas de oxígeno (Walker, Barri et al. 1999, Bates 2003).

Por ello, se analizó la cantidad de ROS en hASC diferenciadas a adipocitos tanto en presencia como en ausencia de PEA y GEN. La figura III.35 muestra que ambos antibióticos producen un incremento significativo en la producción de H_2O_2 .

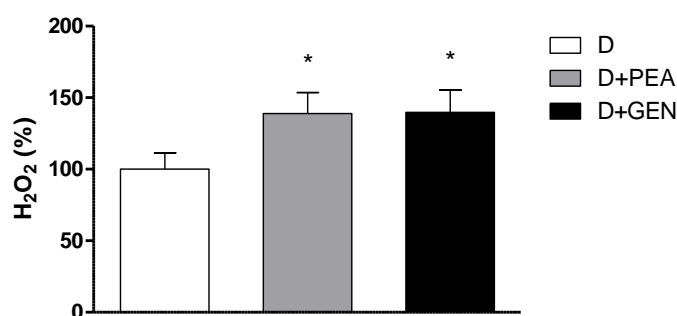


Figura III.35: Producción de peróxido de hidrógeno. D: $100 \pm 11,5$ (3); D+PEA: $138,9 \pm 14,7$ (3); D+GEN: $139,8 \pm 15,6$ (3). * $P \leq 0,0238$. D denota diferenciadas a adipocitos. D+PEA y D+GEN denotan hASC diferenciadas en presencia de penicilina/estreptomicina/anfotericina o gentamicina, respectivamente.

Ya que existen numerosas evidencias en la literatura de que las ROS podrían ser responsables del incremento de distintas variables relacionadas con la diferenciación adipogénica (Calzadilla, Sapochnik et al. 2011, Tormos, Anso et al. 2011), el siguiente paso fue diferenciar las hASC en presencia de los dos antibióticos y adicionando o no el antioxidante N-acetilcisteína (NAC).

La figura III.36 demuestra que el antioxidante hizo disminuir significativamente la tinción con Nile Red (A), así como la concentración de leptina secretada por los adipocitos (B). De hecho, los niveles de ambos parámetros cayeron incluso por debajo de los obtenidos en las células diferenciadas en ausencia de cualquier tratamiento, resultado que también fue estadísticamente significativo.

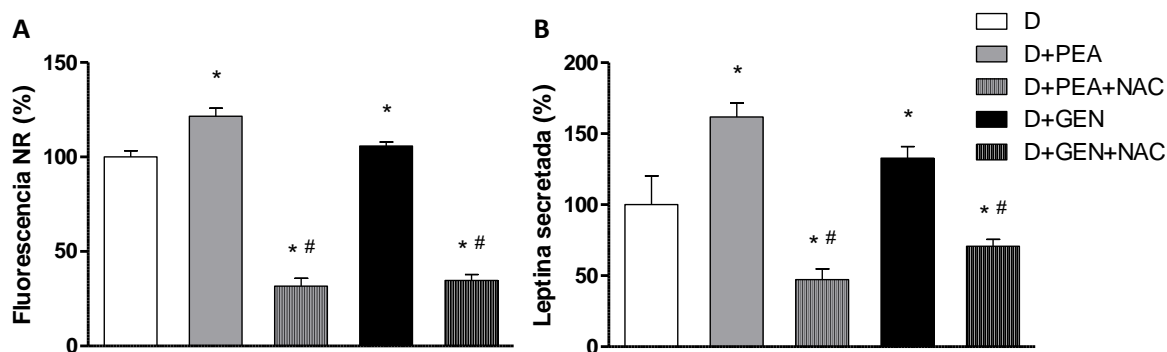


Figura III.36: Parámetros de diferenciación. A) Tinción con Nile Red (NR). Cuantificación de la intensidad de fluorescencia. D: $100 \pm 3,3$ (7); D+PEA: $121,5 \pm 4,3$ (4), *P < 0,0001; D+PEA+NAC: $31,7 \pm 4,1$ (4), *P < 0,0001, #P < 0,0001; D+GEN: $105,9 \pm 2,1$ (3), *P = 0,0235; D+GEN+NAC: $34,7 \pm 3,1$ (4), *P < 0,0001, #P < 0,0001. B) Niveles de leptina secretada. D: $100 \pm 7,2$ (8); D+PEA: $161,8 \pm 4,9$ (4), *P = 0,0002; D+PEA+NAC: $47,2 \pm 3,8$ (4), *P = 0,0006, #P < 0,0001; D+GEN: $132,7 \pm 4,1$ (4), *P = 0,0124; D+GEN+NAC: $70,8 \pm 2,8$ (3), *P = 0,0406, #P < 0,0001. Los valores medios para las hASC diferenciadas se han considerado el 100 %. * denota diferencias significativas versus D; # denota diferencias significativas versus células tratadas con el mismo antibiótico en ausencia de N-acetilcisteína (NAC). D denota diferenciadas a adipocitos. D+PEA y D+GEN denotan hASC diferenciadas en presencia de penicilina/estreptomicina/anfotericina o gentamicina, respectivamente.

III.4.2. Otros antibióticos

Continuando con el estudio de los antibióticos, se eligieron otros cuatro como representantes de alguna de las familias más comunes en cuanto a este tipo de fármacos.

La ceftriaxona (CEF) es una cefalosporina de tercera generación de amplio espectro, con un anillo β -lactámico en su estructura causante de la inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana. La concentración de CEF utilizada en esta tesis, $10 \mu\text{M}$, es la mínima del rango terapéutico, que se extiende de 10 a $1.000 \mu\text{M}$ (Brandebourger, Barre et al. 1986).

La eritromicina (ERI) es un antibiótico perteneciente a la familia de los macrólidos que se une al rRNA 23S de la subunidad 50S del ribosoma bacteriano y bloquea la salida de la cadena peptídica en construcción (Tok and Bi 2003). La concentración administrada fue de $2 \mu\text{g/ml}$, también en el extremo inferior del rango de concentraciones encontradas en el plasma de los pacientes (Carbon 1998, Luca, Lam et al. 2004).

La paromomicina (PAR) es otro aminoglicósido que actúa inhibiendo la síntesis de proteínas bacteriana al unirse al rRNA 16S de la subunidad 30S ribosomal. Se utilizó la concentración de 20 µg/ml, dentro de su rango terapéutico (Eastwood 1962).

Las tetraciclinas (TET) son antibióticos de amplio espectro que se unen también al rRNA 16S de la subunidad 30S del ribosoma bacteriano e impiden la unión del aminoacil tRNA correspondiente. La concentración de 40 µM se ha utilizado en estudios similares (Nadanaciva, Willis et al. 2009) y se encuentra próxima a la hallada en el suero durante una terapia convencional (Ingham, Turnbull et al. 1991).

III.4.2.1. Marcadores de diferenciación

Al tratar las hASC con estos antibióticos durante el transcurso de su diferenciación adipogénica, se observaron algunos cambios significativos que merecen ser resaltados. En primer lugar, el tratamiento con tetraciclina disminuyó la fluorescencia emitida por el colorante de gotas lipídicas Nile Red, tal y como puede observarse en la figura III.37.

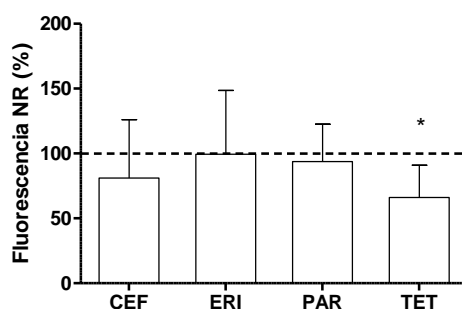


Figura III.37: Tinción con Nile Red (NR) de hASC diferenciadas en presencia de distintos antibióticos. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia. La línea discontinua representa los valores medios obtenidos en las hASC diferenciadas en ausencia de antibióticos, que se ha considerado el 100 %. Ceftriaxona (CEF): 81,0 ± 45,0 (6); eritromicina (ERI): 99,4 ± 49,2 (6); paromomicina (PAR): 93,7 ± 28,9 (6); tetraciclina (TET): 66,1 ± 24,8 (6), *P = 0,0171.

Por otro lado, la concentración de leptina secretada por los adipocitos resultó ser mayor en aquellas células tratadas con ceftriaxona (figura III.38).

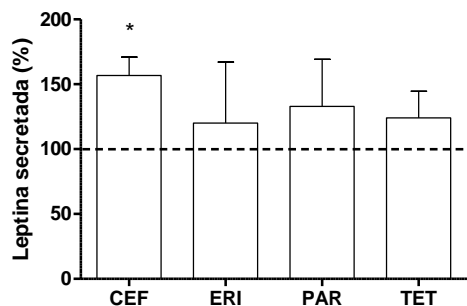


Figura III.38: Niveles de leptina secretada por hASC diferenciadas en presencia de distintos antibióticos. La línea discontinua representa los valores medios obtenidos en las hASC diferenciadas en ausencia de antibióticos, que se ha considerado el 100 %. Ceftriaxona (CEF): $156,8 \pm 14,1$ (3), *P = 0,0054; eritromicina (ERI): $120,2 \pm 47,0$ (3); paromomicina (PAR): $132,9 \pm 36,4$ (3); tetraciclina (TET): $124,0 \pm 20,5$ (3).

Por último, tras la cuantificación de los triglicéridos totales que se muestra en la figura III.39, se observó que la paromomicina incrementaba significativamente este parámetro respecto a los adipocitos sin tratar.

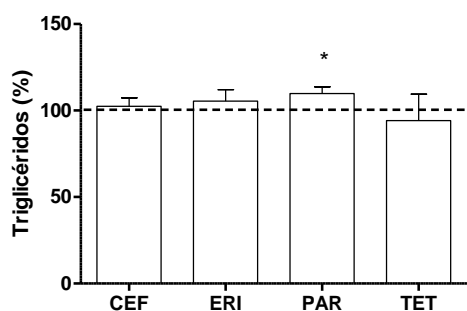


Figura III.39: Cantidad de triglicéridos en hASC diferenciadas en presencia de distintos antibióticos. La línea discontinua representa los valores medios obtenidos en las hASC diferenciadas en ausencia de antibióticos, que se ha considerado el 100 %. Ceftriaxona (CEF): $102,4 \pm 4,9$ (3); eritromicina (ERI): $105,4 \pm 6,7$ (3); paromomicina (PAR): $109,8 \pm 3,9$ (3), *P = 0,0144; tetraciclina (TET): $94,1 \pm 15,3$ (3).

III.4.2.2. Enzimas mitocondriales

Para ver si los antibióticos afectaban a la biogénesis mitocondrial, se analizó la actividad específica de la enzima citrato sintasa (figura III.40), si bien no se encontró ninguna diferencia significativa.

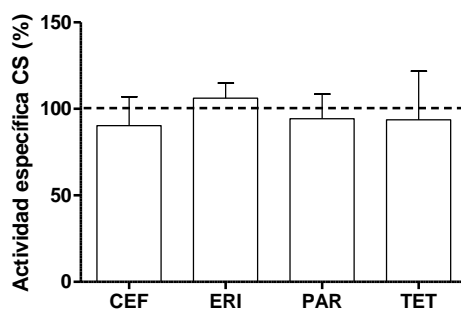


Figura III.40: Actividad específica de la enzima Citrato Sintasa en hASC diferenciadas en presencia de distintos antibióticos. La línea discontinua representa los valores medios obtenidos en las hASC diferenciadas en ausencia de antibióticos, que se han considerado el 100 %. Ceftriaxona (CEF): 90,3 ± 16,7 (3); eritromicina (ERI): 106,2 ± 8,8 (3); paromomicina (PAR): 94,3 ± 14,3 (3); tetraciclina (TET): 93,7 ± 28,1 (3).

En la figura III.41 se representan los valores de actividad y cantidad del complejo IV. Como puede observarse, la tetraciclina disminuyó significativamente la cantidad de CIV por mitocondria, aunque esto no se tradujo en una menor actividad enzimática.

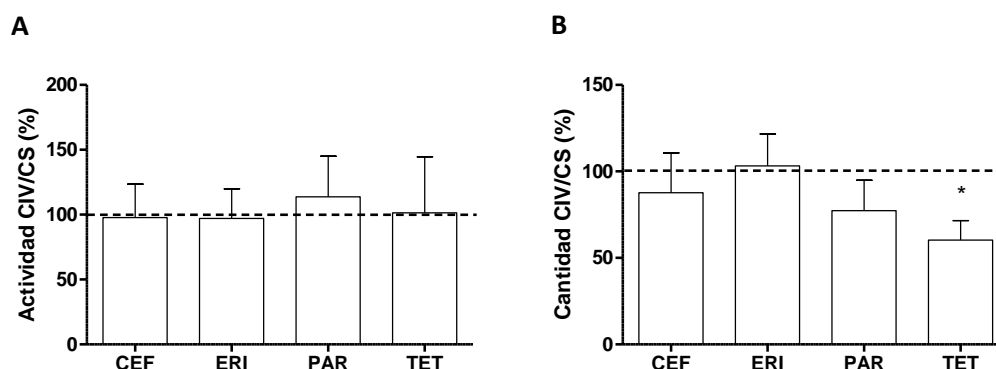


Figura III.41: Actividad y cantidad del complejo IV en hASC diferenciadas en presencia de distintos antibióticos.. La línea discontinua representa los valores medios obtenidos en las hASC diferenciadas en ausencia de antibióticos, que se han considerado el 100 %. A) Actividad del CIV referida a la actividad específica de la CS. Ceftriaxona (CEF): 97,7 ± 25,9 (3); eritromicina (ERI): 97,0 ± 22,9 (3); paromomicina (PAR): 113,8 ± 31,3 (3); tetraciclina (TET): 101,4 ± 43,2 (3). B) Cantidad de CIV referida a la actividad específica de la CS. CEF: 87,7 ± 23,0 (3); ERI: 103,2 ± 18,5 (3); PAR: 77,4 ± 17,6 (3); TET: 60,4 ± 11,2 (3), *P = 0,0456.

III.4.2.3. Especies reactivas de oxígeno

Por último se midió la cantidad de ROS producidas por las células tras su diferenciación en presencia de los antibióticos. Como se observa en la figura III.42, ninguno de ellos afectó a los niveles de peróxido de hidrógeno.

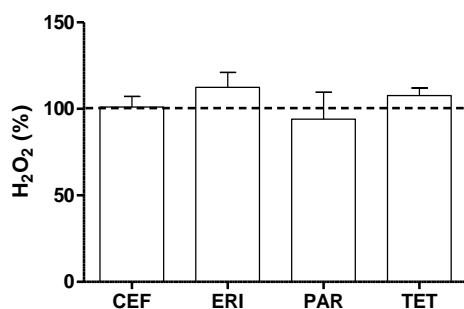


Figura III.42: Producción de peróxido de hidrógeno en hASC diferenciadas en presencia de distintos antibióticos. La línea discontinua representa los valores medios obtenidos en las hASC diferenciadas en ausencia de antibióticos, que se ha considerado el 100 %. Ceftriaxona (CEF): 101,1 ± 6,1 (3); eritromicina (ERI): 112,4 ± 8,7 (3); paromomicina (PAR): 94,1 ± 15,4 (3); tetraciclina (TET): 107,7 ± 4,4 (3).

III.4.3. Análogos de nucleósidos inhibidores de la transcriptasa inversa

Los NRTIs, además de sus efectos antirretrovirales contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), inhiben la polimerasa gamma del mtDNA y alteran la función mitocondrial, lo que puede provocar una interrupción de la diferenciación celular (Caron, Auclair et al. 2004, Stankov, Lucke et al. 2010).

Para esta tesis se han utilizado dos NRTIs, 3'-azido-3'-deoxitimidina (Zidovudine, AZT) y 2',3'-dideoxicitidina (Zalcitabine, ddC), a concentraciones cercanas a las máximas encontradas en plasma humano (Laskin, de Miranda et al. 1989, Gustavson, Fukuda et al. 1990), concretamente 6 μ M y 0,1 μ M respectivamente.

III.4.3.1. Marcadores de diferenciación

Como queda recogido en la figura III.43, AZT no afectó a ninguno de los marcadores de adipogénesis evaluados, ni a nivel intracelular (tinción con Nile Red y cuantificación de triglicéridos totales) ni de adipoquinas secretadas (leptina, adiponectina y FABP4).

Sin embargo, ddC sí que disminuyó significativamente la intensidad de fluorescencia del Nile Red, los triglicéridos y la leptina secretada.

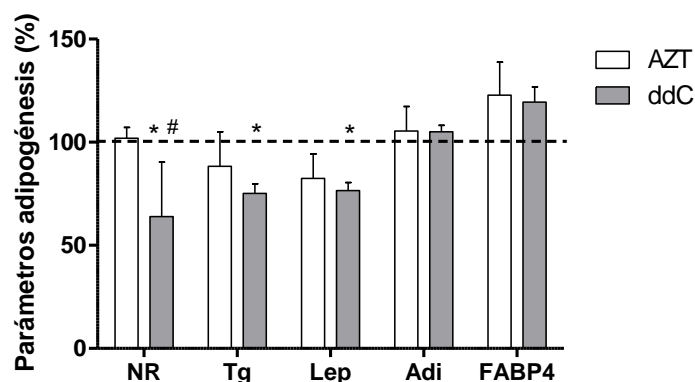


Figura III.43: Parámetros de diferenciación de las hASC a adipocitos en presencia de NRTIs. La línea discontinua representa los valores medios obtenidos en las hASC diferenciadas (D) en ausencia de NRTIs, que se han considerado el 100 %. NR) Intensidad de fluorescencia de la tinción con Nile Red. AZT: $102,0 \pm 5,2$ (6); ddC: $63,9 \pm 26,4$ (6). Tg) Cantidad de triglicéridos totales. AZT: $88,3 \pm 16,8$ (3); ddC: $75,2 \pm 4,6$ (3). Lep) Leptina secretada. AZT: $82,5 \pm 11,9$ (3); ddC: $73,6 \pm 3,9$ (3). Adi) Adiponectina secretada. AZT: $105,4 \pm 11,9$ (3); ddC: $105,0 \pm 3,1$ (3). FABP4) Proteína de unión a ácidos grasos 4 secretada. AZT: $122,8 \pm 16,0$; ddC: $119,5 \pm 7,3$. * $P \leq 0,0135$ (vs. hASC D no tratadas), # $P = 0,0234$ (vs. AZT). AZT y ddC denotan hASC diferenciadas en presencia de 3'-azido-3'-deoxitimidina o 2',3'-dideoxicitidina, respectivamente.

III.4.3.2. Especies reactivas de oxígeno

Como ya se ha demostrado en esta tesis, la diferenciación de las hASC lleva consigo una disminución en la producción de ROS (ver figura III.29). Por ello, se decidió comprobar si los efectos negativos del ddC sobre la adipogénesis ocasionaban también un incremento en los niveles de H_2O_2 .

Efectivamente, tal y como muestra la figura III.44, ddC aumentó la cantidad de ROS, mientras que AZT no tuvo ningún efecto.

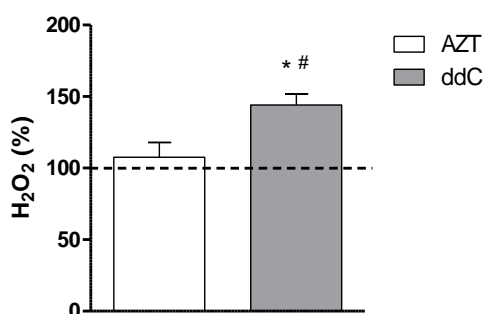


Figura III.44: Producción de H_2O_2 . La línea discontinua representa los valores medios obtenidos en las hASC diferenciadas en ausencia de NRTIs, que se han considerado el 100 %. AZT: $107,7 \pm 10,2$ (3); ddC: $144,1 \pm 7,7$ (3). * $P = 0,0052$ (vs. hASC D no tratadas), # $P = 0,0077$ (vs. AZT). AZT y ddC denotan hASC diferenciadas en presencia de 3'-azido-3'-deoxitimidina o 2',3'-dideoxicitidina, respectivamente.

III.4.3.3. Parámetros mitocondriales

La figura III.45 muestra los efectos de los dos NRTIs sobre algunos parámetros mitocondriales. En primer lugar, se vio que éstos no afectaban a la biogénesis mitocondrial en general, ya que no se observaron cambios en la actividad específica de la citrato sintasa.

Tal y como era de esperar al tratarse de inhibidores de la mtDNA polimerasa, los niveles de mtDNA se encontraron significativamente reducidos en ambos casos.

Finalmente, AZT causó un aumento tanto en la actividad como en la cantidad del complejo IV normalizado por CS, efecto que no produjo el ddC.

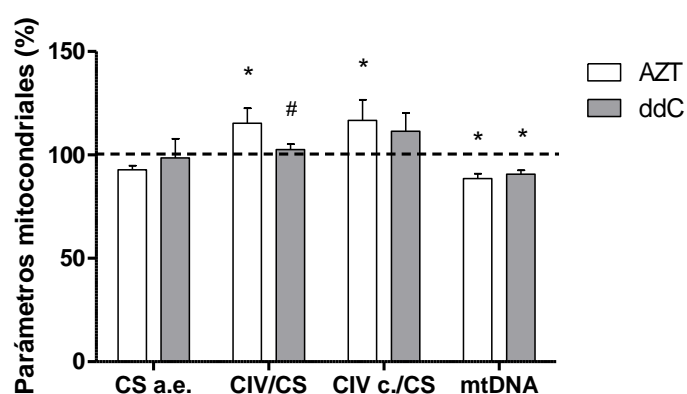


Figura III.45: Variables mitocondriales. La línea discontinua representa los valores medios obtenidos en las hASC diferenciadas (D) en ausencia de NRTIs, que se han considerado el 100 %. CS a.e.) Actividad específica de la CS. AZT: $92,8 \pm 2,0$ (3); ddC: $98,6 \pm 9,2$ (3). CIV/CS) Actividad específica del CIV normalizada por la actividad CS. AZT: $115,3 \pm 7,2$ (3); ddC: $102,5 \pm 2,7$ (3). CIV c./CS) Cantidad de CIV normalizada por la actividad CS. AZT: $116,7 \pm 10,0$ (3); ddC: $111,4 \pm 8,9$ (3). mtDNA) Niveles de mtDNA. AZT: $88,6 \pm 2,4$ (3); ddC: $90,7 \pm 1,9$ (3). * $P \leq 0,0469$ (vs. hASC D no tratadas), # $P = 0,0452$ (vs. AZT). AZT y ddC denotan hASC diferenciadas en presencia de 3'-azido-3'-deoxitimidina o 2',3'-dideoxicitidina, respectivamente.

III.4.3.4. Efecto del tratamiento con ddC previo a la diferenciación

Como se ha visto, el tratamiento con ddC durante la diferenciación provoca la reducción de algunos marcadores de adipogénesis pero no altera las enzimas mitocondriales. Para tratar de conocer en mayor medida el efecto del ddC sobre las hASC, se diseñó un experimento en el cual las células se trataron durante 10 días con ddC $0,1 \mu\text{M}$ y posteriormente se indujo su diferenciación, esta vez en ausencia de la droga.

Así, se vio que este tratamiento previo no causaba ningún efecto sobre los parámetros de diferenciación evaluados al compararlos con los obtenidos para las células no tratadas (figura III.46).

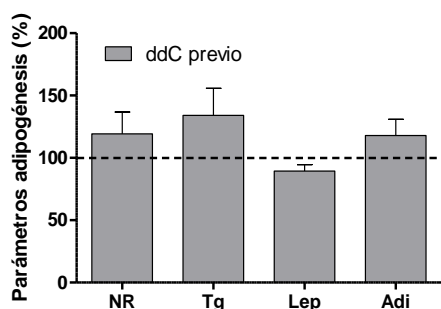


Figura III.46: Variables de adipogénesis tras 10 días de tratamiento con ddC y posterior diferenciación. Nile Red (NR): $119,3 \pm 17,4$ (3); triglicéridos (Tg): $134,1 \pm 21,7$ (3); leptina (Lep): $89,4 \pm 5,2$ (3); adiponectina (Adi): $117,8 \pm 13,1$ (3). La línea discontinua representa los valores medios obtenidos en las hASC no tratadas, que se han considerado el 100 %. ddC denota 2',3'-dideoxicitidina.

Sin embargo, en cuanto a los enzimas mitocondriales, la actividad específica de la CS se vio significativamente disminuida, al mismo tiempo que aumentaron la actividad y cantidad de CIV normalizadas por la CS (figura III.47).

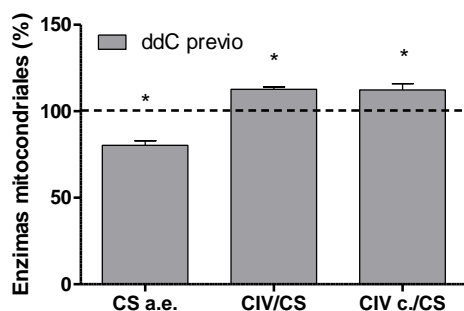


Figura III.47: Variables mitocondriales tras 10 días de tratamiento con ddC y posterior diferenciación. Actividad específica (a.e.) CS: $80,4 \pm 2,6$ (3); CIV/CS: $112,7 \pm 1,4$ (3); cantidad (c.) CIV/CS: $112,3 \pm 3,6$ (3). La línea discontinua representa los valores medios obtenidos en las hASC no tratadas, que se han considerado el 100 %. * $P \leq 0,0480$. ddC denota 2',3'-dideoxicitidina.

III.4.4. Antibióticos ribosomales inhibidores del centro peptidil transferasa

Como ya se ha dicho, debido al origen bacteriano de la mitocondria, algunos antibióticos inhibidores de la síntesis proteica bacteriana pueden inhibir también la síntesis mitocondrial de proteínas. En esta tesis se han utilizado dos de estos antibióticos: cloranfenicol (CLOR) a una concentración de $2,5 \mu\text{M}$, por debajo del límite inferior de su rango terapéutico (Balbi 2004), y linezolid (LIN) a $30 \mu\text{M}$, una concentración también menor a la más alta encontrada en suero (Dryden 2011).

III.4.4.1. Marcadores de diferenciación

Tanto CLOR como LIN, aplicados al medio de diferenciación durante las 3 semanas de protocolo, provocaron una disminución en la cantidad de triglicéridos totales y de leptina secretada al medio extracelular. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la tinción con Nile Red ni tampoco en los niveles de adiponectina y FABP4. Todo ello queda recogido en la figura III.48.

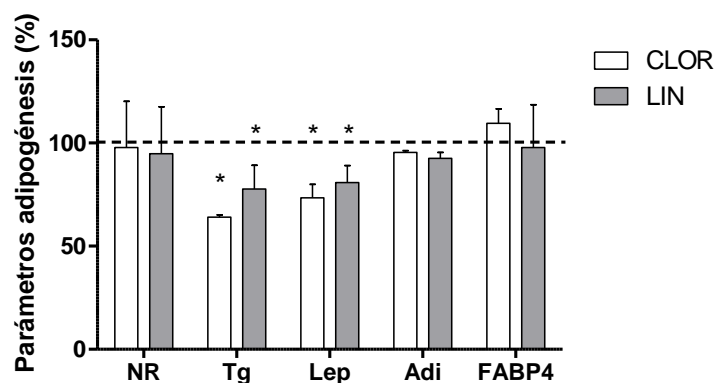


Figura III.48: Parámetros de diferenciación de las hASC a adipocitos en presencia de antibióticos ribosomales. La línea discontinua representa los valores medios obtenidos en las hASC diferenciadas (D) en ausencia de antibióticos, que se han considerado el 100 %. NR) Intensidad de fluorescencia de la tinción con Nile Red. CLOR: $97,8 \pm 22,3$ (6); LIN: $94,8 \pm 22,8$ (6). Tg) Cantidad de triglicéridos totales. CLOR: $64,1 \pm 1,1$ (3); LIN: $77,6 \pm 11,5$ (3). Lep) Leptina secretada. CLOR: $73,5 \pm 6,5$ (3); LIN: $80,8 \pm 8,3$ (3). Adi) Adiponectina secretada. CLOR: $95,4 \pm 0,9$ (3); LIN: $92,5 \pm 2,9$ (3). FABP4) Proteína de unión a ácidos grasos 4 secretada. CLOR: $109,5 \pm 7,0$ (3); LIN: $97,9 \pm 20,7$ (3). * $P \leq 0,0008$ (vs. hASC D no tratadas). CLOR y LIN denotan hASC diferenciadas en presencia de cloranfenicol y linezolid, respectivamente.

III.4.4.2. Especies reactivas de oxígeno

Como se observa en la figura III.49, CLOR aumentó la producción de ROS en las hASC diferenciadas a adipocitos, efecto que ya había sido observado en otras ocasiones (Paez, Becerra et al. 2008). Sin embargo, LIN no alteró significativamente estos niveles, ni siquiera cuando se elevó su concentración a 60 μM .

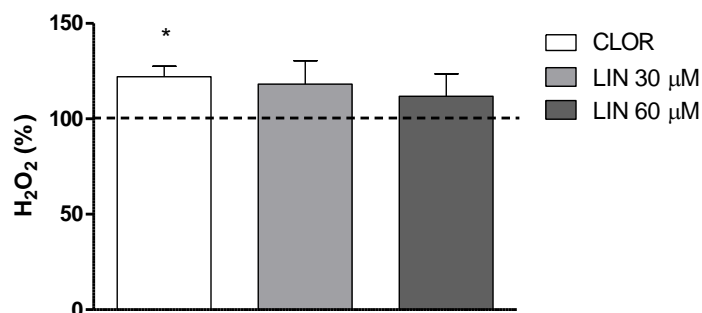


Figura III.49: Producción de H₂O₂. La línea discontinua representa los valores medios obtenidos en las hASC diferenciadas (D) en ausencia de antibióticos, que se han considerado el 100 %. CLOR: 122,1 ± 5,5 (3); LIN 30 μM: 118,2 ± 12,3 (3); LIN 60 μM: 111,9 ± 11,7 (3). *P = 0,0396 (vs. hASC D no tratadas). CLOR y LIN denotan hASC diferenciadas en presencia de cloranfenicol y linezolid, respectivamente.

III.4.4.3. Parámetros mitocondriales

Analizando los enzimas mitocondriales representados en la figura III.50, CLOR disminuyó significativamente la actividad específica de la citrato sintasa, efecto que no produjo LIN. Sorprendentemente, ambos antibióticos alteraron de forma opuesta la actividad y cantidad de complejo IV normalizado por la CS, CLOR positiva y LIN negativamente. Sin embargo, los niveles de mtDNA permanecieron inalterados tras el tratamiento con ambos antibióticos.

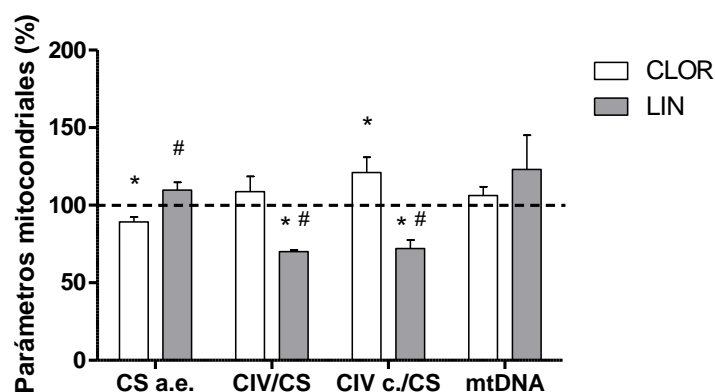


Figura III.50: Variables mitocondriales. La línea discontinua representa los valores medios obtenidos en las hASC diferenciadas (D) en ausencia de antibióticos, que se han considerado el 100 %. CS a.e.) Actividad específica de la CS. CLOR: 89,2 ± 3,1 (3); LIN: 109,7 ± 5,1 (3). CIV/CS) Actividad específica del CIV normalizada por la actividad CS. CLOR: 108,7 ± 9,9 (3); LIN: 70,1 ± 0,9 (3). CIV c./CS) Cantidad de CIV normalizada por la actividad CS. CLOR: 121,0 ± 9,9 (3); LIN: 72,0 ± 5,6 (3). mtDNA) Niveles de mtDNA. CLOR: 106,2 ± 5,7 (3); LIN: 123,0 ± 22,1 (3). *P ≤ 0,0273 (vs. hASC D no tratadas), #P ≤ 0,004 (vs. CLOR). CLOR y LIN denotan hASC diferenciadas en presencia de cloranfenicol y linezolid, respectivamente.

Como el linezolid, antibiótico de la familia de las oxazolidinonas, ya había demostrado ser un potente inhibidor de la traducción mitocondrial en numerosos tejidos de mamíferos (McKee, Ferguson et al. 2006), se comprobó que la disminución en cantidad de CIV observada se correspondía con una caída general en la síntesis mitocondrial de proteínas. Esta hipótesis fue confirmada tal y como muestran los resultados de la figura III.51.

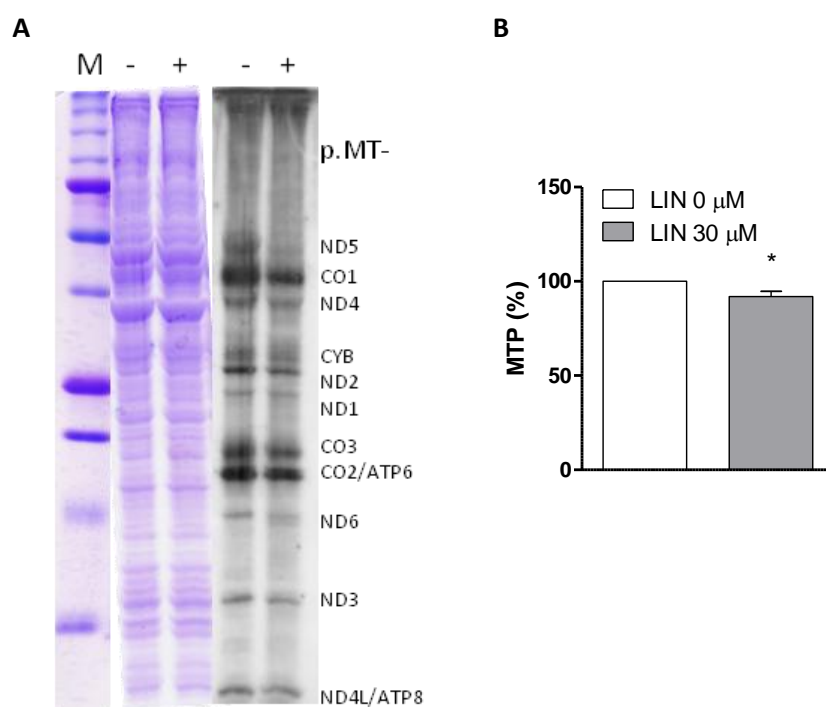


Figura III.51: Síntesis mitocondrial de proteínas en presencia de linezolid (LIN). A) Imagen representativa del gel-autorradiografía que muestra los patrones electroforéticos de los productos de traducción mitocondrial (derecha) así como el control de carga (izquierda). M, - y + indican marcador de pesos moleculares, hASC en ausencia y presencia de linezolid 30 μM respectivamente. B) Cuantificación de los productos de traducción mitocondrial (MTP) por densitometría. Se representa la media de las 3 bandas cuantificadas en 3 geles independientes. LIN 0 μM: 100 (3); LIN 30 μM: 91,9 ± 2,8 (3). *P = 0,0071.

El estudio del efecto del linezolid sobre la traducción mitocondrial en las hASC se completó con dos técnicas más de análisis de proteínas. En primer lugar, tal y como muestra la figura III.52, se llevó a cabo un Western blot a partir del aislado de mitocondrias de hASC no tratadas y tratadas con dos concentraciones de linezolid (30 y 90 μM) durante una semana.

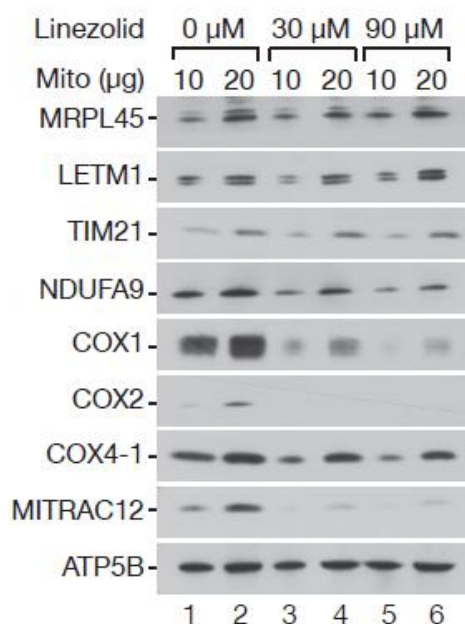


Figura III.52: Inmunodetección de proteínas mitocondriales por Western blot en hASC tratadas con linezolid. Para cada concentración de linezolid (0, 30 y 90 μM) se cargaron 10 y 20 μg de proteína mitocondrial (Mito). El tratamiento se prolongó durante una semana. Las proteínas detectadas son: proteína ribosomal mitocondrial L45 (MRPL45), proteína transmembrana con cremallera de leucina-mano-EF (LETM1), subunidad 21 de la translocasa de importe de la membrana interna mitocondrial (TIM21), subunidad 9 del subcomplejo 1α de la NADH deshidrogenasa (ubiquinona) (NDUFA9), citocromo c oxidasa 1 (COX1), citocromo c oxidasa 2 (COX2), isoforma 1 de la citocromo c oxidasa 4 (COX4-1), intermediario de ensamblaje de la citocromo c oxidasa de regulación de la traducción mitocondrial (MITRAC12), subunidad β de la ATP sintasa (ATP5B).

Como puede observarse, las proteínas que ven reducida su producción tras el tratamiento con linezolid son: NDUFA9 (complejo I); COX1, COX2, COX4-1 (complejo IV) y MITRAC12 (ensamblaje del complejo IV). Asimismo, las proteínas que no varían por acción del linezolid son: MRPL45 (ribosoma mitocondrial), LETM1 (membrana interna mitocondrial, transporte de Ca^{2+}), TIM21 (membrana interna mitocondrial, translocasa) y ATP5B (complejo V).

Por otro lado, para estudiar la abundancia y composición de los complejos OXPHOS en las hASC sin tratar y tratadas con linezolid (90 μM) durante una semana, se realizó una electroforesis en geles nativos (Blue Native) seguida de un análisis en segunda dimensión que queda reflejado en la figura III.53.

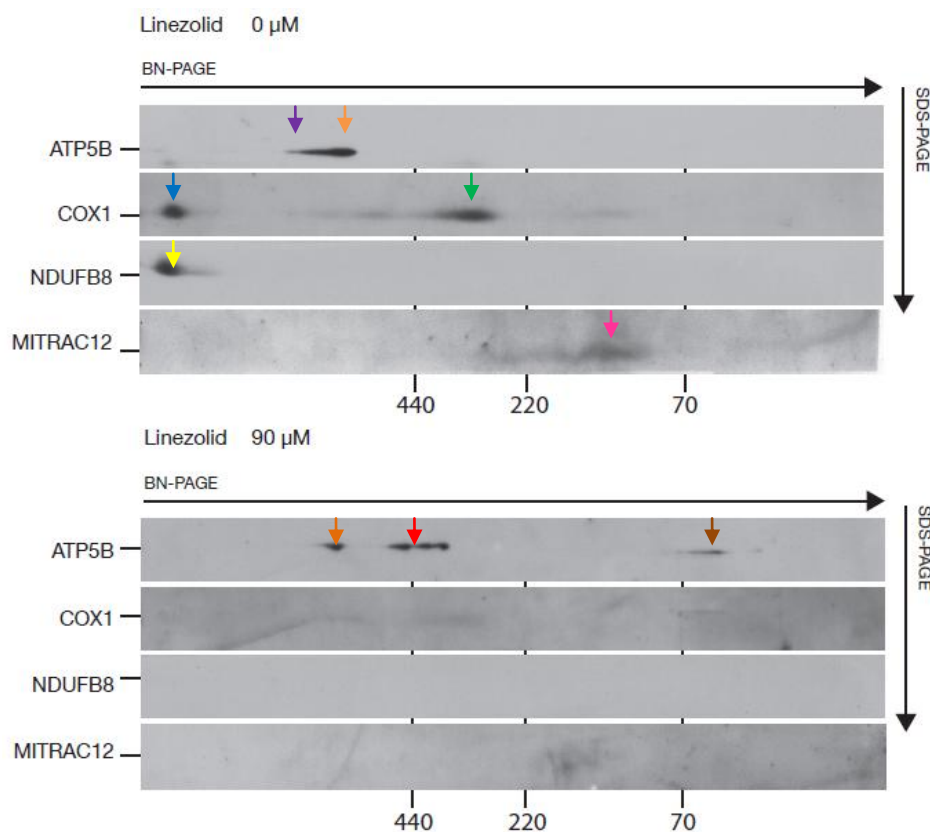


Figura III.53: Inmunodetección de complejos OXPHOS por Blue Native-2D en hASC tratadas con linezolid. Para cada concentración de linezolid (0 y 90 μM) se cargaron 100 μg de proteína mitocondrial. El tratamiento se prolongó durante una semana. 440, 220 y 70 representan los pesos moleculares (en kDa) aproximados.

De forma similar a los resultados obtenidos por Western blot, puede apreciarse que el linezolid provoca la desaparición prácticamente total del CIV, tanto en su forma individual (flecha verde) como formando supercomplejos (flecha azul). Lo mismo ocurre con el CI, que se encuentra mayoritariamente en forma de supercomplejos (flecha amarilla) y desaparece tras el tratamiento con linezolid. En relación al CV, en las hASC sin tratar aparece tanto en forma individual (flecha naranja) como ensamblado consigo mismo (flecha morada), mientras que, llamativamente, tras el tratamiento con linezolid solo se encuentra una pequeña parte como complejo individual y la mayor parte formando subcomplejos (flecha roja), pudiéndose apreciar también la subunidad ATP5B aislada (flecha marrón).

En este último experimento también se observa una menor cantidad de MITRAC12 en las células tratadas con linezolid (flecha rosa). Los llamados complejos MITRAC consisten en distintos intermedios de ensamblaje del CIV, formados por la subunidad COX1 y otras proteínas codificadas en el núcleo (Mick, Dennerlein et al. 2012). Así, lo que puede ocurrir en presencia de linezolid es que, al no estar sintetizándose COX1 durante un periodo prolongado de tiempo, el intermedio de ensamblaje se desestabilice y MITRAC se degrade. No obstante, se ha publicado que el tratamiento con tianfenicol, antibiótico de acción similar a la del linezolid,

no afecta a los niveles de MITRAC (Mick, Dennerlein et al. 2012), aunque esto puede deberse a que el tiempo de exposición en ese caso es más corto (48 horas frente a una semana).

III.4.4.4. Efecto del tratamiento con linezolid previo a la diferenciación

Al igual que se hizo con el ddC, se quiso comprobar si los cambios producidos por el linezolid, tanto a nivel de diferenciación como de función mitocondrial, se mantenían una vez retirada la droga del medio de cultivo. Es decir, las hASC se trataron con LIN 30 μ M durante 10 días y posteriormente se llevó a cabo su diferenciación adipogénica en ausencia del antibiótico.

Como se aprecia en la figura III.54, tanto la tinción de gotas lipídicas con Nile Red como la concentración de leptina secretada resultaron, llamativamente, disminuidas de un modo significativo, lo que induce a pensar que el efecto tóxico del linezolid en cuanto a la diferenciación celular se mantiene incluso al llevar a cabo el protocolo de diferenciación una vez eliminada la droga.

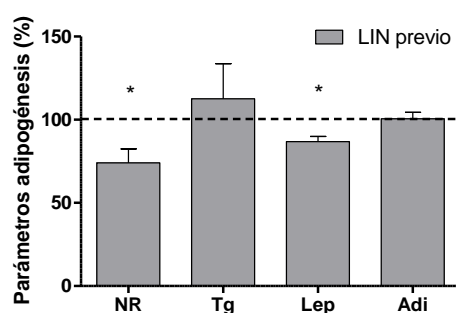


Figura III.54: Variables de adipogénesis tras 10 días de tratamiento con linezolid (LIN) y posterior diferenciación. Nile Red (NR): 74,1 ± 8,3 (4); triglicéridos (Tg): 112,6 ± 21,1 (3); leptina (Lep): 86,9 ± 3,1 (3); adiponectina (Adi): 100,6 ± 3,8 (3). La línea discontinua representa los valores medios obtenidos en las hASC no tratadas, que se han considerado el 100 %. *P ≤ 0,0367.

Sin embargo, la función mitocondrial se restableció completamente, como muestran los resultados de la figura III.55.

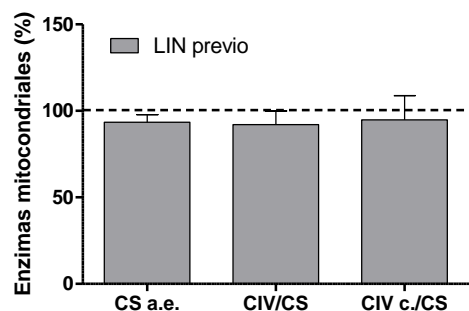


Figura III.55: Variables mitocondriales tras 10 días de tratamiento con linezolid (LIN) y posterior diferenciación. Actividad específica (a.e.) CS: $93,4 \pm 4,4$ (3); CIV/CS: $92,1 \pm 7,8$ (3); cantidad (c.) CIV/CS: $94,9 \pm 13,9$ (3). La línea discontinua representa los valores medios obtenidos en las hASC no tratadas, que se han considerado el 100 %.

Para intentar explicar este efecto duradero del linezolid incluso una vez retirado del medio de cultivo, se midió el estado de metilación global del genoma de las hASC cultivadas durante una semana en presencia del antibiótico, obteniéndose los resultados que se muestran en la figura III.56.

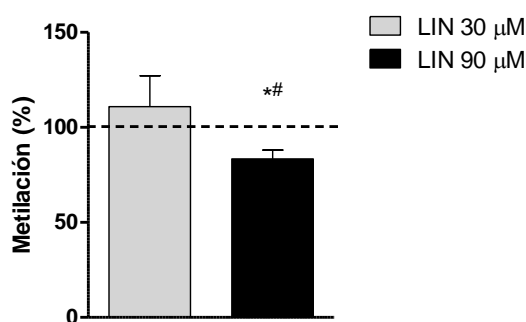


Figura III.56: Estado de metilación general de las hASC sin diferenciar en presencia de linezolid (LIN) 30 y 90 μM durante una semana. La línea discontinua representa la media de los valores obtenidos en las hASC en ausencia de linezolid, que se ha considerado el 100 %. LIN 30 μM: $110,9 \pm 16,3$ (3); LIN 90 μM: $83,4 \pm 4,6$ (3), *P = 0,0194 (vs. LIN 0 μM), #P = 0,048 (vs. LIN 30 μM).

Como queda demostrado, el tratamiento con linezolid produce en las hASC ciertas modificaciones epigenéticas que podrían ser la causa de la alterada diferenciación adipogénica que se observa a posteriori.

III.4.4.5. Efecto del tratamiento con linezolid en hASC procedentes de distintos donantes

Para descartar un posible efecto del linezolid específico para la línea hASC utilizada (hASC-1), se analizó en paralelo la influencia de dos concentraciones de LIN (30 y 60 μM) sobre otras hASC procedentes de un donante distinto (hASC-2). Recordar que ambas líneas difieren en cuanto a su haplogrupo mitocondrial, perteneciendo a los grupos T y H respectivamente (ver tabla 2).

A la concentración de LIN 30 μM , los efectos sobre las hASC-2 fueron muy similares a los observados en las hASC-1, a excepción de la actividad específica de la citrato sintasa, que se encontró significativamente incrementada.

Con LIN 60 μM , las diferencias entre ambas líneas fueron más pronunciadas: tanto los ratios CIV/CS como los niveles de leptina secretada fueron significativamente más bajos en las dos líneas, pero además, para el caso de la actividad de CIV normalizada por CS y para el de la leptina secretada, se encontraron también diferencias significativas entre las hASC-1 y las hASC-2, siendo menores para esta última línea.

Todos estos datos se recogen en la figura III.57, lo que sugiere que los polimorfismos genéticos pueden modificar la susceptibilidad de las hASC frente a los antibióticos que se unen al ribosoma mitocondrial.

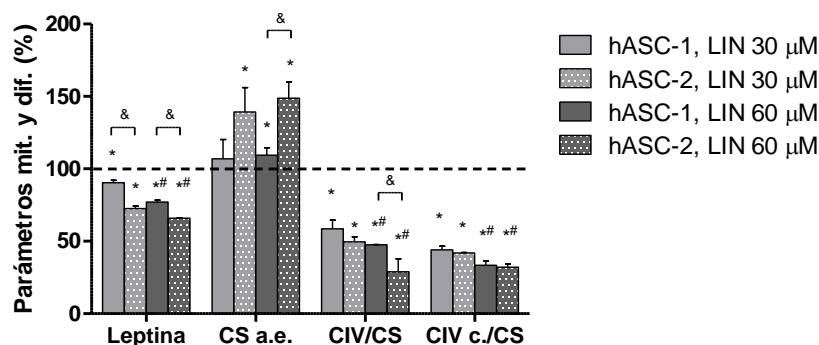


Figura III.57: Parámetros mitocondriales y de diferenciación en las líneas hASC-1 y hASC-2 diferenciadas en presencia de linezolid (LIN). Leptina) hASC-1, LIN 30 μM : 90,4 ± 1,7 (3); hASC-2, LIN 30 μM : 72,5 ± 1,8 (3); hASC-1, LIN 60 μM : 77,0 ± 1,4 (3); hASC-2, LIN 60 μM : 65,9 ± 0,1 (3). Actividad específica (a.e.) CS hASC-1, LIN 30 μM : 107,0 ± 13,2 (3); hASC-2, LIN 30 μM : 139,3 ± 16,7 (3); hASC-1, LIN 60 μM : 109,4 ± 5,2 (3); hASC-2, LIN 60 μM : 148,7 ± 11,3 (3). CIV/CS hASC-1, LIN 30 μM : 58,6 ± 6,0 (3); hASC-2, LIN 30 μM : 49,6 ± 3,5 (3); hASC-1, LIN 60 μM : 47,6 ± 0,2 (3); hASC-2, LIN 60 μM : 29,0 ± 9,0 (3). Cantidad (c.) CIV/CS hASC-1, LIN 30 μM : 44,0 ± 2,6 (3); hASC-2, LIN 30 μM : 42,0 ± 0,4 (3); hASC-1, LIN 60 μM : 33,4 ± 3,0 (3); hASC-2, LIN 60 μM : 32,1 ± 2,2 (3). La línea discontinua representa los valores medios obtenidos en las hASC no tratadas, que se han considerado el 100 %. *P ≤ 0,0366 (vs. hASC diferenciadas no tratadas); #P ≤ 0,0329 (vs. LIN 30 μM); &P ≤ 0,0225 (vs. hASC-1).

Posteriormente, el experimento de diferenciación en presencia de LIN 30 μM se extendió al análisis de 13 líneas hASC procedentes de 13 donantes diferentes, obtenidas a partir de tejido adiposo de distintos pacientes. Los parámetros de diferenciación medidos se representan en la figura III.58.

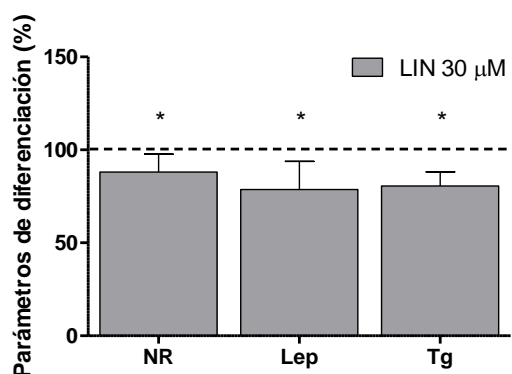


Figura III.58: Parámetros de diferenciación adipogénica en presencia de linezolid (LIN) 30 μM en hASC procedentes de 13 donantes distintos. Todas las hASC sin tratar se han considerado el 100 % y se representan mediante la línea discontinua. NR) Tinción con Nile Red: $88,0 \pm 9,6$ (13). Lep) Cantidad de leptina secretada: $78,6 \pm 15,2$ (13). Tg) Cantidad de triglicéridos totales: $80,6 \pm 7,6$ (13). * $P \leq 0,0002$.

Este resultado confirma de forma indudable el efecto del linezolid sobre la diferenciación adipogénica de las hASC.

Por otra parte, previamente se había demostrado que el tratamiento con linezolid en cíbridos de osteosarcoma 143B con el alelo m.3010A en su mtDNA causa una mayor disminución en la síntesis mitocondrial de proteínas y en el ratio CIV/CS (Pacheu-Grau, Gomez-Duran et al. 2013). Este nucleótido se localiza en el rRNA 16S, posición en la que se une el linezolid.

Por ello, se quiso saber si la presencia de este polimorfismo podía amplificar de algún modo el efecto del linezolid sobre la diferenciación de las hASC. Así, en la figura III.59 se presentan los datos de las 13 hASC clasificadas en función de que presenten el alelo m.3010A (perteneciendo al haplogrupo H1) o el m.3010G (haplogrupo no H1).

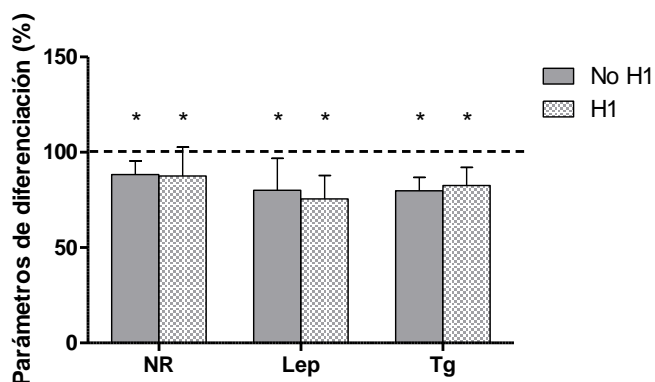


Figura III.59: Parámetros de diferenciación adipogénica en presencia de linezolid 30 μ M en hASC agrupadas según su haplogrupo mitocondrial. Todas las hASC sin tratar se han considerado el 100 % y se representan mediante la línea discontinua. NR) Tinción con Nile Red. No H1: 88,3 \pm 7,2 (9); H1: 87,5 \pm 15,2 (4). Lep) Cantidad de leptina secretada. No H1: 80,0 \pm 16,8 (9); H1: 75,5 \pm 12,2 (4). Tg) Cantidad de triglicéridos totales. No H1: 79,8 \pm 7,0 (4); H1: 82,6 \pm 9,5 (4). *P \leq 0,0057 (vs. hASC diferenciadas en ausencia de linezolid).

Como puede observarse, la hipótesis de que el linezolid afectaría de forma más notoria a células del haplogrupo H1 que a las de otro haplogrupo, no se confirma para el caso de las hASC en las condiciones estudiadas. Además, hay que tener en cuenta que estas células, además de tener distinto mtDNA, difieren también en su nDNA, por lo que el efecto del mencionado polimorfismo mitocondrial podría verse compensado por otros cambios a nivel nuclear imposibles de considerar para este experimento.

III.4.5. Tóxicos ambientales: cloruro de tributiltina

La organotina TBTC es un potente alguicida y molusquicida causante, desde los años 60, de la contaminación de ecosistemas marinos al utilizarse como componente de las pinturas que revisten los barcos. Fuera del agua, las tributiltinas (TBT) se usan además en agricultura y en una gran diversidad de actividades industriales, lo que ha llevado a considerar los efectos perjudiciales de este compuesto sobre la salud humana. Como consecuencia, este tipo de pinturas basadas en tributiltinas fueron prohibidas a nivel global desde el año 2003 (Grun 2014).

Las concentraciones de TBT encontradas en sangre en humanos varían en un rango de 16,8 a 306,8 nM (Whalen, Loganathan et al. 1999), por lo que en esta tesis se han utilizado dos dosis, de 20 y 100 nM. No obstante, a concentraciones más altas, ya se ha demostrado que la subunidad p.MT-ATP6 del complejo V o ATP sintasa podría ser la diana de inhibición de las TBT (von Ballmoos, Brunner et al. 2004, Kotake 2012).

III.4.5.1. Cambios morfológicos y marcadores de diferenciación

Algunos autores ya habían demostrado que las TBT inducen la acumulación de gotas lipídicas en queratinocitos humanos (Corsini, Viviani et al. 2003) así como la diferenciación adipogénica de preadipocitos de ratón (Kanayama, Kobayashi et al. 2005).

Al tratar las hASC con TBTC durante 3 semanas en medio normal de crecimiento (no de diferenciación), así como con otro inhibidor del CV como es la oligomicina (OLI, 16 nM), se indujeron unos cambios morfológicos similares que, tal y como se aprecia en la figura III.60, conllevan la aparición de una especie de vesículas que podrían contener cúmulos de lípidos.

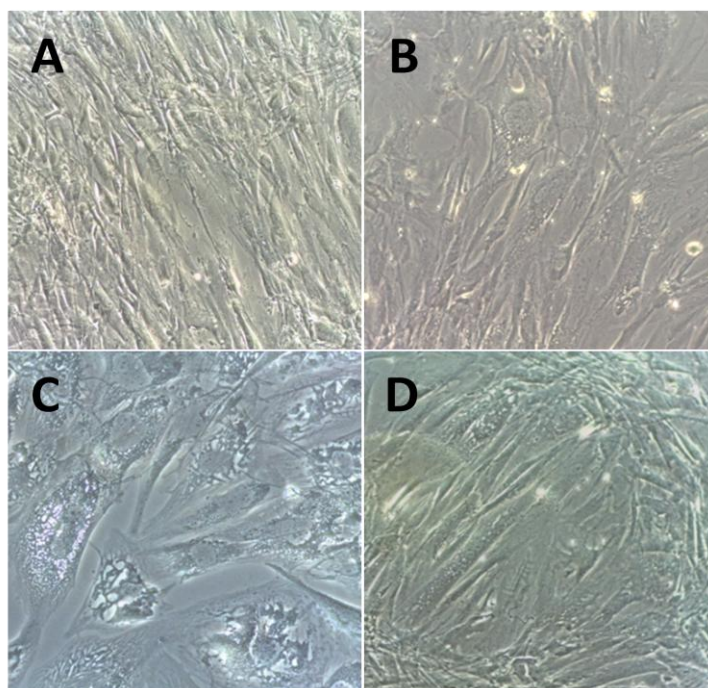


Figura III.60: Imágenes de microscopía óptica de hASC. A) hASC no tratadas. B) hASC tratadas con OLI 16 nM. C) hASC tratadas con TBTC 20 nM. D) hASC tratadas con TBTC 100 nM. 10 X.

En la figura III.61 se representan los valores obtenidos al medir distintas variables de adipogénesis en las hASC tratadas durante 21 días en medio de cultivo normal, no de diferenciación, DMEM (A) o MesenPRO (B). Como puede observarse, los cambios morfológicos hallados se correspondieron con un incremento muy significativo de los marcadores de diferenciación intracelulares (tinción con Nile Red y cantidad de triglicéridos totales) así como en los de secreción de adipoquinas, en este caso leptina. Estas diferencias fueron mayores a mayor concentración de TBTC, obteniendo resultados que apuntan en la misma dirección con el tratamiento con OLI. Del mismo modo, los resultados obtenidos con ambos medios de cultivo son prácticamente equivalentes.

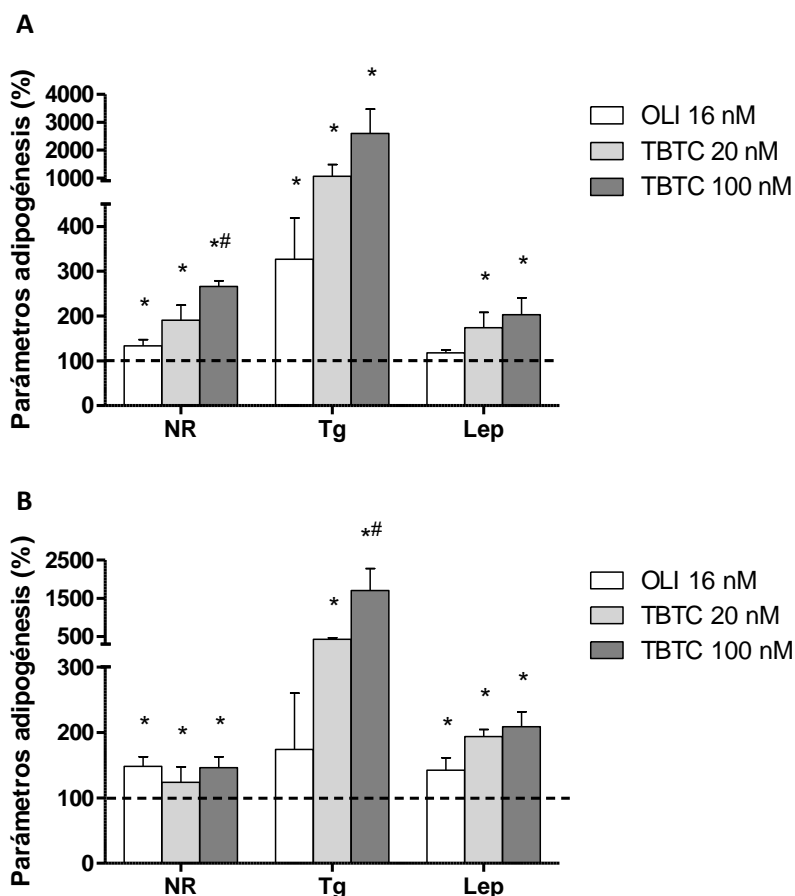


Figura III.61: Variables de diferenciación adipogénica tras el tratamiento con TBTC. A) En medio de cultivo DMEM. Nile Red (NR) OLI 16 nM: $133,4 \pm 13,7$ (3); TBTC 20 nM: $190,6 \pm 33,8$ (3); TBTC 100 nM: $266,2 \pm 12,6$ (3). Triglicéridos (Tg) OLI 16 nM: $326,9 \pm 92,1$ (3); TBTC 20 nM: $1.066,4 \pm 411,3$ (3); TBTC 100 nM: $2.595,9 \pm 879,3$ (3). Leptina (Lep) OLI 16 nM: $117,7 \pm 6,5$ (3); TBTC 20 nM: $173,9 \pm 34,0$ (3); TBTC 100 nM: $203,0 \pm 37,6$ (3). * $P \leq 0,0256$ (vs. hASC no tratadas); # $P = 0,0221$ (vs. TBTC 20 nM). B) En medio de cultivo MesenPRO. NR) OLI 16 nM: $148,1 \pm 14,5$ (3); TBTC 20 nM: $123,6 \pm 23,7$ (3); TBTC 100 nM: $146,1 \pm 16,5$ (3). Tg) OLI 16 nM: $174,0 \pm 86,2$ (3); TBTC 20 nM: $428,3 \pm 42,7$ (3); TBTC 100 nM: $1.704,9 \pm 573,9$ (3). Lep) OLI 16 nM: $142,1 \pm 19,3$ (3); TBTC 20 nM: $193,5 \pm 10,8$ (3); TBTC 100 nM: $208,5 \pm 23,0$ (3). * $P \leq 0,0427$ (vs. hASC no tratadas); # $P = 0,0184$ (vs. TBTC 20 nM). La línea discontinua representa los valores medios obtenidos en las hASC no tratadas, que se han considerado el 100 %. OLI y TBTC denotan oligomicina y cloruro de tributiltina, respectivamente.

III.4.5.2. Diana del TBTC y parámetros mitocondriales

Se sabe que las TBT a bajas concentraciones (10 nM) pueden activar determinadas rutas genómicas a través del PPAR γ y el RXR α (Kanayama, Kobayashi et al. 2005), pero también que pueden promover la adipogénesis de forma independiente al PPAR γ dependiendo del momento de la diferenciación en que se administre el compuesto (Biemann, Fischer et al. 2014). Recientemente se ha demostrado que, a concentraciones nanomolares, las TBT son capaces de inhibir la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NAD (NAD-IDH), definiéndose así como un mecanismo de disrupción endocrina no genómico (Yamada, Kotake et al. 2014).

Para confirmar o desmentir esta última hipótesis en las hASC, se midió la actividad IDH de las células tratadas con TBTC u OLI, viendo que no solo no disminuía sino que incluso con

TBTC 100 nM y con OLI 16 nM aumentaba significativamente (figura III.62), probablemente debido a un mecanismo compensatorio de biogénesis mitocondrial.

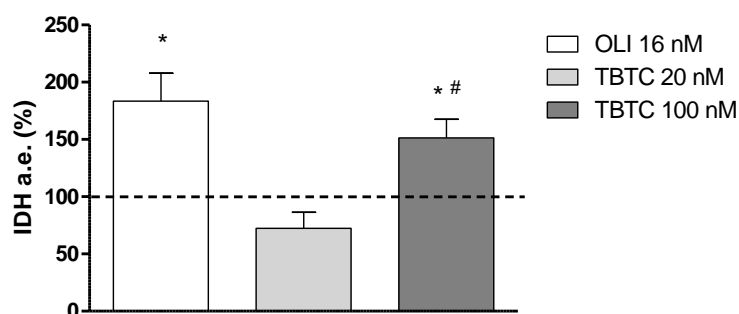


Figura III.62: Actividad específica de la Isocitrato Deshidrogenasa (IDH). La línea discontinua representa los valores medios obtenidos en las hASC no tratadas, que se han considerado el 100 %. OLI 16 nM: 183,4 ± 24,4 (3); TBTC 20 nM: 72,5 ± 13,8 (3); TBTC 100 nM: 151,4 ± 16,2 (3). * $P \leq 0,0173$ (vs. hASC no tratadas); # $P = 0,003$ (vs. TBTC 20 nM). OLI y TBTC denotan oligomicina y cloruro de tributiltina, respectivamente.

Por otro lado, y como era de esperar al tratarse de inhibidores directos de la ATP sintasa, tanto OLI como TBTC (a 100 nM) disminuyeron de forma inmediata el consumo de oxígeno de las hASC, que se recuperó al añadir un desacoplante como el FCCP, lo que indica una cadena respiratoria conservada (figura III.63).

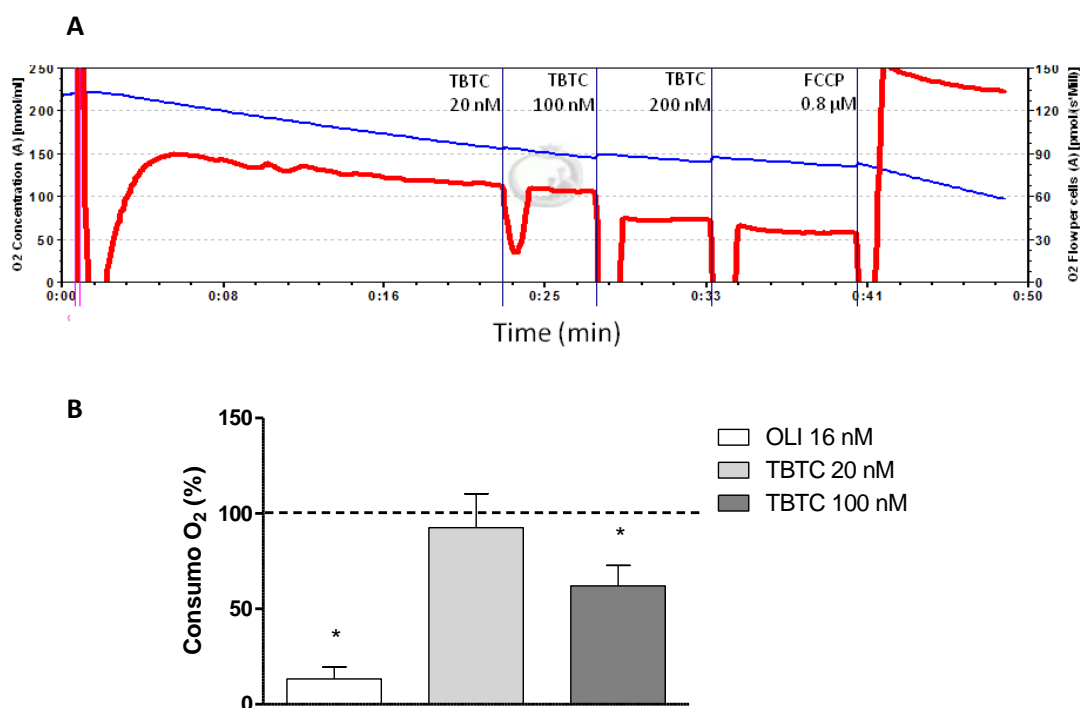


Figura III.63: Determinación del consumo de oxígeno tras la adición de drogas. A) Representación gráfica de los resultados obtenidos mediante el sistema Oroboros®. Las líneas azul y roja representan concentración y consumo de oxígeno respectivamente. B) Cuantificación del consumo de oxígeno. La línea discontinua representa el consumo endógeno medio de las hASC sin tratar, que se ha considerado el 100 %. OLI 16 nM: 13,5 ± 6,2 (3); TBTC 20 nM: 92,6 ± 17,8 (3); TBTC 100 nM: 62,0 ± 10,7 (3). * $P \leq 0,0403$. OLI y TBTC denotan oligomicina y cloruro de tributiltina, respectivamente.

Por último, se midieron los niveles de H_2O_2 tras la adición de estas drogas al cultivo de hASC. Si bien TBTC a 100 nM no afectó a la cantidad de ROS, OLI la disminuyó de forma inmediata. Este último resultado fue inesperado ya que previamente se había demostrado que, a 4 nM, OLI incrementaba los niveles de H_2O_2 en preadipocitos de ratón (Carriere, Fernandez et al. 2003). Para corroborar la funcionalidad de la técnica, se añadió el antioxidante NAC (5 mM) y el agente generador de superóxido Menadiona (MEN, 10 μ M), que efectivamente disminuyeron y aumentaron la producción de H_2O_2 respectivamente. Todos estos datos se recogen en la figura III.64.

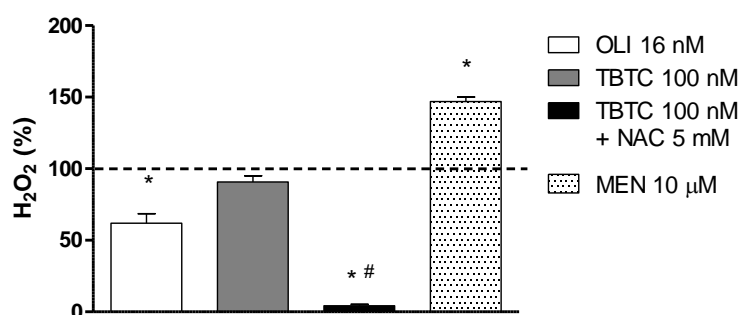


Figura III.64: Determinación de los niveles de H_2O_2 tras la adición de drogas. La línea discontinua representa los valores medios de las hASC sin tratar, que se han considerado el 100 %. OLI 16 nM: 62,0 ± 6,6 (3); TBTC 100 nM: 90,8 ± 4,2 (3); TBTC 100 nM + NAC 5 mM: 4,2 ± 1,1 (3); MEN 10 μ M: 147,0 ± 3,1 (3). * $P \leq 0,0021$ (vs. hASC no tratadas); # $P < 0,0001$ (vs. TBTC 100 nM). OLI, TBTC, NAC y MEN denotan oligomicina, cloruro de tributiltina, N-acetilcisteína y menadiona, respectivamente.

III.5. Estudio del secretoma de las hASC

III.5.1. Cambios en el patrón de secreción entre las hASC sin diferenciar y diferenciadas a adipocitos

Tras demostrar que la diferenciación de las hASC en presencia de xenobióticos que afectan al sistema OXPHOS alteraba la secreción de ciertas adipoquinas como la leptina, se decidió llevar a cabo un estudio general del perfil de proteínas secretadas al medio extracelular por parte de estas células.

En primer lugar, y para conocer más concretamente los cambios en las proteínas secretadas que se producen durante la diferenciación celular, se llevó a cabo el análisis de expresión diferencial entre el secretoma de las hASC sin diferenciar y diferenciadas a adipocitos. Para ello se estudiaron las dos líneas de células madre ya mencionadas (hASC-1 y hASC-2). Para la realización de estos experimentos se utilizó la técnica de marcaje isotópico iTRAQ.

Si bien se prestó especial atención en llevar a cabo un exhaustivo lavado de las células para eliminar los restos de suero fetal bovino que contaminasen la muestra, la presencia de

proteínas de la especie *Bos taurus* resultó inevitable. Tal y como muestra la figura III.65, al cargar las muestras en un gel SDS-PAGE se obtuvo una banda mayoritaria a 67 KDa correspondiente a la albúmina sérica bovina (flecha roja).

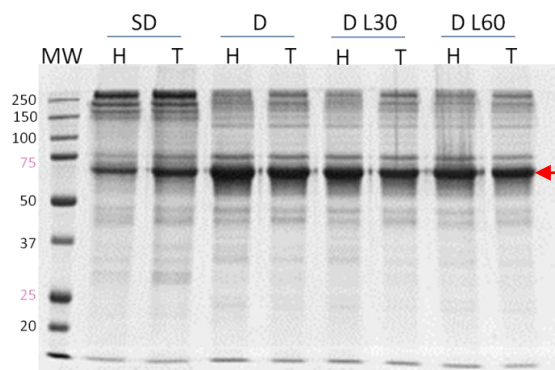


Figura III.65: Gel SDS-PAGE de las muestras de secretoma. Tinción con Azul de Coomassie. MW: patrón de pesos moleculares; SD: hASC sin diferenciar, D: hASC diferenciadas a adipocitos, D L30: hASC diferenciadas en presencia de linezolid 30 μ M, D L60: hASC diferenciadas en presencia de linezolid 60 μ M. H y T denotan el haplogrupo al que pertenece cada una de las dos hASC utilizadas.

Además, se tuvo que hacer un cribado de proteínas cuyos péptidos habían sido identificados con otras especies distintas a la humana y la bovina (*Macaca mulatta*, *Macaca fascicularis* y *Pan troglodytes*). Esto es debido a que algunas proteínas están altamente conservadas en la naturaleza, por lo que los péptidos correspondientes aparecen en las bases de datos por su gran homología.

Una vez considerado esto, en la tabla III.3 se muestran los resultados obtenidos, señalando en color azul las proteínas subexpresadas con la diferenciación y en rojo las superexpresadas. En dicha tabla se incluyen solamente las proteínas con expresión diferencial significativa en ambas líneas celulares, si bien se pueden consultar en el Anexo I (tabla A.1) las obtenidas en solo una de las dos.

Nº Acceso	PROTEÍNA	Gen	D/SD	PS	L	F	Referencias
Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	TGFBI	0,18	SÍ	EX	CC, TS	a, b, c, d, g, h
P08253	72 kDa type IV collagenase	MMP2	0,24	SÍ	EX	MP	a, c, d, e, f, g, h
P02452	Collagen alpha-1(I) chain	COL1A1	0,24	SÍ	EX	MC	a, b, c, d, e, f, g
P02751	Fibronectin	FN1	0,25	SÍ	EX	MC	a, b, c, d, e, f, g, h
P35555	Fibrillin-1	FBN1	0,27	SÍ	EX	MC	c, d, g
P08123	Collagen alpha-2(I) chain	COL1A2	0,29	SÍ	EX	MC	a, b, c, d, e, f, g, h
P05121	Plasminogen activator inhibitor 1	SERPINE1	0,31	SÍ	EX	MP	a, c, d, e, f, g
P12111	Collagen alpha-3(VI) chain	COL6A3	0,31	SÍ	EX	MC	a, c, d
P02461	Collagen alpha-1(III) chain	COL3A1	0,32	SÍ	EX	MC	a, c, d, e, f, g, h
Q9NRN5	Olfactomedin-like protein 3	OLFML3	0,39	SÍ	EX	MC	d
P12109	Collagen alpha-1(VI) chain	COL6A1	0,44	SÍ	EX	MC	a, c, d, e, f, g, h
P20908	Collagen alpha-1(V) chain	COL5A1	0,44	SÍ	EX	MC	c, d, e, g, h
P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10	KRT10	0,48	NO	C	MC	-
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1	KRT1	0,51	NO	M	MC	-
P02787	Serotransferrin	TF	0,54	SÍ	EX	T	d, e, f, g, h
P09871	Complement C1s subcomponent	C1S	0,57	SÍ	EX	I	a, c, d, e
P05997	Collagen alpha-2(V) chain	COL5A2	0,57	SÍ	EX	MC	c, d, g
P14543	Nidogen-1	NID1	1,76	SÍ	EX	MC	a, c, d, h
P07996	Thrombospondin-1	THBS1	1,77	SÍ	EX	MC	c, d, h
P24821	Tenascin	TNC	3,61	SÍ	EX	CC, TS	c, d, h
P00746	Complement factor D	CFD	4,12	SÍ	EX	I	c, h
P02649	Apolipoprotein E	APOE	4,20	SÍ	EX	T	c, d, e, f, g, h
P49747	Cartilage oligomeric matrix protein	COMP	4,73	SÍ	EX	MC	d

Tabla III.3: Secreción diferencial de proteínas por las hASC sin diferenciar y diferenciadas a adipocitos. Se muestran en azul o en rojo las proteínas cuya secreción disminuye (ratio D/SD \leq 0,7) o aumenta (ratio D/SD \geq 1,3) con la diferenciación, respectivamente. El Nº de acceso es el correspondiente a la base de datos SwissProt. La presencia de péptido señal (PS), la localización (L) y la función (F) de cada proteína se ha extraído de la base de datos HPRD. Localización) EX = extracelular, C = citoplasma, M = membrana plasmática. Función) CC = comunicación celular, TS = transducción de señal, MP = metabolismo proteico, MC = mantenimiento celular, T = transporte, I = respuesta inmune. Referencias) a, (Chiellini, Cochet et al. 2008); b, (Frazier, Gimble et al. 2013); c, (Kapur and Katz 2013); d, (Lim, Wollaston-Hayden et al. 2014); e, (Renes, Rosenow et al. 2014); f, (Rosenow, Noben et al. 2012); g, (Rosenow, Noben et al. 2013); h, (Zhou, Xiao et al. 2009).

Como puede observarse, 21 de las 23 proteínas halladas presentan péptido señal de secreción, y solo las dos queratinas carecen de esta señal. Lo particular de este tipo de proteínas es que probablemente procedan de una contaminación externa originada en el laboratorio (piel o pelo de la persona que manipula las muestras), por lo que normalmente se excluyen de este tipo de estudios (Hodge, Have et al. 2013).

Además, se quiso corroborar que todas las proteínas analizadas pertenecían realmente a rutas de secreción, descartando que aparecieran en el medio extracelular por la simple lisis de las células. Para ello se llevó a cabo la determinación enzimática de la lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio de cultivo recogido para los estudios de secretoma. La LDH es una enzima citosólica que en ocasiones se ha utilizado para descartar la rotura de las células en este tipo de estudios (Chiellini, Cochet et al. 2008). El resultado obtenido se representa en la figura III.66, que muestra la ausencia casi total de actividad LDH frente a un control positivo del mismo volumen de medio en contacto con la misma cantidad de células lisadas por el procedimiento de congelación-descongelación.

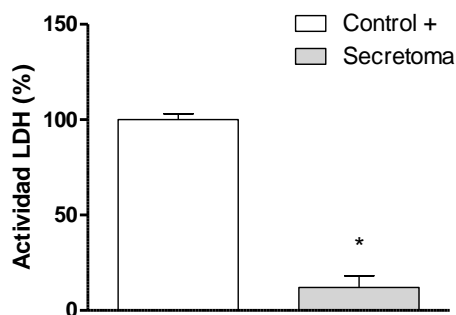


Figura III.66: Determinación de la actividad enzimática de la lactato deshidrogenasa (LDH). Control +: $100 \pm 3,1$ (3); Secretoma: $12,1 \pm 6,1$ (8). *P < 0,0001.

En cuanto a las proteínas encontradas, la mayoría de ellas forman parte de la matriz extracelular y de su mantenimiento, lo que pone de manifiesto la necesidad de remodelar el tejido adiposo con la diferenciación de los adipocitos (Lim, Wollaston-Hayden et al. 2014). Por ejemplo, la disminución de colágeno tipo VI puede facilitar a los adipocitos su incremento de tamaño (Divoux and Clement 2011). Así mismo, una menor expresión de colágenos tipo I y III es necesaria para que los preadipocitos pierdan su morfología fibroblastoide (Weiner, Shah et al. 1989).

Un aspecto que llama la atención es que no aparece ninguna de las adipoquinas que se sabe que secreta el tejido adiposo como órgano endocrino, tales como la adiponectina y la leptina, si bien esta última tampoco es hallada en estudios similares (Zvonic, Lefevre et al. 2007). En cambio, sí que aumentan los niveles de otras proteínas secretadas por los adipocitos como el factor D del complemento o la apolipoproteína E (ApoE), al igual que disminuye el inhibidor 1 del activador del plasminógeno.

III.5.2. Efecto del linezolid sobre el secretoma de las hASC diferenciadas a adipocitos

Del mismo modo, se llevó a cabo el análisis del secretoma de las hASC diferenciadas a adipocitos en presencia de linezolid a dos concentraciones, 30 y 60 μM , concentraciones fisiológicamente relevantes por encontrarse dentro del rango de las halladas en pacientes que hayan seguido este tratamiento.

Los resultados obtenidos respecto a las células sin diferenciar se recogen en la tabla III.4. Al igual que en el apartado anterior, las proteínas incluidas son las que aparecen como diferenciales en ambas réplicas biológicas (hASC-1 y hASC-2), mientras que las que aparecen solo en una de ellas se encuentran en el Anexo I (tabla A.2).

Nº Acceso	PROTEÍNA	Gen	D/SD	DL30/SD	DL60/SD	PS	L	F	Referencias
Q15063	Periostin	POSTN	-	0,16	0,16	SÍ	EX	CC, TS	a, d, h
P21810	Biglycan	BGN	-	0,18	-	SÍ	EX	MC	d
Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	TGFBI	0,18	0,19	0,22	SÍ	EX	CC, TS	a, b, c, d, g, h
P08253	72 kDa type IV collagenase	MMP2	0,24	0,30	0,30	SÍ	EX	MP	a, c, d, e, f, g, h
P02452	Collagen alpha-1(I) chain	COL1A1	0,24	0,26	0,27	SÍ	EX	MC	a, b, c, d, e, f, g
P51884	Lumican	LUM	-	0,26	0,26	SÍ	EX	MC	a, b, d
P02751	Fibronectin	FN1	0,25	0,29	0,31	SÍ	EX	MC	a, b, c, d, e, f, g, h
P35555	Fibrillin-1	FBN1	0,27	0,32	0,33	SÍ	EX	MC	c, d, g
P08123	Collagen alpha-2(I) chain	COL1A2	0,29	0,29	0,28	SÍ	EX	MC	a, b, c, d, e, f, g, h
P05121	Plasminogen activator inhibitor 1	SERPINE1	0,31	-	-	SÍ	EX	MP	a, c, d, e, f, g
P12111	Collagen alpha-3(VI) chain	COL6A3	0,31	0,31	0,34	SÍ	EX	MC	a, c, d
P02461	Collagen alpha-1(III) chain	COL3A1	0,32	0,30	0,33	SÍ	EX	MC	a, c, d, e, f, g, h
Q9NRN5	Olfactomedin-like protein 3	OLFML3	0,39	0,45	0,41	SÍ	EX	MC	d
P12109	Collagen alpha-1(VI) chain	COL6A1	0,44	0,48	0,52	SÍ	EX	MC	a, c, d, e, f, g, h
P20908	Collagen alpha-1(V) chain	COL5A1	0,44	0,41	0,42	SÍ	EX	MC	c, d, e, g, h
P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	KRT2	-	0,54	0,60	NO	C	MC	-
P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10	KRT10	0,48	0,58	0,57	NO	C	MC	-
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1	KRT1	0,51	0,60	0,57	NO	M	MC	-
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9	KRT9	-	-	0,57	NO	C	MC	-
P02787	Serotransferrin	TF	0,54	0,54	0,59	SÍ	EX	T	d, e, f, g, h
P09871	Complement C1s subcomponent	C1S	0,57	-	-	SÍ	EX	I	a, c, d, e
P05997	Collagen alpha-2(V) chain	COL5A2	0,57	0,48	0,46	SÍ	EX	MC	c, d, g
P14543	Nidogen-1	NID1	1,76	1,72	1,59	SÍ	EX	MC	a, c, d, h
P07996	Thrombospondin-1	THBS1	1,77	-	1,89	SÍ	EX	MC	c, d, h
P36955	Pigment epithelium-derived factor	SERPINF1	-	1,99	-	SÍ	EX	CC, TS	a, c, d, e, f, g, h
P24821	Tenascin	TNC	3,61	3,33	3,73	SÍ	EX	CC, TS	c, d, h
P00746	Complement factor D	CFD	4,12	4,85	3,96	SÍ	EX	I	c, h
P02649	Apolipoprotein E	APOE	4,20	3,55	3,06	SÍ	EX	T	c, d, e, f, g, h
P49747	Cartilage oligomeric matrix protein	COMP	4,73	4,66	4,97	SÍ	EX	MC	d

Tabla III.4: Secreción diferencial de proteínas por las hASC sin diferenciar y diferenciadas a adipocitos en presencia de linezolid. Se muestran en azul o en rojo las proteínas cuya secreción disminuye (ratios $\leq 0,7$) o aumenta (ratios $\geq 1,3$) con la diferenciación en ausencia y presencia de linezolid, respectivamente. Aparecen en negrita aquellas proteínas que presentan una tendencia ascendente o descendente al aumentar la dosis de linezolid. El Nº de acceso es el correspondiente a la base de datos SwissProt. La presencia de péptido señal (PS), la localización (L) y la función (F) de cada proteína se ha extraído de la base de datos HPRD. Localización) EX = extracelular, C = citoplasma, M = membrana plasmática. Función) CC = comunicación celular, TS = transducción de señal, MP = metabolismo proteico, MC = mantenimiento celular, T = transporte, I = respuesta inmune. Referencias) a, (Chiellini, Cochet et al. 2008); b, (Frazier, Gimble et al. 2013); c, (Kapur and Katz 2013); d, (Lim, Wollaston-Hayden et al. 2014); e, (Renes, Rosenow et al. 2014); f, (Rosenow, Noben et al. 2012); g, (Rosenow, Noben et al. 2013); h, (Zhou, Xiao et al. 2009).

Como puede observarse, tan solo algunas proteínas (en negrita) presentan una tendencia que puede correlacionarse con las concentraciones crecientes de linezolid. Las que disminuyen con la diferenciación y aumentan con el linezolid son la proteína inducida por el TGF β , el colágeno α 1(I), la fibronectina, la fibrilina-1 y el colágeno α 1(VI). De entre ellas, las diferentes isoformas del colágeno tipo I, por ejemplo, forman parte de los llamados adiposomas, que son vesículas similares a los exosomas pero específicas de los adipocitos, implicadas en la secreción de adipoquinas (Renes, Rosenow et al. 2014). Las proteínas que aumentan con la diferenciación y que disminuyen con el linezolid son el nidogen-1 y la

apolipoproteína E. El colágeno $\alpha 2(V)$ es un caso particular ya que disminuye con la diferenciación y sigue disminuyendo con el tratamiento con linezolid.

Por otro lado, y tal como muestra la tabla III.5, tan solo se encontraron 2 proteínas que cambiaban entre las células diferenciadas en ausencia y presencia de linezolid, concretamente a la concentración de 60 μ M. De nuevo, en el Anexo I (tabla A.3) puede encontrarse la tabla de resultados correspondiente a las proteínas halladas en solo una de las dos líneas hASC analizadas.

Nº Acceso	PROTEÍNA	Gen	DL30/D	DL60/D	DL60/DL30	PS	L	F	Referencias
P02649	Apolipoprotein E	APOE	-	0,72	-	SÍ	EX	T	c, d, e, f, g, h
P02751	Fibronectin	FN1	-	1,27	-	SÍ	EX	MC	a, b, c, d, e, f, g, h

Tabla III.5: Secreción diferencial de proteínas por las hASC diferenciadas a adipocitos en ausencia y presencia de linezolid. Se muestran en azul o en rojo las proteínas cuya secreción tiende a disminuir (ratios $\leq 0,7$) o a aumentar (ratios $\geq 1,3$) con el tratamiento con linezolid, respectivamente. El Nº de acceso es el correspondiente a la base de datos SwissProt. La presencia de péptido señal (PS), la localización (L) y la función (F) de cada proteína se ha extraído de la base de datos HPRD. Localización) EX = extracelular. Función) MC = mantenimiento celular, T = transporte. Referencias) a, (Chiellini, Cochet et al. 2008); b, (Frazier, Gimble et al. 2013); c, (Kapur and Katz 2013); d, (Lim, Wollaston-Hayden et al. 2014); e, (Renes, Rosenow et al. 2014); f, (Rosenow, Noben et al. 2012); g, (Rosenow, Noben et al. 2013); h, (Zhou, Xiao et al. 2009).

La fibronectina es una glicoproteína presente en la matriz extracelular (ECM) que es secretada en forma de dímeros inactivos solubles. Su principal función es iniciar el ensamblaje de diversas proteínas para formar las redes fibrilares de la ECM (Halper and Kjaer 2014).

La apolipoproteína E es un componente proteico de varias lipoproteínas y juega un papel clave en el metabolismo lipídico, producido principalmente por el hígado pero presente también en el tejido adiposo y en el sistema nervioso central (Havel, Yamada et al. 1987, Zechner, Moser et al. 1991).

Estos resultados permiten dar un paso más allá en cuanto a las rutas metabólicas que clásicamente se ven afectadas al alterar de algún modo el sistema OXPHOS como podrían ser la del mantenimiento bioenergético, ya que tanto ApoE como fibronectina actuarían en funciones celulares muy distintas.

III.5.2.1. Validación de los resultados por Western blot

Para validar los resultados del secretoma obtenidos por iTRAQ, las mismas muestras se utilizaron para la inmunodetección de ApoE y fibronectina por Western blot.

Los resultados obtenidos, así como su cuantificación densitométrica, se muestran en la figura III.67. Hay que mencionar que ante la imposibilidad de encontrar una proteína óptima

que sirviera como control de carga en el caso de muestras de secretoma, se repitió la cuantificación por el método de Bradford varias veces, para tratar de cargar exactamente la misma cantidad de proteína en todos los pocillos del gel.

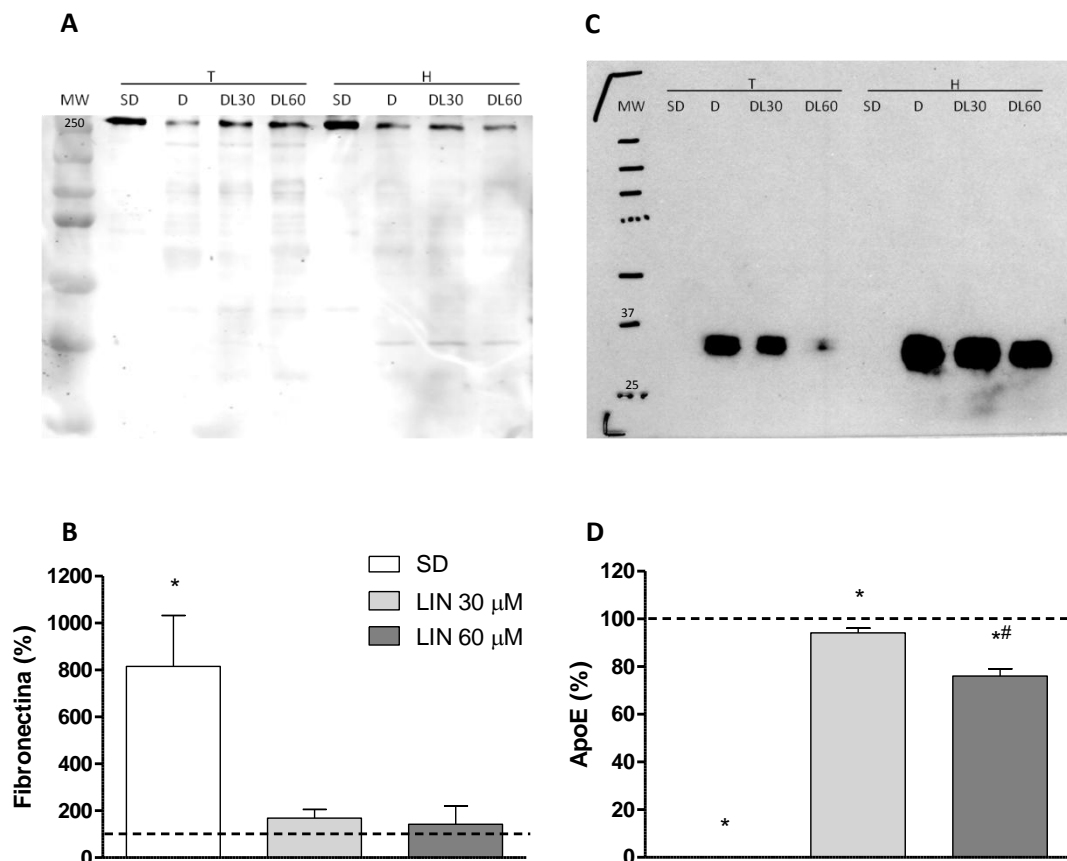


Figura III.67: Inmunodetección de ApoE y fibronectina en el secretoma hASC sin diferenciar y diferenciadas en ausencia y presencia de linezolid (LIN). A) Determinación por Western blot de fibronectina. MW: patrón de pesos moleculares, SD: hASC sin diferenciar, D: hASC diferenciadas a adipocitos, DL30: hASC diferenciadas en presencia de linezolid 30 μM, DL60: hASC diferenciadas en presencia de linezolid 60 μM. H y T denotan el haplogrupo al que pertenece cada una de las dos hASC utilizadas. B) Cuantificación de fibronectina por densitometría. La línea discontinua representa la media de los valores obtenidos en el secretoma de hASC diferenciadas a adipocitos en ausencia de linezolid, que se ha considerado el 100 %. SD: 815,6 ± 216,6 (2); LIN 30 μM: 168,8 ± 36,8 (2); LIN 60 μM: 142,6 ± 78,3 (2). *P = 0,0433 (vs. D). C) Determinación por Western blot de ApoE. D) Cuantificación de ApoE por densitometría. La línea discontinua representa la media de los valores obtenidos en el secretoma de hASC diferenciadas a adipocitos en ausencia de linezolid, que se ha considerado el 100 %. SD: 0 ± 0 (3); LIN 30 μM: 94,1 ± 2,0 (3); LIN 60 μM: 76,0 ± 3,0 (3). *P ≤ 0,0068 (vs. D); #P = 0,001 (vs. LIN 30 μM).

En el caso de la fibronectina, puede observarse una banda por encima de 250 que se corresponde con el peso molecular predicho para la proteína, que es de 263 KDa. Al igual que ocurría en el experimento iTRAQ, la fibronectina se encontró disminuida en las células diferenciadas frente a las sin diferenciar, mientras que al inhibir parcialmente la síntesis mitocondrial de proteínas mediante la administración de linezolid, su expresión frente a las

células diferenciadas sin droga aumentó ligeramente (aunque no de forma estadísticamente significativa).

Por otro lado, la ApoE también mostró la misma tendencia a la observada en el análisis general del secretoma. Como se aprecia en la figura III.67 (C y D), aparece una banda en las células diferenciadas que disminuye significativamente al tratar con linezolid, y que no se observa en las células sin diferenciar. Dicha banda se encuentra por debajo del marcador de 37 KDa, cuando el peso molecular predicho por la casa comercial del anticuerpo era de 38 KDa (aunque el peso molecular de la proteína es de 34,2 KDa, correspondiéndose de este modo con la banda hallada).

III.5.2.2. Verificación de ApoE por huella peptídica

Al no coincidir exactamente el peso molecular de la banda hallada para ApoE con el teórico para esta proteína, y puesto que gran parte de los experimentos posteriores se iban a basar en el uso de este anticuerpo, se decidió verificar la identidad de la misma por la técnica de huella peptídica.

Tal y como muestra la tabla III.6, la proteína mayoritaria en la banda del gel que se correspondía con la inmunodetección de ApoE, era efectivamente ApoE (mayor *Mascot score*), si bien también se encontró otra proteína de peso molecular muy similar, la proteína secretada ácida y rica en cisteínas (SPARC), igualmente conocida con el nombre de osteonectina. Ambas superan la puntuación que determina el motor de búsqueda MASCOT como significativa, con un intervalo de confianza del 95 %.

PROTEÍNA	Nº Acceso	MW (Da)/PI	MASCOT score	Cobertura secuencia	Nº Péptidos apareados	Datos MS/MS
Apo E	P02649	36.246/5,65	278	62 %	21	1.033,5 LQAEAFQAR 45
SPARC	P09486	35.465/4,73	197	43 %	13	1.497,5 AATVGS LAGQPLER 65

Tabla III.6: Identificación de ApoE por huella peptídica. El Nº de acceso es el correspondiente a la base de datos SwissProt. MW y PI denotan peso molecular y punto isoeléctrico teóricos, respectivamente. MASCOT score hace referencia a la puntuación obtenida por cada proteína al utilizar el motor de búsqueda con el mismo nombre en la base de datos SwissProt. La cobertura de la secuencia corresponde al porcentaje en proteínas identificadas por huella genética. Los datos MS/MS son el peso molecular MH^+ (Da), la secuencia del péptido y el Mascot score del ion correspondiente.

III.6. Cambios en la secreción de ApoE por alteración del sistema OXPHOS

III.6.1. Haplotipado del gen *APOE*

La proteína ApoE puede presentarse comúnmente en humanos en tres variantes (conocidas como E2, E3 y E4), muy relacionadas con algunas enfermedades asociadas a la edad como el Alzheimer y también con el fenómeno del envejecimiento y la longevidad en general. Las combinaciones de los alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$ dan como resultado los diferentes haplotipos del locus *APOE* (19q13.31), dependiendo de los polimorfismos del exón 4 rs429358 y rs7412 (Seripa, D'Onofrio et al. 2011).

Por ello, se secuenció el fragmento del gen *APOE* correspondiente en las tres líneas de hASC utilizadas en esta tesis (hASC-1, 2 y 3), obteniendo, tal y como muestra la figura III.68, que las tres se correspondían con el haplotipo E3/E3, el más común en la especie humana.

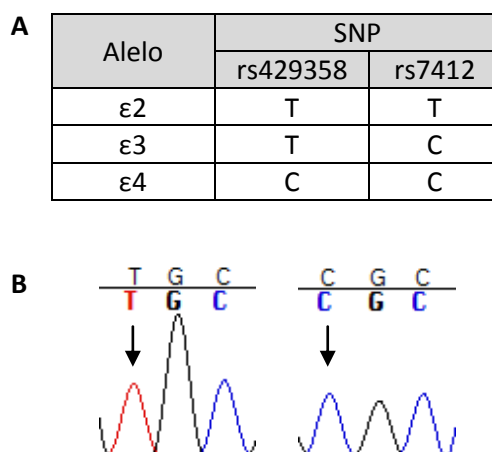


Figura III.68: Haplotipado del gen *APOE*. A) Tabla que muestra los polimorfismos que dan lugar a cada una de las tres variantes genéticas. Los códigos *rs* son los correspondientes a la base de datos dbSNP. B) Figura representativa de un electroferograma, equivalente a las tres líneas hASC analizadas. Se muestran los dos tripletes que codifican para los aminoácidos 112 y 158, en los que se encuentran las mutaciones que definen cada una de las variantes, con la posición concreta señalada con una flecha.

III.6.2. Efecto de distintos xenobióticos sobre la producción de ApoE

Visto el efecto del linezolid, se quiso comprobar si otros de los xenobióticos del sistema OXPHOS utilizados en esta tesis podían alterar del mismo modo la producción de ApoE. En la figura III.69 se muestran los resultados del Western blot realizado.

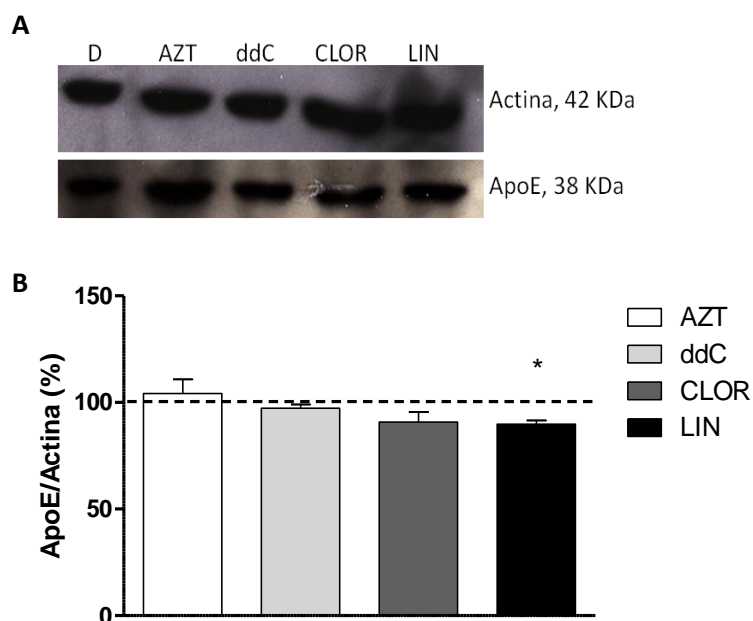


Figura III.69: Inmunodetección por Western blot de ApoE en hASC tratadas con distintos xenobióticos. A) Determinación por Western blot de ApoE (frente a actina como proteína de normalización). D: hASC diferenciadas a adipocitos, AZT: hASC diferenciadas en presencia de AZT 6 μ M, ddC: hASC diferenciadas en presencia de ddC 0,1 μ M, CLOR: hASC diferenciadas en presencia de cloranfenicol 2,5 μ M, LIN: hASC diferenciadas en presencia de linezolid 30 μ M. B) Cuantificación de ApoE por densitometría. La línea discontinua representa la media de los valores obtenidos en el secretoma de hASC diferenciadas a adipocitos en ausencia de cualquier xenobiótico, que se ha considerado el 100 %. AZT: $104,1 \pm 9,5$ (3), ddC: $97,3 \pm 2,4$ (3), CLOR: $90,8 \pm 6,6$ (3), LIN: $89,8 \pm 2,4$ (3). *P = 0,0273. AZT, ddC, CLOR y LIN denotan 3'-azido-3'-deoxitimidina, 2',3'-dideoxicitidina, cloranfenicol y linezolid, respectivamente.

Como puede apreciarse, los análogos de nucleósidos no tuvieron efecto sobre la producción de ApoE. Tan solo en el caso del cloranfenicol se observó una tendencia negativa que, sin embargo, no resultó estadísticamente significativa.

III.6.3. Efecto del linezolid sobre la producción de ApoE

III.6.3.1. Inmunodetección de la proteína

Con el objetivo de concretar si el defecto de ApoE provocado por el tratamiento con linezolid en el secretoma celular tenía lugar a nivel de las rutas de secreción o bien a nivel de la producción general de la proteína, se procedió a su inmunodetección mediante dos técnicas diferentes. Estos experimentos se realizaron a pesar de que el perfil de secreción de la fibronectina, opuesto al de la ApoE (es decir, disminuye con la diferenciación y aumenta al tratar con el linezolid), ya aporta un indicio acerca de que dicho compuesto no está provocando un defecto general en la secreción de los adipocitos.

En primer lugar se llevó a cabo un Western blot a partir de los homogenados celulares de las hASC sin diferenciar y diferenciadas a adipocitos en ausencia y presencia de linezolid 30 y 60 μM . Como puede observarse en la figura III.70A, la ApoE disminuyó significativamente con el tratamiento. Del mismo modo, se detectó la proteína por inmunocitoquímica, aumentando la dosis de linezolid a 90 μM para que los efectos se hicieran más visibles por microscopía. Como se aprecia en la figura III.70, la proteína no apareció en las hASC sin diferenciar (B) mientras que sí lo hizo en los adipocitos (C), disminuyendo su intensidad en las células tratadas con linezolid (D).

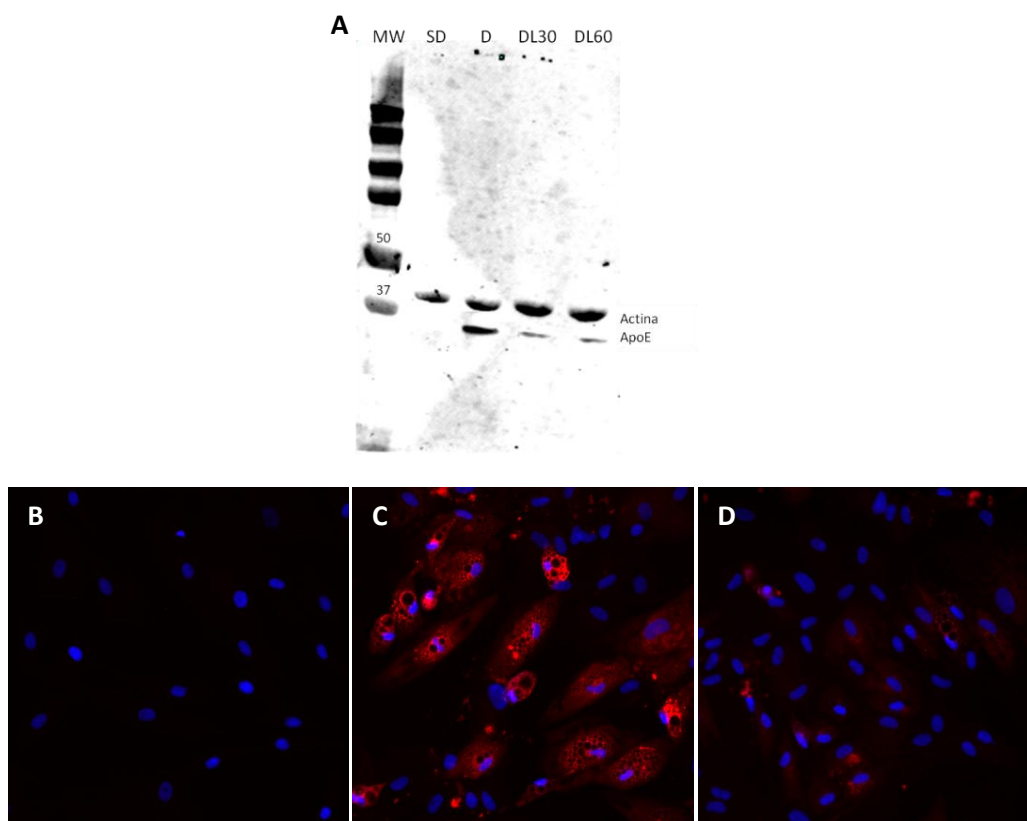


Figura III.70: Inmunodetección de ApoE en hASC sin diferenciar y diferenciadas a adipocitos en ausencia y presencia de linezolid. A) Determinación por Western blot de ApoE (frente a actina como proteína de normalización). MW: patrón de pesos moleculares, SD: hASC sin diferenciar, D: hASC diferenciadas a adipocitos, DL30: hASC diferenciadas en presencia de linezolid 30 μM , DL60: hASC diferenciadas en presencia de linezolid 60 μM . B) hASC sin diferenciar. C) hASC diferenciadas. D) hASC diferenciadas en presencia de linezolid 90 μM . ApoE (rojo) y DAPI (azul).

Estos resultados confirman que el tratamiento con linezolid no altera la ruta de secreción de la ApoE, sino que su efecto se produce en la expresión de la proteína ya a nivel intracelular.

III.6.3.2. Expresión del mRNA

Considerando los resultados anteriores, el siguiente paso fue comprobar si el linezolid afectaba a la traducción de la proteína o bien actuaba antes, sobre la transcripción de su mRNA. Para ello, se midió por qRT-PCR la expresión de ApoE en las hASC diferenciadas a adipocitos en ausencia y presencia de linezolid 90 μ M, que a su vez resultó ser nula en las hASC sin diferenciar. Los resultados se muestran en la figura III.71, que confirma que el linezolid disminuye la expresión de ApoE a nivel de su mRNA.

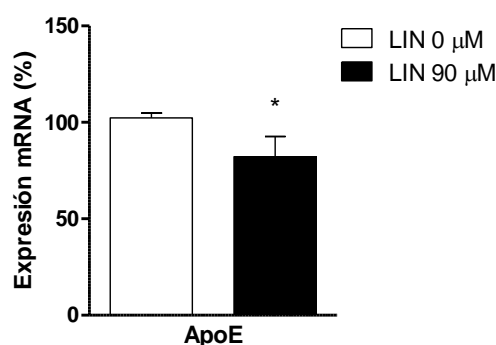


Figura III.71: Expresión del mRNA de ApoE en hASC diferenciadas a adipocitos en ausencia y presencia de linezolid (LIN). LIN 0 μ M: 100 \pm 2,5 (3); LIN 90 μ M: 82,2 \pm 10,5 (3). *P = 0,0322.

III.6.3.3. Estado de metilación del genoma

Que un gen se exprese menos puede ser debido a cambios epigenéticos en su secuencia. Una de las modificaciones epigenéticas más frecuentes es el estado de metilación de las citosinas, inversamente proporcional al nivel de expresión del mRNA.

Como primer paso, se midió el cambio de metilación general, es decir, en todo el genoma, que se producía durante la diferenciación adipogénica, en ausencia y presencia de linezolid. Los resultados obtenidos se muestran en la figura III.72.

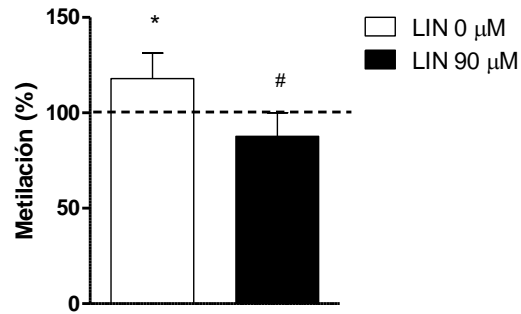


Figura III.72: Estado de metilación general de las hASC diferenciadas en ausencia y presencia de linezolid (LIN). La línea discontinua representa la media de los valores obtenidos en las hASC sin diferenciar, que se ha considerado el 100 %. LIN 0 μM : 117,9 \pm 13,3 (7), *P = 0,015 (vs. hASC SD) ; LIN 90 μM : 87,7 \pm 12,3 (7), #P = 0,0009 (vs. LIN 0 μM).

Como puede apreciarse, el porcentaje de metilación aumenta con la diferenciación adipogénica, mientras que si se lleva a cabo la diferenciación en presencia de linezolid, los niveles de metilación no varían.

IV. DISCUSIÓN

IV. DISCUSIÓN

IV.1. Las hASC como modelo celular para el estudio de la adipogénesis

El modelo de cíbridos, ampliamente aceptado para el estudio de defectos en el sistema OXPHOS, cuenta con dos principales inconvenientes que imposibilitan una reproducción más exacta del contexto biológico en el que aparecen (Iglesias, Llobet et al. 2012). Dado el extendido uso de líneas celulares tumorales como fondo genético nuclear para su construcción, estos cíbridos son aneuploides y presentan una alta inestabilidad cromosómica. Por otro lado, la capacidad de diferenciación de estas células es limitada, lo que impide estudiar el efecto que tienen estas alteraciones sobre la dinámica tisular. Para el desarrollo de esta tesis doctoral, se han utilizado como modelo células madre humanas derivadas de tejido adiposo (hASC), células madre adultas, con cariotipo euploide y capaces de diferenciarse en múltiples linajes.

El principal inconveniente de estas células es que, en cultivo, alcanzan el estado de senescencia muy rápidamente, en torno al pase 15 (Danoviz, Bassaneze et al. 2011), a partir del cual pueden ralentizar su crecimiento, acumular modificaciones epigenéticas o sufrir una diferenciación espontánea (Li, Liu et al. 2011). Por ello, todos los experimentos se han realizado antes del pase 10, tras comprobar que la dotación cromosómica permanecía inalterada. Asimismo, para descartar cualquier potencial efecto fenotípico debido a la presencia de mutaciones mitocondriales, se secuenció su mtDNA completo, confirmándose que ninguno de los polimorfismos encontrados resultaba aparentemente patológico.

Puesto que las células fueron adquiridas comercialmente, se quiso chequear también su identidad genética mediante el análisis de STRs, así como sus características básicas como célula madre mesenquimal, definidas por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (Dominici, Le Blanc et al. 2006).

Tras estas comprobaciones, se realizó un estudio acerca de cuáles eran las condiciones de cultivo más adecuadas para el trabajo *in vitro* con este tipo de células. Por un lado, se vio que, al contrario de lo que ocurre en líneas celulares de origen tumoral, las hASC apenas consumían glucosa y que, por tanto, la concentración de glucosa en el medio de cultivo no afectaba a la actividad mitocondrial. Sin embargo, está demostrado que a bajos niveles de glucosa la diferenciación adipogénica se ve dificultada (Chuang, Yang et al. 2007, Lo, Ho et al. 2011), por lo que se decidió cultivar las células a 25 mM de glucosa. Por otro lado, el cultivo en condiciones de hipoxia o normoxia tisular reproduciría mejor el nicho biológico en el que las células madre se localizan en el organismo, ayudando a su mantenimiento en el estado indiferenciado (Ivanovic 2009). No obstante, nuestros resultados, al igual que otros estudios, muestran que la tasa de proliferación celular es significativamente menor en hipoxia (Mischen, Follmar et al. 2008), mientras que la diferenciación adipogénica, principal objeto de estudio de esta tesis, se ve fuertemente inhibida (Yun, Maecker et al. 2002). Por ello, todos los

experimentos se realizaron a una concentración de oxígeno del 20 %, coincidiendo con la concentración atmosférica. Aun siendo conscientes de que las condiciones de cultivo celular no son las más próximas a las que se dan de manera fisiológica en el organismo, se seleccionaron por ser las que permitían reproducir el proceso de adipogénesis *in vitro*, necesario para llevar a cabo los experimentos.

Dada la relevancia de la obesidad y sus enfermedades emergentes asociadas (diabetes tipo II, enfermedades cardiovasculares, hipertensión, dislipidemias e incluso algunos tipos de cáncer) en la sociedad actual, así como el hecho de que en determinadas patologías del sistema OXPHOS se vea afectado el tejido adiposo, nos interesamos por el estudio de la diferenciación adipogénica de las hASC.

IV.2. La diferenciación adipogénica incrementa la biogénesis del sistema OXPHOS

En primer lugar, las mitocondrias de las hASC diferenciadas a adipocitos se distribuyen preferentemente alrededor de las gotas lipídicas, al igual que se observa en otros estudios de microscopía electrónica de preadipocitos 3T3-L1 de ratón (Novikoff, Novikoff et al. 1980). Dichas mitocondrias cambian su morfología, adquiriendo una apariencia más alargada y aumentando la densidad de sus crestas, lo que se había visto previamente mediante microscopía electrónica en análisis de adipogénesis *in situ* en cortes histológicos de fetos de rata (Atanassova 2002). Se ha postulado que una de las funciones de las crestas mitocondriales es minimizar la distancia entre los translocadores de nucleótidos y la ATP sintasa (Demongeot, Glade et al. 2007), por lo que este cambio estructural podría conllevar una mayor eficiencia en la producción de ATP.

Por otro lado, la diferenciación adipogénica de las hASC utilizadas en esta tesis se acompaña de un aumento en el consumo de oxígeno, MIMP y actividad y cantidad de CIV por célula, resultados que indican una biogénesis mitocondrial durante el proceso de diferenciación.

La necesidad de una hiperpolarización de la membrana mitocondrial para la diferenciación de hMSC a adipocitos ya había sido previamente descrita (Sundelacruz, Levin et al. 2008). En cuanto al consumo de oxígeno, se han hallado los mismos resultados en preadipocitos subcutáneos primarios de adultos jóvenes (von Heimburg, Hemmrich et al. 2005), al igual que en hMSC (Zhang, Marsboom et al. 2013) y en una línea celular de adipocitos blancos del síndrome de Simpson-Golabi-Behmel (SGBS) (Keuper, Jastroch et al. 2014). Asimismo, varios autores demuestran que, paralelamente a la diferenciación de las hMSC a adipocitos, se produce una biogénesis mitocondrial (Tormos, Anso et al. 2011, Zhang, Marsboom et al. 2013). De forma análoga a nuestro caso, los niveles de mRNA de las enzimas SOD2 y CS se incrementaron significativamente durante la diferenciación a adipocitos de hMSC derivadas de médula ósea (Hofmann, Beyer et al. 2012, Zhang, Marsboom et al. 2013). Asimismo, los niveles de mRNA de algunas subunidades del sistema OXPHOS (p.MT-CO3) y la cantidad de supercomplejos resultaron mayores en las mitocondrias de adipocitos frente a las de las células sin diferenciar (Hofmann, Beyer et al. 2012). Además, otros estudios con células

de diferentes especies, como preadipocitos de cerdo (Luo, Yu et al. 2008) o ratón (Wilson-Fritch, Burkart et al. 2003, Shi, Burkart et al. 2008, Ryu, Kim et al. 2013), han demostrado resultados similares.

Por lo tanto, considerando que todos los estudios señalados utilizan protocolos de diferenciación diversos, puede concluirse que el conjunto de los resultados confirma que se produce una biogénesis mitocondrial como fenómeno común durante la diferenciación adipogénica.

Sin embargo, a pesar de esta mayor biogénesis, la síntesis mitocondrial de proteínas fue menor en las células diferenciadas que en las no diferenciadas, al igual que ocurrió con los niveles de RNA de tres de los productos codificados por el mtDNA. Para explicar este fenómeno, ya se ha hablado de la incapacidad de proliferación de las células diferenciadas, por lo que el aporte proteico mitocondrial solo es necesario para reemplazar proteínas degradadas en las células ya existentes, no para sintetizar nuevas mitocondrias. No obstante, cabe mencionar que estos experimentos tan solo se han realizado en el punto final de la diferenciación, por lo que podría darse que el pico de biogénesis mitocondrial ocurriera en los primeros días del proceso, a los que les seguiría una etapa de maduración, menos dependiente de la síntesis mitocondrial de proteínas.

La biogénesis mitocondrial se da también en otros procesos de diferenciación celular, como por ejemplo el de osteogénesis a partir de hMSC, con un mayor consumo de oxígeno y niveles de proteínas mitocondriales en las células diferenciadas (Chen, Shih et al. 2008). Cabe destacar que, al igual que en nuestros resultados obtenidos para el caso de la diferenciación adipogénica, la osteogénesis también implica una menor producción de ROS, probablemente como consecuencia de la sobreexpresión de enzimas antioxidantes (Sheshadri and Kumar 2016). Por otra parte, la miogénesis a partir de dos líneas de mioblastos murinos, C2C12 y Sol8, también va acompañada de una biogénesis mitocondrial, justificada por un incremento significativo de la actividad CS (Kraft, LeMoine et al. 2006). Lo mismo ocurre en el caso de células madre embrionarias humanas, cuya diferenciación supone un aumento tanto en la masa mitocondrial (evidenciada por la tinción con MitoTracker y por microscopía electrónica) como en los niveles de mtDNA (Cho, Kwon et al. 2006).

No obstante, se ha visto que la ausencia de actividad del sistema OXPHOS no es un obstáculo para la diferenciación celular. Por ejemplo, una línea celular ρ^0 (carente de mtDNA) de rhabdomiocarcinoma humano posee la capacidad de diferenciarse a miotubos (Vergani, Prescott et al. 2000), al igual que ocurre con la diferenciación hacia monocito/macrófago de la línea de leucemia promielocítica HL60 ρ^0 (Herst, Levine et al. 2005). Por otro lado, células madre progenitoras endoteliales (EPSC) derivadas de un ratón *KO* para TFAM, presentan una gran depleción en su mtDNA y ausencia de complejos de la ETC, pero su desarrollo epidermal no se ve impedido (Baris, Klose et al. 2011). Del mismo modo, el tratamiento con oligomicina de las células del neuroblastoma murino C1300 no evita la formación de neuritas ni el incremento de los niveles de proteínas neuroespecíficas, lo que sugiere que la función energética de la mitocondria no es necesaria para su diferenciación (Vayssiere, Cordeau-Lossouarn et al. 1992). Asimismo, otra línea ρ^0 de neuroblastoma humano, la SH-SY5Y,

mantiene la capacidad de diferenciarse a neuronas, ya que expresan una enolasa específica y desarrollan neuritas con gránulos secretorios (Miller, Trimmer et al. 1996).

Por tanto, estos estudios demuestran que, en muchos tejidos, el sistema OXPHOS no es necesario para que se produzca la diferenciación, lo que no implica que alteraciones en dicha maquinaria puedan afectar a los distintos procesos que participan en la dinámica tisular.

IV.3. Xenobióticos que afectan al sistema OXPHOS alteran la diferenciación de hASC a adipocitos

Una de las causas por las que el sistema OXPHOS se puede ver alterado, independientemente de la presencia de mutaciones en el genoma mitocondrial o nuclear, es su interacción, directa o indirecta, tanto con sustancias tóxicas de origen natural (antibióticos, compuestos derivados de plantas, etc.) como con xenobióticos sintéticos (medicamentos, pesticidas, compuestos químicos industriales, etc.).

En esta tesis doctoral se ha demostrado que, paralelamente al proceso de adipogénesis, se produce también una diferenciación mitocondrial, es decir, un cambio en el metabolismo energético y del sistema OXPHOS que facilita la formación de los adipocitos maduros. Por ello, que la función mitocondrial se vea comprometida por acción de estos xenobióticos, puede tener como consecuencia una alteración de la diferenciación adipogénica de las hASC.

IV.3.1. Inhibidores de la actividad de los complejos OXPHOS afectan a la diferenciación adipogénica

Una de estas familias de tóxicos medioambientales que pueden interaccionar con determinados complejos proteicos del sistema OXPHOS es la de las organotinas, catalogadas además como compuestos obesógenos, es decir, que pueden inducir la acumulación de lípidos en las células de forma independiente a la ingesta calórica. En concreto, esta tesis se ha centrado en el estudio de una de ellas, el cloruro de tributiltina (TBTC), analizando sus efectos en la función mitocondrial y en la diferenciación adipogénica de las hASC.

Nuestros resultados muestran un aumento significativo en la cantidad de lípidos intracelulares, proporcional a la concentración de TBTC utilizada, al igual que se observa en otras células madre humanas derivadas de médula ósea (Carfi, Croera et al. 2008), en células 3T3-L1 (Kanayama, Kobayashi et al. 2005) y en células mesenquimales de ratón como las mASC (Kirchner, Kieu et al. 2010) o las C3H10T1/2 (Biemann, Navarrete Santos et al. 2012). Además, este compuesto también afecta a la función madura del adipocito, representada aquí por un aumento en la secreción de leptina, al igual que se había visto en otros estudios (Carfi, Croera et al. 2008).

Durante mucho tiempo se ha pensado que el efecto del TBT sobre la diferenciación de los adipocitos se daba solo a través de rutas genómicas vía PPAR γ y RXR α (Kanayama, Kobayashi et al. 2005). Sin embargo, el papel del TBT como agonista del PPAR γ en las hASC en

su estado indiferenciado es cuestionable, ya que se ha visto que la expresión de este gen antes de la diferenciación es escasa. Ocurre lo mismo en el caso de las MSC de ratón C3H10T1/2, que durante su crecimiento en estado indiferenciado raramente expresan PPAR γ 2. Al exponer estas células a TBT 100 nM se aumentó la expresión de FABP4 y PPAR γ 2 y consecuentemente se incrementaron los niveles de triglicéridos. Sin embargo, el tratamiento con un agonista del PPAR γ 2, la rosiglitazona, no tuvo un efecto significativo en la diferenciación adipogénica. Además, el silenciamiento de PPAR γ tampoco tuvo un impacto adicional al ya observado con el TBT. Por lo tanto, estos resultados sugieren que los mecanismos de adipogénesis inducidos por el TBT son independientes del PPAR γ 2 en células no diferenciadas (Biemann, Fischer et al. 2014) y también, al menos en parte, durante la inducción de la diferenciación en las MSC de ratón BMS2 (Yanik, Baker et al. 2011).

Por otro lado, más recientemente se ha visto que el canal protónico de la F₁F₀ ATP sintasa constituye una diana para el TBT, posiblemente por la formación de un enlace Sn-O entre residuos aminoacídicos cruciales y muy conservados (Grun 2014). Esta unión provoca la inhibición del flujo de protones y la consiguiente reducción en los niveles de ATP intracelular (Matsuno-Yagi and Hatefi 1993, von Ballmoos, Brunner et al. 2004). De acuerdo a esta hipótesis, los resultados de esta tesis sugieren que el TBTC induce la adipogénesis mediante un mecanismo dependiente del sistema OXPHOS, ya que la dosis utilizada es capaz de inhibir el consumo de oxígeno de forma instantánea al administrárselo a las hASC. Resultados similares se habían encontrado en mitocondrias aisladas a partir de distintos modelos animales sometidos al tratamiento con TBTC (Ueno, Kashimoto et al. 2003, Nesci, Ventrella et al. 2011). Además, sus efectos son análogos a los producidos por un inhibidor del CV, la oligomicina. De hecho, se ha publicado que una dosis de oligomicina de 8 nM induce la acumulación de triglicéridos en células 3T3-L1 (Vankoningsloo, Piens et al. 2005). Otros datos sostienen esta teoría, como por ejemplo que el tratamiento de 6 días con TBT 25 nM provoca un descenso significativo en los niveles de ATP, además de una pérdida en la función lítica de células *natural killer* humanas (Dudimah, Odman-Ghazi et al. 2007). Del mismo modo, se ha demostrado que el TBTC disminuye el consumo de O₂, los niveles de ATP, el potencial de membrana interna mitocondrial y la producción de H₂O₂ en cíbridos con fondo genético nuclear de osteosarcoma y adenocarcinoma, afectando en mayor medida a aquellos portadores de una mutación en la ATP sintasa (Lopez-Gallardo, Llobet et al. 2016). En cuanto a los niveles de ROS, en nuestro caso no se observó ningún efecto, como tampoco se ha visto en otros estudios con células procedentes de distintas partes de cerebro de rata (Mitra, Siddiqui et al. 2014).

Por otra parte, la inhibición del CV también explicaría la acumulación de isocitrato dependiente de TBT (Yamada, Kotake et al. 2014), ya que el NAD⁺ necesario para su oxidación no se regeneraría con una ETC inhibida. Mediante esta hipótesis, el TBT no tendría por qué inhibir a la enzima isocitrato deshidrogenasa, lo que concuerda con nuestros resultados.

IV.3.2. Inhibidores de la traducción mitocondrial afectan a la diferenciación adipogénica

Otra forma de alterar el funcionamiento del sistema OXPHOS es mediante la inhibición de la maquinaria de síntesis proteica mitocondrial. Se sabe que algunos antibióticos dirigidos

contra el ribosoma bacteriano también pueden inhibir la síntesis mitocondrial de proteínas (Pacheu-Grau, Gomez-Duran et al. 2010), pero su efecto sobre la diferenciación adipogénica no ha sido estudiado.

En esta tesis se ha visto que un antibiótico ribosomal utilizado de una forma relativamente frecuente en la práctica clínica, el linezolid, altera la diferenciación de las hASC, lo que se evidencia por un descenso en la cantidad de triglicéridos intracelulares y en la secreción de leptina.

Además, el linezolid, como potente inhibidor de la traducción mitocondrial, causó una caída en los ratios CIV/CS e inhibió la síntesis mitocondrial de proteínas. Asimismo, su administración provocó una caída en los niveles de proteínas pertenecientes tanto al complejo respiratorio I como al IV. Llamativamente, el análisis de la composición de los complejos OXPPOS por Blue Native-2D reveló la aparición de subcomplejos formados por distintas subunidades del complejo V sin ensamblar. Estos subcomplejos ya se habían observado en células Rho⁰ así como en pacientes con defectos en la biosíntesis mitocondrial (Carrozzo, Wittig et al. 2006). Además, otros estudios afirman que cualquier condición que afecte de forma negativa a la traducción mitocondrial de proteínas causará la inestabilidad y disociación de los dominios F₁ y F₀ del CV, y por tanto la formación de subcomplejos (Smet, Seneca et al. 2009). Si bien estas publicaciones hacen referencia a mutaciones puntuales en tRNAs, depleción o grandes deleciones del mtDNA, el efecto del linezolid sobre la síntesis de proteínas mitocondriales podría equipararse al que tendrían estos defectos genéticos.

Para tratar de averiguar si estos efectos en la diferenciación se daban como consecuencia de la inhibición de la síntesis proteica, se repitieron los experimentos con otro antibiótico dirigido contra la misma subunidad ribosomal, el cloranfenicol. En cuanto a los parámetros de diferenciación adipogénica se obtuvieron resultados similares, si bien no se observó ningún efecto en la función mitocondrial, probablemente debido a que la concentración de droga utilizada fue muy baja en comparación a otros estudios similares (Pacheu-Grau, Gomez-Duran et al. 2013). Sin embargo, la tinción con Nile Red no disminuyó ni con cloranfenicol ni con linezolid, un resultado similar al obtenido con otro colorante lipofílico en preadipocitos de ratón tratados con cloranfenicol (Vankoningsloo, De Pauw et al. 2006).

Por otro lado resulta destacable que, en esta tesis, el linezolid y el cloranfenicol hicieron disminuir la secreción de leptina pero no afectaron a las otras dos adipoquinas analizadas, adiponectina y FABP4. Anteriormente en la literatura científica ya se había hablado de una regulación diferente de estas adipoquinas en respuesta a la inhibición de la ETC. Por ejemplo, en preadipocitos de ratón tratados con un inhibidor del CI, la capsaicina, disminuyeron los niveles de triglicéridos al igual que ocurrió con el linezolid, pero la expresión de leptina y adiponectina disminuyó y aumentó respectivamente (Hsu and Yen 2007). Del mismo modo, en adipocitos humanos diferenciados a una concentración de oxígeno del 10 %, frente a la del 21 %, se observó la misma tendencia (Famulla, Schlich et al. 2012). Para explicar este hecho puede considerarse que en la secreción de leptina, adiponectina y FABP4 se ven implicados distintos compartimentos intracelulares. De hecho, se sabe que para la secreción de adiponectina se necesitan compartimentos endosómicos, pero no es así para el caso de la leptina (Xie, O'Reilly et al. 2008), mientras que el FABP4 se libera mediante un mecanismo

dependiente de calcio (Schlottmann, Ehrhart-Bornstein et al. 2014). A pesar de todo esto, todavía no existen datos acerca de cómo la actividad mitocondrial puede afectar de forma selectiva a estas rutas de secreción.

Aunque no en la adipogénesis, los efectos de antibióticos que inhiben la síntesis mitocondrial de proteínas ya se habían estudiado en otros procesos de diferenciación celular, como es el caso de la formación de miotubos a partir de mioblastos. En estas publicaciones se demuestra que la tetraciclina (Hamai, Nakamura et al. 1997) o el cloranfenicol (Korohoda, Pietrzowski et al. 1993) inhiben la diferenciación miogénica.

Por otro lado, es importante tener en consideración que, en la práctica clínica, tan solo se permite un periodo de administración de linezolid inferior a 28 días, evitando así la manifestación de numerosos efectos secundarios (Garrabou, Soriano et al. 2007). Sin embargo, lo que nuestros resultados demuestran es que la diferenciación adipogénica en ausencia del antibiótico se ve parcialmente impedida cuando las hASC habían sido tratadas previamente (durante 10 días) con la misma. No obstante, la función mitocondrial consiguió recuperarse. Este efecto tóxico del linezolid, prolongado incluso tras la retirada del mismo, puede explicarse a través de mecanismos epigenéticos, es decir, demostrando que este antibiótico puede llevar a cabo cambios en el estado de metilación del genoma, tal y como confirman nuestros resultados. Al respecto, se ha visto en algunos estudios con plantas que efectivamente determinados antibióticos pueden causar tanto hipermetilación como hipometilación del DNA, teniendo esto consecuencias en el metabolismo celular (Schmitt, Oakeley et al. 1997, Bardini, Labra et al. 2003). Además, también se ha publicado que el mantenimiento de un cierto grado de metilación en los promotores de determinados genes implicados en la adipogénesis (como leptina, FABP4 o PPAR γ 2) es esencial para que se produzca la diferenciación (Boquest, Noer et al. 2006), por lo que una alteración en los mismos podría llevar a una menor proporción de células diferenciadas frente a las indiferenciadas. En concreto, un estudio con hASC demuestra que el tratamiento de las células con dos modificadores epigenéticos inhibidores de la metilación, 5-aza-2'-desoxicitidina y tricostatina A, disminuye la diferenciación adipogénica de las mismas (Zych, Stimamiglio et al. 2013).

Otro dato interesante es que con el tratamiento de linezolid 60 μ M, el ratio CIV/CS y la cantidad de leptina secretada es significativamente menor en las hASC del haplogrupo H10e2 (hASC-2) que en las del haplogrupo T2c1d1a (hASC-1). Estos resultados enfatizan la importancia de la función OXPHOS en la diferenciación de los adipocitos, ya que aparentemente podría ser modificada significativamente en función del haplotipo mitocondrial. En relación a esto, previamente se había visto que cíbridos de osteosarcoma 143B con el alelo m.3010A tratados con linezolid poseían una menor cantidad de productos de traducción mitocondrial y unos menores ratios p.MT-CO1/SDHA y CIV/CS (Pacheu-Grau, Gomez-Duran et al. 2013). La posición de este nucleótido se encuentra en el RNA ribosomal 16S, muy próxima al lugar de unión del linezolid. Aproximadamente un cuarto de la población europea (haplogrupos H1 y J1) tienen la variante m.3010A, y concretamente 4 de las 13 hASC procedentes de distintos donantes analizadas en esta tesis. Sin embargo, en nuestras condiciones de estudio, estos individuos no resultaron ser más sensibles a los efectos inhibitorios del linezolid sobre la diferenciación adipogénica, si bien el experimento sirvió para corroborar la acción del antibiótico independientemente de las hASC particulares

seleccionadas. No obstante, hay que destacar que en el caso de esta tesis, se han utilizado células con distintas variantes mitocondriales, pero también con un nDNA diferente. Además, las condiciones ambientales previas de cada uno de los donantes son desconocidas, por lo que el experimento contaba con muchas variables imposibles de controlar.

IV.3.3. Inhibidores de la replicación del mtDNA afectan a la diferenciación adipogénica

Dado que se ha visto que la inhibición de la síntesis mitocondrial de proteínas puede disminuir la diferenciación adipogénica de las hASC, otras funciones mitocondriales, como por ejemplo la replicación de su mtDNA, constituyen una potencial diana cuya alteración puede afectar a la adipogénesis. De forma análoga a lo que ocurría con los antibióticos ribosomales, otros fármacos utilizados en medicina tienen este tipo de efectos secundarios. Por ejemplo, la terapia antirretroviral resulta muy efectiva para disminuir la incidencia del síndrome de inmunodeficiencia adquirida entre los pacientes infectados por el VIH. Sin embargo, los NRTIs, principal componente de dichas terapias, pueden causar una grave toxicidad mitocondrial, puesto que también inhiben la mtDNA polimerasa- γ .

Previamente ya se había demostrado que los NRTIs podían afectar tanto a la función OXPHOS como a la diferenciación adipogénica, e incluso que el haplotipo mitocondrial influía en la propensión a la lipoatrofia en pacientes que recibían esta terapia (Hendrickson, Kingsley et al. 2009).

En el estudio realizado para esta tesis, el tratamiento con ddC a 0,1 μ M en hASC disminuyó la tinción con Nile Red, la cantidad total de triglicéridos, la secreción de leptina y los niveles de mtDNA, pero no afectó al ratio CIV/CS. Sin embargo, AZT a 6 μ M redujo los niveles de mtDNA e incrementó el ratio CIV/CS (quizás como mecanismo de compensación mitocondrial), pero no alteró el resto de parámetros analizados. Estos resultados son consistentes con el nivel de toxicidad de cada uno de los dos fármacos (Kaguni 2004), ya que el ddC es el más tóxico y por ello ha sido retirado de la práctica clínica, mientras que el AZT es uno de los NRTIs con efectos secundarios más suaves. La toxicidad del ddC puede estar ocasionada por el aumento en la producción de ROS, tanto en las hASC utilizadas en esta tesis como en experimentos *in vivo* con modelos animales (Skuta, Fischer et al. 1999). La inhibición de la adipogénesis también se ha asociado al aumento de ROS en estudios con otros NRTIs (Stankov, Panayotova-Dimitrova et al. 2013).

En el mismo rango de concentraciones, se ha visto que AZT y ddC disminuyen la tinción con Oil Red tanto en preadipocitos murinos como humanos (Caron, Auclair et al. 2004, Walker, Auclair et al. 2006, Stankov, Lucke et al. 2010). AZT a 1 μ M también hizo disminuir los niveles de mtDNA y de p.MT-CO2 en preadipocitos de ratón (Walker, Auclair et al. 2006), lo que no ocurrió en preadipocitos subcutáneos primarios humanos a la concentración de 6 μ M, tampoco alterando las actividades específicas de CIV y CS (Stankov, Lucke et al. 2010). Del mismo modo, ddC a 0,2 μ M en preadipocitos murinos disminuyó la cantidad de mtDNA y p.MT-CO2 (Walker, Auclair et al. 2006). Sin embargo, en el mismo tipo celular humano, aunque a 0,1 μ M hizo decrecer los niveles de mtDNA, no afectó a las actividades específicas de CIV y CS (Stankov, Lucke et al. 2010).

Resulta importante remarcar que los NRTIs afectan tanto a los niveles de mtDNA como a la cantidad de lípidos en diversos tipos celulares procedentes de distintas especies y utilizando diferentes concentraciones y protocolos de diferenciación. Como se ha dicho, la depleción del mtDNA se atribuye a la inhibición de la mtDNA polimerasa- γ por parte de los NRTIs. Curiosamente, esta depleción se acompaña de una disminución en los niveles de p.MT-CO2 y de MIMP en preadipocitos de ratón (Walker, Auclair et al. 2006), pero no en el caso de las hASC utilizadas en esta tesis ni en otros estudios con adipocitos primarios humanos (Stankov, Lucke et al. 2010), en los que no se produce una deficiencia en CIV. Este hecho ya había sido documentado en el caso de pacientes infectados con VIH con lipoatrofia, en cuyo tejido adiposo la actividad de CIV no se encontró alterada a pesar de la depleción en su mtDNA (Kim, Jardel et al. 2008). En relación a esto, una deficiencia en TK2 en humanos también causa un síndrome de depleción del mtDNA (Sun and Wang 2014). Así, ratones portadores de dicha deficiencia muestran una reducción en la cantidad de grasa almacenada así como una marcada disminución de los niveles de leptina (Villarroya, Dorado et al. 2011). Sin embargo, la actividad de CIV no se encontró disminuida en el tejido adiposo blanco de estos ratones, a pesar de que sí se redujeron de forma significativa los niveles de transcritos codificados por el mtDNA y la cantidad de mtDNA total. No obstante, es posible que en este modelo estuvieran preferentemente afectados otros complejos OXPHOS. Una última evidencia acerca de que la depleción del mtDNA disminuye la acumulación de lípidos se encuentra en un estudio con células 3T3-L1 que, al tratarlas con bromuro de etidio (agente intercalante que depleciona el mtDNA), vieron disminuida su tinción con Oil Red O (Ryu, Kim et al. 2013).

Por último, cuando el ddC 0,1 μ M se administró 10 días antes del protocolo de diferenciación, la adipogénesis no se vio alterada, como demuestran todos los parámetros medidos. Sin embargo, la actividad y cantidad de CIV normalizadas por la actividad CS sí que aumentaron significativamente. Curiosamente, esta misma relación entre parámetros de diferenciación y variables mitocondriales es la que se encontró tras el tratamiento con AZT 6 μ M durante el tiempo de diferenciación. En ambos casos, es posible que se haya producido una compensación por parte del sistema OXPHOS para tratar de mejorar los parámetros de diferenciación.

IV.3.4. Los antibióticos que se utilizan en el cultivo celular afectan a la diferenciación adipogénica

La familia de los fármacos antibióticos es muy extensa, por lo que en esta tesis doctoral se ha querido estudiar la influencia en la diferenciación adipogénica de al menos un representante de cada subfamilia.

En primer lugar, ni la ceftriaxona (cefalosporina), la eritromicina (macrólido), la paromomicina (aminoglicósido), ni las tetraciclinas tuvieron un efecto significativo en los parámetros de adipogénesis medidos. De forma análoga, ninguno de estos antibióticos alteró la función mitocondrial de las hASC. Cabe destacar que la inhibición del sistema OXPHOS producida, por ejemplo, por los aminoglicósidos a bajas concentraciones, solo se ha visto en casos muy concretos, como es en presencia de la mutación en el mtDNA m.1555A>G, causante

de una pérdida de audición no-sindrómica (Pacheu-Grau, Gomez-Duran et al. 2011, Pacheu-Grau, Gomez-Duran et al. 2013).

No obstante, llegados a este punto es importante resaltar que algunos de estos antibióticos no se utilizan en la práctica clínica, sino que se administran a las células en los laboratorios de cultivos celulares para evitar la contaminación bacteriana de los mismos.

El efecto de estos antibióticos no se ha estudiado en la diferenciación adipogénica, pero sí en otros tipos de diferenciaciones. Por ejemplo, se ha visto que la penicilina G inhibe la diferenciación de células madre embionarias de ratón (mESC) hacia cardiomiocitos, así como hacia neuronas, osteoblastos y condrocitos (Schaad, Guenin et al. 1988, zur Nieden, Kempka et al. 2004). Sin embargo, la concentración usada en estos estudios (>1300 U/ml) es muy alta, y no resulta comparable a la utilizada normalmente en un cultivo celular (donde suele ser de unas 100 U/ml).

No obstante, a concentraciones que sí se utilizan frecuentemente en el cultivo *in vitro*, se han observado otros efectos biológicos relacionados con los procesos de diferenciación derivados del uso de estos antibióticos. Por ejemplo, la combinación penicilina-estreptomicina (200 U/ml - 50 µg/ml), la estreptomicina aislada (50 µg/ml) o la gentamicina (50 µg/ml), interfieren con la síntesis de sulfatida, un componente de la membrana de mielina que se usa como marcador de diferenciación en cultivos celulares derivados de cerebro de ratones recién nacidos (Amonn, Baumann et al. 1978). Del mismo modo, cultivos tratados con estreptomicina (100 µg/ml), sufren una reducción en la acumulación de cadenas pesadas de miosina (MHC), marcador utilizado normalmente para cuantificar la diferenciación a miocitos de células embrionarias de pollo (Moss, Spector et al. 1984). Finalmente, la mezcla penicilina-estreptomicina (100 U/ml - 100 µg/ml) y la gentamicina (100 µg/ml) causan un descenso en la tasa de crecimiento de mESC, así como una inhibición de la diferenciación a neumocitos tipo II (Cohen, Samadikuchaksaraei et al. 2006).

Para el caso de las hASC, hemos visto que tanto la mezcla penicilina-estreptomicina-anfotericina (PEA) como la gentamicina (GEN) incrementan la intensidad de fluorescencia del colorante lipofílico Nile Red y la secreción de leptina, reflejo de un aumento en la diferenciación adipogénica. Por lo tanto, nuestros resultados confirman que los antibióticos que se utilizan comúnmente en el cultivo celular, a las concentraciones aceptadas por la comunidad científica, pueden afectar a la diferenciación celular. Además, amplían la colección de resultados previos obtenidos en otras especies animales, abarcando de este modo también su uso con células humanas.

Por otro lado, hay que destacar que la mayoría de estos antibióticos pertenecen a la familia de los aminoglicósidos. En relación a éstos, ya se ha comentado que previamente se había visto que determinadas mutaciones en el mtDNA podían incrementar su toxicidad. Sin embargo, en nuestro caso, la ausencia de defectos en el CIV descarta la posibilidad de que la síntesis mitocondrial de proteínas sea la causa de la alteración en la diferenciación celular observada. No obstante, en ausencia de estas mutaciones patológicas del mtDNA, también se ha visto que a altas concentraciones o bien tras periodos largos de exposición, los aminoglicósidos pueden resultar tóxicos.

Este fenómeno puede explicarse a través de las ROS, ya que se ha propuesto que éstas pueden favorecer la diferenciación adipogénica, tanto en la etapa inicial de compromiso como en la diferenciación terminal desde preadipocitos a células adiposas maduras (Tormos, Anso et al. 2011, Atashi, Modarressi et al. 2015, Wang, Zhang et al. 2015). Nuestros resultados de diferenciación adipogénica en presencia de NAC apoyan la idea de que el incremento en los niveles de ROS provocado por los aminoglicósidos es el responsable del aumento de otras variables relacionadas con la diferenciación, como la tinción con Nile Red y la secreción de leptina.

Así pues, el origen de los efectos secundarios de los aminoglicósidos sobre la diferenciación adipogénica se encuentra probablemente en una combinación de factores diferentes. De hecho, los aminoglicósidos son moléculas cargadas positivamente que pueden interactuar con otras con carga negativa, como son los ácidos nucleicos o los fosfolípidos, o incluso inhibir las fosfolipasas (Nagai and Takano 2004, Karasawa and Steyger 2011).

En conclusión, dado que los aminoglicósidos pueden modificar la fisiología celular a través de un gran número de rutas, muchas de ellas desconocidas, la mejor forma de evitar sus efectos fenotípicos indeseados en células en cultivo, sería cultivarlas en ausencia de antibióticos, realmente innecesarios si se trabaja con las técnicas de esterilidad adecuadas.

IV.4. Una alteración del sistema OXPHOS por acción del linezolid provoca cambios en la expresión de ApoE

El tejido adiposo blanco no solo almacena energía en forma de triglicéridos sino que también secreta factores endocrinos, englobados bajo el nombre de adipoquinas. Por tanto, conocer el perfil secretómico de las hASC sin diferenciar, diferenciadas y diferenciadas en presencia de un fármaco inhibidor de la traducción mitocondrial como es el linezolid puede resultar de gran interés para conocer más profundamente los cambios metabólicos que tienen lugar en la célula tras este proceso.

Debido al creciente interés en este campo, existen más de 30 publicaciones recientes en las que se analiza el secretoma de células madre mesenquimales (Skalnikova 2013). Llamativamente, en comparación a la mayoría de estos estudios, los resultados de esta tesis muestran un número muy bajo de proteínas con expresión diferencial entre las hASC sin diferenciar y diferenciadas a adipocitos. Aunque la mayoría de ellos utilizan las técnicas proteómicas básicas de electroforesis bidimensional seguida de la identificación de las proteínas por espectrometría de masas, se pueden encontrar ejemplos de secretoma de preadipocitos humanos analizados por marcaje isotópico iTRAQ en el que se detectan más de 400 proteínas (Zhong, Krawczyk et al. 2010). No obstante, en nuestro caso se ha visto que todas las proteínas poseen un péptido señal de secreción y se ha demostrado la ausencia de lisis celular mediante un ensayo de actividad de la lactato deshidrogenasa, asegurando así que todas las proteínas detectadas eran verdaderamente proteínas secretadas.

La mayor parte de estas proteínas son componentes de la matriz extracelular (ECM), lo que es consistente con la idea ampliamente aceptada de que la composición y rigidez de la ECM son factores que regulan la adipogénesis (Cristancho and Lazar 2011), ya que es necesaria

una remodelación de la misma para pasar de la forma alargada propia de los fibroblastos a la redondeada característica de los adipocitos. Por ejemplo, la diferenciación de las células de ratón 3T3-F442A a adipocitos está inhibida si se cultivan en una matriz de fibronectina, uno de los componentes de la ECM necesario para el ensamblaje de sus redes fibrilares, y dicho efecto puede corregirse por la rotura química (con citocalasina D) del citoesqueleto de actina (Spiegelman and Ginty 1983). Al igual que otros estudios (Chiellini, Cochet et al. 2008), nuestros resultados confirman esta hipótesis, ya que la secreción de fibronectina disminuye con la diferenciación de las hASC a adipocitos, facilitando así el cambio morfológico necesario. Llamativamente, la fibronectina es una de las dos proteínas que ven alterada su expresión al diferenciar las células en presencia de linezolid. Por tanto, la disminución en la diferenciación adipogénica observada al inhibir la síntesis mitocondrial de proteínas mediante la acción de este antibiótico, se acompaña de un incremento en la secreción de fibronectina que, como se ha visto, impide dicho proceso por aumento de la rigidez de la ECM. De hecho, un aumento en la expresión de fibronectina se ha visto en híbridos 143B portadores de la mutación m.3243A>T en el tRNA^{Leu} (Nunes, Peixoto et al. 2015), así como en células ρ^0 (Kulawiec, Safina et al. 2008), lo que justifica el papel del sistema OXPHOS en el metabolismo de dicha proteína.

Por otro lado, un resultado muy interesante de esta tesis doctoral es que, al diferenciar las hASC a adipocitos en presencia de linezolid, la secreción de apolipoproteína E disminuye significativamente respecto a la de las células diferenciadas en ausencia de este antibiótico. La ApoE juega un papel importante en el metabolismo lipídico; su disfunción está asociada al desarrollo de enfermedades cardiovasculares y, según la variante alélica que se posea, constituye un factor de riesgo, ampliamente aceptado por la comunidad científica, para la enfermedad de Alzheimer (Corder, Saunders et al. 1993). Además, su función en la diferenciación adipogénica ha sido evidenciada recientemente, ya que tanto preadipocitos aislados de un ratón *KO* para ApoE como hMSC cuyo gen para ApoE ha sido silenciado, acumulan menos triglicéridos y expresan menores niveles de genes marcadores del linaje adipogénico (Lasrich, Bartelt et al. 2015). Por otro lado, una cierta relación entre el sistema OXPHOS y la expresión de ApoE se ha visto recientemente en otros estudios en los que células ES de ratón con una delección del gen nuclear del complejo I, *NDUFS4*, poseen niveles menores de ApoE en comparación a células control (Johnson, Lee et al. 2016).

Para elucidar el mecanismo de acción del linezolid capaz de alterar el perfil secretómico de los adipocitos, se llevaron a cabo varios ensayos que permitieran localizar qué punto del proceso estaba afectado. Tanto los experimentos de Western blot como los de inmunocitoquímica, junto con el hecho de que la secreción de fibronectina aumenta mientras que la de ApoE disminuye, permiten descartar un defecto general en las rutas de secreción de proteínas. Así, viendo que la producción intracelular de ApoE también está disminuida, el siguiente paso fue comprobar si la expresión del gen que la codifica estaba afectada, lo que así demuestran nuestros resultados.

Como se sabe, el nivel de expresión de un gen puede verse alterado por cambios epigenéticos en el DNA, como por ejemplo la metilación de citosinas (Laird 2010). Anteriormente ya se ha visto en esta tesis que el linezolid es capaz de disminuir los niveles de metilación del genoma de las hASC, tanto si su administración es durante unos pocos días en estado indiferenciado como si se prolonga durante todo el proceso de diferenciación

adipogénica. Resulta remarcable que, según nuestros resultados, dicho proceso se acompaña de un incremento en la metilación de genes, mientras que al tratar con linezolid los niveles caen incluso por debajo de los encontrados en las células sin diferenciar.

IV.5. Perspectivas futuras

A partir de estos últimos resultados, se plantea un problema claro para ser resuelto como continuación de esta tesis doctoral. Se ha visto que el linezolid inhibe la diferenciación adipogénica en las hASC y a su vez afecta a los niveles de ApoE. Así, para explicar estos resultados pueden plantearse dos posibles opciones. Por un lado, la alteración del sistema OXPPOS por acción del linezolid podría reducir la expresión de ApoE y ello causar la reducción en la diferenciación adipogénica observada, es decir, de manera lineal (figura IV.1A). Por otro lado, el linezolid podría alterar la ApoE y la diferenciación mediante dos mecanismos de acción diferentes pero que ocurran de forma paralela (figura IV.1B).

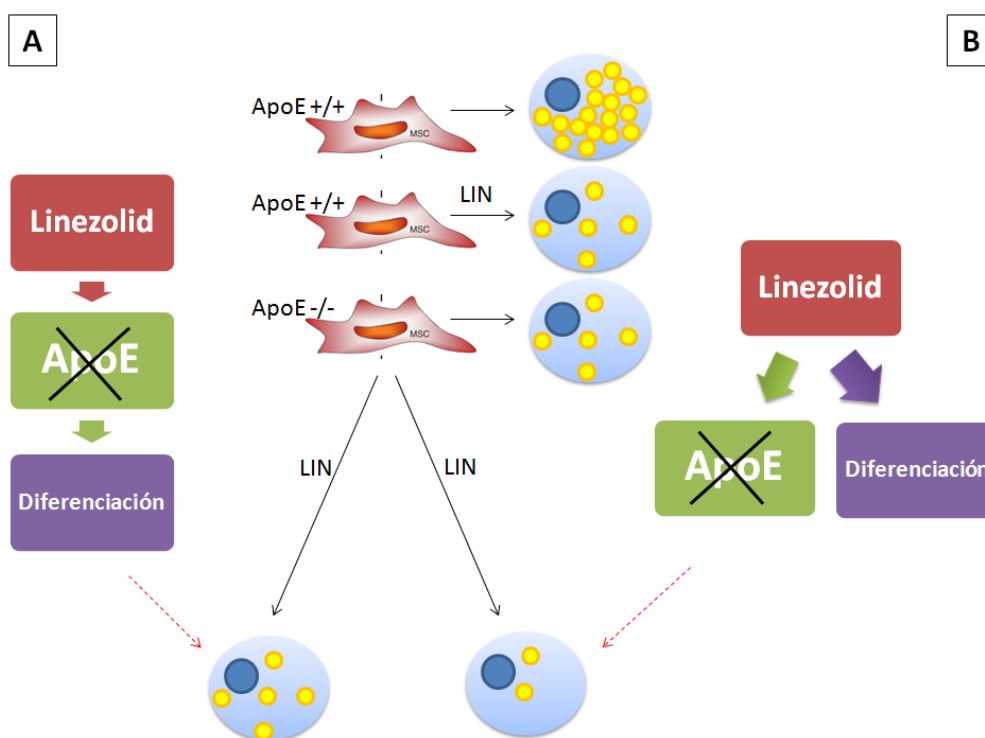


Figura IV.1: Dos posibles hipótesis para explicar el efecto del linezolid sobre ApoE y la diferenciación adipogénica de hASC. Representación esquemática.

Para solventar este problema, también pueden considerarse dos opciones técnicas mediante dos modelos celulares distintos. En primer lugar, podría trabajarse con hASC extraídas de un ratón KO para el gen ApoE (Pendse, Arbones-Mainar et al. 2009). Por otra parte, los nuevos avances en ingeniería genética a través del sistema bacteriano CRISPR/Cas9 (Ran, Hsu et al. 2013) permitirían construir hASC carentes de ApoE. Para ambos modelos, si la hipótesis A es correcta, el linezolid no debería afectar a la diferenciación de estas células,

mientras que para la opción B, el antibiótico disminuiría todavía más la capacidad adipogénica de las mismas. En este punto me gustaría resaltar que al término de la escritura de esta tesis nos encontramos ensayando ambas alternativas, con resultados preliminares satisfactorios.

Por otro lado, para tratar de confirmar que una inhibición de la síntesis mitocondrial de proteínas hace disminuir la diferenciación a adipocito de las hASC, se propone una aproximación distinta al uso de antibióticos ribosomales. En estudios previos se había visto que ASC de ratón *KO* para el factor de traducción y ensamblaje Crif1 veían disminuido su potencial de diferenciación adipogénica al expresar niveles menores de subunidades OXPHOS codificadas por el mtDNA (Ryu, Kim et al. 2013). La proteína ribosomal mitocondrial S12 (MRPS12), codificada en el nDNA, es un componente clave de la subunidad ribosomal pequeña, concretamente del centro decodificador (Demirci, Wang et al. 2013). Así, llevando a cabo el silenciamiento de este gen o bien modificando algún aminoácido clave de su secuencia proteica mediante mutagénesis dirigida (Emperador, Pacheu-Grau et al. 2014), puede inhibirse la traducción mitocondrial, y ver si esto afecta o no a la adipogénesis. Hasta la fecha se ha llevado a cabo la mutagénesis dirigida, la generación de las partículas virales y la infección con ellas de las hASC, por lo que en un futuro próximo ya se podrían realizar los experimentos de diferenciación.

Por último, una vez estudiados los efectos de la inhibición de la traducción mitocondrial por factores ambientales (linezolid) y nucleares (MRPS12), el trabajo se completaría con el análisis de una mutación en el mtDNA que afectara a dicha maquinaria. La transición m.1555A>G en el rRNA ribosomal 12S (gen *MT-RNR1*) causa en humanos sordera no sindrómica, y se ha visto que cíbridos portadores de esta mutación presentan una menor síntesis de proteínas mitocondriales, menor consumo de oxígeno y un mayor tiempo de doblaje que los cíbridos control (Guan, Fischel-Ghodsian et al. 2001). Además, se ha demostrado que la exposición de estas células a aminoglicósidos (paromomicina) agrava el fenotipo de disfunción mitocondrial (Pacheu-Grau, Gomez-Duran et al. 2011). Por tanto, la presencia de esta mutación en las hASC podría causar una diferenciación a adipocitos disminuida, cuyo efecto se haría más notorio al tratarlas con aminoglicósidos. Por el momento en el laboratorio se dispone de una línea hASC extraída de grasa del lóbulo de la oreja de un paciente portador de la m.1555A>G así como de un control sano, ambas con probada capacidad de diferenciación adipogénica.

V. CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

Las conclusiones que se han extraído de la realización de esta tesis doctoral son las siguientes:

1. La diferenciación adipogénica de células madre derivadas de tejido adiposo (hASC) va acompañada de un proceso de biogénesis mitocondrial.
2. Los antibióticos que se utilizan habitualmente en los laboratorios de cultivo celular afectan a la diferenciación de las hASC a adipocitos, por lo que es preferible trabajar en condiciones asépticas en ausencia de antibióticos.
3. Un tóxico ambiental, cloruro de tributiltina (TBTC), estimula la adipogénesis de las hASC de forma similar a un inhibidor de la ATP sintasa (CV), oligomicina, lo que apoya la hipótesis de que dicho complejo sea la diana del TBTC para sus efectos como obesógeno.
4. El antibiótico ribosomal linezolid, como inhibidor de la traducción mitocondrial, disminuye la capacidad de diferenciación adipogénica de las hASC. Del mismo modo, inhibidores de la DNA polimerasa- γ que afectan a la replicación del mtDNA, como los NRTIs, también alteran la adipogénesis.
5. El linezolid provoca cambios en el perfil secretómico de las hASC diferenciadas a adipocito. Concretamente, causa un aumento en la expresión de fibronectina e inhibe la de la apolipoproteína E (ApoE). Además, el linezolid disminuye el estado de metilación global del genoma, por lo que estos cambios epigenéticos pueden ser una de las causas de las alteraciones observadas.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

VI.1. Material y reactivos

VI.1.1. Material biológico y líneas celulares

En el presente trabajo se utilizaron las células *StemPRO*[®] *Human Adipose-Derived Stem Cells* (hASC) de *ThermoFisher Scientific* (células madre adultas), aisladas de tejido adiposo humano recolectado durante procedimientos de liposucción y criopreservadas como cultivo primario. Cada lote de células procedió de un único donante. Estas células pueden diferenciarse a múltiples fenotipos de células maduras *in vitro*, incluyendo adipocitos, osteoblastos y condrocitos. En concreto, durante el desarrollo de esta tesis se adquirieron 3 viales diferentes de células *StemPRO*[®] hASC.

Además, para algunos experimentos se utilizaron hASC obtenidas directamente de tejido adiposo de pacientes, 8 de ellas amablemente cedidas por el Dr. José Miguel Arbonés del Hospital Miguel Servet de Zaragoza, y otras 2 aisladas en nuestro laboratorio. Los datos de los que disponemos acerca de dichos pacientes se muestran en la tabla VI.1.

Muestra	Sexo	Edad	Índice masa corporal	Patologías	Genotipo ApoE
9	Mujer	75	29,2	HTA	E3E3
10	Mujer	42	23,4	-	E3E3
12	Mujer	60	24,2	-	E3E4
15	Mujer	41	20,0	-	E3E3
16	Mujer	77	41,1	HTA/Dislipidemia	E3E3
24	Mujer	53	45,4	-	E3E3
25	Mujer	55	43,5	HTA	E3E3
31	Mujer	32	57,7	-	E3E3
M51	Mujer	51	-	-	-
V85	Varón	85	-	-	-

Tabla VI.1: Datos básicos de pacientes donantes de tejido adiposo para extracción de hASC. HTA denota hipertensión arterial.

También se han utilizado líneas celulares transmitocondriales con fondo nuclear del osteosarcoma 143B, así como su correspondiente línea Rho⁰, carente de DNA mitocondrial.

VI.1.2. Aparatos e instrumentos

FUNCIÓN	NOMBRE	MODELO	MARCA	OBSERVACIONES
Purificación de agua	Destilador	Milli-Ro 4	Millipore	Ósmosis inversa
Esterilización	Estufa	S-201	P-Selecta	Material de vidrio (160 °C, toda la noche)
	Autoclave	437	P-Selecta	Material de plástico y disoluciones (120 °C, 1 atm, 20 min)
Balanzas	Granatario	FA-2000	AND	Precisión 0,1 g
	Balanza analítica	ML204	Mettler Toledo	Precisión 0,001 g
Almacenamiento	Ultracongelador	CFC Free	Sanyo	Muestras biológicas, reactivos, autorradiografías (-80 °C)
	Criopreservador	ESPACE 151-331-661	Air Liquid	Células (Nitrógeno líquido)
	Frigoríficos/Congeladores	Varios modelos	Whirpool, Bosch, Lynx	Reactivos y disoluciones (4 °C/-20 °C)
Manejo de líquidos	Micropipetas	Nichipet EX	Nichiryo	2, 20, 200, 1.000 µl
	Micropipetas multicanal	Finnpipette	ThermoFisher Scientific	50, 300 µl
	Pipeteador	Accu-jet® pro	Brand	1-50 ml
	Jeringas	1701N	Hamilton®	10, 25 µl
Medida de pH	pHmetro	micropH 2000	Crison	
Recuento celular	Contador	Z™Series COULTER COUNTER®	Beckman Coulter	Principio de Coulter
		Countess® Automated Cell Counter	ThermoFisher Scientific	Azul Trypan
Congelación de células	Criocontenedor	Mr. Frosty™	ThermoFisher Scientific	Isopropanol 1 °C/min
Cultivo celular	Incubadores	DHD Autoflow	Nuaire	37 °C, 5 % CO ₂ , atmósfera húmeda
	Cámara de hipoxia	H35 Hypoxystation	Don Whitley Scientific	37 °C, % variable O ₂ , atmósfera húmeda
	Campanas de flujo laminar	LaminAir HB2448	Holten	
		LabGard ES NU-437 Class II, Type A2 Biosafety	Nuaire	

Disgregación de tejidos	Homogeneizador	Eurostar digital	Ika-Werke	
Atemperado	Baño termostatzado	Precistern	Selecta	
	Termobloks	Mulplaces	Selecta	En seco
		Thermomixer 5436	Eppendorf	En seco, con agitación
Bombas	De vacío	Laboport	KnfLab	
		Vacusip	Integra	
	Peristáltica	Ecoline	Ismatec	
Centrífugas	Microcentrífugas	5415R	Eppendorf	Refrigerada
		MiniSpin® plus	Eppendorf	
	A temperatura ambiente	Allegra X-22	Beckman Coulter	
	Termostatzadas	RC 5B PLUS	Sorvall	Rotores HS4 y SS34
		H401	Kontron	Rotores AS4.13 y A8.24
Concentrador a vacío	5301	Eppendorf		
PCR	Termocicladores	Veriti 96 Well Thermal Cycler	Applied Biosystems	
		T3 Thermocycler	Biometra®	
		Mastercycler personal	Eppendorf	
	Real-Time PCR	StepOne™ System	ThermoFisher Scientific	48 pocillos
		StepOnePlus™ System	ThermoFisher Scientific	96 pocillos
Secuenciación	Secuenciador automático	ABI PRISM® 3730	Applied-Biosystems	
Espectrofotómetros	Lector de microplacas	NOVOstar	BMG Labtech	Absorbancia, fluorescencia, luminiscencia
	Nano-drop	ND-1000	ThermoFisher Scientific	Ácidos nucleicos
Electroforesis	Cubetas	Sub-Cell® GT Cell	Bio-Rad	Ácidos nucleicos
		Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad	Western blot
		PROTEAN® II xi Cell	Bio-Rad	Síntesis mitocondrial de proteínas
		XCell SureLock™ Mini-Cell Electrophoresis System	ThermoFisher Scientific	Blue-Native
	Fuentes de alimentación	PowerPac™ Basic	Bio-Rad	10-300 V
		PowerPac™ HC High-Current	Bio-Rad	5-250 V
		PowerPac™ Universal	Bio-Rad	10-500 V

Tratamiento de geles y membranas	Generador de gradiente	Hoefer SG30	Amersham	
	Sistemas de transferencia	Trans-Blot® Turbo™	Bio-Rad	Western Blot
		iBlot® Gel Transfer Device	ThermoFisher Scientific	Blue-Native
	Visualización	Gel Doc™ XR+ System	Bio-Rad	UV
		ODYSSEY® CLx	LI-COR	IR
	Secador de geles	Double-Up Gel Dryer Rack	Bio-Rad	
	Exposición autorradiográfica	Hypercassette™	Amersham	Western blot
Kodak cassette		Kodak	Síntesis mitocondrial de proteínas	
Consumo de oxígeno	Oxígrafo de alta resolución	Oxygraph-2k	OROBOROS Instruments	
Citometría	Citómetros de flujo	Cytomics FC 500	Beckman Coulter	
		FACSAria	BD	Separador
Microscopía	Fluorescencia	FLOID Cell Imaging Station	ThermoFisher Scientific	
	Invertido	DMIL	Leica	Cámara ICC50 HD
	Electrónica (de transmisión)	JEM 1010	Jeol Ltd	100 kV Cámara GATAN BIOSCAN de barrido lento Software DIGITAL MICROGRAPH
	Ultramicrotomo	MT-XL	RMC	Espesores desde 1 nm a 10 µm.
Proteómica	Nano cromatografía líquida	EASY-nLC 1000	ThermoFisher Scientific	
	Espectrómetro de masas tipo trampa iónica	LTQ Orbitrap Velos	ThermoFisher Scientific	

Tabla VI.2: Equipos utilizados en el desarrollo de esta tesis.

VI.1.3. Reactivos

VI.1.3.1. Reactivos generales

Todos los reactivos químicos utilizados fueron de grado analítico o aptos para biología molecular y cultivo celular en su caso. La mayoría de ellos proceden de las casas comerciales Sigma-Aldrich, Bio-Rad, ThermoFisher Scientific, Merck, Roche y Panreac®.

VI.1.3.2. Medios de cultivo

Los medios utilizados en el cultivo celular, así como el suero fetal bovino (SFB), fueron de la casa comercial ThermoFisher Scientific.

VI.1.3.3. Reactivos para PCR

Las Taq polimerasas utilizadas para la reacción de PCR fueron principalmente *RedTaq*TM de Sigma-Aldrich para fragmentos pequeños y la *Taq DNA Polimerase* de Roche para fragmentos mayores. Los reactivos para la qRT-PCR son de Applied-Biosystems (ThermoFisher Scientific). Los oligonucleótidos para la PCR fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies (IDT) y purificados mediante el método del desalado. Los oligonucleótidos y sondas para PCR cuantitativa fueron sintetizados por Applied-Biosystems y purificados por HPLC.

VI.1.3.4. Sondas fluorescentes

Las sondas de fluorescencia utilizadas en citometría de flujo proceden de la casa comercial Molecular Probes (ThermoFisher Scientific) y Enzo Life Sciences. Las sondas para microscopía de fluorescencia (MitoTracker[®] Red y Hoechst 33342) son de ThermoFisher Scientific.

VI.1.3.5. Kits comerciales

NOMBRE	UTILIDAD	CASA COMERCIAL
MycoAlert TM Mycoplasma Detection Kit	Detección de micoplasma	Lonza
BM Cyclin	Eliminación de micoplasma	Roche
Glucosa líquida	Medida del consumo de glucosa	QCA
AdipoRed TM Assay Reagent	Cuantificación de gotas lipídicas intracelulares	Lonza
Adipogenesis Detection Kit	Medida de la cantidad de triglicéridos totales	Abcam
Speedtools tissue DNA extraction kit	Extracción de DNA	Biotoools
NucleoSpin RNA II	Extracción de RNA	Macherey-Nagel
AmpFLSTR [®] Identifiler [®] PCR Amplification Kit	Huella genética	ThermoFisher Scientific
ExoSAP-IT [®] for PCR	Purificación de productos de PCR	Affymetrix
BigDye [®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Secuenciación automática de ácidos nucleicos	Applied-Biosystems
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Retrotranscripción de RNA a cDNA	Roche
TaqMan Gene Expression / Genotyping Master Mix	PCR cuantitativa a tiempo real	Applied-Biosystems
PDARs RNAsa P	PCR cuantitativa a tiempo real	Applied-Biosystems
MethylFlash TM Methylated DNA Quantification Kit (Colorimetric)	Determinación del estado de metilación global	Epigentek
Mito-ID [®] Membrane Potential Cytotoxic Kit	Determinación del potencial de membrana	ENZO [®] Life Sciences
Leptin Human ELISA Kit	Determinación de leptina secretada	Abcam
Adiponectin Human ELISA Kit	Determinación de adiponectina secretada	Millipore
FABP4 Human ELISA Kit	Determinación de FABP4 secretada	Symansis

Isocitrate Dehydrogenase Assay Kit	Determinación de la actividad de la IDH	Abcam
iTRAQ® Reagents	Experimento iTRAQ para estudios de secretoma	AB Sciex
Complex IV Human Duplexing (Activity + Quantity) Microplate Assay Kit	Determinación de actividad y cantidad de CIV	MitoSciences (Abcam)
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Determinación de niveles de ATP	Promega
CellTiter-Blue® Luminescent Cell Viability Assay	Determinación de viabilidad celular	Promega
SuperSignal® West Pico Mouse/Rabbit IgG Detection Kit	Inmunodetección de proteínas	ThermoFisher Scientific

Tabla VI.3: Kits comerciales utilizados en esta tesis.

VI.1.3.6. Geles, membranas y autorradiografías

Para la electroforesis de proteínas y su posterior inmunodetección por Western blot se utilizaron los *Mini-PROTEAN® TGX™ precast gels* y los *Trans-Blot® Turbo™ Mini/Midi PVDF Transfer Packs* de Bio-Rad.

Las películas autorradiográficas utilizadas en la detección de proteínas marcadas radiactivamente con ^{35}S fueron las *Kodak Biomax MR film* de la casa comercial Sigma. Para la detección de proteínas por Western blot, mediante el método de quimioluminiscencia, se utilizaron las películas *Hyperfilm™ ECL* de Amersham. El revelador y el fijador fueron de la marca Kodak.

VI.1.3.7. Anticuerpos

ANTICUERPO	ESPECIE	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL
β -actina	Mc, ratón	1/10.000	Sigma
FABP4	Mc, conejo	1/1.000	ThermoFisher Scientific
ApoE	Mc, ratón	1/1.000	Abcam
Fibronectina	Mc, ratón	1/400	Abcam
MRPL45	Pc, conejo	1/1.000	(Lab. Dr. P. Rehling)
LETM1	Pc, conejo	1/500	(Lab. Dr. P. Rehling)
TIM21	Pc, conejo	1/500	(Lab. Dr. P. Rehling)
NDUFA9	Pc, conejo	1/500	(Lab. Dr. P. Rehling)
NDUFB8	Pc, conejo	1/500	(Lab. Dr. P. Rehling)
COX1	Pc, conejo	1/500	(Lab. Dr. P. Rehling)
COX2	Pc, conejo	1/500	(Lab. Dr. P. Rehling)
COX4-1	Pc, conejo	1/500	(Lab. Dr. P. Rehling)
MITRAC12	Pc, conejo	1/500	(Lab. Dr. P. Rehling)
ATP5B	Pc, conejo	1/500	(Lab. Dr. P. Rehling)
Anti- conejo IgGDyLight™ 680	Cabra	1/15.000	ThermoFisher Scientific

Anti-conejo IgGDyLight™ 800	Cabra	1/15.000	ThermoFisher Scientific
Anti-ratón IgGDyLight™ 680	Cabra	1/15.000	ThermoFisher Scientific
Anti-ratón IgGDyLight™ 800	Cabra	1/15.000	ThermoFisher Scientific
Anti-ratón (H+L) peroxidasa conjugada	Cabra	1/5.000	ThermoFisher Scientific
Anti-conejo (H+L) peroxidasa conjugada	Cabra	1/5.000	ThermoFisher Scientific
Anti-ratón Alexa Fluor 594	Cabra	1/1.000	ThermoFisher Scientific
Anti-conejo Alexa Fluor 594	Cabra	1/1.000	ThermoFisher Scientific

Tabla VI.4: Anticuerpos utilizados en esta tesis. Mc indica monoclonal, Pc indica policlonal.

VI.2. Métodos

VI.2.1. Cultivos celulares

VI.2.1.1. Componentes y medios

Las células hASC se crecieron en general con el medio *MesenPRO RS™* de Gibco (ThermoFisher Scientific), compuesto de un medio basal al 2 % de SFB y 1 g/l de glucosa al que se adiciona, en el momento de su utilización, un suplemento de crecimiento 50X proporcionado por el kit y 2 mM de L-glutamina (GlutaMAX™, ThermoFisher Scientific). En algunos casos se suplementó este medio con 3,5 g/l de D-glucosa (para poder realizar comparaciones con el medio de diferenciación) o con uridina (50 µg/µl) para el cultivo de células rho⁰.

En la diferenciación de las hASC a adipocito, osteocito y condrocito se utilizaron respectivamente los *StemPro® Adipogenesis, Osteogenesis y Chondrogenesis Differentiation Kit*, también de la casa comercial Gibco (ThermoFisher Scientific). Estos kits constan de un medio basal y de un suplemento específico 10X que se adiciona en el momento de su utilización.

Las líneas celulares híbridas construidas a partir del osteosarcoma 143B se cultivaron con *Dubelco's Modified Eagle Medium (DMEM)* de bajo contenido en glucosa (5 mM), suplementado con un 5 % de SFB.

VI.2.1.2. Siembra y cultivo celular

El trabajo con cultivos celulares tuvo lugar en condiciones de esterilidad, utilizando para ello una campana de flujo laminar vertical y tomando todas las medidas necesarias para evitar la contaminación, ya que durante el desarrollo de esta tesis se ha cultivado en ausencia de antibióticos (excepto en aquellos experimentos en los que se quiso evaluar el efecto de los

mismos). Así, el material de vidrio usado en la manipulación de las células se esterilizó a 120 °C en un autoclave durante 20 minutos a 1 atmósfera de presión y los reactivos se filtraron a través de filtros de jeringa *Acrodisc® GHP* de 0,22 µm de tamaño de poro (TPP®).

En general, las hASC se sembraron con una densidad inicial de 5.000 células/cm² en placas Petri de 100 ó 150 mm de diámetro, frascos de cultivo de 25 ó 75 cm² o placas multipocillo de 96, 48, 12 ó 6 pocillos, todas ellas de la marca TPP®. Cuando la finalidad de la siembra era la de realizar un ensayo espectrofotométrico con las células adheridas, se utilizaron placas multipocillo de la marca Nunc™. A todas ellas se añadieron unos 0,2 ml/cm² de medio de cultivo.

Los cultivos se mantuvieron para su crecimiento en un incubador a 37 °C con una atmósfera húmeda al 5 % de CO₂, cambiando el medio de cultivo de forma periódica cada 2-3 días hasta llegar a una confluencia del 80 %. En este punto, las células se lavaron con tampón fosfato (PBS) para eliminar las proteínas del suero que inhiben la tripsina, y posteriormente se incubaron con tripsina 0,05 % - EDTA 0,01 % (*TrypLE™ Express*, ThermoFisher Scientific) durante 2-3 minutos, añadiendo unos 0,033 ml/cm². Tras comprobar con un microscopio invertido que las células se hubieran despegado, se resuspendieron en un volumen de medio 3-5 veces mayor que el volumen de tripsina y se centrifugaron a 1.400 rpm (Beckman Coulter Allegra X-22, rotor SX4250) durante 5 minutos a temperatura ambiente. El pellet celular obtenido fue procesado según el uso que se le fuera a dar.

VI.2.1.3. Congelación y descongelación de células

Para la congelación de células se utilizaron criotubos de 2 ml de capacidad resistentes a N₂ líquido de la marca TPP®.

El pellet celular obtenido por tripsinización se resuspendió en medio de cultivo suplementado con un 20 % de SFB y un 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO), compuesto orgánico que actúa como crioprotector. La cantidad de células congeladas por vial fue de aproximadamente un millón.

Los viales se congelaron inmediatamente en un *Mr. Frosty* a -80 °C y tras 24 horas se pasaron al tanque de N₂ líquido donde se conservaron hasta su posterior utilización. El sistema de congelación *Mr. Frosty* consiste en un contenedor de policarbonato que contiene alcohol isoamílico y que, al ser sometido a congelación, permite un descenso gradual de la temperatura de 1 °C/minuto, lo que favorece una buena conservación celular.

Para la descongelación, se resuspendió el contenido del criotubo en 10 ml de medio de cultivo en un tubo de centrifuga, que se centrifugó a 1.400 rpm (Beckman Coulter Allegra X-22, rotor SX4250) durante 5 minutos para eliminar el DMSO, que resulta tóxico a temperatura ambiente. El pellet celular se disgregó y las células se sembraron en una placa de cultivo adecuada.

VI.2.1.4. Obtención de hASC a partir de tejido adiposo

El tejido adiposo extraído de varios pacientes se recibió sumergido en suero fisiológico e inmediatamente después se llevó a cabo su procesamiento. Dicho tejido se lavó con PBS suplementado con antibiótico y, posteriormente, se troceó en fracciones más pequeñas con ayuda de un bisturí, trabajando en condiciones de esterilidad. Los fragmentos se introdujeron en un tubo con 5 ml de medio de digestión por cada 500-1.000 mg de tejido. Dicho medio se compone de DMEM bajo en glucosa suplementado con antibiótico, 10 mg/ml de albúmina y 1,5 mg/ml de colagenasa tipo II. La mezcla se incubó durante 30-45 minutos a 37 °C con agitación, hasta que el tejido se digirió completamente.

Tras la digestión, se centrifugó el tubo a 1.200 rpm (Beckman Coulter Allegra X-22, rotor SX4250) durante 10 minutos y se retiró el sobrenadante. El pellet resultante se resuspendió en tampón de lisis de glóbulos rojos (NH₄Cl 150 mM, NaHCO₃ 10 mM, EDTA 1,27 mM), se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y se volvió a centrifugar. El pellet se lavó con 10 ml de PBS y se llevó a cabo una última centrifugación.

Las células se sembraron en una placa de cultivo y, al día siguiente, se lavaron dos veces con PBS y se añadió medio fresco para continuar con su expansión de la forma habitual.

VI.2.1.5. Incubación con xenobióticos

Las distintas drogas utilizadas en el desarrollo de esta tesis doctoral fueron las siguientes: oligomicina (OLI), cloruro de tributiltina (TBTC), ceftriaxona (CEF), cloranfenicol (CLOR), 2',3'-dideoxicitidina (ddC), eritromicina (ERI), gentamicina (GEN), linezolid (LIN), penicilina/estreptomicina/anfotericina B (PEA), paromomicina (PAR) y tetraciclina (TET), todas ellas adquiridas en la casa comercial Sigma-Aldrich.

En aquellos ensayos destinados a evaluar el efecto de distintos xenobióticos sobre el sistema de fosforilación oxidativa, éstos se añadieron a la concentración deseada en el medio de cultivo (o medio de diferenciación, en su caso). Para evitar un potencial efecto sobre la adherencia de las células, éstas se sembraron en medio MesenPRO normal en ausencia de tóxicos, que se añadieron unas 8 horas después. El medio fue renovado cada 48 horas hasta que terminó el experimento.

En todos los casos, de forma paralela a los tratamientos, se cultivaron controles de células tratadas únicamente con el vehículo en el que fue disuelta cada droga, con el fin de descartar efectos inespecíficos de los mismos.

VI.2.1.6. Recuento celular

Durante el desarrollo de esta tesis se han utilizado indistintamente dos aparatos de contaje automático de células.

El *ZTMSeries COULTER COUNTER* (Beckman Coulter) se basa en el principio de Coulter, que hace referencia al uso de un campo eléctrico para contar y dimensionar partículas que se

encuentran en suspensión en un líquido conductor. Para ello se resuspendieron 100 µl de suspensión celular en 10 ml de Isotón (solución isotónica en la que se realiza la medida).

El *Countess® Automated Cell Counter* (ThermoFisher Scientific) está diseñado para el conteo de células (rango de concentraciones entre 1×10^4 y 1×10^7 células/ml) y la evaluación de su viabilidad utilizando la técnica estándar del azul tripán, siendo necesaria la misma cantidad de muestra que con un hemocitómetro o cámara de Neubauer. El azul tripán es un colorante capaz de penetrar en las células muertas, ya que éstas presentan su membrana plasmática desestructurada. Así, se mezclaron 10 µl de suspensión celular con la misma cantidad de azul tripán y se pipetearon en el interior de la cámara desechable por duplicado, de manera que las células fueron contadas de forma automática por el aparato en unos 30 segundos.

VI.2.1.7. Análisis y tratamiento de contaminación por *Mycoplasma sp.*

El control de contaminación por micoplasma se llevó a cabo periódicamente a partir de una alícuota del medio de cultivo tras 48 horas de contacto con las células.

El *MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit* de la marca Lonza es un test bioquímico basado en la actividad de determinadas enzimas encontradas en las seis especies más comunes de micoplasma pero ausentes en las células eucariotas. El ensayo consiste en la lisis de los micoplasmas presentes en una muestra, de manera que las enzimas reaccionan con el sustrato proporcionado por el kit, catalizando la conversión de ADP a ATP. Este ATP se transforma en señal luminosa mediante una enzima luciferasa y puede ser medida en un espectrofotómetro. El ratio entre la medida A (antes de la adición del sustrato) y la medida B (después de la adición del mismo) es indicativo de la presencia (>1) o ausencia (<1) de micoplasma. El kit incluye un control positivo liofilizado y un tampón para su reconstitución, que a la vez puede utilizarse como control negativo.

Para eliminar la presencia de micoplasma de las células contaminadas se utilizó el kit *BM Cyclin* de Roche. Este tratamiento consiste en la combinación de dos antibióticos: *BM cyclin 1* (derivado de pleuromitilina), 10 µg/ml, 3 días; y *BM cyclin 2* (derivado de tetraciclina), 5 µg/ml, 4 días. El ciclo se repitió dos veces, tras los cuales se volvió a comprobar la presencia de contaminación.

VI.2.1.8. Cultivo en cámara de hipoxia

Para los experimentos llevados a cabo en hipoxia o normoxia tisular (1-3 % de O₂), se sembraron las células en una campana de flujo laminar, ya que el incubador de hipoxia no permite mantener las condiciones de esterilidad. Pasado el tiempo suficiente para que las células se adhirieran a la placa en el incubador habitual, éstas se transfirieron al incubador de hipoxia *H35* de Don Whitley Scientific.

VI.2.1.9. Diferenciación

VI.2.1.9.1. Adipogénica

Las hASC se sembraron en un soporte adecuado y se crecieron hasta alcanzar un 80 % de confluencia. A partir de este punto se indujo la diferenciación mediante el *StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit* (ThermoFisher Scientific) durante un periodo de 3 semanas, tiempo tras el cual se llevaron a cabo los distintos experimentos. El medio de diferenciación se reemplazó periódicamente cada 2-3 días.

VI.2.1.9.2. Osteogénica

Las hASC se sembraron en un soporte adecuado y se crecieron hasta alcanzar un 50 % de confluencia. A partir de este punto se indujo la diferenciación mediante el *StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit* (ThermoFisher Scientific) durante un periodo de 2 semanas, tiempo tras el cual se llevaron a cabo los distintos experimentos. El medio de diferenciación se reemplazó periódicamente cada 2-3 días.

VI.2.1.9.3. Condrogénica

Las hASC se sembraron en un soporte adecuado y se crecieron hasta alcanzar un 80 % de confluencia. A partir de este punto se tripsinizaron y contaron, resuspendiéndolas a una densidad de 1.6×10^7 células/ml. Para generar cultivos en micromasas, se sembraron gotas de 5 μ l de solución celular en el centro de un pocillo, y pasadas 2 horas se indujo la diferenciación mediante el *StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit* (ThermoFisher Scientific) durante un periodo de 2 semanas, tiempo tras el cual se llevaron a cabo los distintos experimentos. El medio de diferenciación se reemplazó periódicamente cada 2-3 días.

VI.2.1.10. Cariotipado de líneas celulares

Para el análisis citogenético se partió de células en crecimiento exponencial, aproximadamente a un 80 % de confluencia en una placa de 100 mm.

El procedimiento consistió en eliminar el medio de cultivo y añadir medio con colchicina (0,5 μ g/ml), que se incubó durante 4 horas a 37 °C. Pasado este tiempo se tripsinizaron las células y se centrifugaron, resuspendiendo el pellet en 2 ml de medio salino hipotónico (KCl 0,075 M), evitando la formación de burbujas. Una vez resuspendido se añadieron otros 3 ml y se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Inmediatamente después se añadieron 3 gotas de fijador Carnoy (metanol/ácido acético 3:1) y se llevó a cabo una nueva centrifugación para obtener el pellet. Éste se resuspendió en 2 ml de fijador Carnoy, añadiendo 3 ml más como en el paso anterior. Tras una incubación de 20 minutos a temperatura ambiente se centrifugó y se repitió de nuevo el lavado con 5 ml de fijador Carnoy. Por último, se resuspendió el sedimento celular en 0,5 ml de fijador Carnoy.

El cariotipado fue realizado por el servicio de genética de los Laboratorios Durán Bellido de Barcelona. Se utilizó la técnica de bandejo G con tinción Wright y se capturaron y analizaron al menos veinte metafases para cada tipo celular. La cantidad de cromosomas obtenidos se representó como la media de cromosomas \pm desviación estándar y número modal.

VI.2.1.11. Estudios de proliferación celular: curvas de crecimiento

Las hASC se sembraron a una densidad de 20.000 células/pocillo en placas de 6 pocillos y, tras un periodo de 2-4 horas para que se adhirieran a la placa, se cambió el medio de cultivo pasando a las condiciones de estudio. Los contajes se realizaron a tiempo 0, 24, 48 y 72 horas, siguiendo el protocolo descrito anteriormente (ver apartado VI.2.1.6.), cada uno de ellos por triplicado.

Para calcular el tiempo de duplicación celular se representó gráficamente el número de células frente al tiempo transcurrido y se ajustó a una curva exponencial del tipo:

$$N = a \cdot e^{bt}$$

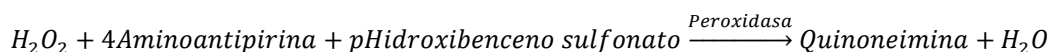
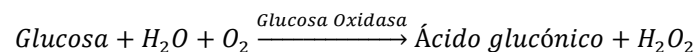
donde N es el número de células y t el tiempo expresado en horas. A partir de esta ecuación, el tiempo de duplicación (DT) se obtuvo utilizando la fórmula:

$$DT = \ln 2/b$$

VI.2.1.12. Estudio del consumo de glucosa

Se midió el consumo de glucosa a lo largo del tiempo de las hASC así como para un híbrido del haplogrupo H con fondo nuclear de 143B (osteosarcoma). Para ello, se sembraron las células y se recogieron muestras del sobrenadante a tiempo cero y cada 6 horas, durante un tiempo total de 72 y 48 horas respectivamente (tiempo tras el cual se renueva el medio en el cultivo habitual de cada uno de los dos tipos celulares). Dichas muestras se almacenaron a -80°C hasta el momento de realizar la medida.

Para ello, se utilizó el reactivo de Tindler (kit *Glucosa Líquida*, QCA), mediante el cual tienen lugar las siguientes reacciones:



Inicialmente se realizó una recta patrón partiendo de una solución de glucosa 25 mM, mezclando 2 μl de muestra con 180 μl del reactivo, y midiendo la absorbancia a 505 nm. Posteriormente se midieron todas las muestras y se interpolaron en dicha recta los valores de absorbancia obtenidos.

VI.2.1.13. Tinciones específicas

VI.2.1.13.1. Oil Red O

Las células se fijaron con una solución de formaldehído al 4 % en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras varios lavados, se tiñeron durante 30 minutos a 37 °C con una solución de Oil Red O (tinción específica de lípidos, Sigma) 16 µM en isopropanol. Las células se lavaron con isopropanol al 60 % y agua destilada, y finalmente se tomaron fotografías en un microscopio invertido.

VI.2.1.13.2. Alizarin Red

Las células se fijaron con una solución de formaldehído al 4 % en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras varios lavados, se tiñeron durante 5 minutos a temperatura ambiente con una solución de Alizarin Red S (tinción específica de calcio, Sigma) 30 mM en agua. Las células se lavaron con agua destilada y finalmente se tomaron fotografías en un microscopio invertido.

VI.2.1.13.3. Toluidine Blue

Las células se fijaron con una solución de formaldehído al 4 % en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras varios lavados, se tiñeron durante 5 minutos a temperatura ambiente con una solución de Toluidine Blue (tinción específica de mucopolisacáridos, Sigma) al 1 % en etanol al 70 %. Las células se lavaron con agua destilada y finalmente se tomaron fotografías en un microscopio invertido.

VI.2.1.14. Cuantificación de gotas lipídicas intracelulares

AdipoRedTM es una solución del colorante hidrofílico Nile Red, que en un ambiente hidrofóbico pasa a ser fluorescente. Puede utilizarse para determinar la acumulación de triglicéridos en forma de gotas intracelulares como marcador de la diferenciación a adipocito.

Las células se sembraron a una densidad de 30.000/cm² en placas NUNC de 12 pocillos y se diferenciaron durante 3 semanas. Pasado este tiempo, se vaciaron los pocillos y se lavaron las células con 1 ml de PBS. Después, se añadieron 2 ml de PBS y 60 µl de AdipoRed a cada pocillo. Tras una incubación de 15 minutos se leyó la placa en el fluorímetro, midiendo la fluorescencia a 485 nm de excitación y 572 nm de emisión. Los resultados se expresaron como unidades relativas de fluorescencia (RFU).

VI.2.1.15. Medida de la cantidad de triglicéridos totales

El *kit* de detección de adipogénesis de Abcam cuantifica la acumulación de triglicéridos en células y tejidos. En este ensayo los triglicéridos se solubilizan e hidrolizan a glicerol, que es

oxidado a la vez que la sonda genera color ($\lambda_{\text{máx}} = 570 \text{ nm}$) y fluorescencia (Ex/Em = 535/587 nm). El *kit* puede detectar triglicéridos en un rango lineal de 0,2 a 10 nmoles.

Las células cultivadas en placas de 6 pocillos se tripsinizan y el pellet resultante se resuspende en 100 μl de la solución de extracción de lípidos proporcionada por el *kit*. A continuación, se transfieren 20 μl de los extractos lipídicos a una placa de 96 pocillos, cargando cada muestra por triplicado, y se lleva a un volumen final de 50 μl con el tampón adecuado. Del mismo modo, a partir de un estándar de triglicéridos 0,2 mM, se construye una recta de calibrado cargando 0, 10, 20, 30, 40 y 50 μl (0, 2, 4, 6, 8, 10 nmoles/pocillo) por triplicado en el caso del ensayo colorimétrico (para el fluorimétrico se diluye previamente el estándar 10 veces, ya que la técnica es más sensible).

A cada pocillo conteniendo muestra o estándares se le añaden 2 μl de lipasa y se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente para convertir los triglicéridos en glicerol y ácidos grasos. Pasado este tiempo, se prepara un *mix* de reacción que contiene, para cada pocillo, 46 μl de tampón, 2 μl de sonda (0,2 μl para el ensayo fluorimétrico) y 2 μl de mezcla enzimática. Se mezcla bien y se incuba durante 30 minutos a 37 °C, protegido de la luz.

Finalmente se mide la densidad óptica a 570 nm en un lector de microplacas.

VI.2.1.16. Toma de imágenes mediante FLoid: inmunofluorescencia

La estación de imagen EVOS® FLoid®Cell Imaging Station de ThermoFisher Scientific permite la captación de imágenes celulares en tres colores de fluorescencia (azul, verde y rojo) de forma rápida y sencilla. El sistema permite tomar las imágenes de la propia placa de cultivo, incluso de células vivas.

VI.2.1.16.1. Tinción con MitoTracker® Red

MitoTracker es un colorante fluorescente que tiñe las mitocondrias en células vivas, ya que su acumulación depende del potencial de membrana. Esta tinción es resistente tras la fijación de las células con formaldehído.

Las células adheridas a cualquier soporte de cultivo se lavaron con PBS y se incubaron con una solución de MitoTracker 100 nM en medio de cultivo durante 30 minutos a 37 °C.

Pasado este tiempo se visualizaron en el sistema FLoid de ThermoFisher Scientific, utilizando el canal rojo (Em= 646/68 nm, Ex= 586/15 nm).

A continuación, se tiñeron los núcleos con el colorante de ácidos nucleicos *Hoechst 33342*, añadiendo 1 gota/ml de la solución comercial (Molecular Probes, ThermoFisher Scientific). La incubación tuvo lugar durante 20 minutos a temperatura ambiente, y la visualización se hizo a través del canal azul (Em= 446/33 nm, Ex= 390/40 nm).

VI.2.1.16.2. Inmunofluorescencia

Las células en cultivo se lavaron con PBS y se fijaron durante 15 minutos a temperatura ambiente con una solución de paraformaldehído al 4 %. Pasado este tiempo, se lavaron con PBS y se permeabilizaron con el detergente Tritón X-100 al 0,1 % durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se bloquearon las uniones inespecíficas con una solución de BSA al 0,1 %, incubando durante 15 minutos a temperatura ambiente.

El anticuerpo primario, diluido en la solución de bloqueo a la concentración deseada, se incubó una hora a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario se diluyó 1:1.000 en la solución de bloqueo y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, las células teñidas se lavaron varias veces con PBS y se visualizaron a través del sistema FLoid.

En todos los casos se llevó a cabo paralelamente un control de anticuerpo secundario (mismo procedimiento pero sin la incubación con anticuerpo primario) para descartar la existencia de uniones inespecíficas con el mismo.

La tinción nuclear en los casos que requieren la fijación de células se realizó con el colorante de ácidos nucleicos DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), utilizándolo a una concentración de 1 μ M en el propio medio de cultivo, durante unos 10 minutos de incubación. La visualización se hizo a través del canal azul (Em= 446/33 nm, Ex= 390/40 nm).

VI.2.1.17. Microscopía electrónica

Las hASC se sembraron a una densidad de 5.000 células/pocillo en 2 cámaras *Lab-Tek*[®] de 8 pocillos de la marca Nunc[®]. En una de las cámaras se indujo la diferenciación adipogénica durante 3 semanas. Pasado este tiempo, las células se fijaron mediante el siguiente protocolo.

En primer lugar se eliminó el medio de cultivo y se realizaron 3 lavados de 2 minutos con PBS 0,1 M. Para la fijación se añadió glutaraldehído al 2,5 % en PBS 0,1 M, incubándolo durante 5 minutos a 37 °C, tiempo tras el cual se sustituyó por glutaraldehído al 2,5 % fresco y se mantuvo durante 1-2 horas a 4 °C. Finalmente, se realizaron 4 lavados de 5 minutos con PBS 0,1 M y se conservaron las preparaciones en PBS 0,1 M con 0,05 % de azida de sodio a 4 °C.

Las muestras fueron procesadas y visualizadas en el Servicio de Microscopía Electrónica de Sistemas Biológicos de la Universidad de Zaragoza.

VI.2.2. Extracción, manipulación y análisis de ácidos nucleicos

VI.2.2.1. Aislamiento de DNA total a partir de cultivos celulares

VI.2.2.1.1. Con fenol-cloroformo

Se resuspendió el pellet celular obtenido por tripsinización y lavado con PBS en 250 μ l de tampón TE 10:1 (TRIS-HCl 10 mM, EDTA 1 mM), sobre el cual se añadieron 5 μ l de SDS (25 %) y 1,25 μ l de proteinasa K (20 mg/ml). La mezcla se incubó a 37 °C durante toda la noche.

Al día siguiente se llevaron a cabo dos procesos de extracción con 1,5 volúmenes de fenol-IAC (fenol-cloroformo-alcohol isoamílico 25:25:1) y un tercero con 1,5 volúmenes de alcohol isoamílico-cloroformo (24:1). Finalmente se añadieron dos volúmenes de etanol frío (-20 °C) para que tuviera lugar la precipitación del DNA. En el caso de que no se formara ovillo, se dejó precipitar a -80 °C durante una hora y se centrifugó a 4 °C durante 30 minutos. El etanol se evaporó en un concentrador.

El DNA se resuspendió durante toda la noche en 100 μ l de agua destilada estéril, por agitación en un *termoblock* a 37 °C.

VI.2.2.1.2. En columna

El *Speedtools DNA extraction kit* permite una rápida y eficiente extracción de DNA genómico de alta calidad procedente de diversas muestras (cultivos celulares, sangre, suero, plasma u otros fluidos orgánicos). Este *kit* permite la purificación de hasta 35 μ g de DNA genómico con una relación A260/280 de entre 1,7 y 1,9. El DNA obtenido está listo para usarse en reacciones tales como PCR, transferencia de Southern, y otras reacciones enzimáticas.

En este caso se resuspendió el pellet celular, obtenido por tripsinización y lavado con PBS, en dos tampones de lisis diferentes y en presencia de proteinasa K. El homogenado se incubó a 70 °C durante 15 minutos. La adición de etanol en el segundo paso de extracción crea las condiciones necesarias de unión del DNA a las partículas de sílice de la columna. El paso de unión del DNA es específico además de reversible. Los contaminantes presentes en la muestra son eliminados mediante sucesivos lavados de la columna con diferentes tampones. Finalmente el DNA es eluído en agua estéril libre de DNAsas, atemperada a 70 °C.

VI.2.2.2. Aislamiento de RNA total a partir de cultivos celulares

El RNA total a partir de células en cultivo se extrajo utilizando el *kit NucleoSpin RNA II* de Macherey-Nagel. Este *kit* permite la purificación de hasta 70 μ g de RNA total libre de DNA, apto para diversas aplicaciones como qRT-PCR o Northern blot.

Las células en cultivo se recogieron por tripsinización, se lavaron con PBS frío y se guardaron a -80 °C para evitar diferencias entre muestras frescas y congeladas. En el momento de la extracción se siguieron las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células se lisaron

por incubación en una solución que contiene una gran cantidad de iones caotrópicos, a la vez que inactiva las RNAsas presentes y crea unas condiciones de unión favorables a la membrana de sílice. Tras la lisis, las muestras se homogeneizaron y se redujo su viscosidad mediante el sistema de filtración proporcionado por el kit. El DNA unido a la columna se eliminó añadiendo una solución de rDNAsa. Las sales, metabolitos y otros componentes celulares se eliminaron mediante varios pasos de lavado con diferentes tampones. Finalmente, el RNA fue eluído con agua libre de RNAsas.

VI.2.2.3. Cuantificación de ácidos nucleicos

Para la cuantificación del DNA o RNA se utilizó un espectrofotómetro *Nano-drop* y su programa informático asociado, el cual mide la absorbancia a 260 nm para cuantificar la cantidad de DNA/RNA, y a 230 y 280 nm para calcular la pureza de dicha muestra (valor óptimo ratio 260/280 = 1,8-2). En todos los casos se depositaron sobre el orificio de medida 2 µl de muestra. En primer lugar se hicieron dos medidas con agua destilada, la segunda de ellas para fijar el valor de blanco. Tras esto se añadió la solución de DNA o RNA a cuantificar y el programa informático calculó la concentración del mismo (en ng/µl). Para finalizar también se realizaron dos medidas con agua destilada para eliminar los restos de ácidos nucleicos.

VI.2.2.4. Huella genética

El *AmpFISTR® Identifiler® PCR Amplification Kit* de ThermoFisher Scientific es un ensayo *multiplex* de repeticiones cortas en tándem (STR, del inglés Short Tandem Repeat) que amplifica 15 loci de repetición de tetranucleótidos y el marcador determinante de género Amelogenina, en una única reacción de PCR. Entre ellos se encuentran los 13 loci requeridos por el CODIS (Combined DNA Index System) (Budowle and Allen 1998) y dos más adicionales (D2S1338 y D19S433). La siguiente tabla muestra los loci amplificados, sus localizaciones cromosómicas y sus correspondientes marcajes fluorescentes.

Loci	Localización cromosómica	Alelos incluidos en el <i>AmpFISTR® Identifiler® PCR Amplification Kit</i>	Marcaje
D8S1179	8	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	6-FAM™
D21S11	21q11.2-q21	24, 24.2, 25, 26, 27, 28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36, 37, 38	
D7S820	7q11.21-22	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	
CSF1PO	5q33.3-34	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	
D3S1358	3p	12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	VIC®
TH01	11p15.5	4, 5, 6, 7, 8, 9, 9.3, 10, 11, 13.3	
D13S317	13q22-31	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	
D16S539	16q24-qter	5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	
D2S1338	2q35-37.1	15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28	NED™
D19S433	19q12-13.1	9, 10, 11, 12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 17.2	
vWA	12p12-pter	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24	
TPOX	2p23-2per	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13	
D18S51	18q21.3	7, 9, 10, 10.2, 11, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27	

Amelogenin	X: p22.1-22.3 Y: p11.2	X, Y	PET®
D5S818	5q21-31	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16	
FGA	4q28	17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26.2, 27, 28, 29, 30, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 47.2, 48.2, 50.2, 51.2	

Tabla VI.5: Loci amplificados para llevar a cabo la huella genética o los perfiles STR de las células utilizadas.

En este caso, se enviaron 100 ng de DNA, extraído a partir del cultivo celular siguiendo el protocolo detallado anteriormente (ver apartado VI.2.2.1.), a la Unidad de Genómica de la Universidad Complutense de Madrid, donde se llevaron a cabo los análisis.

VI.2.2.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción de PCR se llevó a cabo a partir de las muestras de DNA total, aislado como se ha descrito anteriormente (ver apartado VI.2.2.1.), disuelto en agua hasta una concentración aproximada de 100-500 ng/ μ l.

Las condiciones de la PCR varían en función de las características de la región de DNA que se desea amplificar y de la enzima DNA polimerasa utilizada. La reacción se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones del fabricante, generalmente con la enzima *RedTaq*TM DNA Polimerasa de Sigma-Aldrich, realizándose en tubos de 200 μ l y en un volumen final de 50 μ l que contenía los siguientes componentes:

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN (μ l)
Tampón (Tris-HCl 100 mM pH 8,3, KCl 500 mM, gelatina 0,1 %)	10X	5
MgCl ₂	25 mM	2
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y TTP)	10 mM (cada uno)	2
Oligonucleótidos	25 μ M	1
REDTaq polimerasa	1 U/ μ l	1
H ₂ O	-	hasta 50

Tabla VI.6: Mezcla de reacción para la PCR.

Para minimizar el error debido a la manipulación de volúmenes pequeños y para facilitar el trabajo, se preparó una mezcla previa que contenía todos los reactivos necesarios para todas las muestras excepto el DNA. Para comprobar la ausencia de contaminación durante la preparación de los reactivos, en cada experimento se utilizó, además de las muestras, un tubo adicional que contenía la mezcla de reacción, pero que carecía de DNA (blanco).

Se estableció una temperatura de hibridación adecuada para cada par de oligonucleótidos empleados. Las condiciones generales de amplificación fueron las siguientes:

- 94 °C – 5 min
 - 94 °C – 45 s
 - Tª hibridación – 45 s
 - 72 °C – 45 s
 - 72 °C – 5 min
 - 4 °C – ∞
- } 35 ciclos

Las secuencias de oligonucleótidos utilizados durante el presente trabajo, así como las temperaturas de hibridación a las que se emplearon, se muestran en los apartados correspondientes a cada finalidad.

VI.2.2.6. Separación electroforética de ácidos nucleicos: geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio

Para comprobar la amplificación del material genético mediante PCR se utilizaron geles horizontales de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

La agarosa se fundió en un horno microondas en tampón TBE (Tris 50 mM, Ácido Bórico 50 mM, EDTA-Na 1 mM, pH 8,3), a un porcentaje de entre 0,5 y 2,5 de agarosa, dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar. A esta solución se le añadió el bromuro de etidio (1 µg/ml) y se dejó gelificar en las camas de 50 ó 100 ml de la marca Bio-Rad.

La carga de las muestras se realizó mezclando 5 µl de los productos de amplificación con unos 2 µl de tampón de carga (Ficoll 400 al 15 %, azul de bromofenol al 0,2 %, en tampón de electroforesis). Se confirmó el tamaño de las bandas utilizando marcadores de peso molecular de 1, 12 ó 23 Kb, de la casa comercial Roche.

La separación electroforética se llevó a cabo a 100 V durante unos 30 minutos. El resultado se visualizó tras la exposición del gel a una fuente de radiación ultravioleta (Gel Doc™, Bio-Rad).

VI.2.2.7. Secuenciación completa del mtDNA

Se llevó a cabo la extracción del DNA a partir de cultivos celulares para la posterior secuenciación de su DNA mitocondrial mediante el método de secuenciación Sanger. Para ello se amplificó el mtDNA en 10 fragmentos solapantes de entre 955 y 2811 pares de bases. Los oligonucleótidos utilizados para amplificar cada uno de los fragmentos, así como el tamaño de los mismos, fueron los siguientes:

FRAGMENTO	OLIGO 5'-3'	HEBRA	SECUENCIA 5'-3'	AMPLICIÓN (pb)	Tª HIBRIDACIÓN
F1	hmtL 569	L	AACCAAACCCCAAAGACACC	2.452	58 °C
	hmtH2982	H	CTGATCCAACATCGAGGTCCG		
F2	hmtL2797	L	GTCCTAAACTACCAAACCTGC	2.417	58 °C
	hmtH5174	H	GTGTTAGTCATGTTAGCTTG		
F3	hmtL5061	L	AGCAGTTCTACCGTACAACC	2.476	58 °C
	hmtH 7497	H	TTTGAAAAAGTCATGGAGGCC		
F4A	hmtL7336	L	GATTTGAGAAGCCTTCGCTTC	955	62 °C
	hmtH 8251	H	GCTATAGGGTAAATACGGGC		
F4B	COIL 8018	L	CCGATTGAAGCCCCATTTCG	1.272	62 °C
	COH9250	H	GGGCTGGGTTTTACTATATG		
F4C	hmtL 8815	L	CTCATTTACACCAACCACCC	1.140	62 °C
	L6H	H	CTTCGAAGCCAAAGTGAT		
F5	hmtL 9611	L	TCCCACTCTAAACACATCC	2.539	58 °C
	hmtH 12111	H	AAACCCGGTAATGATGTCGG		
F6	L1L	L	TACTCTTCAATCAGCCACAT	2.811	62 °C
	hmtH 14559	H	GATTGTTAGCGGTGTGGTCG		
F7	hmtL 14130	L	TCTTCCCACTCATCCTAACC	2.590	58 °C
	hmtH 112	H	ACAGATACTGCGACATAGGG		
F8	hmtL 15591	L	TTCGCCTACACAATTCTCCG	1.643	58 °C
	hmtH 626	H	TTTATGGGGTGATGTGAGCC		

Tabla VI.7: Fragmentos solapantes para la secuenciación completa del mtDNA.

Para la amplificación de dichos fragmentos se preparó una mezcla con los siguientes componentes:

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN (µl)
Tampón (TRIS 100 mM, MgCl ₂ 15 mM, KCl 500 mM, pH 8,3)	10X	5
dNTPs	10 mM (cada uno)	1
Oligonucleótidos	25 µM	0,5
Taq polimerasa Roche	5 U/µ	0,25
H ₂ O	-	hasta 50

Tabla VI.8: Mezcla de reacción para la PCR de amplificación de los fragmentos de secuenciación.

El programa térmico que debe llevar a cabo el termociclador es el siguiente:

- 94 °C – 5 min
 - 94 °C – 45 s
 - 56 °C – 30 s
 - 72 °C – 3 min
 - 72 °C – 5 min
 - 4 °C – ∞
- } 35 ciclos

Tras comprobar por electroforesis (gel de agarosa al 1 %) la correcta amplificación de cada fragmento (incluyendo un blanco sin DNA para cada uno de ellos y viendo que no hay

contaminación), se deben purificar las muestras. Para ello se mezclaron 8 μ l de ExoSap-It (exonucleasa I y fosfatasa alcalina) con 20 μ l de muestra (2 μ l de reactivo por cada 5 μ l de DNA), y se programó el termociclador con las siguientes temperaturas y tiempos:

- 37 °C – 15 min
- 80 °C – 15 min
- 4 °C – ∞

Tras este paso, las muestras se enviaron al servicio de secuenciación automática de la Universidad Complutense de Madrid. Los oligonucleótidos utilizados para la secuenciación fueron los mismos empleados para obtener los amplificadores por PCR.

Para analizar las secuencias recibidas se utilizó el programa informático Sequencher v 4.1.4. Este programa permite el alineamiento de varias secuencias y detectar cambios en las mismas, ya sean cambios de base, deleciones o inserciones.

Se alinearon todas las secuencias (solapantes entre sí) con una secuencia de referencia del mtDNA completo (NC_012920) (Andrews, Kubacka et al. 1999) y se vieron todos y cada uno de los polimorfismos presentes en las células de estudio.

Las variantes en el mtDNA de la muestra se compararon con un árbol filogenético que incluye más de 20.000 secuencias (van Oven and Kayser 2009).

VI.2.2.8. Detección de polimorfismos en el mtDNA mediante PCR cuantitativa a tiempo real

Una forma de determinar la presencia o ausencia de polimorfismos o mutaciones puntuales en el mtDNA es la utilización de la PCR cuantitativa a tiempo real. Esta técnica permite la detección y cuantificación de una sonda fluorescente cuya señal aumenta en proporción directa a la cantidad de producto de PCR durante la reacción.

En el desarrollo de esta tesis se utilizó, en todos los casos, la tecnología TaqMan[®], que permite medir la producción de productos de PCR mediante un sistema de sondas marcadas mediante dos fluorocromos. Su utilidad radica en que poseen un fluoróforo en su extremo 3' y una molécula en el 5' que bloquea su emisión de fluorescencia (denominada en inglés *quencher*); esta sonda marcada hibrida específicamente en la parte central del producto de PCR a obtener. De este modo, cuando se efectúa la PCR (con la sonda más el par de cebadores específicos), la sonda hibrida en el amplicón pero, debido a la cercanía del fluoróforo al *quencher*, no se emite fluorescencia; cuando la polimerasa se topa con la sonda la hidroliza mediante su actividad exonucleasa 5'-3', lo cual provoca la separación del *quencher* del fluorocromo y, por tanto, la emisión de fluorescencia, que está relacionada con la cantidad de amplicón producido (Heid, Stevens et al. 1996).

En este caso las sondas son idénticas en secuencia excepto en la posición del polimorfismo de interés para cada caso; una sonda tendrá el nucleótido complementario a la base del alelo salvaje y la otra el complementario a la base del alelo mutante. Sólo hibridará

aquella sonda que porte el nucleótido complementario al alelo presente para el polimorfismo de interés.

Se trabajó utilizando placas de 48 pocillos de Applied Biosystems, añadiendo a cada uno de ellos los reactivos que se muestran en la siguiente tabla:

COMPONENTE	Concentración final	Volumen reacción
TaqMan® Genotyping MasterMix	1X	12,5 µl
Mix sonda/ oligonucleótidos	1X	0,66 µl
Agua	-	9,875 µl
DNA	10 ng / µl	2 µl

Tabla VI.9: Mezcla de reacción para la detección de polimorfismos por PCR a tiempo real.

En todos los casos se utilizó un control positivo y un control negativo para el polimorfismo de interés, además de un blanco sin DNA para comprobar la ausencia de contaminación.

Las reacciones tuvieron lugar en el StepOne™ System de Applied Biosystems con las siguientes condiciones:

- 60 °C – 30 s
 - 95 °C – 10 min
 - 95 °C – 15 s
 - 60 °C – 1 min
- } 40 ciclos

VI.2.2.9. Cuantificación del número de copias de mtDNA mediante PCR cuantitativa a tiempo real

La medida de los niveles de mtDNA se basó en la técnica de sondas TaqMan® (Marcuello, Gonzalez-Alonso et al. 2005), también denominadas sondas de hidrólisis (Bustin, Benes et al. 2009), y consiste en la determinación simultánea del genoma mitocondrial y el nuclear. La sonda mitocondrial (fluoróforo FAM) está diseñada para que hibride en una zona muy conservada del mtDNA (en el gen *MT-RNR1*), mientras que la nuclear (fluoróforo VIC) lo hace en el gen de la RNAsa P, que se encuentra en monocopia en el genoma haploide. Los resultados se expresan en base a la relación mitocondrial/nuclear.

A continuación se muestran las secuencias de los oligonucleótidos y de la sonda, los volúmenes de reacción y las condiciones de la misma.

OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA	Tm
MT-L (directo)	CCACGGGAAACAGCATGTATT	58,4 °C
MT-H (reverso)	CTATTGACTTGGGTTAATCGTGTGA	58,2 °C
Sonda MT-FAM	FAM -TGC CAG CCA CCG CG	69,3 °C

Tabla VI.10: Oligonucleótidos utilizados para cuantificar el número de copias de mtDNA por qRT-PCR.

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN (μl)
TaqMan® Gene Expression MasterMix	2X	10
Oligo MT-L	5 μM	0,5
Oligo MT-H	5 μM	0,5
Sonda MT-FAM		0,5
RNAsa P (VIC)		1
DNA	10 ng/μl	-

Tabla VI.11: Mezcla de reacción para cuantificar el número de copias de mtDNA por qRT-PCR.

Las reacciones tuvieron lugar en el StepOne™ System de Applied Biosystems con las siguientes condiciones universales:

- 50 °C – 2 min
 - 95 °C – 10 min
 - 95 °C – 15 s
 - 60 °C – 1 min
 - 50 °C – 30 s
- } 40 ciclos

Para realizar las rectas estándar se partió de una mezcla de dos plásmidos: uno presentaba un inserto con la región del mtDNA del gen *MT-RNR1* y el otro el gen de la RNAsa P. Esta mezcla contenía 9×10^6 copias del gen mitocondrial y 9×10^4 copias del gen nuclear. A partir de la misma se realizaron diluciones seriadas 1:3 (en tampón Tris-HCl 10 mM pH = 8,5).

Los resultados se expresaron como ΔC_t entre la sonda mitocondrial y la nuclear.

VI.2.2.10. Determinación del genotipo mitocondrial

El genotipo o haplogrupo mitocondrial se determinó comprobando la presencia o ausencia de determinados polimorfismos en el mtDNA, mediante la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real. En todos los casos se siguió un esquema preestablecido de búsqueda de los polimorfismos (figura VI.1), basado en la abundancia de los mismos dentro de la población (Ruiz-Pesini, Lapena et al. 2000).

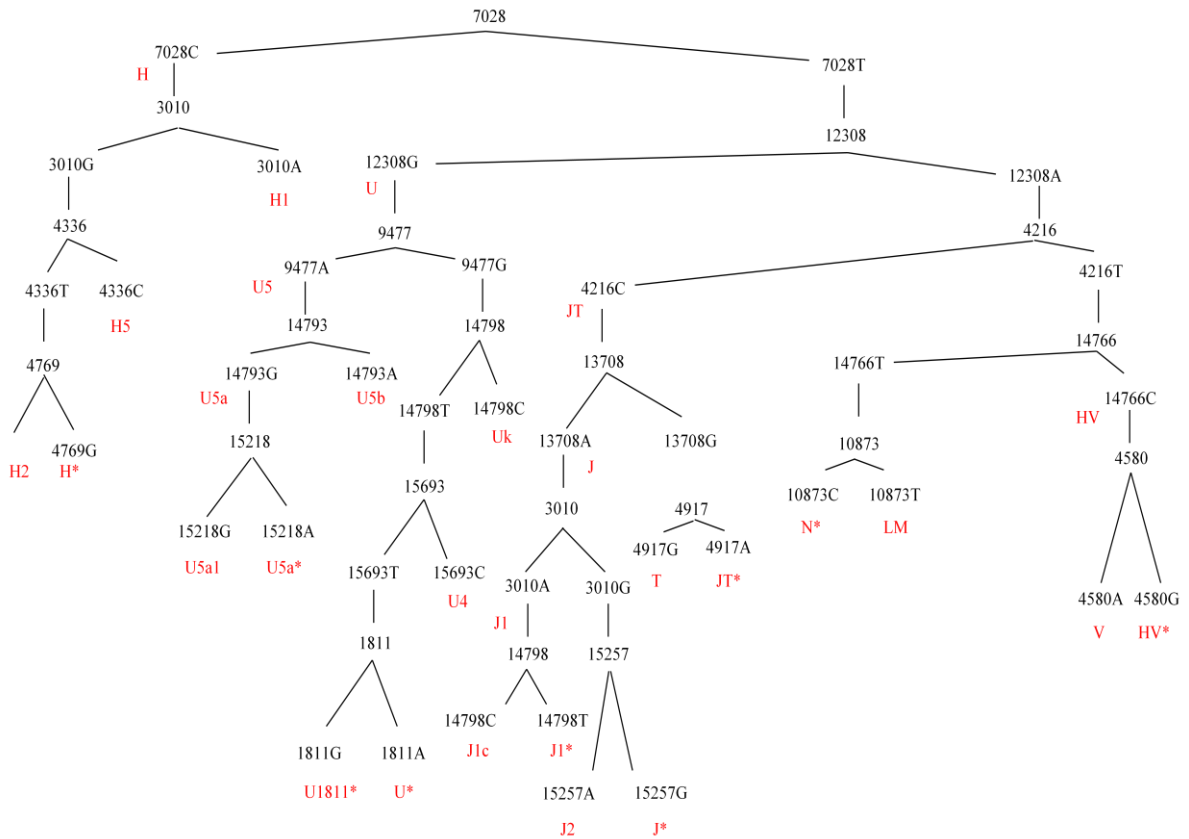


Figura VI.1: Esquema de la estrategia de determinación del genotipo mitocondrial. Polimorfismos (negro) y genotipos mitocondriales (rojo).

VI.2.2.11. Haplotipado del gen *APOE*

Para haplotipar el gen *APOE* se amplificó un fragmento de 314 pb utilizando los oligonucleótidos y las condiciones que se muestran en la tabla (Kontula, Aalto-Setälä et al. 1990). Los polimorfismos se detectaron por secuenciación completa de dicho fragmento.

OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA	Tm
APOE-1F	GGGCGCTGATGGACGAGACC	63 °C
APOE-1R	CCCGGCCTGGTACACTGCCA	64,8 °C

Tabla VI.12: Oligonucleótidos utilizados para el haplotipado de *APOE*.

VI.2.2.12. Retrotranscripción de RNA total

El cDNA monocatenario se obtuvo, utilizando como molde el RNA total extraído a partir de células en cultivo (ver apartado VI.2.2.2), mediante el *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* de Roche. Los componentes y volúmenes de reacción se muestran en la siguiente tabla.

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN (μ l)
Transcriptasa reversa	20 U/ μ l	0,5
Tampón de reacción	5X	4
Inhibidor de RNAsas	40 U/ μ l	0,5
dNTPs	10 mM	2
<i>Random hexamer primer</i>	600 μ M	2
H ₂ O	-	1
RNA total	0,1 μ g/ μ l	10

Tabla VI.13: Mezcla de reacción para la retrotranscripción del RNA a cDNA.

El programa térmico llevado a cabo fue el siguiente.

- 25 °C – 10 min
- 55 °C – 30 min
- 85 °C – 5 min

El cDNA obtenido se conservó a -20 °C hasta su uso.

VI.2.2.13. Medida de expresión de transcritos mediante PCR cuantitativa a tiempo real

Para cuantificar los niveles de mRNA de los distintos genes estudiados se utilizó como molde el cDNA previamente sintetizado (ver apartado VI.2.2.12.), llevando a cabo la reacción en el *StepOne™ System* de Applied Biosystems.

Para cada muestra, además de los genes deseados (fluoróforo FAM), se realizó la amplificación de un gen de referencia, en nuestro caso el ribosómico nuclear 18S (fluoróforo VIC), que cumple una serie de características necesarias para actuar como tal: se expresa en todas las muestras y su expresión es cuantitativamente constante e intensa.

Los componentes y volúmenes de reacción se muestran en la siguiente tabla.

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN (μ l)
TaqMan® Gene Expression MasterMix	2X	10
Gen estudio MIX (FAM)	20X	1
Gen 18S MIX (VIC)	20X	1
H ₂ O	-	7
cDNA	(directamente de la reacción de RT)	1

Tabla VI.14: Mezcla de reacción para la determinación de los niveles de expresión de un transcrito.

Las condiciones de reacción fueron las siguientes.

- 50 °C – 2 min
 - 95 °C – 10 min
 - 95 °C – 15 s
 - 60 °C – 1 min
 - 50 °C – 30 s
- } 40 ciclos

Los resultados se expresaron como Δ Ct entre el transcrito de interés y el de referencia. Se realizaron tres determinaciones independientes para cada muestra, cada una por triplicado.

Los transcritos analizados mediante esta técnica fueron:

- Mitocondriales: rRNA 12S (*MT-RNR1*), subunidad 1 del complejo IV (*MT-CO1*) y subunidad 6 del complejo I (*MT-ND6*).

- Nucleares: gen de referencia 18S, fosfofructoquinasa L (PFKL), Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), superóxido dismutasa 2 (SOD2), marcadores de hASC (Thy-1 o CD90, endoglina o CD105), receptor activado de proliferación de los peroxisomas y (PPAR γ), coactivador 1 del PPAR γ (PGC-1 α), proteína de unión a ácidos grasos 4 (FABP4), leptina, adiponectina y ApoE.

VI.2.2.14. Determinación del estado de metilación global

La metilación del DNA ocurre por la unión covalente de un grupo metilo al carbono 5 del anillo de citosina por acción de enzimas metiltransferasas. Así, el *MethylFlash™ Methylated DNA Quantification Kit* de Epigentek se utilizó para cuantificar la cantidad de 5-mC del DNA obtenido de células hASC en cultivo y diferenciación.

Para ello, se llevó a cabo el protocolo que especifica el fabricante, que se resume en los siguientes pasos. En primer lugar, se aisló el DNA total y se cargaron unos 100 ng en una placa de 96 pocillos ya tratada para que su superficie tenga una gran afinidad por el DNA. Para que se produjera la unión, se incubó a 37 °C durante 90 minutos. Tras varios lavados se añadió el anticuerpo de captura (primario), manteniéndolo durante 60 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se cargó el anticuerpo de detección (secundario) y una solución de amplificación de la señal, incubándose cada uno a temperatura ambiente durante 30 minutos. Finalmente se añadió el sustrato coloreado y, tras un tiempo de reacción de unos 10 minutos,

la solución de parada, pasando a medir la absorbancia a 450 nm. Los valores se interpolaron en una recta de calibrado construida a partir de un DNA hipermetilado proporcionado por el *kit*.

VI.2.3. Estudio funcional del sistema de fosforilación oxidativa

VI.2.3.1. Determinación de especies reactivas de oxígeno por citometría de flujo

El proceso de generación de ROS puede monitorizarse utilizando el compuesto 2',7'-diclorofluoresceína-diacetato (DCFH-DA), que detecta y cuantifica el H₂O₂ producido intracelularmente. La conversión de la sonda no fluorescente (DCFH-DA) en un compuesto altamente fluorescente (DCF) tiene lugar en varios pasos. Primero, la DCFH-DA atraviesa la membrana celular y es desacetilada por esterasas para formar la DCFH, que queda retenida en las células. Después, la DCFH se convierte en la DCF por la acción del peróxido de hidrógeno, gracias a la acción de la peroxidasa (Carter, Narayanan et al. 1994).

Las células en cultivo se tripsinizaron, contaron y centrifugaron. El pellet de células se tiñó con una solución de DCFH-DA (en etanol) a una concentración de 20 µM, y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Seguidamente se centrifugaron las células y se lavó el pellet con PBS. Finalmente se resuspendió dicho pellet en unos 3 ml de HBSS, a partir de los cuales se realizaron 3 medidas por citometría de flujo, midiendo en el canal FL1 la intensidad de fluorescencia.

Los resultados obtenidos por citometría se analizaron utilizando el programa informático Weasel.

VI.2.3.2. Medida de la superficie de membrana interna mitocondrial por citometría de flujo

Para realizar la medida de superficie de membrana interna mitocondrial se utilizó la sonda Naranja Nonil de Acridina (NAO), que se une a la cardiolipina (lípidos característicos de la membrana interna mitocondrial) de forma directamente proporcional a su cantidad.

Las células en cultivo se tripsinizaron, contaron y centrifugaron. El pellet de células se tiñó con una solución de NAO a una concentración de 1 µM, y se incubó a 37 °C durante 10 minutos. Seguidamente se centrifugaron las células y se lavó el pellet con PBS. Finalmente se resuspendió dicho pellet en unos 3 ml de HBSS, a partir de los cuales se realizaron 3 medidas por citometría de flujo, midiendo en FL1 la intensidad de fluorescencia.

VI.2.3.3. Determinación del potencial de membrana mitocondrial

VI.2.3.3.1. Por citometría de flujo

Para la determinación del potencial de membrana interna mitocondrial se utilizó el *Mito-ID® Membrane Potential Cytotoxic Kit* de ENZO®. Esta técnica se basa en una sonda catiónica de emisión dual de fluorescencia, verde o naranja, dependiendo del estado de la célula. Cuando ésta tiene un elevado potencial de membrana, el reactivo coexiste tanto en forma de monómero verde en el citosol como en forma de agregados naranjas en la mitocondria. Sin embargo, cuando este potencial de membrana se pierde, el reactivo se encuentra principalmente como monómero de fluorescencia verde en el citosol y ya no se da la fluorescencia naranja en la mitocondria.

El protocolo se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se tripsinizaron y recogieron las células cultivadas en una placa de 100 mm de diámetro al 80 % de confluencia (aproximadamente 1×10^6 células), y se tiñeron con 2 ml del reactivo proporcionado por el *kit*. Al experimento se le incluyó una placa adicional control positivo pre-tratada con el desacoplante carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP) 2 μ M durante 30 minutos. Las muestras se incubaron durante 15 minutos, a temperatura ambiente y protegidas de la luz.

Pasado este tiempo, las muestras se analizaron en un citómetro de flujo *Cytomics FC 500* de Beckman Coulter, utilizando el canal FL1 (láser 488 nm) para la fluorescencia verde y el canal FL2 para la fluorescencia naranja.

VI.2.3.3.2. Mediante microscopía de fluorescencia

Para la toma de imágenes en la estación de fluorescencia *FLoId* de ThermoFisher Scientific, se utilizó el mismo *kit* que en el apartado anterior, aplicando directamente el reactivo sobre las células adheridas a la placa de cultivo.

VI.2.3.4. Determinaciones enzimáticas

VI.2.3.4.1. Determinación de la cantidad de proteínas totales por el método de Bradford

Este procedimiento está basado en la medida de la cantidad de proteínas totales presente en un homogenado celular mediante una reacción colorimétrica.

Para ello, se prepararon diferentes diluciones de una solución de albúmina sérica bovina (BSA) de concentración conocida (1 mg/ml), con el objetivo de construir una recta de calibrado que constara de los siguientes puntos: 0, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 mg proteína/ml. Se cargaron 10 μ l de cada una de las diluciones por triplicado en una placa de 96 pocillos, al igual que de cada una de las muestras diluidas de tal manera que su valor de absorbancia se encontrara en el centro de la recta de calibrado.

El reactivo de Bradford (Bio-Rad) se diluyó 1:5 en agua destilada y se añadieron 200 µl sobre cada pocillo.

Tras 5 minutos de incubación a temperatura ambiente y protegida de la luz, se midió la absorbancia a 595 nm. Para calcular la concentración de proteína en las muestras se interpolaron los valores de absorbancia en la ecuación de la recta obtenida, teniendo en cuenta la dilución realizada.

VI.2.3.4.2. Determinación de la actividad enzimática y cantidad del complejo respiratorio IV

Se midieron los niveles del complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial como indicador de la presencia y funcionalidad del sistema OXPHOS, utilizando para ello el *Complex IV Human Duplexing (Activity + Quantity) Microplate Assay Kit* de MitoSciences (Abcam).

El complejo IV se inmunocaptura en la placa de 96 pocillos suministrada con el *kit* y su actividad se determina colorimétricamente, siguiendo la oxidación del citocromo c reducido por disminución de la absorbancia a 550 nm.

En los mismos pocillos la cantidad de enzima se mide añadiendo un anticuerpo específico del complejo IV conjugado con fosfatasa alcalina. Esta fosfatasa transforma un sustrato incoloro en un producto de color amarillo que absorbe a 405 nm. La reacción tiene lugar de forma proporcional entre el tiempo y la cantidad de proteína capturada en los pocillos.

VI.2.3.4.2.1. Preparación de las muestras

Este ensayo está diseñado para usarlo con mitocondrias purificadas. Sin embargo, también se pueden utilizar homogenados de tejidos y células enteras. En este caso, las células se tripsinizaron, se recogieron y se centrifugaron. El pellet celular se guardó a -80 °C hasta su uso.

El pellet de células se resuspendió en la *solución 1* suministrada por el *kit*, y se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford, que fue posteriormente ajustada a 5 mg/ml con esta misma solución (concentración recomendada por la casa comercial para una correcta acción del detergente).

A continuación se añadió el detergente incluido en el *kit*, concretamente un volumen 10 veces menor al volumen de muestra, y se incubó en hielo durante 30 minutos. Después, las muestras se centrifugaron durante 20 minutos y se recogió el sobrenadante. Con dicho sobrenadante se realizó un segundo Bradford para determinar la concentración exacta de proteínas (ya que se ha podido perder parte en los procedimientos anteriores).

La concentración de proteínas se ajustó a la de 10 µg/200 µl (ya que se añaden 200 µl por pocillo) mediante la dilución adecuada de las muestras.

VI.2.3.4.2. Determinación de la actividad y cantidad de CIV

Como hemos dicho, se añadieron 200 μl de las muestras en cada pocillo, cada una por triplicado, incluyendo también un triplicado sin proteínas (blanco). Tras 3 horas de incubación, se añadió el sustrato (citocromo c) y se llevó a cabo la medida espectrofotométrica. En los inicios de la reacción la absorbancia a 550 nm decrece linealmente, de forma proporcional a la cantidad de citocromo c que se oxida. Para determinar la actividad en la muestra hay que calcular la pendiente de dicha recta (utilizando el software del propio lector de placas), expresada en mOD/min, y compararla con la obtenida con los controles.

A partir de la misma placa se realiza, como hemos dicho, la medida de la cantidad de complejo IV, añadiendo para ello un anticuerpo de detección. El protocolo seguido fue el que especifica la casa comercial. La cantidad de complejo IV se expresa como cantidad relativa respecto a una muestra control, restando la absorbancia inicial de la final (en el rango de respuesta lineal).

VI.2.3.4.3. Determinación de la actividad enzimática de la citrato sintasa

La actividad citrato sintasa (Faloona and Srere 1969) se mide como el incremento en la absorbancia a 412 nm que se produce debido a la formación de la forma aniónica del ácido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB, $\epsilon=13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) tras añadir oxalacetato como iniciador de la reacción.

Se preparó un *mix* de reacción con los componentes que se muestran en la siguiente tabla. Tanto el DTNB como el oxalacetato se prepararon en fresco, mientras que el acetil-CoA se almacenó alicuotado a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN (μl)
Tris-HCl, pH 8	1 M	15
DTNB (en Tris-HCl, pH 8, 10 mM)	1 mM	20
Tritón X-100	10 %	2
Acetil-CoA	7 mg/ml	2
H ₂ O	-	146
Muestra	~ 5 mg/ml	5

Tabla VI.15: Mezcla de reacción para la medida de la actividad de la citrato sintasa.

A cada pocillo, de una placa de 96 pocillos, se añadieron 185 μl de esta mezcla y 5 μl de cada extracto proteico obtenido por alguno de los procedimientos descritos anteriormente.

Por último se añadieron 10 μl de oxalacetato, preparado a una concentración de 50 mM en agua destilada. Esta adición se realiza automáticamente con el pipeteador programable del aparato *NOVOstar* (BMG Labtech), de manera que se puede empezar a medir en el instante justo en el que empieza la reacción. La medida de absorbancia se realiza a 412 nm durante 5 minutos a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ con la cinética mínima que permita el aparato.

La actividad de citrato sintasa obtenida (pendiente de la recta en mOD/min) se divide por la cantidad total de proteínas en μg (calculada anteriormente por el método de Bradford) para obtener la actividad específica.

VI.2.3.4.4. Determinación de la actividad enzimática del complejo respiratorio II (succinato ubiquinona oxidoreductasa)

Para la medida de la actividad de la succinato ubiquinona oxidoreductasa (King 1966) se determina espectrofotométricamente el incremento de la absorbancia a 600 nm a 30 °C durante varios minutos, que es debida a la reducción del aceptor artificial 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP, $\epsilon=19,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) tras añadir succinato como iniciador de la reacción.

Se preparó un *mix* de reacción conteniendo lo siguientes reactivos:

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN (μl)
Tampón KP, pH 7	100 mM	100
DCPIP	0,03 %	20
KCN	30 mM	10
H ₂ O	-	45
Muestra	~ 5 mg/ml	5

Tabla VI.26: Mezcla de reacción para la medida de la actividad de la succinato ubiquinona oxidoreductasa.

A cada pocillo, de una placa de 96 pocillos, se añadieron 175 μl de esta solución y 5 μl de muestra (extracto proteico obtenido por alguno de los procedimientos descritos anteriormente).

Por último se añadieron 20 μl de succinato 1 M y rápidamente se pasó a medir la absorbancia a 600 nm.

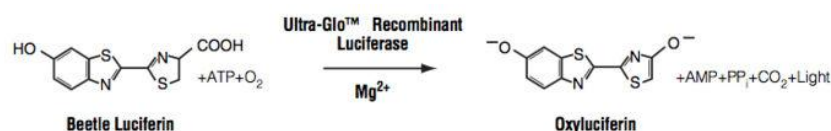
La actividad de complejo II obtenida (pendiente de la recta en mOD/min) se divide por la cantidad total de proteínas en μg (calculada anteriormente por el método de Bradford) para obtener la actividad específica.

VI.2.3.4.5. Determinación de la actividad enzimática de la isocitrato deshidrogenasa

La isocitrato deshidrogenasa se midió mediante un *kit* de ensayo colorimétrico de la casa comercial Abcam, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, el pellet de células se resuspendió en el tampón proporcionado por el *kit* y las muestras se cargaron en una placa de 96 pocillos, junto con una curva de calibrado preparada a partir de NADH estándar. A continuación, se añadió el *mix* de reacción formado por el sustrato, el NAD⁺ y un desencadenante de la reacción, y se incubó durante 30 min a 37 °C. Pasado este tiempo, se midió la densidad óptica a 450 nm en un espectrofotómetro *NOVOstar* (BMG Labtech).

VI.2.3.5. Determinación de niveles de ATP

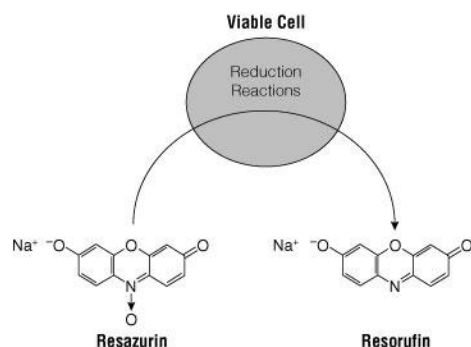
El *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay* de Promega es un ensayo basado en la cuantificación directa del ATP presente en un cultivo celular. A través de un único reactivo se produce la lisis celular y la generación de una señal luminiscente proporcional a la cantidad de ATP. La reacción que tiene lugar es la siguiente.



Se sembraron 10.000 células/pocillo en una multiplaca blanca de 96 pocillos de la marca Nunc, poniendo al menos un cuatuplicado de cada condición, y permanecieron en el incubador hasta el día siguiente. En paralelo, se sembró la misma cantidad de células para llevar a cabo una medida del número de células para el que poder relativizar los niveles de ATP obtenidos.

Dos horas antes de realizar la medida, se sustituyó el medio de cultivo por otro que contenía deoxiglucosa 1 M en lugar de glucosa. Pasado este tiempo, se añadió a cada pocillo 100 µl del reactivo comercial reconstituido con el tampón proporcionado por el *kit*. Tras agitar durante 2 minutos y esperar otros 10 minutos, se llevó a cabo la medida de luminiscencia en un espectrofotómetro *NOVOstar* (BMG Labtech).

Paralelamente, se midió por fluorimetría el número medio de células presentes por condición mediante el *CellTiter-Blue® Cell Viability Assay* (Promega), que se basa en la siguiente reacción enzimática.



La molécula de resorufina es altamente fluorescente, por lo que puede cuantificarse en un lector de microplacas *NOVOstar* (560Ex/590Em).

El procedimiento consiste en añadir 20 μl /pocillo del reactivo comercial sobre las células en cultivo e incubar durante 2 horas a 37 °C, tiempo tras el cual puede llevarse a cabo la medida.

Los resultados de niveles de ATP se han obtenido refiriendo los valores de luminiscencia a los de fluorescencia (proporcionales al número de células).

VI.2.3.6. Electrodo de oxígeno de alta resolución (Oroboros) en células intactas

El consumo de oxígeno se midió en un sistema de alta resolución (Gnaiger, Steinlechner-Maran et al. 1995) llamado Oroboros®, que se basa en el principio básico de la respirometría: una muestra celular que consume el oxígeno presente en una cámara cerrada hará disminuir la concentración del mismo, y si representamos esta disminución frente al tiempo, podemos obtener la velocidad de consumo de oxígeno (Chance and Williams 1955). A diferencia de la respirometría tradicional, la respirometría de alta resolución utiliza electrodos muy sensibles, con un diseño que minimiza la difusión de oxígeno, y está acoplada a un software avanzado (DatLab4) que nos da la información simultánea de las velocidades de consumo de oxígeno, así como la estabilidad de la señal del mismo.

Partiendo de células en crecimiento exponencial se tripsinizaron, se centrifugaron y se contaron. El pellet se diluyó en 2 ml de medio DMEM sin SFB para evitar burbujas y se introdujo en la cámara. Ésta se cerró y se esperó a que se estabilizara el flujo de oxígeno (línea roja), obteniéndose así el valor de respiración endógena o de rutina. A continuación se añadió oligomicina 16 nM para inhibir la ATP sintasa y determinar el consumo de oxígeno filtrante. Para la medida de la respiración desacoplada, que representa la máxima capacidad del sistema de transporte electrónico que estamos estudiando, se añadió carbonilcianuro-p-trifluorometoxi-hidrazona (FCCP) 0,8 μM . Por último, se inhibió el consumo de oxígeno utilizando KCN, un inhibidor del complejo IV, obteniéndose el valor de la respiración no dependiente de cadena respiratoria, que se restó a todos los demás valores (figura VI.2).

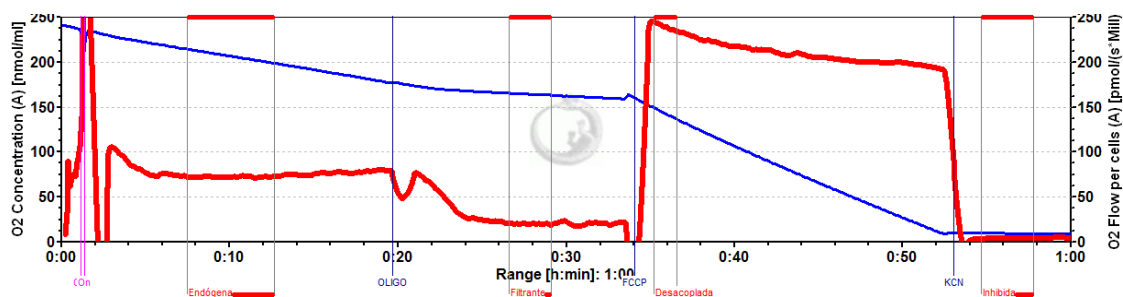


Figura VI.2: Esquema representativo de una medida completa de consumo de O_2 en células intactas. Se muestra en azul la concentración de O_2 y en rojo el consumo de O_2 a lo largo del tiempo. Los eventos señalados corresponden a la adición de oligomicina, FCCP y KCN respectivamente.

Las determinaciones de consumo de oxígeno se realizaron en al menos tres experimentos independientes y se alternaron las cámaras de medida para evitar errores que derivaran de la variación de las mismas.

Previamente a la realización de estos experimentos se titularon todas las drogas utilizadas en cada tipo celular mediante el uso de la bomba TIP-2K, que nos permite añadir pequeñas cantidades de droga (0,025-250 μ l) a una velocidad constante (entre 0,01-25 μ l/s) y en ambas cámaras simultáneamente, evitando así el posible error manual.

En la siguiente figura (VI.3) se muestra un ejemplo de titulación para hallar la concentración óptima de FCCP para conseguir la respiración desacoplada máxima en las hASC, evitando un exceso que da lugar al efecto contrario.

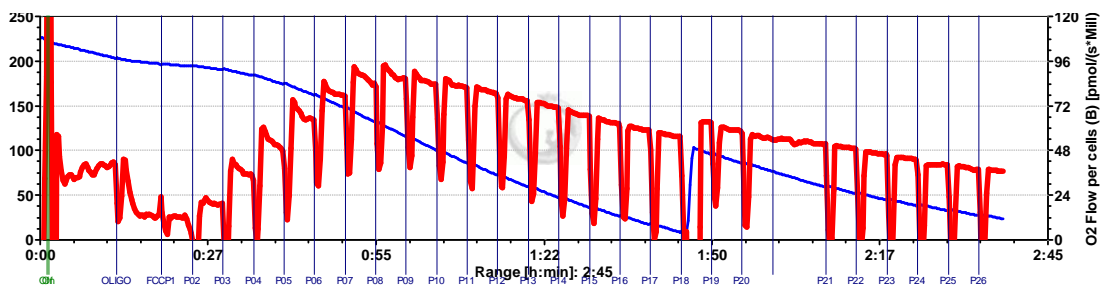


Figura VI.3: Esquema representativo del consumo de O₂ durante la titulación del FCCP. Cada evento corresponde a la adición de un volumen de FCCP.

VI.2.4. Manipulación y análisis de proteínas

VI.2.4.1. Ensayos ELISA

VI.2.4.1.1. Leptina

El *kit* ELISA de leptina humana de Abcam es un ensayo *in vitro* para la medida cuantitativa de dicha adipoquina en suero, plasma o sobrenadante de cultivos celulares. Este ensayo utiliza un anticuerpo específico para la leptina humana unido a una placa de 96 pocillos. Tanto los estándares como las muestras se pipetea en los pocillos y la leptina presente en la muestra se une a los pocillos a través del anticuerpo inmovilizado. Tras lavar los pocillos se añade otro anticuerpo biotinilado anti-leptina humana. Una vez se elimina el anticuerpo no unido, se pipetea una solución de estreptavidina conjugada a la enzima HRP (peroxidasa de rábano). Los pocillos se lavan de nuevo y finalmente se añade el sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), de manera que se desarrolla la reacción colorimétrica de forma proporcional a la cantidad de leptina unida. La solución *stop* cambia el color de azul a amarillo, llevando a cabo la medida de intensidad a 450 nm.

VI.2.4.1.2. Adiponectina

El *kit* ELISA de adiponectina humana de Millipore es un ensayo *in vitro* para la medida cuantitativa de dicha adipocina en suero, plasma y extractos de adipocitos o sobrenadante de cultivos celulares. Está basado en un ELISA tipo sándwich en el que, secuencialmente: 1) captura de las moléculas de adiponectina de una muestra en un placa de 96 pocillos recubierta de un anticuerpo monoclonal anti-adiponectina humana, y unión de un segundo anticuerpo monoclonal biotinilado para la misma proteína, 2) lavado de las moléculas que no se han unido, 3) unión de los conjugados estreptavidina-HRP a los anticuerpos biotinilados inmovilizados, 4) lavado del exceso de conjugados enzimáticos, 5) cuantificación de los conjugados enzima-anticuerpo mediante la monitorización de la actividad HRP en presencia del sustrato TMB. La actividad enzimática se mide espectrofotométricamente por el incremento de absorbancia 450 nm tras la acidificación de los productos formados.

VI.2.4.1.3. FABP4

Este ensayo es un ELISA cuantitativo tipo sándwich de Symansis. La placa de 96 pocillos está cubierta con un anticuerpo monoclonal de ratón específico para la FABP4 humana. Los estándares y las muestras se pipetea en los pocillos y la FABP4 humana presente se une a los anticuerpos inmovilizados. Tras eliminar las sustancias que no se han unido, se añade un anticuerpo policlonal conjugado a biotina específico de la FABP4 humana. Después de un nuevo paso de lavado se añade un conjugado estreptavidina-HRP, y posteriormente una solución de su sustrato, cuyo color se desarrolla en proporción a la cantidad de FABP4 unida inicialmente. La reacción se detiene y la densidad óptica de cada pocillo se determina utilizando un lector de microplacas. Ya que el incremento de absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de FABP4 humana capturada, la concentración desconocida en la muestra se puede calcular por interpolación en una curva de referencia incluida en el ensayo.

VI.2.4.2. Estudios del secretoma celular

VI.2.4.2.1. Preparación de las muestras

Para los estudios de secretoma, las hASC se cultivaron y diferenciaron en placas de 100 mm de diámetro al 80 % de confluencia. Pasadas las 3 semanas de diferenciación, las células se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron durante 48 horas en un medio mínimo, es decir, DMEM libre de SFB, ya que el suero está compuesto de muchas proteínas (sobretodo BSA) que interferirían en el ensayo. A continuación, se recogieron los sobrenadantes, se centrifugaron para eliminar los restos celulares y se filtraron a través de un filtro de 0,22 µm para evitar la presencia de cualquier artefacto. Éstos se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento.

La precipitación de las proteínas secretadas presentes en el medio de cultivo se llevó a cabo mediante el método tradicional de la acetona fría (Merrill and Fleisher 1932). Éste consiste en añadir a la solución de proteínas 3-4 volúmenes de acetona fría (preenfriada a -20 °C) y agitar con vórtex. La precipitación tuvo lugar a -20 °C durante toda la noche. Pasado este tiempo, las muestras se centrifugaron a 4 °C durante 10 minutos a 5.000 rpm (*RC 5B PLUS*,

rotor SS34, Sorvall). El pellet de proteínas se lavó con acetona fría y se volvió a centrifugar, almacenándolo a -80 °C hasta que se realizó el envío.

Estos extractos proteicos se procesaron en el Centro de Genómica y Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid.

Del mismo modo, cuando se quisieron analizar las proteínas secretadas por Western blot, el sobrenadante celular se concentró utilizando las columnas *Amicon® Ultra-15* y *Ultra-0.5 Centrifugal Filters* de Millipore.

VI.2.4.2.2. Cuantificación de las muestras

Los extractos proteicos precipitados con acetona se resuspendieron en 800 µl de tampón TEAB 0,5 M y se cuantificaron por el método de Bradford, comprobando posteriormente la integridad de los mismos mediante un gel SDS-PAGE al 10 % y cargando 10 µg de cada una de las muestras (figura VI.4).

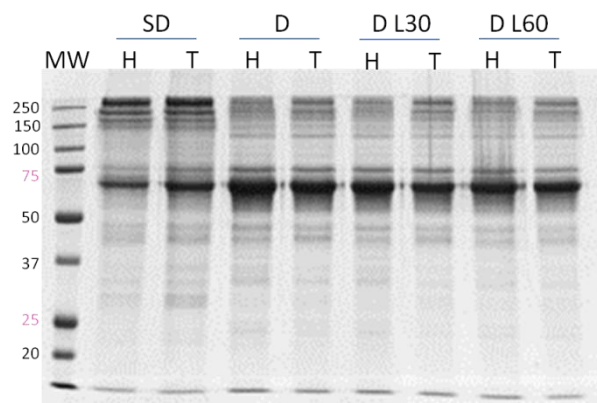


Figura VI.4: Gel SDS-PAGE de las muestras de secretoma. Tinción con Azul de Coomassie. MW: patrón de pesos moleculares; SD: hASC sin diferenciar, D: hASC diferenciadas a adipocitos, D L30: hASC diferenciadas en presencia de linezolid 30 µM, D L60: hASC diferenciadas en presencia de linezolid 60 µM. H y T denotan el haplogrupo al que pertenece cada una de las dos hASC utilizadas.

VI.2.4.2.3. Experimento iTRAQ

El estudio de la expresión diferencial de proteínas se realizó mediante la técnica de marcaje isotópico iTRAQ 8-plex, que permite el análisis simultáneo de hasta 8 muestras.

Se aplicaron 50 µg de las muestras en un gel SDS-PAGE discontinuo (concentrador 4 % y separador 10 %), parando la electroforesis cuando el frente estaba a unos 3 mm del comienzo del gel separador. Las bandas de las proteínas sin separar se visualizaron con tinción de Coomassie coloidal y se recortaron para su posterior digestión.

Cada una de las bandas se redujo con TCEP 2,5 mM durante 1 hora a 57 °C y se alquiló con MMTS 20 mM durante 20 min en oscuridad. Finalmente se digirieron durante toda la noche a 37 °C con tripsina recombinante de grado de secuenciación (Roche) en TEAB 0,5 M (pH 8,5) en un ratio 1/20 (w/w).

La extracción de los péptidos del gel se realizó con ACN al 50 % y TFA al 0,1 %. Finalmente cada extracto se secó hasta un volumen final de aproximadamente 30 µl.

El marcaje isotópico se realizó utilizando los reactivos e instrucciones de la casa comercial AB Sciex. Brevemente, cada uno de los reactivos iTRAQ se reconstituyó añadiendo 60 µl de isopropanol y fueron añadidos a cada una de las muestras. Tras 2 h de incubación a temperatura ambiente, las muestras marcadas individualmente se juntaron y mezclaron, secándose hasta alcanzar un volumen final de unos 100 µl. Finalmente se acidificó la muestra y se eliminó el exceso de reactivos y sales mediante cromatografía de fase reversa C18 en punta (OMIX C18, Agilent Technologies), resuspendiéndola en ACN 2 % y AF 0,1 %. La muestra se congeló para su posterior análisis.

VI.2.4.2.4. Análisis por espectrometría de masas (LC-MS/MS)

La muestra se analizó por nano-cromatografía líquida (EASY-nLC 1000, Proxeon, Thermo Scientific) acoplada a un espectrómetro de masas tipo trampa iónica (LTQ Orbitrap Velos, ThermoFisher Scientific).

Los péptidos fueron concentrados por cromatografía de fase reversa usando una precolumna C18 (Acclaim®PepMap100, NanoViper, 0,1 x 20 mm) y separados en una columna C18 (Biosphere, NanoSeparations, 0,075 x 150 mm, flujo de 0,25 µl/min). Posteriormente se eluyeron en 120 min usando un gradiente del 5 al 40 % de ácido fórmico 0,1 % y ACN 2 %.

La entrada de los péptidos al espectrómetro de masas se realizó por ionización con electrospray utilizando capilares de 30 µm de diámetro interno (Nano-bore emitters Stainless Steel, Proxeon). El equipo operó en modo de ionización positivo y dependiente de datos, para cambiar automáticamente de MS a MSMS. Los péptidos fueron detectados con una resolución de 30.000 en modo *Full scan MS* en un rango de masas m/z de 400-1.600 amu. En cada escaneado se seleccionaron hasta 10 precursores con carga mayor o igual a 2, en función de su intensidad, con exclusión dinámica de 30 segundos, seguidos de su aislamiento con un ancho de ventana de 2 unidades de m/z y fragmentación por HCD (*high collision dissociation*) con un exceso de energía de colisión normalizada (42 %) y una resolución de 7.500, para maximizar la intensidad de iones.

Se realizó un segundo análisis de la muestra en las mismas condiciones, teniendo dos réplicas técnicas, obteniéndose así 38.443 espectros MS/MS.

VI.2.4.2.5. Identificación y cuantificación relativa de proteínas

Los espectros MS/MS adquiridos se analizaron con el software Protein Pilot v.4.5 (AB Sciex), tanto para la identificación de proteínas (algoritmos de búsqueda Paragon™ y ProGroup™) como para la cuantificación relativa de éstas.

Para la identificación se utilizó la base de datos revisada UniProt-SwissProt sin restricción taxonómica. El programa realizó un análisis FDR (*False Discovery Rate*) para elegir un punto de corte (*unused score* = 1,3) en el que el porcentaje de falsos positivos fuese menor al 1 % y el porcentaje de confianza mayor al 95 %.

Las proteínas que cumplieron estos requisitos se consideraron correctamente identificadas, correspondiéndose con un total de 119 proteínas (el 19,3 % de los espectros adquiridos).

La cuantificación relativa se realizó en función de las áreas de los picos para cada una de las muestras que aparecen en los espectros MSMS. La expresión de una proteína en dos condiciones se representó por un ratio que resultó de la media de los logaritmos de los ratios de todos los péptidos usados en esa proteína, normalizados de forma informática (*Bias correction*) para corregir las diferencias experimentales en concentración de las muestras. Se consideraron cuantificables aquellas proteínas con 2 o más péptidos identificados. Los cambios de expresión reales fueron aquellos con un p-valor < 0,05 y un factor de error < 2, considerándose sobreexpresadas aquellas con un ratio > 1,3 y subexpresadas aquellas con un ratio < 0,7.

VI.2.4.3. Huella peptídica

VI.2.4.3.1. Preparación de las muestras

Las muestras de medio de cultivo recogidas para los experimentos de secretoma se concentraron y se cargaron en un gel SDS-PAGE por duplicado. Una mitad de gel se transfirió a una membrana para la posterior inmunodetección por Western blot de la proteína de interés, mientras que la otra mitad se tiñó con azul de Coomassie. Una vez realizado el Western blot, la autorradiografía se superpuso con el gel teñido y se recortó, con la ayuda de un bisturí estéril, la banda correspondiente, que se almacenó sumergida en agua milliQ y se envió al Centro de Genómica y Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid.

Dichas bandas se lavaron y deshidrataron con ACN y se redujeron con DTT 10 mM durante 30 min a 56 °C. A continuación se alquilaron con iodoacetamida 55 mM durante 15 min en oscuridad. Tras secar los fragmentos de gel en una centrifuga a vacío, se añadieron 20 µl de tripsina bovina a una concentración de 12,5 ng/µl y se incubaron toda la noche a 37 °C. Los péptidos resultantes se recogieron para ser analizados por espectrometría de masas tipo MALDI-TOF/TOF.

VI.2.4.3.2. Análisis mediante MALDI-TOF/TOF

Se depositó 1 µl de los péptidos en cada uno de los pocillos de la placa portamuestras de MALDI y se dejó secar al aire a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 0,6 µl de matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico 3 mg/ml, en 50 % ACN y 0,1 % TFA) y se dejó secar antes de introducir la placa para su análisis en el espectrómetro de masas.

El análisis de masas se realizó en un espectrómetro de masas en tándem *4800 Plus Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF* (Applied Biosystems), equipado con un láser de nitrógeno, extracción retardada y reflector. El equipo operó en modo reflector positivo con un voltaje de aceleración de 20.000 V para la adquisición de los espectros MS. Todos los espectros fueron calibrados internamente utilizando los valores m/z conocidos de los péptidos procedentes de la autólisis de la tripsina. Como resultado de este primer análisis de masas se obtuvo un espectro MS, y esta huella peptídica de la proteína (PMF, *peptide mass fingerprint*) se utilizó para su identificación en la base de datos.

Para la confirmación de las proteínas identificadas por PMF se realizó un análisis MS/MS o fragmentación de péptidos. Así, en el espectro MS se seleccionaron de 1 a 4 péptidos precursores con buena intensidad y separados de otros péptidos como mínimo en ± 4 Da (ventana de masa) para ser aislados. Cada uno de ellos se analizó independiente en una cámara y fragmentados por colisión con gas atmosférico, con el método de operación de *1 Kv ion reflector* en modo positivo. Con los espectros MS/MS obtenidos de cada uno de los precursores fragmentados se realizó la búsqueda de la proteína en las bases de datos. Además, se buscaron, en el espectro MS de la muestra APOE, péptidos que pudieran pertenecer a esa proteína de acuerdo a la digestión trípica de la misma realizada *in silico*, y se fragmentaron para confirmar su identificación de forma concluyente.

VI.2.4.3.3. Búsqueda en bases de datos

La identificación de las proteínas por huella peptídica se realizó con el motor de búsqueda MASCOT v 2.3 a través del software *Global Protein Server* (GPS) v. 3.6 (ABSCIEX), en la base de datos de Swissprot (fecha 09/06/2014; 545.388 secuencias), con restricción taxonómica a humano (20.265 secuencias) y utilizando los siguientes parámetros de búsqueda: carbamidometilación de cisteínas como modificación fija, oxidación de metioninas como modificación variable, tolerancia de error de masa para los péptidos 50 ppm y un punto de corte perdido para la tripsina. La proteína identificada supera la puntuación (score) que determina MASCOT como significativa con un intervalo de confianza del 95 % (p-valor < 0,05).

Para la identificación por huella peptídica combinada con MS/MS, los parámetros de búsqueda fueron los mismos utilizados en la identificación por huella peptídica, a excepción de la tolerancia del error para la masa del precursor que en este caso podía ser hasta de 80 ppm, y la tolerancia en las masas de los fragmentos (MS/MS) de 0,3 Da. El péptido identificado supera la puntuación individual del ion que determina MASCOT como significativa con un p-valor < 0,05.

VI.2.4.4. Preparación de extractos celulares totales para Western blot en geles desnaturalizantes

Para este tipo de ensayos se partió, normalmente, de células cultivadas en una placa de 100 mm de diámetro al 80 % de confluencia (aproximadamente 1×10^6 células), que se tripsinizaron y recogieron, guardando el pellet resultante a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su uso.

En función del tamaño del pellet se añadieron entre 25-100 μl de tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM pH = 7,4, NaCl 50 mM, deoxicolato de sodio al 0,5 %, EDTA 5 mM, Tritón X-100 al 1 %) autoclavado, añadiendo a éste un cóctel de inhibidores de proteasas de la marca Sigma-Aldrich. La suspensión celular se incubó durante 15 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una noria giratoria, favoreciendo la rotura de las membranas celulares por acción del detergente. A continuación, esta suspensión se centrifugó a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos a 13.000 rpm (Eppendorf 5415R, rotor F45-24-11) para eliminar los restos celulares. El extracto proteico se alicuotó y se almacenó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

VI.2.4.5. Preparación de extractos mitocondriales

Las mitocondrias se aislaron por centrifugación diferencial siguiendo el protocolo previamente descrito (Lazarou, Smith et al. 2009). Brevemente, las hASC sembradas en 4 placas de cultivo de 150 mm de diámetro se tripsinizaron, y el pellet celular resultante se resuspendió en 2 ml de tampón THE (trehalosa 0,3 M, HEPES 10 mM, KCl 10 mM, pH 7,4) con 0,1 % de BSA. A continuación, la muestra se procesó utilizando un homogeneizador mecánico durante 25 veces a 750 rpm. Tras una centrifugación de 10 min a $400 \times g$ se recogió el sobrenadante, y con el pellet se repitió el procedimiento otras dos veces más. Finalmente se unieron todos los sobrenadantes y se centrifugaron durante 6 min a $800 \times g$ para eliminar los restos celulares. Las mitocondrias se consiguieron con una nueva centrifugación de 10 min a $12.000 \times g$ utilizando tubos de baja afinidad, y se resuspendieron en 100 μl de tampón THE sin BSA. La concentración proteica se midió mediante el método de Bradford.

VI.2.4.6. Síntesis *in vivo* de proteínas mitocondriales marcadas con ^{35}S -Metionina

La cuantificación de la síntesis de proteínas codificadas en el mtDNA en células *in vivo* se realizó siguiendo el protocolo ya descrito (Chomyn 1996).

Se utilizaron células cultivadas en dos placas de cultivo de 100 mm de diámetro por condición. Brevemente, se retiró el medio de cultivo, se lavaron las células con PBS y se añadió DMEM libre de metionina y cisteína al que se le añadió SFB (5 %), piruvato (0,11 mg/ml), uridina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y L-Glutamina (2 mM). La incubación de las células durante 5 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ con este medio permite que las mismas consuman su metionina y cisteína endógenas. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio de la placa y se volvió a incubar durante 5 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en el mismo medio suplementado con emetina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) para inhibir irreversiblemente la síntesis de proteínas citosólicas.

A continuación se añadió a la placa 0,1 mCi de *PRO-MIX™ L-(35S) in Vitro Cell Labeling Mix* de Perkin Elmer, y se incubaron durante 2 horas a 37 °C (pulso). Una vez transcurrido el tiempo de marcaje se eliminó el medio de las placas, se lavaron las células con PBS y se incubaron con medio DMEM completo durante un minuto (caza), para que los ribosomas mitocondriales terminasen de sintetizar las cadenas polipeptídicas empezadas.

Finalmente, las células se tripsinizaron, centrifugaron, lavaron y resuspendieron en tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 7,4, SDS 0,1 %) suplementado con el cóctel de inhibidores de proteasas de la marca Sigma.

Para romper las membranas celulares se realizaron 5 ciclos de congelación-descongelación. Tras calcular la cantidad de proteínas totales presentes en cada muestra mediante el método de Bradford, el extracto de proteínas se cargó en un gel desnaturizante en gradiente exponencial (tal y como se explicará detalladamente en el apartado VI.2.4.7.3).

VI.2.4.7. Electroforesis de proteínas

VI.2.4.7.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La separación electroforética de proteínas aisladas a partir de cultivos celulares se realizó en geles de poliacrilamida, que permiten la separación de las mismas en función de su peso molecular.

Los geles de SDS-Tris-Glicina (Laemmli 1970) están formados por dos fases que difieren en composición y función. La fase superior, que se conoce como fase de concentración, contiene un 5 % (p/v) de poliacrilamida. La inferior, llamada fase de resolución, puede contener un porcentaje variable de acrilamida-bisacrilamida en función del tamaño de las proteínas que nos interesa separar, en general del 10-15 % (p/v).

En el desarrollo de esta tesis se utilizaron geles comerciales de la marca Bio-Rad o bien se fabricaron utilizando el sistema *Mini-Protean® 3 Cell* de esta misma casa comercial.

A continuación se resumen las disoluciones necesarias para la fabricación de los geles (en su caso) y para la posterior separación electroforética.

DISOLUCIÓN	COMPOSICIÓN
Acrilamida/bisacrilamida	29:1 (30 %)
Tampón de resolución	Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, SDS 0,4 %, EDTA 8 mM
Tampón de concentración	Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, SDS 0,4 %, EDTA 8 mM
Tampón de electroforesis 10X	Tris-HCl 0,25 M, glicina 1,92 M, SDS 1 %
Tampón de carga 4X	Glicerol 20 %, Tris-HCl 0,16 M pH 6,8, EDTA 20 mM, SDS 8 %, azul de bromofenol 0,4 %, β-mercaptoetanol 4 %

Tabla VI.17: Disoluciones necesarias para la elaboración de geles de acrilamida y para la electroforesis de proteínas.

La composición de las dos fases del gel se muestra en la siguiente tabla.

COMPONENTE	GEL DE RESOLUCIÓN 10 %	GEL DE CONCENTRACIÓN
Acrilamida/bisacrilamida	1,65 ml	325 µl
Tampón de resolución	1,25 ml	-
Tampón de concentración	-	630 µl
H ₂ O	2,01 ml	1,5 ml
APS 10 %	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl

Tabla VI.18: Composición de las dos fases de un gel de acrilamida al 10 %.

En primer lugar se añadió el gel de resolución, sobre el cual se adicionó isopropanol para estabilizar el frente y evitar el contacto del mismo con el oxígeno del aire, que dificulta la polimerización. Una vez solidificado se retiró el isopropanol y se lavaron los restos con agua destilada (2-3 veces). Seguidamente se añadió el gel concentrador y se insertó un peine del tamaño deseado. Tras la polimerización se lavaron los pocillos con tampón de electroforesis y se prepararon las muestras para cargar.

Los extractos proteicos, obtenidos según los procedimientos detallados anteriormente, se mezclaron con tampón de carga y se desnaturalizaron durante 5 minutos a 90 °C. Se cargaron entre 20 y 50 µg de proteínas totales. La electroforesis se realizó a un amperaje constante de 10 mA hasta que las muestras entraron en el gel de resolución y a 20 mA el resto del tiempo, hasta que el frente alcanzó la parte inferior del gel.

VI.2.4.7.2. Electroforesis en geles desnaturalizantes en gradiente de poli-acrilamida

La separación electroforética de las proteínas mitocondriales sintetizadas *in vivo* se realizó en un gel de gradiente exponencial del 15 al 20 %. Las disoluciones necesarias para la preparación del gel fueron las mismas que se describieron en el apartado anterior. Sin embargo, para la electroforesis se utilizó el sistema *Mini-Protean II xi* de Bio-Rad con cristales de 16x20 cm (interior) y 18,3x20 cm (exterior) y separadores de 0,75 mm. Se prepararon dos mezclas de acrilamida, una al 20 y otra al 15 %, siguiendo las proporciones de la siguiente tabla.

COMPONENTE	15 %	20 %
Acrilamida/bisacrilamida	12,6 ml	8,6 ml
Tampón de resolución	6,3 ml	3,4 ml
H ₂ O	6,25 ml	1,2 ml
APS 10 %	70 µl	40 µl
TEMED	12 µl	6 µl

Tabla VI.19: Composición de las dos fases de un gel en gradiente de acrilamida.

Se colocaron 14 ml de la disolución de acrilamida al 15 % en la cámara más alejada de la llave de salida de un formador de gradiente y 14 ml de la disolución al 20 % de acrilamida en la otra. La llave intermedia, que permite la comunicación del líquido entre ambas cámaras, permaneció cerrada. Este formador de gradiente se conectó a una bomba peristáltica a una velocidad de 16 unidades (1 U = 0,3 ml/min). Cuando la disolución al 20 % había recorrido aproximadamente 3/4 partes de la longitud de la goma se abrió la llave intermedia, comenzando la formación del gradiente. Cuando ya no quedó líquido en el formador de gradiente se añadieron 3 ml más de la disolución al 15 %. Finalmente, se añadió isopropanol para favorecer la polimerización y estabilizar el frente del gel. Una vez polimerizado se retiró el isopropanol y se lavaron los restos con agua destilada (2-3 veces), y se almacenó durante toda la noche a 4 °C.

Al día siguiente se eliminó el agua y se añadió un gel concentrador con la siguiente composición:

COMPONENTE	VOLUMEN
Acrilamida/bisacrilamida	1,2 ml
Tampón de concentración	2 ml
SDS 25 %	50 μ l
Agua	4,7 ml
APS 10 %	75 μ l
TEMED	20 μ l

Tabla VI.203: Componentes del gel concentrador.

Una vez polimerizado se lavaron los pocillos con tampón de electroforesis y se cargaron las muestras, concretamente 40 μ g de proteínas totales mezcladas con el volumen correspondiente de tampón de carga. La electroforesis se realizó a amperaje constante a 20 mA hasta que las muestras salieron del gel concentrador, y a 30 mA hasta media hora después de que el frente saliera del gel (unas 5 horas en total).

Cuando la electroforesis hubo finalizado se procedió a la tinción del gel con azul de Coomassie y a continuación se secó, tal y como se explica detalladamente en apartados posteriores.

VI.2.4.7.2.1. Tinción de geles con azul de Coomassie

Los geles se tiñeron en una solución de metanol 30 % : ácido acético 10 % (v/v) a la que se añadió 0,025 % de *R Blue* (azul de Coomassie) durante aproximadamente 45 minutos. A continuación, se empezaron a desteñir con una solución de metanol 30 % : ácido acético 10 % (v/v) durante varios lavados (incluido un último lavado de toda la noche de duración). A la mañana siguiente se escaneó el gel para tener el control de carga de todos los carriles, y posteriormente se siguió desteñiendo con una solución de metanol 50 % : ácido acético 10 % (v/v). Es importante que, en este paso, el gel quede bien desteñido, ya que el azul de Coomassie interfiere en la emisión radiactiva. Para que el gel se rehidratara se sumergió en

una solución de metanol 20 % : ácido acético 10 % (v/v). Finalmente la señal radiactiva se potenció durante 30 minutos con el reactivo *Amplify* de la casa comercial Amersham.

VI.2.4.7.2.2. Secado de geles

Los geles se secaron en un secador de la marca Bio-Rad conectado a una bomba de vacío. Éstos se colocaron sobre un papel de alto gramaje y se cubrieron con un papel *film* transparente, evitando la formación de burbujas. El aparato se programó a 70 °C durante una hora.

VI.2.4.7.2.3. Detección

El gel seco se colocó en un casete (Kodak) junto con una placa autorradiográfica *BIOMAX MR Film* (Kodak) específica para ^{35}S a -80 °C durante el tiempo necesario para obtener una buena intensidad de la señal (entre 7 y 15 días), tras el cual se llevó a cabo el revelado.

Utilizando el programa informático *Quantity One 1-D Analysis Software* (Bio-Rad) se cuantificaron las bandas correspondientes a las subunidades p.MT-ND5, p.MT-CO3 y p.MT-ND3. Estas proteínas, además de pertenecer a dos complejos respiratorios distintos, están situadas en las partes superior, media e inferior de los geles respectivamente. La intensidad de las bandas se refirió en todos los casos a la intensidad de una de las bandas del gel de carga.

VI.2.4.7.3. Electroforesis en geles TRIS-Tricina en gradiente de poliacrilamida

Para la inmunodetección de proteínas mitocondriales en muestras de mitocondrias aisladas se utilizaron geles TRIS-Tricina con un gradiente de acrilamida del 18 al 10 %. La composición de los tampones utilizados para este tipo de geles se muestra en la siguiente tabla.

TAMPÓN	COMPOSICIÓN
Tampón del cátodo 10X	Tris 1 M, Tricina 1 M, SDS 1 %, pH 8,25
Tampón del gel 4X	Tris 3 M, SDS 0,3 %, pH 8,45
Tampón del ánodo 10X	Tris 2 M, pH 8,9

Tabla VI.21: Composición de los tampones utilizados para los geles TRIS-Tricina.

Para la formación del gradiente se utilizó el protocolo ya detallado previamente (apartado VI.2.4.7.2.).

Una vez cargadas las muestras, la electroforesis se desarrolló durante toda la noche a un voltaje de 80 V.

VI.2.4.7.4. Electroforesis en geles nativos: Blue Native-2D

Para el análisis de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial se utilizó el protocolo de electroforesis *Blue Native* (Schagger and von Jagow 1991). El principio de esta técnica es que el colorante Coomassie es un sustituto para la unión al detergente, de manera que los complejos proteicos pasan a estar cargados (el colorante tiene carga negativa) y ya no en forma de micelas con el detergente. Así, se puede estimar el peso molecular del complejo proteico, lo que normalmente no es posible debido a la unión del detergente. La composición de los tampones utilizados para este tipo de geles se muestra en la siguiente tabla.

TAMPÓN	COMPOSICIÓN
Tampón del cátodo 10X	Tricina 500 mM, pH 7, Bis-Tris 150 mM, Coomassie G 0,2 %
Tampón del gel 3X	Ácido aminocaproico 200 mM, Bis-Tris/HCl 150 mM, pH 7
Tampón del ánodo 10X	Bis-Tris/HCl 500 mM, pH 7
Tampón de carga 10X	Coomassie G 5 %, ácido aminocaproico 500 mM, Bis-Tris 100 mM, pH 7
Tampón con digitonina	Digitonina 1 %, Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, EDTA 0,1 mM, NaCl 50 mM, glicerol 10 %, inhibidor de proteasas 1 mM

Tabla VI.22: Composición de los tampones utilizados para la técnica Blue Native.

El gel se construyó con un gradiente de acrilamida del 14 al 4 %, utilizando el protocolo ya detallado (apartado VI.2.4.7.2).

Para la preparación de las muestras, se lisaron 100 µg de mitocondrias en 50 µl del tampón con digitonina previamente enfriado en hielo. El material insoluble se eliminó por centrifugación a máxima velocidad durante 15 minutos.

La electroforesis se llevó a cabo a 4 °C a 70 V durante 1 hora y posteriormente a 80 V durante toda la noche. Tras esta primera hora, el tampón del cátodo se cambió por un tampón de la misma composición pero sin Coomassie G.

Para separar los complejos OXPHOS en sus distintos componentes (segunda dimensión) se cortaron los carriles del gel y se dispusieron de forma horizontal sobre un gel SDS-PAGE, vertiendo el gel concentrador sobre dicha pieza. El protocolo para esta segunda electroforesis fue el detallado previamente (ver apartado VI.2.4.7.1).

VI.2.4.8. Transferencia a membranas PVDF

La transferencia de proteínas para su posterior inmunodetección por Western blot se realizó en el sistema de transferencia *Trans-Blot® Turbo™* de Bio-Rad siguiendo las instrucciones del fabricante, utilizando el programa HIGH MW para proteínas de hasta 150 kDa con una duración de 10 minutos, además de las membranas comerciales de la misma marca.

VI.2.4.9. Inmunodetección de proteínas mediante Western blot

VI.2.4.9.1. Incubación de los anticuerpos primario y secundario

Si la membrana estaba guardada, se rehidrató con PBS-T (PBS con Tween al 0,1 % v/v). A continuación se realizó el bloqueo de la membrana con PBS-T al 5 % p/v de leche desnatada en polvo, que se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. En los casos en los que la detección de proteínas se llevó a cabo a través del sistema de imagen *Odyssey*, el bloqueo se realizó con PBS al 5 % p/v en leche desnatada sin Tween-20. Seguidamente se realizaron 3 lavados rápidos con PBS-T para eliminar los restos de la solución de bloqueo. Finalmente la membrana se incubó con el anticuerpo primario, diluido en PBS-T al 1 % de leche desnatada en polvo, o bien 1 hora a temperatura ambiente o bien durante toda la noche a 4 °C.

Transcurrido ese tiempo, se realizaron de nuevo 3 lavados de 10 minutos con PBS-T, para arrastrar posibles restos de anticuerpo primario no adherido. Seguidamente, se incubó la membrana durante 1 hora con el anticuerpo secundario, diluido en PBS-T al 0,1 % de leche desnatada en polvo. Después de esto, se realizaron otros 3 lavados de 10 min con PBS-T para eliminar las trazas de anticuerpo secundario (eliminando el Tween-20 del último lavado para la visualización en el sistema *Odyssey*) y se procedió a la detección, tal y como se explica en el apartado siguiente. Tal y como queda reflejado en la tabla VI.4 (apartado VI.1.3.7.) los anticuerpos secundarios utilizados dependieron del sistema de detección posterior de la proteína, es decir, conjugados a peroxidasa en caso del revelado por quimioluminiscencia o con emisión infrarroja para su visualización en el sistema *Odyssey*.

VI.2.4.9.2. Detección de proteínas

La membrana se incubó durante 5 minutos con el sustrato quimioluminiscente del kit *SuperSignal® West Pico Mouse/Rabbit IgG Detection Kit* y la luminiscencia de dicha reacción se detectó mediante una placa autorradiográfica y su posterior revelado. El tiempo de exposición dependió de la cantidad de muestra aplicada y de la sensibilidad del anticuerpo utilizado. Tras el revelado, las películas radiográficas se secaron al aire, se digitalizaron y se almacenaron en bolsas de plástico selladas.

Se utilizó también el sistema de imágenes *Odyssey®* (LI-COR) que utiliza dos canales de radiación infrarroja (700 y 800 nm) para detección y análisis simultáneo de proteínas. Las membranas fueron escaneadas y procesadas según los requerimientos del equipo. Una vez obtenidas las imágenes, las bandas fueron cuantificadas con el programa *Image Studio™* (IS) versión 2.0.

VI.2.4.9.3. Reutilización de membranas

Cuando se quiso reutilizar una membrana después de la detección, se incubó con solución de *stripping* (2-mercaptoetanol 100 mM, SDS 2 %, Tris-HCl 62,5 mM pH 6,7) a 58 °C durante 20-30 min. Seguidamente, se realizaron dos lavados de 10 minutos a temperatura

ambiente con PBS-T para eliminar las trazas de solución de *stripping*, y se procedió a la siguiente inmunodetección, repitiendo los procesos anteriormente descritos.

En el caso de la utilización del sistema *Odyssey*[®] este paso no es necesario, de manera que se pueden realizar distintas hibridaciones sucesivas sin intercalar el procedimiento de *stripping*.

VI.2.5. Tratamientos estadísticos

Se ha utilizado el programa informático StatView 6.0 para llevar a cabo todos los análisis estadísticos. En los gráficos se presentan los valores medios y la desviación estándar. Mediante el test de Kolmogorov-Smirnov se comprobó si la distribución de las variables era normal. Si resultó así, se realizó un test *t* desapareado para comparar los distintos parámetros. Si la variable no fue normal se aplicó el test no paramétrico de Mann Whitney. Los *P*-valores menores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos (*).

VIII. BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abdollahi, H., L. J. Harris, P. Zhang, S. McIlhenny, V. Srinivas, T. Tulenko and P. J. DiMuzio (2011). "The role of hypoxia in stem cell differentiation and therapeutics." *J Surg Res* **165**(1): 112-117.
- Acin-Perez, R., P. Fernandez-Silva, M. L. Peleato, A. Perez-Martos and J. A. Enriquez (2008). "Respiratory active mitochondrial supercomplexes." *Mol Cell* **32**(4): 529-539.
- Ahima, R. S. and J. S. Flier (2000). "Adipose tissue as an endocrine organ." *Trends Endocrinol Metab* **11**(8): 327-332.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, D. Morgan, M. Raff, K. Roberts and P. Walter (2007). "Molecular Biology of the Cell, 5th Ed."
- Ali, A. T., W. E. Hochfeld, R. Myburgh and M. S. Pepper (2013). "Adipocyte and adipogenesis." *Eur J Cell Biol* **92**(6-7): 229-236.
- Amonn, F., U. Baumann, U. N. Wiesmann, K. Hofmann and N. Herschkowitz (1978). "Effects of antibiotics on the growth and differentiation in dissociated brain cell cultures." *Neuroscience* **3**(4-5): 465-468.
- Anderson, S., A. T. Bankier, B. G. Barrell, M. H. de Bruijn, A. R. Coulson, J. Drouin, I. C. Eperon, D. P. Nierlich, B. A. Roe, F. Sanger, P. H. Schreier, A. J. Smith, R. Staden and I. G. Young (1981). "Sequence and organization of the human mitochondrial genome." *Nature* **290**(5806): 457-465.
- Andrews, R. M., I. Kubacka, P. F. Chinnery, R. N. Lightowlers, D. M. Turnbull and N. Howell (1999). "Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA." *Nat Genet* **23**(2): 147.
- Ariemma, F., V. D'Esposito, D. Liguoro, F. Oriente, S. Cabaro, A. Liotti, I. Cimmino, M. Longo, F. Beguinot, P. Formisano and R. Valentino (2016). "Low-Dose Bisphenol-A Impairs Adipogenesis and Generates Dysfunctional 3T3-L1 Adipocytes." *PLoS One* **11**(3): e0150762.
- Arita, Y., S. Kihara, N. Ouchi, M. Takahashi, K. Maeda, J. Miyagawa, K. Hotta, I. Shimomura, T. Nakamura, K. Miyaoka, H. Kuriyama, M. Nishida, S. Yamashita, K. Okubo, K. Matsubara, M. Muraguchi, Y. Ohmoto, T. Funahashi and Y. Matsuzawa (1999). "Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity." *Biochem Biophys Res Commun* **257**(1): 79-83.
- Ashjian, P. H., A. S. Elbarbary, B. Edmonds, D. DeUgarte, M. Zhu, P. A. Zuk, H. P. Lorenz, P. Benhaim and M. H. Hedrick (2003). "In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors." *Plast Reconstr Surg* **111**(6): 1922-1931.
- Atanassova, P. K. (2002). "Electron microscopic study of the differentiation of rat white subcutaneous adipocytes in situ." *Folia Med (Plovdiv)* **44**(4): 45-49.
- Atashi, F., A. Modarressi and M. S. Pepper (2015). "The role of reactive oxygen species in mesenchymal stem cell adipogenic and osteogenic differentiation: a review." *Stem Cells Dev* **24**(10): 1150-1163.
- Attardi, G. and G. Schatz (1988). "Biogenesis of mitochondria." *Annu Rev Cell Biol* **4**: 289-333.
- Auxenfans, C., C. Lequeux, E. Perrusel, A. Mojallal, B. Kinikoglu and O. Damour (2012). "Adipose-derived stem cells (ASCs) as a source of endothelial cells in the reconstruction of endothelialized skin equivalents." *J Tissue Eng Regen Med* **6**(7): 512-518.
- Bahceci, M., D. Gokalp, S. Bahceci, A. Tuzcu, S. Atmaca and S. Arikan (2007). "The correlation between adiposity and adiponectin, tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 and high sensitivity C-reactive protein levels. Is adipocyte size associated with inflammation in adults?" *J Endocrinol Invest* **30**(3): 210-214.

- Bailey, C. M., R. Kasiviswanathan, W. C. Copeland and K. S. Anderson (2009). "R964C mutation of DNA polymerase gamma imparts increased stavudine toxicity by decreasing nucleoside analog discrimination and impairing polymerase activity." Antimicrob Agents Chemother **53**(6): 2610-2612.
- Balbi, H. J. (2004). "Chloramphenicol: a review." Pediatr Rev **25**(8): 284-288.
- Ballinger, S. W., J. M. Shoffner, E. V. Hedaya, I. Trounce, M. A. Polak, D. A. Koontz and D. C. Wallace (1992). "Maternally transmitted diabetes and deafness associated with a 10.4 kb mitochondrial DNA deletion." Nat Genet **1**(1): 11-15.
- Barak, Y., M. C. Nelson, E. S. Ong, Y. Z. Jones, P. Ruiz-Lozano, K. R. Chien, A. Koder and R. M. Evans (1999). "PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development." Mol Cell **4**(4): 585-595.
- Bardini, M., M. Labra, M. Winfield and F. Sala (2003). "Antibiotic-induced DNA methylation changes in calluses of *Arabidopsis thaliana*." Plant Cell, Tissue and Organ Culture **72**: 157-162.
- Baris, O. R., A. Klose, J. E. Kloepper, D. Weiland, J. F. Neuhaus, M. Schauen, A. Wille, A. Muller, C. Merkwirth, T. Langer, N. G. Larsson, T. Krieg, D. J. Tobin, R. Paus and R. J. Wiesner (2011). "The mitochondrial electron transport chain is dispensable for proliferation and differentiation of epidermal progenitor cells." Stem Cells **29**(9): 1459-1468.
- Barouki, R. (2010). "Linking long-term toxicity of xeno-chemicals with short-term biological adaptation." Biochimie **92**(9): 1222-1226.
- Barouki, R., P. D. Gluckman, P. Grandjean, M. Hanson and J. J. Heindel (2012). "Developmental origins of non-communicable disease: implications for research and public health." Environ Health **11**: 42.
- Bashan, A., R. Zarivach, F. Schluenzen, I. Agmon, J. Harms, T. Auerbach, D. Baram, R. Berisio, H. Bartels, H. A. Hansen, P. Fucini, D. Wilson, M. Peretz, M. Kessler and A. Yonath (2003). "Ribosomal crystallography: peptide bond formation and its inhibition." Biopolymers **70**(1): 19-41.
- Bates, D. E. (2003). "Aminoglycoside ototoxicity." Drugs Today (Barc) **39**(4): 277-285.
- Benarbia Mel, A., D. Macherel, S. Faure, C. Jacques, R. Andriantsitohaina and Y. Malthiery (2013). "Plasmatic concentration of organochlorine lindane acts as metabolic disruptors in HepG2 liver cell line by inducing mitochondrial disorder." Toxicol Appl Pharmacol **272**(2): 325-334.
- Berg, A. H., T. P. Combs, X. Du, M. Brownlee and P. E. Scherer (2001). "The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action." Nat Med **7**(8): 947-953.
- Bergkvist, C., M. Oberg, M. Appelgren, W. Becker, M. Aune, E. H. Ankarberg, M. Berglund and H. Hakansson (2008). "Exposure to dioxin-like pollutants via different food commodities in Swedish children and young adults." Food Chem Toxicol **46**(11): 3360-3367.
- Biemann, R., B. Fischer, M. Bluher and A. Navarrete Santos (2014). "Tributyltin affects adipogenic cell fate commitment in mesenchymal stem cells by a PPARgamma independent mechanism." Chem Biol Interact **214**: 1-9.
- Biemann, R., A. Navarrete Santos, D. Riemann, J. Knelangen, M. Bluher, H. Koch and B. Fischer (2012). "Endocrine disrupting chemicals affect the adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells in distinct ontogenetic windows." Biochem Biophys Res Commun **417**(2): 747-752.
- Birmingham, M. C., C. R. Rayner, A. K. Meagher, S. M. Flavin, D. H. Batts and J. J. Schentag (2003). "Linezolid for the treatment of multidrug-resistant, gram-positive infections: experience from a compassionate-use program." Clin Infect Dis **36**(2): 159-168.
- Bogacka, I., B. Ukropcova, M. McNeil, J. M. Gimble and S. R. Smith (2005). "Structural and functional consequences of mitochondrial biogenesis in human adipocytes in vitro." J Clin Endocrinol Metab **90**(12): 6650-6656.
- Bonab, M. M., K. Alimoghaddam, F. Talebian, S. H. Ghaffari, A. Ghavamzadeh and B. Nikbin (2006). "Aging of mesenchymal stem cell in vitro." BMC Cell Biol **7**: 14.
- Bonora-Centelles, A., R. Jover, V. Mirabet, A. Lahoz, F. Carbonell, J. V. Castell and M. J. Gomez-Lechon (2009). "Sequential hepatogenic transdifferentiation of adipose tissue-derived stem cells: relevance of different

- extracellular signaling molecules, transcription factors involved, and expression of new key marker genes." *Cell Transplant* **18**(12): 1319-1340.
- Bouquest, A. C., A. Noer and P. Collas (2006). "Epigenetic programming of mesenchymal stem cells from human adipose tissue." *Stem Cell Rev* **2**(4): 319-329.
- Bourez, S., S. Le Lay, C. Van den Daelen, C. Louis, Y. Larondelle, J. P. Thome, Y. J. Schneider, I. Dugail and C. Debier (2012). "Accumulation of polychlorinated biphenyls in adipocytes: selective targeting to lipid droplets and role of caveolin-1." *PLoS One* **7**(2): e31834.
- Brandebourger, M., J. Barre, C. Hamberger, I. Pochet and J. P. Tillement (1986). "[In vitro study of ceftriaxone binding to blood]." *Pathol Biol (Paris)* **34**(5): 320-324.
- Budowle, B. and R. C. Allen (1998). "Analysis of amplified fragment-length polymorphisms (VNTR/STR loci) for human identity testing." *Methods Mol Biol* **98**: 155-171.
- Bustin, S. A., V. Benes, J. A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M. W. Pfaffl, G. L. Shipley, J. Vandesompele and C. T. Wittwer (2009). "The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments." *Clin Chem* **55**(4): 611-622.
- Butow, R. A. and N. G. Avadhani (2004). "Mitochondrial signaling: the retrograde response." *Mol Cell* **14**(1): 1-15.
- Calzadilla, P., D. Sapochnik, S. Cosentino, V. Diz, L. Dicelio, J. C. Calvo and L. N. Guerra (2011). "N-acetylcysteine reduces markers of differentiation in 3T3-L1 adipocytes." *Int J Mol Sci* **12**(10): 6936-6951.
- Campian, J. L., X. Gao, M. Qian and J. W. Eaton (2007). "Cytochrome C oxidase activity and oxygen tolerance." *J Biol Chem* **282**(17): 12430-12438.
- Campos, Y., M. A. Martin, C. Navarro, P. Gordo and J. Arenas (1996). "Single large-scale mitochondrial DNA deletion in a patient with mitochondrial myopathy associated with multiple symmetric lipomatosis." *Neurology* **47**(4): 1012-1014.
- Carbon, C. (1998). "Pharmacodynamics of macrolides, azalides, and streptogramins: effect on extracellular pathogens." *Clin Infect Dis* **27**(1): 28-32.
- Carelli, V., F. Franceschini, S. Venturi, P. Barboni, G. Savini, G. Barbieri, E. Pirro, C. La Morgia, M. L. Valentino, F. Zanardi, F. S. Violante and S. Mattioli (2007). "Grand rounds: could occupational exposure to n-hexane and other solvents precipitate visual failure in leber hereditary optic neuropathy?" *Environ Health Perspect* **115**(1): 113-115.
- Carelli, V., F. N. Ross-Cisneros and A. A. Sadun (2002). "Optic nerve degeneration and mitochondrial dysfunction: genetic and acquired optic neuropathies." *Neurochem Int* **40**(6): 573-584.
- Carfi, M., C. Croera, D. Ferrario, V. Campi, G. Bowe, R. Pieters and L. Gribaldo (2008). "TBTC induces adipocyte differentiation in human bone marrow long term culture." *Toxicology* **249**(1): 11-18.
- Caron, M., M. Auclair, C. Lagathu, A. Lombes, U. A. Walker, M. Kornprobst and J. Capeau (2004). "The HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitors stavudine and zidovudine alter adipocyte functions in vitro." *AIDS* **18**(16): 2127-2136.
- Carriere, A., M. C. Carmona, Y. Fernandez, M. Rigoulet, R. H. Wenger, L. Penicaud and L. Casteilla (2004). "Mitochondrial reactive oxygen species control the transcription factor CHOP-10/GADD153 and adipocyte differentiation: a mechanism for hypoxia-dependent effect." *J Biol Chem* **279**(39): 40462-40469.
- Carriere, A., Y. Fernandez, M. Rigoulet, L. Penicaud and L. Casteilla (2003). "Inhibition of preadipocyte proliferation by mitochondrial reactive oxygen species." *FEBS Lett* **550**(1-3): 163-167.
- Carrozzo, R., I. Wittig, F. M. Santorelli, E. Bertini, S. Hofmann, U. Brandt and H. Schagger (2006). "Subcomplexes of human ATP synthase mark mitochondrial biosynthesis disorders." *Ann Neurol* **59**(2): 265-275.
- Carter, W. O., P. K. Narayanan and J. P. Robinson (1994). "Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells." *J Leukoc Biol* **55**(2): 253-258.

- Casemore, D. P. (1967). "Gentamicin as a bactericidal agent in virological tissue cultures." *J Clin Pathol* **20**(3): 298-299.
- Cinti, S. (2012). "The adipose organ at a glance." *Dis Model Mech* **5**(5): 588-594.
- Clarke, C., R. Xiao, E. Place, Z. Zhang, N. Sondheimer, M. Bennett, M. Yudkoff and M. J. Falk (2013). "Mitochondrial respiratory chain disease discrimination by retrospective cohort analysis of blood metabolites." *Mol Genet Metab* **110**(1-2): 145-152.
- Clayton, D. A. (1982). "Replication of animal mitochondrial DNA." *Cell* **28**(4): 693-705.
- Clayton, D. A. (2000). "Vertebrate mitochondrial DNA-a circle of surprises." *Exp Cell Res* **255**(1): 4-9.
- Cogliati, S., J. A. Enriquez and L. Scorrano (2016). "Mitochondrial Cristae: Where Beauty Meets Functionality." *Trends Biochem Sci* **41**(3): 261-273.
- Cohen, S., A. Samadikuchaksaraei, J. M. Polak and A. E. Bishop (2006). "Antibiotics reduce the growth rate and differentiation of embryonic stem cell cultures." *Tissue Eng* **12**(7): 2025-2030.
- Corder, E. H., A. M. Saunders, W. J. Strittmatter, D. E. Schmechel, P. C. Gaskell, G. W. Small, A. D. Roses, J. L. Haines and M. A. Pericak-Vance (1993). "Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families." *Science* **261**(5123): 921-923.
- Cornelius, P., O. A. MacDougald and M. D. Lane (1994). "Regulation of adipocyte development." *Annu Rev Nutr* **14**: 99-129.
- Corsini, E., B. Viviani, O. Zancanella, L. Lucchi, F. Visioli, G. Serrero, S. Bartesaghi, C. L. Galli and M. Marinovich (2003). "Induction of adipose differentiation related protein and neutral lipid droplet accumulation in keratinocytes by skin irritants." *J Invest Dermatol* **121**(2): 337-344.
- Cossarizza, A., C. Mussini and A. Vigano (2001). "Mitochondria in the pathogenesis of lipodystrophy induced by anti-HIV antiretroviral drugs: actors or bystanders?" *Bioessays* **23**(11): 1070-1080.
- Cousin, B., S. Cinti, M. Morroni, S. Raimbault, D. Ricquier, L. Penicaud and L. Casteilla (1992). "Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization." *J Cell Sci* **103** (Pt 4): 931-942.
- Cristancho, A. G. and M. A. Lazar (2011). "Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation." *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**(11): 722-734.
- Champ, M. A. (2003). "Economic and environmental impacts on ports and harbors from the convention to ban harmful marine anti-fouling systems." *Mar Pollut Bull* **46**(8): 935-940.
- Chance, B. and G. R. Williams (1955). "Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization." *J Biol Chem* **217**(1): 383-393.
- Chang, T. H. and S. E. Polakis (1978). "Differentiation of 3T3-L1 fibroblasts to adipocytes. Effect of insulin and indomethacin on the levels of insulin receptors." *J Biol Chem* **253**(13): 4693-4696.
- Chapman, A. B., D. M. Knight, B. S. Dieckmann and G. M. Ringold (1984). "Analysis of gene expression during differentiation of adipogenic cells in culture and hormonal control of the developmental program." *J Biol Chem* **259**(24): 15548-15555.
- Charni, S., G. de Bettignies, M. G. Rathore, J. I. Aguilo, P. J. van den Elsen, D. Haouzi, R. A. Hipskind, J. A. Enriquez, M. Sanchez-Beato, J. Pardo, A. Anel and M. Villalba (2010). "Oxidative phosphorylation induces de novo expression of the MHC class I in tumor cells through the ERK5 pathway." *J Immunol* **185**(6): 3498-3503.
- Chen, C. T., S. H. Hsu and Y. H. Wei (2010). "Upregulation of mitochondrial function and antioxidant defense in the differentiation of stem cells." *Biochim Biophys Acta* **1800**(3): 257-263.

- Chen, C. T., Y. R. Shih, T. K. Kuo, O. K. Lee and Y. H. Wei (2008). "Coordinated changes of mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells." *Stem Cells* **26**(4): 960-968.
- Chen, S., L. C. Teicher, D. Kazim, R. E. Pollack and L. S. Wise (1989). "Commitment of mouse fibroblasts to adipocyte differentiation by DNA transfection." *Science* **244**(4904): 582-585.
- Chiappini, F., E. Teicher, R. Saffroy, B. Debuire, D. Vittecoq and A. Lemoine (2009). "Relationship between polymerase gamma (POLG) polymorphisms and antiretroviral therapy-induced lipodystrophy in HIV-1 infected patients: a case-control study." *Curr HIV Res* **7**(2): 244-253.
- Chicano, J. J., A. Ortiz, J. A. Teruel and F. J. Aranda (2001). "Organotin compounds alter the physical organization of phosphatidylcholine membranes." *Biochim Biophys Acta* **1510**(1-2): 330-341.
- Chiellini, C., O. Cochet, L. Negroni, M. Samson, M. Poggi, G. Ailhaud, M. C. Alessi, C. Dani and E. Z. Amri (2008). "Characterization of human mesenchymal stem cell secretome at early steps of adipocyte and osteoblast differentiation." *BMC Mol Biol* **9**: 26.
- Cho, Y. M., S. Kwon, Y. K. Pak, H. W. Seol, Y. M. Choi, J. Park do, K. S. Park and H. K. Lee (2006). "Dynamic changes in mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during the spontaneous differentiation of human embryonic stem cells." *Biochem Biophys Res Commun* **348**(4): 1472-1478.
- Choi, J. R., B. Pingguan-Murphy, W. A. Wan Abas, M. A. Noor Azmi, S. Z. Omar, K. H. Chua and W. K. Wan Safwani (2014). "Impact of low oxygen tension on stemness, proliferation and differentiation potential of human adipose-derived stem cells." *Biochem Biophys Res Commun* **448**(2): 218-224.
- Chomyn, A. (1996). "In vivo labeling and analysis of human mitochondrial translation products." *Methods Enzymol* **264**: 197-211.
- Choo, H. J., J. H. Kim, O. B. Kwon, C. S. Lee, J. Y. Mun, S. S. Han, Y. S. Yoon, G. Yoon, K. M. Choi and Y. G. Ko (2006). "Mitochondria are impaired in the adipocytes of type 2 diabetic mice." *Diabetologia* **49**(4): 784-791.
- Chow, S. C., G. E. Kass, M. J. McCabe, Jr. and S. Orrenius (1992). "Tributyltin increases cytosolic free Ca²⁺ concentration in thymocytes by mobilizing intracellular Ca²⁺, activating a Ca²⁺ entry pathway, and inhibiting Ca²⁺ efflux." *Arch Biochem Biophys* **298**(1): 143-149.
- Christy, R. J., V. W. Yang, J. M. Ntambi, D. E. Geiman, W. H. Landschulz, A. D. Friedman, Y. Nakabeppu, T. J. Kelly and M. D. Lane (1989). "Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes: CCAAT/enhancer binding protein interacts with and activates the promoters of two adipocyte-specific genes." *Genes Dev* **3**(9): 1323-1335.
- Chuang, C. C., R. S. Yang, K. S. Tsai, F. M. Ho and S. H. Liu (2007). "Hyperglycemia enhances adipogenic induction of lipid accumulation: involvement of extracellular signal-regulated protein kinase 1/2, phosphoinositide 3-kinase/Akt, and peroxisome proliferator-activated receptor gamma signaling." *Endocrinology* **148**(9): 4267-4275.
- Danoviz, M. E., V. Bassaneze, J. S. Nakamuta, G. R. dos Santos-Junior, D. Saint-Clair, M. C. Bajgelman, K. C. Fae, J. Kalil, A. A. Miyakawa and J. E. Krieger (2011). "Adipose tissue-derived stem cells from humans and mice differ in proliferative capacity and genome stability in long-term cultures." *Stem Cells Dev* **20**(4): 661-670.
- De Pauw, A., S. Tejerina, M. Raes, J. Keijer and T. Arnould (2009). "Mitochondrial (dys)function in adipocyte (de)differentiation and systemic metabolic alterations." *Am J Pathol* **175**(3): 927-939.
- Degli Esposti, M. (1998). "Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview." *Biochim Biophys Acta* **1364**(2): 222-235.
- Delgado, L. and S. Ingen-Housz-Oro (2012). "Enfermedades del tejido adiposo: lipomas, lipomatosis, lipodistrofias." *EMC - Dermatología* **46**(1): 1-9.
- Demirci, H., L. Wang, F. V. t. Murphy, E. L. Murphy, J. F. Carr, S. C. Blanchard, G. Jogl, A. E. Dahlberg and S. T. Gregory (2013). "The central role of protein S12 in organizing the structure of the decoding site of the ribosome." *RNA* **19**(12): 1791-1801.

- Demongeot, J., N. Glade, O. Hansen and A. Moreira (2007). "An open issue: the inner mitochondrial membrane (IMM) as a free boundary problem." Biochimie **89**(9): 1049-1057.
- Dicker, A., K. Le Blanc, G. Astrom, V. van Harmelen, C. Gotherstrom, L. Blomqvist, P. Arner and M. Ryden (2005). "Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue." Exp Cell Res **308**(2): 283-290.
- DiMauro, S. (2004). "Mitochondrial diseases." Biochim Biophys Acta **1658**(1-2): 80-88.
- Divoux, A. and K. Clement (2011). "Architecture and the extracellular matrix: the still unappreciated components of the adipose tissue." Obes Rev **12**(5): e494-503.
- Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop and E. Horwitz (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." Cytotherapy **8**(4): 315-317.
- Dryden, M. S. (2011). "Linezolid pharmacokinetics and pharmacodynamics in clinical treatment." J Antimicrob Chemother **66 Suppl 4**: iv7-iv15.
- Dudimah, F. D., S. O. Odman-Ghazi, F. Hatcher and M. M. Whalen (2007). "Effect of tributyltin (TBT) on ATP levels in human natural killer (NK) cells: relationship to TBT-induced decreases in NK function." J Appl Toxicol **27**(1): 86-94.
- Eastwood, J. (1962). "Paromomycin: serum levels following parenteral administration." Antibiot Chemother (Northfield) **12**: 77-84.
- Elston, T., H. Wang and G. Oster (1998). "Energy transduction in ATP synthase." Nature **391**(6666): 510-513.
- Ellison, D., J. Rigg, S. J. McConnell, A. D. Alexander and R. H. Yager (1965). "Use of Antibiotics in the Preparation of Canine Kidney Tissue Culture Vaccines to Eliminate Leptospirosis Hazards." Appl Microbiol **13**: 595-599.
- Emperador, S., D. Pacheu-Grau, M. P. Bayona-Bafaluy, N. Garrido-Perez, A. Martin-Navarro, M. J. Lopez-Perez, J. Montoya and E. Ruiz-Pesini (2014). "An MRPS12 mutation modifies aminoglycoside sensitivity caused by 12S rRNA mutations." Front Genet **5**: 469.
- Enerback, S. (2009). "The origins of brown adipose tissue." N Engl J Med **360**(19): 2021-2023.
- Faloon, G. R. and P. A. Srere (1969). "Escherichia coli citrate synthase. Purification and the effect of potassium on some properties." Biochemistry **8**(11): 4497-4503.
- Famulla, S., R. Schlich, H. Sell and J. Eckel (2012). "Differentiation of human adipocytes at physiological oxygen levels results in increased adiponectin secretion and isoproterenol-stimulated lipolysis." Adipocyte **1**(3): 132-181.
- Fei, H., H. J. Okano, C. Li, G. H. Lee, C. Zhao, R. Darnell and J. M. Friedman (1997). "Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(13): 7001-7005.
- Fernyhough, M. E., J. L. Vierck, G. J. Hausman, P. S. Mir, E. K. Okine and M. V. Dodson (2004). "Primary adipocyte culture: adipocyte purification methods may lead to a new understanding of adipose tissue growth and development." Cytotechnology **46**(2-3): 163-172.
- Finley, L. W. and M. C. Haigis (2009). "The coordination of nuclear and mitochondrial communication during aging and calorie restriction." Ageing Res Rev **8**(3): 173-188.
- Fischer-Posovszky, P., F. S. Newell, M. Wabitsch and H. E. Tornqvist (2008). "Human SGBS cells - a unique tool for studies of human fat cell biology." Obes Facts **1**(4): 184-189.
- Forge, A. and J. Schacht (2000). "Aminoglycoside antibiotics." Audiol Neurootol **5**(1): 3-22.
- Frazier, T. P., J. M. Gimble, I. Kheterpal and B. G. Rowan (2013). "Impact of low oxygen on the secretome of human adipose-derived stromal/stem cell primary cultures." Biochimie **95**(12): 2286-2296.

Fridlender, B., M. Fry, A. Bolden and A. Weissbach (1972). "A new synthetic RNA-dependent DNA polymerase from human tissue culture cells (HeLa-fibroblast-synthetic oligonucleotides-template-purified enzymes)." Proc Natl Acad Sci U S A **69**(2): 452-455.

Friedenstein, A. J. (1976). "Precursor cells of mechanocytes." Int Rev Cytol **47**: 327-359.

Friedman, J. M. (1999). "Leptin and the regulation of body weight." Harvey Lect **95**: 107-136.

Frontini, A. and S. Cinti (2010). "Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ." Cell Metab **11**(4): 253-256.

Fruhbeck, G. (2008). "Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders." Methods Mol Biol **456**: 1-22.

Fu, Y., N. Luo, R. L. Klein and W. T. Garvey (2005). "Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation." J Lipid Res **46**(7): 1369-1379.

Galera, T., F. Zurita-Diaz, R. Garesse and M. E. Gallardo (2016). "iPSCs, a Future Tool for Therapeutic Intervention in Mitochondrial Disorders: Pros and Cons." J Cell Physiol.

Gamez, J., A. Playan, A. L. Andreu, C. Bruno, C. Navarro, C. Cervera, M. A. Arbos, S. Schwartz, J. A. Enriquez and J. Montoya (1998). "Familial multiple symmetric lipomatosis associated with the A8344G mutation of mitochondrial DNA." Neurology **51**(1): 258-260.

Gao, Y. H., C. X. Li, S. M. Shen, H. Li, G. Q. Chen, Q. Wei and L. S. Wang (2013). "Hypoxia-inducible factor 1 α mediates the down-regulation of superoxide dismutase 2 in von Hippel-Lindau deficient renal clear cell carcinoma." Biochem Biophys Res Commun **435**(1): 46-51.

Gardner, K., P. A. Hall, P. F. Chinnery and B. A. Payne (2014). "HIV treatment and associated mitochondrial pathology: review of 25 years of in vitro, animal, and human studies." Toxicol Pathol **42**(5): 811-822.

Garg, A. (2011). "Clinical review#: Lipodystrophies: genetic and acquired body fat disorders." J Clin Endocrinol Metab **96**(11): 3313-3325.

Garrabou, G., A. Soriano, S. Lopez, J. P. Guallar, M. Giralt, F. Villarroya, J. A. Martinez, J. Casademont, F. Cardellach, J. Mensa and O. Miro (2007). "Reversible inhibition of mitochondrial protein synthesis during linezolid-related hyperlactatemia." Antimicrob Agents Chemother **51**(3): 962-967.

Gesta, S., O. Bezy, M. A. Mori, Y. Macotela, K. Y. Lee and C. R. Kahn (2011). "Mesodermal developmental gene Tbx15 impairs adipocyte differentiation and mitochondrial respiration." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(7): 2771-2776.

Gesta, S., Y. H. Tseng and C. R. Kahn (2007). "Developmental origin of fat: tracking obesity to its source." Cell **131**(2): 242-256.

Gimble, J. M., A. J. Katz and B. A. Bunnell (2007). "Adipose-derived stem cells for regenerative medicine." Circ Res **100**(9): 1249-1260.

Giordano, A., A. Smorlesi, A. Frontini, G. Barbatelli and S. Cinti (2014). "White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ." Eur J Endocrinol **170**(5): R159-171.

Gir, P., G. Oni, S. A. Brown, A. Mojallal and R. J. Rohrich (2012). "Human adipose stem cells: current clinical applications." Plast Reconstr Surg **129**(6): 1277-1290.

Giralt, M., P. Domingo, J. P. Guallar, M. L. Rodriguez de la Concepcion, M. Alegre, J. C. Domingo and F. Villarroya (2006). "HIV-1 infection alters gene expression in adipose tissue, which contributes to HIV- 1/HAART-associated lipodystrophy." Antivir Ther **11**(6): 729-740.

Gnaiger, E., R. Steinlechner-Maran, G. Mendez, T. Eberl and R. Margreiter (1995). "Control of mitochondrial and cellular respiration by oxygen." J Bioenerg Biomembr **27**(6): 583-596.

Goldstein, A. L. and P. R. Johnson (1982). "Primary culture of adipoblasts from obese and lean Zucker rat adipose tissue." *Metabolism* **31**(6): 601-607.

Gorman, G. S., A. M. Schaefer, Y. Ng, N. Gomez, E. L. Blakely, C. L. Alston, C. Feeney, R. Horvath, P. Yu-Wai-Man, P. F. Chinnery, R. W. Taylor, D. M. Turnbull and R. McFarland (2015). "Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease." *Ann Neurol* **77**(5): 753-759.

Goto, Y., I. Nonaka and S. Horai (1990). "A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies." *Nature* **348**(6302): 651-653.

Green, H. and O. Kehinde (1975). "An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion." *Cell* **5**(1): 19-27.

Grimaldi, P., P. Djian, R. Negrel and G. Ailhaud (1982). "Differentiation of Ob17 preadipocytes to adipocytes: requirement of adipose conversion factor(s) for fat cell cluster formation." *EMBO J* **1**(6): 687-692.

Grun, F. (2014). "The obesogen tributyltin." *Vitam Horm* **94**: 277-325.

Grun, F. and B. Blumberg (2006). "Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling." *Endocrinology* **147**(6 Suppl): S50-55.

Guallar, J. P., J. M. Gallego-Escuredo, J. C. Domingo, M. Alegre, J. Fontdevila, E. Martinez, E. L. Hammond, P. Domingo, M. Giral and F. Villarroya (2008). "Differential gene expression indicates that 'buffalo hump' is a distinct adipose tissue disturbance in HIV-1-associated lipodystrophy." *AIDS* **22**(5): 575-584.

Guallar, J. P., R. Rojas-Garcia, E. Garcia-Arumi, J. C. Domingo, E. Gallardo, A. L. Andreu, P. Domingo, I. Illa, M. Giral and F. Villarroya (2008). "Impaired expression of mitochondrial and adipogenic genes in adipose tissue from a patient with acquired partial lipodystrophy (Barraquer-Simons syndrome): a case report." *J Med Case Rep* **2**: 284.

Guallar, J. P., M. R. Vila, E. Lopez-Gallardo, A. Solano, J. C. Domingo, J. Gamez, M. Pineda, J. L. Capablo, P. Domingo, A. L. Andreu, J. Montoya, M. Giral and F. Villarroya (2006). "Altered expression of master regulatory genes of adipogenesis in lipomas from patients bearing tRNA(Lys) point mutations in mitochondrial DNA." *Mol Genet Metab* **89**(3): 283-285.

Guan, M. X., N. Fischel-Ghodsian and G. Attardi (2001). "Nuclear background determines biochemical phenotype in the deafness-associated mitochondrial 12S rRNA mutation." *Hum Mol Genet* **10**(6): 573-580.

Gustavson, L. E., E. K. Fukuda, F. A. Rubio and A. W. Dunton (1990). "A pilot study of the bioavailability and pharmacokinetics of 2',3'-dideoxycytidine in patients with AIDS or AIDS-related complex." *J Acquir Immune Defic Syndr* **3**(1): 28-31.

Hakonen, A. H., S. Heiskanen, V. Juvonen, I. Lappalainen, P. T. Luoma, M. Rantamaki, G. V. Goethem, A. Lofgren, P. Hackman, A. Paetau, S. Kaakkola, K. Majamaa, T. Varilo, B. Udd, H. Kaariainen, L. A. Bindoff and A. Suomalainen (2005). "Mitochondrial DNA polymerase W748S mutation: a common cause of autosomal recessive ataxia with ancient European origin." *Am J Hum Genet* **77**(3): 430-441.

Halper, J. and M. Kjaer (2014). "Basic components of connective tissues and extracellular matrix: elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins." *Adv Exp Med Biol* **802**: 31-47.

Hamai, N., M. Nakamura and A. Asano (1997). "Inhibition of mitochondrial protein synthesis impaired C2C12 myoblast differentiation." *Cell Struct Funct* **22**(4): 421-431.

Hammond, E., D. Nolan, I. James, C. Metcalf and S. Mallal (2004). "Reduction of mitochondrial DNA content and respiratory chain activity occurs in adipocytes within 6-12 months of commencing nucleoside reverse transcriptase inhibitor therapy." *AIDS* **18**(5): 815-817.

Hance, N., M. I. Ekstrand and A. Trifunovic (2005). "Mitochondrial DNA polymerase gamma is essential for mammalian embryogenesis." *Hum Mol Genet* **14**(13): 1775-1783.

Hausman, G. J., J. T. Wright and R. L. Richardson (1996). "The influence of extracellular matrix substrata on preadipocyte development in serum-free cultures of stromal-vascular cells." *J Anim Sci* **74**(9): 2117-2128.

- Havel, R. J., N. Yamada and D. M. Shames (1987). "Role of apolipoprotein E in lipoprotein metabolism." Am Heart J **113**(2 Pt 2): 470-474.
- Heid, C. A., J. Stevens, K. J. Livak and P. M. Williams (1996). "Real time quantitative PCR." Genome Res **6**(10): 986-994.
- Hendrickson, S. L., L. A. Kingsley, E. Ruiz-Pesini, J. C. Poole, L. P. Jacobson, F. J. Palella, J. H. Bream, D. C. Wallace and S. J. O'Brien (2009). "Mitochondrial DNA haplogroups influence lipotrophy after highly active antiretroviral therapy." J Acquir Immune Defic Syndr **51**(2): 111-116.
- Herst, P. M., D. M. Levine and M. V. Berridge (2005). "Mitochondrial gene knockout HL60rho0 cells show preferential differentiation into monocytes/macrophages." Leuk Res **29**(10): 1163-1170.
- Higuchi, M., G. J. Dusting, H. Peshavariya, F. Jiang, S. T. Hsiao, E. C. Chan and G. S. Liu (2013). "Differentiation of human adipose-derived stem cells into fat involves reactive oxygen species and Forkhead box O1 mediated upregulation of antioxidant enzymes." Stem Cells Dev **22**(6): 878-888.
- Hodge, K., S. T. Have, L. Hutton and A. I. Lamond (2013). "Cleaning up the masses: exclusion lists to reduce contamination with HPLC-MS/MS." J Proteomics **88**: 92-103.
- Hofmann, A. D., M. Beyer, U. Krause-Buchholz, M. Wobus, M. Bornhauser and G. Rodel (2012). "OXPHOS supercomplexes as a hallmark of the mitochondrial phenotype of adipogenic differentiated human MSCs." PLoS One **7**(4): e35160.
- Hsu, C. L. and G. C. Yen (2007). "Effects of capsaicin on induction of apoptosis and inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells." J Agric Food Chem **55**(5): 1730-1736.
- Hynes, K., D. Menicanin, K. Mrozik, S. Gronthos and P. M. Bartold (2014). "Generation of functional mesenchymal stem cells from different induced pluripotent stem cell lines." Stem Cells Dev **23**(10): 1084-1096.
- Iglesias, E., L. Lobet, D. Pacheu-Grau, A. Gómez-Durán and E. Ruiz-Pesini (2012). "Cybrids for Mitochondrial DNA Pharmacogenomics." DRUG DEVELOPMENT RESEARCH **73**: 453-460.
- Ingham, E., L. Turnbull and J. N. Kearney (1991). "The effects of minocycline and tetracycline on the mitotic response of human peripheral blood-lymphocytes." J Antimicrob Chemother **27**(5): 607-617.
- Isenmann, S., A. Arthur, A. C. Zannettino, J. L. Turner, S. Shi, C. A. Glackin and S. Gronthos (2009). "TWIST family of basic helix-loop-helix transcription factors mediate human mesenchymal stem cell growth and commitment." Stem Cells **27**(10): 2457-2468.
- Ivanovic, Z. (2009). "Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm." J Cell Physiol **219**(2): 271-275.
- Janneh, O., P. G. Hoggard, J. F. Tjia, S. P. Jones, S. H. Khoo, B. Maher, D. J. Back and M. Pirmohamed (2003). "Intracellular disposition and metabolic effects of zidovudine, stavudine and four protease inhibitors in cultured adipocytes." Antivir Ther **8**(5): 417-426.
- Joggerst, S. J. and A. K. Hatzopoulos (2009). "Stem cell therapy for cardiac repair: benefits and barriers." Expert Rev Mol Med **11**: e20.
- Johnson, J., W. Lee, A. E. Frazier, V. Vaghjiani, A. Laskowski, A. L. Rodriguez, G. L. Cagnone, M. McKenzie, S. J. White, D. R. Nisbet, D. R. Thorburn and J. C. St John (2016). "Deletion of the Complex I Subunit NDUF54 Adversely Modulates Cellular Differentiation." Stem Cells Dev **25**(3): 239-250.
- Johnson, P. C., M. Vaduganathan, K. M. Phillips and W. J. O'Donnell (2015). "A triad of linezolid toxicity: hypoglycemia, lactic acidosis, and acute pancreatitis." Proc (Bayl Univ Med Cent) **28**(4): 466-468.
- Kaguni, L. S. (2004). "DNA polymerase gamma, the mitochondrial replicase." Annu Rev Biochem **73**: 293-320.
- Kalghatgi, S., C. S. Spina, J. C. Costello, M. Liesa, J. R. Morones-Ramirez, S. Slomovic, A. Molina, O. S. Shirihai and J. J. Collins (2013). "Bactericidal antibiotics induce mitochondrial dysfunction and oxidative damage in Mammalian cells." Sci Transl Med **5**(192): 192ra185.

- Kanayama, T., N. Kobayashi, S. Mamiya, T. Nakanishi and J. Nishikawa (2005). "Organotin compounds promote adipocyte differentiation as agonists of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma/retinoid X receptor pathway." *Mol Pharmacol* **67**(3): 766-774.
- Kapur, S. K. and A. J. Katz (2013). "Review of the adipose derived stem cell secretome." *Biochimie* **95**(12): 2222-2228.
- Karasawa, T. and P. S. Steyger (2011). "Intracellular mechanisms of aminoglycoside-induced cytotoxicity." *Integr Biol (Camb)* **3**(9): 879-886.
- Kasamatsu, H. and J. Vinograd (1974). "Replication of circular DNA in eukaryotic cells." *Annu Rev Biochem* **43**(0): 695-719.
- Kauppila, J. H. and J. B. Stewart (2015). "Mitochondrial DNA: Radically free of free-radical driven mutations." *Biochim Biophys Acta* **1847**(11): 1354-1361.
- Keuper, M., M. Jastroch, C. X. Yi, P. Fischer-Posovszky, M. Wabitsch, M. H. Tschop and S. M. Hofmann (2014). "Spare mitochondrial respiratory capacity permits human adipocytes to maintain ATP homeostasis under hypoglycemic conditions." *FASEB J* **28**(2): 761-770.
- Kim, J. H., S. H. Kim, S. Y. Song, W. S. Kim, S. U. Song, T. Yi, M. S. Jeon, H. M. Chung, Y. Xia and J. H. Sung (2014). "Hypoxia induces adipocyte differentiation of adipose-derived stem cells by triggering reactive oxygen species generation." *Cell Biol Int* **38**(1): 32-40.
- Kim, M. J., C. Jardel, C. Barthelemy, V. Jan, J. P. Bastard, S. Fillaut-Chapin, S. Houry, J. Capeau and A. Lombes (2008). "Mitochondrial DNA content, an inaccurate biomarker of mitochondrial alteration in human immunodeficiency virus-related lipodystrophy." *Antimicrob Agents Chemother* **52**(5): 1670-1676.
- Kim, M. J., P. Marchand, C. Henegar, J. P. Antignac, R. Alili, C. Poitou, J. L. Bouillot, A. Basdevant, B. Le Bizec, R. Barouki and K. Clement (2011). "Fate and complex pathogenic effects of dioxins and polychlorinated biphenyls in obese subjects before and after drastic weight loss." *Environ Health Perspect* **119**(3): 377-383.
- Kim, M. J., V. Pelloux, E. Guyot, J. Tordjman, L. C. Bui, A. Chevallier, C. Forest, C. Benelli, K. Clement and R. Barouki (2012). "Inflammatory pathway genes belong to major targets of persistent organic pollutants in adipose cells." *Environ Health Perspect* **120**(4): 508-514.
- King, T. E. (1966). "Reconstitution of the respiratory chain." *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **28**: 155-236.
- Kirchner, S., T. Kieu, C. Chow, S. Casey and B. Blumberg (2010). "Prenatal exposure to the environmental obesogen tributyltin predisposes multipotent stem cells to become adipocytes." *Mol Endocrinol* **24**(3): 526-539.
- Kirkman, M. A., P. Yu-Wai-Man, A. Korsten, M. Leonhardt, K. Dimitriadis, I. F. De Coo, T. Klopstock and P. F. Chinnery (2009). "Gene-environment interactions in Leber hereditary optic neuropathy." *Brain* **132**(Pt 9): 2317-2326.
- Kirtland, J. and P. M. Harris (1980). "Changes in adipose tissue of the rat due early undernutrition followed by rehabilitation. 3. Changes in cell replication studied with tritiated thymidine." *Br J Nutr* **43**(1): 33-43.
- Klopstock, T., M. Naumann, P. Seibel, B. Shalke, K. Reiners and H. Reichmann (1997). "Mitochondrial DNA mutations in multiple symmetric lipomatosis." *Mol Cell Biochem* **174**(1-2): 271-275.
- Koh, E. H., J. Y. Park, H. S. Park, M. J. Jeon, J. W. Ryu, M. Kim, S. Y. Kim, M. S. Kim, S. W. Kim, I. S. Park, J. H. Youn and K. U. Lee (2007). "Essential role of mitochondrial function in adiponectin synthesis in adipocytes." *Diabetes* **56**(12): 2973-2981.
- Kontula, K., K. Aalto-Setälä, T. Kuusi, L. Hamalainen and A. C. Syvanen (1990). "Apolipoprotein E polymorphism determined by restriction enzyme analysis of DNA amplified by polymerase chain reaction: convenient alternative to phenotyping by isoelectric focusing." *Clin Chem* **36**(12): 2087-2092.
- Korohoda, W., Z. Pietrkowski and K. Reiss (1993). "Chloramphenicol, an inhibitor of mitochondrial protein synthesis, inhibits myoblast fusion and myotube differentiation." *Folia Histochem Cytobiol* **31**(1): 9-13.

- Kotake, Y. (2012). "Molecular mechanisms of environmental organotin toxicity in mammals." *Biol Pharm Bull* **35**(11): 1876-1880.
- Kraft, C. S., C. M. LeMoine, C. N. Lyons, D. Michaud, C. R. Mueller and C. D. Moyes (2006). "Control of mitochondrial biogenesis during myogenesis." *Am J Physiol Cell Physiol* **290**(4): C1119-1127.
- Kralisch, S. and M. Fasshauer (2013). "Adipocyte fatty acid binding protein: a novel adipokine involved in the pathogenesis of metabolic and vascular disease?" *Diabetologia* **56**(1): 10-21.
- Kuhlbrandt, W. (2015). "Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes." *BMC Biol* **13**: 89.
- Kulawiec, M., A. Safina, M. M. Desouki, I. Still, S. Matsui, A. Bakin and K. K. Singh (2008). "Tumorigenic transformation of human breast epithelial cells induced by mitochondrial DNA depletion." *Cancer Biol Ther* **7**(11): 1732-1743.
- Kusminski, C. M. and P. E. Scherer (2012). "Mitochondrial dysfunction in white adipose tissue." *Trends Endocrinol Metab* **23**(9): 435-443.
- La Merrill, M., C. Emond, M. J. Kim, J. P. Antignac, B. Le Bizec, K. Clement, L. S. Birnbaum and R. Barouki (2013). "Toxicological function of adipose tissue: focus on persistent organic pollutants." *Environ Health Perspect* **121**(2): 162-169.
- Lackner, L. L. (2014). "Shaping the dynamic mitochondrial network." *BMC Biol* **12**: 35.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-685.
- Laird, P. W. (2010). "Principles and challenges of genomewide DNA methylation analysis." *Nat Rev Genet* **11**(3): 191-203.
- Laskin, O. L., P. de Miranda and M. R. Blum (1989). "Azidothymidine steady-state pharmacokinetics in patients with AIDS and AIDS-related complex." *J Infect Dis* **159**(4): 745-747.
- Lasrich, D., A. Bartelt, T. Grewal and J. Heeren (2015). "Apolipoprotein E promotes lipid accumulation and differentiation in human adipocytes." *Exp Cell Res* **337**(1): 94-102.
- Lazarou, M., S. M. Smith, D. R. Thorburn, M. T. Ryan and M. McKenzie (2009). "Assembly of nuclear DNA-encoded subunits into mitochondrial complex IV, and their preferential integration into supercomplex forms in patient mitochondria." *FEBS J* **276**(22): 6701-6713.
- Lee, E. Y., Y. Xia, W. S. Kim, M. H. Kim, T. H. Kim, K. J. Kim, B. S. Park and J. H. Sung (2009). "Hypoxia-enhanced wound-healing function of adipose-derived stem cells: increase in stem cell proliferation and up-regulation of VEGF and bFGF." *Wound Repair Regen* **17**(4): 540-547.
- Lee, H., J. Hanes and K. A. Johnson (2003). "Toxicity of nucleoside analogues used to treat AIDS and the selectivity of the mitochondrial DNA polymerase." *Biochemistry* **42**(50): 14711-14719.
- Lefterova, M. I. and M. A. Lazar (2009). "New developments in adipogenesis." *Trends Endocrinol Metab* **20**(3): 107-114.
- Lehrke, M. and M. A. Lazar (2005). "The many faces of PPARgamma." *Cell* **123**(6): 993-999.
- Li, N., K. Ragheb, G. Lawler, J. Sturgis, B. Rajwa, J. A. Melendez and J. P. Robinson (2003). "Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production." *J Biol Chem* **278**(10): 8516-8525.
- Li, Z., C. Liu, Z. Xie, P. Song, R. C. Zhao, L. Guo, Z. Liu and Y. Wu (2011). "Epigenetic dysregulation in mesenchymal stem cell aging and spontaneous differentiation." *PLoS One* **6**(6): e20526.

- Liao, W., J. Xie, J. Zhong, Y. Liu, L. Du, B. Zhou, J. Xu, P. Liu, S. Yang, J. Wang, Z. Han and Z. C. Han (2009). "Therapeutic effect of human umbilical cord multipotent mesenchymal stromal cells in a rat model of stroke." Transplantation **87**(3): 350-359.
- Lim, J. M., E. E. Wollaston-Hayden, C. F. Teo, D. Hausman and L. Wells (2014). "Quantitative secretome and glycome of primary human adipocytes during insulin resistance." Clin Proteomics **11**(1): 20.
- Lin, C. S., Z. C. Xin, C. H. Deng, H. Ning, G. Lin and T. F. Lue (2010). "Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and in culture." Histol Histopathol **25**(6): 807-815.
- Lo, T., J. H. Ho, M. H. Yang and O. K. Lee (2011). "Glucose reduction prevents replicative senescence and increases mitochondrial respiration in human mesenchymal stem cells." Cell Transplant **20**(6): 813-825.
- Lopez-Gallardo, E., L. Llobet, S. Emperador, J. Montoya and E. Ruiz-Pesini (2016). "Effects of tributyltin chloride on hybrids with or without an ATP synthase pathologic mutation." Environmental Health Perspectives **In Press**.
- Luca, C. C., B. L. Lam and C. T. Moraes (2004). "Erythromycin as a potential precipitating agent in the onset of Leber's hereditary optic neuropathy." Mitochondrion **4**(1): 31-36.
- Luft, R., D. Ikkos, G. Palmieri, L. Ernster and B. Afzelius (1962). "A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study." J Clin Invest **41**: 1776-1804.
- Lund, K. C., L. L. Peterson and K. B. Wallace (2007). "Absence of a universal mechanism of mitochondrial toxicity by nucleoside analogs." Antimicrob Agents Chemother **51**(7): 2531-2539.
- Lund, K. C. and K. B. Wallace (2004). "Direct, DNA pol-gamma-independent effects of nucleoside reverse transcriptase inhibitors on mitochondrial bioenergetics." Cardiovasc Toxicol **4**(3): 217-228.
- Luo, G. F., T. Y. Yu, X. H. Wen, Y. Li and G. S. Yang (2008). "Alteration of mitochondrial oxidative capacity during porcine preadipocyte differentiation and in response to leptin." Mol Cell Biochem **307**(1-2): 83-91.
- Luo, J., R. Sladek, J. Carrier, J. A. Bader, D. Richard and V. Giguere (2003). "Reduced fat mass in mice lacking orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha." Mol Cell Biol **23**(22): 7947-7956.
- Lynx, M. D., A. T. Bentley and E. E. McKee (2006). "3'-Azido-3'-deoxythymidine (AZT) inhibits thymidine phosphorylation in isolated rat liver mitochondria: a possible mechanism of AZT hepatotoxicity." Biochem Pharmacol **71**(9): 1342-1348.
- Lloreta, J., P. Domingo, R. M. Pujol, J. A. Arroyo, N. Baixeras, X. Matias-Guiu, M. Gilaberte, M. A. Sarnat and S. Serrano (2002). "Ultrastructural features of highly active antiretroviral therapy-associated partial lipodystrophy." Virchows Arch **441**(6): 599-604.
- Mackey, D. A., J. H. Fingert, J. Z. Luzhansky, P. J. McCluskey, N. Howell, A. J. Hall, A. B. Pierce and J. F. Hoy (2003). "Leber's hereditary optic neuropathy triggered by antiretroviral therapy for human immunodeficiency virus." Eye (Lond) **17**(3): 312-317.
- Macotela, Y., B. Emanuelli, M. A. Mori, S. Gesta, T. J. Schulz, Y. H. Tseng and C. R. Kahn (2012). "Intrinsic differences in adipocyte precursor cells from different white fat depots." Diabetes **61**(7): 1691-1699.
- Mak, I. T., L. F. Nedelec and W. B. Weglicki (2004). "Pro-oxidant properties and cytotoxicity of AZT-monophosphate and AZT." Cardiovasc Toxicol **4**(2): 109-115.
- Mamaeva, S. E. (1998). "Karyotypic evolution of cells in culture: a new concept." Int Rev Cytol **178**: 1-40.
- Mandrup, S., T. M. Loftus, O. A. MacDougald, F. P. Kuhajda and M. D. Lane (1997). "Obese gene expression at in vivo levels by fat pads derived from s.c. implanted 3T3-F442A preadipocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(9): 4300-4305.
- Mannella, C. A., M. Marko, P. Penczek, D. Barnard and J. Frank (1994). "The internal compartmentation of rat-liver mitochondria: tomographic study using the high-voltage transmission electron microscope." Microsc Res Tech **27**(4): 278-283.

- Marcuello, A., J. Gonzalez-Alonso, J. A. Calbet, R. Damsgaard, M. J. Lopez-Perez and C. Diez-Sanchez (2005). "Skeletal muscle mitochondrial DNA content in exercising humans." *J Appl Physiol* (1985) **99**(4): 1372-1377.
- Martinez-Liarte, J. H., F. Solano and J. A. Lozano (1995). "Effect of penicillin-streptomycin and other antibiotics on melanogenic parameters in cultured B16/F10 melanoma cells." *Pigment Cell Res* **8**(2): 83-88.
- Martínez-Romero, Í., S. Emperador, L. Llobet, J. Montoya and E. Ruiz-Pesini (2011). "Mitogenomics: recognizing the significance of mitochondrial genomic variation for personalized medicine." *Current Pharmacogenomics and Personalized Medicine* **9**(2): 84-93.
- Martino, G., R. J. Franklin, A. Baron Van Evercooren, D. A. Kerr and G. Stem Cells in Multiple Sclerosis Consensus (2010). "Stem cell transplantation in multiple sclerosis: current status and future prospects." *Nat Rev Neurol* **6**(5): 247-255.
- Matsuno-Yagi, A. and Y. Hatefi (1993). "Studies on the mechanism of oxidative phosphorylation. ATP synthesis by submitochondrial particles inhibited at F₀ by venturicidin and organotin compounds." *J Biol Chem* **268**(9): 6168-6173.
- McKee, E. E., M. Ferguson, A. T. Bentley and T. A. Marks (2006). "Inhibition of mammalian mitochondrial protein synthesis by oxazolidinones." *Antimicrob Agents Chemother* **50**(6): 2042-2049.
- McKenzie, R., M. W. Fried, R. Sallie, H. Conjeevaram, A. M. Di Bisceglie, Y. Park, B. Savarese, D. Kleiner, M. Tsokos, C. Luciano and et al. (1995). "Hepatic failure and lactic acidosis due to fialuridine (FIAU), an investigational nucleoside analogue for chronic hepatitis B." *N Engl J Med* **333**(17): 1099-1105.
- Merante, F., R. Petrova-Benedict, N. MacKay, G. Mitchell, M. Lambert, C. Morin, M. De Braekeleer, R. Laframboise, R. Gagne and B. H. Robinson (1993). "A biochemically distinct form of cytochrome oxidase (COX) deficiency in the Saguenay-Lac-Saint-Jean region of Quebec." *Am J Hum Genet* **53**(2): 481-487.
- Merrill, M. H. and M. S. Fleisher (1932). "Factors Involved in the Use of Organic Solvents as Precipitating and Drying Agents of Immune Sera." *J Gen Physiol* **16**(2): 243-256.
- Meyer, J. N., M. C. Leung, J. P. Rooney, A. Sendoel, M. O. Hengartner, G. E. Kisby and A. S. Bess (2013). "Mitochondria as a target of environmental toxicants." *Toxicol Sci* **134**(1): 1-17.
- Mick, D. U., S. Dennerlein, H. Wiese, R. Reinhold, D. Pacheu-Grau, I. Lorenzi, F. Sasarman, W. Weraarpachai, E. A. Shoubbridge, B. Warscheid and P. Rehling (2012). "MITRAC links mitochondrial protein translocation to respiratory-chain assembly and translational regulation." *Cell* **151**(7): 1528-1541.
- Michikawa, Y., F. Mazzucchelli, N. Bresolin, G. Scarlato and G. Attardi (1999). "Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication." *Science* **286**(5440): 774-779.
- Miller, S. W., P. A. Trimmer, W. D. Parker, Jr. and R. E. Davis (1996). "Creation and characterization of mitochondrial DNA-depleted cell lines with "neuronal-like" properties." *J Neurochem* **67**(5): 1897-1907.
- Miro, O., M. Gomez, E. Pedrol, F. Cardellach, V. Nunes and J. Casademont (2000). "Respiratory chain dysfunction associated with multiple mitochondrial DNA deletions in antiretroviral therapy-related lipodystrophy." *AIDS* **14**(12): 1855-1857.
- Mischen, B. T., K. E. Follmar, K. E. Moyer, B. Buehrer, K. C. Olbrich, L. S. Levin, B. Klitzman and D. Erdmann (2008). "Metabolic and functional characterization of human adipose-derived stem cells in tissue engineering." *Plast Reconstr Surg* **122**(3): 725-738.
- Mitra, S., W. A. Siddiqui and S. Khandelwal (2014). "Early cellular responses against tributyltin chloride exposure in primary cultures derived from various brain regions." *Environ Toxicol Pharmacol* **37**(3): 1048-1059.
- Mizuno, H., P. A. Zuk, M. Zhu, H. P. Lorenz, P. Benhaim and M. H. Hedrick (2002). "Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells." *Plast Reconstr Surg* **109**(1): 199-209; discussion 210-191.
- Mohamed-Ali, V., J. H. Pinkney and S. W. Coppack (1998). "Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ." *Int J Obes Relat Metab Disord* **22**(12): 1145-1158.

- Montoya, J., E. Lopez-Gallardo, C. Diez-Sanchez, M. J. Lopez-Perez and E. Ruiz-Pesini (2009). "20 years of human mtDNA pathologic point mutations: carefully reading the pathogenicity criteria." *Biochim Biophys Acta* **1787**(5): 476-483.
- Montoya, J., M. J. Lopez-Perez and E. Ruiz-Pesini (2006). "Mitochondrial DNA transcription and diseases: past, present and future." *Biochim Biophys Acta* **1757**(9-10): 1179-1189.
- Moss, P. S., D. H. Spector, C. A. Glass and R. C. Strohmman (1984). "Streptomycin retards the phenotypic maturation of chick myogenic cells." *In Vitro* **20**(6): 473-478.
- Moyes, C. D., O. A. Mathieu-Costello, N. Tsuchiya, C. Filburn and R. G. Hansford (1997). "Mitochondrial biogenesis during cellular differentiation." *Am J Physiol* **272**(4 Pt 1): C1345-1351.
- Nadanaciva, S. and Y. Will (2011). "Investigating mitochondrial dysfunction to increase drug safety in the pharmaceutical industry." *Curr Drug Targets* **12**(6): 774-782.
- Nadanaciva, S. and Y. Will (2011). "New insights in drug-induced mitochondrial toxicity." *Curr Pharm Des* **17**(20): 2100-2112.
- Nadanaciva, S., J. H. Willis, M. L. Barker, D. Gharaibeh, R. A. Capaldi, M. F. Marusich and Y. Will (2009). "Lateral-flow immunoassay for detecting drug-induced inhibition of mitochondrial DNA replication and mtDNA-encoded protein synthesis." *J Immunol Methods* **343**(1): 1-12.
- Nagai, J. and M. Takano (2004). "Molecular aspects of renal handling of aminoglycosides and strategies for preventing the nephrotoxicity." *Drug Metab Pharmacokinet* **19**(3): 159-170.
- Nakajima, I., T. Yamaguchi, K. Ozutsumi and H. Aso (1998). "Adipose tissue extracellular matrix: newly organized by adipocytes during differentiation." *Differentiation* **63**(4): 193-200.
- Nesci, S., V. Ventrella, F. Trombetti, M. Pirini and A. Pagliarani (2011). "Tributyltin (TBT) and mitochondrial respiration in mussel digestive gland." *Toxicol In Vitro* **25**(4): 951-959.
- Newton, B. W., S. M. Cologna, C. Moya, D. H. Russell, W. K. Russell and A. Jayaraman (2011). "Proteomic analysis of 3T3-L1 adipocyte mitochondria during differentiation and enlargement." *J Proteome Res* **10**(10): 4692-4702.
- Nishikimi, A., Y. Kira, E. Kasahara, E. F. Sato, T. Kanno, K. Utsumi and M. Inoue (2001). "Tributyltin interacts with mitochondria and induces cytochrome c release." *Biochem J* **356**(Pt 2): 621-626.
- Novikoff, A. B., P. M. Novikoff, O. M. Rosen and C. S. Rubin (1980). "Organelle relationships in cultured 3T3-L1 preadipocytes." *J Cell Biol* **87**(1): 180-196.
- Nunes, J. B., J. Peixoto, P. Soares, V. Maximo, S. Carvalho, S. S. Pinho, A. F. Vieira, J. Paredes, A. C. Rego, I. L. Ferreira, M. Gomez-Lazaro, M. Sobrinho-Simoes, K. K. Singh and J. Lima (2015). "OXPHOS dysfunction regulates integrin-beta1 modifications and enhances cell motility and migration." *Hum Mol Genet* **24**(7): 1977-1990.
- O'Brien, T. W. (1971). "The general occurrence of 55 S ribosomes in mammalian liver mitochondria." *J Biol Chem* **246**(10): 3409-3417.
- O'Brien, T. W. (2003). "Properties of human mitochondrial ribosomes." *IUBMB Life* **55**(9): 505-513.
- O'Rourke, E. J., A. A. Soukas, C. E. Carr and G. Ruvkun (2009). "C. elegans major fats are stored in vesicles distinct from lysosome-related organelles." *Cell Metab* **10**(5): 430-435.
- Ojala, D., J. Montoya and G. Attardi (1981). "tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria." *Nature* **290**(5806): 470-474.
- Ong, W. K. and S. Sugii (2013). "Adipose-derived stem cells: fatty potentials for therapy." *Int J Biochem Cell Biol* **45**(6): 1083-1086.

- Oral, E. A., V. Simha, E. Ruiz, A. Andewelt, A. Premkumar, P. Snell, A. J. Wagner, A. M. DePaoli, M. L. Reitman, S. I. Taylor, P. Gorden and A. Garg (2002). "Leptin-replacement therapy for lipodystrophy." N Engl J Med **346**(8): 570-578.
- Pace, C. S., A. M. Martin, E. L. Hammond, C. D. Mamotte, D. A. Nolan and S. A. Mallal (2003). "Mitochondrial proliferation, DNA depletion and adipocyte differentiation in subcutaneous adipose tissue of HIV-positive HAART recipients." Antivir Ther **8**(4): 323-331.
- Pacheu-Grau, D., A. Gomez-Duran, E. Iglesias, E. Lopez-Gallardo, J. Montoya and E. Ruiz-Pesini (2013). "Mitochondrial antibiograms in personalized medicine." Hum Mol Genet **22**(6): 1132-1139.
- Pacheu-Grau, D., A. Gomez-Duran, E. Lopez-Gallardo, T. Pinos, A. L. Andreu, M. J. Lopez-Perez, J. Montoya and E. Ruiz-Pesini (2011). "'Progress' renders detrimental an ancient mitochondrial DNA genetic variant." Hum Mol Genet **20**(21): 4224-4231.
- Pacheu-Grau, D., A. Gomez-Duran, M. J. Lopez-Perez, J. Montoya and E. Ruiz-Pesini (2010). "Mitochondrial pharmacogenomics: barcode for antibiotic therapy." Drug Discov Today **15**(1-2): 33-39.
- Paez, P. L., M. C. Becerra and I. Albesa (2008). "Chloramphenicol-induced oxidative stress in human neutrophils." Basic Clin Pharmacol Toxicol **103**(4): 349-353.
- Palade, G. E. (1952). "The fine structure of mitochondria." Anat Rec **114**(3): 427-451.
- Pape, T., W. Wintermeyer and M. V. Rodnina (2000). "Conformational switch in the decoding region of 16S rRNA during aminoacyl-tRNA selection on the ribosome." Nat Struct Biol **7**(2): 104-107.
- Pendse, A. A., J. M. Arbones-Mainar, L. A. Johnson, M. K. Altenburg and N. Maeda (2009). "Apolipoprotein E knock-out and knock-in mice: atherosclerosis, metabolic syndrome, and beyond." J Lipid Res **50** Suppl: S178-182.
- Penefsky, H. S. (1985). "Mechanism of inhibition of mitochondrial adenosine triphosphatase by dicyclohexylcarbodiimide and oligomycin: relationship to ATP synthesis." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(6): 1589-1593.
- Perez, L. M., S. Suarez, A. Bernal, B. de Lucas, N. San Martin and B. G. Galvez (2016). "Obesity-driven alterations in adipose-derived stem cells are partially restored by weight loss." Obesity (Silver Spring).
- Piraino, F. and C. Abel (1964). "Plaque Assay for Psittacosis Virus in Monolayers of Chick Embryo Fibroblasts." J Bacteriol **87**: 1503-1511.
- Planat-Benard, V., C. Menard, M. Andre, M. Puceat, A. Perez, J. M. Garcia-Verdugo, L. Penicaud and L. Casteilla (2004). "Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells." Circ Res **94**(2): 223-229.
- Poulos, S. P., M. V. Dodson and G. J. Hausman (2010). "Cell line models for differentiation: preadipocytes and adipocytes." Exp Biol Med (Maywood) **235**(10): 1185-1193.
- Prezant, T. R., J. V. Agapian, M. C. Bohlman, X. Bu, S. Oztas, W. Q. Qiu, K. S. Arnos, G. A. Cortopassi, L. Jaber, J. I. Rotter and et al. (1993). "Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness." Nat Genet **4**(3): 289-294.
- Ran, F. A., P. D. Hsu, J. Wright, V. Agarwala, D. A. Scott and F. Zhang (2013). "Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system." Nat Protoc **8**(11): 2281-2308.
- Reitzer, L. J., B. M. Wice and D. Kennell (1979). "Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells." J Biol Chem **254**(8): 2669-2676.
- Reyes, J., A. Rosenow, N. Roumans, J. P. Noben and E. C. Mariman (2014). "Calorie restriction-induced changes in the secretome of human adipocytes, comparison with resveratrol-induced secretome effects." Biochim Biophys Acta **1844**(9): 1511-1522.
- Rieske, J. S., S. H. Lipton, H. Baum and H. I. Silman (1967). "Factors affecting the binding of antimycin A to complex 3 of the mitochondrial respiratory chain." J Biol Chem **242**(21): 4888-4896.

- Robberson, D. L., H. Kasamatsu and J. Vinograd (1972). "Replication of mitochondrial DNA. Circular replicative intermediates in mouse L cells." Proc Natl Acad Sci U S A **69**(3): 737-741.
- Rodriguez-Novoa, S., P. Barreiro, I. Jimenez-Nacher and V. Soriano (2006). "Overview of the pharmacogenetics of HIV therapy." Pharmacogenomics J **6**(4): 234-245.
- Romao, J. M., W. Jin, M. V. Dodson, G. J. Hausman, S. S. Moore and L. L. Guan (2011). "MicroRNA regulation in mammalian adipogenesis." Exp Biol Med (Maywood) **236**(9): 997-1004.
- Rong, J. X., J. L. Klein, Y. Qiu, M. Xie, J. H. Johnson, K. M. Waters, V. Zhang, J. A. Kashatus, K. S. Remlinger, N. Bing, R. M. Crosby, T. K. Jackson, S. M. Witherspoon, J. T. Moore, T. E. Ryan, S. D. Neill and J. C. Strum (2011). "Rosiglitazone Induces Mitochondrial Biogenesis in Differentiated Murine 3T3-L1 and C3H/10T1/2 Adipocytes." PPAR Res **2011**: 179454.
- Rosen, E. D. and B. M. Spiegelman (2006). "Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis." Nature **444**(7121): 847-853.
- Rosen, E. D., C. J. Walkey, P. Puigserver and B. M. Spiegelman (2000). "Transcriptional regulation of adipogenesis." Genes Dev **14**(11): 1293-1307.
- Rosenow, A., J. P. Noben, F. G. Bouwman, E. C. Mariman and J. Renes (2013). "Hypoxia-mimetic effects in the secretome of human preadipocytes and adipocytes." Biochim Biophys Acta **1834**(12): 2761-2771.
- Rosenow, A., J. P. Noben, J. Jocken, S. Kallendrusch, P. Fischer-Posovszky, E. C. Mariman and J. Renes (2012). "Resveratrol-induced changes of the human adipocyte secretion profile." J Proteome Res **11**(9): 4733-4743.
- Rosland, G. V., A. Svendsen, A. Torsvik, E. Sobala, E. McCormack, H. Immervoll, J. Mysliwicz, J. C. Tonn, R. Goldbrunner, P. E. Lonning, R. Bjerkvig and C. Schichor (2009). "Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation." Cancer Res **69**(13): 5331-5339.
- Rotig, A. (2011). "Human diseases with impaired mitochondrial protein synthesis." Biochim Biophys Acta **1807**(9): 1198-1205.
- Rottenberg, H. and S. Wu (1998). "Quantitative assay by flow cytometry of the mitochondrial membrane potential in intact cells." Biochim Biophys Acta **1404**(3): 393-404.
- Rudin, A., A. Healey, C. A. Phillips, D. W. Gump and B. R. Forsyth (1970). "Antibacterial activity of gentamicin sulfate in tissue culture." Appl Microbiol **20**(6): 989-990.
- Rue, N., J. Vissing and H. Galbo (2014). "Insulin resistance and increased muscle cytokine levels in patients with mitochondrial myopathy." J Clin Endocrinol Metab **99**(10): 3757-3765.
- Ruiz-Pesini, E., A. C. Lapena, C. Diez-Sanchez, A. Perez-Martos, J. Montoya, E. Alvarez, M. Diaz, A. Urries, L. Montoro, M. J. Lopez-Perez and J. A. Enriquez (2000). "Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility." Am J Hum Genet **67**(3): 682-696.
- Ryu, M. J., S. J. Kim, M. J. Choi, Y. K. Kim, M. H. Lee, S. E. Lee, H. K. Chung, S. B. Jung, H. J. Kim, K. S. Kim, Y. S. Jo, G. R. Kweon, C. H. Lee and M. Shong (2013). "Mitochondrial oxidative phosphorylation reserve is required for hormone- and PPARgamma agonist-induced adipogenesis." Mol Cells **35**(2): 134-141.
- Sagan, L. (1967). "On the origin of mitosing cells." J Theor Biol **14**(3): 255-274.
- Scarpulla, R. C. (1997). "Nuclear control of respiratory chain expression in mammalian cells." J Bioenerg Biomembr **29**(2): 109-119.
- Scarpulla, R. C. (2011). "Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network." Biochim Biophys Acta **1813**(7): 1269-1278.
- Schaad, U. B., K. Guenin, C. Steffen and N. Herschkowitz (1988). "Effects of antimicrobial agents used for therapy of CNS infections on dissociated brain cell cultures." Pediatr Res **24**(3): 367-372.

- Schagger, H. and G. von Jagow (1991). "Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form." *Anal Biochem* **199**(2): 223-231.
- Schipani, E. and H. M. Kronenberg (2008). "Adult mesenchymal stem cells."
- Schlottmann, I., M. Ehrhart-Bornstein, M. Wabitsch, S. R. Bornstein and V. Lamounier-Zepter (2014). "Calcium-dependent release of adipocyte fatty acid binding protein from human adipocytes." *Int J Obes (Lond)* **38**(9): 1221-1227.
- Schlunzen, F., R. Zarivach, J. Harms, A. Bashan, A. Tocilj, R. Albrecht, A. Yonath and F. Franceschi (2001). "Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria." *Nature* **413**(6858): 814-821.
- Schmitt, F., E. J. Oakeley and J. P. Jost (1997). "Antibiotics induce genome-wide hypermethylation in cultured *Nicotiana tabacum* plants." *J Biol Chem* **272**(3): 1534-1540.
- Schwartz, M. W., D. G. Baskin, T. R. Bukowski, J. L. Kuijper, D. Foster, G. Lasser, D. E. Prunkard, D. Porte, Jr., S. C. Woods, R. J. Seeley and D. S. Weigle (1996). "Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuro peptide Y gene expression in ob/ob mice." *Diabetes* **45**(4): 531-535.
- Schwarze, P. E. and P. O. Seglen (1981). "Effects of antibiotics on protein synthesis and degradation in primary cultures of rat hepatocytes." *In Vitro* **17**(1): 71-76.
- Seripa, D., G. D'Onofrio, F. Panza, L. Cascavilla, C. Masullo and A. Pilotto (2011). "The genetics of the human APOE polymorphism." *Rejuvenation Res* **14**(5): 491-500.
- Shen, W. J., Y. Liang, R. Hong, S. Patel, V. Natu, K. Sridhar, A. Jenkins, D. A. Bernlohr and F. B. Kraemer (2001). "Characterization of the functional interaction of adipocyte lipid-binding protein with hormone-sensitive lipase." *J Biol Chem* **276**(52): 49443-49448.
- Shepherd, P. R., L. Gnudi, E. Tozzo, H. Yang, F. Leach and B. B. Kahn (1993). "Adipose cell hyperplasia and enhanced glucose disposal in transgenic mice overexpressing GLUT4 selectively in adipose tissue." *J Biol Chem* **268**(30): 22243-22246.
- Sheshadri, P. and A. Kumar (2016). "Managing Odds in Stem Cells: Insights into the Role of Mitochondrial Antioxidant Enzyme MnSOD." *Free Radic Res*: 1-46.
- Shi, X., A. Burkart, S. M. Nicoloso, M. P. Czech, J. Straubhaar and S. Corvera (2008). "Paradoxical effect of mitochondrial respiratory chain impairment on insulin signaling and glucose transport in adipose cells." *J Biol Chem* **283**(45): 30658-30667.
- Skalnikova, H. (2013). "Proteomic techniques for characterisation of mesenchymal stem cell secretome." *Biochimie* **95**(12): 2196 - 2211.
- Skuta, G., G. M. Fischer, T. Janaky, Z. Kele, P. Szabo, J. Tozser and B. Sumegi (1999). "Molecular mechanism of the short-term cardiotoxicity caused by 2',3'-dideoxycytidine (ddC): modulation of reactive oxygen species levels and ADP-ribosylation reactions." *Biochem Pharmacol* **58**(12): 1915-1925.
- Smeitink, J. A., M. Zeviani, D. M. Turnbull and H. T. Jacobs (2006). "Mitochondrial medicine: a metabolic perspective on the pathology of oxidative phosphorylation disorders." *Cell Metab* **3**(1): 9-13.
- Smet, J., S. Seneca, B. De Paepe, A. Meulemans, H. Verhelst, J. Leroy, L. De Meirleir, W. Lissens and R. Van Coster (2009). "Subcomplexes of mitochondrial complex V reveal mutations in mitochondrial DNA." *Electrophoresis* **30**(20): 3565-3572.
- Smith, B. S. (1981). "Tributyltin compounds induce male characteristics on female mud snails *Nassarius obsoletus* = *Ilyanassa obsoleta*." *J Appl Toxicol* **1**(3): 141-144.
- Spalding, K. L., E. Arner, P. O. Westermark, S. Bernard, B. A. Buchholz, O. Bergmann, L. Blomqvist, J. Hoffstedt, E. Naslund, T. Britton, H. Concha, M. Hassan, M. Ryden, J. Frisen and P. Arner (2008). "Dynamics of fat cell turnover in humans." *Nature* **453**(7196): 783-787.

- Spiegelman, B. M. and C. A. Ginty (1983). "Fibronectin modulation of cell shape and lipogenic gene expression in 3T3-adipocytes." Cell **35**(3 Pt 2): 657-666.
- Spitkovsky, D., P. Sasse, E. Kolossov, C. Bottinger, B. K. Fleischmann, J. Hescheler and R. J. Wiesner (2004). "Activity of complex III of the mitochondrial electron transport chain is essential for early heart muscle cell differentiation." FASEB J **18**(11): 1300-1302.
- Stankov, M. V., T. Lucke, A. M. Das, R. E. Schmidt and G. M. Behrens (2010). "Mitochondrial DNA depletion and respiratory chain activity in primary human subcutaneous adipocytes treated with nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors." Antimicrob Agents Chemother **54**(1): 280-287.
- Stankov, M. V., D. Panayotova-Dimitrova, M. Leverkus, R. E. Schmidt and G. M. Behrens (2013). "Thymidine analogues suppress autophagy and adipogenesis in cultured adipocytes." Antimicrob Agents Chemother **57**(1): 543-551.
- Stankov, M. V., R. E. Schmidt, G. M. Behrens and H. A. German Competence Network (2008). "Zidovudine impairs adipogenic differentiation through inhibition of clonal expansion." Antimicrob Agents Chemother **52**(8): 2882-2889.
- Stumpf, J. D., R. P. Saneto and W. C. Copeland (2013). "Clinical and molecular features of POLG-related mitochondrial disease." Cold Spring Harb Perspect Biol **5**(4): a011395.
- Sun, K., C. M. Kusminski and P. E. Scherer (2011). "Adipose tissue remodeling and obesity." J Clin Invest **121**(6): 2094-2101.
- Sun, R. and L. Wang (2014). "Thymidine kinase 2 enzyme kinetics elucidate the mechanism of thymidine-induced mitochondrial DNA depletion." Biochemistry **53**(39): 6142-6150.
- Sundelacruz, S., M. Levin and D. L. Kaplan (2008). "Membrane potential controls adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells." PLoS One **3**(11): e3737.
- Sussman, H. E., O. A. Olivero, Q. Meng, S. M. Pietras, M. C. Poirier, J. P. O'Neill, B. A. Finette, M. J. Bauer and V. E. Walker (1999). "Genotoxicity of 3'-azido-3'-deoxythymidine in the human lymphoblastoid cell line, TK6: relationships between DNA incorporation, mutant frequency, and spectrum of deletion mutations in HPRT." Mutat Res **429**(2): 249-259.
- Sutovsky, P., R. D. Moreno, J. Ramalho-Santos, T. Dominko, C. Simerly and G. Schatten (1999). "Ubiquitin tag for sperm mitochondria." Nature **402**(6760): 371-372.
- Suzuki, Y., K. Nishimaki, M. Taniyama, T. Muramatsu, Y. Atsumi, K. Matsuoka and S. Ohta (2004). "Lipoma and ophthalmoplegia in mitochondrial diabetes associated with small heteroplasmy level of 3243 tRNA(Leu(UUR)) mutation." Diabetes Res Clin Pract **63**(3): 225-229.
- Suzuki, Y., K. Tsukuda, M. Taniyama, Y. Atsumi, K. Matsuoka and Y. Oka (2002). "Lipoma and sensory neuropathy in mitochondrial diabetes associated with tRNA mutation at position 3271." Diabetes Care **25**(2): 407-408.
- Tabb, M. M. and B. Blumberg (2006). "New modes of action for endocrine-disrupting chemicals." Mol Endocrinol **20**(3): 475-482.
- Takahashi, K., K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda and S. Yamanaka (2007). "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors." Cell **131**(5): 861-872.
- Tang, Q. Q. and M. D. Lane (2012). "Adipogenesis: from stem cell to adipocyte." Annu Rev Biochem **81**: 715-736.
- Tatuch, Y., J. Christodoulou, A. Feigenbaum, J. T. Clarke, J. Wherret, C. Smith, N. Rudd, R. Petrova-Benedict and B. H. Robinson (1992). "Heteroplasmic mtDNA mutation (T----G) at 8993 can cause Leigh disease when the percentage of abnormal mtDNA is high." Am J Hum Genet **50**(4): 852-858.
- Thayer, K. A., J. J. Heindel, J. R. Bucher and M. A. Gallo (2012). "Role of environmental chemicals in diabetes and obesity: a National Toxicology Program workshop review." Environ Health Perspect **120**(6): 779-789.
- Thompson Legault, J. S., L.; Tardif, J.; Sharma, R.; Tremblay-Vaillancourt, V.; Aubut, C.; Boucher, G.; Clish, C.B.; Cyr, D.; Daneault, C.; Waters, P.J.; LSFC Consortium; Vachon, L.; Morin, C.; Laprise, C.; Rioux, J.D.; Mootha, V.K.; Des

- Rosiers, C. (2015). "A Metabolic Signature of Mitochondrial Dysfunction Revealed through a Monogenic Form of Leigh Syndrome." *Cell Rep.* **13**(5): 981-989.
- Timper, K., D. Seboek, M. Eberhardt, P. Linscheid, M. Christ-Crain, U. Keller, B. Muller and H. Zulewski (2006). "Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells." *Biochem Biophys Res Commun* **341**(4): 1135-1140.
- Tok, J. B. and L. Bi (2003). "Aminoglycoside and its derivatives as ligands to target the ribosome." *Curr Top Med Chem* **3**(9): 1001-1019.
- Tormos, K. V., E. Anso, R. B. Hamanaka, J. Eisenbart, J. Joseph, B. Kalyanaraman and N. S. Chandel (2011). "Mitochondrial complex III ROS regulate adipocyte differentiation." *Cell Metab* **14**(4): 537-544.
- Trayhurn, P. (2005). "Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat." *Acta Physiol Scand* **184**(4): 285-293.
- Trifunovic, A., A. Wredenberg, M. Falkenberg, J. N. Spelbrink, A. T. Rovio, C. E. Bruder, Y. M. Bohlooly, S. Gidlof, A. Oldfors, R. Wibom, J. Tornell, H. T. Jacobs and N. G. Larsson (2004). "Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase." *Nature* **429**(6990): 417-423.
- Ueno, S., T. Kashimoto, N. Susa, Y. Shiota, M. Okuda, K. Mutoh, F. Hoshi, K. Watanabe, S. Tsuda, S. Kawazoe, T. Suzuki and M. Sugiyama (2003). "Effects of butyltin compounds on mitochondrial respiration and its relation to hepatotoxicity in mice and Guinea pigs." *Toxicol Sci* **75**(1): 201-207.
- Van Blerkom, J. (2009). "Mitochondria in early mammalian development." *Semin Cell Dev Biol* **20**(3): 354-364.
- van Oven, M. and M. Kayser (2009). "Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation." *Hum Mutat* **30**(2): E386-394.
- Vandenberg, L. N., T. Colborn, T. B. Hayes, J. J. Heindel, D. R. Jacobs, Jr., D. H. Lee, T. Shioda, A. M. Soto, F. S. vom Saal, W. V. Welshons, R. T. Zoeller and J. P. Myers (2012). "Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses." *Endocr Rev* **33**(3): 378-455.
- Vankoningsloo, S., A. De Pauw, A. Houbion, S. Tejerina, C. Demazy, F. de Longueville, V. Bertholet, P. Renard, J. Remacle, P. Holvoet, M. Raes and T. Arnould (2006). "CREB activation induced by mitochondrial dysfunction triggers triglyceride accumulation in 3T3-L1 preadipocytes." *J Cell Sci* **119**(Pt 7): 1266-1282.
- Vankoningsloo, S., M. Piens, C. Lecocq, A. Gilson, A. De Pauw, P. Renard, C. Demazy, A. Houbion, M. Raes and T. Arnould (2005). "Mitochondrial dysfunction induces triglyceride accumulation in 3T3-L1 cells: role of fatty acid beta-oxidation and glucose." *J Lipid Res* **46**(6): 1133-1149.
- Vantyghem, M. C., A. S. Balavoine, C. Douillard, F. Defrance, L. Dieudonne, F. Mouton, C. Lemaire, N. Bertrand-Escoufflaire, M. F. Bourdelle-Hego, F. Devemy, A. Evrard, D. Gheerbrand, C. Girardot, S. Gumuche, C. Hober, H. Topolinski, B. Lamblin, B. Mycinski, A. Ryndak, W. Karrouz, E. Duvivier, E. Merlen, C. Cortet, J. Weill, D. Lacroix and J. L. Wemeau (2012). "How to diagnose a lipodystrophy syndrome." *Ann Endocrinol (Paris)* **73**(3): 170-189.
- Vayssiere, J. L., L. Cordeau-Lossouarn, J. C. Larcher, M. Basseville, F. Gros and B. Croizat (1992). "Participation of the mitochondrial genome in the differentiation of neuroblastoma cells." *In Vitro Cell Dev Biol* **28A**(11-12): 763-772.
- Vergani, L., A. R. Prescott and I. J. Holt (2000). "Rhabdomyosarcoma rho(0) cells: isolation and characterization of a mitochondrial DNA depleted cell line with 'muscle-like' properties." *Neuromuscul Disord* **10**(6): 454-459.
- Vernochet, C., F. Damilano, A. Mourier, O. Bezy, M. A. Mori, G. Smyth, A. Rosenzweig, N. G. Larsson and C. R. Kahn (2014). "Adipose tissue mitochondrial dysfunction triggers a lipodystrophic syndrome with insulin resistance, hepatosteatosis, and cardiovascular complications." *FASEB J* **28**(10): 4408-4419.
- Vila, M. R., J. Gamez, A. Solano, A. Playan, S. Schwartz, F. M. Santorelli, C. Cervera, C. Casali, J. Montoya and F. Villarroya (2000). "Uncoupling protein-1 mRNA expression in lipomas from patients bearing pathogenic mitochondrial DNA mutations." *Biochem Biophys Res Commun* **278**(3): 800-802.

- Villarroya, F., P. Domingo and M. Giral (2005). "Lipodystrophy associated with highly active anti-retroviral therapy for HIV infection: the adipocyte as a target of anti-retroviral-induced mitochondrial toxicity." Trends Pharmacol Sci **26**(2): 88-93.
- Villarroya, J., B. Dorado, M. R. Vila, E. Garcia-Arumi, P. Domingo, M. Giral, M. Hirano and F. Villarroya (2011). "Thymidine kinase 2 deficiency-induced mitochondrial DNA depletion causes abnormal development of adipose tissues and adipokine levels in mice." PLoS One **6**(12): e29691.
- Villarroya, J., M. Giral and F. Villarroya (2009). "Mitochondrial DNA: an up-and-coming actor in white adipose tissue pathophysiology." Obesity (Silver Spring) **17**(10): 1814-1820.
- von Ballmoos, C., J. Brunner and P. Dimroth (2004). "The ion channel of F-ATP synthase is the target of toxic organotin compounds." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(31): 11239-11244.
- von Heimburg, D., K. Hemmrich, S. Zachariah, H. Staiger and N. Pallua (2005). "Oxygen consumption in undifferentiated versus differentiated adipogenic mesenchymal precursor cells." Respir Physiol Neurobiol **146**(2-3): 107-116.
- Wabitsch, M., S. Bruderlein, I. Melzner, M. Braun, G. Mechtersheimer and P. Moller (2000). "LiSa-2, a novel human liposarcoma cell line with a high capacity for terminal adipose differentiation." Int J Cancer **88**(6): 889-894.
- Wagner, W., A. D. Ho and M. Zenke (2010). "Different facets of aging in human mesenchymal stem cells." Tissue Eng Part B Rev **16**(4): 445-453.
- Walker, P. D., Y. Barri and S. V. Shah (1999). "Oxidant mechanisms in gentamicin nephrotoxicity." Ren Fail **21**(3-4): 433-442.
- Walker, U. A., M. Auclair, D. Lebrecht, M. Kornprobst, J. Capeau and M. Caron (2006). "Uridine abrogates the adverse effects of antiretroviral pyrimidine analogues on adipose cell functions." Antivir Ther **11**(1): 25-34.
- Wallace, D. C., W. Fan and V. Procaccio (2010). "Mitochondrial energetics and therapeutics." Annu Rev Pathol **5**: 297-348.
- Wallace, D. C., E. Ruiz-Pesini and D. Mishmar (2003). "mtDNA variation, climatic adaptation, degenerative diseases, and longevity." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **68**: 479-486.
- Wallace, K. B. (2008). "Mitochondrial off targets of drug therapy." Trends Pharmacol Sci **29**(7): 361-366.
- Wang, D. W., B. Fermor, J. M. Gimble, H. A. Awad and F. Guilak (2005). "Influence of oxygen on the proliferation and metabolism of adipose derived adult stem cells." J Cell Physiol **204**(1): 184-191.
- Wang, P., E. Mariman, J. Renes and J. Keijer (2008). "The secretory function of adipocytes in the physiology of white adipose tissue." J Cell Physiol **216**(1): 3-13.
- Wang, W., Y. Zhang, W. Lu and K. Liu (2015). "Mitochondrial reactive oxygen species regulate adipocyte differentiation of mesenchymal stem cells in hematopoietic stress induced by arabinosylcytosine." PLoS One **10**(3): e0120629.
- Weber, K., D. Ridderskamp, M. Alfert, S. Hoyer and R. J. Wiesner (2002). "Cultivation in glucose-deprived medium stimulates mitochondrial biogenesis and oxidative metabolism in HepG2 hepatoma cells." Biol Chem **383**(2): 283-290.
- Weiner, F. R., A. Shah, P. J. Smith, C. S. Rubin and M. A. Zern (1989). "Regulation of collagen gene expression in 3T3-L1 cells. Effects of adipocyte differentiation and tumor necrosis factor alpha." Biochemistry **28**(9): 4094-4099.
- Whalen, M. M., B. G. Loganathan and K. Kannan (1999). "Immunotoxicity of environmentally relevant concentrations of butyltins on human natural killer cells in vitro." Environ Res **81**(2): 108-116.
- Wilson-Fritch, L., A. Burkart, G. Bell, K. Mendelson, J. Leszyk, S. Nicolero, M. Czech and S. Corvera (2003). "Mitochondrial biogenesis and remodeling during adipogenesis and in response to the insulin sensitizer rosiglitazone." Mol Cell Biol **23**(3): 1085-1094.

- Wilson, D. N. (2009). "The A-Z of bacterial translation inhibitors." *Crit Rev Biochem Mol Biol* **44**(6): 393-433.
- Wilson, D. N., F. Schluenzen, J. M. Harms, A. L. Starosta, S. R. Connell and P. Fucini (2008). "The oxazolidinone antibiotics perturb the ribosomal peptidyl-transferase center and effect tRNA positioning." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(36): 13339-13344.
- Winer, J. P., P. A. Janmey, M. E. McCormick and M. Funaki (2009). "Bone marrow-derived human mesenchymal stem cells become quiescent on soft substrates but remain responsive to chemical or mechanical stimuli." *Tissue Eng Part A* **15**(1): 147-154.
- Wu, J., P. Bostrom, L. M. Sparks, L. Ye, J. H. Choi, A. H. Giang, M. Khandekar, K. A. Virtanen, P. Nuutila, G. Schaart, K. Huang, H. Tu, W. D. van Marken Lichtenbelt, J. Hoeks, S. Enerback, P. Schrauwen and B. M. Spiegelman (2012). "Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human." *Cell* **150**(2): 366-376.
- Wu, Y., R. C. Zhao and E. E. Tredget (2010). "Concise review: bone marrow-derived stem/progenitor cells in cutaneous repair and regeneration." *Stem Cells* **28**(5): 905-915.
- Wu, Z., P. Puigserver, U. Andersson, C. Zhang, G. Adelmant, V. Mootha, A. Troy, S. Cinti, B. Lowell, R. C. Scarpulla and B. M. Spiegelman (1999). "Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1." *Cell* **98**(1): 115-124.
- Wu, Z., E. D. Rosen, R. Brun, S. Hauser, G. Adelmant, A. E. Troy, C. McKeon, G. J. Darlington and B. M. Spiegelman (1999). "Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity." *Mol Cell* **3**(2): 151-158.
- Wurtman, R. J., M. Cansev, T. Sakamoto and I. H. Ulus (2009). "Use of phosphatide precursors to promote synaptogenesis." *Annu Rev Nutr* **29**: 59-87.
- Xia, W., Y. Wan, Y. Y. Li, H. Zeng, Z. Lv, G. Li, Z. Wei and S. Q. Xu (2011). "PFOS prenatal exposure induce mitochondrial injury and gene expression change in hearts of weaned SD rats." *Toxicology* **282**(1-2): 23-29.
- Xie, L., C. P. O'Reilly, S. K. Chapes and S. Mora (2008). "Adiponectin and leptin are secreted through distinct trafficking pathways in adipocytes." *Biochim Biophys Acta* **1782**(2): 99-108.
- Xiong, Z. M., C. LaDana, D. Wu and K. Cao (2013). "An inhibitory role of progerin in the gene induction network of adipocyte differentiation from iPS cells." *Aging (Albany NY)* **5**(4): 288-303.
- Yamada, S., Y. Kotake, Y. Demizu, M. Kurihara, Y. Sekino and Y. Kanda (2014). "NAD-dependent isocitrate dehydrogenase as a novel target of tributyltin in human embryonic carcinoma cells." *Sci Rep* **4**: 5952.
- Yamanaka, H., H. Gatanaga, P. Kosalaraksa, S. Matsuoka-Aizawa, T. Takahashi, S. Kimura and S. Oka (2007). "Novel mutation of human DNA polymerase gamma associated with mitochondrial toxicity induced by anti-HIV treatment." *J Infect Dis* **195**(10): 1419-1425.
- Yanik, S. C., A. H. Baker, K. K. Mann and J. J. Schlezinger (2011). "Organotins are potent activators of PPARgamma and adipocyte differentiation in bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells." *Toxicol Sci* **122**(2): 476-488.
- Yarham, J. W., E. L. Blakely, C. L. Alston, M. E. Roberts, J. Ealing, P. Pal, D. M. Turnbull, R. McFarland and R. W. Taylor (2013). "The m.3291T>C mt-tRNA(Leu(UUR)) mutation is definitely pathogenic and causes multisystem mitochondrial disease." *J Neurol Sci* **325**(1-2): 165-169.
- Yu, M., S. K. Selvaraj, M. M. Liang-Chu, S. Aghajani, M. Busse, J. Yuan, G. Lee, F. Peale, C. Klijn, R. Bourgon, J. S. Kaminker and R. M. Neve (2015). "A resource for cell line authentication, annotation and quality control." *Nature* **520**(7547): 307-311.
- Yun, Z., H. L. Maecker, R. S. Johnson and A. J. Giaccia (2002). "Inhibition of PPAR gamma 2 gene expression by the HIF-1-regulated gene DEC1/Stra13: a mechanism for regulation of adipogenesis by hypoxia." *Dev Cell* **2**(3): 331-341.
- Zaera, M. G., O. Miro, E. Pedrol, A. Soler, M. Picon, F. Cardellach, J. Casademont and V. Nunes (2001). "Mitochondrial involvement in antiretroviral therapy-related lipodystrophy." *AIDS* **15**(13): 1643-1651.

- Zechner, R., R. Moser, T. C. Newman, S. K. Fried and J. L. Breslow (1991). "Apolipoprotein E gene expression in mouse 3T3-L1 adipocytes and human adipose tissue and its regulation by differentiation and lipid content." J Biol Chem **266**(16): 10583-10588.
- Zhang, S. O., R. Trimble, F. Guo and H. Y. Mak (2010). "Lipid droplets as ubiquitous fat storage organelles in *C. elegans*." BMC Cell Biol **11**: 96.
- Zhang, Y., G. Marsboom, P. T. Toth and J. Rehman (2013). "Mitochondrial respiration regulates adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells." PLoS One **8**(10): e77077.
- Zhao, H., R. Li, Q. Wang, Q. Yan, J. H. Deng, D. Han, Y. Bai, W. Y. Young and M. X. Guan (2004). "Maternally inherited aminoglycoside-induced and nonsyndromic deafness is associated with the novel C1494T mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in a large Chinese family." Am J Hum Genet **74**(1): 139-152.
- Zhao, H., W. Y. Young, Q. Yan, R. Li, J. Cao, Q. Wang, X. Li, J. L. Peters, D. Han and M. X. Guan (2005). "Functional characterization of the mitochondrial 12S rRNA C1494T mutation associated with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss." Nucleic Acids Res **33**(3): 1132-1139.
- Zhong, J., S. A. Krawczyk, R. Chaerkady, H. Huang, R. Goel, J. S. Bader, G. W. Wong, B. E. Corkey and A. Pandey (2010). "Temporal profiling of the secretome during adipogenesis in humans." J Proteome Res **9**(10): 5228-5238.
- Zhou, H., Y. Xiao, R. Li, S. Hong, S. Li, L. Wang, R. Zeng and K. Liao (2009). "Quantitative analysis of secretome from adipocytes regulated by insulin." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) **41**(11): 910-921.
- Zick, M., R. Rabl and A. S. Reichert (2009). "Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria." Biochim Biophys Acta **1793**(1): 5-19.
- zur Nieden, N. I., G. Kempka and H. J. Ahr (2004). "Molecular multiple endpoint embryonic stem cell test--a possible approach to test for the teratogenic potential of compounds." Toxicol Appl Pharmacol **194**(3): 257-269.
- Zvonic, S., M. Lefevre, G. Kilroy, Z. E. Floyd, J. P. DeLany, I. Kheterpal, A. Gravois, R. Dow, A. White, X. Wu and J. M. Gimble (2007). "Secretome of primary cultures of human adipose-derived stem cells: modulation of serpins by adipogenesis." Mol Cell Proteomics **6**(1): 18-28.
- Zych, J., M. A. Stimamiglio, A. C. Senegaglia, P. R. Brofman, B. Dallagiovanna, S. Goldenberg and A. Correa (2013). "The epigenetic modifiers 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A influence adipocyte differentiation in human mesenchymal stem cells." Braz J Med Biol Res **46**(5): 405-416.

VIII. ANEXOS

VIII. ANEXOS

Anexo I

Nº Acceso	PROTEÍNA	Gen	D/SD	PS	L	F	Referencias
Q15063	Periostin	POSTN	0,17	SÍ	EX	CC, TS	a, d, h
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9	KRT9	0,52	NO	C	MC	-
P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	KRT2	0,54	NO	C	MC	-
P11047	Laminin subunit gamma-1	LAMC1	0,59	SÍ	EX	MC	a, c, d, e, f, h
Q08380	Galectin-3-binding protein	LGALS3BP	0,73	SÍ	EX	I	a, c, d, h
P36955	Pigment epithelium-derived factor	SERPINF1	2,08	SÍ	EX	CC, TS	a, c, d, e, f, g, h
P06396	Gelsolin	GSN	2,23	SÍ	EX	MC	c, d, e, h
P08572	Collagen alpha-2(IV) chain	COL4A2	2,57	SÍ	EX	MC	c, d, e, h
P15090	Fatty acid-binding protein, adipocyte	FABP4	3,30	NO	C	CC, TS	e, f

Tabla A.1: Secreción diferencial de proteínas por las hASC sin diferenciar y diferenciadas a adipocitos en alguna de las dos líneas analizadas. Se muestran en azul o en rojo las proteínas cuya secreción disminuye (ratio D/SD \leq 0,7) o aumenta (ratio D/SD \geq 1,3) con la diferenciación, respectivamente, mientras que el color negro representa valores muy próximos a estos valores fijados como límite. El Nº de acceso es el correspondiente a la base de datos SwissProt. La presencia de péptido señal (PS), la localización (L) y la función (F) de cada proteína se ha extraído de la base de datos HPRD. Localización) EX = extracelular, C = citoplasma. Función) CC = comunicación celular, TS = transducción de señal, T = transporte, I = respuesta inmune.

Nº Acceso	PROTEÍNA	Gen	D/SD	DL30/SD	DL60/SD	PS	L	F	Referencias
P10909	Clusterin	CLU	-	0,14	0,08	NO	C	I	d, h
Q15063	Periostin	POSTN	0,17	-	-	SÍ	EX	CC, TS	a, d, h
P05121	Plasminogen activator inhibitor 1	SERPINE1	-	0,18	0,22	SÍ	EX	MP	a, c, d, e, f, g
O14498	Immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat protein	ISLR	-	0,36	0,31	SÍ	M	CC, TS	d, g
P21810	Biglycan	BGN	-	-	0,36	SÍ	EX	MC	d
P09871	Complement C1s subcomponent	C1S	-	0,48	0,40	SÍ	EX	I	a, c, d, e
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9	KRT9	0,52	0,55	-	NO	C	MC	-
P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	KRT2	0,54	-	-	NO	C	MC	-
Q92626	Peroxidasin homolog	PXDN	-	-	0,54	SÍ	?	A	d
P11047	Laminin subunit gamma-1	LAMC1	0,59	0,56	0,62	SÍ	EX	MC	a, c, d, e, f, h
Q08380	Galectin-3-binding protein	LGALS3BP	0,73	-	0,67	SÍ	EX	I	a, c, d, h
Q99715	Collagen alpha-1(XII) chain	COL12A1	-	0,74	-	SÍ	EX	MC	d
P36955	Pigment epithelium-derived factor	SERPINF1	2,08	-	2,20	SÍ	EX	CC, TS	a, c, d, e, f, g, h
P07996	Thrombospondin-1	THBS1	-	2,54	-	SÍ	EX	MC	c, d, h
P06396	Gelsolin	GSN	2,23	2,57	-	SÍ	EX	MC	c, d, e, h
P08572	Collagen alpha-2(IV) chain	COL4A2	2,57	1,91	2,05	SÍ	EX	MC	c, d, e, h
P15090	Fatty acid-binding protein, adipocyte	FABP4	3,30	-	-	NO	C	CC, TS	e, f

Tabla A.2: Secreción diferencial de proteínas por las hASC sin diferenciar y diferenciadas a adipocitos en presencia de linezolid, en alguna de las dos líneas analizadas. Se muestran en azul o en rojo las proteínas cuya secreción disminuye (ratios \leq 0,7) o aumenta (ratios \geq 1,3) con el tratamiento con linezolid, respectivamente, mientras que el color negro representa valores muy próximos a estos valores fijados como límite. El Nº de acceso es el correspondiente a la base de datos SwissProt. La presencia de péptido señal (PS), la localización (L) y la función (F) de cada proteína se ha extraído de la base de datos HPRD. Localización) EX = extracelular, C = citoplasma. Función) CC = comunicación celular, TS = transducción de señal, MP = metabolismo proteico, MC = mantenimiento celular, T = transporte, I = respuesta inmune, A = apoptosis.

Nº Acceso	PROTEÍNA	Gen	D/SD	DL30/SD	DL60/SD	PS	L	F	Referencias
P15090	Fatty acid-binding protein, adipocyte	FABP4	-	-	0,68	NO	C	CC, TS	e, f
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9	KRT9	-	-	0,69	NO	C	MC	-
P02649	Apolipoprotein E	APOE	0,59	-	0,69	SÍ	EX	T	c, d, e, f, g, h
P14543	Nidogen-1	NID1	-	-	0,87	SÍ	EX	MC	a, c, d, h
P08572	Collagen alpha-2(IV) chain	COL4A2	0,68	0,74	-	SÍ	EX	MC	c, d, e, h
P05997	Collagen alpha-2(V) chain	COL5A2	0,69	-	-	SÍ	EX	MC	c, d, g
Q15063	Periostin	POSTN	0,73	0,74	-	SÍ	EX	CC, TS	a, d, h
P12111	Collagen alpha-3(VI) chain	COL6A3	0,78	-	-	SÍ	EX	MC	a, c, d
P02751	Fibronectin	FN1	1,21	-	1,14	SÍ	EX	MC	a, b, c, d, e, f, g, h
P02452	Collagen alpha-1(I) chain	COL1A1	-	1,25	1,12	SÍ	EX	MC	a, b, c, d, e, f, g
P12109	Collagen alpha-1(VI) chain	COL6A1	-	1,28	1,21	SÍ	EX	MC	a, c, d, e, f, g, h
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1	KRT1	1,22	1,37	-	NO	M	MC	-
P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10	KRT10	1,24	1,38	0,78	NO	C	MC	-
P35555	Fibrillin-1	FBN1	1,28	1,49	-	SÍ	EX	MC	c, d, g
P08253	72 kDa type IV collagenase	MMP2	1,35	1,55	0,90	SÍ	EX	MP	a, c, d, e, f, g, h
Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	TGFBI	1,38	1,55	1,21	SÍ	EX	CC, TS	a, b, c, d, g, h
P05121	Plasminogen activator inhibitor 1	SERPINE1	1,42	1,46	-	SÍ	EX	MP	a, c, d, e, f, g
P00746	Complement factor D	CFD	1,46	-	0,73	SÍ	EX	I	c, h
P49747	Cartilage oligomeric matrix protein	COMP	-	-	1,16	SÍ	EX	MC	d
P02461	Collagen alpha-1(III) chain	COL3A1	-	-	1,18	SÍ	EX	MC	a, c, d, e, f, g, h
P02787	Serotransferrin	TF	-	-	1,23	SÍ	EX	T	d, e, f, g, h
P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	KRT2	-	-	1,55	NO	C	MC	-

Tabla A.3: Secreción diferencial de proteínas por las hASC diferenciadas a adipocitos en ausencia y presencia de linezolid en alguna de las dos líneas analizadas. Se muestran en azul o en rojo las proteínas cuya secreción disminuye (ratios $\leq 0,7$) o aumenta (ratios $\geq 1,3$) con la diferenciación en ausencia y presencia de linezolid, respectivamente, mientras que el color negro representa valores muy próximos a estos valores fijados como límite. El Nº de acceso es el correspondiente a la base de datos SwissProt. La presencia de péptido señal (PS), la localización (L) y la función (F) de cada proteína se ha extraído de la base de datos HPRD. Localización) EX = extracelular, C = citoplasma. Función) CC = comunicación celular, TS = transducción de señal, MP = metabolismo proteico, MC = mantenimiento celular, T = transporte, I = respuesta inmune.

IX. PUBLICACIONES

Effects of Tributyltin Chloride on Cybrids with or without an ATP Synthase Pathologic Mutation

Ester López-Gallardo^{1,2,3}, Laura Llobet^{1,2,3}, Sonia Emperador^{1,2,3}, Julio Montoya^{1,2,3}, and Eduardo Ruiz-Pesini^{1,2,3,4}

¹Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular; ²Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón; ³CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER); ⁴Fundación ARAID. Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain

Address correspondence to Eduardo Ruiz-Pesini (eduruiz@unizar.es) and Julio Montoya (jmontoya@unizar.es), Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza. C/ Miguel Servet, 177. 50013-Zaragoza, Spain. Telephone: +34-976761640. Fax: +34-976761612.

Short running title: Xenobiotic mitochondriopathies

Acknowledgments: We would like to thank Santiago Morales for his assistance with the figures. This work was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (FIS-PI14/00005 and PI14/00070); Departamento de Ciencia, Tecnología y Universidad del Gobierno de Aragón (Grupos Consolidados B33) and FEDER Funding Program from the European Union; and Fundación ARAID-Programa de Apoyo a la I+D+I para jóvenes investigadores 2010. L.L. has a fellowship from Instituto de Salud Carlos III [FI12/00217]. CIBERER is an initiative of the ISCIII.

Competing financial interests: The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

ABSTRACT

Background: The oxidative phosphorylation system (OXPHOS) includes nuclear chromosome (nDNA)- and mitochondrial DNA (mtDNA)-encoded polypeptides. Many rare OXPHOS disorders, such as striatal necrosis syndromes, are due to genetic mutations. Despite important advances in sequencing procedures, causative mutations remain undetected in some patients. It is possible that etiologic factors, such as environmental toxins, are the cause of these cases. Indeed, the inhibition of a particular enzyme by a poison could imitate the biochemical effects of pathological mutations in that enzyme. Moreover, environmental factors can modify the penetrance or expressivity of pathological mutations.

Objectives: To study the interaction between p.MT-ATP6 and an environmental exposure that may contribute phenotypic differences between healthy individuals and patients suffering from striatal necrosis syndromes or other mitochondriopathies.

Methods: We analyzed the effects of the ATP synthase inhibitor tributyltin chloride (TBTC), a widely distributed environmental factor that contaminates human food and water, on transmitochondrial cell lines with or without an ATP synthase mutation that causes striatal necrosis syndrome. Doses were selected based on TBTC concentrations previously reported in human whole blood samples.

Results: TBTC modifies the phenotypic effects caused by a pathological mtDNA mutation. Interestingly, wild-type cells treated with this xenobiotic show similar bioenergetics when compared with the untreated mutated cells.

Conclusions: In addition to the known genetic causes, our findings suggest that environmental exposure to TBTC might contribute to the etiology of striatal necrosis syndromes.

INTRODUCTION

The mitochondrial DNA (mtDNA) m.8993T>G transversion in the *MT-ATP6* gene provokes a p.L156R substitution in the transmembrane helix 4 (TMH4) of the p.MT-ATP6 subunit. This polypeptide is an ATP synthase (complex V, CV) component of the oxidative phosphorylation system (OXPHOS). The amino acid position 156 is located in the channel used by protons to enter the mitochondrial matrix and power the ATP synthesis. The m.8993T>G mutation is associated with maternally inherited Leigh syndrome (MILS) and neurogenic muscle weakness, ataxia and retinitis pigmentosa (NARP) (Holt et al. 1990; Thorburn and Rahman 1993). As a generalization, NARP is caused by moderate levels of the m.8993T>G mutation, whereas individuals with mutant loads greater than 90 % have MILS (Tatuch et al. 1992). However, in some families, oligosymptomatic children share the same mutation load of symptomatic siblings (Enns et al. 2006), and high mutation loads are not always associated with MILS or NARP signs (Degoul et al. 1995; Mkaouar-Rebai et al. 2009; Tsao et al. 2001). Similar to many other pathological mutations (Cooper et al. 2013; Lake et al. 2015), other factors are likely involved in the phenotypic differences among individuals with the same m.8993T>G mutation load.

Other pathological mutations in mtDNA genes have been reported in MILS patients (Montoya et al. 2009; Ruhoy and Saneto 2014; Thorburn and Rahman 1993). Thus, polymorphic variation in these genes may influence the m.8993T>G phenotype. Indeed, the mtDNA genetic background (mtDNA haplogroups) plays an important role in modulating the biochemical defects and clinical outcome by altering the risk of MILS due to m.8993T>G (D'Aurelio et al. 2010; Hao et al. 2013). Moreover, many other pathological mutations in nuclear DNA (nDNA) genes have

been described in Leigh syndrome (LS) patients (Ruhoy and Saneto 2014). For example, a mutated mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetase was described in a LS patient (Schwartzentruber et al. 2014). Interestingly, a MILS patient had a homoplasmic mutation in the tRNA^{Val} and his clinically normal mother was also homoplasmic mutant (McFarland et al. 2002). It was recently shown that the overexpression of the mitochondrial valyl-tRNA synthetase can restore the steady-state levels of the mutated tRNA^{Val}. Thus, inter-individual variations of this synthetase may underlie clinical differences (Rorbach et al. 2008). Therefore, polymorphic variation in nDNA genes may influence the m.8993T>G phenotype.

In addition to nuclear and mitochondrial genetic factors, environmental stimuli may modify the phenotype of the m.8993T>G mutation. Certain chemicals trigger the appearance of pathological phenotypes associated with mtDNA mutations. For example, individuals harboring the m.1555A>G transition in the *MT-RNR1* gene for the 12S rRNA suffer non-syndromic hearing loss when exposed to aminoglycosides (Prezant et al. 1993). Furthermore, occupational exposure to n-hexane and other solvents precipitated visual failure in a Leber hereditary optic neuropathy patient with the m.11778G>A mutation (Carelli et al. 2007). Previous reports suggest that the CV proton channel, particularly the p.MT-ATP6 subunit, is the target site for organotin compounds, including tributyltin chloride (TBTC) (von Ballmoos et al. 2004). These compounds contaminate human food and water (Kotake 2012). Therefore, it is possible that TBTC affects the expressivity of the m.8993T>G mutation.

MATERIALS AND METHODS

Transmitochondrial cell line construction, characterization and functional investigations

To homogenize nuclear and environmental factors, we built transmitochondrial cell lines (cytoplasmic hybrids or cybrids) with osteosarcoma 143B or adenocarcinoma A549 rho⁰ nuclear backgrounds using patient and control platelets (Chomyn et al. 1994). All samples were collected with informed consent, and the Ethics Review Committees of the involved hospitals and the Government of Aragón approved the study (CEICA 11/2010).

The cybrids were grown in Dulbecco's modified eagle medium containing glucose (1 g/l), pyruvate (0.11 g/l) and fetal bovine serum (5 %) with no antibiotics (Llobet et al. 2015a).

For molecular cytogenetic analysis, cells were exposed to colchicine (0.5 µg/ml) for 4 h at 37 °C and harvested routinely. Metaphases were prepared following a conventional cytogenetic protocol for methanol: acetic acid (3:1)-fixed cells. Approximately 20 metaphase cells were captured and analyzed for each cell line. The genetic fingerprint of the cybrid cell lines was determined using an AmpFLSTR[®] Identifiler[®] PCR Amplification Kit (Life Technologies) and an ABI Prism 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems). These genetic fingerprints were compared with those from the American Type Culture Collection (ATCC) cell lines. To confirm the nucleotide at the m.8993 position, a PCR-RFLP analysis was performed (Lopez-Gallardo et al. 2014). The mtDNA sequences were obtained using a BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) and an ABI Prism 3730xl DNA analyzer. The revised Cambridge reference sequence (GenBank NC_012920) and an mtDNA phylogenetic tree were used to locate mutations and define mtDNA haplogroups (van Oven and Kayser 2009),

respectively. The level of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) mRNA was determined in triplicate using RT-qPCR and the One-Step Real-Time system (Applied Biosystems). The expression levels were normalized using 18S rRNA. The Δ Ct method was used to calculate fold expression. StepOne software version 2.0 (Applied Biosystems) was used for data analysis.

The analyses of oxygen consumption, ATP and H₂O₂ levels were performed in triplicate according to previously described protocols (Gomez-Duran et al. 2010). The determination of the mitochondrial inner membrane potential (MIMP) was performed using a Mito-ID Membrane Potential Detection Kit (Enzo Life Sciences). Fluorescent microscopy was performed on live cells using a Floyd Cell imaging station (Life Technologies). Isocitrate dehydrogenase (IDH) activity was determined using a commercial Isocitrate Dehydrogenase Colorimetric Assay Kit (Abcam[®]), according to the manufacturer's instructions. Briefly, 1×10^6 cells grown in DMEM were lysed in 200 μ l of an assay buffer provided in the kit. The lysate was centrifuged at 13,000 x g for 10 min, and the cleared supernatant was used for the assay. NAD⁺ was used as the substrate for the NAD-IDH assay. The measurements were obtained using a NovoStar MBG Labtech microplate instrument.

In a previous study, 25 out of 32 blood donors from Michigan, USA, showed TBT detectable concentrations in whole blood samples (Kannan et al. 1999). The observed range, 8.3 - 293 nM, encompasses TBTC concentrations used in this study. When required, TBTC (Sigma-Aldrich) or oligomycin (OLI) (Sigma-Aldrich), another CV inhibitor, were solved in ethanol and added to the respiration medium during the oxygen consumption determination and to the medium for ATP, MIMP, H₂O₂ or IDH determination during the 2 h, 15 min, 30 min and 24 h of incubation, respectively.

Statistical analysis

The statistical package StatView 6.0 was used to perform all statistical analyses. The data are presented as the mean and standard deviation. At least three analyses were performed for each parameter. An unpaired two-tailed t-test was used to compare parameters. Linear regression analyses were performed and linear regression equations and regression coefficients are indicated for TBTC concentrations vs. oxygen consumption, ATP amount, or H₂O₂ levels. P values < 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Characterization of the cybrid cell lines

Five cybrid cell lines were built. Two cybrids within the adenocarcinoma A549 nuclear background should harbor the m.8993T (Awt) or m.8993G (Am) mtDNA alleles. The other three cybrids within the osteosarcoma 143B nuclear background should also harbor the m.8993G (Om) or m.8993T mtDNA alleles. For the osteosarcoma 143B m.8993T cells, a non-isogenic wild-type cybrid was first generated (Owt). An isogenic cybrid was produced (Owti) after we obtained platelets from the wild-type mother of the mutant patient.

Karyotyping was used to verify that the nuclear backgrounds were equivalent. Thus, the Am and Awt cybrids share the modal number of chromosomes (60) and several chromosomal abnormalities [del(2p21), +der(6)t(1;6)(q24-25?;q23), +der(7)delq32?, del(11q23)] (see

Supplemental Material, Figure S1). The modal number of chromosomes differs in Owt (66), Owti (69), and Om (70/71) cybrids; however, these numbers are similar to those previously published in other osteosarcoma 143B transmitochondrial cell lines (Gomez-Duran et al. 2010). These cybrids share several chromosomal abnormalities [+i(7p), +der(7)t(1;7)(q25;q32)[2], +der(12)add(q24.3)]. To confirm the cell origin of our cybrids and the equivalence of nuclear backgrounds, we determined the nuclear genetic fingerprint of 16 short tandem repeats (STRs) (see Supplemental Material, Table S1). Adenocarcinoma A549 cybrids do not differ in STR markers and do not vary from the 9 STR markers characterized for the ATCC adenocarcinoma A549 cell line. The same is true for the osteosarcoma 143B cybrids and the ATCC osteosarcoma 143B cell line.

Next, we confirmed the mtDNA alleles of the cybrids using PCR-RFLP. The m.8993T>G mutation caused the amplicon to be cut in two fragments, and the wild-type amplicon was not digested (see Supplemental Material, Figure S2). To rule out the presence of mtDNA non-defining haplogroup (private) mutations that can affect the bioenergetic phenotypes of these cybrids, we sequenced the complete mtDNA (GenBank JN635299, KJ742713, KJ742715, KT002148, KT002149) (see Supplemental Material, Figure S2). Owt cybrids contained two non-synonymous private mutations: m.3387T>A provoking a p.MT-ND1:I27M substitution and m.14189A>G causing a p.MT-ND6:V162A change. Am cybrids contained one non-synonymous private mutation: m.9194A>G producing a p.MT-ATP6:H223R replacement. These mutations have been previously found 0, 9 and 4 times, respectively, in 29,867 mtDNA sequences (GenBank, February 2015). However, the affected positions show a low evolutionary conservation (23.5 %, 13.9 % and 14.1 % in 5,165, 5,177 and 4,925 eukaryote species, respectively, obtained from GenBank in February 2015) when compared with the conservation of

the p.MT-ATP6:L156 amino acid (99.0 % in 4,925 Eukaryota species) that causes MILS or NARP. The lack of evolutionary conservation suggests that these mutations would have little or no impact on phenotype. Therefore, we assume that the m.8993T>G transversion is responsible for the major phenotypic differences between mutant and wild-type cybrids that have the same nuclear background.

It has previously been reported that m.8993T>G mutant cybrids with the osteosarcoma 143B nuclear background showed reduced oxygen consumption (D'Aurelio et al. 2010; Lopez-Gallardo et al. 2014; Pallotti et al. 2004), decreased ATP levels (D'Aurelio et al. 2010; Fujita et al. 2007; Lopez-Gallardo et al. 2014; Pallotti et al. 2004; Sgarbi et al. 2009; Vazquez-Memije et al. 2009), diminished MIMP (Lopez-Gallardo et al. 2014), and increased reactive oxygen species (ROS) (Lopez-Gallardo et al. 2014; Wojewoda et al. 2010). Oxygen consumption was also reported to be reduced in m.8993T>G mutant cybrids with the cervical cancer HeLa EB8 nuclear background (Shidara et al. 2005). To confirm that the mutant cybrids used in the present study also showed reduced OXPHOS capability, we analyzed these mitochondrial variables. We found that oxygen consumption was significantly decreased in both Om and Am cybrids (see Supplemental Material, Figure S3A and Table S3). The ATP levels were significantly diminished in only the Om cybrid. In contrast with Om in which H₂O₂ was significantly higher than in Owti, H₂O₂ levels were decreased in Am cybrids compared with Awt, though not significantly so. It was previously reported that mitochondria of an m.8993T>G mutant osteosarcoma 143B cybrid generated MIMP at the same magnitude as the parental wild-type cells (Wojewoda et al. 2012). We found that, similar to Om cybrids (Lopez-Gallardo et al. 2014), the MIMP in Am cybrids was reduced (see Supplemental Material, Figure S3B), although the last result is based on visual assessment of a single sample.

These results confirm that the biochemical phenotypes of our cybrids are similar to other reported cybrids with the m.8993T>G mutation.

Effects of tributyltin chloride on cybrids

It was previously reported that mitochondrial respiration was significantly decreased in mice treated with TBTC (Ueno et al. 2003), and that oxygen consumption in human adipose tissue derived-stem cells (hASCs) was decreased in response to 100 nM TBTC (Llobet et al. 2015b). We found that TBTC \geq 10 nM significantly decreased oxygen consumption in Om cybrids when compared with untreated cybrids (Figure 1A). TBTC \geq 50 nM was required to significantly reduce oxygen consumption in Owt cybrids. There are negative and significant correlations between TBTC concentration and oxygen consumption in Owt (linear regression coefficient (β) for the change in %O₂ consumption with a 1-nM increase in TBTC = -0.45 ; $R^2 = 0.924$; $P < 0.0001$) and Om (TBTC $\beta = -0.41$; $R^2 = 0.796$; $P < 0.0001$). For the majority of TBTC concentrations between 20 and 90 nM, the reduction in oxygen consumption in response to TBTC was significantly greater in Om than Owt cybrids.

Additionally, TBTC \geq 20 nM significantly decreased oxygen consumption in Am cybrids when compared with untreated cybrids (Figure 1B). TBTC \geq 70 nM significantly reduced oxygen consumption in Awt cybrids; however, 40 nM TBTC also reduced this parameter. There are negative and significant correlations between TBTC concentration and oxygen consumption in Awt (TBTC $\beta = -0.35$; $R^2 = 0.876$; $P < 0.0001$) and Am cybrids (TBTC $\beta = -0.46$; $R^2 = 0.956$; $P < 0.0001$). For TBTC concentrations between 30 and 90 nM, the reduction in oxygen consumption in response to TBTC was significantly greater in Am than Awt cybrids. The

decrease in oxygen consumption in response to 50 and 60 nM TBTC was significantly greater in Om than in Am cybrids, and the decrease in oxygen consumption in response to 90 and 100 nM TBTC was significantly greater in Owt than Awt cybrids.

Previous reports showed that 100 nM tributyltin decreased ATP levels in human embryonic carcinoma NT2/D1 cells (Yamada et al. 2014). We found that TBTC \geq 15 nM significantly decreased ATP levels in Om and Am cybrids when compared with untreated cybrids (Figure 2). Furthermore, Owti and Awt cybrids treated with TBTC \geq 60 nM and 90 nM, respectively, showed a significant reduction in ATP levels. These levels were also reduced in Owti cybrids treated with 15 nM TBTC. There are negative and significant correlations between TBTC concentrations and ATP levels in Owti (TBTC $\beta = -0.17$; $R^2 = 0.810$; $P = 0.0374$), Om (TBTC $\beta = -0.30$; $R^2 = 0.850$; $P = 0.0234$) and Am cybrids (TBTC $\beta = -0.38$; $R^2 = 0.780$; $P = 0.0491$) but not Awt cybrids (TBTC $\beta = -0.11$; $R^2 = 0.382$; $P = 0.3076$). Om and Am cybrids were more susceptible to TBTC concentrations \geq 15 or \geq 30 nM, respectively, when compared with the wild-type. The decrease in ATP levels in response to 90 nM TBTC was significantly greater in Am than Om cybrids. There was no significant difference in ATP levels between Owti and Awt cybrids at any dose.

In a previous study, MIMP was diminished in mouse thymocytes treated with 10 nM TBTC (Sharma and Kumar 2014). In the present study, visual assessment of a single sample suggests that TBTC \geq 30 nM decreased the MIMP of the Am cybrid. However, a concentration \geq 60 nM is required to affect the MIMP of the Awt cybrid (Figure 3).

In a preceding study, concentrations of TBTC 10 nM increased H₂O₂ production in mouse thymocytes (Sharma and Kumar 2014). However, in other studies, TBTC \leq 300 nM did not increase H₂O₂ levels in dissociated mix cells from different parts of rat brain (Mitra et al. 2014),

and 100 nM TBTC did not change the H₂O₂ production in hASCs (Llobet et al. 2015b). We found that, TBTC \geq 30 nM significantly decreased H₂O₂ production in Owti and Om cybrids when compared with untreated cybrids (Figure 4). There are negative and significant correlations between TBTC concentrations and H₂O₂ levels in Owti (TBTC $\beta = -0.56$; $R^2 = 0.969$; $P = 0.0006$) and Om cybrids (TBTC $\beta = -0.58$; $R^2 = 0.915$; $P = 0.0071$).

Tributyltin target

Several TBTC targets have been proposed. It has been reported that TBTC can activate genomic pathways by binding PPAR γ (Kanayama et al. 2005). Thus, the different susceptibilities of mutant and wild-type cybrids to TBTC may be PPAR γ -mediated. Osteosarcoma 143B and adenocarcinoma A549 cells express the PPAR γ gene (Haydon et al. 2002; Li et al. 2014). However, we did not observe significant differences in PPAR γ mRNA levels between mutant and wild-type cybrids (see Supplemental Material, Figure S3A). Therefore, this target does not explain our results.

A previous report showed that 100 nM TBTC decreased IDH activity in human embryonic carcinoma NT2/D1 cells. These results suggest that IDH is a novel target of TBTC (Yamada et al. 2014). IDH is a mitochondrial enzyme from the tricarboxylic acid cycle that produces NADH. This compound is reoxidized in the OXPHOS electron transport chain and increases oxygen consumption and MIMP and ATP production. Therefore, the inhibition of IDH by TBTC would decrease all of these parameters. However, we have previously found that 100 nM TBTC increased IDH activity in hASCs (Llobet et al. 2015b). To assess IDH inhibition, we tested the effect of TBTC on osteosarcoma 143B cybrids. At TBTC \geq 20 nM, Owti IDH activity did not

differ significantly from untreated Owti cells. TBTC at 20 and 100 nM significantly increased IDH activity in the Om cybrid compared with untreated Om cells (Figure 5). These data suggest that NADH accumulated by OXPHOS dysfunction in mutant cybrids can provoke an abnormal increase in isocitrate and a compensatory expression of IDH. Indeed, the mutant cybrid showed significantly higher IDH activity than the Owti cybrid (see Supplemental Material, Figure S3A). Thus, inhibition of IDH does not explain our results.

CV is the third proposed target of TBTC. In previous studies it has been shown that, similar to TBTC, the CV inhibitor OLI ≥ 49 nM decreased oxygen consumption in osteosarcoma 143B cybrids (Gomez-Duran et al. 2010; McKenzie et al. 2007; Gomez-Duran et al. 2012; Zhang et al. 2012) and 3.15 μ M OLI produced a decline in ATP production in these 143B cybrids (Gomez-Duran et al. 2010; McKenzie et al. 2007; Gomez-Duran et al. 2012). Furthermore, 3.15 μ M OLI increased and 6 μ M OLI decreased MIMP in osteosarcoma 143B cybrids (McKenzie et al. 2007; Porcelli et al. 2009). Surprisingly, in this study, a qualitative assessment suggests that MIMP was reduced in Awt cybrids in response to 16 nM OLI, but was reduced in Am cybrids in response to only 4 nM OLI (Figure 6A). OLI may cause a decrease in MIMP because there is not enough ATP to activate respiratory substrates (Brown et al. 1990). The effect of OLI on H₂O₂ levels also varies. Previous studies showed that 4 nM OLI increased these H₂O₂ levels in mouse preadipocytes 3T3-L1 (Carriere et al. 2003), and 16 nM OLI decreased H₂O₂ in hASCs (Llobet et al. 2015b). In both Om and Owt cybrids, 16 nM OLI decreased H₂O₂ levels (Figure 6B). Similar to hASCs (Llobet et al. 2015b), 16 nM OLI increased IDH activity in Om cybrids (Figure 6C). All of these results support CV as the target of TBTC (von Ballmoos et al. 2004). Further investigation to confirm the target of TBTC is required.

DISCUSSION

TBTC is a potent algicide and molluscicide that was used in marine antifouling ship paints (Grun 2014). Due to its adsorbing efficacy on sediments, long half-life and lipophilic nature, the levels of TBTC were considerably high in marine sediments and fishes (Mitra et al. 2014). Widespread environmental contamination of marine ecosystems with organotin began in the 1960s (Grun 2014). As a result, a global ban on the use of organotin-based antifouling paints was created in 2003 onward (Grun 2014). However, environmental contamination by organotins goes beyond aquatic ecosystems because they are also used in industrial and agricultural activities (Grun 2014). The slow rate of environmental degradation gives TBTC the potential for bioaccumulation in upper trophic species of the food chain. In fact, several studies have found TBT concentrations in human blood in the range of 8.3 - 293 nM (Kannan et al. 1999; Whalen et al. 1999). This range is consistent with the TBTC concentrations used in this study. However, tributyltin compounds may be metabolized to dibutyltin and other metabolites (Boyer 1989), and TBT is rapidly cleared from blood. Thus, blood would not be the ideal biological compartment for estimating butyltin burden in humans (Kannan et al, 1999). In liver samples from 9 Polish, 4 Japanese and 18 Danish, ranges of 2.4 – 11; 59 – 96; y 1.1 – 33 ng of butyltin (TBT+DBT+MBT)/g of liver were found (Kannan et al. 1997; Nielsen et al. 2002; Takahashi et al. 1999).

Om and Owt cybrids (or Am and Awt cybrids) differ in their mtDNA genotype. The phenotypic differences provoked by TBTC between cybrids from the same nuclear genetic background suggest that mtDNA is the responsible factor. For the analysis of all mitochondrial variables, except oxygen consumption, in osteosarcoma 143B cybrids, we used isogenic cybrids

(Owti and Om). The Owti cybrid only differs from Om in the m.8993 nucleotide position. Our results suggest that this mtDNA nucleotide position is the factor responsible for the phenotypic differences in response to TBTC between these cells. Moreover, there is a higher similarity in the mitochondrial response to TBTC between the Om and Am cybrids (or between Owt/Owti and Awt cybrids), that harbor different nDNA and mtDNA but the same m.8993 nucleotide, than Om and Owt/Owti cybrids (or Am and Awt cybrids), that harbor the same nDNA or even the same mtDNA but differ in the m.8993 nucleotide. These results confirm that the m.8993T>G transversion is the responsible factor for the phenotypic differences between these cells in the response to TBTC. Therefore, a combination of this pathological mutation and this environmental contaminant could modify the phenotypic expression of the m.8993T>G mutation.

Several p.MT-ATP6 TMH4 and 5 amino acids from the CV proton channel are mutated in patients suffering from different mitochondriopathies (Lopez-Gallardo et al. 2014). The interaction of a particular mutation with an environmental factor, such as TBTC, may explain different pathological phenotypes. Interestingly, such an interaction might also explain why the m.9025G>A/p.MT-ATP6:G167S mutation, a candidate for the etiologic factor of a particular mitochondriopathy, is found in both patients and healthy individuals. The m.9025G>A mutation was found in a patient with loss of Purkinje cells (Lopez-Gallardo et al. 2014), and Purkinje cells showed degenerative changes throughout the tributyltin treated-rat cerebellum (Elsabbagh et al. 2002).

Organotin compounds are highly lipophilic and readily penetrate the blood-brain barrier to enter the brain (Kotake 2012). An *in vitro* study reported that a concentration of 30 nM TBTC caused a significant decrease in MIMP in dissociated mixed cells from different parts of the rat brain. Cells from the striatum showed a higher susceptibility than cells from other brain regions

(Mitra et al. 2014). Brain lesions, particularly in the striatum, characterize a group of disorders termed “striatal necrosis syndromes”. These disorders include familial bilateral striatal necrosis (FBSN), MILS and NARP, and they can be caused by *MT-ATP6* mutations (Schon et al. 2001). Interestingly, we found that levels of oxygen consumption, MIMP, and ATP production in wild-type cybrids following TBTC exposure were similar to levels in cybrids with *MT-ATP6* mutations before TBTC exposure. More experiments in primary cells, such as neurons, are required. However, our findings suggest that environmental-induced striatal necrosis syndromes due to xenobiotics, such as organotins, may be possible.

REFERENCES

- Boyer IJ. 1989. Toxicity of dibutyltin, tributyltin and other organotin compounds to humans and to experimental animals. *Toxicology* 55(3): 253-298.
- Brown GC, Lakin-Thomas PL, Brand MD. 1990. Control of respiration and oxidative phosphorylation in isolated rat liver cells. *Eur J Biochem* 192(2): 355-362.
- Carelli V, Franceschini F, Venturi S, Barboni P, Savini G, Barbieri G, et al. 2007. Grand rounds: could occupational exposure to n-hexane and other solvents precipitate visual failure in leber hereditary optic neuropathy? *Environ Health Perspect* 115(1): 113-115.
- Carriere A, Fernandez Y, Rigoulet M, Penicaud L, Casteilla L. 2003. Inhibition of preadipocyte proliferation by mitochondrial reactive oxygen species. *FEBS Lett* 550(1-3): 163-167.
- Chomyn A, Lai ST, Shakeley R, Bresolin N, Scarlato G, Attardi G. 1994. Platelet-mediated transformation of mtDNA-less human cells: analysis of phenotypic variability among clones from normal individuals--and complementation behavior of the tRNA^{Lys} mutation causing myoclonic epilepsy and ragged red fibers. *Am J Hum Genet* 54(6): 966-974.
- Cooper DN, Krawczak M, Polychronakos C, Tyler-Smith C, Kehrer-Sawatzki H. 2013. Where genotype is not predictive of phenotype: towards an understanding of the molecular basis of reduced penetrance in human inherited disease. *Hum Genet* 132(10): 1077-1130.
- D'Aurelio M, Vives-Bauza C, Davidson MM, Manfredi G. 2010. Mitochondrial DNA background modifies the bioenergetics of NARP/MILS ATP6 mutant cells. *Hum Mol Genet* 19(2): 374-386.
- Degoul F, Diry M, Rodriguez D, Robain O, Francois D, Ponsot G, et al. 1995. Clinical, biochemical, and molecular analysis of a maternally inherited case of Leigh syndrome

- (MILS) associated with the mtDNA T8993G point mutation. *J Inher Metab Dis* 18(6): 682-688.
- Elsabbagh HS, Moussa SZ, El-tawil OS. 2002. Neurotoxicologic sequelae of tributyltin intoxication in rats. *Pharmacol Res* 45(3): 201-206.
- Enns GM, Bai RK, Beck AE, Wong LJ. 2006. Molecular-clinical correlations in a family with variable tissue mitochondrial DNA T8993G mutant load. *Mol Genet Metab* 88(4): 364-371.
- Fujita Y, Ito M, Nozawa Y, Yoneda M, Oshida Y, Tanaka M. 2007. CHOP (C/EBP homologous protein) and ASNS (asparagine synthetase) induction in cybrid cells harboring MELAS and NARP mitochondrial DNA mutations. *Mitochondrion* 7(1-2): 80-88.
- Gomez-Duran A, Pacheu-Grau D, Lopez-Gallardo E, Diez-Sanchez C, Montoya J, Lopez-Perez MJ, et al. 2010. Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups. *Hum Mol Genet* 19(17): 3343-3353.
- Gomez-Duran A, Pacheu-Grau D, Martinez-Romero I, Lopez-Gallardo E, Lopez-Perez MJ, Montoya J, et al. 2012. Oxidative phosphorylation differences between mitochondrial DNA haplogroups modify the risk of Leber's hereditary optic neuropathy. *Biochim Biophys Acta* 1822(8): 1216-1222.
- Grun F. 2014. The obesogen tributyltin. *Vitam Horm* 94: 277-325.
- Hao XD, Yang YL, Tang NL, Kong QP, Wu SF, Zhang YP. 2013. Mitochondrial DNA haplogroup Y is associated to Leigh syndrome in Chinese population. *Gene* 512(2): 460-463.
- Haydon RC, Zhou L, Feng T, Breyer B, Cheng H, Jiang W, et al. 2002. Nuclear receptor agonists as potential differentiation therapy agents for human osteosarcoma. *Clin Cancer Res* 8(5): 1288-1294.

- Holt IJ, Harding AE, Petty RK, Morgan-Hughes JA. 1990. A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am J Hum Genet* 46(3): 428-433.
- Kanayama T, Kobayashi N, Mamiya S, Nakanishi T, Nishikawa J. 2005. Organotin compounds promote adipocyte differentiation as agonists of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma/retinoid X receptor pathway. *Mol Pharmacol* 67(3): 766-774.
- Kanan K, Falandysz J. 1997. Butyltin residues in sediment, fish, fish-eating birds, harbor porpoise and human tissues from the Polish coast of the Baltic Sea. *Mar Pollut Bull* 34(3): 203-207.
- Kannan K, Senthilkumar K, Giesy JP. 1999. Occurrence of Butyltin Compounds in Human Blood. *Environ Sci Technol* 33(10): 1776-1779.
- Kotake Y. 2012. Molecular mechanisms of environmental organotin toxicity in mammals. *Biol Pharm Bull* 35(11): 1876-1880.
- Lake NJ, Bird MJ, Isohanni P, Paetau A. 2015. Leigh syndrome: neuropathology and pathogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol* 74(6): 482-492.
- Li J, Chen L, Yu P, Liu B, Zhu J, Yang Y. 2014. Telmisartan exerts anti-tumor effects by activating peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Molecules* 19(3): 2862-2876.
- Llobet L, Montoya J, López-Gallardo E, Ruiz-Pesini E. 2015a. Side effects of culture media antibiotics on cell differentiation. *Tissue Eng Part C Methods* 21(11): 1143-1147.
- Llobet L, Toivonen JM, Montoya J, Ruiz-Pesini E, López-Gallardo E. 2015b. Xenobiotics that affect oxidative phosphorylation alter differentiation of human adipose-derived stem cells at concentrations that are found in human blood. *Dis Model Mech* 8(11): 1441-1455.
- Lopez-Gallardo E, Emperador S, Solano A, Llobet L, Martin-Navarro A, Lopez-Perez MJ, et al.

2014. Expanding the clinical phenotypes of MT-ATP6 mutations. *Hum Mol Genet* 23(23): 6191-6200.
- McFarland R, Clark KM, Morris AA, Taylor RW, Macphail S, Lightowlers RN, et al. 2002. Multiple neonatal deaths due to a homoplasmic mitochondrial DNA mutation. *Nat Genet* 30(2): 145-146.
- McKenzie M, Liolitsa D, Akinshina N, Campanella M, Sisodiya S, Hargreaves I, et al. 2007. Mitochondrial ND5 gene variation associated with encephalomyopathy and mitochondrial ATP consumption. *J Biol Chem* 282(51): 36845-36852.
- Mitra S, Siddiqui WA, Khandelwal S. 2014. Early cellular responses against tributyltin chloride exposure in primary cultures derived from various brain regions. *Environ Toxicol Pharmacol* 37(3): 1048-1059.
- Mkaouar-Rebai E, Chaari W, Younes S, Bousoffara R, Sfar MT, Fakhfakh F. 2009. Maternally inherited Leigh syndrome: T8993G mutation in a Tunisian family. *Pediatr Neurol* 40(6): 437-442.
- Montoya J, Lopez-Gallardo E, Diez-Sanchez C, Lopez-Perez MJ, Ruiz-Pesini E. 2009. 20 years of human mtDNA pathologic point mutations: carefully reading the pathogenicity criteria. *Biochim Biophys Acta* 1787(5): 476-483.
- Nielsen JB, Strand J. 2002. Butyltin compounds in human liver. *Environ Res* 88(2): 129-133.
- Pallotti F, Baracca A, Hernandez-Rosa E, Walker WF, Solaini G, Lenaz G, et al. 2004. Biochemical analysis of respiratory function in cybrid cell lines harbouring mitochondrial DNA mutations. *Biochem J* 384(Pt 2): 287-293.
- Porcelli AM, Angelin A, Ghelli A, Mariani E, Martinuzzi A, Carelli V, et al. 2009. Respiratory complex I dysfunction due to mitochondrial DNA mutations shifts the voltage threshold for

opening of the permeability transition pore toward resting levels. *J Biol Chem* 284(4): 2045-2052.

Prezant TR, Agapian JV, Bohlman MC, Bu X, Oztas S, Qiu WQ, et al. 1993. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat Genet* 4(3): 289-294.

Rorbach J, Yusoff AA, Tuppen H, Abg-Kamaludin DP, Chrzanowska-Lightowlers ZM, Taylor RW, et al. 2008. Overexpression of human mitochondrial valyl tRNA synthetase can partially restore levels of cognate mt-tRNA^{Val} carrying the pathogenic C25U mutation. *Nucleic Acids Res* 36(9): 3065-3074.

Ruhoy IS, Saneto RP. 2014. The genetics of Leigh syndrome and its implications for clinical practice and risk management. *Appl Clin Genet* 7: 221-234.

Schon EA, Santra S, Pallotti F, Girvin ME. 2001. Pathogenesis of primary defects in mitochondrial ATP synthesis. *Semin Cell Dev Biol* 12(6): 441-448.

Schwartzentruber J, Buhas D, Majewski J, Sasarman F, Papillon-Cavanagh S, Thiffault I, et al. 2014. Mutation in the nuclear-encoded mitochondrial isoleucyl-tRNA synthetase IARS2 in patients with cataracts, growth hormone deficiency with short stature, partial sensorineural deafness, and peripheral neuropathy or with Leigh syndrome. *Hum Mutat* 35(11): 1285-1289.

Sgarbi G, Casalena GA, Baracca A, Lenaz G, DiMauro S, Solaini G. 2009. Human NARP mitochondrial mutation metabolism corrected with alpha-ketoglutarate/aspartate: a potential new therapy. *Arch Neurol* 66(8): 951-957.

Sharma N, Kumar A. 2014. Mechanism of immunotoxicological effects of tributyltin chloride on murine thymocytes. *Cell Biol Toxicol* 30(2): 101-112.

- Shidara Y, Yamagata K, Kanamori T, Nakano K, Kwong JQ, Manfredi G, et al. 2005. Positive contribution of pathogenic mutations in the mitochondrial genome to the promotion of cancer by prevention from apoptosis. *Cancer Res* 65(5): 1655-1663.
- Takahashi S, Mukai H, Tanabe S, Sakayama K, Miyazaki T, Masuno H. 1999. Butyltin residues in livers of humans and wild terrestrial mammals and in plastic products. *Environ Pollut* 106(2): 213-218.
- Tatuch Y, Christodoulou J, Feigenbaum A, Clarke JT, Wherret J, Smith C, et al. 1992. Heteroplasmic mtDNA mutation (T----G) at 8993 can cause Leigh disease when the percentage of abnormal mtDNA is high. *Am J Hum Genet* 50(4): 852-858.
- Thorburn DR, Rahman S. 1993. Mitochondrial DNA-Associated Leigh Syndrome and NARP. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Smith RJH, Stephens K, editors. *GeneReviews*[®] [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015. 2003 Oct 30 [updated 2014 Apr 17].
- Tsao CY, Mendell JR, Bartholomew D. 2001. High mitochondrial DNA T8993G mutation (<90%) without typical features of Leigh's and NARP syndromes. *J Child Neurol* 16(7): 533-535.
- Ueno S, Kashimoto T, Susa N, Shiota Y, Okuda M, Mutoh K, et al. 2003. Effects of butyltin compounds on mitochondrial respiration and its relation to hepatotoxicity in mice and Guinea pigs. *Toxicol Sci* 75(1): 201-207.
- van Oven M, Kayser M. 2009. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum Mutat* 30(2): E386-E394.
- Vazquez-Memije ME, Rizza T, Meschini MC, Nesti C, Santorelli FM, Carrozzo R. 2009. Cellular and functional analysis of four mutations located in the mitochondrial ATPase6

- gene. *J Cell Biochem* 106(5): 878-886.
- von Ballmoos C, Brunner J, Dimroth P. 2004. The ion channel of F-ATP synthase is the target of toxic organotin compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(31): 11239-11244.
- Whalen MM, Loganathan BG, Kannan K. 1999. Immunotoxicity of environmentally relevant concentrations of butyltins on human natural killer cells in vitro. *Environ Res* 81(2): 108-116.
- Wojewoda M, Duszynski J, Szczepanowska J. 2010. Antioxidant defence systems and generation of reactive oxygen species in osteosarcoma cells with defective mitochondria: effect of selenium. *Biochim Biophys Acta* 1797(6-7): 890-896.
- Wojewoda M, Duszynski J, Wieckowski M, Szczepanowska J. 2012. Effect of selenite on basic mitochondrial function in human osteosarcoma cells with chronic mitochondrial stress. *Mitochondrion* 12(1): 149-155.
- Yamada S, Kotake Y, Demizu Y, Kurihara M, Sekino Y, Kanda Y. 2014. NAD-dependent isocitrate dehydrogenase as a novel target of tributyltin in human embryonic carcinoma cells. *Sci Rep* 4: 5952.
- Zhang C, Huang VH, Simon M, Sharma LK, Fan W, Haas R, et al. 2012. Heteroplasmic mutations of the mitochondrial genome cause paradoxical effects on mitochondrial functions. *FASEB J* 26(12): 4914-4924.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Oxygen consumption by Osteosarcoma 143B (A) and Adenocarcinoma A549 (B) cybrids. The dashed line (100 %) represents the mean value in each of the untreated cybrids. The bars indicate the percentage of TBTC-treated cybrids. Error bars represent the standard deviation. * $P < 0.05$ vs. the same untreated cybrid; # $P < 0.05$ vs. the wild-type cybrid from the same nuclear background at the same TBTC concentration; † $P < 0.05$ for Om vs. Am or Owt vs. Awt at the same TBTC concentration.

Figure 2. ATP levels in Osteosarcoma 143B and Adenocarcinoma A549 cybrids. The dashed line (100 %) represents the mean value in each of the untreated cybrids. The bars indicate the percentage of TBTC-treated cybrids. Error bars represent the standard deviation. * $P < 0.05$ vs. the same untreated cybrid; # $P < 0.05$ vs. the wild-type cybrid from the same nuclear background at the same TBTC concentration; † $P < 0.05$ for Om vs. Am at the same TBTC concentration.

Figure 3. MIMP in single samples of TBTC-treated Adenocarcinoma A549 cybrids. A decreased red stain corresponds to a lower MIMP.

Figure 4. H_2O_2 production in TBTC-treated Osteosarcoma 143B cybrids. The dashed line (100 %) represents the mean value in each of the untreated cybrids. The bars indicate the percentage of treated cybrids. Error bars represent the standard deviation. * $P < 0.05$ vs. the same untreated cybrid.

Figure 5. IDH activity in TBTC-treated Osteosarcoma 143B cybrids. The dashed line (100 %) represents the mean value in each of the untreated osteosarcoma 143B cybrids. The bars indicate the percentage of treated cybrids. Error bars represent the standard deviation. * $P < 0.05$ vs. the same untreated cybrid. # $P < 0.05$ vs. the mutant cybrid treated with 20 nM TBTC.

Figure 6. Oligomycin (OLI) effect on different mitochondrial parameters. A) MIMP in single samples of treated Adenocarcinoma A549 cybrids. A decreased red stain corresponds to a lower MIMP. The uncoupler carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP) was used as a control because it decreases MIMP. B) H_2O_2 production in treated Osteosarcoma 143B cybrids. C) IDH activity in treated Osteosarcoma 143B cybrids. The dashed line (100 %) represents the mean value in each of the untreated osteosarcoma 143B cybrids. The bars indicate the percentage of treated cybrids. Error bars represent the standard deviation. * $P < 0.05$ vs. the same untreated cybrid; # $P < 0.05$ vs. the wild-type cybrid at the same OLI concentration.

Figure 1

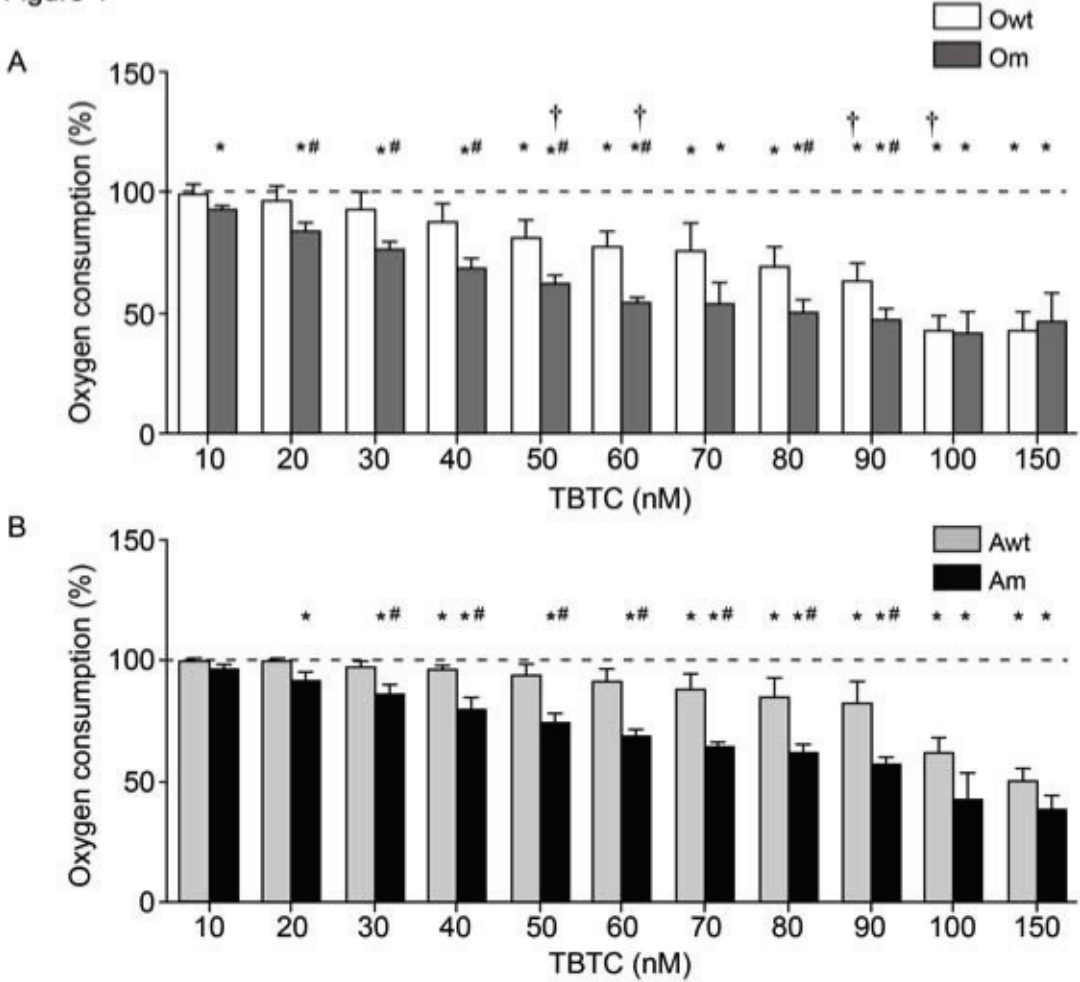


Figure 2

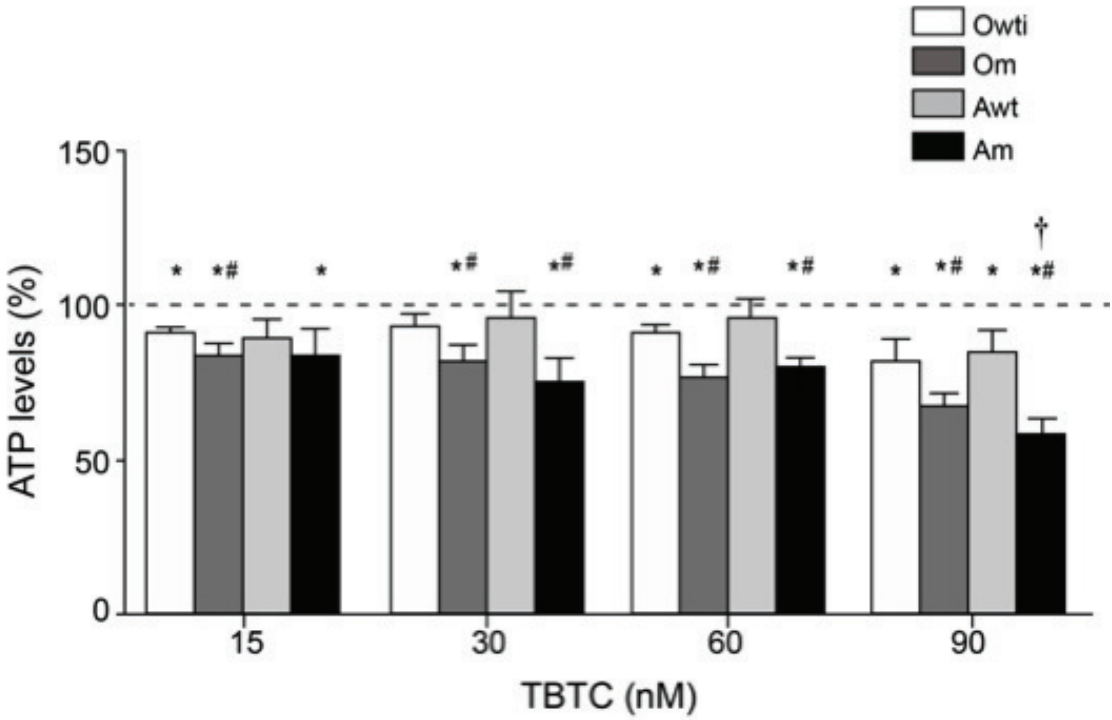


Figure 3

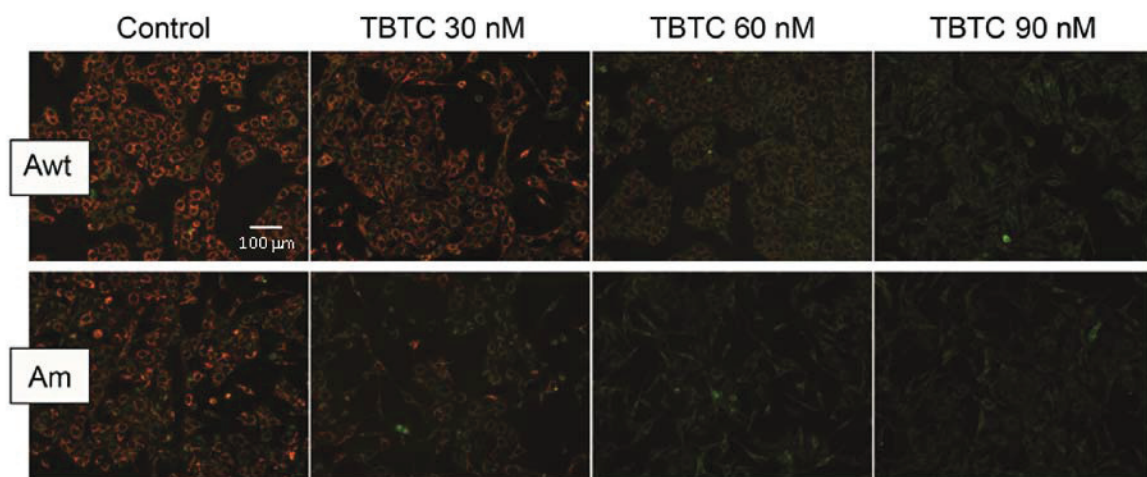
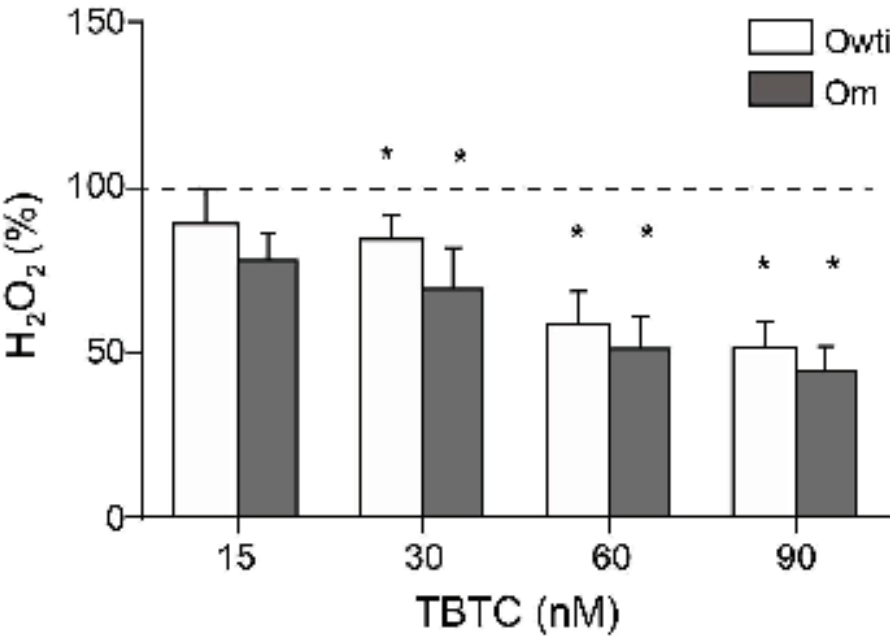


Figure 4



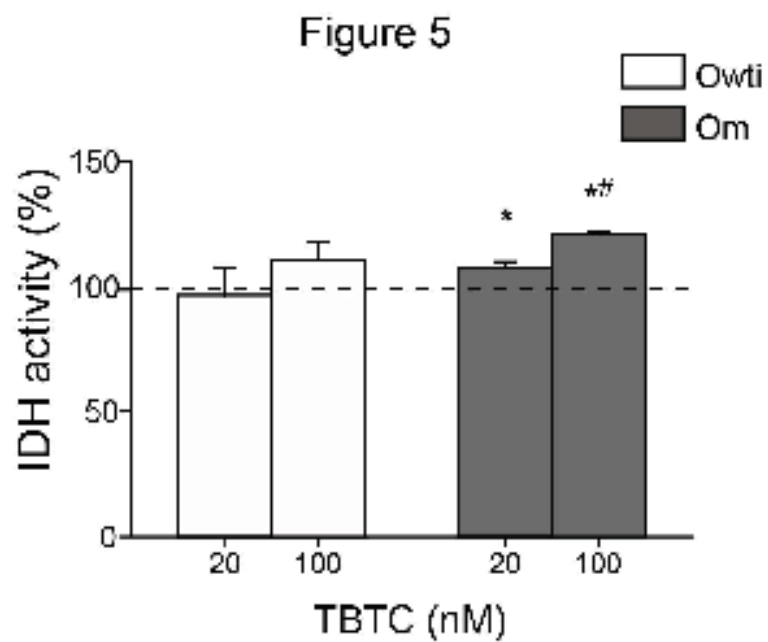
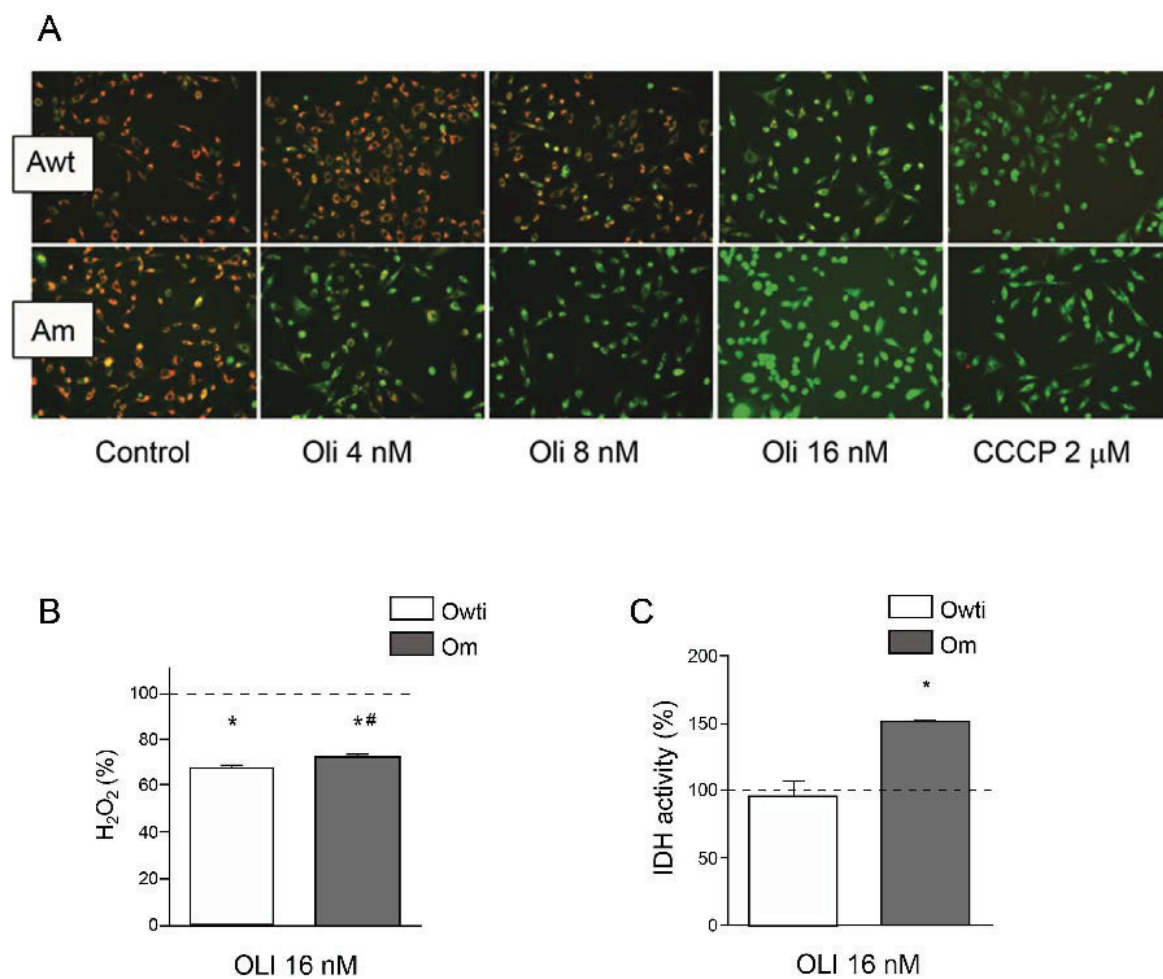


Figure 6



RESEARCH ARTICLE

Xenobiotics that affect oxidative phosphorylation alter differentiation of human adipose-derived stem cells at concentrations that are found in human blood

Laura Llobet^{1,2,3}, Janne M. Toivonen^{1,2}, Julio Montoya^{1,2,3}, Eduardo Ruiz-Pesini^{1,2,3,4,*} and Ester López-Gallardo^{1,2,3,*} ‡

ABSTRACT

Adipogenesis is accompanied by differentiation of adipose tissue-derived stem cells to adipocytes. As part of this differentiation, biogenesis of the oxidative phosphorylation system occurs. Many chemical compounds used in medicine, agriculture or other human activities affect oxidative phosphorylation function. Therefore, these xenobiotics could alter adipogenesis. We have analyzed the effects on adipocyte differentiation of some xenobiotics that act on the oxidative phosphorylation system. The tested concentrations have been previously reported in human blood. Our results show that pharmaceutical drugs that decrease mitochondrial DNA replication, such as nucleoside reverse transcriptase inhibitors, or inhibitors of mitochondrial protein synthesis, such as ribosomal antibiotics, diminish adipocyte differentiation and leptin secretion. By contrast, the environmental chemical pollutant tributyltin chloride, which inhibits the ATP synthase of the oxidative phosphorylation system, can promote adipocyte differentiation and leptin secretion, leading to obesity and metabolic syndrome as postulated by the obesogen hypothesis.

KEY WORDS: OXPHOS, Xenobiotics, Adipocytes

INTRODUCTION

The white adipose tissue (WAT) stores energy as triglycerides and secretes endocrine factors such as adipokines. Most WAT mass or volume consists of mature adipocytes. In adult humans, the number of these cells is remarkably stable because new adipocytes differentiate constantly to replace lost adipocytes (Spalding et al., 2008).

In vitro differentiation of 3T3-L1 mouse preadipocytes, one of the best characterized models for studying adipogenesis (Green and Kehinde, 1975; Kita et al., 2009), is accompanied by a remarkable increase in the expression of numerous mitochondrial proteins (Newton et al., 2011). The increased basal rate of oxygen consumption in adipocytes compared with preadipocytes could be a clear manifestation of augmented biogenesis of the oxidative

phosphorylation (OXPHOS) system during the adipogenic process (Wilson-Fritch et al., 2003). The levels of assembled OXPHOS complexes and mitochondrial DNA (mtDNA) copy number also increase with the adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells (Ryu et al., 2013; Shi et al., 2008).

Genetic manipulation of the OXPHOS system can affect adipocyte differentiation. Mouse preadipocytes that overexpress mesodermal developmental transcription factor Tbx15 have reduced mitochondrial mass, basal respiration and mtDNA gene expression. These cells show an impaired differentiation to adipocytes and reduced triglyceride accumulation (Gesta et al., 2011). Mouse adipose tissue-derived stem cells (mASCs) that lacked the CR6/gadd45-interacting protein Gadd45gip1/Crif1, a translation/assembly factor for mtDNA-derived polypeptides, express lower levels of mtDNA-encoded OXPHOS subunits and display disrupted adipocyte differentiation (Ryu et al., 2013). The expression of mitochondrial transcription factor A (TFAM), a key factor for mtDNA transcription and replication, is increased with adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells (hMSCs). When TFAM expression is suppressed in hMSCs with small interfering RNA, expression of the gene encoding NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 2 (*MT-ND2*) is lowered and adipogenic differentiation, as determined by adiponectin mRNA levels, is inhibited (Zhang et al., 2013).

In addition to genetic intervention, physiologic or pharmacologic manipulation of OXPHOS can also affect adipogenic differentiation. Oxygen is the ultimate electron acceptor in the OXPHOS electron transport chain (ETC) and hypoxia (1% O₂) restrains adipogenic differentiation in both mouse preadipocytes and hMSCs (Carriere et al., 2004; Zhang et al., 2013). Nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) used in human immunodeficiency virus (HIV) treatment inhibit mtDNA polymerase- γ , the enzyme required for mtDNA replication. This provokes mtDNA depletion and decreases adipogenesis in mouse and human preadipocytes (Caron et al., 2004; Stankov et al., 2010, 2013, 2008; Walker et al., 2006).

Numerous chemical compounds used in medicine, agriculture or other human activities can affect OXPHOS function (Degli Esposti, 1998; Nadanaciva and Will, 2011; Wallace, 2008). Because OXPHOS appears to be important for adipocyte differentiation, xenobiotics could also alter adipogenesis. However, xenobiotics are very frequently tested at high concentrations that would never be found in humans. Therefore, we have investigated the effects on adipogenic differentiation of some OXPHOS xenobiotics at low concentrations. Our results support the view that OXPHOS xenobiotics might interfere with mitochondrial ETC and alter adipogenic differentiation in concentrations already reported present in human circulation.

¹Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza, 50013-Zaragoza, Spain. ²Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón, Universidad de Zaragoza, 50013-Zaragoza, Spain. ³CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Universidad de Zaragoza, 50013-Zaragoza, Spain. ⁴Fundación ARAID, Universidad de Zaragoza, 50013-Zaragoza, Spain.
*These authors share senior authorship

‡Authors for correspondence (edurruiz@unizar.es; esterlop@unizar.es)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly attributed.

TRANSLATIONAL IMPACT

Clinical issue

Adipogenesis, the process by which adipocytes are generated from precursor cells, requires high levels of cellular energy. In line with this, an increase in biogenesis of the oxidative phosphorylation system (OXPHOS) is observed in differentiating preadipocytes. Genetic manipulation of OXPHOS is known to negatively affect adipocyte differentiation in model systems, and defects in OXPHOS are associated with a wide range of human multisystem disorders, reflecting its importance in cellular metabolism. Unfortunately, this system is often an unintended target of drug therapies and is responsible, at least in part, for the dose-limiting side effects associated with a large array of pharmaceuticals. Moreover, OXPHOS is frequently the target of many environmental toxins (xenobiotics). In general, the effects of xenobiotics on OXPHOS have been assessed by applying high concentrations that would not be found in humans. Here, the authors evaluate the effects on cell differentiation and function of OXPHOS-targeting xenobiotics at concentrations that have been reported in human circulation.

Results

Isolated human adipose tissue-derived stem cells (hASCs) were used to model adipocyte differentiation. As proof-of-principle, the authors first showed that OXPHOS biogenesis is enhanced during the differentiation of these cells. They then evaluated the effect of different xenobiotics, using concentrations that are usually found in human blood. Because some essential polypeptides for OXPHOS biogenesis are mitochondrial DNA (mtDNA)-encoded, the team tested compounds that could interfere with mtDNA replication or translation. Inhibitors of mtDNA replication, including nucleoside reverse transcriptase inhibitors used in the antiretroviral therapy of individuals with AIDS, and inhibitors of mtDNA translation, including ribosomal antibiotics used to fight bacterial infections, were found to decrease cell triglycerides and leptin secretion. On the other hand, an inhibitor of the OXPHOS ATP synthase, the environmental chemical pollutant tributyltin chloride, increased triglyceride levels and leptin discharge.

Implications and future directions

This work supports previous studies that indicate that OXPHOS biogenesis is important for adipocyte differentiation. Clinical drugs that reduce mtDNA gene expression, such as inhibitors of mtDNA replication or translation, decrease OXPHOS biogenesis and alter adipogenesis, even at low concentrations. Exposure to environmental toxins that modify OXPHOS complex activities can also interfere with adipocyte differentiation. This finding lends weight to the obesogen hypothesis, in which it is proposed that environmental contaminants have contributed to the increase in obesity and related metabolic disorders in recent years. Important OXPHOS components are mtDNA-encoded. These polypeptides, by themselves or after their interaction with different xenobiotics, modify OXPHOS capacity. Thus, mtDNA genetic variability might also affect adipocyte differentiation and related phenotypes, with potentially pathological consequences.

RESULTS

Characterization of human adipose tissue-derived stem cells

Prior to exposing the cells under study to xenobiotics, they were confirmed to display characteristics typical of human adipose tissue-derived stem cells (hASCs). As previously described (Gir et al., 2012), hASCs were found to adhere to plastic, express mRNAs for the hASC marker proteins cluster of differentiation 90 (CD90/THY1) and 105 (CD105/ENG) (Fig. 1A) and possess the capacity to undergo adipogenic, osteogenic and chondrogenic differentiation (Fig. 1B-E). To genetically characterize these cells, the nuclear genetic fingerprint of 16 short tandem repeats and the whole mtDNA sequence were obtained (Fig. 2A,B). Two different

lots of hASCs were used (hASCs-1 and hASCs-2), originating from different donors. The mtDNA haplogroup of hASCs-1 was T2c1d1a and that of hASCs-2 was H10e2. In the organelle genomes, there were no private mutations and none of the genetic variants was apparently pathologic (GenBank KR816716, KR816717) (van Oven and Kayser, 2009). Because all the experiments described here were completed before passage 10, karyotype analysis of the hASCs was performed in this passage. All 20 metaphase preparations were found to be normal 46,XX (Fig. 2C).

It has been previously shown that the glucose concentration in the culture medium can affect different mitochondrial parameters (Weber et al., 2002). We observed that very glycolytic tumor cell lines, such as osteosarcoma 143B cybrids, consumed all medium glucose when grown at low (5 mM) glucose concentration for 48 h (Fig. S1A). Compared with cells grown without glucose, they showed significantly lower quantities of respiratory complex IV (CIV) (Fig. S1B). At high (25 mM) glucose concentration, the sugar concentration in the medium was greatly decreased after 48 h. CIV specific activity and quantity were significantly lower at high glucose than those from cells growing without glucose. The CIV quantity and specific activity of citrate synthase (CS), a volumetric marker of cell fraction occupied by mitochondria, were also significantly lower at high glucose than in cells growing at low glucose. In contrast, glucose consumption by hASCs was almost negligible over 72 h (Fig. 1F). It is possible that hASCs preferably use other substrates, such as pyruvate or glutamine, as energy source (Reitzer et al., 1979). As found in other studies (Keuper et al., 2014), mitochondrial parameters such as CS specific activity, CIV specific activity or quantity (Fig. 1G) and oxygen consumption (Fig. 1H) were not affected by glucose in hASCs.

Several reports have proposed the use of hypoxia for maintaining undifferentiated stem cell cultures, but it is known that hypoxia can also stimulate differentiation (Abdollahi et al., 2011). At 3% oxygen, the mRNA levels of hypoxia markers phosphofructokinase L (PFKL) and vascular endothelium-derived growth factor (VEGF) significantly increased (Fig. 1I) (Lee et al., 2009), as did the number of mtDNA copies and CS specific activity (Fig. 1J), suggesting mitochondrial biogenesis. However, even though CIV quantity tended to increase, CIV specific activity significantly decreased in hypoxia. The hASC doubling time in hypoxia was 45.8 h as opposed to 26.3 h in normoxia (Fig. 1K). Furthermore, the shift to hypoxic conditions slowed adipogenic differentiation but, surprisingly, chondrogenic and osteogenic differentiation was favored by induction of adipogenic differentiation (Fig. 1L-N) (Choi et al., 2014; Wang et al., 2005).

As a result of the slower hASC proliferation rate, the difficulty to induce adipocyte differentiation and confounding effects of chondro/osteogenesis of hASCs under hypoxia, all differentiation experiments were performed at 20% oxygen. Because of the reported delay in adipogenic lineage commitment of hMSCs after glucose reduction (Lo et al., 2011), we also performed these experiments at 25 mM glucose, in spite of the fact that these conditions do not faithfully replicate the true physiological conditions under which hASCs undergo differentiation *in vivo*.

Cell morphology and metabolic alterations during adipogenic differentiation

As expected, adipogenic differentiation medium slowed hASC proliferation. The mRNA levels of hASC marker proteins CD90 and

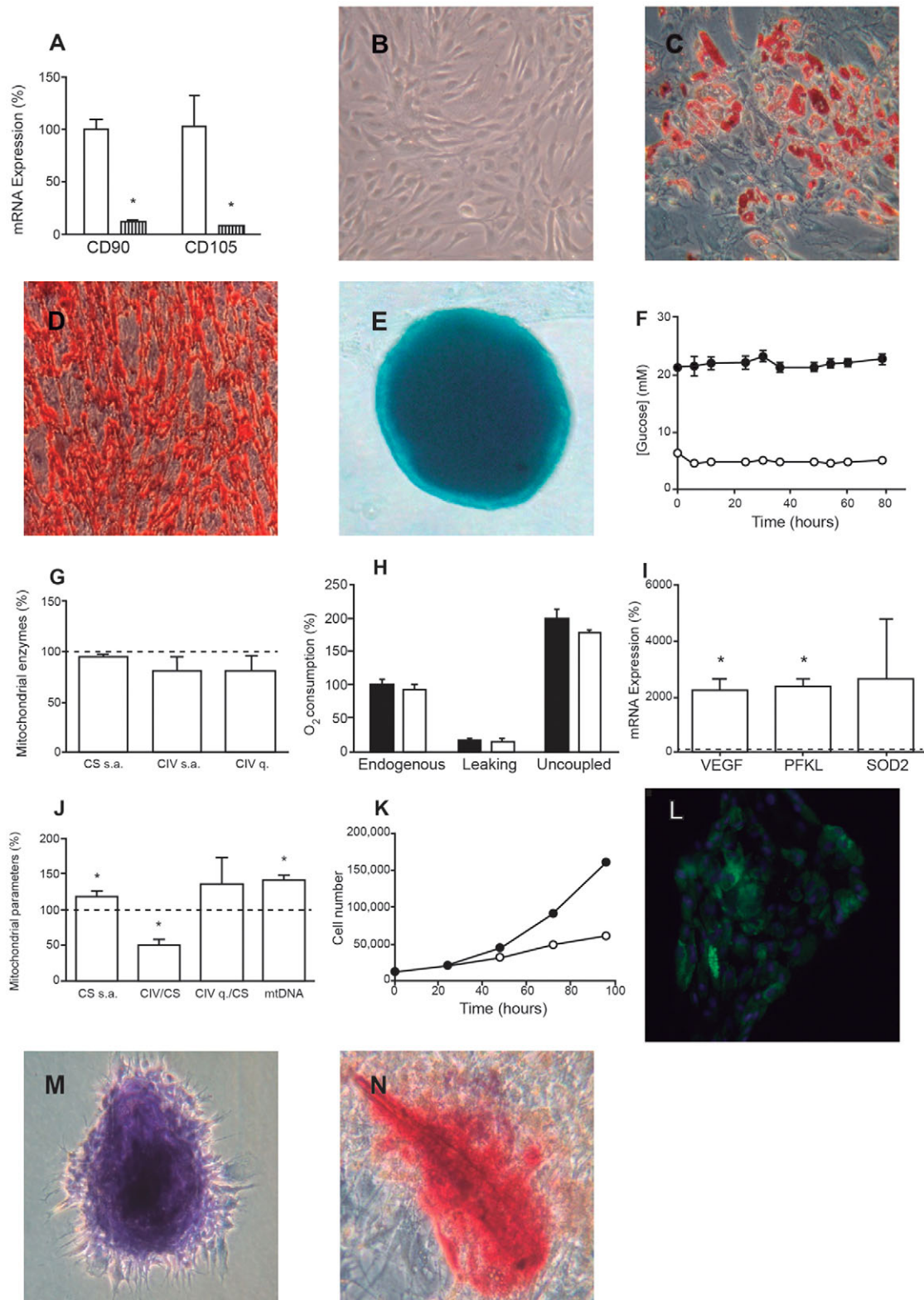


Fig. 1. hASC characterization. (A) Expression of hASC marker mRNAs. White bars represent hASCs. Striped bars represent neuroblastoma SK-N-BE(2)-C cells, as a negative control. * $P \leq 0.0044$. (B-E) Representative microscopy images of hASCs (B), hASCs differentiated to adipocytes (Oil Red) (C), hASCs differentiated to osteocytes (D) and hASCs differentiated to chondrocytes (micromass culture) (E). (F) Glucose concentration of hASC culture medium. Black and white circles indicate 25 and 5 mM glucose, respectively. (G) Mitochondrial enzymes specific activities (s.a.) and levels (q). White bars indicate the value of enzymatic parameters of cells grown at 5 mM glucose. Dotted line represents the value of these variables for cells grown at 25 mM glucose. (H) Oxygen consumption of cells grown at 25 mM (black bars) and 5 mM (white bars) glucose. (I) Expression of hypoxia (3% O_2) mRNA markers. Dotted line at 100% represents the value of these variables at 20% oxygen. * $P \leq 0.0162$. (J) Effect of hypoxia on mitochondrial variables. Dotted line represents the value of these variables at 20% oxygen. * $P \leq 0.0178$. (K) hASC doubling time. Black or white circles indicate normoxia or hypoxia, respectively. (L-N) Representative optical microscopy images of hASCs differentiated to adipocytes (Nile Red) (L), chondrocytes (normal culture) (M) and osteocytes (N) in hypoxia.

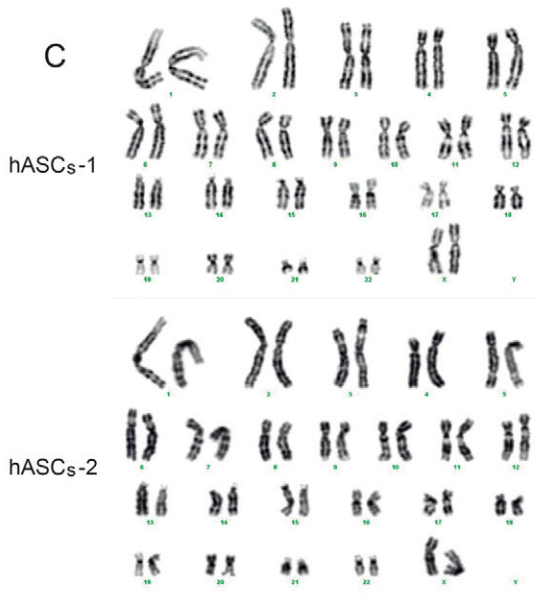
A

Nuclear Marker	Chromosome	Alleles	
		hASCs-1	hASCs-2
TPOX	2	8, 11	8, 11
D2S1338	2	25	16, 17
D3S1358	3	16, 17	14, 15
FGA	4	21, 23	21, 24
D5S818	5	12	12, 13
CSF1PO	5	11, 12	11, 12
D7S820	7	10, 11	10, 11
D8S1179	8	13, 14	13, 14
TH01	11	6	6
vWA	12	15	17
D13S317	13	11, 12	11, 13
D16S539	16	12	9, 11
D18S51	18	12, 13	13, 18
D19S433	19	13, 15	15
D21S11	21	31.2, 33	29, 30
AMEL	X	X	X

Fig. 2. hASC genetic characterization. (A) Nuclear genetic fingerprints. (B) mtDNA genetic variants. Sequences are compared with the revised Cambridge reference sequence (rCRS). (C) Karyotypes.

B

mtDNA Genes	SNPs	
	hASCs-1	hASCs-2
<i>MT-ND1</i>	T4216C	
<i>MT-ND2</i>	A4769G, A4917G, C5187T	A4769G, T4823C
<i>MT-ND4</i>	C10822T, A11251G, G11719A, A11812G, G11914A	
<i>MT-ND5</i>	C12363T, G13368A	
<i>MT-ND6</i>	A14233G	T14470A, A14602G
<i>MT-CYB</i>	C14766T, G14905A, A15326G, C15452A, A15607G	A15326G
<i>MT-CO1</i>	G6261A, C7028T	
<i>MT-CO2</i>	C7873T	
<i>MT-ATP6</i>	G8697A, A8860G	A8860G
<i>MT-TR</i>	T10463C	
<i>MT-TT</i>	G15928A	
<i>MT-RNR1</i>	G709A, A750G, A1438G	A750G, A1438G
<i>MT-RNR2</i>	G1888A, A2706G	
<i>MT-DLOOP</i>	A73G, T146C, A263G, T279C, 309Ci, 315Ci, T16126C, C16292T, C16294T, T16519C	A263G, 309Ci, 315Ci, T16093C, C16221T



CD105 decreased by 57.4% and 40.8%, respectively (Fig. 3A). The onset of differentiation was not completely synchronized and, as previously reported (Hofmann et al., 2012; Keuper et al., 2014), a certain percentage of the cells (approximately 50% in our case) did not differentiate at all. Compared with undifferentiated hASCs (Fig. 3B,C), differentiated cells showed a morphological change and increased volume (Fig. 3D,E) which, at times, has been reported to be as high as 20-fold (von Heimburg et al., 2005). The increased size was only partially associated with higher protein content

(Fig. 3F) and mainly represented accumulation of lipid droplets, as shown by lipophilic staining (Fig. 3G,H) and triglyceride assay (Fig. 3I). The appearance of lipid droplets is a clear indicator of adipocyte differentiation.

As described in other reports (Gesta et al., 2011; Hofmann et al., 2012; Keuper et al., 2014; Vankoningsloo et al., 2006; Zhang et al., 2013), the induction of adipogenic differentiation led to expression of mRNAs for adipocyte markers adiponectin, leptin, fatty acid binding protein 4 (FABP4), peroxisome proliferator-activated

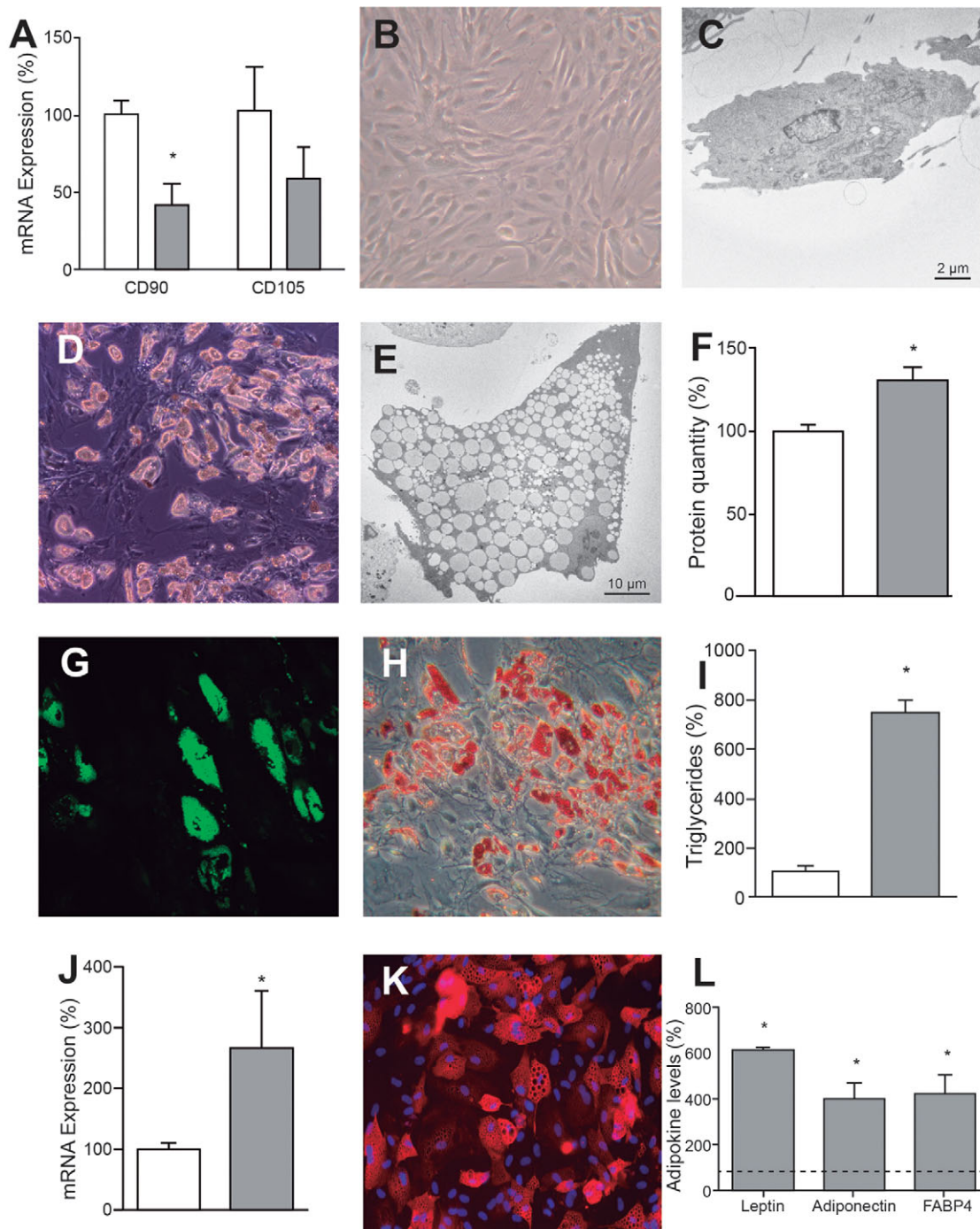


Fig. 3. Adipogenic differentiation. (A) Expression of hASC marker mRNAs. White and gray bars represent hASCs and adipocytes, respectively. $*P=0.0035$. (B,C) Representative optical (B) and electron microscopy (C) images of hASCs. (D,E) Representative optical (D) and electron microscopy (E) images of adipocytes. (F) Cell protein amount. White and gray bars represent the protein quantity per million cells of hASCs and adipocytes, respectively. $*P=0.0314$. (G,H) Representative microscopy images of adipocytes stained with Nile Red (G) or Oil Red O (H). (I) Cell triglyceride levels. White and gray bars represent the quantity of triglycerides in hASCs and adipocytes, respectively. $*P<0.0001$. (J) Expression of *PPAR γ* mRNA. White and gray bars represent hASCs and adipocytes, respectively. $*P=0.0442$. (K) Representative immunocytochemical image of adipocytes FABP4. (L) Adipokine levels secreted by adipocytes. Dotted line represents the levels found in the hASC culture medium. $*P\leq 0.0117$.

receptor gamma coactivator 1-alpha (*PGC1 α*) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (*PPAR γ*) which, except for *PPAR γ* , were not expressed at quantifiable levels in undifferentiated hASCs (Fig. 3J). Consistently, protein levels for intracellular FABP4 (Fig. 3K) and secreted FABP4, adiponectin and leptin (Fig. 3L) were greatly induced (Dicker et al., 2005).

Mitochondrial morphology and the OXPHOS system during adipogenic differentiation

Small, round mitochondria with few cristae are commonly found in small numbers, often in the perinuclear cytoplasm of undifferentiated hASCs (Fig. 4A,B). In adipocytes (Fig. 4C,D), numerous, large and extended mitochondria with multiple cristae

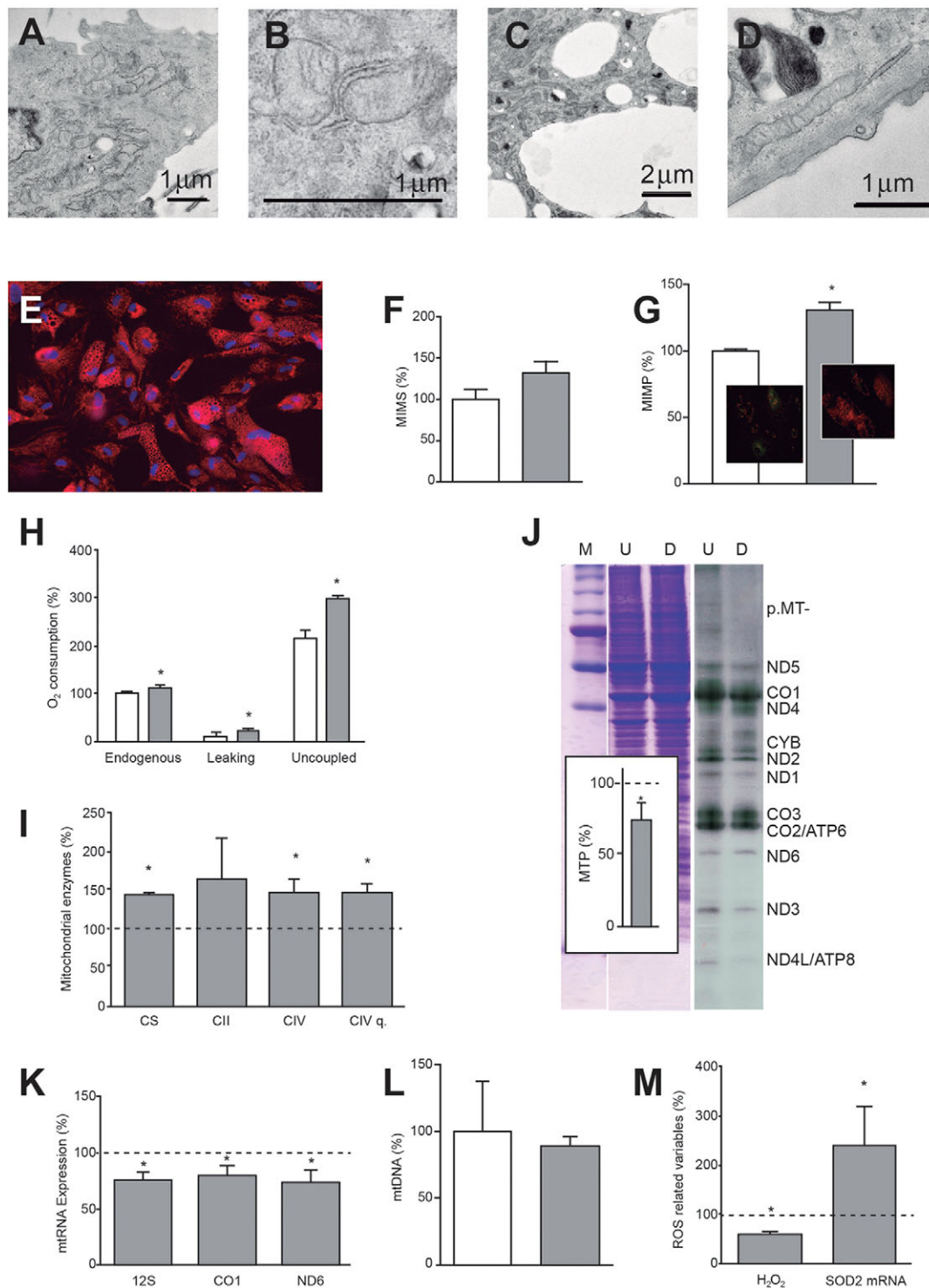


Fig. 4. Mitochondrial changes during adipocyte differentiation. (A,B) Representative electron microscopy images of part of a hASC (A) and mitochondria (B). (C,D) Representative electron microscopy images of an adipocyte fragment (C) and mitochondrion (D). (E) Representative microscopy image of the mitochondrial disposition in adipocytes. (F) MIMS. White and gray bars represent hASC and adipocyte MIMS values, respectively. (G) MIMP. White and gray bars represent hASC and adipocyte MIMP values, respectively. * $P=0.0034$. Inserts: representative images of hASCs (left) and adipocytes (right) stained with a dye used to measure MIMP. Green changes to orange when MIMP increases. (H) Oxygen consumption. White and gray bars represent values of consumed oxygen in hASCs and adipocytes, respectively. * $P\leq 0.0361$. (I) Mitochondrial enzyme specific activities and quantity (q) in adipocytes. Dotted line represents enzyme activities and amount found in hASCs. * $P\leq 0.0388$. (J) Mitochondrial protein synthesis. Representative gel showing the electrophoretic patterns of mitochondrial translation products (ND1-6, CYB, CO1-3 and ATP6,8) (right) and loading controls (left). M, molecular weight marker; U, undifferentiated cells (hASCs); D, differentiated cells (adipocytes). Insert: quantification of mitochondrial translation products (MTPs) in adipocytes. Dotted line represents the level of MTPs in hASCs. * $P=0.0210$. (K) Mitochondrial transcripts in adipocytes. Mitochondrial RNA levels (12S, CO1 and ND6) represent the three transcription units of the mtDNA. Dotted line represents levels in hASCs. * $P\leq 0.0104$. (L) mtDNA levels. White and gray bars represent the mtDNA amount in hASCs and adipocytes, respectively. (M) H₂O₂ quantity and SOD2 mRNA levels in adipocytes. Dotted line represents levels of these parameters in hASCs. * $P\leq 0.0463$.

are preferentially distributed between the cytoplasmic lipid droplets. These results were confirmed in live cells using a mitochondrial stain (Fig. 4E). Although simple microscopic observation suggested that the mitochondrial inner membrane surface (MIMS) would be larger in differentiated cells, the increase was not found to be significant according to cardiolipin assay (Fig. 4F). This can probably be explained by the fact that only approximately half of the cells used for quantitative assay were differentiated.

The mitochondrial inner membrane potential (MIMP), which drives OXPHOS, was significantly augmented with differentiation (Fig. 4G). The endogenous, leak state and uncoupled oxygen consumption per cell significantly increased with differentiation (Fig. 4H). However, these parameters did not change when normalized by protein amount or CS specific activity. Accordingly, specific activities of CS and CIV, and the quantity of CIV per cell, also increased with differentiation. The increase in respiratory complex II (CII) specific activity was also suggestive (Fig. 4I). Again, these parameters did not change when normalized by CS specific activity. All these biochemical results confirm mitochondrial biogenesis during differentiation. Despite the increase in mitochondrial biogenesis, mitochondrial protein synthesis in differentiated cells was lower than in undifferentiated cells (Fig. 4J). Actively dividing, undifferentiated cells are likely to require continuous mitochondrial protein synthesis to produce mitochondria for the new cells. However, differentiated, non-proliferating cells only need to replace the degraded mitochondrial proteins of existent cells. In agreement with protein levels, the RNA expression for three mtDNA-encoded products (representing three mtDNA transcription units) also decreased with adipocyte differentiation (Fig. 4K), although mtDNA levels remained unaltered (Fig. 4L).

Despite the observed increase in MIMP, the hydrogen peroxide (H_2O_2) levels were significantly reduced in differentiated cells (Fig. 4M). This is probably a consequence of increased expression of antioxidant enzymes during adipogenic differentiation (Higuchi et al., 2013). Indeed, it was demonstrated that adipogenesis was accompanied by significantly increased levels of mRNA for manganese superoxide dismutase (SOD2) (Fig. 4M).

OXPHOS xenobiotics and adipogenic differentiation

Nucleoside reverse transcriptase inhibitors: Zidovudine and Zalcitabine

As previously commented, NRTIs, in addition to their antiretroviral effects, inhibit mtDNA polymerase- γ , alter mitochondrial function and can result in disturbed cellular differentiation. Two NRTIs, 3'-azido-3'-deoxythymidine (Zidovudine, AZT) and 2',3'-dideoxycytidine (Zalcitabine, ddC) were tested here at concentrations close to their maximum reported concentration in human plasma (Gustavson et al., 1990; Laskin et al., 1989).

Whereas AZT at 6 μ M had no effect on intracellular or secreted markers of adipogenesis, ddC at 0.1 μ M significantly decreased Nile Red staining, triglycerides and secreted leptin (Fig. 5A). Adipogenic differentiation of hASCs decreased H_2O_2 levels (Fig. 4M) and, consistent with its effects on adipogenesis, ddC (but not AZT) was associated with increased H_2O_2 levels (Fig. 5B). Neither AZT nor ddC had any effect on CS specific activity, suggesting lack of a general effect on mitochondrial biogenesis (Fig. 5C). However, as expected from inhibitors of mtDNA polymerase, mtDNA levels were significantly reduced. Additionally, AZT (but not ddC) increased CIV quantity and specific activity, normalized by CS specific activity.

ddC treatment during adipogenic differentiation provoked reduction of some adipocyte markers but had no effect on mitochondrial enzymes. However, when hASCs were treated with 0.1 μ M ddC for 10 days and then differentiated in the absence of drug, they did not show any difference from untreated cells with regards to adipocyte markers (Fig. 5D), but CS specific activity was significantly decreased and CIV specific activity and quantity, normalized by CS specific activity, were significantly increased (Fig. 5E).

Ribosomal antibiotics: chloramphenicol and linezolid

Because of the bacterial origin of mitochondria, some ribosomal antibiotics also inhibit mitochondrial protein synthesis. Two inhibitors of bacterial protein synthesis, chloramphenicol (CAM) and linezolid (LIN), bind the large subunit of the mitochondrial ribosome and produce myelosuppression, lactic acidosis and optical and peripheral neuropathy (Pacheu-Grau et al., 2010). Both CAM at 2.5 μ M, a concentration below the lower limit of its therapeutic range (Balbi, 2004), and LIN at 30 μ M, a concentration below the steady-state peak serum concentrations (Dryden, 2011), significantly decreased the amount of triglycerides and secreted leptin (Fig. 6A). However, Nile Red staining and adiponectin and FABP4 levels were not significantly affected. CAM, but not LIN at 30 or 60 μ M, increased production of reactive oxygen species (ROS) (Fig. 6B). CAM, but not LIN, decreased CS specific activity (Fig. 6C). Interestingly, the ratio CIV (specific activity or quantity)/CS specific activity seemed to be altered in opposite directions by the two antibiotics, whereas mtDNA levels remained unaltered. Consistent with a negative effect of LIN on CIV quantity, a general decrease in mitochondrial protein synthesis was observed in the presence of the drug (Fig. 6D).

To rule out a particular effect of LIN on the specific hASCs used (hASCs-1), we analyzed in parallel the influence of 30 or 60 μ M LIN on other hASCs (hASCs-2) derived from a different donor (Fig. 2). LIN at 30 μ M provoked similar effects on hASCs-2 as observed on hASCs-1, except for CS specific activity, which was significantly increased (Fig. 6E). At 60 μ M LIN, the effects on both lots of hASCs were more pronounced: the CIV/CS ratios and the levels of secreted leptin were significantly lower than at 30 μ M in both cell lines (Fig. 6E). Interestingly, at 60 μ M, the CIV/CS specific activities ratio and the secreted leptin were also significantly lower in hASCs-2 than in hASCs-1 (Fig. 6E). This suggests that genetic polymorphisms modify the susceptibility of hASCs to antibiotics targeting mitochondrial ribosomes.

Environmental toxins: tributyltin chloride

The organotin tributyltin chloride (TBTC) is a potent algicide and molluscicide. Widespread environmental contamination of marine ecosystems with tributyltins (TBT) began in the 1960s when it became ubiquitous as the active component in marine antifouling paints for ships. However, environmental contamination by TBT goes beyond aquatic ecosystems; they are also frequently used in many industrial and agricultural activities. All this has led to concern over their effects on human health. As a result, a global ban on the use of organotin-based antifouling paints was enacted from 2003 onward (Grun, 2014).

It was previously shown that TBT induces lipid droplet accumulation in human keratinocytes and adipogenic differentiation of mouse preadipocyte cells (Corsini et al., 2003; Kanayama et al., 2005). Bovine submitochondrial particles treated with TBT were found to synthesize ATP at very low rates, and it was reported that subunit p.MT-ATP6 of the OXPHOS complex V (CV, or ATP synthase) was

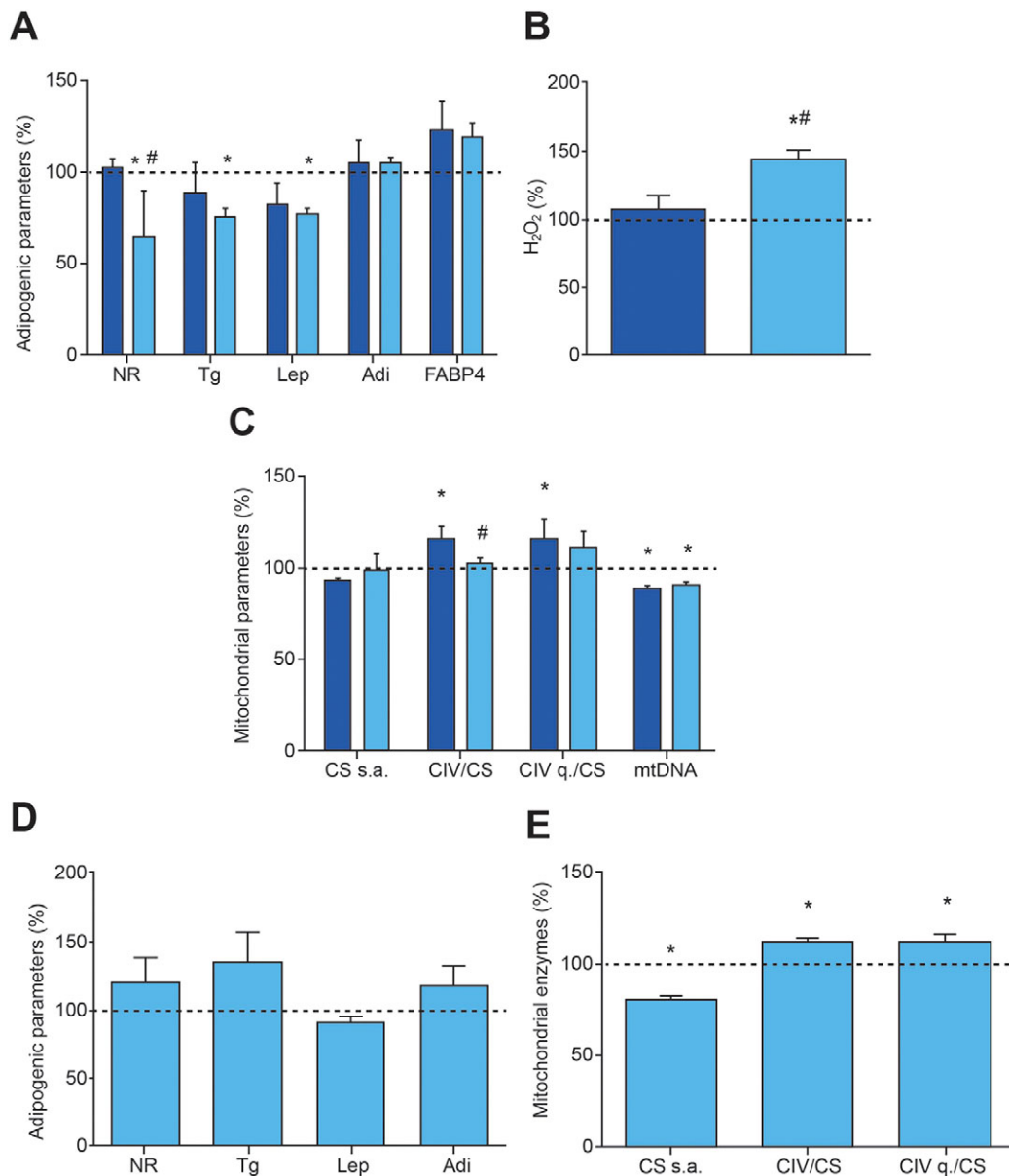


Fig. 5. Response of adipogenic and mitochondrial parameters to NRTIs. Dark and light blue bars indicate treatment with 6 μ M AZT and 0.1 μ M ddC, respectively. Dotted lines represent levels in untreated adipocytes. (A) Adipogenic variables. * $P \leq 0.0135$, # $P = 0.0234$ (vs AZT). (B) H₂O₂ production in adipocytes. * $P = 0.0052$, # $P = 0.0077$ (vs AZT). (C) Mitochondrial variables. * $P \leq 0.0469$, # $P = 0.0452$ (vs AZT). (D) Adipogenic variables after 0.01 μ M ddC for 10 days and posterior differentiation. (E) Mitochondrial variables after 0.01 μ M ddC for 10 days and posterior differentiation. * $P \leq 0.0480$.

the target site for inhibition by TBT (Matsuno-Yagi and Hatefi, 1993; von Ballmoos et al., 2004). However, these data were obtained at relatively high concentrations of the drug (Kotake, 2012). TBT concentrations in human blood have been found to range from 16.8 to 306.8 nM (Kannan et al., 1999; Whalen et al., 1999), and TBT at 10 nM can activate genomic pathways via PPAR γ and retinoid X receptor alpha (RXR α) (Kanayama et al., 2005). It has also been shown recently that, depending on the exposure window, TBT can promote adipogenesis independently of PPAR γ (Biemann et al., 2014). Inhibition of isocitrate dehydrogenase (IDH) at nanomolar levels has been demonstrated as a non-genomic, endocrine-disrupting mechanism (Yamada et al., 2014).

In the preliminary test for the effects of TBTC on hASCs it was recorded that another CV inhibitor, oligomycin (OLI) at 16 nM, induced similar morphological changes in cells as those observed

with TBTC (Fig. 7A-D). TBTC at 20 and 100 nM significantly increased the intracellular (Nile Red, triglycerides) and secreted (leptin) markers of adipogenesis in hASCs grown for 21 days in normal, non-differentiation media (Fig. 7E and Fig. S2). Similar results were obtained for OLI at 16 nM. However, in our hands, neither TBTC nor OLI decreased IDH activity. On the contrary, TBTC at 100 nM or OLI at 16 nM significantly increased IDH activity (Fig. 7F), probably mirroring a compensatory response for increasing mitochondrial biogenesis. As expected from direct inhibitors of ATP synthase, both OLI and TBTC (at 100 nM) decreased oxygen consumption of hASCs (Fig. 7G) and the effect of TBTC was shown to be immediate (Fig. 7H). TBTC at 100 nM did not affect the levels of H₂O₂ but, unexpectedly, OLI was found to immediately decrease these levels (Fig. 7I). The assay was confirmed functional by addition of antioxidant *N*-acetyl-cysteine

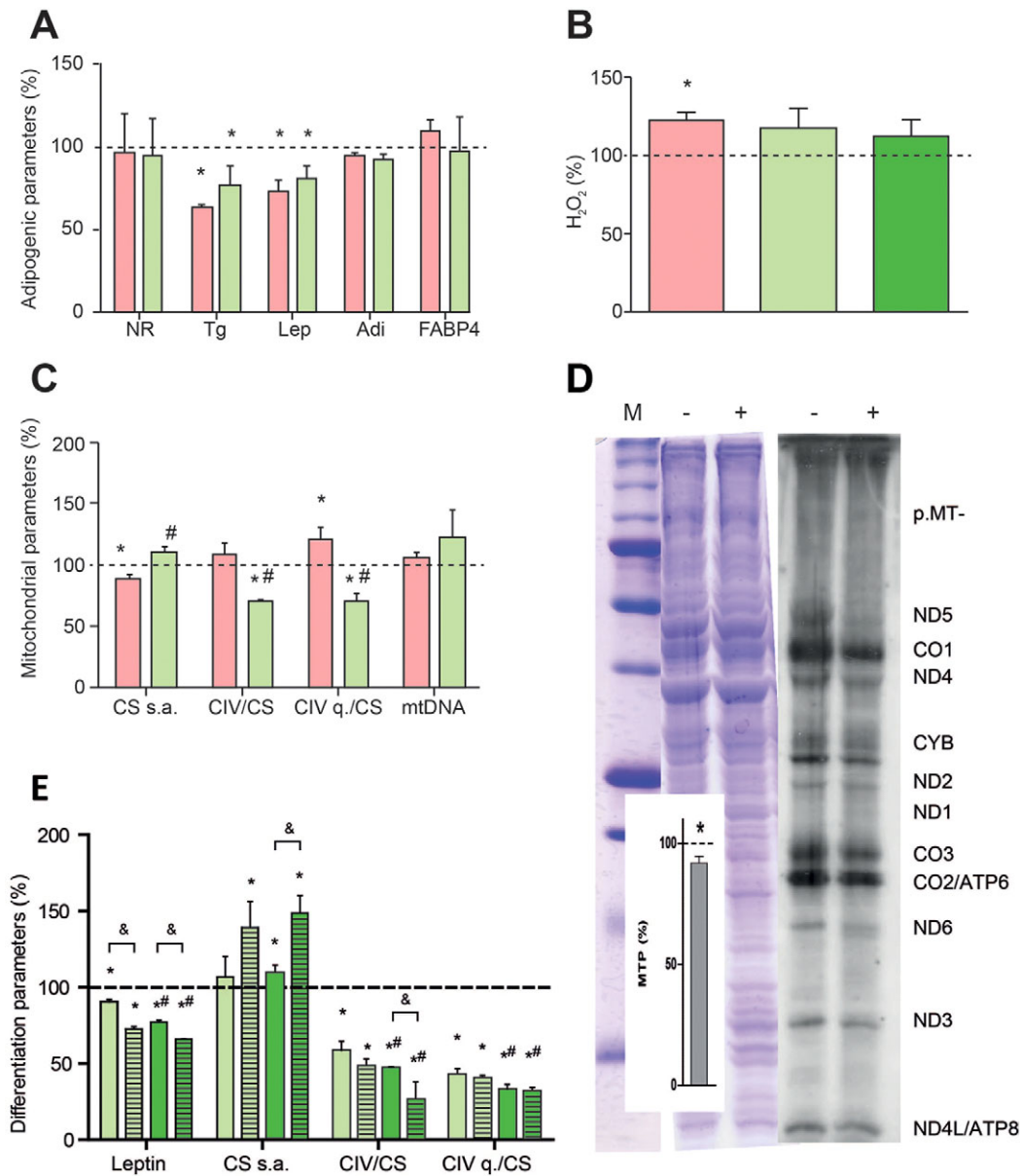


Fig. 6. Response of adipogenic and mitochondrial parameters to ribosomal antibiotics. Pink and light green bars indicate treatment with 2.5 μ M CAM and 30 μ M LIN, respectively. Dotted lines represent levels in untreated adipocytes. (A) Adipogenic variables. $*P \leq 0.0008$. (B) H_2O_2 production in adipocytes. Dark green bar indicates treatment with 60 μ M LIN. $*P = 0.0396$. (C) Mitochondrial variables. $*P \leq 0.0273$, $\#P \leq 0.0040$ (vs CAM). (D) Mitochondrial protein synthesis. Representative gel showing the electrophoretic patterns of MTP (right) and loading controls (left). M, molecular weight marker; -, untreated hASCs; +, 30 μ M LIN-treated hASCs. Insert: quantification of MTPs in LIN-treated hASCs. Dotted line represents the level of MTPs in untreated hASCs. $*P = 0.0071$. (E) Response of secreted leptin and mitochondrial variables to 30 μ M (light green bars) and 60 μ M (dark green bars) LIN in differentiated hASCs-1 (solid bars) and hASCs-2 (striped bars). Dotted line represents levels in untreated adipocyte-differentiated hASCs-1 or hASCs-2. $*P \leq 0.0366$, $\#P \leq 0.0329$ (vs 30 μ M LIN), $\&P \leq 0.0225$ (vs differentiated hASCs-1).

(NAC) or a superoxide-generating agent (Menadione), which decreased and increased H_2O_2 , respectively. OLI at 4 nM was previously shown to increase H_2O_2 in mouse preadipocytes (Carriere et al., 2003). It remains to be seen whether the contrasting results were caused by differences in the OLI concentration used or reflect true differences between the cells from the two species.

DISCUSSION

Adipogenic differentiation increases OXPHOS biogenesis

In the hASCs used here, oxygen consumption, MIMP, CIV specific activity and CIV quantity per cell increased with differentiation.

Thus, our results imply that adipogenic differentiation is accompanied by OXPHOS biogenesis. Oxygen consumption is also higher in differentiated than in immature primary subcutaneous preadipocytes of young adults (von Heimbürg et al., 2005). Higher endogenous and uncoupled oxygen consumption is also observed after adipogenic differentiation in hMSCs and in Simpson-Golabi-Behmel syndrome subcutaneous preadipocytes (Keuper et al., 2014; Zhang et al., 2013). Mitochondrial biogenesis is increased through adipogenic differentiation of hMSCs (Tormos et al., 2011; Zhang et al., 2013). Mitochondria of adipocytes are preferentially distributed around the lipid droplets. Analogous to our findings with hASCs, *CS* and *SOD2* mRNA levels increase during

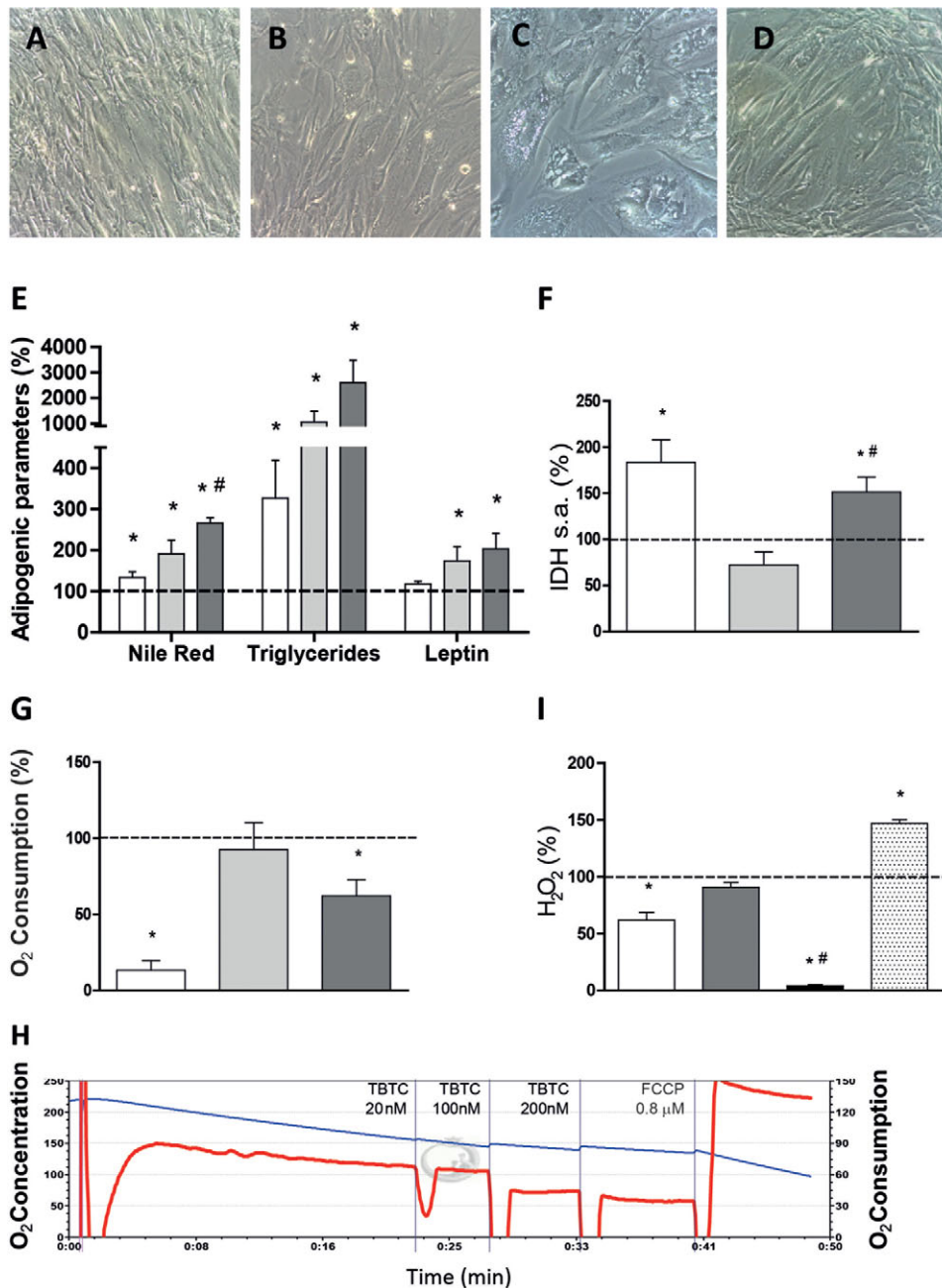


Fig. 7. Response of adipogenic and mitochondrial parameters to TBTC. White, light and dark gray bars indicate 16 nM OLI-, 20 nM TBTC- and 100 nM TBTC-treated hASCs, respectively. Dotted lines represent levels in untreated hASCs. (A-D) Representative microscopy images of untreated hASCs (A), hASCs treated with 16 nM OLI (B), hASCs treated with 20 nM TBTC (C) and hASCs treated with 100 nM TBTC (D). (E) Adipogenic variables. * $P \leq 0.0256$, # $P = 0.0221$ (vs 20 nM TBTC). (F) IDH levels. * $P \leq 0.0173$, # $P = 0.0030$ (vs 20 nM TBTC). (G) Determination of oxygen consumption just after drug addition. * $P \leq 0.0403$. (H) Oxygen consumption plot. Blue and red lines represent oxygen concentration and consumption, respectively. (I) Determination of H₂O₂ levels after drug addition. White, gray, black and dotted bars represent 16 nM OLI-, 100 nM TBTC-, 100 nM TBTC+5 mM NAC- and 10 μ M Menadione-treated hASCs, respectively. * $P \leq 0.0021$, # $P < 0.0001$ (vs 100 nM TBTC).

adipogenic differentiation of hMSCs derived from bone marrow aspirates (Hofmann et al., 2012; Zhang et al., 2013). Moreover, the mRNA levels of cytochrome oxidase subunit 3 (p.MT-CO3) and the quantity of OXPHOS supercomplexes are strikingly increased in adipocyte mitochondria compared with undifferentiated cells (Hofmann et al., 2012). Similar results have also been obtained with cells from other species (Luo et al., 2008; Ryu et al., 2013; Shi et al., 2008; Wilson-Fritch et al., 2003). Therefore, considering that diverse differentiation protocols have been used in these reports, the collective results confirm that mitochondrial biogenesis is a common phenomenon during adipocyte differentiation.

Inhibitors of mtDNA replication affect adipogenic differentiation

Antiretroviral therapy has been effective in lowering acquired immunodeficiency syndrome incidence among patients infected

with HIV. However, NRTIs used as a component of these therapies can cause serious mitochondrial toxicity because they also inhibit mtDNA polymerase- γ . It was previously shown that NRTIs might affect OXPHOS function and adipocyte differentiation and that mtDNA genetic background (haplotype) influences the propensity for lipotrophy in patients receiving NRTIs (Hendrickson et al., 2009). In the range of concentrations used in this study, AZT and ddC have been shown to decrease Oil Red staining both in mouse and human preadipocytes (Caron et al., 2004; Stankov et al., 2010, 2013, 2008; Walker et al., 2006). AZT at 1 μ M also decreased mtDNA and p.MT-CO2 levels in mouse preadipocytes (Walker et al., 2006) but, even at 6 μ M, did not have any effect on mtDNA levels or on specific activities of CIV or CS in primary human subcutaneous preadipocytes (Stankov et al., 2010). ddC at 0.2 μ M decreased mtDNA and p.MT-CO2 abundance in mouse preadipocytes (Walker et al., 2006). Even though ddC at 0.1 μ M

decreased mtDNA levels in primary human subcutaneous preadipocytes, it did not alter CIV or CS specific activities (Stankov et al., 2010). In hASCs, ddC at 0.1 μ M decreased Nile Red staining, amount of triglycerides, secreted leptin, ROS production and mtDNA levels, but did not affect the CIV/CS ratio. However, AZT at 6 μ M decreased mtDNA levels and increased the CIV/CS ratio, but did not have an effect on the other parameters.

It is remarkable that NRTIs seem to affect mtDNA and lipid levels in diverse cell types from different species and using distinct concentrations and differentiation protocols. mtDNA depletion is a result of inhibition of mtDNA polymerase- γ by NRTIs. Curiously, NRTI-mediated mtDNA depletion of mouse preadipocytes is accompanied by a decrease in p.MT-CO2 levels and MIMP (Walker et al., 2006), whereas mtDNA depletion in hASCs (here) or in primary human subcutaneous adipocytes is not followed by CIV deficiency (Stankov et al., 2010). Preserved CIV activity in adipose tissue of HIV-infected patients with lipoatrophy, despite mtDNA depletion, has been previously documented (Kim et al., 2005, 2008). Thymidine kinase 2 (TK2) deficiency in humans causes mtDNA depletion syndrome (Sun and Wang, 2014). mtDNA-depleted TK2-deficient mice show reduced fat accumulation and severe reduction in leptin mRNA and circulating levels of leptin (Villarroya et al., 2011). However, CIV activity is not lowered in WAT from TK2-deficient mice, despite a significant reduction in mtDNA-encoded transcripts and moderate mtDNA depletion (Villarroya et al., 2011). It remains possible that other OXPHOS complexes are preferably affected in this model. That the mtDNA depletion directly decreases lipid accumulation is supported by the fact that treatment of mouse 3T3-L1 cells with ethidium bromide (which depletes mtDNA) decreases the intensity of Oil Red O staining (Ryu et al., 2013).

When 0.1 μ M ddC was supplied for 10 days before the differentiation protocol, the parameters of adipogenic differentiation were no different to those of untreated cells. However, CIV specific activity and quantity, normalized by CS specific activity, were significantly increased. Almost the same relationship between differentiation and mitochondrial variables was observed when AZT 6 μ M was provided to hASCs during the differentiation protocol. Possibly, OXPHOS compensation is able to improve differentiation factors.

Inhibitors of mitochondrial translation affect adipogenic differentiation

It is known that some antibiotics that target bacterial ribosome also inhibit mitochondrial protein synthesis (Pacheu-Grau et al., 2010), but their potential effect on adipocyte differentiation has not been previously studied. We have shown here that ribosomal antibiotics CAM and LIN impair differentiation of hASCs, as evidenced by decreased intracellular triglycerides and secreted leptin. LIN also significantly decreased CIV/CS ratios and inhibited mitochondrial protein synthesis. However, Nile Red staining of hASCs was not decreased with CAM or LIN, which is similar to previous results on lipophilic staining of mouse preadipocytes treated with CAM (Vankoningsloo et al., 2006). Cellular fat stores primarily take the form of triglycerides, and there is some data indicating that Nile Red staining does not always correspond to quantitative triglyceride assays. In *Caenorhabditis elegans*, for example, the major fat stores are not normally stained by Nile Red, but the stain is found exclusively in lysosome-related organelles (O'Rourke et al., 2009; Zhang et al., 2010). It remains to be seen whether the observed discrepancy between triglycerides and lipophilic staining could be,

at least partially, a result of the nonspecificity of stained compartments in hASCs.

In our hands, LIN diminished leptin secretion but did not affect two other adipokines (adiponectin and FABP4). A different regulation for these adipokines in response to ETC inhibition has been previously reported. Thus, leptin and adiponectin expression were decreased and increased, respectively, in mouse preadipocytes treated with the respiratory complex I (CI) inhibitor capsaicin that, similarly to LIN, also decreased triglyceride levels (Hsu and Yen, 2007). Moreover, adiponectin and leptin release was increased and decreased, respectively, in human adipocytes differentiated at 10% oxygen compared with 21% (Famulla et al., 2012). The explanation could be that leptin, adiponectin and FABP4 secretion involve distinct intracellular compartments: endosomal compartments are required for adiponectin but not for leptin secretion (Xie et al., 2008), and FABP4 is actively released via a non-classical, calcium-dependent mechanism (Schlottmann et al., 2014). However, currently there is no information on how these pathways could be selectively modulated by mitochondrial activity.

Very interestingly, for 60 μ M LIN, the CIV/CS ratio was significantly lower in hASCs with mtDNA from haplogroup H10e2 (hASCs-2) than in haplogroup T2c1d1a (hASCs-1), and the same was observed with secreted leptin. We have previously found that the amount of mitochondrial translation products, the p.MT-CO1/succinate dehydrogenase complex subunit A (SDHA) ratio and the CIV/CS ratio were significantly lower after treatment with LIN in osteosarcoma 143B cybrids harboring the mtDNA m.3010A allele (Pacheu-Grau et al., 2013). This nucleotide position is located in the 16S ribosomal RNA, where LIN binds. The two hASCs types used here have the m.3010G allele, but approximately one quarter of western European individuals (mtDNA haplogroups H1 and J1) harbor the A variant. These individuals would be even more sensitive to the inhibitory effects of LIN on adipogenic differentiation. Here, the differences in CIV and secreted leptin between cells treated with different concentrations of LIN, and between hASCs-1 and hASCs-2, emphasize the importance of OXPHOS function on adipocyte differentiation that can be significantly modified by mtDNA haplotype.

Inhibitors of OXPHOS complex activities affect adipogenic differentiation

It was long thought that the effect of TBT on adipocyte differentiation was solely through genomic pathways via PPAR γ and RXR α (Kanayama et al., 2005). However, the role of TBT as PPAR γ agonist in hASCs is questionable. It has been shown that hASCs do not express PPAR γ before adipogenic differentiation. The same seems to be true in mouse mesenchymal stem cells (mMSCs) C3H10T1/2. Thus, during undifferentiated growth, PPAR γ 2 is rarely expressed. In C3H10T1/2, exposure to 100 nM TBT during undifferentiated growth increased expression of the adipogenic marker genes *FABP4* and *PPAR γ 2*, and subsequently increased triglyceride levels. However, treatment with the PPAR γ 2 agonist rosiglitazone had no significant effect on subsequent adipogenic differentiation. Moreover, silencing of *PPAR γ* had no additional impact on the regulation of cell fate markers, over that already observed with TBT. These results suggest that the TBT-induced adipogenic mechanisms act independently of PPAR γ 2 during undifferentiated growth (Biemann et al., 2014) and, in part, during the induction of differentiation in mMSCs (BMS2) (Yanik et al., 2011).

It has been shown that the proton channel of the F₁F₀ ATP synthase is a target of TBT, possibly through formation of Sn-O bonds at crucial, conserved amino acid residues (Grun, 2014). This

leads to inhibition of proton flow and reduction in intracellular ATP levels (Matsuno-Yagi and Hatefi, 1993; von Ballmoos et al., 2004). Accordingly, our results suggest that TBTC induces adipogenesis by an OXPHOS-mediated mechanism. Moreover, 6-day exposure to 25 nM TBT provoked a significant decrease in ATP levels and loss of lytic function in human natural killer cells (Dudimah et al., 2007). Inhibition of OXPHOS CV could also explain TBT-dependent isocitrate accumulation (Yamada et al., 2014), as NAD⁺ required for its oxidation would not be regenerated by an inhibited ETC. It was reported that OXPHOS CV inhibitor OLI at 8 nM induces triglyceride accumulation in 3T3-L1 cells (Vankoningsloo et al., 2005), which is similar to our results.

Published data on the potential role of inhibition of other OXPHOS complexes are somewhat contradictory. Rotenone, a CI inhibitor, decreased Oil Red O staining and adiponectin mRNA levels of adipocyte-differentiated hMSCs (Zhang et al., 2013) but induced lipid accumulation in hASCs (Kim et al., 2014). Antimycin A, a complex III (CIII) inhibitor, decreased adipogenic differentiation of 3T3-F442A mouse preadipocytes (Carriere et al., 2004) but again induced adipogenesis in hASCs (Kim et al., 2014). Additionally, it has been shown that antimycin A, as well as stigmatellin and myxothiazol (other CIII inhibitors), can induce triglycerides in 3T3-L1 cells (Vankoningsloo et al., 2006, 2005). Thus, more detailed work on different classes of ETC inhibitors are required to evaluate their adipogenic versus antiadipogenic effects on various types of cells capable of adipogenic differentiation.

Conclusions

Here, we have shown that the mitochondrial OXPHOS system is important for regulation of adipogenesis in hASCs and that its inhibition at the level of mtDNA replication (NRTIs), organelle protein synthesis (antibiotics) or function (TBTC) can either inhibit or promote adipogenesis *in vitro*. Because important OXPHOS components are mtDNA-encoded and OXPHOS capacity is affected by mtDNA haplogroup (Gomez-Duran et al., 2010, 2012), genetic variability in mtDNA could affect adipocyte differentiation and related phenotypes such as obesity (Knoll et al., 2014; Nardelli et al., 2013; Yang et al., 2011).

In the fight against infectious diseases, as well as in agricultural pest control, therapies are based on the selective toxicity of the used drug or xenobiotic against the non-desired agent. In this light, the human OXPHOS system can be seen as the unintended off-target of some drug treatments and responsible, at least in part, for adverse events associated with a large array of compounds (Wallace, 2008), including those related to adipogenic differentiation. As previously commented, mtDNA haplogroups modify the lipotrophy propensity of patients being treated with NRTIs (De Luca et al., 2012; Hendrickson et al., 2009; Hulgan et al., 2011). mtDNA haplogroups can also define cell susceptibility to inhibitors of mitochondrial protein synthesis (Pacheu-Grau et al., 2013). These observations suggest that the mtDNA genotype is a risk factor for lipotrophy in patients treated with OXPHOS xenobiotics.

If the potential side effects (such as altered adipocyte differentiation) of a particular pharmacological intervention are known, they can be monitored and possibly prevented. However, human exposure to a myriad of other OXPHOS xenobiotics that affect adipocyte differentiation is unknown and uncontrolled. Thus, as the obesogen hypothesis postulates (Grun, 2014), environmental chemical pollutants such as TBT that promote adipose-dependent weight gain might lead to obesity and metabolic syndrome.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

All reagents used were of research or cell culture quality. AZT and ddC, which affect mitochondrial function and adipogenic differentiation; CAM, LIN and OLI, which affect mitochondrial function; and TBTC, which affects adipogenic differentiation, were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

Cells, growth and differentiation conditions

StemPro[®] Human Adipose-Derived Stem Cells (#R7788-115, Invitrogen[™], Life Technologies[™]) derive from human adipose tissue collected during liposuction procedures and were cryopreserved at passage 1 from primary cultures. Each lot of hASCs originates from a single donor of human lipoaspirate tissue, and the two lots used here are named hASCs-1 and hASCs-2. hASCs were generally grown in MesenPRO RS[™] medium (Invitrogen[™], Life Technologies[™]), containing 5 mM glucose and 2% fetal bovine serum complemented with MesenPRO RS[™] growth supplement and 2 mM L-glutamine prior to use. To avoid undesired phenotypic effects, cells were grown in the absence of antibiotics (Llobet et al., 2015). The doubling times were determined using the Z2 Beckman Coulter. Initially, 2×10^4 cells per well were seeded in a six-well plate. Three replicate growth curves were performed and cells counts were performed in duplicate at each time point (0, 24, 48, 72 and 96 h). For the hypoxia treatment, cultures were transferred to an H35 Hypoxystation (Don Whitley Scientific), where the incubation proceeded in atmosphere containing 5% CO₂ and 3% O₂ balanced with nitrogen.

To induce adipogenic differentiation, confluent hASCs were incubated for 21 days with StemPro[®] Adipogenesis Differentiation Kit (Invitrogen[™]). Because this differentiation medium contains 25 mM glucose, the glucose concentration of the control culture medium (MesenPRO RS[™]) for undifferentiated cells was also raised to 25 mM in experiments where undifferentiated and differentiated cells were compared.

For osteogenic differentiation, hASCs were grown to 50% of confluence and then incubated for 14 days with StemPro[®] Osteogenesis Differentiation Media (Invitrogen[™]). For assessment of calcium deposition, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS), fixed for 30 min in 4% paraformaldehyde at room temperature and washed with distilled water. Samples were incubated for 5 min at room temperature in 30 mM Alizarin Red in distilled water, washed and visualized using an inverted microscope.

For chondrogenic differentiation, 80% confluent hASCs were harvested and micromass cultures were generated by seeding the center of 96-well plate wells with 5 μ l droplets from a cell suspension containing 1.6×10^7 cells/ml. After 2 h, warmed StemPro[®] Chondrogenesis Differentiation Medium (Invitrogen[™]) was added and the micromass cultures were incubated for 14 days. The differentiated cell aggregates were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min at room temperature and stained with 1% Toluidine Blue in 70% ethanol, which detects glycoproteins in the extracellular matrix. An inverted microscope was used for imaging.

Metabolic markers

Glucose concentration was measured by an enzymatic colorimetric GOD-POD method with the Glucose Liquid reagents (Química Clínica Aplicada S.A., Tarragona, Spain) following a previously described protocol (Trinder, 1969). Briefly, the cells under study were seeded, supernatant samples were collected three times per day (6 h intervals) and absorbance was measured at 510 nm using the NovoStar MBG Labtech microplate instrument.

Lipid accumulation was assessed by Oil Red O staining. Briefly, cells were washed with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min at room temperature and incubated for 30 min at 37°C in freshly diluted and filtered 16 μ M Oil Red O solution in isopropanol. Alternatively, intracellular lipids were stained with the hydrophilic stain Nile Red that, when partitioned in a hydrophobic environment, becomes fluorescent. For quantitative determination of Nile Red fluorescence, the NovoStar MBG Labtech microplate instrument was used (Ex: 485 nm/Em: 572 nm). Images were acquired either with a DMIL inverted microscope (Leica) or FLoid Cell Imaging Station (Life Technologies[™]).

Adipogenesis Detection Kit (Abcam) was used to quantify triglyceride accumulation in cells according to the manufacturer's instructions.

In this assay, triglycerides are solubilized and hydrolyzed to glycerol, which is subsequently oxidized to convert the probe to generate color ($\lambda_{\text{max}}=570$ nm). A NovoStar MBG Labtech microplate instrument was used for measurements. For quantitative determination of adiponectin, FABP4 and leptin in cell culture supernatants, Human Adiponectin ELISA kit (Millipore), FABP4 Human ELISA kit (Symansis) and Leptin Human ELISA Kit (Abcam) were used. Media were centrifuged for 5 min at 1400 rpm (Beckman Coulter Allegra X-22, SX4250 rotor) and supernatants diluted for use in the quantification reaction. Concentrations were determined according to the manufacturer's instructions.

For immunocytochemistry, the cultured cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature and permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 10 min. After blocking with 0.1% bovine serum albumin, the washed cells were incubated for 1 h at room temperature with a primary antibody against FABP4 (Invitrogen). Subsequently, the cells were incubated with fluorescence-labeled secondary Alexa Fluor[®] 594 (Molecular Probes) at room temperature for 30 min, protected from light. The cells were further incubated with 1 μM 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for nuclear staining. Between incubations, samples were washed with PBS containing 0.05% Tween.

Electron microscopy

For ultrastructural analysis, hASCs were seeded in Permax[®] chamberslides (NUNC), fixed with 2.5% glutaraldehyde for 2 h at 4°C and maintained in phosphate buffer supplemented with 0.05% sodium azide. Post-fixation was carried out using 1% OsO₄ for 2 h. The cells were dehydrated in a graded series of ethanol up to absolute. The specimens were then passed through different mixtures of ethanol and araldite (3:1, 1:1, 1:3) and embedded in pure araldite. After 3 days polymerization at 70°C, ultrathin sections were cut and stained following a previously published protocol (Reynolds, 1963). The sections were examined with a JEOL 1010 transmission electron microscope using a Gatan Bioscan camera and the Digital Micrograph software.

Analysis of mitochondrial function

To measure mitochondrial content, mitochondria were labeled using the mitochondria-specific dye MitoTracker[®] Red (Molecular Probes[™]), according to the manufacturer's protocol. The final dye concentration was 100 nM and the incubation time was 30 min at 37°C prior to visualization. Fluorescent microscopy was performed on live cells using a FLOID Cell Imaging Station (Life Technologies[™]). MIMP was measured in triplicate in three independent experiments using the Mito-ID Membrane Potential Cytotoxicity kit (ENZO[®]) following the manufacturer's instructions. MIMS, based on the quantity of cardiolipin, was measured three times in three independent experiments using nonylacridine-orange (Sigma) (Petit et al., 1992). H₂O₂ production was measured in triplicate using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (Sigma) as described previously (Carter et al., 1994), with minor modifications. A Beckman Coulter Cytomics FC500 cytometer was used for measurement of intracellular fluorescence, and Weasel software was used for flow cytometry data analysis.

Oxygen consumption was analyzed using the high-resolution oxygraph OROBOROS[®] (Oroboros Instrument, Innsbruck, Austria). Exponentially growing cells were collected by trypsinization, then washed, counted and resuspended at 1 × 10⁶ cells/ml in DMEM. Endogenous, leaking (with OLI added at 16 nM) and uncoupled (with FCCP added at 0.8 μM) respiration analyses were performed. To correct for oxygen consumption not due to the ETC, inhibition of mitochondrial respiration by KCN was performed. Each condition was analyzed three times. Respiration was measured at 37°C, with chamber volumes set at 2 ml. The software DatLab (Oroboros Instrument, Innsbruck, Austria) was used for data acquisition at 1 s time intervals, as well as for data analysis (Gnaiger et al., 1995).

The enzymatic activities of OXPHOS CII and CS and their protein levels were assayed following previously described protocols (Faloona and Srere, 1969; King, 1966; Tzagoloff et al., 1967). CIV activity and levels were determined using the Complex IV Human Specific Activity Microplate Assay Kit (Mitosciences, Abcam[®]) according to the manufacturer's instructions. All enzyme determinations were performed in triplicate in at

least three independent experiments using a NovoStar MBG Labtech microplate instrument. IDH activity was determined using the commercial Isocitrate Dehydrogenase Colorimetric Assay Kit (Abcam[®]), according to the manufacturer's instructions. Briefly, 1 × 10⁶ hASCs grown in DMEM were lysed in 200 μl of provided assay buffer. The lysate was centrifuged at 13,000 g for 10 min and the cleared supernatant used for the assay. NAD⁺ was used as substrate for the NAD-IDH assay. A NovoStar MBG Labtech microplate instrument was used for the measurements.

Mitochondrial protein synthesis was analyzed as described previously (Chomyn, 1996), with minor modifications. Electrophoresis was performed with a Protean II xi system (Bio-Rad). As a loading control, we dyed the gel for 15 min with fixing solution (30% methanol, 10% acetic acid) plus 0.025% Coomassie Blue (Brilliant Blue R, Sigma). The gel was washed several times with 50% methanol, 10% acetic acid solution and left overnight in fixing solution. Finally, the gel was treated for 20 min with Amplify solution (Amersham), dried and used for autoradiography. The band intensities from appropriate exposures of the fluorograms from three independent gels were quantified by densitometric analysis with the Gelpro analyzer v4.0. Three bands, corresponding to the upper, middle and lower parts of the gel, were selected for quantification.

Genetics characterization and gene expression analysis

For molecular cytogenetic analysis, cells were exposed to colchicine (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 4 h at 37°C and harvested routinely. Metaphases were prepared following a conventional cytogenetic protocol for cells fixed in methanol:acetic acid (3:1). Approximately 20 metaphase cells were captured and analyzed for each cell line. The genetic fingerprints of the cells were performed with the AmpFLSTR[®] Identifier[®] PCR Amplification Kit (Life Technologies). The mtDNA sequences were obtained using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and an ABI Prism 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). To locate mutations, the revised Cambridge Reference Sequence (rCRS) was used (GenBank NC_012920) (Andrews et al., 1999).

The mtDNA content was measured by the real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR) method using an Applied Biosystems StepOne[™] Real-Time PCR System Thermal Cycling Block, as described elsewhere (Marcello et al., 2005). The mtDNA levels were determined in triplicate in three independent experiments.

To assess mRNA levels, total RNA was isolated from exponentially growing cells using a NucleoSpin[®] RNA II kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's protocol. Total RNA (1 μg) was reversed-transcribed with the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche), using the manufacturer's conditions. The levels of *CD90/THY1* and *CD105/ENG*, *FABP4*, *PGC1 α* , *PPAR γ* , *VEGF*, *PFKL* and *SOD2* mRNAs and cytochrome oxidase subunit 1 (p.MT-CO1), 12S ribosomal RNA and NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 6 (p.MT-ND6) mitochondrial RNA were determined in triplicate in three independent experiments by RT-qPCR using the One-Step Real-Time system (Applied Biosystems). The expression levels were normalized using the 18S ribosomal RNA. The ΔCt method was used to calculate fold expression. StepOne software version 2.0 (Applied Biosystems) was used for data analysis.

Statistics

The statistical package StatView 6.0 was used to perform all the statistics. Data for mean, standard deviation and number of independent experiments or replicates are presented. The Kolmogorov-Smirnov test was used to check the normal distribution. The unpaired two-tailed *t*-test was used to compare parameters. *P* values lower than 0.05 were considered statistically significant.

Acknowledgements

We would like to thank Dr Miguel Martín and Dr Javier García-Castro from Laboratorio de Reprogramación Metabólica y Cáncer of GENYO from Universidad de Granada (Granada, Spain) and Unidad de Biotecnología Celular of Instituto de Investigación en Enfermedades Raras from the Instituto de Investigación Carlos III (Majadahonda, Madrid, Spain), respectively, for their initial support. We would like also to thank Santiago Morales for his assistance with the figures. The authors would like to acknowledge the use of Servicio General de Apoyo a la Investigación-SAI, Universidad de Zaragoza.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

L.L., J.M.T., E.R.-P. and E.L.-G. conceived and designed the experiments. L.L. and J.M.T. executed experiments. L.L., J.M.T., E.R.-P. and E.L.-G. analyzed and interpreted the data. L.L., J.M.T., J.M., E.R.-P. and E.L.-G. contributed to manuscript editing by thoroughly revising the manuscript and providing critical and intellectual suggestions. J.M. and E.R.-P. wrote the manuscript.

Funding

This work was supported by grants from the Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (PIPAMER 09-01 and 10-010); the Instituto de Salud Carlos III (FIS-PI14/00005 and PI14/00070); Departamento de Ciencia, Tecnología y Universidad del Gobierno de Aragón y Fondo Social Europeo (Grupos Consolidados B33) and FEDER Funding Program from the European Union. CIBERER is an initiative of the ISCIII.

Supplementary information

Supplementary information available online at <http://dmm.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/dmm.021774/-DC1>

References

- Abdollahi, H., Harris, L. J., Zhang, P., McIlhenny, S., Srinivas, V., Tulenko, T. and DiMuzio, P. J. (2011). The role of hypoxia in stem cell differentiation and therapeutics. *J. Surg. Res.* **165**, 112-117.
- Andrews, R. M., Kubacka, I., Chinnery, P. F., Lightowlers, R. N., Turnbull, D. M. and Howell, N. (1999). Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat. Genet.* **23**, 147.
- Balbi, H. J. (2004). Chloramphenicol: a review. *Pediatr. Rev.* **25**, 284-288.
- Biemann, R., Fischer, B., Blüher, M. and Navarrete Santos, A. (2014). Tributyltin affects adipogenic cell fate commitment in mesenchymal stem cells by a PPAR γ independent mechanism. *Chem. Biol. Interact.* **214**, 1-9.
- Caron, M., Auclair, M., Lagathu, C., Lombes, A., Walker, U. A., Kornprobst, M. and Capeau, J. (2004). The HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitors stavudine and zidovudine alter adipocyte functions in vitro. *AIDS* **18**, 2127-2136.
- Carriere, A., Fernandez, Y., Rigoulet, M., Penicaud, L. and Casteilla, L. (2003). Inhibition of preadipocyte proliferation by mitochondrial reactive oxygen species. *FEBS Lett.* **550**, 163-167.
- Carriere, A., Carmona, M.-C., Fernandez, Y., Rigoulet, M., Wenger, R. H., Penicaud, L. and Casteilla, L. (2004). Mitochondrial reactive oxygen species control the transcription factor CHOP-10/GADD153 and adipocyte differentiation: a mechanism for hypoxia-dependent effect. *J. Biol. Chem.* **279**, 40462-40469.
- Carter, W. O., Narayanan, P. K. and Robinson, J. P. (1994). Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. *J. Leukoc. Biol.* **55**, 253-258.
- Choi, J. R., Pingguan-Murphy, B., Wan Abas, W. A. B., Noor Azmi, M. A., Omar, S. Z., Chua, K. H. and Wan Safwani, W. K. (2014). Impact of low oxygen tension on stemness, proliferation and differentiation potential of human adipose-derived stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **448**, 218-224.
- Chomyn, A. (1996). In vivo labeling and analysis of human mitochondrial translation products. *Methods Enzymol.* **264**, 197-211.
- Corsini, E., Viviani, B., Zancanella, O., Lucchi, L., Visioli, F., Serrero, G., Bartesaghi, S., Galli, C. L. and Marinovich, M. (2003). Induction of adipose differentiation related protein and neutral lipid droplet accumulation in keratinocytes by skin irritants. *J. Invest. Dermatol.* **121**, 337-344.
- De Luca, A., Nasi, M., Di Giambenedetto, S., Cozzi-Lepri, A., Pinti, M., Marzocchetti, A., Mussini, C., Fabbiani, M., Bracciale, L., Cauda, R. et al. (2012). Mitochondrial DNA haplogroups and incidence of lipodystrophy in HIV-infected patients on long-term antiretroviral therapy. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **59**, 113-120.
- Degli Esposti, M. (1998). Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview. *Biochim. Biophys. Acta* **1364**, 222-235.
- Dicker, A., Le Blanc, K., Astrom, G., van Harmelen, V., Gotherstrom, C., Blomqvist, L., Arner, P. and Ryden, M. (2005). Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Exp. Cell Res.* **308**, 283-290.
- Dryden, M. S. (2011). Linezolid pharmacokinetics and pharmacodynamics in clinical treatment. *J. Antimicrob. Chemother.* **66** Suppl. 4, iv7-iv15.
- Dudimah, F. D., Odman-Ghazi, S. O., Hatcher, F. and Whalen, M. M. (2007). Effect of tributyltin (TBT) on ATP levels in human natural killer (NK) cells: relationship to TBT-induced decreases in NK function. *J. Appl. Toxicol.* **27**, 86-94.
- Faloon, G. R. and Srere, P. A. (1969). Escherichia coli citrate synthase. Purification and the effect of potassium on some properties. *Biochemistry* **8**, 4497-4503.
- Famulla, S., Schlich, R., Sell, H. and Eckel, J. (2012). Differentiation of human adipocytes at physiological oxygen levels results in increased adiponectin secretion and isoproterenol-stimulated lipolysis. *Adipocyte* **1**, 132-181.
- Gesta, S., Bezy, O., Mori, M. A., Macotela, Y., Lee, K. Y. and Kahn, C. R. (2011). Mesodermal developmental gene Tbx15 impairs adipocyte differentiation and mitochondrial respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 2771-2776.
- Gir, P., Oni, G., Brown, S. A., Mojallal, A. and Rohrich, R. J. (2012). Human adipose stem cells: current clinical applications. *Plast. Reconstr. Surg.* **129**, 1277-1290.
- Gnaiger, E., Steinelechner-Maran, R., Mendez, G., Eberl, T. and Margreiter, R. (1995). Control of mitochondrial and cellular respiration by oxygen. *J. Bioenerg. Biomembr.* **27**, 583-596.
- Gomez-Duran, A., Pacheu-Grau, D., Lopez-Gallardo, E., Diez-Sanchez, C., Montoya, J., Lopez-Perez, M. J. and Ruiz-Pesini, E. (2010). Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 3343-3353.
- Gomez-Duran, A., Pacheu-Grau, D., Martinez-Romero, I., Lopez-Gallardo, E., Lopez-Perez, M. J., Montoya, J. and Ruiz-Pesini, E. (2012). Oxidative phosphorylation differences between mitochondrial DNA haplogroups modify the risk of Leber's hereditary optic neuropathy. *Biochim. Biophys. Acta* **1822**, 1216-1222.
- Green, H. and Kehinde, O. (1975). An established preadipose cell line and its differentiation in culture II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* **5**, 19-27.
- Grun, F. (2014). The obesogen tributyltin. *Vitam. Horm.* **94**, 277-325.
- Gustavson, L. E., Fukuda, E. K., Rubio, F. A. and Dunton, A. W. (1990). A pilot study of the bioavailability and pharmacokinetics of 2',3'-dideoxycytidine in patients with AIDS or AIDS-related complex. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **3**, 28-31.
- Hendrickson, S. L., Kingsley, L. A., Ruiz-Pesini, E., Poole, J. C., Jacobson, L. P., Palella, F. J., Bream, J. H., Wallace, D. C. and O'Brien, S. J. (2009). Mitochondrial DNA haplogroups influence lipodystrophy after highly active antiretroviral therapy. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **51**, 111-116.
- Higuchi, M., Disting, G. J., Peshavariya, H., Jiang, F., Hsiao, S. T.-F., Chan, E. C. and Liu, G.-S. (2013). Differentiation of human adipose-derived stem cells into fat involves reactive oxygen species and Forkhead box O1 mediated upregulation of antioxidant enzymes. *Stem Cells Dev.* **22**, 878-888.
- Hofmann, A. D., Beyer, M., Krause-Buchholz, U., Wobus, M., Bornhauser, M. and Rodel, G. (2012). OXPHOS supercomplexes as a hallmark of the mitochondrial phenotype of adipogenic differentiated human MSCs. *PLoS ONE* **7**, e35160.
- Hsu, C.-L. and Yen, G.-C. (2007). Effects of capsaicin on induction of apoptosis and inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 1730-1736.
- Hulgan, T., Haubrich, R., Riddler, S. A., Tebas, P., Ritchie, M. D., McCormsey, G. A., Haas, D. W. and Canter, J. A. (2011). European mitochondrial DNA haplogroups and metabolic changes during antiretroviral therapy in AIDS Clinical Trials Group Study A5142. *AIDS* **25**, 37-47.
- Kanayama, T., Kobayashi, N., Mamiya, S., Nakanishi, T. and Nishikawa, J.-I. (2005). Organotin compounds promote adipocyte differentiation as agonists of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma/retinoid X receptor pathway. *Mol. Pharmacol.* **67**, 766-774.
- Kannan, K., Senthilkumar, K. and Giesy, J. P. (1999). Occurrence of butyltin compounds in human blood. *Environ. Sci. Technol.* **33**, 1776-1779.
- Keuper, M., Jastroch, M., Yi, C.-X., Fischer-Posovszky, P., Wabitsch, M., Tschop, M. H. and Hofmann, S. M. (2014). Spare mitochondrial respiratory capacity permits human adipocytes to maintain ATP homeostasis under hypoglycemic conditions. *FASEB J.* **28**, 761-770.
- Kim, M. J., Jardel, C., Barthelemy, C., Jan, V., Bastard, J. P., Chapin, S., Houry, S., Levan, P., Capeau, J. and Lombe, A. (2005). Preserved cytochrome c oxidase activity despite mitochondrial DNA depletion in adipose tissue of HIV-infected patients with lipodystrophy. *Antivir. Ther.* **10**, L8.
- Kim, M. J., Jardel, C., Barthelemy, C., Jan, V., Bastard, J. P., Fillaut-Chapin, S., Houry, S., Capeau, J. and Lombes, A. (2008). Mitochondrial DNA content, an inaccurate biomarker of mitochondrial alteration in human immunodeficiency virus-related lipodystrophy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 1670-1676.
- Kim, J. H., Kim, S.-H., Song, S. Y., Kim, W.-S., Song, S. U., Yi, T., Jeon, M.-S., Chung, H.-M., Xia, Y. and Sung, J.-H. (2014). Hypoxia induces adipocyte differentiation of adipose-derived stem cells by triggering reactive oxygen species generation. *Cell Biol. Int.* **38**, 32-40.
- King, T. E. (1966). Reconstitution of the respiratory chain. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **28**, 155-236.
- Kita, T., Nishida, H., Shibata, H., Niimi, S., Higuti, T. and Arakaki, N. (2009). Possible role of mitochondrial remodelling on cellular triacylglycerol accumulation. *J. Biochem.* **146**, 787-796.
- Knoll, N., Jarick, I., Volckmar, A.-L., Klingenspor, M., Illig, T., Grallert, H., Gieger, C., Wichmann, H.-E., Peters, A., Wiegand, S. et al. (2014). Mitochondrial DNA variants in obesity. *PLoS ONE* **9**, e94882.
- Kotake, Y. (2012). Molecular mechanisms of environmental organotin toxicity in mammals. *Biol. Pharm. Bull.* **35**, 1876-1880.
- Laskin, O. L., de Miranda, P. and Blum, M. R. (1989). Azidothymidine steady-state pharmacokinetics in patients with AIDS and AIDS-related complex. *J. Infect. Dis.* **159**, 745-747.
- Lee, E. Y., Xia, Y., Kim, W.-S., Kim, M. H., Kim, T. H., Kim, K. J., Park, B.-S. and Sung, J.-H. (2009). Hypoxia-enhanced wound-healing function of adipose-

- derived stem cells: increase in stem cell proliferation and up-regulation of VEGF and bFGF. *Wound Repair. Regen.* **17**, 540-547.
- Llobet, L., Montoya, J., López-Gallardo, E. and Ruiz-Pesini, E.** (2015). Side effects of culture media antibiotics on cell differentiation. *Tissue Eng. Part C Methods* [Epub ahead of print]. doi:10.1089/ten.tec.2015.0062.
- Lo, T., Ho, J. H., Yang, M.-H. and Lee, O. K.** (2011). Glucose reduction prevents replicative senescence and increases mitochondrial respiration in human mesenchymal stem cells. *Cell Transplant.* **20**, 813-825.
- Luo, G.-F., Yu, T.-Y., Wen, X.-H., Li, Y. and Yang, G.-S.** (2008). Alteration of mitochondrial oxidative capacity during porcine preadipocyte differentiation and in response to leptin. *Mol. Cell. Biochem.* **307**, 83-91.
- Marcuello, A., Gonzalez-Alonso, J., Calbet, J. A. L., Damsgaard, R., Lopez-Perez, M. J. and Diez-Sanchez, C.** (2005). Skeletal muscle mitochondrial DNA content in exercising humans. *J. Appl. Physiol.* **99**, 1372-1377.
- Matsuno-Yagi, A. and Hatefi, Y.** (1993). Studies on the mechanism of oxidative phosphorylation. ATP synthesis by submitochondrial particles inhibited at F0 by venturicidin and organotin compounds. *J. Biol. Chem.* **268**, 6168-6173.
- Nadanaciva, S. and Will, Y.** (2011). New insights in drug-induced mitochondrial toxicity. *Curr. Pharm. Des.* **17**, 2100-2112.
- Nardelli, C., Labruna, G., Liguori, R., Mazzaccara, C., Ferrigno, M., Capobianco, V., Pezzuti, M., Castaldo, G., Farinaro, E., Contaldo, F. et al.** (2013). Haplogroup T is an obesity risk factor: mitochondrial DNA haplotyping in a morbid obese population from southern Italy. *Biomed. Res. Int.* **2013**, 631082.
- Newton, B. W., Cologna, S. M., Moya, C., Russell, D. H., Russell, W. K. and Jayaraman, A.** (2011). Proteomic analysis of 3T3-L1 adipocyte mitochondria during differentiation and enlargement. *J. Proteome Res.* **10**, 4692-4702.
- O'Rourke, E. J., Soukas, A. A., Carr, C. E. and Ruvkun, G.** (2009). C. elegans major fats are stored in vesicles distinct from lysosome-related organelles. *Cell Metab.* **10**, 430-435.
- Pacheu-Grau, D., Gomez-Duran, A., Lopez-Perez, M. J., Montoya, J. and Ruiz-Pesini, E.** (2010). Mitochondrial pharmacogenomics: barcode for antibiotic therapy. *Drug Discov. Today* **15**, 33-39.
- Pacheu-Grau, D., Gomez-Duran, A., Iglesias, E., Lopez-Gallardo, E., Montoya, J. and Ruiz-Pesini, E.** (2013). Mitochondrial antibiograms in personalized medicine. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 1132-1139.
- Petit, J.-M., Maftah, A., Ratinaud, M.-H. and Julien, R.** (1992). 10N-nonyl acridine orange interacts with cardiolipin and allows the quantification of this phospholipid in isolated mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **209**, 267-273.
- Reitzer, L. J., Wice, B. M. and Kennell, D.** (1979). Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **254**, 2669-2676.
- Reynolds, E. S.** (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **17**, 208-212.
- Ryu, M. J., Kim, S. J., Choi, M. J., Kim, Y. K., Lee, M. H., Lee, S. E., Chung, H. K., Jung, S. B., Kim, H.-J., Kim, K. S. et al.** (2013). Mitochondrial oxidative phosphorylation reserve is required for hormone- and PPARgamma agonist-induced adipogenesis. *Mol. Cells* **35**, 134-141.
- Schlottmann, I., Ehrhart-Bornstein, M., Wabitsch, M., Bornstein, S. R. and Lamounier-Zepter, V.** (2014). Calcium-dependent release of adipocyte fatty acid binding protein from human adipocytes. *Int. J. Obes.* **38**, 1221-1227.
- Shi, X., Burkart, A., Nicoloso, S. M., Czech, M. P., Straubhaar, J. and Corvera, S.** (2008). Paradoxical effect of mitochondrial respiratory chain impairment on insulin signaling and glucose transport in adipose cells. *J. Biol. Chem.* **283**, 30658-30667.
- Spalding, K. L., Arner, E., Westermark, P. O., Bernard, S., Buchholz, B. A., Bergmann, O., Blomqvist, L., Hoffstedt, J., Naslund, E., Britton, T. et al.** (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* **453**, 783-787.
- Stankov, M. V., Schmidt, R. E., Behrens, G. M. N. and German Competence Network HIV/AIDS.** (2008). Zidovudine impairs adipogenic differentiation through inhibition of clonal expansion. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 2882-2889.
- Stankov, M. V., Lucke, T., Das, A. M., Schmidt, R. E. and Behrens, G. M. N.** (2010). Mitochondrial DNA depletion and respiratory chain activity in primary human subcutaneous adipocytes treated with nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 280-287.
- Stankov, M. V., Panayotova-Dimitrova, D., Leverkus, M., Schmidt, R. E. and Behrens, G. M. N.** (2013). Thymidine analogues suppress autophagy and adipogenesis in cultured adipocytes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 543-551.
- Sun, R. and Wang, L.** (2014). Thymidine kinase 2 enzyme kinetics elucidate the mechanism of thymidine-induced mitochondrial DNA depletion. *Biochemistry* **53**, 6142-6150.
- Tormos, K. V., Anso, E., Hamanaka, R. B., Eisenbart, J., Joseph, J., Kalyanaram, B. and Chandel, N. S.** (2011). Mitochondrial complex III ROS regulate adipocyte differentiation. *Cell Metab.* **14**, 537-544.
- Trinder, P.** (1969). Determination of blood glucose using 4-amino phenazone as oxygen acceptor. *J. Clin. Pathol.* **22**, 246.
- Tzagoloff, A., MacLennan, D. H., McConnell, D. G. and Green, D. E.** (1967). Studies on the electron transfer system. 68. Formation of membranes as the basis of the reconstitution of the mitochondrial electron transfer system. *J. Biol. Chem.* **242**, 2051-2061.
- van Oven, M. and Kayser, M.** (2009). Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum. Mutat.* **30**, E386-E394.
- Vankoningsloo, S., Piens, M., Lecocq, C., Gilson, A., De Pauw, A., Renard, P., Demazy, C., Houbion, A., Raes, M. and Arnould, T.** (2005). Mitochondrial dysfunction induces triglyceride accumulation in 3T3-L1 cells: role of fatty acid beta-oxidation and glucose. *J. Lipid Res.* **46**, 1133-1149.
- Vankoningsloo, S., De Pauw, A., Houbion, A., Tejerina, S., Demazy, C., de Longueville, F., Bertholet, V., Renard, P., Remacle, J., Holvoet, P. et al.** (2006). CREB activation induced by mitochondrial dysfunction triggers triglyceride accumulation in 3T3-L1 preadipocytes. *J. Cell Sci.* **119**, 1266-1282.
- Villarroya, J., Dorado, B., Vila, M. R., Garcia-Arumi, E., Domingo, P., Giral, M., Hirano, M. and Villarroya, F.** (2011). Thymidine kinase 2 deficiency-induced mitochondrial DNA depletion causes abnormal development of adipose tissues and adipokine levels in mice. *PLoS ONE* **6**, e29691.
- von Ballmoos, C., Brunner, J. and Dimroth, P.** (2004). The ion channel of F-ATP synthase is the target of toxic organotin compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 11239-11244.
- von Heimburg, D., Hemmrich, K., Zachariah, S., Staiger, H. and Pallua, N.** (2005). Oxygen consumption in undifferentiated versus differentiated adipogenic mesenchymal precursor cells. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **146**, 107-116.
- Walker, U. A., Auclair, M., Lebrecht, D., Kornprobst, M., Capeau, J. and Caron, M.** (2006). Uridine abrogates the adverse effects of antiretroviral pyrimidine analogues on adipose cell functions. *Antivir. Ther.* **11**, 25-34.
- Wallace, K. B.** (2008). Mitochondrial off targets of drug therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* **29**, 361-366.
- Wang, D. W., Farmor, B., Gimble, J. M., Awad, H. A. and Guilak, F.** (2005). Influence of oxygen on the proliferation and metabolism of adipose derived adult stem cells. *J. Cell Physiol.* **204**, 184-191.
- Weber, K., Ridderskamp, D., Alfert, M., Hoyer, S. and Wiesner, R. J.** (2002). Cultivation in glucose-deprived medium stimulates mitochondrial biogenesis and oxidative metabolism in HepG2 hepatoma cells. *Biol. Chem.* **383**, 283-290.
- Whalen, M. M., Loganathan, B. G. and Kannan, K.** (1999). Immunotoxicity of environmentally relevant concentrations of butyltins on human natural killer cells in vitro. *Environ. Res.* **81**, 108-116.
- Wilson-Fritch, L., Burkart, A., Bell, G., Mendelson, K., Leszyk, J., Nicolero, S., Czech, M. and Corvera, S.** (2003). Mitochondrial biogenesis and remodeling during adipogenesis and in response to the insulin sensitizer rosiglitazone. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 1085-1094.
- Xie, L., O'Reilly, C. P., Chapes, S. K. and Mora, S.** (2008). Adiponectin and leptin are secreted through distinct trafficking pathways in adipocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **1782**, 99-108.
- Yamada, S., Kotake, Y., Demizu, Y., Kurihara, M., Sekino, Y. and Kanda, Y.** (2014). NAD-dependent isocitrate dehydrogenase as a novel target of tributyltin in human embryonic carcinoma cells. *Sci. Rep.* **4**, 5952.
- Yang, T.-L., Guo, Y., Shen, H., Lei, S.-F., Liu, Y.-J., Li, J., Liu, Y.-Z., Yu, N., Chen, J., Xu, T. et al.** (2011). Genetic association study of common mitochondrial variants on body fat mass. *PLoS ONE* **6**, e21595.
- Yanik, S. C., Baker, A. H., Mann, K. K. and Schlezinger, J. J.** (2011). Organotins are potent activators of PPARgamma and adipocyte differentiation in bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells. *Toxicol. Sci.* **122**, 476-488.
- Zhang, S. O., Trimble, R., Guo, F. and Mak, H. Y.** (2010). Lipid droplets as ubiquitous fat storage organelles in C. elegans. *BMC Cell Biol.* **11**, 96.
- Zhang, Y., Marsboom, G., Toth, P. T. and Rehman, J.** (2013). Mitochondrial respiration regulates adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *PLoS ONE* **8**, e77077.

METHODS ARTICLE

Side Effects of Culture Media Antibiotics on Cell Differentiation

Laura Llobet, BSc,¹⁻³ Julio Montoya, PhD,¹⁻³ Ester López-Gallardo, PhD,^{1-3,*} and Eduardo Ruiz-Pesini, PhD^{1-4,*}

Besides the advance in scientific knowledge and the production of different compounds, cell culture can now be used to obtain cells for regenerative medicine. To avoid microbial contamination, antibiotics were usually incorporated into culture media. However, these compounds affect cell biochemistry and may modify the differentiation potential of cultured cells. To check this possibility, we grew human adipose tissue-derived stem cells and differentiated them to adipocyte with or without antibiotics commonly used in these culture protocols, such as a penicillin–streptomycin–amphotericin mix or gentamicin. We show that these antibiotics affect cell differentiation. Therefore, antibiotics should not be used in cell culture because aseptic techniques make these compounds unnecessary.

Introduction

THE PROTOCOLS FOR cell differentiation frequently require long-lasting cultures, which increase the risk of microbial contamination. Antibiotics were introduced into culture media to reduce the frequency of contamination. An antibiotic mix commonly used in cell culture contains 100 U/mL penicillin, a β -lactam that inhibits bacterial cell wall synthesis; 100 μ g/mL streptomycin, an aminoglycoside that inhibits bacterial protein synthesis; and sometimes, 0.25 μ g/mL amphotericin B, a macrolide polyene that causes disintegration of the fungal lipid membranes.^{1,2} The aminoglycoside gentamicin is also used in cell culture protocols.^{3,4} Thus, gentamicin 5 μ g/mL is recommended to prepare the complete adipogenic differentiation medium for human adipose tissue-derived stem cells (hASCs) (STEMPRO[®] human adipose-derived stem cells; Invitrogen).

Despite their effectiveness to avoid bacterial and fungal growth, antibiotics can have a number of significant disadvantages. One of them is a potential influence on cultured cell biochemistry. We accomplished a very extensive literature review and, surprisingly, only found a very small number of reports on this topic, and none of them in human cells. Thus, in rat primary hepatocyte cultures, penicillin 360 μ M (\sim 210 U/mL)–streptomycin 175 μ M (250 μ g/mL) inhibited protein synthesis.⁵ In primary adipoblasts from young obese Zucker rats, the penicillin 1 mg/mL (\sim 1785 U/mL)–streptomycin 33 μ g/mL mix modified the heparin-

releasable lipoprotein lipase activity.⁶ In mouse B16/F10 melanoma cells, penicillin 100 U/mL–streptomycin 100 μ g/mL causes a moderate stimulation in dopa oxidase and tyrosine hydroxylase activities, but a slight inactivation in the dopachrome tautomerase activity.⁷ The absence of studies on this issue maybe is the cause for the unawareness about the effect of antibiotics used in cell culture on many different aspects of cell biochemistry.

Since the influence of these antibiotics on cell differentiation, at concentrations found in cell culture, has not been usually analyzed, we have studied their effect on adipocyte differentiation of hASCs.

Materials and Methods

Biological samples, growth conditions, and cell differentiation

STEMPRO human adipose-derived stem cells (hASCs) (#R7788-115; InvitrogenTM, Life TechnologiesTM) are isolated from human adipose tissue collected during liposuction procedures and cryopreserved from primary cultures. Before cryopreservation, the hASCs are expanded for one passage in the MesenPRO RSTM Medium. Each lot of hASCs originates from a single donor of human lipoaspirate tissue.

Cells were grown, without antibiotics, in the MesenPRO RS Medium containing glucose (5 mM) and fetal bovine serum (FBS 2%) complemented with the MesenPRO RS

¹Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular; ²Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón; ³CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER); and ⁴Fundación ARAID, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain.

*These authors have contributed equally to this article.

Growth Supplement and L-glutamine 2 mM before use. To induce adipogenic differentiation, confluent hASCs were incubated for 21 days with the STEMPRO[®] Adipogenesis Differentiation Kit (Invitrogen) without antibiotics; with penicillin 100 U/mL–streptomycin 100 µg/mL–amphotericin B 0.25 µg/mL (#15240-062; Life Technologies) or gentamicin 5 µg/mL (#15710-064; Life Technologies). When cells were grown with an antioxidant, N-acetylcysteine (NAC) 5 mM was used in the differentiation medium.

Determination of adipocyte markers

Intracellular droplets of lipids were stained with the hydrophilic stain Nile Red, which becomes fluorescent when partitioned in a hydrophobic environment. For quantitative determination, a NovoStar BMG Labtech microplate instrument (Ex: 485 nm/Em: 572 nm) was used. This determination was replicated, at least, six times.

The Adipogenesis Detection Kit (Abcam) was used to quantify triglyceride accumulation in cells, in triplicate in three independent experiments, following the manufacturer's conditions. In the assay, triglycerides are solubilized and hydrolyzed to glycerol, which is subsequently oxidized to convert the probe to generate color (λ_{\max} = 570 nm). A NovoStar BMG Labtech microplate instrument was used for the measurements.

For quantitative determination of leptin in cell culture supernatants, the Leptin Human ELISA Kit (Abcam) was used. Media were centrifuged for 5 min at 1400 rpm (SX4250 rotor, Beckman Coulter Allegra X-22) and then supernatants were diluted for use in the quantification reaction. These experiments were performed in triplicate in three different experiments. Concentrations were determined according to the manufacturer's instructions.

Determination of mitochondrial enzyme activities and levels

The Complex IV Human Specific Activity Microplate Assay Kit from Mitosciences (Abcam) was used according to the manufacturer's instructions for the determination of respiratory complex IV (CIV)-specific activity and levels. CIV is immunocaptured within the wells and the activity is determined colorimetrically by the oxidation of reduced cytochrome c as an absorbance decrease at 550 nm. Subsequently, in the same wells, the quantity of enzyme is measured by adding a CIV-specific antibody conjugated with alkaline phosphatase. The phosphatase changes a substrate from colorless to yellow at 405 nm. The citrate synthase (CS)-specific activity was assayed following previously described protocols.⁸ Protein concentration was determined by the Bradford protocol (#500-0006; Bio-Rad).⁹ All enzyme determinations were performed in triplicate in at least three independent experiments using a NovoStar BMG Labtech microplate instrument.

Determination of hydrogen peroxide levels

The production of the hydrogen peroxide was measured in triplicate by using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (Sigma) as described previously,¹⁰ with slight modifications. A BD FACSAria sorter cytometer was used for measurements of intracellular fluorescence. Weasel software was used for flow cytometry data analysis.

Statistics analysis

The statistical package StatView 6.0 was used to perform all the statistics. Data for mean, standard deviation, and number of replicates or independent experiments are presented. The Kolmogorov–Smirnov test was used to check the normal distribution. For normal variables, the unpaired two-tailed *t*-test was used to compare parameters. The *p*-values lower than 0.05 were considered statistically significant.

Results

The hASCs cultured in the adipogenic differentiation medium slowed down proliferation and showed a

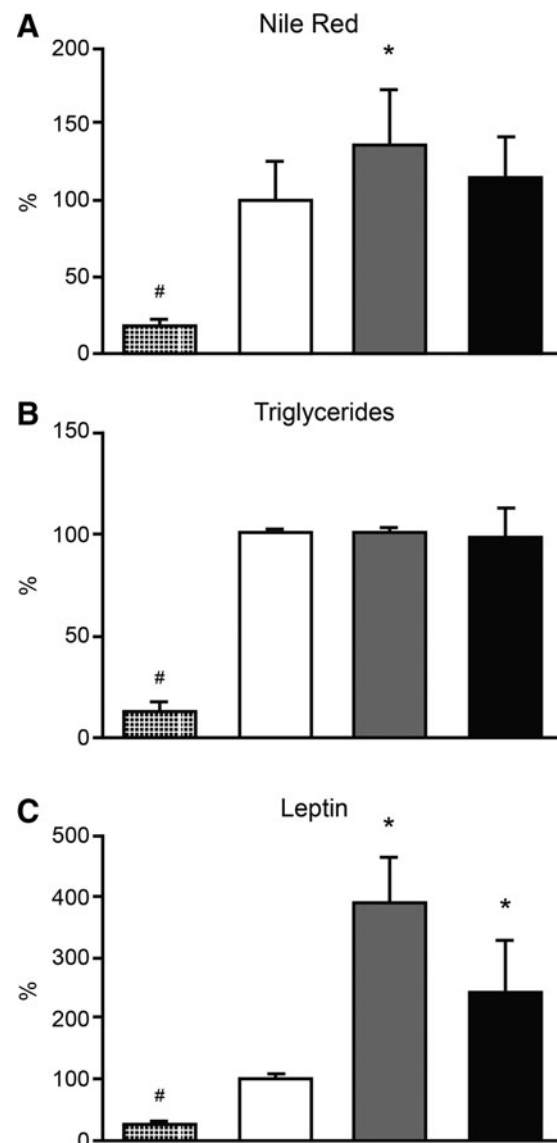


FIG. 1. Adipocyte markers. Dot, white, gray, and black bars code for undifferentiated, differentiated, penicillin–streptomycin–amphotericin-treated differentiated, and gentamicin-treated differentiated human adipose tissue-derived stem cells (hASCs), respectively. The mean value for differentiated hASCs has been represented as 100%. #,* denote significant differences versus differentiated hASCs. (A) Intracellular lipid droplets. (B) Triglyceride amount. (C) Secreted leptin levels.

morphological change with an important rise in cell volume, mainly due to a lipid accumulation, as demonstrated by the significant increase in Nile Red staining ($p < 0.0001$), a vital stain for the detection of intracellular lipid droplets,¹¹ and cell triglycerides ($p < 0.0001$) (Fig. 1A, B). Moreover, the levels of secreted leptin, another adipocyte marker,¹² were significantly higher after the differentiation protocol ($p = 0.0004$) (Fig. 1C). All these results support the adipocyte differentiation of hASCs.

At concentrations used in cell culture, the penicillin 100 U/mL–streptomycin 100 μ g/mL–amphotericin 0.25 μ g/mL mix significantly increased Nile Red staining (136%, $p = 0.0274$) and leptin secretion (390%, $p = 0.0027$), although it did not affect triglyceride levels (Fig. 1). During the adipocyte differentiation, gentamicin 5 μ g/mL significantly increased leptin production (244%, $p = 0.0441$), but it had no effect on triglyceride levels (Fig. 1). This gentamicin concentration is within the range of concentrations (0.9–11.4 μ g/mL) found in the blood of some patients, for example, in neonates with hypoxic ischemic encephalopathy treated for presumptive infection, and therefore, it could have physiologic consequences on medicated individuals.¹³

Although considered selective for the A-site of the prokaryotic ribosome, most aminoglycosides also bind to the A-site of the eukaryotic cytosolic ribosome, but with lower affinities. Nevertheless, their binding to the A-site of the eukaryotic mitochondrial ribosome, whose sequence is very close to the bacterial one, might inhibit mitochondrial protein synthesis and negatively affect mammal cells.¹⁴ However, the CIV-specific activity and quantity, an enzyme with mitochondrial DNA (mtDNA)-encoded subunits and, therefore, potentially more susceptible to aminoglycosides, were not affected in hASCs differentiated in a culture with the aminoglycoside streptomycin or gentamicin (Fig. 2). Maybe, there was a relative decrease in the CIV activity and quantity but compensated, in some way, by a general mitochondrial biogenesis. However, these antibiotics did not affect the CS-specific activity, a nuclear DNA-encoded enzyme that is a marker of mitochondrial biogenesis (Fig. 2).

Experimental evidence in animals has indicated that reactive oxygen species (ROS) may be one of the factors responsible for the development of aminoglycoside toxicity.^{15,16} Therefore, we checked the ROS amount in hASCs differentiated in the presence/absence of antibiotics. The antibiotics mix, or gentamicin, provokes a significant increase in ROS production ($\sim 140%$, $p \leq 0.0238$) (Fig. 3A). Many evidences from the literature claim that ROS are responsible for rise in different variables related to adipogenic differentiation.^{17–24} Therefore, we differentiated hASCs in the presence of these antibiotics with or without NAC. This antioxidant significantly decreased Nile Red staining ($>70%$, $p < 0.0001$) and secreted leptin concentrations ($>60%$, $p < 0.0001$) (Fig. 3B, C).

Discussion

At very high concentrations, penicillin G [≥ 730 μ g/mL or ≥ 1300 U/mL²⁵] had an inhibitory effect on mouse embryonic stem cell (mESC) differentiation into cardiomyocytes, as determined by contracting cardiomyocytes and quantitative expression of the myosin heavy chain (MHC) gene. This penicillin concentration also inhibited neuronal,

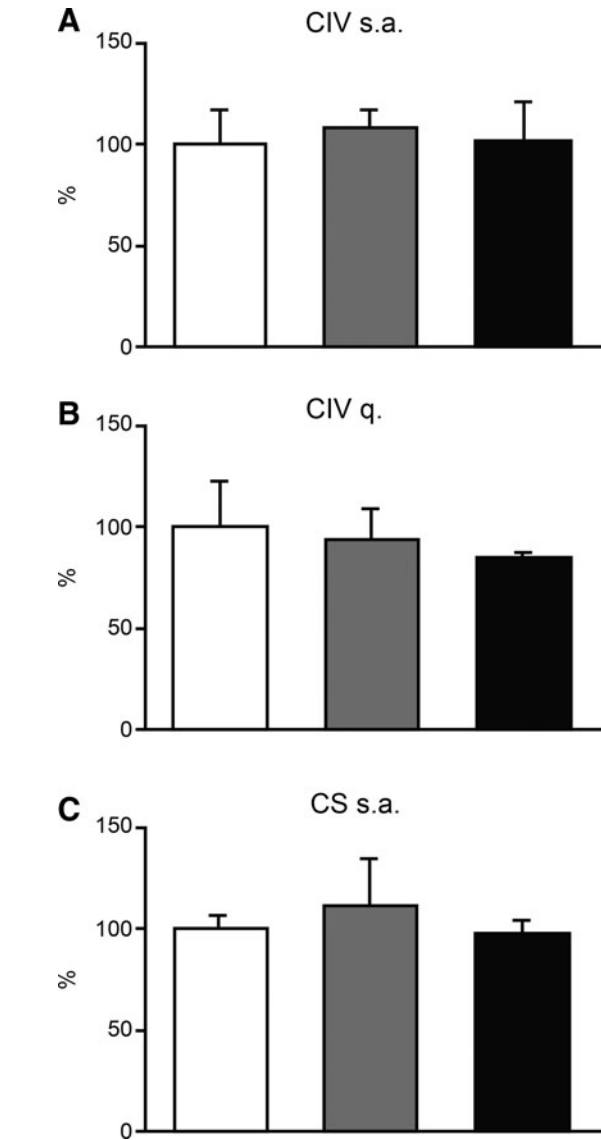


FIG. 2. Mitochondrial enzymes. *White, gray, and black bars* code for differentiated, penicillin–streptomycin–amphotericin-treated differentiated, and gentamicin-treated differentiated hASCs, respectively. The mean value for differentiated hASCs has been represented as 100%. (A) Complex IV (CIV)-specific activity. (B) CIV quantity. (C) Citrate synthase (CS)-specific activity.

osteoblast, and chondrocyte differentiation as determined by quantitative expression of the neurofilament 160, osteocalcin, and aggrecan genes, respectively.²⁶ However, these concentrations are not relevant for normal cell cultures.

At concentrations usually found in cell culture, the combination of penicillin 200 U/mL–streptomycin 50 μ g/mL, streptomycin 50 μ g/mL, or gentamicin 50 μ g/mL interfered with the synthesis of sulfatide, a component of the myelin membrane and indicator of cell differentiation, in brain cell cultures of newborn mice.²⁷ The accumulation of MHC, often used as a marker of myogenic differentiation of chick embryo myogenic cells, was significantly reduced in cultures with streptomycin 100 μ g/mL.²⁸ Penicillin 100 U/mL–streptomycin 100 μ g/mL or gentamicin 100 μ g/mL decreased the growth rate

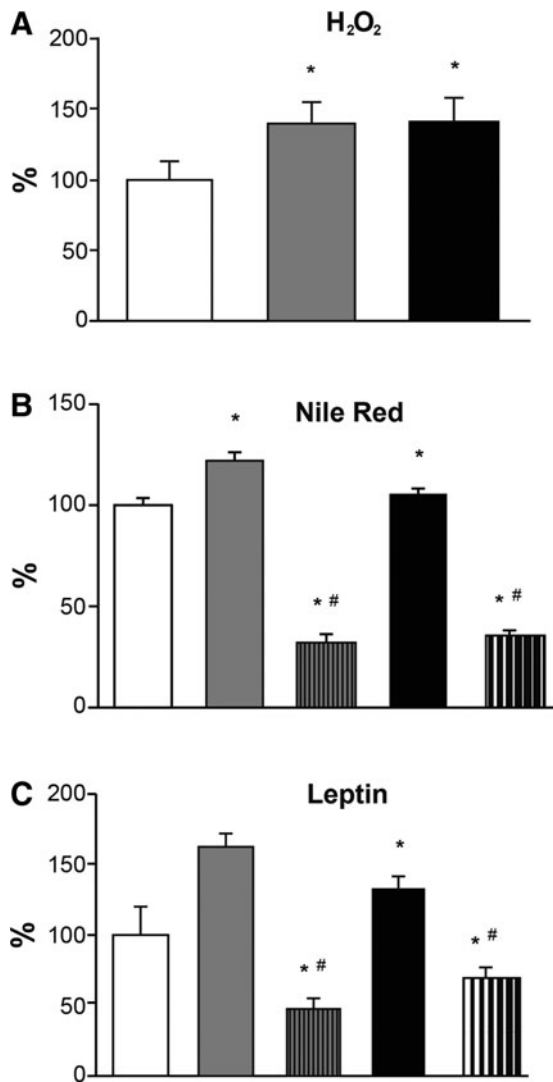


FIG. 3. Reactive oxygen species effects on adipocyte differentiation. *White, gray, stripped gray, black, and stripped black bars* code for differentiated, penicillin-streptomycin-amphotericin-treated differentiated, penicillin-streptomycin-amphotericin-N-acetylcysteine (NAC)-treated differentiated, gentamicin-treated differentiated, and gentamicin-NAC-treated differentiated hASCs, respectively. The mean value for differentiated hASCs has been represented as 100%. *denotes significant differences versus differentiated hASCs. #denotes significant differences between untreated and NAC-treated hASCs differentiated in the presence of antibiotics. (A) Hydrogen peroxide production. (B) Intracellular lipid droplets. (C) Secreted leptin levels.

of mESC and, after their differentiation to type II pneumocytes, the mRNA levels for surfactant protein C.²⁹

Our results confirm that antibiotics commonly used in cell culture, at concentrations usually employed, can affect cell differentiation. Moreover, they extend previous results obtained in other animal cells to encompass human cells.

Compounds from the aminoglycoside family are the antibiotics shared in all these reports. It has been previously shown that particular mtDNA mutations can increase aminoglycoside toxicity, but the absence of a CIV defect rules

out an effect on mitochondrial protein synthesis as the cause for the altered cell differentiation. However, in the absence of these pathologic mtDNA mutations, high concentrations or after long periods of exposure, aminoglycosides are also usually toxic. It has been proposed that ROS can act to promote both the initiation of adipocyte lineage commitment of stem cells and the terminal differentiation of pre-adipocytes to mature adipose cells.¹⁷⁻²⁴ Our results on the adipocyte differentiation in NAC presence support that the increase in ROS levels provoked by aminoglycosides is responsible for the rise in other variables related with adipogenic differentiation, such as Nile Red staining and leptin secretion. The origin of aminoglycoside side effects on adipocyte differentiation and general cell differentiation probably results from a combination of different factors. Aminoglycosides are positively charged molecules that can interact with other negatively charged molecules, such as nucleic acids or phospholipids, or inhibit phospholipases.³⁰⁻³² Moreover, it has been shown that streptomycin $\geq 80 \mu\text{g}/\text{mL}$ increases read through of stop codons and gentamicin $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ induces read through of a premature termination codon found in an expressed human pseudogene.^{33,34}

Therefore, aminoglycosides can modify cell physiology in unknown ways.³⁰⁻³² To avoid undesired phenotypic effects, in general, cultured cells should be grown without antibiotics. The use of aseptic techniques makes antibiotics unnecessary.

Acknowledgments

We would like to thank Santiago Morales for his help with the figures. This work was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (FIS-PI14/00005 and PI14/00070); Departamento de Ciencia, Tecnología y Universidad del Gobierno de Aragón y Fondo Social Europeo (Grupos Consolidados B33); and FEDER Funding Program from the European Union. CIBERER is an initiative of the ISCIII.

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

1. Piraino, F., and Abel, C. Plaque assay for psittacosis virus in monolayers of chick embryo fibroblasts. *J Bacteriol* **87**, 1503, 1964.
2. Ellison, D., Rigg, J., McConnell, S.J., Alexander, A.D., and Yager, R.H. Use of antibiotics in the preparation of canine kidney tissue culture vaccines to eliminate leptospiral infection hazards. *Appl Microbiol* **13**, 595, 1965.
3. Casmore, D.P. Gentamicin as a bactericidal agent in virological tissue cultures. *J Clin Pathol* **20**, 298, 1967.
4. Rudin, A., Healey, A., Phillips, C.A., Gump, D.W., and Forsyth, B.R. Antibacterial activity of gentamicin sulfate in tissue culture. *Appl Microbiol* **20**, 989, 1970.
5. Schwarze, P.E., and Seglen, P.O. Effects of antibiotics on protein synthesis and degradation in primary cultures of rat hepatocytes. *In Vitro* **17**, 71, 1981.
6. Goldstein, A.L., and Johnson, P.R. Primary culture of adipoblasts from obese and lean Zucker rat adipose tissue. *Metabolism* **31**, 601, 1982.

7. Martinez-Liarte, J.H., Solano, F., and Lozano, J.A. Effect of penicillin-streptomycin and other antibiotics on melanogenic parameters in cultured B16/F10 melanoma cells. *Pigment Cell Res* **8**, 83, 1995.
8. Faloona, G.R., and Srere, P.A. *Escherichia coli* citrate synthase. Purification and the effect of potassium on some properties. *Biochemistry* **8**, 4497, 1969.
9. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248, 1976.
10. Carter, W.O., Narayanan, P.K., and Robinson, J.P. Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. *J Leukoc Biol* **55**, 253, 1994.
11. Greenspan, P., Mayer, E.P., and Fowler, S.D. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol* **100**, 965, 1985.
12. Dicker, A., Le Blanc, K., Astrom, G., van Harmelen, V., Gotherstrom, C., Blomqvist, L., Arner, P., and Ryden, M. Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Exp Cell Res* **308**, 283, 2005.
13. Frymoyer, A., Lee, S., Bonifacio, S.L., Meng, L., Lucas, S.S., Guglielmo, B.J., Sun, Y., and Verotta, D. Every 36-h gentamicin dosing in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy receiving hypothermia. *J Perinatol* **33**, 778, 2013.
14. Pacheu-Grau, D., Gomez-Duran, A., Lopez-Perez, M.J., Montoya, J., and Ruiz-Pesini, E. Mitochondrial pharmacogenomics: barcode for antibiotic therapy. *Drug Discov Today* **15**, 33, 2010.
15. Walker, P.D., Barri, Y., and Shah, S.V. Oxidant mechanisms in gentamicin nephrotoxicity. *Ren Fail* **21**, 433, 1999.
16. Bates, D.E. Aminoglycoside ototoxicity. *Drugs Today (Barc)* **39**, 277, 2003.
17. Calzadilla, P., Sapochnik, D., Cosentino, S., Diz, V., Di-celio, L., Calvo, J.C., and Guerra, L.N. N-acetylcysteine reduces markers of differentiation in 3T3-L1 adipocytes. *Int J Mol Sci* **12**, 6936, 2011.
18. Kanda, Y., Hinata, T., Kang, S.W., and Watanabe, Y. Reactive oxygen species mediate adipocyte differentiation in mesenchymal stem cells. *Life Sci* **89**, 250, 2011.
19. Tormos, K.V., Anso, E., Hamanaka, R.B., Eisenbart, J., Joseph, J., Kalyanaraman, B., and Chandel, N.S. Mitochondrial complex III ROS regulate adipocyte differentiation. *Cell Metab* **14**, 537, 2011.
20. Liu, G.S., Chan, E.C., Higuchi, M., Dusting, G.J., and Jiang, F. Redox mechanisms in regulation of adipocyte differentiation: beyond a general stress response. *Cells* **1**, 976, 2012.
21. Higuchi, M., Dusting, G.J., Peshavariya, H., Jiang, F., Hsiao, S.T., Chan, E.C., and Liu, G.S. Differentiation of human adipose-derived stem cells into fat involves reactive oxygen species and Forkhead box O1 mediated upregulation of antioxidant enzymes. *Stem Cells Dev* **22**, 878, 2013.
22. Kim, J.H., Kim, S.H., Song, S.Y., Kim, W.S., Song, S.U., Yi, T., Jeon, M.S., Chung, H.M., Xia, Y., and Sung, J.H. Hypoxia induces adipocyte differentiation of adipose-derived stem cells by triggering reactive oxygen species generation. *Cell Biol Int* **38**, 32, 2014.
23. Atashi, F., Modarressi, A., and Pepper, M.S. The role of reactive oxygen species in mesenchymal stem cell adipogenic and osteogenic differentiation: a review. *Stem Cells Dev* **24**, 1150, 2015.
24. Wang, W., Zhang, Y., Lu, W., and Liu, K. Mitochondrial reactive oxygen species regulate adipocyte differentiation of mesenchymal stem cells in hematopoietic stress induced by arabinosylcytosine. *PLoS One* **10**, e0120629, 2015.
25. Schaad, U.B., Guenin, K., Steffen, C., and Herschkowitz, N. Effects of antimicrobial agents used for therapy of CNS infections on dissociated brain cell cultures. *Pediatr Res* **24**, 367, 1988.
26. zur Nieden, N.I., Kempka, G., and Ahr, H.J. Molecular multiple endpoint embryonic stem cell test—a possible approach to test for the teratogenic potential of compounds. *Toxicol Appl Pharmacol* **194**, 257, 2004.
27. Amonn, F., Baumann, U., Wiesmann, U.N., Hofmann, K., and Herschkowitz, N. Effects of antibiotics on the growth and differentiation in dissociated brain cell cultures. *Neuroscience* **3**, 465, 1978.
28. Moss, P.S., Spector, D.H., Glass, C.A., and Strohmman, R.C. Streptomycin retards the phenotypic maturation of chick myogenic cells. *In Vitro* **20**, 473, 1984.
29. Cohen, S., Samadikuchaksaraei, A., Polak, J.M., and Bishop, A.E. Antibiotics reduce the growth rate and differentiation of embryonic stem cell cultures. *Tissue Eng* **12**, 2025, 2006.
30. Forge, A., and Schacht, J. Aminoglycoside antibiotics. *Audiol Neurootol* **5**, 3, 2000.
31. Nagai, J., and Takano, M. Molecular aspects of renal handling of aminoglycosides and strategies for preventing the nephrotoxicity. *Drug Metab Pharmacokinet* **19**, 159, 2004.
32. Karasawa, T., and Steyger, P.S. Intracellular mechanisms of aminoglycoside-induced cytotoxicity. *Integr Biol (Camb)* **3**, 879, 2011.
33. Manuvakhova, M., Keeling, K., and Bedwell, D.M. Aminoglycoside antibiotics mediate context-dependent suppression of termination codons in a mammalian translation system. *RNA* **6**, 1044, 2000.
34. Venkataraman, N., Cole, A.L., Ruchala, P., Waring, A.J., Lehrer, R.I., Stuchlik, O., Pohl, J., and Cole, A.M. Reawakening retrocyclins: ancestral human defensins active against HIV-1. *PLoS Biol* **7**, e95, 2009.

Address correspondence to:

Eduardo Ruiz-Pesini, PhD

Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular

Universidad de Zaragoza

C/Miguel Servet 177

Zaragoza 50013

Spain

E-mail: eduruiz@unizar.es

Received: February 5, 2015

Accepted: June 1, 2015

Online Publication Date: July 3, 2015

Expanding the clinical phenotypes of *MT-ATP6* mutations

Ester López-Gallardo^{1,6}, Sonia Emperador^{1,6}, Abelardo Solano¹, Laura Llobet^{1,6}, Antonio Martín-Navarro¹, Manuel José López-Pérez^{1,6}, Paz Briones^{3,6}, Mercedes Pineda^{4,6}, Rafael Artuch^{5,6}, Elena Barraquer⁷, Ivonne Jericó⁸, Eduardo Ruiz-Pesini^{1,2,6} and Julio Montoya^{1,6,*}

¹Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular, Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón, Zaragoza, Spain, ²Fundación ARAID, Universidad de Zaragoza, 50013 Zaragoza, Spain, ³Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, Hospital Clínico, IDIBAPS, 08036-Barcelona, Spain, ⁴Servicio de Neurología and ⁵Departamento de Bioquímica Clínica, Hospital San Joan de Deu, 08950 Barcelona, Spain, ⁶Centro de Investigaciones Biomédicas en red de Enfermedades Raras (CIBERER), Spain, ⁷Clínica Barraquer, 08021 Barcelona, Spain and ⁸Servicio de Neurología, Complejo Universitario de Navarra, 31008-Pamplona, Spain

Received May 26, 2014; Revised and Accepted June 26, 2014

Mitochondrial DNA mutations at *MT-ATP6* gene are relatively common in individuals suffering from striatal necrosis syndromes. These patients usually do not show apparent histochemical and/or biochemical signs of oxidative phosphorylation dysfunction. Because of this, *MT-ATP6* is not typically analyzed in many other mitochondrial disorders that have not been previously associated to mutations in this gene. To correct this bias, we have performed a screening of the *MT-ATP6* gene in a large collection of patients suspected of suffering different mitochondrial DNA (mtDNA) disorders. In three cases, biochemical, molecular-genetics and other analyses in patient tissues and cybrids were also carried out. We found three new pathologic mutations. Two of them in patients showing phenotypes that have not been commonly associated to mutations in the *MT-ATP6* gene. These results remark the importance of sequencing the *MT-ATP6* gene in patients with striatal necrosis syndromes, but also within other mitochondrial pathologies. This gene should be sequenced at least in all those patients suspected of suffering an mtDNA disorder disclosing normal results for histochemical and biochemical analyses of respiratory chain.

INTRODUCTION

Approximately 10–20% of individuals with Leigh syndrome (LS) and more than 50% of individuals with neurogenic muscle weakness, ataxia and retinitis pigmentosa (NARP) have a mutation at mitochondrial DNA (mtDNA) nucleotide position 8993 of the *MT-ATP6* gene (1). These two clinical conditions have been termed ‘striatal necrosis syndromes’ and have been also associated to mutations at nucleotide position 9176 of the *MT-ATP6* gene (2). Thus, these mutations have been frequently analyzed in persons suffering these pathologies. In these patients, histologic examination of muscle biopsies shows only minimal, if any, changes and the specific activities of respiratory complexes are usually normal (1), because the p.MT-ATP6 polypeptide is not a component of the respiratory

chain but of the oxidative phosphorylation system (OXPHOS) complex V (CV) or ATP synthase. Moreover, for ADP phosphorylation to take place, mitochondria need to be maintained intact and in a coupled state. Then, ATP synthesis can only be measured on freshly isolated mitochondria (3). Therefore, ATP synthase-specific activity is not regularly measured in patients’ tissues. Because of the general lack of positive histochemical and biochemical evidences on the implication of p.MT-ATP6 in a particular pathology based in *MT-ATP6* mutations, its screening in other mitochondrial diseases has been infrequent.

To avoid these biases, we have performed a screening of the *MT-ATP6* gene in a big collection of patients suspected of suffering mtDNA disorders, as NARP, maternally inherited LS (MILS) and other with very different clinical phenotypes.

*To whom correspondence should be addressed at: Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza, C/ Miguel Servet, 177, 50013 Zaragoza, Spain. Tel: +34 976761640; Fax: +34 976761612; Email: jmontoya@unizar.es

RESULTS

MT-ATP6 analysis

Three out of the 550 patients studied harbored interesting mutations in their *MT-ATP6* genes. These mutations consisted of transitions at m.9025G>A, m.9029A>G and m.9032T>C nucleotide positions for P1, P2 and P3, respectively (Fig. 1). To rule out the presence of other potentially pathological mutations, we sequenced the complete mtDNAs of these three patients, but no other variant was a better candidate for being the pathogenic mutation (Supplementary Material, Note S1). These analyses also provided us their mtDNA haplogroups (U5b2b3, W1* and U5b1f). Next, we analyzed the presence of these mutations in 21 580 human p.MT-ATP6 sequences obtained from GenBank plus 4352 from different publications (Supplementary Material, References S1). The m.9025G>A, m.9029A>G and m.9032T>C transitions were found 13, 1 and 0 times, respectively, in apparently healthy individuals and always in different mtDNA genetic backgrounds and distinct from our patients (Supplementary Material, Note S2). To rule out these mutations as more geographically restricted polymorphisms, we also studied 13 and 18 Spaniard population samples from mtDNA haplogroups W and U5b, respectively. The mutations were not found in any of them. In addition of the 550 patients from the initial screening, we also analyzed by real-time polymerase chain reaction (PCR) the m.9025G>A/m.9032T>C and m.9029A>G transitions in all remaining samples of our laboratory from individuals suspected of suffering from MILS/NARP and optic neuropathy, respectively. We found the m.9025G>A mutation in a MILS patient (P4, Supplementary Material, Note S1). Finally, the m.9025G>A mutation had been found in one patient with colon cancer from haplogroup H7d3a and another with motor neuropathy and the m.9029A>G transition had also been found in one patient from haplogroup H with suspected mitochondrial disorder (Supplementary Material, References S2).

These mutations were firstly discovered by conformation sensitive gel electrophoresis (CSGE) and/or sequencing (Supplementary Material, Fig. S1A). To rule out sequencing artifacts and confirm the presence of these mutations by another different method, we performed PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) analyses. These mutations were found in heteroplasmy in at least one individual from each pedigree (Supplementary Material, Fig. S1B). However, the mtDNA region around these mutations is highly represented in nuclear mitochondrial DNA sequences (NUMTs) (4) and short amplicons for m.9025G>A and m.9029A>G, but not for 9032T>C, analyses were observed from rho⁰ cells (Supplementary Material, Fig. S1C). Therefore, to ratify heteroplasmies, determine their true percentages and their association with the phenotype, we designed a larger amplicon (Supplementary Material, Fig. S1D) and performed a nesting radioactive PCR-RFLP in probands and relatives. The m.9025G>A mutation was found in homoplasmy in proband's muscle, liver and blood and in mother's and sister's blood (Fig. 2A). The m.9029A>G mutation was found in homoplasmy in the patient's blood but in heteroplasmy in his mother (95%) and siblings (brother 85%, sister 95%) (Fig. 2B). This heteroplasmy is authentic because only two NUMTs in chromosomes 5 and 17 have enough length to be amplified with our PCR conditions and, despite that their targets for the

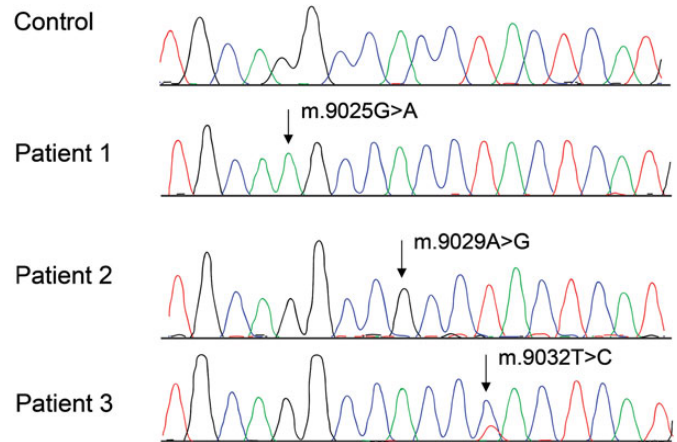


Figure 1. Electropherograms from segments of the *MT-ATP6* gene. Heteroplasmy at m.9032 position can be observed.

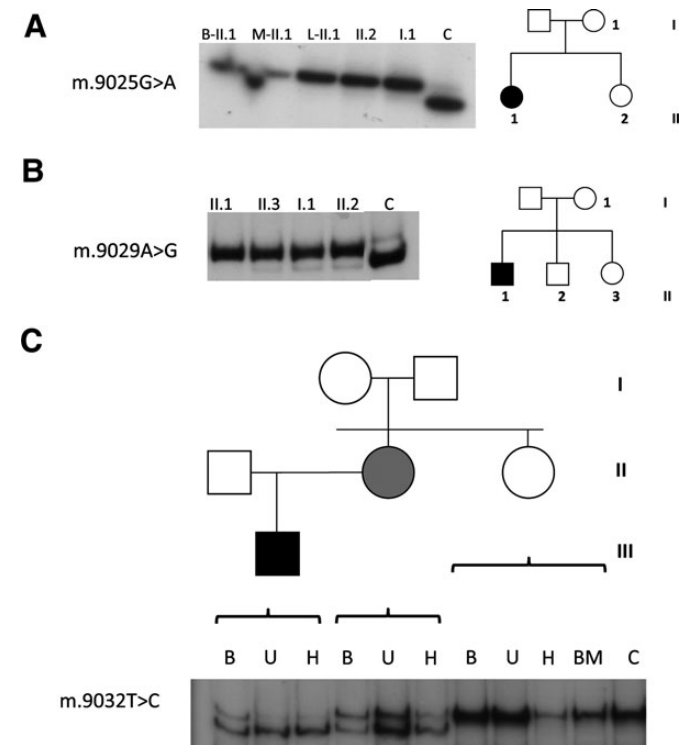


Figure 2. Hot PCR-RFLP. (A) m.9025G>A transition. C, B, L, M, I and II denote control, blood, liver, muscle, first and second generation, respectively. Black and white figures represent the patient and non-affected relatives, respectively. (B) m.9029A>G transition. C, I and II denote control, first and second generation, respectively. Black and white figures represent the patient and non-affected relatives, respectively. (C) m.9032T>C transition. C, B, BM, H, U, I, II and III denote control, blood, buccal mucosa, hair, urine, first, second and third generation, respectively. Black, grey and white figures represent the patient, the moderately affected mother and other non-affected relatives, respectively.

genotyping restriction enzyme are identical to that of the normal mtDNA sequence, there are many mispairings in the primers-matched sequences (Supplementary Material, Note S3) and this segment was not amplified in rho⁰ cells (Supplementary Material, Fig. S1D) or the patient blood (Fig. 2B). The m.9032T>C

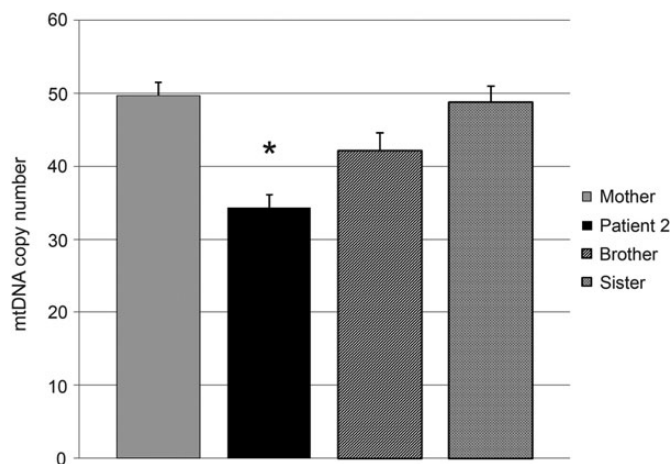


Figure 3. mtDNA levels in members of the m.9029A>G pedigree. The asterisk denotes significant differences ($P \leq 0.0078$) from the rest of pedigree members.

transition was found in heteroplasmy in proband's urine (96%), hair (93%) and blood (70%) and also in mother's hair (73%), urine (57%) and blood (42%) but it was not found in hair, urine, buccal mucosa or blood of a healthy maternal aunt (Fig. 2C).

As the mutation m.9025G>A was found in homoplasmy in the asymptomatic mother and sister and m.9029A>G was found at a high percentage in the asymptomatic mother and siblings, we looked for potential compensatory factors, such as the mtDNA levels, in symptomatic and asymptomatic family members (5). There were no differences in mtDNA levels in members of the m.9025G>A pedigree, but they were significantly lower in the m.9029A>G patient than in his relatives (Fig. 3).

P.MT-ATP6 analysis

The m.9025G>A, m.9029A>G and m.9032T>C transitions provoke glycine to serine, histidine to arginine and leucine to proline amino acid substitutions, respectively. The MutPred score mean \pm standard deviation for all of the 24 206 possible amino acid variations defined by a single point mutation away from the revised Cambridge reference sequence (rCRS) is 0.642 ± 0.154 (6). These values for all of the 111 glycine to serine, 97 histidine to arginine and 553 leucine to proline possible substitutions were 0.749 ± 0.120 , 0.728 ± 0.166 and 0.737 ± 0.105 , respectively, and they were significantly higher than those for all of the possible amino acid substitutions ($P < 0.0001$). The particular values for these changes were 0.860 (G167S), 0.827 (H168R) and 0.837 (L169P) (Table 1). Because a higher pathogenicity score correspond to a greater likelihood that the amino acid variation is pathogenic, these results suggest that these particular amino acid substitutions will have phenotypic consequences.

The G167, H168 and L169 amino acids are extremely preserved through evolution. Thus, they were conserved in 99.7, 98.1 and 87.9%, respectively, of 3410 published p.MT-ATP6 reference sequences from animals, plants, fungi and protists (Table 1). G167 was the second most conserved p.MT-ATP6 position after R159, a key residue for proton transport. As there is a bias in the type of organisms with their mtDNAs sequenced

(most of the sequenced mtDNAs belong to animals), to confirm the clues about the functional importance of these amino acids, we also estimated the conservation indexes (CI) for these positions in 1409 bacteria that are organisms very distant from an evolutionary point of view. The CIs were 86.2, 36.0 and 33.4%, respectively (Table 1).

The G167, H168 and L169 amino acids are located in the transmembrane helix 4 (TMH4) of p.MT-ATP6 (Fig. 4A and B). TMH4 and TMH5 of p.MT-ATP6 and TMH2 of subunit c form the F1F0 ATP synthase proton channel (7). Four other positions affected by pathologic mutations (A155, L156, A162 and L170) are also located in this TMH4. Moreover, G167 and L169 are placed along with A155, L156, R159, A162 and L170 in the most conserved side of TMH4 (Fig. 4C). A structurally compensating replacement in any of these TMHs could explain the phenotypic differences between the homoplasmic m.9025G>A patient and her asymptomatic maternal relatives. However, there were not differences between the p.MT-ATP6 and c subunits (the three isoenzymes) from the patient and relatives.

Cybrid analysis

The previous results suggested that these mutations might be functionally important and, maybe, they were responsible for patients' phenotypes. To confirm this possibility, we built seven transmitochondrial cell lines (cytoplasmic hybrids or cybrids) using the osteosarcoma 143B206 rho⁰ cell line as the common nuclear background (8) and platelets from each of these patients. Unfortunately, family of deceased P1 did not want to continue with the study and from P4, a patient studied 7 years ago, we only had muscle. Therefore, we could not produce cybrids with this mtDNA mutation. We used a haplogroup H cybrid harboring the homoplasmic m.8993T>G pathologic mutation as a positive control. As negative controls, we used the isogenic m.8993T cybrid and, as it has been previously shown that the mtDNA genetic background plays an important role in modulating the biochemical defects and clinical outcome in NARP/MILS (9), we also generated cybrids from healthy individuals from close haplogroups to those of the patients. Thus, H, N1b and Uk cybrids were negative controls (C5, C2 and C3) for mutant H, W1* and U5b cybrids (P5, P2 and P3), respectively.

First, we confirmed that the cybrids harbored the nuclear background of osteosarcoma 143B206 rho⁰ cells and the mtDNA of the donor platelets (Supplementary Material, Fig. S2).

Compared with their haplogroup controls, mutant cybrids harboring the homoplasmic m.8993T>G, m.9029A>G and heteroplasmic (25 and 80%) m.9032T>C mutations presented a decrease in the endogenous oxygen consumption (Fig. 5A), but there were no differences in leaking respiration (Fig. 5A). Uncoupled respiration was not different from control cybrids in m.8993T>G and m.9029A>G cybrids but was significantly lower in m.9032T>C cybrids (Fig. 5A).

The mitochondrial inner membrane potential was significantly lower in the m.8993T>G cybrid than in its haplogroup control cybrid. However, this parameter was significantly higher in m.9029A>G and m.9032T>C (25%) cybrids than in their controls (Fig. 5B). This potential was not different from that of the haplogroup control in the m.9032T>C (80%) cybrid (Fig. 5B).

Table 1. Pathologic mutations in the *MT-ATP6* gene

p.MT-ATP6 <i>MT-ATP6</i>	Mutation load	Phenotype	Pathologic pedigrees	Controls (>25 000)	Mt-CI (%) (3410)	B-CI (%) (1409)	MutPred	Cybrids
Previously reported mutations								
p.MIT m.8528T>C	Ho-He	IC	S	0	69.8	–	0.983	N
p.A105P m.8839G>C	He	NARP	O	0	80.9	–	0.742	C
p.W109R m.8851T>C	Ho-He	BSN	S	1	90.9	–	0.780	N
p.A155P m.8989G>C	He	NARP	O	0	67.6	13.3	0.742	N
p.L156P/R m.8993T>C/G	He/He	AOSA/NARP/LS	S/S	0/0	99.1	84.0	0.846/0.824	C/C
p.A162V m.9011C>T	Ho	LHON	O	1	95.0	30.5	0.728	C
p.L170P m.9035T>C	Ho-He	Ataxia/AOSA	S	0	91.0	23.0	0.865	C
p.L217P/R m.9176T>C/G	He/He	LS	S/S	1/0	98.4	96.5	0.719/0.777	C/C
p.L220P m.9185T>C	Ho-He	AOSA/NARP/LS/CMT	S	0	86.8	11.1	0.751	N
p.L222P m.9191T>C	He	LS	O	0	72.7	38.2	0.844	N
New mutations								
p.G167S m.9025G>A	Ho	CC, MN, LS-like	S	13	99.7	86.2	0.860	N
p.H168R m.9029A>G	Ho-He	LHON-like	S	1	98.1	36.0	0.827	C
p.L169P m.9032T>C	He	NARP	O	0	87.9	33.4	0.837	C

To consider a previously published p.MT-ATP6 mutation as a pathologic one, the mutation should fulfill at least one of these two criteria: (i) the mutation should be present in more than one pathologic pedigree, its population frequency should be very low (below 0.05%) and it should not be located at internal branches of the mtDNA phylogenetic tree or (ii) phenotypic differences should be shown between cell models harboring different percentages of mutant and control mtDNAs. The m.8989G>C and m.9191T>C mutations do not fulfill these criteria. However, several other features suggest that they are pathologic mutations. AOSA, adult-onset spinocerebellar ataxia; B-CI, conservation index for bacterial subunit a; BSN, bilateral striatal necrosis; C, cybrids; CC, colon cancer; CMT, Charcot-Marie-Tooth; Ho, homoplasmy; He, heteroplasmy; IC, infantile cardiomyopathy; LHON, Leber hereditary optic neuropathy; LS, Leigh syndrome; MN, motor neuropathy; Mt-CI, conservation index for p.MT-ATP6; MutPred, a proxy index for the pathogenicity of an amino acid variation (6); N, No; NARP, neuropathy, ataxia and retinitis pigmentosa; O, one; S, several. A hyphen in the B-CI column signifies that we cannot trustworthily indicate the equivalent amino acid in the bacterial subunit a.

ATP levels in mutant cybrids were lower than those of their control cybrids (Fig. 5C), except for the m.9032T>C (25%) cybrid.

Reactive oxygen species (ROS) and Mn superoxide dismutase (SOD2) mRNA levels in mutant cybrids were also significantly higher than those of their control cybrids, except for the m.9032T>C (25%) cybrid (Fig. 5D).

Therefore, when compared with normal mtDNAs, the relocation of these mutated mtDNAs to rho⁰ cell lines transfers altered biochemical features.

DISCUSSION

M.9025G>A associated with type IV 3-methylglutaconic aciduria

The m.9025G>A/p.MT-ATP6:G167S mutation fulfills some but fails in other of the accepted pathogenicity criteria. Thus, this mutation was found in homoplasmy in healthy relatives and, except for Leber hereditary optic neuropathy (LHON) and mitochondrial deafness, this is not a common observation in disorders due to mtDNA mutations. However, the homoplasmic m.9176T>C/p.MT-ATP6:L217P mutation has also been associated with a very mild disease course in some individuals

from two pedigrees suffering hereditary spastic paraplegia-like disorder (10) and Charcot-Marie-Tooth hereditary neuropathy (11). Homoplasmic levels of the m.9185T>C/p.MT-ATP6:L220P mutation were found in several slightly affected individuals from another pathologic pedigree (12). The m.9025G>A mutation has been found in 13 out of more than 25 000 (0.05%) apparently healthy individuals, but all of them from different mtDNA genetic backgrounds, which means that this is not an ancient polymorphism. Moreover, other *MT-ATP6* pathologic mutations, such as m.8851T>C/p.MT-ATP6:W109R, m.9011C>T/p.MT-ATP6:A162V and m.9176T>C/p.MT-ATP6:L217P, have been found in homoplasmy in individuals from different population studies (Supplementary Material, Note S2). In all these examples, other factors such as nuclear modifying genes, the mtDNA genetic background or environmental influences may be involved in determining the severity of the phenotypic expression and the large phenotypic variability of these *MT-ATP6* mutations (10). On the other hand, G167 is the second most conserved amino acid position in the p.MT-ATP6 subunit and bioinformatics studies predict that the glycine to serine amino acid substitution at p.MT-ATP6 167 position would be pathologic (6).

The glycine of the equivalent position in bacteria is also extremely conserved (86.2% of 1409 bacteria species). Many bacteria lacking a glycine in this position have a glycine at the

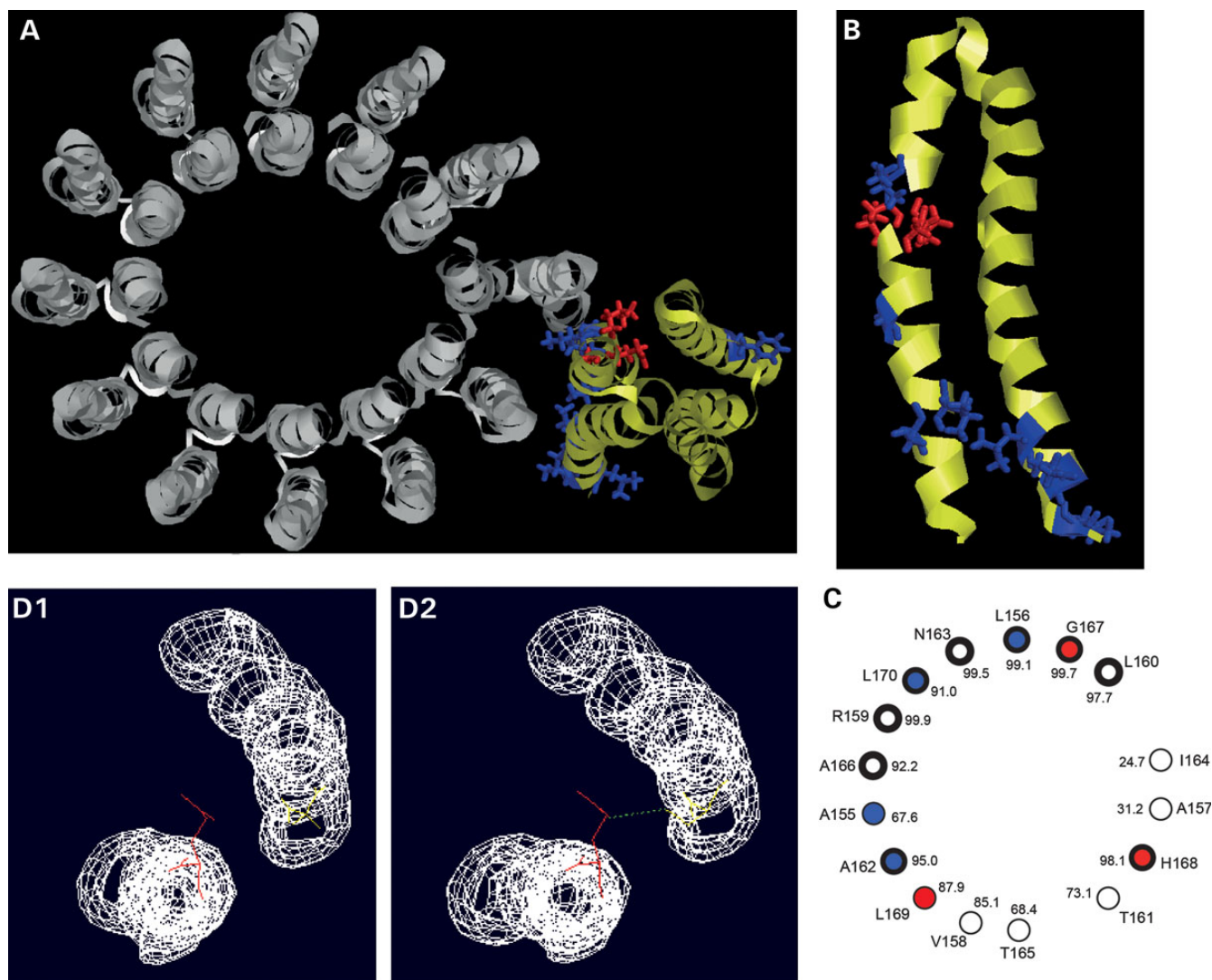


Figure 4. The molecular model of the p.MT-ATP6 subunit. (A) View of subunit a (yellow color) (the bacterial orthologue of mitochondrial p.MT-ATP6) and subunits c (grey color) of *Escherichia coli* from the periplasma (intermembrane) space. The bacterial equivalent p.MT-ATP6 positions that, when mutated, have been associated to human disorders (blue color) have been represented in this model. New mutations described in this article are represented in red color. (B) p.MT-ATP6 TMH4 and TMH5. Already described and newly described pathologic mutations are represented in blue and red color, respectively. (C) Helical wheel representation of TMH4. Pathologic positions are represented with blue and red circles and those with a CI > 90% with thick lines. (D) G167 (yellow color), in TMH4, does not interact with E203 (red color) of TMH5 (D₁) but S167 (yellow color) establishes a hydrogen bond (green line) with E203 (red color) of TMH5 (D₂).

equivalent position to amino acid 203 in TMH5 that interacts with amino acid at position 167 in TMH4 (2). Thus, glycine is frequently a member of the interacting amino acid pair. This pair forms part of an aqueous pocket extending from D61 of subunit c to the periplasmic surface (13). Glycine is the smallest amino acid and the bigger hydrophilic S167 might form a hydrogen bond with the E203 (Fig. 4D) and alter the conformational movements of this helix (14). Also supporting an important role of this amino acid position, the ATP synthase of extreme alkaliphiles has special features that are required for non-fermentative growth and OXPHOS at high pH (≥ 10.5). At such pH values, maintenance of a cytoplasmic pH that is acid in, lowers the total chemiosmotic driving force, and yet a robust H^+ -coupled OXPHOS proceeds optimally. The K180 amino acid of these alkaliphilic bacteria (amino acid position 167 in humans) is implicated in the pH-dependent restriction

of the proton flux through the ATP synthase to and from the bulk phase (15). Moreover, different replacements at the equivalent position to human 167 have been modeled in *E. coli* and the ATP synthase activity was greatly inhibited and the aerobic growth suppressed. Replacing this amino acid by a polar one caused proton leak (14,16–18).

All these forward and against evidences on the pathogenicity of this mutation prevent its assignation as a pathologic change and make necessary more proofs.

The clinical phenotype and the increased levels of 3-methylglutaconic acid in our patient suggested a type IV 3-methylglutaconic aciduria. This is a mixed bag diagnostic but, frequently, a defect on the OXPHOS system has been found for these patients (Supplementary Material, References S3). Our results allowed us to rule out a defect of respiratory complexes, a coenzyme Q (CoQ) deficiency or an mtDNA

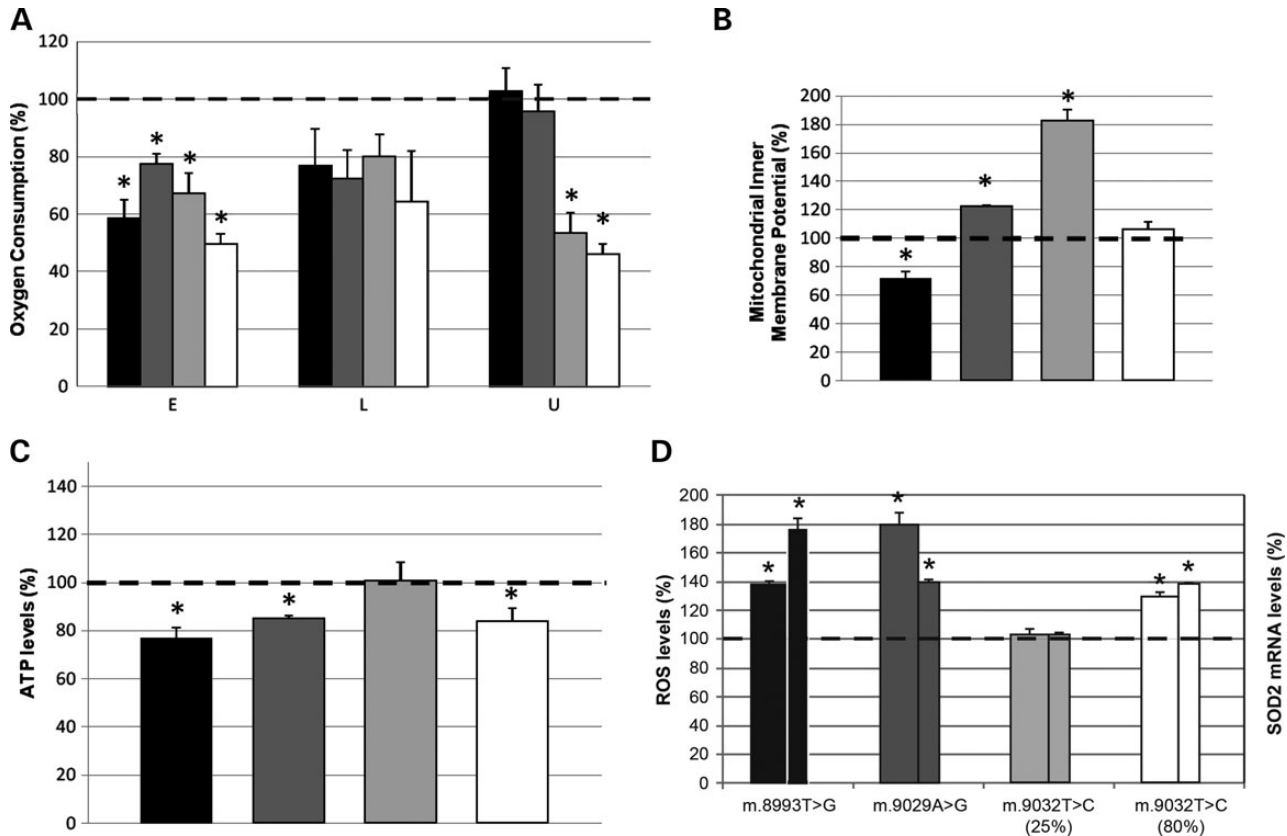


Figure 5. Biochemical characterization of the cybrid cell lines. Black, dark gray, light gray and white code for m.8993T>G, m.9029A>G, m.9032T>C (25%) and (80%) cybrids, respectively. Asterisks denote significant differences ($P \leq 0.0074$). (A) Oxygen consumption. E, L and U code for endogenous, leaking and uncoupled oxygen consumption. (B) Mitochondrial inner membrane potential. (C) ATP levels. (D) ROS quantity and SOD2 mRNA expression. Wide and strait bars code for ROS and SOD2 mRNA levels, respectively.

deletion or depletion. The 3-methylglutaconic aciduria has sometimes been found in LS, but we were able to rule out several causes of LS such as pyruvate dehydrogenase (PDH) complex deficiency. LS caused by *MT-ATP6* mutations frequently show normal activities for the electron transport chain complexes such as those found in our patient. Moreover, 3-methylglutaconic aciduria is frequently found in ATP synthase deficiency and, particularly interesting, it was found in a patient with the pathologic mutation m.8993T>G in the *MT-ATP6* gene.

M.9029A>G associated with atypical LHON

The m.9029A>G/p.MT-ATP6:H168R mutation fulfills most of the accepted pathogenicity criteria. However, this mutation was also reported in two other individuals out of more than 25 000 including patients and controls. This observation is not rare for mtDNA mutations associated to hereditary optic neuropathies. Thus, the m.11778G>A and m.14484T>C transitions are frequently found in homoplasmy in normal females of LHON pedigrees. Moreover, two individuals without evidence of visual abnormalities and not being part of LHON families harbored these homoplasmic LHON pathogenic mutations (19). More importantly, one of these two individuals with the m.9029A>G mutation was suspected of suffering a mitochondrial disorder (20). On the other hand, and supporting its pathogenic role, this mutation is also the best candidate mutation to explain a

pathologic phenotype (optic neuropathy) frequently found associated to pathologic mtDNA mutations. It was in homoplasmy in the proband and in heteroplasmy in the unaffected relatives. Despite the percentage of heteroplasmy was very high in the healthy relatives, maybe their higher mtDNA content may contribute to a moderate amount of normal mtDNA genotypes that compensate the pathologic mutation (21). The mutation changes a highly conserved amino acid in an important trans-membrane alpha-helix which is part of the ATP synthase proton channel. Moreover, 3 (W109R, L156R and L217R) out of 12 previously described *MT-ATP6* pathologic mutations incorporate an arginine. Finally, the m.9029A>G cybrid show OXPHOS dysfunction when compared with the cybrid harboring a normal mtDNA genotype from a close mtDNA haplogroup.

By using the Ag⁺-chemical labeling of cysteine side chains, introduced by site-directed mutagenesis, to map the aqueous accessible regions on subunit a (bacterial orthologue of mitochondrial p.MT-ATP6), it was found that the bacterial equivalent position to amino acid 168 might be part of an aqueous pathway to the intermembrane space (13). Moreover, it has been proposed that the proton motive force causes protonation of a network of residues in subunit a near the intermembrane surface, including amino acid 168 (22,23). Therefore, the H168R substitution, with very different pK, should have an important phenotypic effect. Interestingly, different amino acid replacements have been modeled at this equivalent position

in *E. coli* (corresponding to position 219), showing that the proton translocation and the ATP synthase activity was greatly inhibited, and that the aerobic growth was also affected (16,24–27).

The main interest of m.9029A>G is that it is associated with an atypical LHON phenotype. Many patients are not fully evaluated early in the course of the disease or are referred electively for a subspecialty opinion years later. Properly evaluating an individual with suspected optic neuropathy years after the visual loss occurred may be difficult (28). Sometimes, rare optic neuropathies in patients harboring common LHON mutations can be confused with ischemic optic neuropathy (29,30), as it was the case of this patient. Moreover, LHON progression varies considerably, ranging from sudden and complete vision loss to progressive decline up to 2 years (31). However, the progressive loss of vision in our patient over 4 years, although highly unusual, has already been reported in an individual with the m.11778G>A pathologic mutation (32).

It is considered that LHON is caused by mutations in mtDNA-encoded complex I subunits. Mutations in *MT-ND* genes have been associated to LHON but also to LS. Moreover, some LHON mutations have been sometimes associated to LS (33). Therefore, it would be possible that *MT-ATP6* mutations, usually associated to LS, were etiologic factors for LHON. A lowered rate of oxidative ATP synthesis appears to be the common biochemical background of pathogenic importance in all LHON complex I mutations (34). This background is also accompanied by an increased ROS production (35). The p.MT-ATP6 mutations that cause LS also reduce the ATP production (36) and increase ROS production (37). Very interestingly, the few histopathological studies reporting ocular findings in LS patients indicate that these individuals show features indistinguishable from LHON (38,39). Thus, maybe LHON is not a defect of mtDNA-encoded complex I subunits but of mtDNA-encoded OXPHOS subunits. Our results on ROS and ATP levels from cybrids harboring the m.9029A>G transition show that, in addition to *MT-ND* mutations, other mtDNA mutations could be associated to hereditary optic neuropathies. In fact, and although nowadays evidences are not too strong, other *MT-ATP6* mutations, such as m.9101T>C/p.MT-ATP6:1192T (40) and m.9011C>T/p.MT-ATP6:A162V (41) have been postulated as etiologic factors for LHON patients. The m.9101T>C transition induced a proton leak that reduced OXPHOS efficiency (40) and this phenotype was transferred to cybrids (42). Moreover, cybrids harboring the m.9011C>T transition showed decreased calcium levels (43).

M.9032T>C associated with NARP

The m.9032T>C/p.MT-ATP6:L169P mutation fulfills all the accepted pathogenicity criteria. It was the best mtDNA candidate mutation to explain a pathologic phenotype (NARP) frequently found associated to pathologic mutations in the *MT-ATP6* gene. It has not been found in normal individuals. It is present in heteroplasmy in the affected individuals, but it was not present in a healthy relative. It changes a highly conserved amino acid in an important transmembrane alpha-helix which is part of the ATP synthase proton channel. This mutation incorporates the same amino acid than other pathologic mutations of the same subunit, such as A105P, A155P, L156P, L170P, L217P, L220P and L222P, also associated to NARP/MILS phenotypes. A proline inside a transmembrane alpha-helix provokes the loss of hydrogen

bonds in the peptide bonds, destabilizes the secondary structure and introduces a kink in the alpha-helix (44,45). Finally, cybrids harboring mutant mtDNA genotypes show OXPHOS dysfunction when compared with the cybrid harboring a normal mtDNA genotype from the same mtDNA haplogroup.

CONCLUSIONS

Our results on P3 patient (m.9032T>C) remark the importance of sequencing the entire *MT-ATP6* gene in NARP/MILS patients. These analyses are providing new pathologic mutations, such as m.8618-8619insT (46), m.8839G>C (47) or m.8989G>C (48), as etiologic factors for these syndromes. Recent results also suggest that *MT-ATP6* sequencing in other mitochondrial pathologies, no previously associated to *MT-ATP6* mutations, unmask already known pathologic mutations as responsible for these clinical conditions, such as m.9185T>C in the Charcot-Marie-Tooth disease (49) or in the episodic weakness (50). Finally, these studies are also revealing new *MT-ATP6* mutations in other mitochondrial disorders, such as m.8528T>C in infantile cardiomyopathy (51) or m.9025G>A and m.9029A>G in 3-methylglutaconic aciduria and hereditary optic neuropathy, respectively (this study). To increase the success rate in the finding of *MT-ATP6* pathologic mutations, this gene should be sequenced at least in those patients suspected of suffering a mtDNA disorder and negatives for histochemical and biochemical analyses of respiratory chain defects. However, a positive marker is still required to improve the diagnostic efficiency of p.MT-ATP6 defects. Maybe, 3-methylglutaconic acid can help to point out *MT-ATP6* mutations.

MATERIALS AND METHODS

Patients screening and case reports

The *MT-ATP6* gene was analyzed by CSGE or by sequencing of DNA obtained from blood or muscle samples of 550 patients that were referred to our laboratory after a suspect of mitochondrial disease. All samples were collected with informed consent of the patients and family members and the study was approved by the Ethics Review Committees of the involved Hospitals and of the Government of Aragón (CEICA 11/2010). These patients included individuals with MILS or NARP, in which we had previously ruled out the presence of the m.8993 and m.9176 mutations by PCR-RFLP. Many others suffered from other pathologies, such as optic neuropathies. Three of these patients presented interesting mutations.

The first patient (P1), a girl, is the first child born from healthy non-consanguineous parents. Familial antecedents were uneventful. The pregnancy was normal and the serology negative. The delivery was at 40 weeks by caesarean section with meconium-stained amniotic fluid. Since birth and due to respiratory depression, bradycardia and hypotonia, mechanic ventilation was applied. Clinical examination showed microcephaly, severe axial hypotonia, low deep tendon reflexes and pin cataract on the left eye. Computerized tomography scan and magnetic resonance imaging (MRI) showed cerebellum and brainstem atrophy and diffuse increased signal on cerebellar white matter. Motor and sensitive neuropathy was detected with electromyography and nerve conduction velocity. The respiratory problems were aggravated in the following days with severe bradycardia that

did not respond to reanimation procedures and lead her to death at 41 days of life. Necropsy studies confirmed severe atrophy of the cerebellum and brainstem. There was loss of granule and Purkinje cells and important astrocytosis of the cerebellar white matter. Clinical picture was of LS but ganglia were not affected on MRI or on the anatomopathologic study.

Lactate, pyruvate and alanine were elevated in blood. Urine organic acid analysis disclosed increased 3-methylglutaconic acid (34 mmol/mol creatinine; control range 5–15). In muscle, normalized respiratory complexes I+III (CI + III), II + III (CII + III) and IV (CIV) activities were not diminished. In the liver, CI + III was severely decreased, CII + III increased and CIV normal. PDH was normal as well (Supplementary Material, Table S1). Normal muscle CI + III and CII + III and elevated liver CII + III activities ruled out a CoQ deficit. Total and non-esterified carnitine levels in the muscle were 26 and 36%, respectively, of the lower limit for the control ranges (Supplementary Material, Table S1).

The second patient (P2) is a 38-year-old caucasian male who first came to our clinic complaining of a 4-year history of progressive visual loss. He was tentatively diagnosed of retinal ischemia 4 months prior to consultation. On examination, his best-corrected visual acuity was 20/80 in the right eye and 20/70 in the left eye. The anterior segments examination was within normal limits. The intraocular pressure was 12 mmHg in both eyes. Posterior segment evaluation showed the temporal half of the optic disc to be pale in both eyes. Visual evoked potentials showed a markedly increased latency in both eyes. Paracentral visual field defects were seen by the Goldmann visual field analysis. He was diagnosed as suffering an atypical LHON. His visual acuity and the anterior and posterior segment exam and visual fields were unchanged after four and a half years of oral multivitamin therapy on daily basis, especially B₆ and B₁₂. Family history was negative for visual loss or neurological disease.

The third patient (P3) is a male resulting from an uncomplicated pregnancy and delivery. He is the second child from non-consanguineous parents. Since birth he showed a mild motor delay. At 12 months, he was admitted to the hospital because of recurrent vomiting episodes and metabolic acidosis that persisted throughout his childhood. His height and weight remained steady at high percentile during development. He had learning difficulties at school. At the age of 7 years, an ophthalmologic evaluation revealed decreased visual acuity and mild bilateral macular pigmentary changes being diagnosed with pigmentary retinopathy. Currently, the patient is 16 years old and the most recent examination has revealed a mild ataxic gait, hypoactive reflexes and bilateral hypoacusia along with visual deficit. He has remained relatively stable for the last years. The laboratory tests, the screening for metabolic disorders including lactate and pyruvate levels in basal conditions, the thyroid and liver function, and the serum creatine kinase level have been repeatedly normal, and the karyotype was also normal. No lactate determination was recorded during any of the metabolic acidosis episodes in his pediatrics history. The electrophysiological study showed a subclinical sensory neuropathy and the brain MRI detects cerebellar vermis atrophy. His mother presented with progressive both unstable gait and bilateral sensorineural hearing loss since more than 15 years ago. She also presented bilateral concentric visual loss with a final diagnosis of retinitis

pigmentosa. Examination disclosed a proximal weakness of lower limbs. The laboratory tests, electrophysiological studies and brain MRI are normal. The grandmother presented visual disturbances without a definitive diagnosis. The clinical phenotype of both patients (mother and son) was highly suggested of NARP syndrome. New sequence accession numbers: GenBank KJ742709-KJ742715.

Molecular-genetic analyses

The *MT-ATP6* gene was screened by CSGE and/or sequencing. The *ATP5G1*, *ATP5G2* and *ATP5G3* genes for the three isoforms of subunit c from the ATP synthase were screened by sequencing. The primers and conditions for these analyses and for the whole mtDNA sequencing are available upon request. The percentage of mutation was studied by the PCR-RFLP analysis (Supplementary Material, Table S2). For the hot-PCR, 2 μ Ci of [α -³²P] dCTP (3000 Ci/mmol) was added and one additional cycle was performed. The mtDNA content was measured by using protocols described elsewhere (52).

Bioinformatics explorations

The possibility of amplifying a nuclear sequence similar to the 1822 bp amplicon, between mtDNA positions 8018–9839, was checked in the mitochondrial pseudogenes database from mitomap (4). The 21 580 human, 3410 eukaryote and 1409 prokaryote p.MT-ATP6 sequences were obtained from GenBank (18 October 2013). The MutPred scores for particular amino acid substitutions were previously provided (6).

Modeling studies of p.MT-ATP6

The structure of *E. coli* subunit a (PDB 1C17) (53) was obtained with the RasMol2.6 program. The intramolecular interactions for the bacterial equivalent positions to p.MT-ATP6:G167 and p.MT-ATP6:S167 were obtained with Swiss-PDB-Viewer v.4.0.1. For this analysis, the *E. coli* equivalent position (histidine 245) in TMH5 was *in silico* mutated to glutamic.

Production, maintenance and functional investigations of transmitochondrial cell lines

To homogenize nuclear and environmental factors, we built transmitochondrial cell lines or cybrids with the osteosarcoma 143B rho⁰ nuclear background using patient and control platelets (54). The genetic fingerprints of the rho⁰ cell line and cybrids were performed with AmpFLSTR® Identifiler® PCR Amplification Kit (Life Technologies). These cybrids were grown in Dulbecco's modified eagle medium with no antibiotics and containing glucose (4.5 g/l), pyruvate (0.11 g/l) and fetal bovine serum (5%).

The analyses of oxygen consumption, ROS, SOD2 mRNA and ATP were performed in triplicate in three independent experiments, according to the previously described protocols (55). Mitochondrial ATP levels were measured using the CellTiter-Glow Luminiscent Cell Viability Assay (Promega) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 20 000 cells/well were seeded 10–12 h before measurement. Then, cells were washed twice with PBS and incubated for 2 h in

record solution with 5 mM 2-deoxy-D-glucose plus 1 mM pyruvate (56). Cells were lysed, and lysates were incubated with the luciferin/luciferase reagents. Samples were measured using a NovoStar MBG Labtech microplate luminometer, and the results referred to the protein quantity.

The determination of the mitochondrial inner membrane potential was also done in triplicate in three independent experiments using Mito-ID Membrane Potential Detection Kit (Enzo Life Sciences).

Statistics analysis

The statistical package StatView 6.0 was used to perform all the statistics. Data for mean and standard deviation are presented. The unpaired two-tailed *t*-test was used to compare parameters. *P*-values < 0.05 were considered statistically significant.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at *HMG* online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Santiago Morales for his help with the figures.

Conflict of Interest statement. None declared.

FUNDING

This work was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (FIS-PI10/00662, PI11/01301, PI11/02350); and Asociación de Enfermos de Patología Mitocondrial (AEPMI). L.L. has a fellowship from Instituto de Salud Carlos III (FI12/00217). R.A. is supported by the 'intensificación de la actividad investigadora' program (ISCI). CIBERER is an initiative of the ISCI.

REFERENCES

- Thorburn, D.R. and Rahman, S. (1993) Mitochondrial DNA-Associated Leigh Syndrome and NARP. In Pagon, R.A., Adam, M.P., Ardinger, H.H., Bird, T.D., Dolan, C.R., Fong, C.T., Smith, R.J.H. and Stephens, K. (eds), *GeneReviews* [Internet], University of Washington, Seattle, WA: 1993–2014. 2003 October 30 [updated 2014 April 17] (www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1173/).
- Schon, E.A., Santra, S., Pallotti, F. and Girvin, M.E. (2001) Pathogenesis of primary defects in mitochondrial ATP synthesis. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **12**, 441–448.
- Vives-Bauza, C., Yang, L. and Manfredi, G. (2007) Assay of mitochondrial ATP synthesis in animal cells and tissues. *Methods Cell Biol.*, **80**, 155–171.
- Mishmar, D., Ruiz-Pesini, E., Brandon, M. and Wallace, D.C. (2004) Mitochondrial DNA-like sequences in the nucleus (NUMTs): insights into our African origins and the mechanism of foreign DNA integration. *Hum. Mutat.*, **23**, 125–133.
- Giordano, C., Iommarini, L., Giordano, L., Maresca, A., Pisano, A., Valentino, M.L., Caporali, L., Liguori, R., Deceglie, S., Roberti, M. et al. (2014) Efficient mitochondrial biogenesis drives incomplete penetrance in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain*, **137**, 335–353.
- Pereira, L., Soares, P., Radivojac, P., Li, B. and Samuels, D.C. (2011) Comparing phylogeny and the predicted pathogenicity of protein variations reveals equal purifying selection across the global human mtDNA diversity. *Am. J. Hum. Genet.*, **88**, 433–439.
- Fillingame, R.H., Angevine, C.M. and Dmitriev, O.Y. (2002) Coupling proton movements to c-ring rotation in F(1)F(o) ATP synthase: aqueous access channels and helix rotations at the a-c interface. *Biochim. Biophys. Acta*, **1555**, 29–36.
- King, M.P. and Attardi, G. (1989) Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science*, **246**, 500–503.
- D'Aurelio, M., Vives-Bauza, C., Davidson, M.M. and Manfredi, G. (2010) Mitochondrial DNA background modifies the bioenergetics of NARP/MILS ATP6 mutant cells. *Hum. Mol. Genet.*, **19**, 374–386.
- Verny, C., Guegen, N., Desquiret, V., Chevrollier, A., Prunéan, A., Dubas, F., Cassereau, J., Ferre, M., Amati-Bonneau, P., Bonneau, D. et al. (2011) Hereditary spastic paraplegia-like disorder due to a mitochondrial ATP6 gene point mutation. *Mitochondrion*, **11**, 70–75.
- Synofzik, M., Schicks, J., Wilhelm, C., Bornemann, A. and Schols, L. (2012) Charcot-Marie-Tooth hereditary neuropathy due to a mitochondrial ATP6 mutation. *Eur. J. Neurol.*, **19**, e114–e116.
- Childs, A.M., Hutchin, T., Pysden, K., Highet, L., Bamford, J., Livingston, J. and Crow, Y.J. (2007) Variable phenotype including Leigh syndrome with a 9185T>C mutation in the MTATP6 gene. *Neuropediatrics*, **38**, 313–316.
- Angevine, C.M. and Fillingame, R.H. (2003) Aqueous access channels in subunit a of rotary ATP synthase. *J. Biol. Chem.*, **278**, 6066–6074.
- Fillingame, R.H., Angevine, C.M. and Dmitriev, O.Y. (2003) Mechanics of coupling proton movements to c-ring rotation in ATP synthase. *FEBS Lett.*, **555**, 29–34.
- Wang, Z., Hicks, D.B., Guffanti, A.A., Baldwin, K. and Krulwich, T.A. (2004) Replacement of amino acid sequence features of a- and c-subunits of ATP synthases of Alkaliphilic Bacillus with the Bacillus consensus sequence results in defective oxidative phosphorylation and non-fermentative growth at pH 10.5. *J. Biol. Chem.*, **279**, 26546–26554.
- Cain, B.D. and Simoni, R.D. (1988) Interaction between Glu-219 and His-245 within the a subunit of F1F0-ATPase in Escherichia coli. *J. Biol. Chem.*, **263**, 6606–6612.
- Cain, B.D. and Simoni, R.D. (1989) Proton translocation by the F1F0ATPase of Escherichia coli. Mutagenic analysis of the a subunit. *J. Biol. Chem.*, **264**, 3292–3300.
- Hartzog, P.E. and Cain, B.D. (1994) Second-site suppressor mutations at glycine 218 and histidine 245 in the alpha subunit of F1F0 ATP synthase in Escherichia coli. *J. Biol. Chem.*, **269**, 32313–32317.
- Howell, N., Herrnstadt, C., Shults, C. and Mackey, D.A. (2003) Low penetrance of the 14484 LHON mutation when it arises in a non-haplogroup J mtDNA background. *Am. J. Med. Genet. A*, **119A**, 147–151.
- Tang, S., Wang, J., Zhang, V.W., Li, F.Y., Landsverk, M., Cui, H., Truong, C.K., Wang, G., Chen, L.C., Graham, B. et al. (2013) Transition to next generation analysis of the whole mitochondrial genome: a summary of molecular defects. *Hum. Mutat.*, **34**, 882–893.
- Durham, S.E., Samuels, D.C., Cree, L.M. and Chinnery, P.F. (2007) Normal levels of wild-type mitochondrial DNA maintain cytochrome c oxidase activity for two pathogenic mitochondrial DNA mutations but not for m.3243A->G. *Am. J. Hum. Genet.*, **81**, 189–195.
- Zhang, D. and Vik, S.B. (2003) Close proximity of a cytoplasmic loop of subunit a with c subunits of the ATP synthase from Escherichia coli. *J. Biol. Chem.*, **278**, 12319–12324.
- Zhang, D. and Vik, S.B. (2003) Helix packing in subunit a of the Escherichia coli ATP synthase as determined by chemical labeling and proteolysis of the cysteine-substituted protein. *Biochemistry*, **42**, 331–337.
- Valiyaveetil, F.I. and Fillingame, R.H. (1997) On the role of Arg-210 and Glu-219 of subunit a in proton translocation by the Escherichia coli F0F1-ATP synthase. *J. Biol. Chem.*, **272**, 32635–32641.
- Hatch, L.P., Cox, G.B. and Howitt, S.M. (1998) Glutamate residues at positions 219 and 252 in the a-subunit of the Escherichia coli ATP synthase are not functionally equivalent. *Biochim. Biophys. Acta*, **1363**, 217–223.
- Kuo, P.H. and Nakamoto, R.K. (2000) Intragenic and intergenic suppression of the Escherichia coli ATP synthase subunit a mutation of Gly-213 to Asn: functional interactions between residues in the proton transport site. *Biochem. J.*, **347**(Pt 3), 797–805.
- Angevine, C.M., Herold, K.A. and Fillingame, R.H. (2003) Aqueous access pathways in subunit a of rotary ATP synthase extend to both sides of the membrane. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100**, 13179–13183.
- Jacobson, D.M. and Stone, E.M. (1991) Difficulty differentiating Leber's from dominant optic neuropathy in a patient with remote visual loss. *J. Clin. Neuroophthalmol.*, **11**, 152–157.

29. Borruat, F.X., Green, W.T., Graham, E.M., Sweeney, M.G., Morgan-Hughes, J.A. and Sanders, M.D. (1992) Late onset Leber's optic neuropathy: a case confused with ischaemic optic neuropathy. *Br. J. Ophthalmol.*, **76**, 571–573.
30. Cawley, N., Molloy, A., Cassidy, L. and Tubridy, N. (2010) Late-onset progressive visual loss in a man with unusual MRI findings: MS, Harding's, Leber's or Leber's Plus? *Ir. J. Med. Sci.*, **179**, 599–601.
31. Yen, M.Y., Wei, Y.H. and Liu, J.H. (1996) Stargardt's type maculopathy in a patient with 11778 Leber's optic neuropathy. *J. Neuroophthalmol.*, **16**, 120–123.
32. Tran, M., Bhargava, R. and MacDonald, I.M. (2001) Leber hereditary optic neuropathy, progressive visual loss, and multiple-sclerosis-like symptoms. *Am. J. Ophthalmol.*, **132**, 591–593.
33. Funalot, B., Reynier, P., Vighetto, A., Ranoux, D., Bonnefont, J.P., Godinot, C., Malthiery, Y. and Mas, J.L. (2002) Leigh-like encephalopathy complicating Leber's hereditary optic neuropathy. *Ann. Neurol.*, **52**, 374–377.
34. Baracca, A., Solaini, G., Sgarbi, G., Lenaz, G., Baruzzi, A., Schapira, A.H., Martinuzzi, A. and Carelli, V. (2005) Severe impairment of complex I-driven adenosine triphosphate synthesis in Leber hereditary optic neuropathy cybrids. *Arch. Neurol.*, **62**, 730–736.
35. Giordano, C., Montopoli, M., Perli, E., Orlandi, M., Fantin, M., Ross-Cisneros, F.N., Caparrotta, L., Martinuzzi, A., Ragazzi, E., Ghelli, A. *et al.* (2011) Oestrogens ameliorate mitochondrial dysfunction in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain*, **134**, 220–234.
36. Carozzo, R., Rizza, T., Stringaro, A., Pierini, R., Mormone, E., Santorelli, F.M., Malorni, W. and Matarrese, P. (2004) Maternally-inherited Leigh syndrome-related mutations bolster mitochondrial-mediated apoptosis. *J. Neurochem.*, **90**, 490–501.
37. Geromel, V., Kadhon, N., Ceballos-Picot, I., Ouari, O., Polidori, A., Munnich, A., Rotig, A. and Rustin, P. (2001) Superoxide-induced massive apoptosis in cultured skin fibroblasts harboring the neurogenic ataxia retinitis pigmentosa (NARP) mutation in the ATPase-6 gene of the mitochondrial DNA. *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 1221–1228.
38. Carelli, V. and Sadun, A.A. (2001) Optic neuropathy in Lhon and Leigh syndrome. *Ophthalmology*, **108**, 1172–1173.
39. Carelli, V., Ross-Cisneros, F.N. and Sadun, A.A. (2004) Mitochondrial dysfunction as a cause of optic neuropathies. *Prog. Retin. Eye Res.*, **23**, 53–89.
40. Lamminen, T., Majander, A., Juvonen, V., Wikstrom, M., Aula, P., Nikoskelainen, E. and Savontaus, M.L. (1995) A mitochondrial mutation at nt 9101 in the ATP synthase 6 gene associated with deficient oxidative phosphorylation in a family with Leber hereditary optic neuroretinopathy. *Am. J. Hum. Genet.*, **56**, 1238–1240.
41. Shidara, K. and Wakakura, M. (2012) Leber's hereditary optic neuropathy with the 3434, 9011 mitochondrial DNA point mutation. *Jpn J. Ophthalmol.*, **56**, 175–180.
42. Majander, A., Lamminen, T., Juvonen, V., Aula, P., Nikoskelainen, E., Savontaus, M.L. and Wikstrom, M. (1997) Mutations in subunit 6 of the F1F0-ATP synthase cause two entirely different diseases. *FEBS Lett.*, **412**, 351–354.
43. Kazuno, A.A., Munakata, K., Tanaka, M., Kato, N. and Kato, T. (2008) Relationships between mitochondrial DNA subhaplogroups and intracellular calcium dynamics. *Mitochondrion*, **8**, 164–169.
44. Vanhoof, G., Goossens, F., De Meester, I., Hendriks, D. and Scharpe, S. (1995) Proline motifs in peptides and their biological processing. *FASEB J.*, **9**, 736–744.
45. Cordes, F.S., Bright, J.N. and Sansom, M.S. (2002) Proline-induced distortions of transmembrane helices. *J. Mol. Biol.*, **323**, 951–960.
46. Lopez-Gallardo, E., Solano, A., Herrero-Martin, M.D., Martinez-Romero, I., Castano-Perez, M.D., Andreu, A.L., Herrera, A., Lopez-Perez, M.J., Ruiz-Pesini, E. and Montoya, J. (2009) NARP syndrome in a patient harbouring an insertion in the MT-ATP6 gene that results in a truncated protein. *J. Med. Genet.*, **46**, 64–67.
47. Blanco-Grau, A., Bonaventura-Ibars, I., Coll-Canti, J., Melia, M.J., Martinez, R., Martinez-Gallo, M., Andreu, A.L., Pinos, T. and Garcia-Arumi, E. (2013) Identification and biochemical characterization of the novel mutation m.8839G>C in the mitochondrial ATP6 gene associated with NARP syndrome. *Genes Brain Behav.*, **12**, 812–820.
48. Duno, M., Wibrand, F., Baggesen, K., Rosenberg, T., Kjaer, N. and Frederiksen, A.L. (2013) A novel mitochondrial mutation m.8989G>C associated with neuropathy, ataxia, retinitis pigmentosa - the NARP syndrome. *Gene*, **515**, 372–375.
49. Pitceathly, R.D., Murphy, S.M., Cottenie, E., Chalasani, A., Sweeney, M.G., Woodward, C., Mudanohwo, E.E., Hargreaves, I., Heales, S., Land, J. *et al.* (2012) Genetic dysfunction of MT-ATP6 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology*, **79**, 1145–1154.
50. Aure, K., Dubourg, O., Jardel, C., Clarysse, L., Sternberg, D., Fournier, E., Laforet, P., Streichenberger, N., Petiot, P., Gervais-Bernard, H. *et al.* (2013) Episodic weakness due to mitochondrial DNA MT-ATP6/8 mutations. *Neurology*, **81**, 1810–1818.
51. Ware, S.M., El-Hassan, N., Kahler, S.G., Zhang, Q., Ma, Y.W., Miller, E., Wong, B., Spicer, R.L., Craigen, W.J., Kozel, B.A. *et al.* (2009) Infantile cardiomyopathy caused by a mutation in the overlapping region of mitochondrial ATPase 6 and 8 genes. *J. Med. Genet.*, **46**, 308–314.
52. Marcuello, A., Gonzalez-Alonso, J., Calbet, J.A., Damsgaard, R., Lopez-Perez, M.J. and Diez-Sanchez, C. (2005) Skeletal muscle mitochondrial DNA content in exercising humans. *J. Appl. Physiol.* (1985), **99**, 1372–1377.
53. Rastogi, V.K. and Girvin, M.E. (1999) Structural changes linked to proton translocation by subunit c of the ATP synthase. *Nature*, **402**, 263–268.
54. Chomyn, A., Lai, S.T., Shakeley, R., Bresolin, N., Scarlato, G. and Attardi, G. (1994) Platelet-mediated transformation of mtDNA-less human cells: analysis of phenotypic variability among clones from normal individuals— and complementation behavior of the tRNALys mutation causing myoclonic epilepsy and ragged red fibers. *Am. J. Hum. Genet.*, **54**, 966–974.
55. Gomez-Duran, A., Pacheu-Grau, D., Lopez-Gallardo, E., Diez-Sanchez, C., Montoya, J., Lopez-Perez, M.J. and Ruiz-Pesini, E. (2010) Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups. *Hum. Mol. Genet.*, **19**, 3343–3353.
56. Gong, S., Peng, Y., Jiang, P., Wang, M., Fan, M., Wang, X., Zhou, H., Li, H., Yan, Q., Huang, T. *et al.* (2014) A deafness-associated tRNAHis mutation alters the mitochondrial function, ROS production and membrane potential. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 8039–8048.



Original Article

New *MT-ND1* pathologic mutation for Leber hereditary optic neuropathy

Íñigo Martínez-Romero PhD,¹ M Dolores Herrero-Martín PhD,¹ Laura Llobet BSc,^{1,5} Sonia Emperador BSc,^{1,5} Antonio Martín-Navarro BSc,¹ Bernat Narberhaus MD,³ Francisco J Ascaso MD PhD,^{4,5} Ester López-Gallardo PhD,^{1,5} Julio Montoya PhD^{1,5} and Eduardo Ruiz-Pesini PhD^{1,2,5}

¹Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular and Centro de Investigaciones Biomédicas en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) and ²Fundación ARAID, Universidad de Zaragoza, ⁴Departamento de Oftalmología, Hospital Clínico Universitario “Lozano Blesa”, ⁵Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón, Zaragoza, and ³Servicio de Neurología, Hospital General de Manresa, Barcelona, Spain

ABSTRACT

Background: Mutations causing Leber hereditary optic neuropathy are usually homoplasmic, show incomplete penetrance, and many of the affected positions are not well conserved through evolution. A large percentage of patients harbouring these mutations have no family history of disease. Moreover, the transfer of the mutation in the cybrid model is frequently not accompanied by the transfer of the cellular, biochemical and molecular phenotype. All these features make difficult their classification as the etiologic factors for this disease. We report a patient who exhibits typical clinical features of Leber hereditary optic neuropathy but lacks all three of the most common mitochondrial DNA mutations.

Methods: The diagnosis was made based on clinical studies. The mitochondrial DNA was completely sequenced, and the candidate mutation was analysed in more than 18 000 individuals around the world, its conservation index was estimated in more than 3100 species from protists to mammals, its position was modelled in the crystal structure of a bacteria ortholog subunit, and its functional consequences were studied in a cybrid model.

Results: Genetic analysis revealed an m.3472T>C transition in the *MT-ND1* gene that changes a phenylalanine to leucine at position 56. Bioinformatics, molecular-genetic analysis and functional studies suggest that this transition is the etiological factor for the disorder.

Conclusions: This mutation expands the spectrum of deleterious changes in mitochondrial DNA-encoded complex I polypeptides associated with this pathology and highlights the difficulties in assigning pathogenicity to new homoplasmic mutations that show incomplete penetrance in sporadic Leber hereditary optic neuropathy patients.

Key words: Leber hereditary optic neuropathy, mitochondrial DNA, mutation, respiratory complex I.

INTRODUCTION

Leber hereditary optic neuropathy (LHON, OMIM 535000) is characterized by severe acute or subacute central vision loss in one eye, soon followed by the fellow eye. It usually plateaus over the next months. Bilateral simultaneous onset occurs in about 25% of patients. In the acute phase, there is optic disc hyperaemia, peripapillary telangiectatic vessels, vascular tortuosity and retinal nerve fibre layer oedema.

■ **Correspondence:** Dr Eduardo Ruiz-Pesini, Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza, C/ Miguel Servet, 177, Zaragoza 50013, Spain. Email: eduruiz@unizar.es

Received 4 December 2013; accepted 21 April 2014.

Competing/conflicts of interest: No stated conflict of interest.

Funding sources: This work was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) [FIS-PI10/00662 to J.M. and PI11/01301 to E.R.-P.] and Asociación de Enfermos de Patología Mitocondrial (AEPMI). L.L. has a fellowship from ISCIII [FI12/00217]. CIBERER is an initiative of the ISCIII.

These changes can be subtle, and approximately 20% of affected individuals show no fundal abnormalities.¹ In some LHON patients, the optic discs look entirely normal at the beginning and then they develop neuroretinal rim pallor after 1 month. Moreover, there is an associated dense central or centrocecal scotoma, and colour vision is significantly impaired. The pupillary light reflexes are relatively preserved. Pathological cupping of the optic disc is also a feature of long-standing LHON cases. It is unusual for symptoms to develop beyond 50 years of age.²

Three mitochondrial DNA (mtDNA) transitions in genes for respiratory complex I (CI) subunits explain approximately 90% of LHON cases (m.3460G>A/*MT-ND1*, m.11778G>A/*MT-ND4* and m.14484T>C/*MT-ND6*). Beside these primary mutations, other changes in mtDNA-encoded CI genes have been associated to LHON, and *MT-ND6* and *MT-ND1* genes have been reported as mutational hot spots for this disorder.^{3,4} However, the pathogenicity of several of these LHON mutations has not been confirmed. This is not an easy task because different disease modifiers influence the pathological consequences of these mutations. Thus, LHON is characterized by incomplete penetrance of homoplasmic mutations.² Moreover, an important percentage of cases have no family history.¹ Here, we report a LHON patient harbouring a new mutation in the *MT-ND1* gene, and the bioinformatics, molecular-genetic and functional studies performed to confirm this mutation as the etiologic factor for his disorder.

METHODS

Clinical phenotyping

The clinical phenotyping was performed by clinical history, early-treatment diabetic retinopathy study group (ETDRS) best-corrected visual acuity (BCVA) charts, anterior segment bio-microscopy, Goldmann applanation intraocular pressure (IOP) measurement, fundus examination, visual field testing using a perimeter (Humphrey Field Analyzer, Carl Zeiss Meditec, Inc., Dublin, CA).

Molecular genetic analysis

Venous blood samples were obtained from the patient and his mother. Total DNA was extracted by standard methods. Screening for the three primary LHON mutations was done by polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism (PCR/RFLP). The complete mtDNA was amplified and sequenced, from patient's blood DNA and DNA from a cybrid harbouring the m.3460G>A mutation, according to previously described protocols.⁵ The

revised human mtDNA Cambridge sequence (GenBank NC_012920) was used as the reference sequence. The percentage of m.3472T>C transition was analysed by PCR/RFLP by using primers HmtL2797 (GTCCTAAACTACCAAACCTGC) and HmtH3733 (ATGATGGCTAGGGTACTTC). The amplicon size is 976 bp, and the PCR conditions 95°C 5 min (95°C 45 s / 56°C 30 s / 72°C 3 min) 35 cycles, 72°C 5 min. The restriction enzyme MboII (GAAGA) cuts the amplicon in four fragments of 510 + 176 + 82 + 208 bp. The m.3472C>T transition removes one cutting site (510 + 258 + 208). The presence of the m.3472T>C mutation in Spaniard controls and patients suffering from optic neuropathy was performed by PCR-RFLP or qRT-PCR, respectively. This qRT-PCR was performed with TaqMan reagents including two primers around the m.3472T>C position and two probes: a fluorophore VIC-labelled probe specific for one allele and other fluorophore FAM-labelled probe specific for the other allele.⁶ The mtDNA levels were determined according protocols previously published.⁵

Construction and maintenance of transmitochondrial cell lines. By using platelets from two patients and two haplogroup-matched controls, four cybrid cell lines were built following protocols previously described.⁷ One of the patients used to built these cybrids is the one here reported with the m.3472T>C mutation, and the other one is a positive control harbouring the LHON m.3460G>A pathologic mutation. The haplogroup-matched controls did not harbour any of these mutations.

Biochemical investigations

The respiratory complex II (CII) and IV (CIV) and the citrate synthase (CS)-specific activities in cell homogenates were determined according to previously described assays.⁸ Mitoprofile Human complex IV Activity and Quantity from Mitosciences (Invitrogen) was used according to the manufacturer's instructions for the determination of CIV activity and levels. The enzymatic activities of CII, CIV and CS were assayed in a NovoStar MBG Labtech microplate instrument. To determine CI-specific activity in mitochondria-enriched homogenates, mitochondrial membranes were obtained from cell cultures.⁹ Thus, cells were harvested with trypsin, washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), and re-suspended in 100 mL PBS plus 100 mL of digitonin solution (4 mg/mL). The cell solution was kept on ice for 10 min to dissolve the membranes. One millilitre of cold PBS was added to the cells, which were spun for 10 min at 10 000 r.p.m. at 4°C. The supernatant was removed and the pellets re-suspended as previously reported.¹⁰ CI activity was determined by following the decrease in absorbance due to the oxidation of

NADH at 340 nm in a Unicam UV500 spectrometer.¹¹ The mitochondrial inner membrane potential, ATP levels and oxygen consumption were determined according to protocols previously published.⁵ In particular, the determination of the mitochondrial inner membrane potential was done using 3,3'-dihexylosacarbocyanine [DiOC₆(3)]. ATP levels were measured using the CellTiter-Glo Luminiscent Cell Viability Assay (Promega) according to the manufacturer's instructions. Oxygen consumption was analysed using the high-resolution oxygraph OROBOROS (Innsbruck, Austria).

Bioinformatic studies

18 037 human p.MT-ND1 sequences and 3121 p.MT-ND1 reference sequences from other species from protists to mammals were obtained from Genbank (May 2013 and December 2012, respectively) and aligned with the multiple sequence alignment program Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). The conservation index was calculated for every amino acid position in pMT-ND1.¹²

Molecular modelling

The structure of *Thermus thermophilus* Nqo8, bacterial ortholog of human p.MT-ND1, subunit was obtained with the RasMol2.6 program (PDB 4HEA).¹³ The bacterial equivalent p.MT-ND1 positions that, when mutated, have been associated to human disorders have been represented in this model.

Statistic analysis

The statistical package StatView 6.0 (Cary, North Carolina, USA) was used to perform all the statistics. Data for mean, standard deviation and sample size are presented. The normal distribution was checked by the Kolmogorov–Smirnov test, and the unpaired two-tailed *t*-test was used to compare parameters. *P*-values of <0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Case report

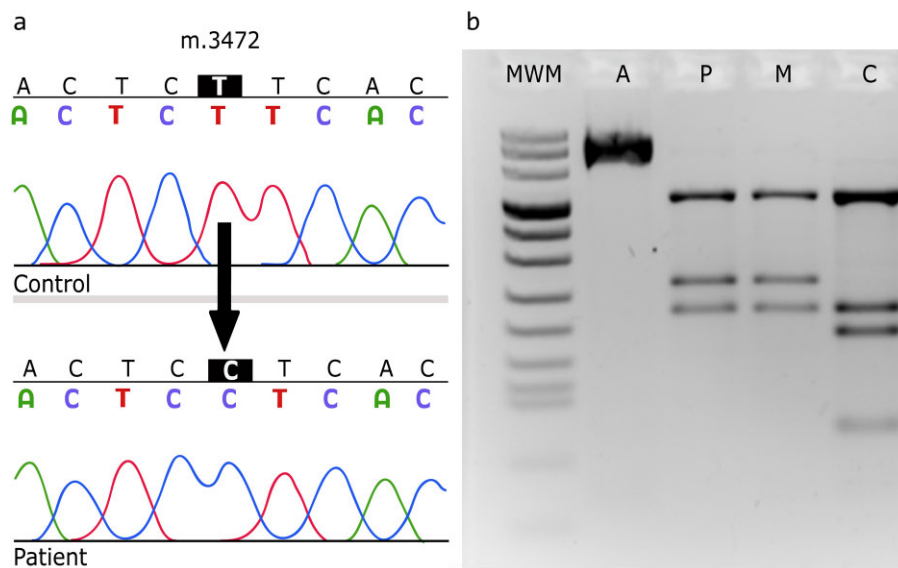
An otherwise healthy 40-year-old man presented to the Emergency department complaining of 6 months of progressive bilateral painless visual loss. BCVA was 20/400 in both eyes. The bio-microscopic examination revealed a normal anterior segment. IOP measured by applanation Goldmann tonometry was 14 mmHg bilaterally. Pupillary light responses were preserved. Fundus examination demonstrated pale optic discs. Visual field testing showed a bilateral

dense central/centrocecal scotoma. Colour vision was markedly reduced. Visual evoked potentials (VEP) of both eyes showed reduced central amplitudes and prolonged latencies. Magnetic resonance imaging of the brain and orbit were normal and no other abnormality was found on a neurology consultation. The absence of a history of alcohol, tobacco or medications ruled out a toxic optic neuropathy. Hemogram, erythrocyte sedimentation rate, hepatic, renal and thyroid function, folic acid and vitamin B₁₂ levels, electrophoretic proteinogram, antinuclear antibodies, rheumatoid factor were normal and serology for syphilis, hepatitis A virus, hepatitis B virus, human immunodeficiency virus, Epstein–Barr virus and varicella zoster virus were negative. He was the only child, and there was no familiar history of similar pathology. The patient gave informed consent for this investigation.

The PCR/RFLP analysis of mtDNA from patient's blood excluded him from being a carrier of one of the three more frequent mutations associated to LHON (m.3460G>A, m.11778G>A and m.14484T>C) (data not shown). The sequencing of the whole mtDNA resulted in the identification of 18 apparently homoplasmic mutations (GenBank: JX401415). Of these mutations, 12 (m.263A>G, m.315-316insC, m.750A>G, m.1438A>G, m.3010G>A, m.3796A>G, m.4769A>G, m.8860A>G, m.15326A>G, m.16189T>C, m.16356T>C, m.16362T>C) defined this patient as belonging to mitochondrial haplogroup H1b1,¹⁴ 5 (m.150C>T, m.309-310insC, m.523delAC, m.16183A>C, m.16519T>C) were located in the control region and had been previously described as population polymorphisms, and the last (m.3472T>C) (Fig. 1a) was a transition in the *MT-ND1* gene that provoked the substitution of a phenylalanine at position 56 of p.MT-ND1 by leucine.

To rule out m.3472T>C as a population polymorphism, we analysed 18 037 mtDNA sequences of persons from all around the world. We found it in three individuals without reported visual problems, one from mtDNA haplogroup V2,¹⁵ one from haplogroup M34¹⁶ and one schizophrenic patient from haplogroup D4b1b1a.¹⁷ Despite this very low population frequency (0.017%), to rule out the possibility that m.3472T>C was a geographically restricted polymorphism, we examined 101 Spaniard control individuals from haplogroup H1 and did not find it. As it has been suggested that a novel mtDNA base change cannot be considered pathogenic until it has been observed independently on two or more occasions and only in association with LHON, showing clear segregation with affected disease status,¹ we also analysed 298 patients suffering from optic neuropathy but without any of the three commonest LHON mutations and did not find it. By PCR/RFLP analysis, we confirmed the

Figure 1. The m.3472T>C transition. (a) Electropherograms showing segments of mtDNA sequences encompassing the m.3472 nucleotide position. Upper and lower electropherograms represent control individual and patient, respectively. (b) Gel showing the RFLP patterns. MWM, A, P, M and C code for molecular weight marker, amplicon, patient, mother and control, respectively.



homoplasmic state of this mutation in the patient's and his mother's blood (Fig. 1b).

A MutPred score has been previously provided for all of the 24 206 possible amino acid variations defined by a single point mutation away from the revised Cambridge reference sequence (rCRS).¹⁸ A MutPred score equal or higher than 0.7 was considered as a high pathogenicity score. The MutPred score for the F56L substitution is 0.746. Thus, the F56L substitution would be classified as a potentially pathogenic mutation. To get an idea about the functional importance on the substitution of this amino acid, we evaluated the conservation index of the phenylalanine at position 56. To perform this analysis, we selected the polypeptide sequence of 3121 different organisms from protists to mammals. The phenylalanine 56 is much more conserved (82.2%) than the mean conservation of the whole protein (58.4%) or the matrix loop that contains it (67.6%) (Fig. 2a). Moreover, this phenylalanine is only four positions away from one of the amino acids most frequently mutated in LHON (m.3460G>A/p.MT-ND1:A52T), and three positions from another pathogenic mutation also located in the same matrix loop (m.3481G>A/p.MT-ND1:E59K). These three positions are part of, and face the same side in, the amphipathic helix 1 (AH1) that frames the entrance into the Q-site¹³ (Fig. 2b). All these results encouraged us to confirm the pathogenic feature of this mutation through the cybrid model.

We constructed a transmitochondrial cell line by using osteosarcoma 143B rho⁰ cells and platelets from this patient. As a negative control, we used a cybrid cell line from the same mtDNA haplogroup (H1) but without any pathologic mutation (Genbank: HM103354). As a positive control, we used a cybrid cell line harbouring the m.3460G>A

pathologic mutation, although because this mtDNA genotype belonged to a different mtDNA haplogroup (J1c) (GenBank: JX401416), we had to compare it to another negative control from the same J1c haplogroup (Genbank: JN635299). There were no significant differences in hydrogen peroxide production, mitochondrially generated ATP or oxygen consumption between mutant and their haplogroup control cybrids (data not shown). However, the mitochondrial inner membrane potential of cybrid with the m.3472T>C mutation was significantly lower than that of its haplogroup control (Fig. 3a), and the mtDNA levels were significantly lower in mutant cybrids than in their haplogroup controls (Fig. 3b). Finally, we determined the specific activities of several respiratory complexes (CI, CII and CIV) and the Krebs cycle enzyme citrate synthase (CS), a nuclear DNA (nDNA)-encoded mitochondrial matrix enzyme commonly used to determine the cell fraction occupied by mitochondria. There were no differences in CS, CII or CIV-specific activities among mutant cybrids and their haplogroup controls. However, CI-specific activity was significantly lower in mutant cybrids when compared to their haplogroup controls (Fig. 4).

DISCUSSION

We describe a LHON patient without any of the three commonest mutations in a 40-year-old male. The patient was not heavily exposed to xenobiotics that could explain its phenotype, and an LHON due to nDNA mutations has never been reported. Therefore, because 10% of LHON cases harbour a rare pathogenic variant in its mtDNA,² we consider the mtDNA m.3472T>C transition as the best candidate mutation to be the etiologic factor for this phenotype.

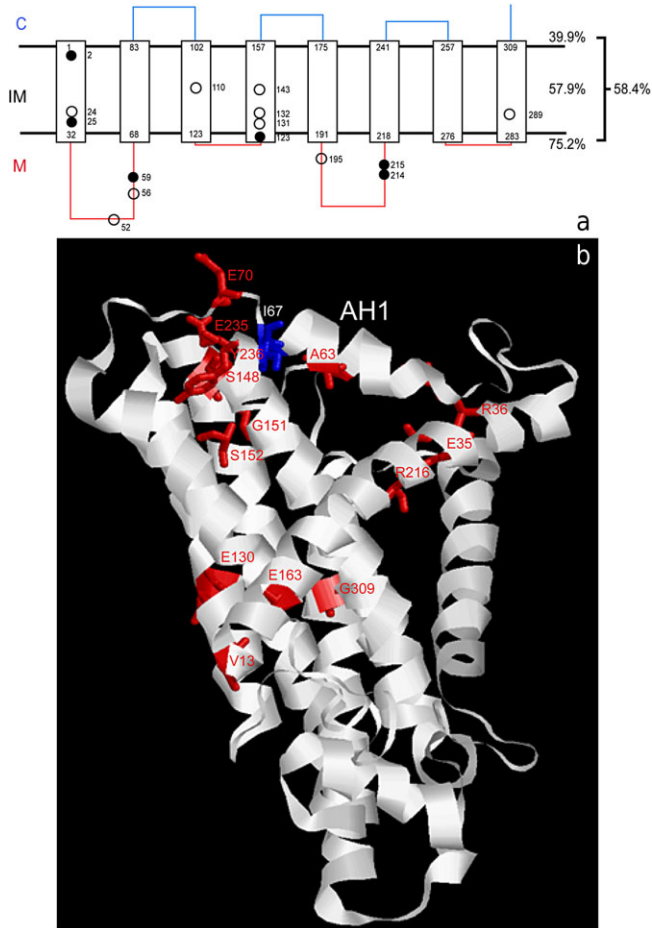


Figure 2. The respiratory complex I p.MT-ND1 subunit. (a) Secondary structure of p.MT-ND1 polypeptide. The rectangles symbolize transmembrane helices. Their limits are indicated.¹³ Blue and red lines symbolize intermembrane and matrix loops, respectively. Pathogenic mutations are denoted by black and white (associated to LHON) dots. Percentages indicate the conservation indexes of intermembrane, transmembrane and matrix domains and the whole protein. C, IM and M code for intermembrane (cytosolic), inner membrane and matrix, respectively. (b) The structure of *Thermus thermophilus* Nqo8 subunit, bacterial ortholog of human p.MT-ND1. The *T. thermophilus* positions V13, E35, R36, A63, I67, E70, E130, S148, G151, S152, E163, R216, E235, Y236 and G309 correspond to human positions affected by pathogenic mutations P2, E24, R25, A52, F56, E59, S110, A128, G131, A132, E143, R195, E214, Y215 and L289, respectively. The new pathogenic mutation, here reported, is represented in blue and the rest in red. AH1 codes for amphipathic helix 1.

However, because mitochondrial genomes harbour large numbers of mutations with no clinical significance, the pathogenic role of new mutations associated with human disease has to be established beyond a reasonable doubt.¹⁹

One of the criteria to confirm the pathogenicity of a particular mutation is that the mutation must be present in patients but absent in controls. As we

found this transition in the mtDNA sequence of three individuals (in two of them, demographic and health status are not known) from more than 18 000 analysed mtDNA genomes, the mutation should not be pathologic. However, other clearly pathologic mutations in the *MT-ND1* gene have been found in population controls (Table 1). Similarly, two LHON common mutations (m.11778G>A and m.14484T>C) in other *MT-ND* genes were previously found in normal controls from a database including approximately 1000 mtDNA genomes.⁴² Moreover, the carrier frequencies of the three major mutations that cause LHON estimated from umbilical cord blood samples were similar (0.70–1.08 per 1000). In particular, the carrier frequency for the m.3460G>A transition in the *MT-ND1* gene was 1.07.⁴³ If m.3472T>C had the same carrier frequency than m.3460G>A, then we should have found this mutation in approximately 17 of the 18 436 analysed individuals. Therefore, this mutation is more rare in controls (0.11 per 1000) than other clearly pathologic LHON mutations. Thus, the finding of this pathological mutation in control individuals might be due to errors in the sequencing process of normal individuals without the mutation; because the pathological conditions of the supposed “control individuals” were not reported; or because this mutation show incomplete penetrance, as it is known for the LHON common mutations, and other factors (genetic, physiologic, anatomic or environmental) required to express the disease are absent in control individuals with the mutation. The last would also explain the absence of phenotype in this patient’s mother, as it is the case for many mothers of patients with one of the LHON common mutations. In fact, 90% of females who harbour a primary LHON-causing mtDNA mutation do not develop blindness.¹ Thus, it has been found that the different exposure to oestrogens is sufficient to modify the severity of mitochondrial dysfunction induced by mtDNA mutations affecting CI in LHON⁴⁴ then determining the predilection for males. Moreover, two of the four reported individuals with the m.3472T>C mutation suffer disorders that have been associated to mtDNA pathologic mutations: LHON and schizophrenia.⁴⁵ Interestingly, it has been recently described a patient displaying both schizophrenia and LHON that harboured the m.3460G>A mutation. Three of his relatives had similar patterns of visual loss, without psychiatric disorders.⁴⁶

A second pathogenicity criterion for an mtDNA mutation is the heteroplasmic status of the mutation, that is, the existence of normal and mutant mtDNA in the same individual. Although most of *MT-ND1* LHON mutations have been found heteroplasmic in one or more individuals, this is not the normal scenario. Heteroplasmy is present in less than 15% of individuals with an LHON-causing mtDNA

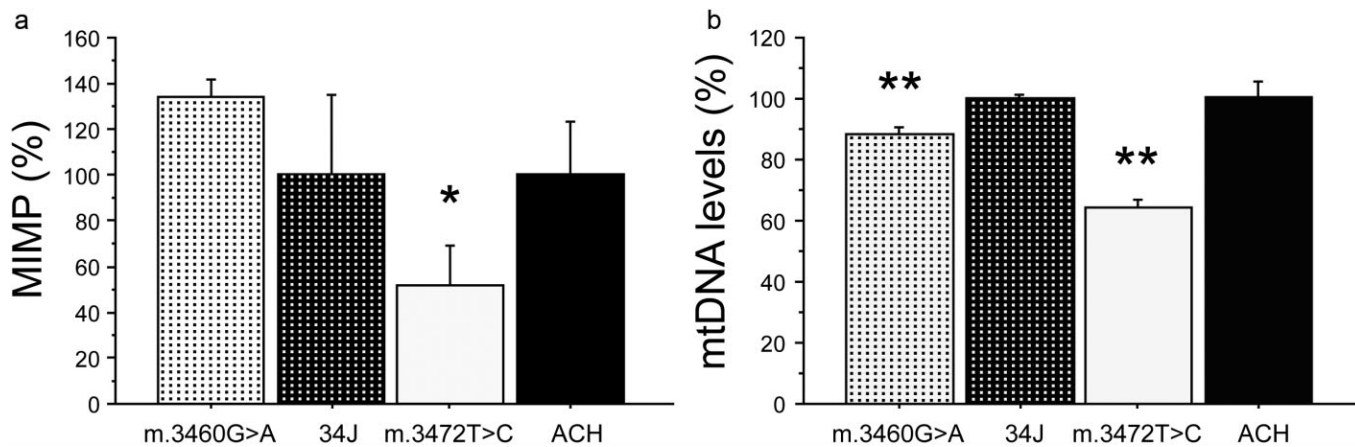


Figure 3. Mitochondrial inner membrane potential (MIMP) and mitochondrial DNA levels. The values for haplogroup controls (haplogroup J, 34J and haplogroup H, ACH) have been settled at 100%. Each of these determinations was performed, at least, three times. (a) Mitochondrial inner membrane potential (MIMP). * $P = 0.0432$. (b) Mitochondrial DNA levels. ** $P \leq 0.0027$.

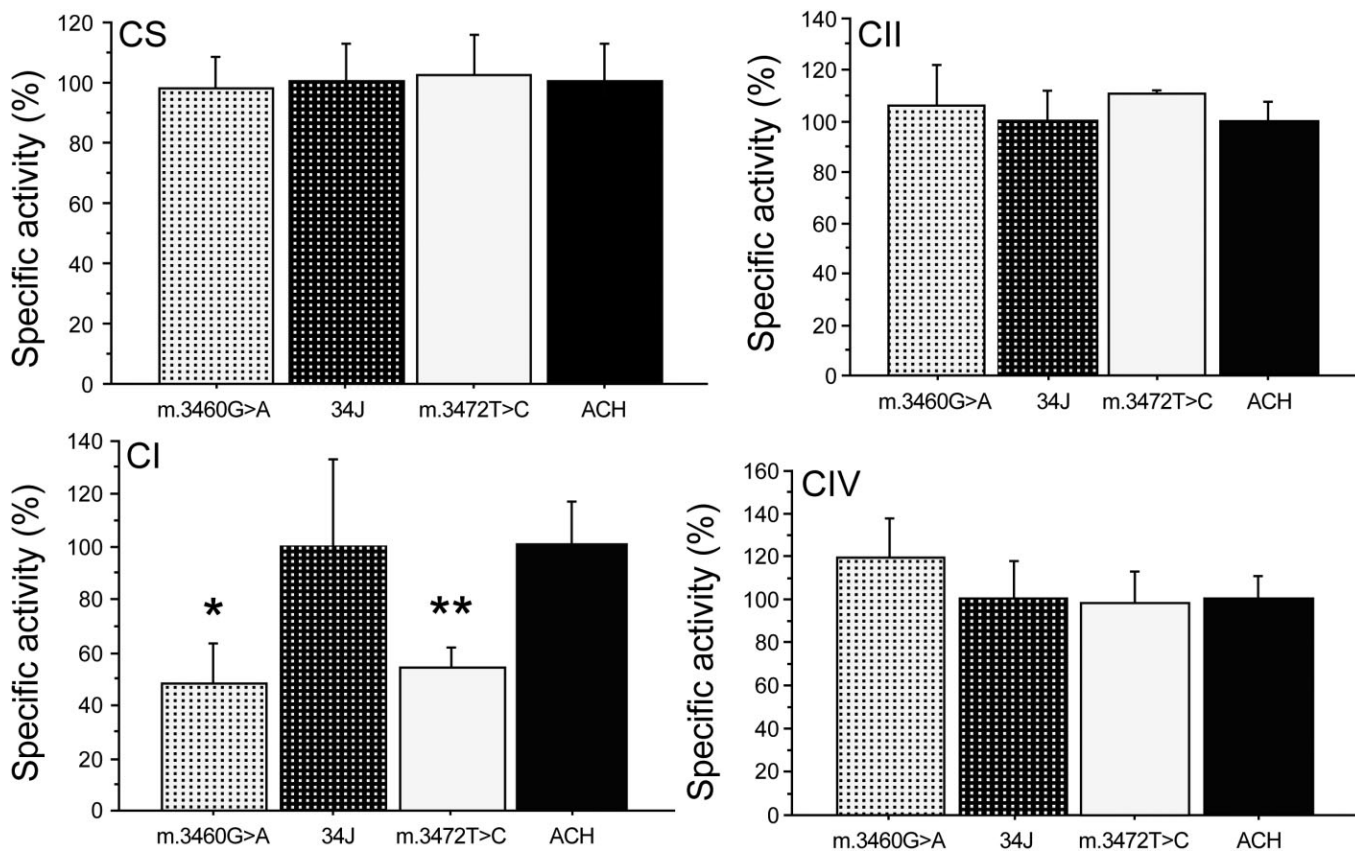


Figure 4. Citrate synthase and respiratory complexes-specific activities. The values for haplogroup controls (haplogroup J, 34J and haplogroup H, ACH) have been settled at 100%. Each of these determinations was performed, at least, three times. * $P = 0.0394$; ** $P = 0.0027$.

mutation.¹ Similarly, the m.3472T>C mutation was homoplasmic in the patient and his mother.

A third principle to confirm the pathogenicity of a particular mutation is that the mutation must affect a highly conserved amino acid position. A high conser-

vation index means that the particular amino acid is functionally important and any change will be deleterious. The phenylalanine at position 56 is in the same conservation range or much more conserved than several *MT-ND1* pathologic mutations associated

Table 1. Pathologic mutations of the p.MT-ND1 polypeptide. To consider a previously published p.MT-ND1 mutation as a pathologic one, the mutation should fulfil at least one of these two criteria: First, the mutation should be present in more than one pathologic pedigree, and its population frequency should be extremely low. Second, phenotypic differences should be shown between cell models harbouring different percentages of mutant and control mtDNAs

p.MT-ND1	Phenotype	Ho/He	Several pedigrees	Controls	CI (%) (3121 spp)	Confirmation	References
m.3310C>Tp.P2S	NIDDM/HCM	He	N	Y [†]	1.5	C	20
m.3376G>Ap.E24K	MELAS/LHON	He	N	N	98.8	N(b)	21,22
m.3380G>Ap.R25Q	MELAS	He	N	Y [‡]	98.6	SF	23
m.3460G>Ap.A52T	LHON	Ho/He	Y	N	33.8	C(b)	Many reports ²⁴
m.3472G>Ap.F56L	LHON/Sch	Ho	Y	Y[§]	82.2	C	Present work¹⁷
m.3481G>Ap.E59K	MELAS/EM	He	Y	N	95.5	C	25,26
m.3635G>Ap.S110N	LHON	Ho/He	Y	N	89.8	C	27–31
m.3688G>Ap.A128T	LS	Ho	N	N	79.2	C	32
m.3697G>Ap.G131S	MELAS/LHON/D	He	Y	N	98.0	H	32–35
m.3700G>Ap.A132T	LHON	Ho	Y	N	73.0	N	36,37
m.3733G>Ap.E143K	LHON	Ho/He	Y	N	99.1	N	4,37
m.3890G>Ap.R195Q	LHON/LS	He	Y	N	99.2	C	26,38
m.3946G>Ap.E214K	MELAS	He	N	Y [¶]	98.8	H(b)	33,39
m.3949T>Cp.Y215H	MELAS	He	N	Y ^{††}	93.5	H(b)	33,39
m.4171C>Ap.L289M	LHON	Ho/He	Y	N	27.9	N	37,40,41

[†](Genbank AAR91258, ABL61619, ACS48909, ADN11253, AEH03872, AFG10524, AFN09684); [‡](Genbank AAO88618); [§](Genbank AAX15615, ABR94125); [¶](Genbank ABO39439); ^{††}(Genbank ABR58707, this sequence belongs to a patient with an oncocytic thyroid carcinoma with papillary features). The m.3376G>A transition is the only *MT-ND1* mutation of this table whose pathogenicity has not been confirmed by cybrids, hybrids or single fibres or has not been found in several pathologic pedigrees. However, several other features suggest that is a pathologic mutation. NIDDM, non-insulin-dependent diabetes mellitus; HCM, hypertrophic cardiomyopathy; MELAS, mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes; LHON, Leber hereditary optic neuropathy; Sch, schizophrenia; EM, encephaloMyopathy; LS, Leigh Syndrome; D, dystonia; Ho, homosplasy; He, heteroplasy; N, no; Y, yes; CI, conservation index; C, cybrids; b, bacteria; SF, single fibres; H, hybrids.

to LHON (Table 1). A pathologic mutation will usually affect an important domain of the polypeptide. The F56L mutation alters a position in an amphipathic helix (AH1). It has been proposed that this domain would be important to connect the membrane and matrix parts of CI and also to contribute to the coenzyme Q-binding site¹³ (Fig. 2b). In this sense, it is very interesting that one of the AH1 sides contains highly conserved charged amino acids, such as K54 (K65 in *T. thermophilus*) that forms a salt bridge with an aspartate of the matrix NDUFS7 subunit (Nqo6 in *T. thermophilus*), and the other side, encompassing the A52T and F56L mutations, is hydrophobic and contribute to frame the entrance into the Q-site.

It was previously recommended that, to put the assignment of pathogenicity for a novel LHON primary mutation on a firmer footing, the complete sequence of the mtDNA-encoded CI genes and functional studies on cybrids should be performed.⁴⁷ We have completed these requests and have found significant differences between mutant and control cybrids in some mitochondrial parameters, such as CI-specific activity, mitochondrial inner membrane potential or mtDNA levels, but there were not differences in other important mitochondrial variables, such as oxygen consumption, reactive oxygen species (ROS) production or ATP levels. This is not rare and many cybrids harbouring LHON mutations

have been reported that showed differences in some, but not all, mitochondrial parameters.^{27,48,49} Thus, similar to the cybrids here reported, cybrids with one of the commonest LHON mutations can show normal respiration,^{50–52} ROS production⁵³ or ATP levels^{51,54} and isolated deficiency in CI activity⁵⁰ or lower mtDNA levels.⁹

Taken all the previous facts into account, the evidence presented strongly suggests that the m.3472T>C transition is the etiologic factor for this LHON patient. Similar to our patient, a third of genetically confirmed patients for the commonest LHON mutations have no a history of similarly affected relatives.⁵⁵ Moreover, most of LHON patients are homoplasmic for their pathologic mutations and LHON mutations are usually characterized by incomplete penetrance.² Finally, some parameters indicating mitochondrial dysfunction have not been transferred with the pathologic mutation in several cybrid models. For all these reasons, it is really difficult to assign pathogenicity to new homoplasmic mutations, with incomplete penetrance, in sporadic LHON patients. However, another report of this mutation in a LHON pathologic pedigree could change its pathologic status from 'provisional' to 'confirmed' but, after analysing 298 patients suffering from optic neuropathy without any of the three commonest LHON mutations, we have not find it.

REFERENCES

1. Yu-Wai-Man P, Chinnery PF. Leber Hereditary Optic Neuropathy. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, Adam MP, eds. *Leber Hereditary Optic Neuropathy*. Seattle, WA: University of Washington, Seattle, 2010. 03/20 edn., 1993–2000 Oct 26 [updated 2012 Apr 19].
2. Sitarz KS, Chinnery PF, Yu-Wai-Man P. Disorders of the optic nerve in mitochondrial cytopathies: new ideas on pathogenesis and therapeutic targets. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2012; **12**: 308–17.
3. Chinnery PF, Brown DT, Andrews RM *et al*. The mitochondrial ND6 gene is a hot spot for mutations that cause Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain* 2001; **124**: 209–18.
4. Valentino ML, Barboni P, Ghelli A *et al*. The ND1 gene of complex I is a mutational hot spot for Leber's hereditary optic neuropathy. *Ann Neurol* 2004; **56**: 631–41.
5. Gomez-Duran A, Pacheu-Grau D, Lopez-Gallardo E *et al*. Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups. *Hum Mol Genet* 2010; **19**: 3343–53.
6. Pacheu-Grau D, Perez-Delgado L, Gomez-Diaz C, Fraile-Rodrigo J, Montoya J, Ruiz-Pesini E. Mitochondrial ribosome and Meniere's disease: a pilot study. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2012; **269**: 2003–8.
7. 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^{Lys} mutation causing myoclonic epilepsy and ragged red fibers. *Am J Hum Genet* 1994; **54**: 966–74.
8. Gomez-Duran A, Pacheu-Grau D, Martinez-Romero I *et al*. Oxidative phosphorylation differences between mitochondrial DNA haplogroups modify the risk of Leber's hereditary optic neuropathy. *Biochim Biophys Acta* 2012; **1822**: 1216–22.
9. Pello R, Martin MA, Carelli V *et al*. Mitochondrial DNA background modulates the assembly kinetics of OXPHOS complexes in a cellular model of mitochondrial disease. *Hum Mol Genet* 2008; **17**: 4001–11.
10. Fernandez-Vizarra E, Lopez-Perez MJ, Enriquez JA. Isolation of biogenetically competent mitochondria from mammalian tissues and cultured cells. *Methods* 2002; **26**: 292–7.
11. Birch-Machin MA, Turnbull DM. Assaying mitochondrial respiratory complex activity in mitochondria isolated from human cells and tissues. *Methods Cell Biol* 2001; **65**: 97–117.
12. Ruiz-Pesini E, Mishmar D, Brandon M, Procaccio V, Wallace DC. Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA. *Science* 2004; **303**: 223–6.
13. Baradaran R, Berrisford JM, Minhas GS, Sazanov LA. Crystal structure of the entire respiratory complex I. *Nature* 2013; **494**: 443–8.
14. van Oven M, Kayser M. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum Mutat* 2009; **30**: E386–94.
15. Herrnstadt C, Elson JL, Fahy E *et al*. Reduced-median-network analysis of complete mitochondrial DNA coding-region sequences for the major African, Asian, and European haplogroups. *Am J Hum Genet* 2002; **70**: 1152–71.
16. Sun C, Kong QP, Palanichamy MG *et al*. The dazzling array of basal branches in the mtDNA macrohaplogroup M from India as inferred from complete genomes. *Mol Biol Evol* 2006; **23**: 683–90.
17. Ueno H, Nishigaki Y, Kong QP *et al*. Analysis of mitochondrial DNA variants in Japanese patients with schizophrenia. *Mitochondrion* 2009; **9**: 385–93.
18. Pereira L, Soares P, Radivojac P, Li B, Samuels DC. Comparing phylogeny and the predicted pathogenicity of protein variations reveals equal purifying selection across the global human mtDNA diversity. *Am J Hum Genet* 2011; **88**: 433–9.
19. DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Am J Med Genet* 2001; **106**: 18–26.
20. Chen J, Hattori Y, Nakajima K *et al*. Mitochondrial complex I activity is significantly decreased in a patient with maternally inherited type 2 diabetes mellitus and hypertrophic cardiomyopathy associated with mitochondrial DNA C3310T mutation: a cybrid study. *Diabetes Res Clin Pract* 2006; **74**: 148–53.
21. Blakely EL, de Silva R, King A *et al*. LHON/MELAS overlap syndrome associated with a mitochondrial MTND1 gene mutation. *Eur J Hum Genet* 2005; **13**: 623–7.
22. Patsi J, Maliniemi P, Pakanen S *et al*. LHON/MELAS overlap mutation in ND1 subunit of mitochondrial complex I affects ubiquinone binding as revealed by modeling in *Escherichia coli* NDH-1. *Biochim Biophys Acta* 2012; **1817**: 312–8.
23. Horvath R, Reilmann R, Holinski-Feder E, Ringelstein EB, Klopstock T. The role of complex I genes in MELAS: a novel heteroplasmic mutation 3380G>A in ND1 of mtDNA. *Neuromuscul Disord* 2008; **18**: 553–6.
24. Zickermann V, Barquera B, Wikstrom M, Finel M. Analysis of the pathogenic human mitochondrial mutation ND1/3460, and mutations of strictly conserved residues in its vicinity, using the bacterium *Paracoccus denitrificans*. *Biochemistry* 1998; **37**: 11792–6.
25. Malfatti E, Bugiani M, Invernizzi F *et al*. Novel mutations of ND genes in complex I deficiency associated with mitochondrial encephalopathy. *Brain* 2007; **130**: 1894–904.
26. Moslemi AR, Darin N, Tulinius M, Wiklund LM, Holme E, Oldfors A. Progressive encephalopathy and complex I deficiency associated with mutations in MTND1. *Neuropediatrics* 2008; **39**: 24–8.
27. Brown MD, Zhadanov S, Allen JC *et al*. Novel mtDNA mutations and oxidative phosphorylation dysfunction in Russian LHON families. *Hum Genet* 2001; **109**: 33–9.
28. Yang J, Zhu Y, Tong Y *et al*. Confirmation of the mitochondrial ND1 gene mutation G3635A as a primary LHON mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; **386**: 50–4.
29. Zhang AM, Zou Y, Guo X, Jia X, Zhang Q, Yao YG. Mitochondrial DNA mutation m.3635G>A may be

- associated with Leber hereditary optic neuropathy in Chinese. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; **386**: 392–5.
30. Jia X, Li S, Wang P, Guo X, Zhang Q. mtDNA m.3635G>A may be classified as a common primary mutation for Leber hereditary optic neuropathy in the Chinese population. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; **403**: 237–41.
 31. Bi R, Zhang AM, Jia X, Zhang Q, Yao YG. Complete mitochondrial DNA genome sequence variation of Chinese families with mutation m.3635G>A and Leber hereditary optic neuropathy. *Mol Vis* 2012; **18**: 3087–94.
 32. Valente L, Piga D, Lamantea E *et al.* Identification of novel mutations in five patients with mitochondrial encephalomyopathy. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1787**: 491–501.
 33. Kirby DM, McFarland R, Ohtake A *et al.* Mutations of the mitochondrial ND1 gene as a cause of MELAS. *J Med Genet* 2004; **41**: 784–9.
 34. Morava E, Hamel B, Hol F, Rodenburg R, Smeitink J. Mitochondrial dysfunction in Stuve–Wiedemann syndrome in a patient carrying an ND1 gene mutation. *Am J Med Genet A* 2006; **140**: 2248–50.
 35. Spruijt L, Smeets HJ, Hendrickx A *et al.* A MELAS-associated ND1 mutation causing Leber hereditary optic neuropathy and spastic dystonia. *Arch Neurol* 2007; **64**: 890–3.
 36. Fauser S, Lubrichs J, Besch D, Leo-Kottler B. Sequence analysis of the complete mitochondrial genome in patients with Leber's hereditary optic neuropathy lacking the three most common pathogenic DNA mutations. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **295**: 342–7.
 37. Achilli A, Iommarini L, Olivieri A *et al.* Rare primary mitochondrial DNA mutations and probable synergistic variants in Leber's hereditary optic neuropathy. *PLoS ONE* 2012; **7**: e42242.
 38. Caporali L, Ghelli AM, Iommarini L *et al.* Cybrid studies establish the causal link between the mtDNA m.3890G>A/MT-ND1 mutation and optic atrophy with bilateral brainstem lesions. *Biochim Biophys Acta* 2013; **1832**: 445–52.
 39. Kervinen M, Hinttala R, Helander HM *et al.* The MELAS mutations 3946 and 3949 perturb the critical structure in a conserved loop of the ND1 subunit of mitochondrial complex I. *Hum Mol Genet* 2006; **15**: 2543–52.
 40. Kim JY, Hwang JM, Park SS. Mitochondrial DNA C4171A/ND1 is a novel primary causative mutation of Leber's hereditary optic neuropathy with a good prognosis. *Ann Neurol* 2002; **51**: 630–4.
 41. Yang J, Zhu Y, Chen L *et al.* Novel A14841G mutation is associated with high penetrance of LHON/C4171A family. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; **386**: 693–6.
 42. Howell N, Herrnstadt C, Shults C, Mackey DA. Low penetrance of the 14484 LHON mutation when it arises in a non-haplogroup J mtDNA background. *Am J Med Genet A* 2003; **119A**: 147–51.
 43. Elliott HR, Samuels DC, Eden JA, Relton CL, Chinnery PF. Pathogenic mitochondrial DNA mutations are common in the general population. *Am J Hum Genet* 2008; **83**: 254–60.
 44. Giordano C, Montopoli M, Perli E *et al.* Oestrogens ameliorate mitochondrial dysfunction in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain* 2011; **134**: 220–34.
 45. Verge B, Alonso Y, Valero J, Miralles C, Vilella E, Martorell L. Mitochondrial DNA (mtDNA) and schizophrenia. *Eur Psychiatry* 2011; **26**: 45–56.
 46. Boyer L, Guedj E, Dassa D, Lancon C. Leber's hereditary optic neuropathy associated with schizophrenia. *J Clin Psychiatry* 2012; **73**: e1158–9.
 47. Mitchell AL, Elson JL, Howell N, Taylor RW, Turnbull DM. Sequence variation in mitochondrial complex I genes: mutation or polymorphism? *J Med Genet* 2006; **43**: 175–9.
 48. Ghelli A, Zanna C, Porcelli AM *et al.* Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) pathogenic mutations induce mitochondrial-dependent apoptotic death in transmitochondrial cells incubated with galactose medium. *J Biol Chem* 2003; **278**: 4145–50.
 49. Sala G, Trombin F, Beretta S *et al.* Antioxidants partially restore glutamate transport defect in Leber hereditary optic neuropathy cybrids. *J Neurosci Res* 2008; **86**: 3331–7.
 50. 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**: 39831–6.
 51. Baracca A, Solaini G, Sgarbi G *et al.* Severe impairment of complex I-driven adenosine triphosphate synthesis in leber hereditary optic neuropathy cybrids. *Arch Neurol* 2005; **62**: 730–6.
 52. Floreani M, Napoli E, Martinuzzi A *et al.* Antioxidant defences in cybrids harboring mtDNA mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *FEBS J* 2005; **272**: 1124–35.
 53. Wong A, Cavelier L, Collins-Schramm HE *et al.* Differentiation-specific effects of LHON mutations introduced into neuronal NT2 cells. *Hum Mol Genet* 2002; **11**: 431–8.
 54. Beretta S, Mattavelli L, Sala G *et al.* Leber hereditary optic neuropathy mtDNA mutations disrupt glutamate transport in cybrid cell lines. *Brain* 2004; **127**: 2183–92.
 55. Harding AE, Sweeney MG, Govan GG, Riordan-Eva P. Pedigree analysis in Leber hereditary optic neuropathy families with a pathogenic mtDNA mutation. *Am J Hum Genet* 1995; **57**: 77–86.



Short communication

Mitochondrial DNA haplogroups and risk of new-onset diabetes among tacrolimus-treated renal transplanted patients



Beatriz Tavira^a, Juan Gómez^a, Carmen Díaz-Corte^b, Laura Llobet^{c,d}, Eduardo Ruiz-Pesini^{c,d}, Francisco Ortega^{b,e}, Eliecer Coto^{a,e,f,*}

^a Genética Molecular, Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), Oviedo, Spain

^b Nefrología, Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), Oviedo, Spain

^c Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain

^d Centro de Investigaciones Biomédicas En Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain

^e Fundación Renal I. Alvarez de Toledo, Madrid, Spain

^f Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 13 January 2014

Available online 18 January 2014

Keywords:

Post-transplant diabetes

Tacrolimus

Mitochondria

Haplogroups

ABSTRACT

Background and aims: Tacrolimus (Tac) is an immunosuppressive drug widely used to avoid organ rejection. New-onset diabetes after transplantation (NODAT) is a major complication among transplanted patients who receive Tac. The increased risk for NODAT could be partly mediated by the effect of Tac on mitochondria from pancreatic beta-cells. Common and rare mitochondrial DNA variants have been linked to the risk of diabetes. Our aim was to determine whether mtDNA polymorphisms/haplogroups were associated with NODAT in Tac-treated kidney transplanted.

Methods: Seven polymorphisms that define the common European haplogroups were determined in 115 NODAT and 197 no-NODAT patients.

Results: Haplogroup H was significantly more frequent in the NODAT group (50% vs. 35%; $p = 0.01$, OR = 1.82). There was no difference between patients without and with ($n = 106$) D2M prior to the transplant.

Conclusions: Mitochondrial haplogroup H was associated with the risk for NODAT among Tac-treated transplanted patients. The reported differences between the mtDNA variants could explain the increased NODAT-risk among H-patients.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

New-onset diabetes after transplantation (NODAT) is a frequent complication in patients who receive immunosuppressive therapy with the calcineurin inhibitor tacrolimus (Tac; FK506) (Balla and Chobanian, 2007; Rodrigo et al., 2005). Although the diabetogenic effect is reversible after its withdrawal, patients who receive a solid organ require a continuous use of Tac to avoid organ rejection. NODAT is thus considered an important health issue, and the search for biological markers that could help to predict the risk of developing NODAT is important to optimize the immunosuppressive regimen.

There is growing evidence that mitochondria play a relevant role in DM2. Tac decreased insulin secretion and reduced mitochondrial density and function, suggesting that posttransplantation diabetes induced by this immunosuppressor may be mediated by its effects on

mitochondrial function (Rostambeigi et al., 2011). We have previously shown that Tac provokes an important decrease in oxygen consumption, accompanied by a slight reduction in the synthesis of mitochondrial DNA-encoded proteins (Palacin et al., 2013).

Recent studies have identified DNA variants associated with NODAT-risk among Tac-treated patients (Ghisal et al., 2009; Kang et al., 2009; Tavira et al., 2011a, 2012). These polymorphisms were in nuclear genes linked to the risk of developing type 2 diabetes (DM2) that encoded proteins involved in beta-cell function (Schwanstecher et al., 2002; Scott et al., 2007; Sladek et al., 2007; Yang et al., 2011). Rare mtDNA mutations have been found among patients with maternally transmitted syndromes that included diabetes among the spectra of clinical manifestations (de Andrade et al., 2006; Maassen et al., 2004; Madsen-Bouterse et al., 2010; van den Ouweland et al., 1992; Wang et al., 2010). Also, common mtDNA variants have been associated with the risk of developing DM2 in the general population (Fuku et al., 2007; Poulton et al., 2002; Wang et al., 2009). Differences between common mtDNA polymorphisms in mitochondrial matrix pH and intracellular calcium dynamics, reactive oxygen species (ROS) production and oxidative phosphorylation (OXPHOS) capacity could explain the association with DM2 (Gómez-Durán et al., 2010; Kazuno et al., 2006; Rostambeigi et al., 2011). A recent study reported that cybrids with

Abbreviations: Tac, tacrolimus; DM2, type 2 diabetes; NODAT, new-onset diabetes after transplantation; ROS, reactive oxygen species; OXPHOS, oxidative phosphorylation; mtDNA, mitochondrial DNA; OGTT, oral glucose tolerance test; FPG, fasting plasma glucose; BMI, body mass index.

* Corresponding author at: Genética Molecular, Hospital Universitario Central de Asturias, 33006 Oviedo, Spain. Tel./fax: +34 985107968.

E-mail address: eliecer.coto@sespa.princast.es (E. Coto).

diabetes-susceptibility and diabetes-resistant haplogroups showed significant differences in cell signaling pathways in response to insulin treatment (Weng et al., 2013).

Based on these evidences we hypothesized that common mtDNA variants could contribute to the risk of developing NODAT among Tac-treated patients.

2. Methods

2.1. Patients and immunosuppressive regimen

The study involved a total of 312 patients who received a cadaveric kidney and were treated with a standard immunosuppressive therapy with the oral twice a day formulation of Tac (Prograf TM, Astellas Pharm), Mycophenolate mophetyl, and steroids, as previously reported (Tavira et al., 2011b). None of the 312 patients had DM2 at the time of transplantation. Following the WHO guidelines, DM2 was defined as a fasting plasma glucose (FPG) > 125 mg/dL (7.0 mmol/L) after three consecutive measurements. Oral glucose tolerance test (OGTT) was not performed to all the patients, and the definition of DM2 was thus based on the FPG values. We also studied a group of 106 patients with a history of DM2 prior to the time of kidney transplantation. All the patients were Caucasians from the region of Asturias (Northern Spain, total population 1 million). The study was approved by the Ethical Committee of HUCA, and all the patients gave their informed consent to participate.

Starting with a dose of 0.2 mg/kg per day, the Tac blood concentration was determined 12 h postdose (immediately before receiving the next dose) with an automated chemiluminescent immunoassay (CMIA) and the Arquitect@Tacrolimus assay (Abbott Laboratories, Illinois, USA). The dose was adjusted to reach a blood concentration of 10–20 ng/ml at one week PT and 5–15 ng/ml thereafter.

2.2. Mitochondrial DNA analysis

The DNA was obtained from blood leukocytes and the mtDNA polymorphisms that define the common European haplogroups were determined following a polymerase chain reaction restriction fragment

length polymorphism (PCR-RFLP) procedure (Supplementary tables) (Coto et al., 2011; Palacín et al., 2011).

2.3. Statistical analysis

Haplogroup frequencies were compared between NODAT and no-NODAT through the Chi-squared test. The ANOVA and t-Student's tests were used to compare the mean values between the groups. Lineal regression and logistic binary regression were used to determine the influence of the different variables (age, gender, Tac dose, BMI, genotypes) on NODAT-risk. A $p < 0.05$ was the cut-off value to consider significant all the statistical comparisons. The statistical power was calculated online (<http://statpages.org/proppowr.html>).

3. Results

Compared to the no-NODAT group, NODAT patients had significantly higher mean age ($p = 0.004$) and BMI ($p = 0.01$) (Table 1). There was a significantly higher frequency of mtDNA haplogroup H among the NODAT groups ($p = 0.01$), with an OR = 1.82 (95%CI = 1.14–2.91) (Table 2). The sample size (115 NODAT + 197 no-NODAT) was sufficient for a power of 73%. For an 80% power at a $p = 0.05$ and a 1.5 no-NODAT/NODAT ratio, a total of 212 and 142 patients should be necessary. Haplogroup H remained significantly associated in the multivariate analysis (Supplementary tables). Haplogroup H was more frequent among the 106 patients with pre-transplant DM2 (42%) compared to the 312 without DM2 at the time of transplant (40%), but the difference was not significant.

4. Discussion

The diabetogenic effect of Tac could be mediated in part by its effect on mitochondrial function (Palacín et al., accepted for publication; Rostambeigi et al., 2011). Pathways that involved membrane trafficking, cytoskeleton remodeling, and ATP metabolism were significantly down-regulated in isolated islet cells treated with pharmacological relevant concentrations FK506/Tac. These cells also showed a decreased insulin secretion and mitochondrial content and reduced the oxygen consumption in isolated islet cells (Rostambeigi et al., 2011). In addition to the nuclear genes, DNA variants in mitochondria encoded genes could contribute to the risk of developing NODAT. MtDNA mutations have been found in maternally transmitted forms of DM2 and common mtDNA polymorphisms/haplogroups have been linked to the risk of developing DM2 (De Andrade et al., 2006; Fuku et al., 2007; Maassen et al., 2004; Poulton et al., 2002; van den Ouweland et al., 1992; Wang et al., 2009, 2010). An impaired mitochondrial function could predispose to develop DM2, and a direct effect of some mtDNA variants on reactive oxygen species (ROS) production and oxidative phosphorylation (OXPHOS) capacity could explain the association of these mtDNA variants with DM2 (Gómez-Durán et al., 2010; Larsen et al., 2014). Moreover, a recent study showed that upon insulin treatment cybrids containing B4 (the major diabetes-susceptible haplogroup in the Chinese population) exhibited an increased oxidative stress compared to cybrids D4 and N9 (the major diabetes-resistant haplogroup among Chinese and Japanese, respectively) (Weng et al., 2013).

Considering the effect of Tac on mitochondrial function and the association between mtDNA variants and DM2, we sought to determine whether there was an association between the mtDNA haplogroups and the risk of developing NODAT among Tac treated patients. We found a significantly increased frequency of haplogroup H in the NODAT patients. A functional difference between H and the other haplogroups could explain the association of this haplogroup and other traits. Huntington's disease patients carrying the 7028C allele (that defined haplogroup H) showed higher intracellular ATP concentrations and ROS production (Arning et al., 2010). Haplogroup H was also associated with increased lipotrophy among AIDS patients

Table 1
Main anthropometric and analytical values in the NODAT and no-NODAT patients.

		NO-NODAT (mean ± SD) (n = 197)	NODAT (mean ± SD) (n = 115)	P values
Age (years)		45 ± 12/15–75	53 ± 11/22–74	0.004
Male gender		125 (63%)	67 (58%)	0.34
Weight (kg)	One week	68 ± 13/37–112	71 ± 12/43–104	0.08
	6 months	70 ± 13/40–113	72 ± 12/42–96	0.45
	12 months	71 ± 14/41.2–119	75 ± 14/44–125	0.14
BMI (kg/m ²)	One week	24 ± 4/17–38	26 ± 4/17–36	0.01
	6 months	25 ± 4/17–43	26 ± 4/17–38	0.08
	12 months	26 ± 4/17–43	27 ± 4/18–41	0.04
		Median (range)	Median (range)	P values
Tac dose mg/day	One week	8 (1–30)	8 (4–20)	0.46
	6 months	4 (0.5–16)	5 (1.5–20)	0.09
	12 months	4 (0.5–50)	4 (0.5–14)	0.45
Tac blood levels (ng/ml)	One week	11 (1.6–38)	11 (3.4–27)	0.29
	6 months	8 (1.5–23)	9 (4–12)	0.06
	12 months	8 (2.4–97)	7 (2.5–17)	0.68
Tac dose mg/kg/day	One week	0.11 (0.01–0.4)	0.11 (0.02–0.34)	0.14
	6 months	0.06 (0.006–0.29)	0.07 (0.02–0.35)	0.17
	12 months	0.05 (0.01–0.62)	0.06 (0.01–0.88)	0.51
Tac normalized dose (ng/ml per mg/kg/day)	One week	89 (14–700)	97 (26–979)	0.12
	6 months	135 (24–1300)	133 (99–524)	0.61
	12 months	152 (29–1528)	126 (37–461)	0.18

Table 2

Frequency of the haplogroups (defined by seven mtDNA polymorphisms) in the NODAT, no-NODAT, and patients with pre-transplant type 2 diabetes.

Haplogroup	C 7028 T	A 12308 G	G 13368 A	G 13708 A	A 9055 G	G 4580 A	G 16391 A	No-NODAT n = 197	NODAT n = 115	Pre-TR T2DM N = 106
H*	C	A	G	G	G	G	G	69 (35)	57 (50)	45 (42)
I	T	A	G	G	G	G	A	7 (4)	3 (2)	7 (7)
J	T	A	G	A	G	G	G	25 (13)	11 (10)	13 (12)
K	T	G	G	G	A	G	G	14 (7)	6 (5)	8 (8)
T	T	A	A	G	G	G	G	20 (10)	8 (7)	8 (7)
U	T	G	G	G	G	G	G	26 (13)	12 (10)	9 (8)
V	T	A	G	G	G	A	G	13 (7)	5 (5)	5 (5)
W + X	T	A	G	G	G	G	G	15 (8)	6 (5)	6 (6)
other								8 (4)	7 (7)	5 (5)

* $p = 0.011$; OR = 1.82 (1.14–2.91); H vs no-H, NODAT vs. no-NODAT.

receiving nucleoside reverse transcriptase inhibitors, and riboflavin was more effective in non-H patients with migraine (Di Lorenzo et al., 2009; Hendrickson et al., 2009). We reported a significant association between this haplogroup and early onset myocardial infarction, an effect that could be attributed to the enhanced ROS production/endothelia dysfunction among H-individuals (Palacín et al., 2011).

Interestingly, haplogroup H was no significantly more frequent among our patients with pretransplant diabetes. Moreover, the frequency was close to the 40% reported in our general population (Palacín et al., 2011). This suggests that this haplogroup has no or a limited value as a risk factor for DM2 in the absence of the immunosuppressive therapy. Haplogroup H was defined by a SNP at position 7028, a synonymous amino acid change in the cytochrome C oxidase subunit I (CO-I). A direct effect of this SNP on NODAT was thus unlikely, and the risk could be attributed to other functional mtDNA variants. A large scale sequencing of the full mtDNA encoded genes from NODAT and no-NODAT patients should be necessary to define nucleotide variants implicated in the risk of developing NODAT in response to Tac.

Finally, our study was based on a limited sample size. Although the effect of haplogroup H on NODAT-risk was plausible in view of the functional differences between this and the other haplogroups, the association here reported requires confirmation on large cohorts of renal transplanted patients and from different populations.

In conclusion, we found a significant effect of the common European mitochondrial haplogroup H on the risk of developing NODAT in response to Tac. This effect could be explained by an increased oxidative damage in beta cells from H individuals, compared to the other haplogroups.

Conflict of interest

All the authors declare they have no conflicts of interest related with this work.

Authors' contribution

All the authors participated in the study design and contributed to the study by recruiting the patients, obtaining the patient's data, or performing the laboratory work. E.C. had full access to the data and takes the responsibility for the accuracy of the data analysis.

Acknowledgments

This work has been supported by the Instituto de Salud Carlos III-REDinREN, and the FEDER Funding Program from the European Union.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.01.036>.

References

- Arning, L., et al., 2010. Mitochondrial haplogroup H correlates with ATP levels and age at onset in Huntington disease. *J. Mol. Med.* 88, 431–436.
- Balla, A., Chobanian, M., 2007. New-onset diabetes after transplantation: a review of recent literature. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 14, 375–379.
- Coto, E., et al., 2011. Late-onset Alzheimer's disease is associated with mitochondrial DNA 7028C/haplogroup H and D310 poly-C tract heteroplasmy. *Neurogenetics* 12, 345–346.
- de Andrade, P.B., et al., 2006. Diabetes-associated mitochondrial DNA mutation A3243G impairs cellular metabolic pathways necessary for beta cell function. *Diabetologia* 49, 1816–1826.
- Di Lorenzo, C., et al., 2009. Mitochondrial DNA haplogroups influence the therapeutic response to riboflavin in migraineurs. *Neurology* 72, 1588–1594.
- Fuku, N., et al., 2007. Mitochondrial haplogroup N9a confers resistance against type 2 diabetes in Asians. *Am. J. Hum. Genet.* 80, 407–415.
- Ghisal, L., et al., 2009. TCF7L2 polymorphism associates with new-onset diabetes after transplantation. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20, 2459–2467.
- Gómez-Durán, A., et al., 2010. Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups. *Hum. Mol. Genet.* 19, 3343–3353.
- Hendrickson, S.L., et al., 2009. Mitochondrial DNA haplogroups influence lipotrophy after highly active antiretroviral therapy. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 51, 111–116.
- Kang, E.S., et al., 2009. Association of common type 2 diabetes risk gene variants and post-transplantation diabetes mellitus in renal allograft recipients in Korea. *Transplantation* 88, 693–698.
- Kazuno, A.A., et al., 2006. Identification of mitochondrial DNA polymorphisms that alter mitochondrial matrix pH and intracellular calcium dynamics. *PLoS Genet.* 2, e128.
- Larsen, S., et al., 2014. Increased intrinsic mitochondrial function in humans with mitochondrial haplogroup H. *Biochim. Biophys. Acta* 1837, 226–231.
- Maassen, J.A., et al., 2004. Mitochondrial diabetes: molecular mechanisms and clinical presentation. *Diabetes* 53, S103–S109.
- Madsen-Bouterse, S.A., et al., 2010. Oxidative damage of mitochondrial DNA in diabetes and its protection by manganese superoxide dismutase. *Free Radic. Res.* 44, 313–321.
- Palacín, M., et al., 2011. Mitochondrial DNA and TFAM gene variation in early-onset myocardial infarction: evidence for an association to haplogroup H. *Mitochondrion* 11, 176–181.
- Palacín, M., et al., 2013. FK506 affects mitochondrial protein synthesis and oxygen consumption in human cells. *Cell Biol. Toxicol.* 29, 407–414.
- Poulton, J., et al., 2002. Type 2 diabetes is associated with a common mitochondrial variant: evidence from a population-based case-control study. *Hum. Mol. Genet.* 11, 1581–1583.
- Rodrigo, E., et al., 2005. Evolution of tacrolimus blood levels and concentration-dose ratios in patients who develop new onset diabetes mellitus after kidney transplantation. *Transpl. Int.* 18, 1152–1157.
- Rostambeigi, N., et al., 2011. Unique cellular and mitochondrial defects mediate FK506-induced islet β -cell dysfunction. *Transplantation* 91, 615–623.
- Schwanstecher, C., et al., 2002. K(IR)6.2 polymorphism predisposes to type 2 diabetes by inducing overactivity of pancreatic beta-cell ATP-sensitive K(+) channels. *Diabetes* 51, 875–879.
- Scott, L.J., et al., 2007. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science* 316, 1341–1345.
- Sladek, R., et al., 2007. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 445, 881–885.

- Tavira, B., et al., 2011a. KCNQ1 gene variants and risk of new-onset diabetes in tacrolimus-treated renal-transplanted patients. *Clin. Transplant.* 25, 284–291.
- Tavira, B., et al., 2011b. Pharmacogenetics of tacrolimus after renal transplantation: analysis of polymorphisms in genes encoding 16 drug metabolizing enzymes. *Clin. Chem. Lab. Med.* 49, 825–833.
- Tavira, B., et al., 2012. Association between a common KCNJ11 polymorphism (rs5219) and new-onset posttransplant diabetes in patients treated with Tacrolimus. *Mol. Genet. Metab.* 105, 525–527.
- Van den Ouweland, J.M., et al., 1992. Mutation in mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness. *Nat. Genet.* 1, 368–371.
- Wang, P.W., et al., 2009. Mitochondrial DNA variants in the pathogenesis of type 2 diabetes — relevance of Asian population studies. *Rev. Diabet. Stud.* 6, 237–246.
- Wang, C.H., et al., 2010. Mitochondrial dysfunction in insulin insensitivity: implication of mitochondrial role in type 2 diabetes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1201, 157–165.
- Weng, S.W., et al., 2013. Study of insulin resistance in cybrid cells harboring diabetes-susceptible and diabetes-protective mitochondrial haplogroups. *Mitochondrion* 13, 888–897.
- Yang, L., et al., 2011. Association between KCNJ11 gene polymorphisms and risk of type 2 diabetes mellitus in East Asian populations: a meta-analysis in 42,573 individuals. *Mol. Biol. Rep.* 39, 645–659.

FK506 affects mitochondrial protein synthesis and oxygen consumption in human cells

María Palacín · Eliecer Coto · Laura Llobet ·
David Pacheu-Grau · Julio Montoya · Eduardo Ruiz-Pesini

Received: 7 June 2013 / Accepted: 17 September 2013 / Published online: 28 September 2013
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

Abstract FK506 is an important immunosuppressive medication. However, it can provoke neurotoxicity, nephrotoxicity, and diabetes as adverse side effects. The decrease in oxygen consumption of rat cells treated with pharmacologically relevant concentrations of FK506, along with other evidences, has insinuated that some of the toxic effects are probably caused by drug-induced mitochondrial dysfunction at the level of gene expression. To confirm this suggestion, we have analyzed cell respiration and mitochondrial protein synthesis in human cell lines treated with FK506. This drug provokes an important decrease in oxygen consumption, accompanied by a slight reduction in the synthesis of mitochondria DNA-encoded proteins. These results are similar to those triggered by rapamycin, another macrolide with immunosuppressive properties, therefore insinuating a common toxic pathway.

Keywords FK506 · Mitochondria · Oxidative phosphorylation · Toxicity

Introduction

Streptomyces tsukubaensis produces FK506. This compound showed antifungal activity against *Aspergillus fumigatus* and *Fusarium oxysporum* and, in mice, had important immunosuppressive properties (Kino et al. 1987). This drug was first introduced as a human immunosuppressive medication in 1989 (Starzl et al. 1989). FK506 binds to FK-binding protein (FKBP) 12. This complex inhibits the phosphatase activity of calcineurin, preventing the dephosphorylation of nuclear factor of activated T cell (NFATc), its nuclear translocation, and its interaction with different genes,

M. Palacín · E. Coto
Genética Molecular, Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), Oviedo, Spain

E. Coto
Departamento de Medicina, Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain

E. Coto
Fundación Renal I. Alvarez de Toledo, Madrid, Spain

M. Palacín · L. Llobet · D. Pacheu-Grau · J. Montoya ·
E. Ruiz-Pesini
Departamento de Bioquímica Biología Molecular y Celular and Centro de Investigaciones Biomédicas En Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Zaragoza, Spain

E. Ruiz-Pesini
Fundación ARAID, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain

E. Ruiz-Pesini (✉)
Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza, C/Miguel Servet, 177, 50013 Zaragoza, Spain
e-mail: eduruiz@unizar.es

such as the proinflammatory interleukin-2 gene. In this way, FK506 blocks T cell-mediated immune response because, in these cells, the activation of membrane receptors by antigens induces a calcium signal that activates the calcineurin. The chemical structure of FK506 is entirely different from that of the frequently used immunosuppressive cyclosporine A. Cyclosporine A binds cyclophilin, and this complex also acts as a calcineurin inhibitor (Prokai et al. 2012). Due to their impressive ability to improve short-term outcomes, these drugs are used in most of the immunosuppressive protocols to prevent graft rejection following organ transplantation. However, the toxicity related to calcineurin inhibitors is one of the main reasons for long-term failures. The most limiting adverse side effects of calcineurin inhibitors are neurotoxicity, nephrotoxicity, and diabetes (Serkova and Christians 2003). However, the nephrotoxic and diabetogenic effects of FK506 are five times higher than those of cyclosporine A (Prokai et al. 2012).

Studies using a magnetic resonance spectroscopy-based metabolomic approach indicate that toxicity due to calcineurin inhibitors is caused by drug-induced mitochondrial dysfunction. Indeed, comparison of the typical clinical symptoms of cyclosporine A neurotoxicity and mitochondriopathies, such as mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS) and myoclonic epilepsy with ragged red fibers (MERRF), indicates an almost complete overlap. These mitochondrial diseases are usually caused by pathologic mutations in the mitochondrial DNA (mtDNA)-encoded tRNAs that are involved in the mitochondrial synthesis of proteins. Interestingly, mitochondriopathies can also cause kidney dysfunction and diabetes (Serkova and Christians 2003). It has been recently reported that insulin secretion and oxygen consumption were significantly decreased in rat INS-1 cells treated with pharmacologically relevant concentrations of FK506 (Rostambeigi et al. 2011).

Because the electron transport chain (ETC) of the oxidative phosphorylation (OXPHOS) system is the major oxygen consumer in the cell, since this system is the main ATP producer in most of the cells, and mitochondrial ATP is important for insulin secretion, it was insinuated that maybe some of the FK506 toxic effects were mediated by a mitochondrial dysfunction at the level of gene expression (Rostambeigi et al. 2011). To confirm this suggestion in humans, we have analyzed

oxygen consumption and mitochondrial protein synthesis in human cell lines treated or not with FK506.

Material and methods

Cells and growth conditions

As it has been suggested that FK506 toxicity was mediated by mitochondrial dysfunction, to avoid specific effects of the mtDNA genetic background, we used six human osteosarcoma 143B cell lines with the same nuclear genetic background but different mtDNA genotype (AcH, 612H, 613H, 3K, 8K, and 48K from Gomez-Duran et al. 2010). Cells were seeded in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with glucose (25 mM) and fetal bovine serum (FBS) (5 %). After 8 h, the medium was replaced by DMEM without glucose but with galactose (5 mM), pyruvate (1 mM), and FBS (5 %), and the cells were grown for 72 h. It has been shown that this growth medium stimulates mitochondrial biogenesis and oxidative metabolism and, therefore, would increase the OXPHOS effects of FK506 (Rossignol et al. 2004). We did not use penicillin–streptomycin in the growing media to avoid undesired phenotypic effects. The medium was renewed every 48 h. To evaluate the effects of different calcineurin inhibitors, cyclosporine A 800 ng/ml (665 nM) or FK506 50 ng/ml (62 nM) was incorporated in the culture medium. FK506, PROGRAF[®] 5 mg/ml Astellas Pharma S.A., was obtained from the Pharmacology Department at HUCA, National code 680678 (<http://www.aemps.gob.es/>).

Oxygen consumption

In order to analyze oxygen consumption, we used the high-resolution oxygraph OROBOROS[®]. Exponentially growing cells were collected by trypsinization, washed, counted, and resuspended at 1.5×10^6 cells/ml. Endogenous, leaking (with oligomycin added at 49 nM), and uncoupled (with FCCP added at 1.2 μ M) respiration analyses were performed according to previously published protocols (Gomez-Duran et al. 2010). The analysis of oxygen consumption was carried out in parallel for both conditions, non-treated and treated cell lines. Each cell line and condition was measured three times. Results were expressed as picomoles of O₂ per minute per million cells.

All non-treated cell lines had shown normal respiration rates (Gomez-Duran et al. 2010).

Analysis of respiratory complexes and citrate synthase

The respiratory complex IV (CIV) specific activity and quantity were measured by using Mitoprofile[®] Human Complex IV Activity and Quantity kit from Mitosciences according to the manufacturer's instructions. This kit immunocaptures CIV, and activity is determined colorimetrically by following the oxidation of reduced cytochrome c as an absorbance decrease at 550 nm. Subsequently, in the same well, the quantity of enzyme is measured by adding a CIV-specific antibody conjugated with alkaline phosphatase. CIV activities and quantities were normalized per milligram of protein, a surrogate of cell number or volume. Therefore, CIV activities and quantities were expressed as milli-optical density per minute per milligram of protein. The p.MT-CO1/SDHA and SDHA/Janus Green ratios were measured using the MitoBiogenesis[®] In-Cell ELISA kit from Mitosciences according to the manufacturer's instructions. Human cells were seeded in 48-well microplates, and the levels of CIV p.MT-CO1 and CII SDHA subunits were measured simultaneously in each well. All these variables, along with the protein levels, were assayed by triplicate for each cell line and condition in at least three independent experiments following previously described protocols in a NovoStar MBG Labtech microplate reader (Gomez-Duran et al. 2010). The enzymatic activities of complexes I + III (CI + III) and citrate synthase (CS) were assayed, by triplicate for each cell line and condition, following previously described protocols with some modifications and normalized per milligram of protein (Ruiz-Pesini et al. 1998).

Mitochondrial protein synthesis

The mitochondrial protein synthesis was analyzed as described previously (Chomyn 1996; Gomez-Duran et al. 2010). Electrophoresis was performed with a PROTEAN II xi system. As a load control, we dyed the gel for 15 min with fixing solution (30 % methanol, 10 % acetic acid) plus 0.025 % of Brilliant Blue R (Coomassie blue). Then, the gel was washed several times with a 50 % methanol, 10 % acetic acid solution and left overnight in fixing solution. Finally, it was treated for 20 min with Amplify solution, dried, and used for autoradiography. The band intensities from

appropriate exposures of the fluorograms were quantified by densitometric analysis with the Quantity One 1-D analysis software (Bio-Rad). Three bands, corresponding to p.MT-ND4, p.MT-CO3, and p.MT-ND3 polypeptides (upper, middle, and lower part of the gel, respectively), were selected for quantification.

Statistical analysis

The statistical package StatView 6.0 was used to perform all statistical analyses. Mean and standard deviation are represented. The normal distribution was checked by the Kolmogorov–Smirnov test. As all variables were normally distributed, the unpaired two-tailed *t* test was used to compare parameters. *P* values of <0.05 were considered statistically significant.

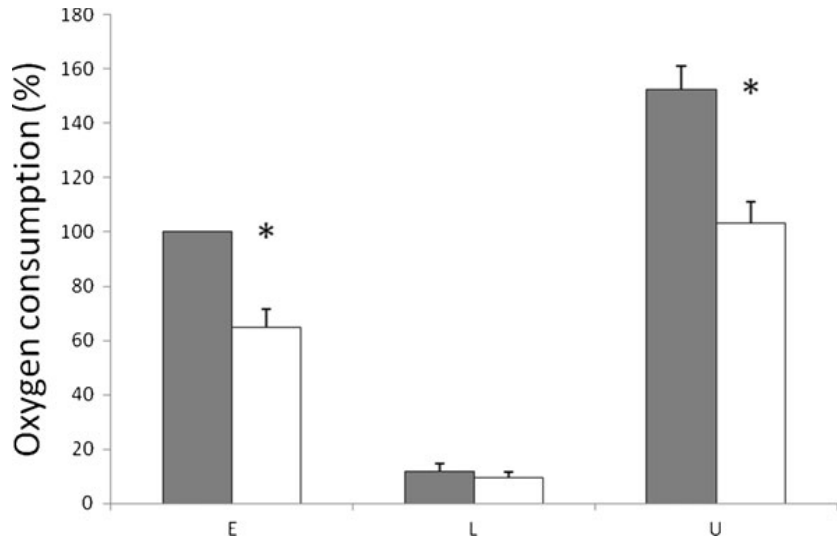
Results

To confirm that FK506 toxic effects could be mediated by a dysfunction of the OXPHOS system, we analyzed the oxygen consumption in six human cell lines treated or not with FK506 (50 ng/ml) during 3 days. Endogenous and uncoupled, but not the leaking, respirations were significantly lower in human cells treated with FK506 than in non-treated cells (Fig. 1). The oxygen consumption was 35.1 (endogenous) and 32.2 % (uncoupled) inferior in treated than non-treated cells.

Oxygen is consumed in mitochondria. Therefore, a lesser number of mitochondria could be responsible for lower oxygen consumption. To get an idea of mitochondrial number or volume, we determined the specific activity of citrate synthase, a nucleus-encoded mitochondrial enzyme, commonly used for this purpose. There were no differences between treated and non-treated cells (Fig. 2).

Oxygen is reduced to water in CIV by electrons flowing through the ETC. ETC includes respiratory complexes I (CI), II (CII), III (CIII), IV (CIV, cytochrome oxidase or COX), and the protein cytochrome c. CI, CIII, and CIV, but not CII or cytochrome c, contain mtDNA-encoded polypeptides (7 out of 44, 1 out of 11, and 3 out of 14, respectively) (Balsa et al. 2012). FK506 is a macrolide. Some reports suggest that macrolides, such as erythromycin, can provoke inhibition of the mitochondrial protein synthesis when interacting with mitochondrial rRNAs (Doersen and

Fig. 1 Effects of FK506 on oxygen consumption. *Gray* and *white bars* represent mean values for six non-treated and six FK506-treated cell lines, respectively. *E*, *L*, and *U* stand for endogenous, leaking, and uncoupled respiration, respectively. The mean value for endogenous respiration in non-treated cell lines was set to 100 % in order to assess respiration rate derived from the treatment. * $P < 0.0001$ (unpaired two-tailed *t* test)



Stanbridge 1979, 1982; Luca et al. 2004). Therefore, it would be possible that FK506 would affect oxygen consumption by decreasing the translation of mtDNA-encoded ETC subunits. Because important subunits of CI, CIII, and CIV are coded in the mtDNA, we determined CI + III and CIV activities in cells treated with FK506. However, we did not find differences in the specific activities of these ETC complexes when compared to non-treated cells (Fig. 2); neither did we find them in CIV quantity or SDHA

levels, a CII polypeptide (Fig. 2). This result suggested that FK506 had no effect on mitochondrial translation of proteins.

To confirm that the synthesis of mtDNA-encoded polypeptides was not altered, we performed mitochondrial protein synthesis assays before and after treatment with FK506. Surprisingly, we observed a small but significant decrease in the amount of mitochondrial translation products (Fig. 3). Metabolic labeling to estimate mitochondrial protein synthesis in cultured

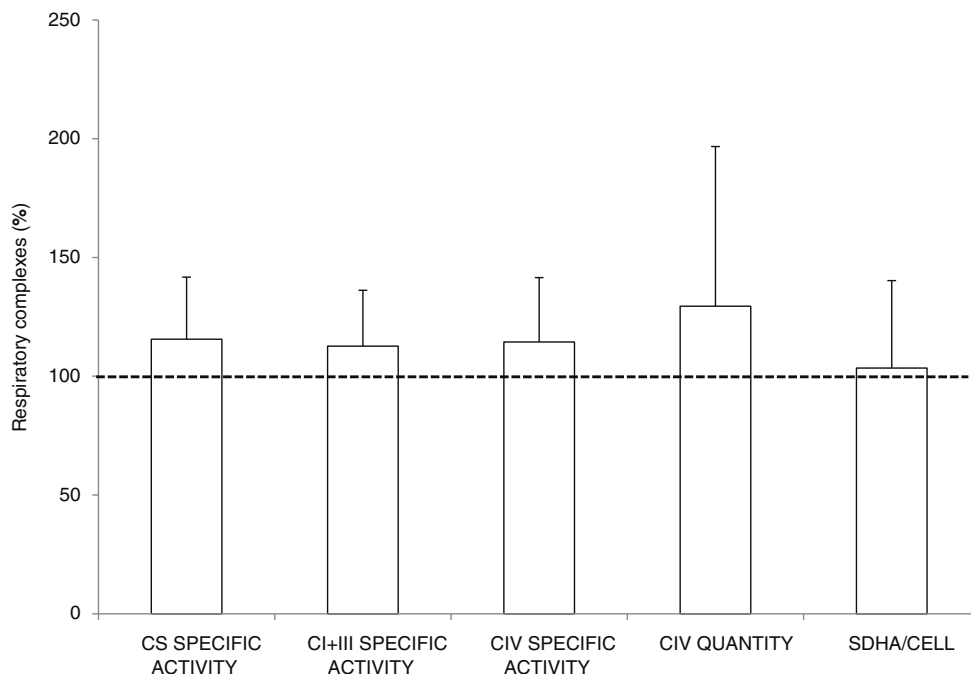


Fig. 2 Effects of FK506 on citrate synthase and respiratory complexes. *White bars* represent the percentage of change in the respiratory complexes and citrate synthase in six FK506-

treated cell lines. The mean value for six non-treated cell lines was set to 100 % and is shown as a *dashed horizontal line*

cells is a semiquantitative technique (Moreno-Loshuertos et al. 2011). Therefore, with the aim of ratifying this result, we quantitatively determined the levels of p.MT-CO1, the CIV subunit that directly reduces the oxygen to water, and normalized them to those of SDHA. This p.MT-CO1/SDHA ratio showed, again, a small but significant decrease, thus confirming a slight effect of FK506 on mitochondrial protein synthesis (Fig. 3).

To check whether this action of FK506 on OXPHOS function was, in part, responsible of its more toxic effect than cyclosporine A, we determine the p.MT-CO1/SDHA ratio of cells treated with cyclosporine A (800 ng/ml). This cyclosporine A concentration had a comparable impact, to that of FK506, on cell proliferation and viability and insulin secretion and cell content of INS-1 cells (Rostambeigi et al. 2011); however, it did not appear to affect oxygen consumption in HepG2 cells (Luo et al. 2012). This p.MT-CO1/SDHA ratio in cells treated with cyclosporine A was not different from that of control cells (Fig. 3).

The effect of FK506 on ETC has been studied in six hybrid cell lines from two different mtDNA genetic backgrounds, haplogroups H (AcH, 612H, and 613H) and Uk (3K, 8K, and 48K). To check if these mtDNA genotypes influenced the ETC effects of FK506, we compared all previously analyzed parameters in both haplogroups, but we did not find significant differences between them (data not shown).

Discussion

An analysis of CO₂ production from D-[¹⁴C]glucose or [2-¹⁴C]pyruvate in FK506-treated versus control rat enterocytes showed significant reductions in CO₂ released from treated cells, thus indicating a mitochondrial dysfunction (Madsen et al. 1995). Moreover, the oxygen consumption in rat INS-1 cells after 72 h of treatment with pharmacologically relevant concentrations (50 ng/ml) of FK506 was approximately a third lower than that from the non-treated cell line (Rostambeigi et al. 2011). We have found a similar decrease of oxygen consumption in human cell lines treated during 72 h with FK506 50 ng/ml. The lack of differences in leaking respiration indicates that this drug does not affect electron slipping or proton leaking processes. On the other hand, the significant differences in endogenous and uncoupled respiration suggest

that treated cells contain lesser ETC capacity because of a lower ETC quantity or a direct inhibition of the electron transport.

The toxic effects of the macrolide FK506 could be due to its interaction with the mitochondrial ribosome and the inhibition of organelle protein synthesis, decreasing the ETC quantity and then impairing oxygen consumption and many other cell functions dependent on the OXPHOS system (Martínez-Romero et al. 2011). In fact, the amount of mtDNA-encoded subunits and the p.MT-CO1/SDHA ratio of human cell lines treated with FK506 is 5 % lower than that of non-treated cell lines. A small decrease in mitochondrial protein synthesis accompanied by a big decrease in the oxygen consumption has been previously reported for other drugs, such as calmodulin antagonists (Vijayasarathy et al. 1993). A decrease in the level of expression of a given subunit did not necessarily lead to a proportionate (if any) decrease in the activity of the corresponding respiratory chain complex (Rossignol et al. 2003). The expression and steady-state amounts of a particular respiratory complex subunit are, maybe in some conditions, higher than those required to assemble a normal amount of that complex. This fact would explain why a decrease in p.MT-CO1 expression and steady-state amounts in FK506-treated cells are not mirrored in a difference in CIV activity or quantity. However, the absence of differences in CI + III and CIV specific activities or CIV levels between treated and untreated cells, similar to previous experiments in human umbilical endothelial cells (Illsinger et al. 2011), appears to rule out that a lower ETC quantity was responsible for the decrease in oxygen consumption. As CII has no mtDNA-encoded polypeptides, then SDHA levels can be used as a marker of mitochondrial number or volume. Thus, our results suggest that the mitochondrial density was not affected by the FK506 treatment, contrary to that observed in rat INS-1 cells (Rostambeigi et al. 2011) but similar to that observed in human umbilical endothelial cells (Illsinger et al. 2011). This fact was also confirmed by the absence of differences in CS specific activity. On the other hand, the significant differences in respiration could be due to a direct inhibition of the ETC by FK506. In fact, it had been previously shown that FK506 partly blocked CIII activity (Simon et al. 2003; Zini et al. 1998). However, our results on CI + III specific activities rule out this possibility.

Despite an important decrease in oxygen consumption, our results appear to preclude an important implication

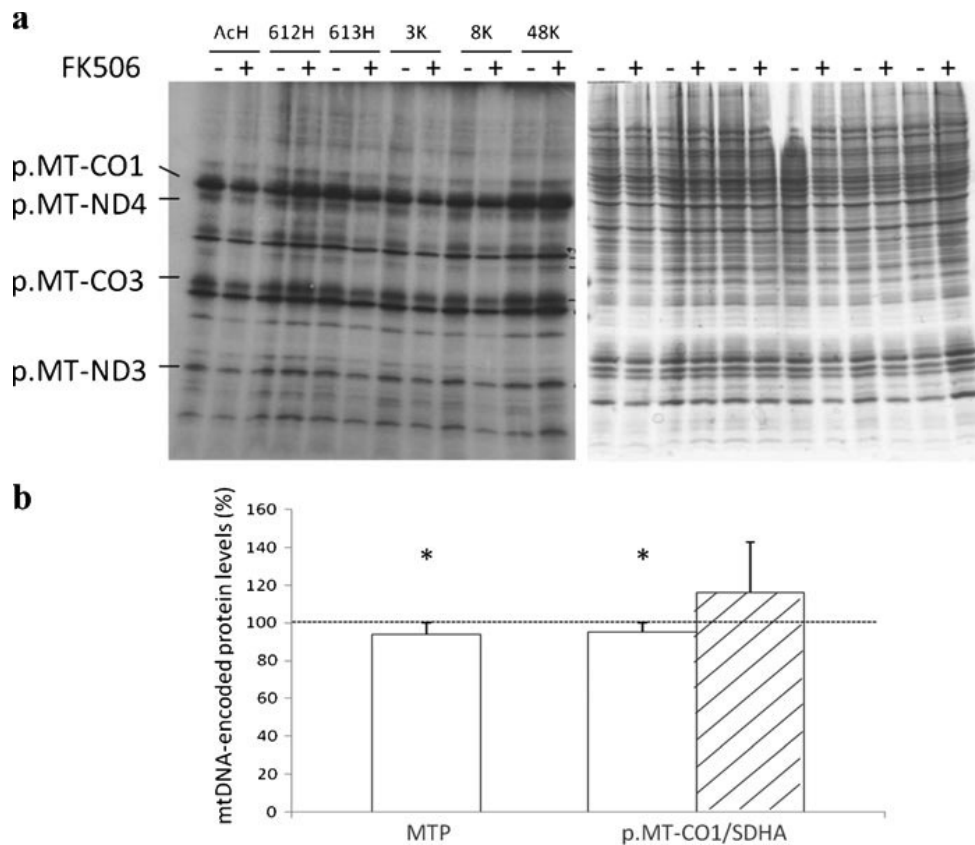


Fig. 3 Effects of FK506 on mitochondrial protein synthesis. **a** *Left panel.* Gel showing the electrophoretic patterns of mitochondrial translation products (*MTP*), in which the bands of three mtDNA-encoded polypeptides used for quantification (*p.MT-ND4*, *p.MT-CO3*, and *p.MT-ND3*) are indicated. We also show the *p.MT-CO1* band to compare it with the quantitative assay results (see Fig. 3b). The name of each cell line used is provided. *Right panel.* Loading control from the six non-treated (–) and

FK506-treated (+) cell lines. **b** Quantification of mitochondrial protein synthesis. The *MTP* (Fig. 3a, *left panel*) were normalized using a densitometry of the Coomassie staining pattern (Fig. 3a, *right panel*). *White* and *stippled bars* represent mean values for FK506- and cyclosporine A-treated cell lines, respectively. The mean value for non-treated cell lines was set to 100 % and was shown as a *dashed horizontal line*. * $P \leq 0.0433$ (unpaired two-tailed *t* test)

of ETC in the side effects of FK506. However, in addition of ETC, the OXPHOS system also includes the ATP synthase or complex V (CV). Individuals with mtDNA mutations affecting CV subunits often show normal specific activities of the ETC complexes (Thorburn et al. 1993). However, cells with these mutations have lower oxygen consumption (Trounce et al. 1994). Very interestingly, it has been shown that FK506 inhibits oxygen consumption and CV activity of mitochondria from the rat brain (Zini et al. 1998). FK506 also decreased the expression of rat aortic ATP synthase gamma chain (Zamorano-Leon et al. 2012). Therefore, it would be possible that some FK506 side effects were mediated through its interaction with CV.

Rapamycin is another macrolide with immunosuppressive activity. FK506 and rapamycin share a chemical

domain that allows them to bind FKBP12. Other parts of these molecules are different and enable FK506 or rapamycin, in conjunction with surface residues from FKBP12, to interact with calcineurin or the mammalian target of rapamycin (mTOR), respectively (Dumont and Su 1996). Rapamycin, an mTOR inhibitor, decreases endogenous and uncoupled respiration in Jurkat T cell leukemia clone E6-1 cells (Ramanathan and Schreiber 2009; Schieke et al. 2006). Moreover, in the C2C12 mouse myoblast cell line, rapamycin decreased the expression of several transcriptional regulators important for mitochondrial biogenesis, such as PGC-1 α , resulting in a decrease in the expression of nucleus-encoded mitochondrial proteins, such as cytochrome c, COX5a, or ATP5g1, and oxygen consumption (Cunningham et al. 2007). In human prostate cancer cell lines, rapamycin also decreases the

expression of ATP5g1 gene that codes for a subunit of CV (van der Poel et al. 2003). Interestingly, PGC-1 α was also downregulated in FK506-treated rat INS-1 cells (Rostambeigi et al. 2011). Thus, perhaps the FK506 toxic effects may be due to a mitochondrial dysfunction mediated by the mTOR pathway. In fact, it has been already shown that chronic administration of FK506 decreased mTOR activity (Yu et al. 2013).

It has been previously shown that side effects were noted in connection with 76 % of FK506 concentrations above 30 ng/ml. Thus, FK506 concentrations should preferably be kept below 20 ng/ml (Bottiger et al. 1999). In humans, an increased ratio of blood 3-hydroxybutyrate to acetoacetate observed in liver transplant recipients treated with FK506 relative to the healthy control subjects implied a more reduced hepatic intramitochondrial redox state, i.e., a lower capacity of NADH oxidation by the ETC. The mean plasma FK506 level at the time of these metabolic studies was 0.5 nM (Krentz et al. 1993). These results, along with the lower oxygen consumption and mitochondrial translation of human cells treated with FK506, make it reasonable to suggest that OXPHOS defects contribute to FK506 toxicity.

Acknowledgments This work was supported by grants from Instituto de Salud Carlos III [FIS-PI10/00662, PI11/01301, REDINREN-RD06/0016]; Departamento de Ciencia, Tecnología y Universidad del Gobierno de Aragón y Fondo Social Europeo [Grupos Consolidados B33]; and FEDER Funding Program from the European Union. DP-G was supported by the Asociación de Enfermos de Patología Mitocondrial (AEPMI). MP and LL have fellowships from FICYT-Principado de Asturias and Instituto de Salud Carlos III (FI12/00217), respectively. The CIBERER is an initiative of the ISCIII.

References

- Balsa E, Marco R, Perales-Clemente E, Szklarczyk R, Calvo E, Landazuri MO, et al. NDUFA4 is a subunit of complex IV of the mammalian electron transport chain. *Cell Metab*. 2012;16:378–86.
- Bottiger Y, Brattstrom C, Tyden G, Sawe J, Groth CG. Tacrolimus whole blood concentrations correlate closely to side-effects in renal transplant recipients. *Br J Clin Pharmacol*. 1999;48:445–8.
- Chomyn A. In vivo labeling and analysis of human mitochondrial translation products. *Methods Enzymol*. 1996;264:197–211.
- Cunningham JT, Rodgers JT, Arlow DH, Vazquez F, Mootha VK, Puigserver P. mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1 α transcriptional complex. *Nature*. 2007;450:736–40.
- Doersen CJ, Stanbridge EJ. Cytoplasmic inheritance of erythromycin resistance in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76:4549–53.
- Doersen CJ, Stanbridge EJ. Erythromycin inhibition of cell proliferation and in vitro mitochondrial protein synthesis in human HeLa cells is pH dependent. *Biochim Biophys Acta*. 1982;698:62–9.
- Dumont FJ, Su Q. Mechanism of action of the immunosuppressant rapamycin. *Life Sci*. 1996;58:373–95.
- Gomez-Duran A, Pacheu-Grau D, Lopez-Gallardo E, Diez-Sanchez C, Montoya J, Lopez-Perez MJ, et al. Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups. *Hum Mol Genet*. 2010;19:3343–53.
- Illsinger S, Goken C, Brockmann M, Thiemann I, Bednarczyk J, Schmidt KH, et al. Effect of tacrolimus on energy metabolism in human umbilical endothelial cells. *Ann Transplant*. 2011;16:68–75.
- Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M, Nishiyama M, Goto T, Okuhara M, et al. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *J Antibiot*. 1987;40:1249–55 (Tokyo).
- Krentz AJ, Dousset B, Mayer D, McMaster P, Buckels J, Cramb R, et al. Metabolic effects of cyclosporin A and FK 506 in liver transplant recipients. *Diabetes*. 1993;42:1753–59.
- Luca CC, Lam BL, Moraes CT. Erythromycin as a potential precipitating agent in the onset of Leber's hereditary optic neuropathy. *Mitochondrion*. 2004;4:31–6.
- Luo Y, Rana P, Will Y. Cyclosporine A and palmitic acid treatment synergistically induce cytotoxicity in HepG2 cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012;261:172–80.
- Madsen KL, Yanchar NL, Sigalet DL, Reigel T, Fedorak RN. FK506 increases permeability in rat intestine by inhibiting mitochondrial function. *Gastroenterology*. 1995;109:107–14.
- Martínez-Romero I, Emperador S, Llobet L, Montoya J, Ruiz-Pesini E. Mitogenomics: recognizing the significance of mitochondrial genomic variation for personalized medicine. *Curr Pharmacogenomics Pers Med*. 2011;9:84–93.
- Moreno-Loshuertos R, Ferrin G, Acin-Perez R, Gallardo ME, Viscomi C, Perez-Martos A, et al. Evolution meets disease: penetrance and functional epistasis of mitochondrial tRNA mutations. *PLoS Genet*. 2011;7:e1001379.
- Prokai A, Fekete A, Pasti K, Rusai K, Banki NF, Reusz G, et al. The importance of different immunosuppressive regimens in the development of posttransplant diabetes mellitus. *Pediatr Diabetes*. 2012;13:81–91.
- Ramanathan A, Schreiber SL. Direct control of mitochondrial function by mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:22229–32.
- Rossignol R, Faustin B, Rocher C, Malgat M, Mazat JP, Letellier T. Mitochondrial threshold effects. *Biochem J*. 2003;370:751–62.
- Rossignol R, Gilkerson R, Aggeler R, Yamagata K, Remington SJ, Capaldi RA. Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res*. 2004;64:985–93.
- Rostambeigi N, Lanza IR, Dzeja PP, Deeds MC, Irving BA, Reddi HV, et al. Unique cellular and mitochondrial defects mediate FK506-induced islet beta-cell dysfunction. *Transplantation*. 2011;91:615–23.

- Ruiz-Pesini E, Diez C, Lapena AC, Perez-Martos A, Montoya J, Alvarez E, et al. Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. *Clin Chem*. 1998;44:1616–20.
- Schieke SM, Phillips D, McCoy Jr JP, Aponte AM, Shen RF, Balaban RS, et al. The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity. *J Biol Chem*. 2006;281:27643–52.
- Serkova N, Christians U. Transplantation: toxicokinetics and mechanisms of toxicity of cyclosporine and macrolides. *Curr Opin Investig Drugs*. 2003;4:1287–96.
- Simon N, Morin C, Urien S, Tillement JP, Bruguerolle B. Tacrolimus and sirolimus decrease oxidative phosphorylation of isolated rat kidney mitochondria. *Br J Pharmacol*. 2003;138:369–76.
- Starzl TE, Todo S, Fung J, Demetris AJ, Venkataramman R, Jain A. FK 506 for liver, kidney, and pancreas transplantation. *Lancet*. 1989;2:1000–4.
- Thorburn DR, Rahman S. Mitochondrial DNA-associated Leigh syndrome and NARP. In: Pagon RA, Adam MP, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Stephens K (eds) *GeneReviews™* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2013. 2003 Oct 30 [updated 2011 May 3].
- Trounce I, Neill S, Wallace DC. Cytoplasmic transfer of the mtDNA nt 8993 T->G (ATP6) point mutation associated with Leigh syndrome into mtDNA-less cells demonstrates cosegregation with a decrease in state III respiration and ADP/O ratio. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:8334–8.
- Van der Poel HG, Hanrahan C, Zhong H, Simons JW. Rapamycin induces Smad activity in prostate cancer cell lines. *Urol Res*. 2003;30:380–6.
- Vijayasathya C, Raza H, Avadhani NG. Inhibition of mitochondrial translation by calmodulin antagonist N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide. *Biochim Biophys Acta*. 1993;1143:38–44.
- Yu JJ, Zhang Y, Wang Y, Wen ZY, Liu XH, Qin J, et al. Inhibition of calcineurin in the prefrontal cortex induced depressive-like behavior through mTOR signaling pathway. *Psychopharmacology (Berl)*. 2013;225:361–72.
- Zamorano-Leon JJ, Lopez-Farre AJ, Marques M, Rodriguez P, Modrego J, Segura A, et al. Changes by tacrolimus of the rat aortic proteome: involvement of endothelin-1. *Transpl Immunol*. 2012;26:191–200.
- Zini R, Simon N, Morin C, Thiault L, Tillement JP. Tacrolimus decreases in vitro oxidative phosphorylation of mitochondria from rat forebrain. *Life Sci*. 1998;63:357–68.

Stressed cybrids model demyelinated axons in multiple sclerosis

Laura Llobet · Aurora Gómez-Durán · Ruth Iceta · Eldris Iglesias · Julio Montoya · Jesús Martín-Martínez · José Ramón Ara · Eduardo Ruiz-Pesini

Received: 8 March 2013 / Accepted: 15 April 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract Multiple sclerosis is likely caused by a complex interaction of multiple genes and environmental factors. The contribution of mitochondrial DNA genetic backgrounds has been frequently reported. To evaluate the effect of mitochondrial DNA haplogroups in the same genetic and environmental circumstances, we have built human transmittochondrial cell lines and simulated the effect of axon demyelination, one of the hallmarks of multiple sclerosis pathology, by altering the ionic gradients through the plasmalemma and increasing ATP consumption. In this model, mitochondrial biogenesis is observed. This process is larger in Uk cybrids, which mirrors their lower oxidative phosphorylation capacity in basal conditions. This model replicates a process occurring in both patients suffering from multiple sclerosis and several animal models of axon demyelination. Therefore, it can be used to analyze the contribution of various mitochondrial DNA genotypes to multiple sclerosis. In this sense, a longer or stronger energy stress, such as that associated with demyelinated axons in multiple

sclerosis, could make Uk individuals more susceptible to this pathology. Finally, pharmacologic compounds targeted to mitochondrial biogenesis could be a potential therapy for multiple sclerosis.

Keywords Multiple sclerosis · Demyelination · Axon · Cybrid · Mitochondria · mtDNA

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a chronic demyelinating disease of the central nervous system and is the most common cause of non-traumatic disability in young adults. Histopathological hallmarks of MS include inflammation, demyelination, loss of oligodendrocytes and neuroaxonal degeneration (Witte et al. 2009). Axonal damage occurs in the initial stages of the disease, and over time, degenerative processes take over and lead to extensive axonal loss and brain atrophy. Current research focuses on pathogenic mechanisms that contribute to axonal injury in MS, and new evidence suggests that axonal pathology is tightly associated with mitochondrial alterations (van Horssen et al. 2012).

Ethnic differences influence the worldwide distribution of MS and MS appears to aggregate in families. Different studies show higher concordance rates in monozygotic versus dizygotic twins or other siblings. There is an intermediate risk for half-siblings and no increased risk for adoptive relatives. Therefore, there is a systematic reduction in relative risk correlated with genetic distance from the proband (Lin et al. 2012). The crude recurrence in children of conjugal pairs is significantly higher than that of children with one affected parent (Robertson et al. 1997), and the occurrence rate of MS in the patients' offspring are 20- to 50-fold greater than that in the general population. The higher

L. Llobet · A. Gómez-Durán · R. Iceta · E. Iglesias · J. Montoya · E. Ruiz-Pesini
Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular,
Centro de Investigaciones Biomédicas En Red de Enfermedades Raras (CIBERER) Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain

J. Martín-Martínez · J. R. Ara
Servicio de Neurología, Hospital Universitario Miguel Servet,
Zaragoza, Spain

E. Ruiz-Pesini
Fundación ARAID, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain

E. Ruiz-Pesini (✉)
Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular,
Universidad de Zaragoza, C/Miguel Servet, 177,
Zaragoza 50013, Spain
e-mail: eduruiz@unizar.es

recurrence risk for maternal rather than paternal half-siblings suggests a maternal effect of MS susceptibility (Ebers et al. 2004).

All of these epidemiological data suggest that genetic variation is important for susceptibility to MS, and as human mitochondrial DNA (mtDNA) is maternally inherited (Giles et al. 1980), a genetic susceptibility transmitted in the mitochondrial genome may be a potential contributor to MS risk. Supporting this idea, an association between MS and Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) was suggested in the 1960s (Lees et al. 1964). LHON is a disease caused by point mutations in the mtDNA-encoded genes of respiratory complex I. Some LHON patients develop a demyelinating disease that is both clinically and radiologically indistinguishable of MS except for the prominence of visual failure. This association is sometimes referred to as "Harding's disease" (Harding et al. 1992, Palace 2009). When two rare conditions such as LHON and MS coexist, it is appropriate to question if this occurs by chance. These two pathologies coincide 50 times more frequently than expected (Palace 2009), which suggests that LHON mtDNA mutations may affect the pathogenesis of MS. Moreover, MS has also been associated with other non-LHON mtDNA pathologic mutations, such as deletions (Bet et al. 1994).

The mtDNA pathologic mutations are very rare, and their importance for MS should be marginal. However, the analysis of the mtDNA genetic backgrounds of MS patients has suggested associations with particular mtDNA haplogroups (Ahari et al. 2007, Ban et al. 2008, Chalmers et al. 1996, Ghabaee et al. 2009, Hanefeld et al. 1994, Houshmand et al. 2005, Kumleh et al. 2006, Mayr-Wohlfart et al. 1996, Mihailova et al. 2007, Ohlenbusch et al. 1998, Otaegui et al. 2004, Otaegui et al. 2007, Penisson-Besnier et al. 2001, Venkateswaran et al. 2011, Vyshkina et al. 2005, Vyshkina et al. 2008, Yu et al. 2008). The mtDNA haplogroups are sets of phylogenetically related mtDNA genotypes. Thus, their population frequencies are much higher than those of mtDNA pathologic mutations. For example, a higher susceptibility to MS has been associated with the mtDNA haplogroup Uk (Kalman et al. 1996a, Kalman et al. 1996b, Kalman and Alder 1998, Kalman et al. 1999). The European frequency of this haplogroups is 6.1 % (Richard et al. 2007). Very interestingly, this haplogroup is also at a higher risk for LHON (Hudson et al. 2007).

The etiology of MS is difficult to elucidate because of its multifactorial nature. The disease is likely caused by a complex interaction between multiple genes and environmental factors (Vidaurre et al. 2012). Thus, the contribution of the mtDNA genetic background to MS is likely dependent on the context. An important disadvantage of MS animal models is that they do not consider the human genetic background (Mix et al. 2010). Consequently, human cell models are required to understand the effects of particular genetic variants. Moreover, MS affects

the nervous system and obtaining, culture and manipulate human cells from this tissue is not an easy task. Therefore, to evaluate the effect of the mtDNA haplogroup Uk in this context, we have generated transmitochondrial cell lines, cytoplasmic hybrids or "cybrids" and have simulated the effects of axon demyelination.

Material and methods

Cells and growth conditions

Blood from 165 healthy volunteers was obtained after receiving the approval of the Ethical Committee of the Regional Government (Acta n° 17/2008) and securing a signed informed consent. The mtDNA haplogroups of these samples were characterized by PCR-RFLP. Platelets, which have mitochondria and mtDNA but no nucleus, from 5 individuals from each of the haplogroups H and Uk were used to generate cybrids with osteosarcoma 143B TK⁻ rho⁰ 206 cells, which do not contain mtDNA. The mtDNAs of these 10 cybrid cell lines were completely sequenced (Gomez-Duran et al. 2010). This approach allows the homogenization of nuclear genetic and environmental factors, because all 10 cybrids share the nuclear background and were grown in the same culture conditions.

Most of the experiments were performed with cell lines grown in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) containing glucose (25 mM), pyruvate (1 mM) and fetal bovine serum (FBS 5 %). When the cells were treated with gramicidin, ethanol was used as the drug vehicle.

Determination of ATP levels

The cybrids' ATP levels were measured 8 times using previously published protocols (Gomez-Duran et al. 2012). Briefly, 20,000 cells/well were seeded 10–12 h before measurement. Then, the cells were washed twice with PBS and incubated for 2 h in record solution supplemented with 5 mM 2-deoxy-D-glucose, 1 mM pyruvate and various gramicidin concentrations. The cells were lysed, and the lysates were incubated with luciferin/luciferase reagents. Samples were analyzed using a NovoStar MBG Labtech microplate luminometer, and the results referred to the protein quantity.

Oxygen consumption

Endogenous oxygen consumption was analyzed using the high-resolution oxygraph OROBOROS®. Exponentially growing cells were either treated with 5.3 nM gramicidin for 6 h or were left untreated. The cells were then collected by trypsinization, washed, counted and resuspended at 1.5×10^6 cells/ml. Each cell line and condition was analyzed three times.

Determination of mitochondrial inner membrane potential

The determination of the mitochondrial inner membrane potential (MIMP) was performed in quadruplicate in two independent cell lines using the Mito-ID Membrane Potential Cytotoxicity kit from ENZO following the manufacturer's conditions and the same buffer used for measuring the ATP levels. Briefly, the cells were incubated for 2 h either with or without 5.3 nM gramicidin or 1.2 μ M FCCP as a positive control. The samples were measured using a NovoStar MBG Labtech microplate reader and the results referred to that of cells without drugs.

Determination of cell viability

The cell viability was measured 8 times using the Neutral Red kit from Sigma-Aldrich and conditions previously published (Repetto et al. 2008). Briefly, the cells were either treated with 5.3 nM gramicidin or left untreated for 48 h. Then, the cells were incubated for 2 h with neutral red dye (3.3 g/l), washed with PBS and treated with elution medium followed by gentle shaking for 10 min. Aliquots of the resulting solutions were transferred to 96-well plates, and the absorbance at 540 nm was recorded using a NovoStar MBG Labtech microplate instrument.

Determination of mitochondrial enzyme levels and activity

Exponentially growing cells were treated with 5.3 nM gramicidin during 6 h to determine the mitochondrial enzyme levels and activity. Mitoprofile[®] Human Complex IV Activity and Quantity from Mitosciences (Invitrogen) was used according to the manufacturer's instructions to determine complex IV (CIV) activity and levels. CIV is immunocaptured within the wells and activity is determined colorimetrically by the oxidation of reduced cytochrome c as an absorbance decrease at 550 nm. Subsequently, in the same wells the quantity of enzyme is measured by adding a CIV specific antibody conjugated with alkaline phosphatase. The phosphatase changes a substrate from colorless to yellow at 405 nm. The specific activity of citrate synthase (CS) and the protein levels were assayed according to previously published protocols (Gomez-Duran et al. 2010). All enzyme determinations were performed in triplicate in at least three independent experiments using a NovoStar MBG Labtech microplate instrument.

Statistical analysis

The statistical package StatView 6.0 was used to perform all of the statistics. The mean and standard deviation are represented. The normal distribution was examined using the Kolmogorov–Smirnov test, and the unpaired two-tailed *t*-

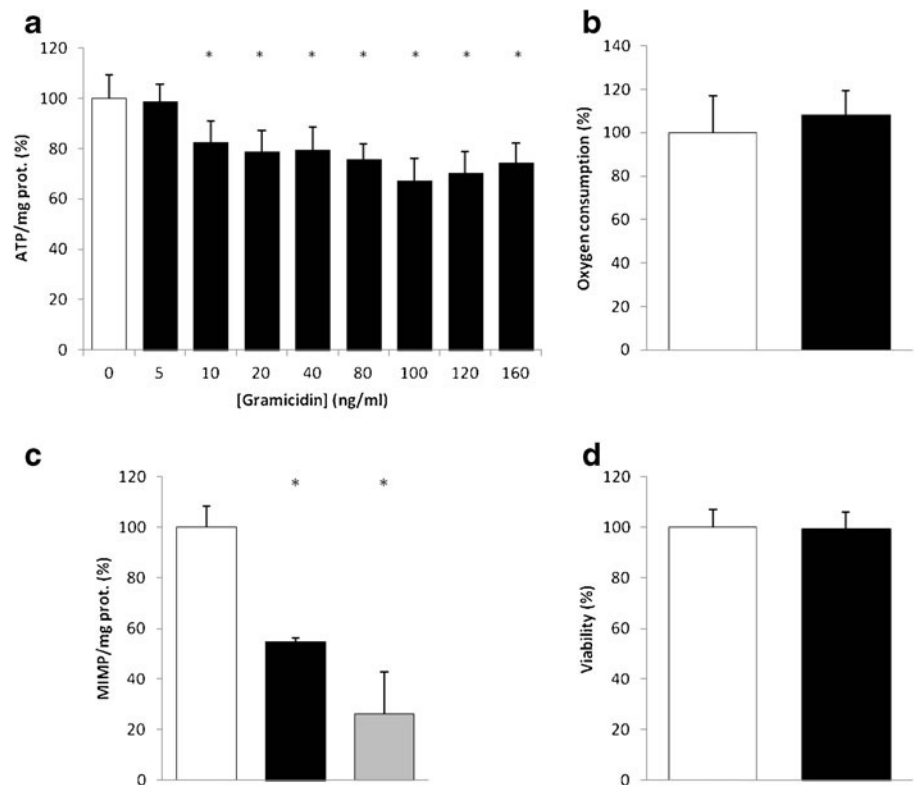
test was used to compare parameters. *P* values < 0.05 were considered to be statistically significant.

Results

To analyze the oxidative phosphorylation (OXPHOS) function of haplogroup Uk, we generated 5 cybrids from this genetic background in an osteosarcoma 143B nuclear background and 5 cybrids from the most common European mtDNA, haplogroup H (Gomez-Duran et al. 2010), for comparison. Demyelinated axons upregulate and reorganize voltage-gated Na⁺ channels, which are usually found only in the nodes of Ranvier, all along the naked axons. The expression of Na⁺/K⁺-ATPase is also increased to restore intracellular Na⁺ concentrations, which enhances ATP demand (van Horssen et al. 2012). Gramicidin rapidly and nonspecifically permeabilizes membranes to monovalent cations and increases ATP turnover by Na⁺/K⁺-ATPase (James et al. 1999). Thus, osteosarcoma cybrids treated with gramicidin better reflect the stress scenario found in MS axons.

To determine the gramicidin concentration required to decrease ATP levels in osteosarcoma 143B cybrids, the cells were cultured with 5 mM 2-deoxy-D-glucose (a glycolytic inhibitor) and drug concentrations ranging from 5 to 160 ng/ml (2.7 to 84.8 nM). In these conditions, gramicidin concentrations greater than 10 ng/ml (5.3 nM) significantly diminished cellular ATP levels (Fig. 1a). As each of the multiple factors contributing to MS most likely exerts a small impact, the remainder of the experiments used 5.3 nM gramicidin, which was the minimum concentration that had an effect on ATP levels. Subsequently, we measured the oxygen consumption but did not find significant differences in this parameter between untreated cybrids and cybrids treated with gramicidin (Fig. 1b). In agreement with this result, it was previously reported that 100 nM gramicidin had no effect on cellular respiration in rat lymphocytes (Arslan et al. 1981). These results are maybe due to a reduced availability of ATP molecules for the initial glucose phosphorylation reactions, slower glycolysis and Krebs cycle rate, and less reducing equivalents, finally resulting in altered oxygen consumption by a decrease in the electron flow through the respiratory chain (Ortsater et al. 2002). To corroborate the observation that OXPHOS function was modified by this drug concentration (5.3 nM), the MIMP was measured, and it was found that treatment with gramicidin greatly decreased the MIMP (Fig. 1c). To confirm that we were truly measuring MIMP, we used 1.2 μ M FCCP as a positive control. This mitochondrial uncoupler also reduced the MIMP (Fig. 1c). Because previous reports showed that gramicidin concentrations greater than 5.3 nM resulted in visible hemolysis of washed human erythrocytes (Engstrom

Fig. 1 Effect of gramicidin on various mitochondrial and cellular parameters. *White and black bars* denote non-treated and gramicidin-treated cells, respectively. The value obtained for non-treated (control) cells was expressed as 100 %, and the value from the gramicidin-treated cells was expressed as a percentage of the control value. An *asterisk* (*) denotes a significant difference compared to untreated cells ($P \leq 0.0029$). **a** ATP levels. There is a negative ($r = -0.759$) and significant ($P = 0.0149$) correlation between the ATP levels and gramicidin doses. Gramicidin 10 ng/ml corresponds to 5.3 nM. **b** Oxygen consumption. **c** Mitochondrial inner membrane potential (MIMP). The *gray bar* denotes FCCP-treated cells. **d** Cell viability



et al. 1993), the viability of these osteosarcoma 143B cybrids after 48 h of treatment with gramicidin was determined. This gramicidin concentration did not affect cell viability (Fig. 1d), which is supported by evidence that fibroblast viability was preserved when cells were forced to increase energy consumption by exposure to 21.2 nM gramicidin (Sgarbi et al. 2009).

Next, the 10 cybrid cell lines were grown in the presence or absence of gramicidin and the specific activity of CS was determined. CS is an enzyme of the mitochondrial matrix that is commonly used as a marker of mitochondrial number and volume. The cells treated with gramicidin showed an increase in CS specific activity (Fig. 2). Thereafter, we analyzed CIV specific activity and quantity as a surrogate

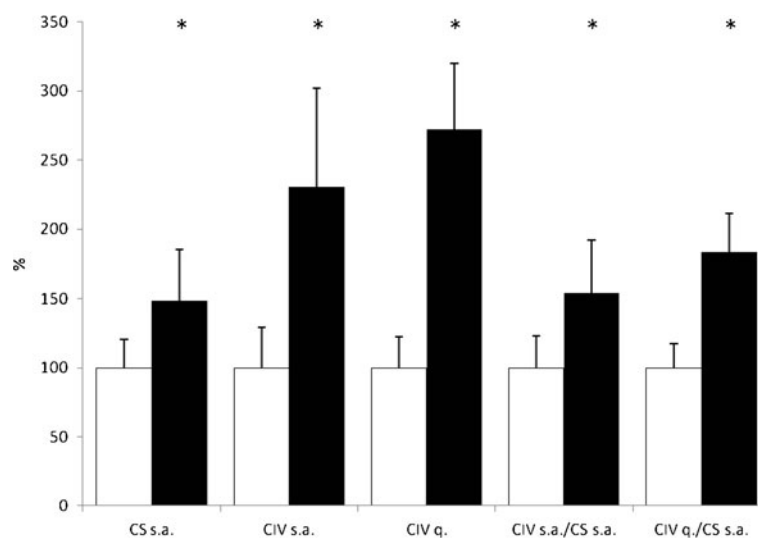


Fig. 2 Mitochondrial enzymes. White and black bars denote non-treated and gramicidin-treated cells, respectively. These variables were determined in triplicate in at least three independent experiments for each of the 10 cybrid cell lines in both conditions. The value obtained for non-treated (control) cells was expressed as

100 %, and the value from the gramicidin-treated cells was expressed as a percentage of the control value. An *asterisk* (*) denotes a significant difference compared to untreated cells ($P \leq 0.0017$). *CS* citrate synthase, *CIV* complex IV, *s.a.* specific activity, *q.* quantity

of the OXPHOS system. The values for these two variables were also significantly higher in cells grown with gramicidin (Fig. 2). These results suggest that ATP-depleted cybrids increase mitochondrial biogenesis. Moreover, the augmented ratios of CIV specific activity and quantity to CS specific activity implies that the attempt to compensate for the energy deficit was accomplished not only by increasing mitochondrial biogenesis but also by increasing the OXPHOS capacity per mitochondrion (Fig. 2).

To examine the effect of the mtDNA genetic background on the OXPHOS compensation, the cybrids were separated based on their mtDNA haplogroup and the CS specific activity and the ratios of CIV specific activity and quantity to CS specific activity were analyzed. There were no differences in the CS specific activity between H and Uk cybrids in either the untreated or gramicidin-treated cybrids (Fig. 3a). However, the significant differences between these two haplogroups regarding the ratios of the CIV specific activity and quantity to the CS specific activity observed in the control cells were not observed in the cells treated with gramicidin (Fig. 3b and c).

Discussion

Gramicidin decreases ATP levels in osteosarcoma 143B cybrids and induces mitochondrial biogenesis and increased OXPHOS capacity per mitochondrion as a compensatory mechanism. Interestingly, these responses can also be observed in several animal models of MS. CIV activity and mitochondrial density were increased in the mouse model of hypomyelination, which was generated by knockout of the gene encoding the myelin basic protein (Andrews et al. 2006). The demyelination after proteolipid protein overexpression in another mouse model is accompanied by an increase in mitochondrial density and CIV activity (Hogan et al. 2009). An increase in mitochondrial numbers has also been observed in the demyelination model induced by Theiler's murine encephalomyelitis virus (Sathornsumetee et al. 2000). More importantly, enhanced mitochondrial density and increased ratio of CIV specific activity versus CS specific activity have been reported in chronic inactive lesions of MS patients, which correlates with the increase in CIV protein expression (Witte et al. 2009). Thus, mitochondria are most likely recruited into demyelinated axons to meet the increased energy demand needed for proper conduction.

In cats, demyelination of the optic nerve was induced with antiserum to galactocerebroside, and increased numbers of mitochondria were observed at the site of demyelination (Mutsaers and Carroll 1998). In humans, ganglion cell axons traverse the lamina cribrosa, and the optic nerve myelination is postlaminal. A higher density of voltage-gated Na⁺ channels in the prelaminar and laminar optic

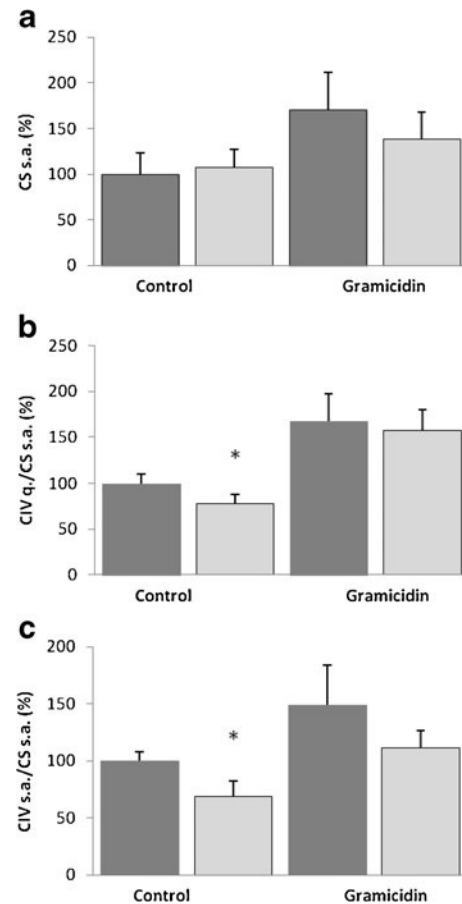


Fig. 3 Mitochondrial enzyme capacities based on the mtDNA haplogroup. *Dark and light gray bars* denote the H and Uk cybrids, respectively. These variables were determined in triplicate in at least three independent experiments for each of the 5 cybrid cell lines from haplogroup H and 5 from haplogroup Uk in both conditions. The value obtained for non-treated H cells was expressed as 100 %, and the value from non-treated Uk cells and gramicidin-treated H and Uk cells was expressed as a percentage of the control value. An *asterisk (*)* denotes a significant difference compared to H cybrids ($P \leq 0.0099$). *CS* citrate synthase, *CIV* complex IV, *s.a.* specific activity, *q.* quantity

nerve is accompanied by physiologically increased numbers of mitochondria and higher CIV activity and levels (Balaratnasingam et al. 2009, Barron et al. 2004, Bristow et al. 2002). Therefore, the propagation of action potentials in these segments of the optic nerve requires greater energy input; as a result, the segments are more vulnerable to OXPHOS impairments, such as those caused by LHON mtDNA mutations. These increased axonal energy demands are most likely a link between LHON and MS.

Our stressed cell model reproduced some of the features found in MS and LHON and could be useful for analyzing the epidemiologic associations observed between the mtDNA haplogroup Uk and LHON (Hudson et al. 2007) or MS (Kalman et al. 1996a, Kalman et al. 1996b, Kalman and Alder 1998, Kalman et al. 1999) after homogenizing the nuclear genetic and environmental factors. We had previously

found that CIV activity and quantity were significantly higher in cybrids from haplogroup H when compared to those of the haplogroup Uk (Gomez-Duran et al. 2010). Here, we show that the ratios of CIV specific activity and quantity to CS specific activity were also significantly higher in the H compared to Uk control cybrids. These results suggest that one or a combination of several single nucleotide polymorphisms (SNPs) defining haplogroup H confers it a higher OXPHOS reserve capacity. There are 19 SNPs differentiating H and Uk haplogroups (4 in the control region, 3 in RNA genes, 9 synonymous and 3 non-synonymous in protein genes). However, this capacity is not sufficient under stress conditions, such as a gramicidin challenge. Under moderate stress conditions that require increased mitochondrial ATP production and in which cell viability is preserved, cybrids from both haplogroups significantly increase this OXPHOS capacity; however this increase is greater in Uk cybrids than in H cybrids. It is possible that a longer or stronger energy stress, such as demyelinated or unmyelinated axons in MS or LHON, respectively, makes individuals in the Uk haplogroup more susceptible to these pathologies. Thus, such individuals could be overrepresented in epidemiologic studies.

If mitochondrial biogenesis in axons is a compensatory mechanism to satisfy increased energy demands and if this process is insufficient in strong stress situations, pharmacologic methods to increase mitochondrial biogenesis could be a potential therapy for LHON and MS. It has been shown that 17 β -estradiol induces a general activation of mitochondrial biogenesis in osteosarcoma 143B cybrids harboring LHON mutations, resulting in a small though significant improvement in energetic competence (Giordano et al. 2011). Treatment with estrogens, which protect against axonal loss and other effects, are currently being used in clinical trials addressing MS (Spence and Voskuhl 2012).

Acknowledgments This work was supported by Química-Farmacéutica Bayer S.L. to E.R.-P. and J.R.A.; and by grants from the Instituto de Salud Carlos III [FIS-PI10/00662 to J.M., and PI11/01301 to E.R.-P.]. L.L. and E.I. have a fellowship from Instituto de Salud Carlos III [FI12/00217] and Universidad de Zaragoza-Banco de Santander, respectively. A.G.-D. was supported by the Asociación de Enfermos de Patología Mitocondrial (AEPMI). R.I. was funded by Química-Farmacéutica Bayer S.L.. The CIBERER is an initiative of the ISCIII.

Conflict of interest None.

References

- Ahari SE, Houshmand M, Panahi MS, Kasraie S, Moin M, Bahar MA (2007) Investigation on mitochondrial tRNA(Leu/Lys), NDI and ATPase 6/8 in Iranian multiple sclerosis patients. *Cell Mol Neurobiol* 27:695–700
- Andrews H, White K, Thomson C, Edgar J, Bates D, Griffiths I, Turnbull D, Nichols P (2006) Increased axonal mitochondrial activity as an adaptation to myelin deficiency in the Shiverer mouse. *J Neurosci Res* 83:1533–1539
- Arslan P, Montecucco C, Celi D, Pozzan T (1981) Effect of monovalent cation ionophores on lymphocyte cellular metabolism. *Biochim Biophys Acta* 643:177–181
- Balaratnasingam C, Morgan WH, Johnstone V, Cringle SJ, Yu DY (2009) Heterogeneous distribution of axonal cytoskeleton proteins in the human optic nerve. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:2824–2838
- Ban M, Elson J, Walton A, Turnbull D, Compston A, Chinnery P, Sawcer S (2008) Investigation of the role of mitochondrial DNA in multiple sclerosis susceptibility. *PLoS ONE* 3:e2891
- Barron MJ, Griffiths P, Turnbull DM, Bates D, Nichols P (2004) The distributions of mitochondria and sodium channels reflect the specific energy requirements and conduction properties of the human optic nerve head. *Br J Ophthalmol* 88:286–290
- Bet L, Moggio M, Comi GP, Mariani C, Prella A, Checcarelli N, Bordoni A, Bresolin N, Scarpini E, Scarlato G (1994) Multiple sclerosis and mitochondrial myopathy: an unusual combination of diseases. *J Neurol* 241:511–516
- Bristow EA, Griffiths PG, Andrews RM, Johnson MA, Turnbull DM (2002) The distribution of mitochondrial activity in relation to optic nerve structure. *Arch Ophthalmol* 120:791–796
- Chalmers RM, Robertson N, Compston DAS, Harding AE (1996) Sequence of mitochondrial DNA in patients with multiple sclerosis. *Ann Neurol* 40:239–243
- Ebers GC, Sadovnick AD, Dyment DA, Yee IM, Willer CJ, Risch N (2004) Parent-of-origin effect in multiple sclerosis: observations in half-siblings. *Lancet* 363:1773–1774
- Engstrom I, Waldenstrom A, Ronquist G (1993) Effects of the ionophore gramicidin D on energy metabolism in human erythrocytes. *Scand J Clin Lab Invest* 53:247–252
- Ghabaee M, Omranisikaroudi M, Amrisaroukolaei S, Meysamie A, Sahraian MA, Bayati A, Sanati MH, Houshman M, Sadeghian H, Vajihazaman K (2009) Mitochondrial mutation in Iranian patients with multiple sclerosis, correlation between haplogroups H, A and clinical manifestations. *Cell Mol Neurobiol* 29:341–346
- Giles RE, Blanc H, Cann HM, Wallace DC (1980) Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:6715–6719
- Giordano C, Montopoli M, Perli E, Orlandi M, Fantin M, Ross-Cisneros FN, Caparrotta L, Martinuzzi A, Ragazzi E, Ghelli A, Sadun AA, d'Amati G, Carelli V (2011) Oestrogens ameliorate mitochondrial dysfunction in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain* 134:220–234
- Gomez-Duran A, Pacheu-Grau D, Lopez-Gallardo E, Diez-Sanchez C, Montoya J, Lopez-Perez MJ, Ruiz-Pesini E (2010) Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups. *Hum Mol Genet* 19:3343–3353
- Gomez-Duran A, Pacheu-Grau D, Martinez-Romero I, Lopez-Gallardo E, Lopez-Perez MJ, Montoya J, Ruiz-Pesini E (2012) Oxidative phosphorylation differences between mitochondrial DNA haplogroups modify the risk of Leber's hereditary optic neuropathy. *Biochim Biophys Acta* 1822:1216–1222
- Hanefeld FA, Ernst BP, Wilichowski E, Christen HJ (1994) Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA mutations in childhood multiple sclerosis. *Neuropediatrics* 25:331
- Harding AE, Sweeney MG, Miller DH, Mumford CJ, Kellar-Wood H, Menard D, McDonald WI, Compston DA (1992) Occurrence of a multiple sclerosis-like illness in women who have a Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA mutation. *Brain* 115:979–989
- Hogan V, White K, Edgar J, McGill A, Karim S, McLaughlin M, Griffiths I, Turnbull D, Nichols P (2009) Increase in mitochondrial density within axons and supporting cells in response to

- demyelination in the Plp1 mouse model. *J Neurosci Res* 87:452–459
- Houshmand M, Sanati MH, Babrzadeh F, Ardalan A, Teimori M, Vakilian M, Akuchekian M, Farhud D, Lotfi J (2005) Population screening for association of mitochondrial haplogroups BM, J, K and M with multiple sclerosis: interrelation between haplogroup J and MS in Persian patients. *Mult Scler* 11:728–730
- Hudson G, Carelli V, Spruijt L, Gerards M, Mowbray C, Achilli A, Pyle A, Elson J, Howell N, La Morgia C, Valentino ML, Huoponen K, Savontaus ML, Nikoskelainen E, Sadun AA, Salomao SR, Belfort R Jr, Griffiths P, Man PY, de Coe RF, Horvath R, Zeviani M, Smeets HJ, Torroni A, Chinnery PF (2007) Clinical expression of Leber hereditary optic neuropathy is affected by the mitochondrial DNA-haplogroup background. *Am J Hum Genet* 81:228–233
- James AM, Sheard PW, Wei YH, Murphy MP (1999) Decreased ATP synthesis is phenotypically expressed during increased energy demand in fibroblasts containing mitochondrial tRNA mutations. *Eur J Biochem* 259:462–469
- Kalman B, Alder H (1998) Is the mitochondrial DNA involved in determining susceptibility to multiple sclerosis? *Acta Neurol Scand* 98:232–237
- Kalman B, Alder H, Bosch UF, Lublin FD, Chatterjee D (1996a) The evolutionary relationship among Caucasian MS patients and controls. *Mult Scler* 1:288–295
- Kalman B, Lublin FD, Alder H (1996b) Characterization of the mitochondrial DNA in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 140:75–84
- Kalman B, Li S, Chatterjee D, O'Connor J, Voehl MR, Brown MD, Alder H (1999) Large scale screening of the mitochondrial DNA reveals no pathogenic mutations but a haplotype associated with multiple sclerosis in Caucasians. *Acta Neurol Scand* 99:16–25
- Kumleh HH, Houshmand M, Panahi MS, Riazi GH, Sanati MH, Gharagozli K, Ghabaee M (2006) Mitochondrial D-Loop Variation in Persian Multiple Sclerosis Patients: K and A Haplogroups as a Risk Factor!! *Cell Mol Neurobiol* 26:119–125
- Lees F, Macdonald AM, Turner JW (1964) Leber's disease with symptoms resembling disseminated sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 27:415–421
- Lin R, Charlesworth J, van der Mei I, Taylor BV (2012) The genetics of multiple sclerosis. *Pract Neurol* 12:279–288
- Mayr-Wohlfart U, Paulus C, Henneberg A, Rodel G (1996) Mitochondrial DNA mutations in multiple sclerosis patients with severe optic involvement. *Acta Neurol Scand* 94:167–171
- Mihailova SM, Ivanova MI, Quin LM, Naumova EJ (2007) Mitochondrial DNA variants in Bulgarian patients affected by multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 14:44–47
- Mix E, Meyer-Rienecker H, Hartung HP, Zettl UK (2010) Animal models of multiple sclerosis—potentials and limitations. *Prog Neurobiol* 92:386–404
- Mutsaers SE, Carroll WM (1998) Focal accumulation of intra-axonal mitochondria in demyelination of the cat optic nerve. *Acta Neuropathol* 96:139–143
- Ohlenbusch A, Wilichowski E, Hanefeld F (1998) Characterization of the mitochondrial genome in childhood multiple sclerosis. I. Optic neuritis and LHON mutations. *Neuropediatrics* 29:175–179
- Ortsater H, Liss P, Akerman KE, Bergsten P (2002) Contribution of glycolytic and mitochondrial pathways in glucose-induced changes in islet respiration and insulin secretion. *Pflugers Arch* 444:506–512
- Otaegui D, Saenz A, Martinez-Zabaleta M, Villoslada P, Fernandez-Manchola I, Alvarez de Arcaya A, Emparanza JI, Lopez de Munain A (2004) Mitochondrial haplogroups in Basque multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 10:532–535
- Otaegui D, Saenz A, Ruiz-Martinez J, Olaskoaga J, Lopez de Munain A (2007) UCP2 and mitochondrial haplogroups as a multiple sclerosis risk factor. *Mult Scler* 13:454–458
- Palace J (2009) Multiple sclerosis associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *J Neurol Sci* 286:24–27
- Penisson-Besnier I, Moreau C, Jacques C, Roger JC, Dubas F, Reynier P (2001) Multiple sclerosis and Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA mutations. *Rev Neurol (Paris)* 157:537–541
- Repetto G, del Peso A, Zurita JL (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc* 3:1125–1131
- Richard C, Pennarun E, Kivisild T, Tambets K, Tolk HV, Metspalu E, Reidla M, Chevalier S, Giraudet S, Lauc LB, Pericic M, Rudan P, Claustres M, Journel H, Dorval I, Muller C, Villems R, Chaventre A, Moisan JP (2007) An mtDNA perspective of French genetic variation. *Ann Hum Biol* 34:68–79
- Robertson NP, O'Riordan JI, Chataway J, Kingsley DP, Miller DH, Clayton D, Compston DA (1997) Offspring recurrence rates and clinical characteristics of conjugal multiple sclerosis. *Lancet* 349:1587–1590
- Sathornsumetee S, McGavern DB, Ure DR, Rodriguez M (2000) Quantitative ultrastructural analysis of a single spinal cord demyelinated lesion predicts total lesion load, axonal loss, and neurological dysfunction in a murine model of multiple sclerosis. *Am J Pathol* 157:1365–1376
- Sgarbi G, Casalena GA, Baracca A, Lenaz G, DiMauro S, Solaini G (2009) Human NARP mitochondrial mutation metabolism corrected with alpha-ketoglutarate/aspartate: a potential new therapy. *Arch Neurol* 66:951–957
- Spence RD, Voskuhl RR (2012) Neuroprotective effects of estrogens and androgens in CNS inflammation and neurodegeneration. *Front Neuroendocrinol* 33:105–115
- van Horssen J, Witte ME, Ciccarelli O (2012) The role of mitochondria in axonal degeneration and tissue repair in MS. *Mult Scler* 18:1058–1067
- Venkateswaran S, Zheng K, Sacchetti M, Gagne D, Arnold DL, Sadovnick AD, Scherer SW, Banwell B, Bar-Or A, Simon DK, Canadian Pediatric Demyelinating Disease N (2011) Mitochondrial DNA haplogroups and mutations in children with acquired central demyelination. *Neurology* 76:774–780
- Vidaurre OG, Liu J, Haines J, Sandoval J, Nowakowski R, Casaccia P (2012) An integrated approach to design novel therapeutic interventions for demyelinating disorders. *Eur J Neurosci* 35:1879–1886
- Vyshkina T, Banisor I, Shugart YY, Leist TP, Kalman B (2005) Genetic variants of Complex I in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 228:55–64
- Vyshkina T, Sylvester A, Sadiq S, Bonilla E, Canter JA, Perl A, Kalman B (2008) Association of common mitochondrial DNA variants with multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol* 129:31–35
- Witte ME, Bo L, Rodenburg RJ, Belien JA, Musters R, Hazes T, Wintjes LT, Smeitink JA, Geurts JJ, De Vries HE, van der Valk P, van Horssen J (2009) Enhanced number and activity of mitochondria in multiple sclerosis lesions. *J Pathol* 219:193–204
- Yu X, Koczan D, Sulonen AM, Akkad DA, Kroner A, Comabella M, Costa G, Corongiu D, Goertsches R, Camina-Tato M, Thiesen HJ, Nyland HI, Mork SJ, Montalban X, Rieckmann P, Marrosu MG, Myhr KM, Epplen JT, Saarela J, Ibrahim SM (2008) mtDNA nt13708A variant increases the risk of multiple sclerosis. *PLoS ONE* 3:e1530

Research Overview

Cybrids for Mitochondrial DNA Pharmacogenomics

Eldris Iglesias,^{1,2} Laura Llobet,^{1,2} David Pacheu-Grau,^{1,2} Aurora Gómez-Durán,^{1,2} and Eduardo Ruiz-Pesini^{1,2,3*}¹Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain²Centro de Investigaciones Biomédicas En Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Zaragoza, Spain³Fundación ARAID, Zaragoza, Spain

Strategy, Management and Health Policy				
Enabling Technology, Genomics, Proteomics	Preclinical Research	Preclinical Development Toxicology, Formulation Drug Delivery, Pharmacokinetics	Clinical Development Phases I-III Regulatory, Quality, Manufacturing	Postmarketing Phase IV

ABSTRACT Several key components of the oxidative phosphorylation system are coded in mitochondrial DNA. In humans, the mutation rate of the mitochondrial genome is higher than that of nuclear DNA. Some of these mutations can modify the interaction of mitochondrial DNA-encoded products with different therapeutic drugs. Several of these mutations have survived evolution, therefore generating different mitochondrial DNA genetic backgrounds. Thus, personalized medicine approaches must consider these particular interactions. However, before incorporating this knowledge into patient treatments, cellular and molecular studies are required. In this review, we discuss the cybrid model as a tool for this type of analysis, along with the pitfalls and improvements that are necessary before the translation of such models to medical practice. *Drug Dev Res* 73 : 453–460, 2012. © 2012 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: mitochondria; mtDNA; pharmacogenomics; cybrid cell lines

INTRODUCTION

The oxidative phosphorylation (OXPHOS) system is embedded in the mitochondrial inner membrane. This system includes ATP synthase (complex V, CV) and the electron transport chain (ETC). The ETC contains respiratory complexes I through IV (CI-CIV), cytochrome c, and the lipid coenzyme Q (Q). The electrons from nutrients flow along this chain, resulting in the reduction of inhaled oxygen to water. By eating and respiring, we supply electron donors and acceptors to the ETC. The electron flow is accompanied by the pumping of protons into the intermembrane space, thus generating an electrochemical gradient. Among many other functions, this proton gradient contributes to the regulation of cytosolic calcium levels, the production of reactive oxygen species (ROS), and ATP synthesis when the protons return to the matrix through the CV proton channel. Because these compounds can behave as second messengers, OXPHOS regulates many cellular

functions. Disequilibrium in the OXPHOS system is frequently associated with various disorders [Martínez-Romero et al., 2011].

Thirteen subunits of the OXPHOS system are coded in DNA molecules located in the mitochondrial matrix and known as mitochondrial DNA (mtDNA). These polypeptides include seven of CI, one of CIII, three of CIV, and two of CV. Besides these 13 polypeptides, mtDNA also codes for 22 tRNAs and 2 rRNAs that are required for the expression of these proteins. Because of their particular location and genetic features, mtDNA molecules have a high mutation rate [Montoya

*Correspondence to: Eduardo Ruiz-Pesini. Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular. Universidad de Zaragoza. C/Miguel Servet 177, 50013-Zaragoza, Spain. E-mail: eduruiz@unizar.es

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/ddr.21037

et al., 2009]. Many of these mutations will be removed by natural selection [Ruiz-Pesini et al., 2004] but some will survive, giving rise to new genetic backgrounds known as mtDNA haplogroups. An mtDNA haplogroup is a set of phylogenetically related mtDNA genotypes. These haplogroups are defined by ancient and frequent single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the mtDNA.

mtDNA GENETIC VARIATION AND DRUG RESPONSE

The mtDNA SNPs can affect OXPHOS function [Gomez-Duran et al., 2010], and as a consequence modify individual susceptibility to various xenobiotics. For example, more than half of patients with bipolar disorder do not completely respond to lithium maintenance therapy, the first drug of choice. The mtDNA polymorphism m.10398A/p.MT-ND3:Thr114 may be a genetic marker predicting the efficacy of lithium treatment in patients with bipolar disorder [Washizuka et al., 2003]. Riboflavin is an OXPHOS enhancer used to prevent migraines. However, individuals from mtDNA haplogroup H do not respond to riboflavin [Di Lorenzo et al., 2009]. Cisplatin is a highly effective chemotherapeutic agent, but its use is limited by nephrotoxicity, neurotoxicity, and ototoxicity. It was recently shown that 5 out of 20 patients with hearing impairments under therapeutic doses of cisplatin belonged to the mtDNA haplogroup J, while only 1 of 19 patients without hearing impairment belonged to this haplogroup [Peters et al., 2003]. Nucleoside reverse transcriptase inhibitors were the first drugs approved to treat human immunodeficiency virus infection. These drugs inhibit human mtDNA polymerase- γ and cause peripheral neuropathy, lipatrophy, and occasional hearing loss. The mtDNA European T and African L1c haplogroups are independent predictors of peripheral neuropathy in these patients [Hulgan et al., 2005; Canter et al., 2008, 2010; Kallianpur and Hulgan, 2009]. However, mtDNA haplogroup H is strongly associated with increased lipatrophy [Hendrickson et al., 2009], whereas mtDNA haplogroup J provides relative protection against lipatrophy [Hulgan et al., 2008].

The mtDNA mutations can also modify the susceptibility to different xenobiotics directly. The m.1494C>T and m.1555A>G transitions rebuild a Watson-Crick base pair in the 12S rRNA that increases aminoglycoside binding at the rRNA decoding site. In this way, aminoglycosides induce nonsyndromic hearing loss in individuals with these mutations [Prezant et al., 1993; Zhao et al., 2004; Pacheu-Grau et al., 2010a,b 2011]. Many pesticides are inhibitors that act on the Q-binding sites in mitochondrial cytochrome b. Mutations affecting these sites may modify inhibition. For example, in *Saccharo-*

myces cerevisiae, an isoleucine to phenylalanine mutation at position 17 of cytochrome b (position 18 in humans) causes resistance to diuron, an herbicide [di Rago et al., 1986]. Interestingly, mammals appear to be naturally resistant to diuron, as 80%, including humans, have phenylalanine at this position. Similarly, because individuals from mtDNA haplogroups J1c and Uk have a p.MT-CYB:F18L mutation, it is possible that these individuals differentially respond to particular xenobiotics [Gomez-Duran et al., 2011].

MODELS FOR mtDNA PHARMACOGENOMICS STUDIES

In mtDNA pharmacogenomic approaches, the interactions between particular drugs and compounds and different human mtDNA genetic backgrounds are analyzed. It would be interesting to introduce a particular human mtDNA variant in mouse mtDNA and then generate the animal harboring this mutation. In this way, the model would permit the study of the drug/mtDNA SNP interaction in terms of the whole organism level. However, the introduction of a particular mutation into an animal's mtDNA is not possible. Moreover, this approach would break the functional coevolution of all the SNPs in that mtDNA molecule. Thus, the model would not be very representative of the human haplotype under study [Wallace, 2007]. To maintain the functional coevolution of mtDNA SNPs, it would be possible to introduce human mitochondria with human mtDNAs into animal cells [Kenyon and Moraes, 1997]. However, the rate of mtDNA evolution is much higher than that of nuclear DNA (nDNA) [Brown et al., 1979]. Moreover, nuclear genes for proteins that interact with mtDNA-encoded products also evolve faster than the other nDNA genes to maintain a successful interaction [Schmidt et al., 2005; Brindfalk et al., 2007; Smits et al., 2007]. In fact, some clearly pathological human mtDNA mutations represent the wild-type allele in other animals [Kern and Kondrashov, 2004; Pacheu-Grau et al., 2011]. Therefore, the interaction of the human mtDNA with the animal nDNA would be different from that found in humans [Barrientos et al., 1998], and, again, the model would not be representative of humans. Thus, models based on the human genome are required [Schule et al., 2009].

The previous considerations make the use of human cell models completely necessary. An advantage of using cells is that environmental factors can be completely homogenized. However, cells directly derived from individuals will have different nDNA genotypes. As a result, they will not be convenient models to analyze the role of mtDNA population genetic variants, as nDNA represents 99.9995% of the human genome

and, therefore, many nDNA SNPs could affect the results of mtDNA pharmacogenomics studies. Therefore, homogeneous nuclear backgrounds are required. Fortunately, a very useful model is available to individualize the phenotypic effect of mtDNA haplotypes. This model is a transmitochondrial cell line, also known as cytoplasmic hybrids or cybrids [Wallace et al., 1975]. Cybrid cell lines share the same nuclear genetic background and environmental conditions but differ in their mtDNA genotype due to the fusion of a nucleated cell with an enucleated cell (cytoplast) [Bunn et al., 1974]. Cell fragments with mitochondria but without nucleus, such as platelets [Chomyn et al., 1994], synaptosomes [Inoue et al., 1997], or whole cells treated with nuclear poisons [Bayona-Bafaluy et al., 2003], can also be used as cytoplasm donors. The cytoplasm contribution from the donor cell can be increased via the reconstituted cell (recons) approach. In this approach, most of the cytoplasm of the receptor cell is removed, and a karyoplast is obtained. A karyoplast is a nucleus surrounded by a thin cytoplasm layer. A mix of mtDNA from the donor and receptor cells is present in cybrids and, to a lesser extent, in recons. This condition is called heteroplasmy. In contrast, a cell with only one type of mtDNA is homoplasmic. This cell type can be obtained by using a receptor cell without mtDNA, a ρ^0 cell [King and Attardi, 1989], or by pretreating cells with rhodamine 6G, a toxic mitochondrial dye [Trounce and Wallace, 1996] (Fig. 1).

Cybrid technology was used to demonstrate the mitochondrial inheritance of human chloramphenicol resistance due to the m.2939C>A/*MT-RNR2* and m.2991T>C/*MT-RNR2* mutations [Wallace et al., 1975, 1977; Blanc et al., 1981; Wallace, 1981]. Furthermore, cybrids have been very useful for studying susceptibility to other ribosomal antibiotics, such as erythromycin [Doersen and Stanbridge, 1979; Luca et al., 2004] and the aminoglycosides [Inoue et al., 1996; Guan et al., 2001; Giordano et al., 2002; Zhao et al., 2005]. It has also been shown that tumors derived from cybrids with mtDNA from cancer lines were more resistant than those with mtDNA from healthy individuals in suppressing tumor growth and inducing massive apoptosis when anticancer drugs were administered [Mizutani et al., 2009; Bayona-Bafaluy et al., 2011]. Because of their frequency, common genetic variants, such as those defining mtDNA haplogroups, will be more interesting to study. It was recently shown that n-hexane might act as an exogenous trigger for Leber's hereditary optic neuropathy (LHON). The sensitivity to cell death induced by n-hexane's neurotoxic metabolite, 2,5-hexanedione, was greatly increased in cybrids carrying the LHON mutations in haplogroup J [Ghelli et al., 2009]. Valproic acid is an antimigraine agent also used

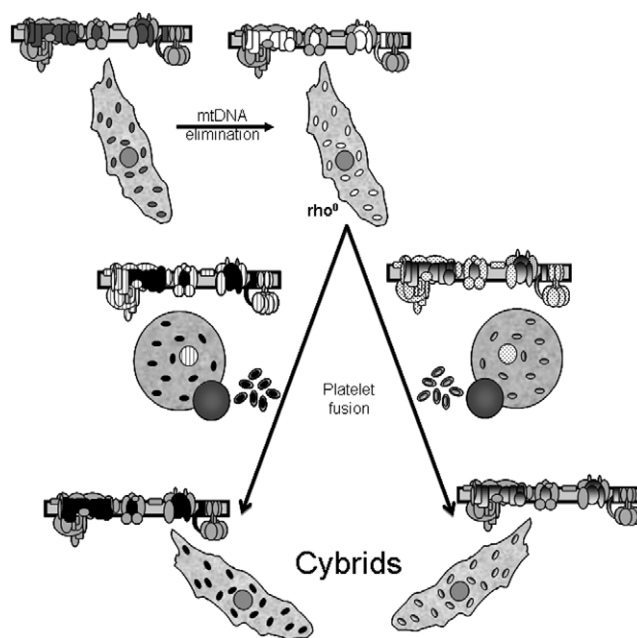


Fig. 1. Transmitochondrial cell lines. Cells and their oxidative phosphorylation systems are displayed. The gray scale denotes the genetic origin of the particular OXPHOS subunits. Thus, the subunits coded by the nuclear or mitochondrial DNA are shown with the same code as that used to represent the nucleus or mitochondria, respectively.

for prophylactic treatment of bipolar disorder. Valproate significantly decreased mitochondrial calcium levels in cybrids from mtDNA macrohaplogroup N, but does not decrease mitochondrial calcium levels in cybrids from other macrohaplogroup [Kazuno et al., 2008]. In human cybrids, the antioxidant N-acetylcysteine significantly decreases mtDNA levels. This effect is larger for cybrids from mtDNA haplogroup H [Gomez-Duran et al., 2010].

CONSIDERATIONS REGARDING THE CYBRID MODEL

Despite the previous observations, the use of model systems that are appropriate to detect large phenotypic effects might not be optimal for the analysis of the interaction between common genetic variants and particular xenobiotics. Therefore, several concerns should be taken into account. Some of these concerns have already been discussed [Gomez-Duran et al., 2010] (Table 1).

When cybrids built from ρ^0 cells are used, a particular issue must be considered. Compounds that interfere with mtDNA replication have been frequently used to generate cells without mtDNA. The primary disadvantage is their potential mutagenic effects. However, the recent development of vectors that allow

TABLE 1. Cell models for oxidative phosphorylation (OXPHOS) studies: Answers to some drawbacks

Problem	Solution
Cybrid cell lines	
Nuclear mutations	Recons, endonucleases
mtDNA somatic mutations	Young platelet donors
Mutations in culture	Resequencing
Nuclear clonal effects	Multiple cybrid clones
mtDNA steady-state levels	Culture passages
Tumoral cell lines	
Only proliferative cells	Cell differentiation
Aneuploidy	Stem cells
Any cultured cell	
<i>Mycoplasma</i> contamination	Frequent checkups
Antibiotics unspecific effects	Growing without antibiotics
Different culture phase	Same confluence level
Low OXPHOS function	Low sugar concentration
Tissue hyperoxia	Tissue oxygen concentrations
Only one cell type	Cells from different tissue

the temporal expression of mtDNA-degrading enzymes removes the necessity of using mutagenic drugs to obtain rho⁰ cells. Regardless, osteosarcoma 143B rho⁰ cells generated by these two methods did not show differences in several studied parameters [Kukat et al., 2008].

Additional considerations are required for experiments using cell culture. For example, some mitochondria-related parameters are altered when the cells progress from the early to logarithmic to confluent phases. Particularly, the oxygen tension at the surface of the cell cultures decreases linearly as the cell density increases [Tokuda et al., 2000]. Therefore, it is critical to perform experiments at the same confluence level. Moreover, mycoplasma contamination of the cultured cells affects the cell respiration [Gabridge, 1975; Koch and Biaglow, 1983; Darin et al., 2003], the induction of ROS [Sun et al., 2008], and the drug sensitivity of the cell lines [Doersen and Stanbridge, 1981]. Thus, the absence of this microorganism should be confirmed regularly.

Aminoglycoside and penicillin are usually used to avoid bacterial contamination of the cell cultures. However, penicillin causes irreversible inhibition of the mitochondrial carnitine-acylcarnitine transporter after prolonged incubation [Pochini et al., 2008], and aminoglycosides might inhibit mitochondrial protein synthesis [Bottger, 2007]. Aminoglycosides are also positively charged molecules that can interact with other negatively charged molecules, such as nucleic acids or phospholipids [Hermann, 2007]. Therefore they can modify cell physiology in unknown ways. Thus, to avoid undesired phenotypic effects, cybrid cell lines should be grown without antibiotics.

Cell cultures are usually carried out using high glucose concentrations. Under these conditions, cells with highly pathologic mtDNA mutations are able to grow [Robinson et al., 1992]. The chronic exposure to high glucose is also responsible for a decrease in mitochondrial biogenesis [Palmeira et al., 2007]. Therefore, in excess glucose conditions, the cells are not dependent on mitochondrial function. On the contrary, the cells grown in the absence of fermentable carbohydrates stimulate mitochondrial biogenesis and oxidative metabolism [Weber et al., 2002] as glutamine provides most of the cell energy when carbohydrate concentrations are not high [Reitzer et al., 1979]. Thus, the potential OXPHOS effects of different drugs can be more easily shown using cells grown in the absence of high glucose [Marroquin et al., 2007; Swiss and Will, 2011].

Oxygen is fundamental for life and is particularly essential for OXPHOS function. Oxygen concentration is, therefore, an important signal. Nonetheless, oxygen is rarely taken into account in cell culture. In room air, oxygen comprises 21% of the gas, and cell culture is usually performed at oxygen levels of 20%. However, the mean tissue level of oxygen is approximately 3% [Csete, 2005]. More oxygen is not necessarily better in the case of tissue culture, and the exposure of cells to high levels of oxygen can be toxic. Moreover, it is possible to lower the oxygen tension in tissue culture for prolonged periods of time to levels closer to normal physiological levels without subjecting the cells to hypoxic stress. In fact, the incubation of human fetal mesencephalic precursor cells in 3% atmospheric oxygen resulted in higher cellular yields than in room air [Storch et al., 2001], and the differentiation of precursor cells into dopaminergic neurons is increased at lower oxygen levels when compared with atmospheric oxygen [Studer et al., 2000].

Undifferentiated SH-SY5Y cells are more susceptible to 6-hydroxydopamine or 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP), two toxins used in chemically induced models of Parkinson's disease, than differentiated cells [Cheung et al., 2009]. Thus, the cell responses change depending on the differentiation status. Thus, to simulate real conditions, undifferentiated and differentiated cells must be studied. Undifferentiated cells, which represent proliferative cells, will aid in understanding tissue dynamics, whereas differentiated cells, which are postmitotic, are more associated with the tissue function. SH-SY5Y neuroblastoma cells can be differentiated into neuron-like cells with retinoic acid or the phorbol ester 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) [Pahlman et al., 1990]. Depending on differentiation conditions, these cells express dopaminergic markers, e.g., tyrosine hydroxylase (TH),

dopamine D2 and D3 receptors, the dopamine (DAT) and vesicular monoamine (VMAT2) transporters [Presgraves et al., 2004] Teratocarcinoma NT2 cells can be differentiated into dopamine neurons and express an impressive variety of dopaminergic markers, including TH, DAT, aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC), nuclear receptor related 1 (Nurr1), neurotrophic tyrosine kinase receptor types 2 and 3 (TrkB and TrkC), and GDNF family receptor α 1 (GFRA1). Furthermore, these cells show functional properties of dopaminergic cell lines responding to neurotransmitters and exhibiting electrophysiological excitability [Schwartz et al., 2005].

Markers of osteoblastic differentiation in osteosarcoma 143B cells can be induced by 25(OH)D₃ and 1 α ,25(OH)₂D₃, as evidenced by increases in alkaline phosphatase (ALP) activity, osteocalcin mRNA expression, and mineralization of extracellular matrix by alizarin red staining [Thompson et al., 2012]. Interferon- α -mediated differentiation of lung carcinoma A549 was observed based on increase ALP activity [Krejcová et al., 2009] while rhabdomyosarcoma RD cells retain the capacity to differentiate into myotubes [Vergani et al., 2007]. All cell lines have been used as nuclear backgrounds to build cybrids, and for cybrids with SH-SY5Y, NT2, and RD nuclear backgrounds, the cybridization process does not hamper their differentiation [Wong et al., 2002; Trimmer and Borland, 2005; Vergani et al., 2007].

An important difference between cultured immortal cell lines and primary cultures is their karyotype. Immortal cell lines, and the cybrids derived from them, are usually aneuploid. Thus, the mean number of chromosomes in osteosarcoma 143B cybrids is 65.5 ± 3.0 [Gomez-Duran et al., 2010] a number different from that of the only other analyzed osteosarcoma 143B cybrid (87.3 ± 4.6). This cybrid harbors an m.5703G>A mtDNA mutation [Hao et al., 1999]. Thus, during long-term culture, the cell lines may change in their karyotype. Such changes are due not only to genetic peculiarities but also culture conditions [Mamaeva, 1998]. Therefore, it is important to maintain very stable culture conditions. Teratocarcinoma NT2 cells are also aneuploid and contain between 56 and 61 chromosomes [Mostert et al., 1996]. The karyotype of neuroblastoma SH-SY5Y cells (47,XX) is numerically closer to the normal human karyotype but is still aneuploid [Spengler et al., 2002]. Although stem cells may show chromosomal instability while being cultured continuously in vitro [Hanson and Caisander, 2005], they are generally a source of cultured cells with normal karyotypes [Amabile and Meissner, 2009] and are a potentially useful cell source for building cybrids [Levy et al., 1999].

CONCLUSIONS

Rho⁰ cells karyotyped and completely sequenced can be used to build a collection of cybrids, including several haplotypes of every important mtDNA haplogroup. To model different nDNA/mtDNA interactions, diverse nDNA genetic backgrounds can also be used in other cybrid collections. Although they are not ideal, these collections are currently the best models to apply to mtDNA pharmacogenomics studies. Fortunately, as we have commented, these cybrid collections have a tremendous capacity for improvement. Therefore, these compilations of cybrids will be useful for analyzing the effects of new chemical compounds on OXPHOS function in the context of medicine, agriculture, food, work exposure, etc. In any case, cybrids are only models, and the idiosyncrasies of particular individuals used to develop these should be taken into account.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Instituto de Salud Carlos III (FIS-PI08/0264 and PI11/01301to ER-P). A.G-D. and D.P-G. were supported by Asociación de Enfermos de Patología Mitocondrial. E.I. and L.L. have a fellowship from Universidad de Zaragoza-Banco de Santander and Diputación General de Aragón, respectively. The Centro de Investigaciones Biomédicas En Red de Enfermedades Raras is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III.

REFERENCES

- Amabile G, Meissner A. 2009. Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine. *Trends Mol Med* 15:59–68.
- Barrientos A, Kenyon L, Moraes CT. 1998. Human xenomitocondrial cybrids. Cellular models of mitochondrial complex I deficiency. *J Biol Chem* 273:14210–14217.
- Bayona-Bafaluy MP, Lopez-Gallardo E, Montoya J, Ruiz-Pesini E. 2011. Maternally inherited susceptibility to cancer. *Biochim Biophys Acta* 1807:643–649.
- Bayona-Bafaluy MP, Manfredi G, Moraes CT. 2003. A chemical enucleation method for the transfer of mitochondrial DNA to rho(o) cells. *Nucleic Acids Res* 31:e98.
- Blanc H, Adams CW, Wallace DC. 1981. Different nucleotide changes in the large rRNA gene of the mitochondrial DNA confer chloramphenicol resistance on two human cell lines. *Nucleic Acids Res* 9:5785–5795.
- Bottger EC. 2007. Antimicrobial agents targeting the ribosome: the issue of selectivity and toxicity—lessons to be learned. *Cell Mol Life Sci* 64:791–795.
- Brindefalk B, Viklund J, Larsson D, Thollessen M, Andersson SG. 2007. Origin and evolution of the mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases. *Mol Biol Evol* 24:743–756.

- Brown WM, George M Jr, Wilson AC. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:1967–1971.
- Bunn CL, Wallace DC, Eisenstadt JM. 1974. Cytoplasmic inheritance of chloramphenicol resistance in mouse tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71:1681–1685.
- Canter JA, Haas DW, Kallianpur AR, Ritchie MD, Robbins GK, Shafer RW, Clifford DB, Murdock DG, Hulgán T. 2008. The mitochondrial pharmacogenomics of haplogroup T: MTND2*LHON4917G and antiretroviral therapy-associated peripheral neuropathy. *Pharmacogenomics J* 8:71–77.
- Canter JA, Robbins GK, Selph D, Clifford DB, Kallianpur AR, Shafer R, Levy S, Murdock DG, Ritchie MD, Haas DW, et al. 2010. African mitochondrial DNA subhaplogroups and peripheral neuropathy during antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 201:1703–1707.
- Cheung YT, Lau WK, Yu MS, Lai CS, Yeung SC, So KF, Chang RC. 2009. Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *Neurotoxicology* 30:127–135.
- Chomyn A, Lai ST, Shakeley R, Bresolin N, Scarlato G, Attardi G. 1994. Platelet-mediated transformation of mtDNA-less human cells: analysis of phenotypic variability among clones from normal individuals—and complementation behavior of the tRNALys mutation causing myoclonic epilepsy and ragged red fibers. *Am J Hum Genet* 54:966–974.
- Csete M. 2005. Oxygen in the cultivation of stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 1049:1–8.
- Darin N, Kadhon N, Briere JJ, Chretien D, Bebear CM, Rotig A, Munnich A, Rustin P. 2003. Mitochondrial activities in human cultured skin fibroblasts contaminated by *Mycoplasma hyorhinis*. *BMC Biochem* 4:15–21.
- Di Lorenzo C, Pierelli F, Coppola G, Grieco GS, Rengo C, Ciccollella M, Magis D, Bolla M, Casali C, Santorelli FM, et al. 2009. Mitochondrial DNA haplogroups influence the therapeutic response to riboflavin in migraineurs. *Neurology* 72:1588–1594.
- di Rago JP, Perea X, Colson AM. 1986. DNA sequence analysis of diuron-resistant mutations in the mitochondrial cytochrome b gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 208:208–210.
- Doersen CJ, Stanbridge EJ. 1979. Cytoplasmic inheritance of erythromycin resistance in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4549–4553.
- Doersen CJ, Stanbridge EJ. 1981. Effects of mycoplasma contamination on phenotypic expression of mitochondrial mutants in human cells. *Mol Cell Biol* 1:321–329.
- Gabridge MG. 1975. Oxygen consumption by trachea organ cultures infected with *Mycoplasma pneumoniae*. *Infect Immun* 12:544–549.
- Ghelli A, Porcelli AM, Zanna C, Vidoni S, Mattioli S, Barbieri A, Iommarini L, Pala M, Achilli A, Torroni A, et al. 2009. The background of mitochondrial DNA haplogroup J increases the sensitivity of Leber's hereditary optic neuropathy cells to 2,5-hexanedione toxicity. *PLoS ONE* 4:e7922.
- Giordano C, Pallotti F, Walker WF, Checcarelli N, Musumeci O, Santorelli F, d'Amati G, Schon EA, DiMauro S, Hirano M. 2002. Pathogenesis of the deafness-associated A1555G mitochondrial DNA mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 293:521–529.
- Gomez-Duran A, Pacheu-Grau D, Lopez-Gallardo E, Diez-Sanchez C, Montoya J, Lopez-Perez MJ, Ruiz-Pesini E. 2010. Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups. *Hum Mol Genet* 19:3343–3353.
- Gomez-Duran A, Pacheu-Grau D, Lopez-Perez MJ, Montoya J, Ruiz-Pesini E. 2011. Mitochondrial pharma-Q-genomics: targeting the OXPHOS cytochrome b. *Drug Discov Today* 16:176–180.
- Guan MX, Fischel-Ghodsian N, Attardi G. 2001. Nuclear background determines biochemical phenotype in the deafness-associated mitochondrial 12S rRNA mutation. *Hum Mol Genet* 10:573–580.
- Hanson C, Caisander G. 2005. Human embryonic stem cells and chromosome stability. *APMIS* 113:751–755.
- Hao H, Morrison LE, Moraes CT. 1999. Suppression of a mitochondrial tRNA gene mutation phenotype associated with changes in the nuclear background. *Hum Mol Genet* 8:1117–1124.
- Hendrickson SL, Kingsley LA, Ruiz-Pesini E, Poole JC, Jacobson LP, Palella FJ, Bream JH, Wallace DC, O'Brien SJ. 2009. Mitochondrial DNA haplogroups influence lipoatrophy after highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 51:111–116.
- Hermann T. 2007. Aminoglycoside antibiotics: old drugs and new therapeutic approaches. *Cell Mol Life Sci* 64:1841–1852.
- Hulgán T, Haas DW, Haines JL, Ritchie MD, Robbins GK, Shafer RW, Clifford DB, Kallianpur AR, Summar M, Canter JA. 2005. Mitochondrial haplogroups and peripheral neuropathy during antiretroviral therapy: an adult AIDS clinical trials group study. *AIDS* 19:1341–1349.
- Hulgán T, Tebas P, Canter JA, Mulligan K, Haas DW, Dube M, Grinspoon S, Robbins GK, Motsinger AA, Kallianpur AR, et al. 2008. Hemochromatosis gene polymorphisms, mitochondrial haplogroups, and peripheral lipoatrophy during antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 197:858–866.
- Inoue K, Ito S, Takai D, Soejima A, Shisa H, LePecq JB, Segal-Bendirdjian E, Kagawa Y, Hayashi JI. 1997. Isolation of mitochondrial DNA-less mouse cell lines and their application for trapping mouse synaptosomal mitochondrial DNA with deletion mutations. *J Biol Chem* 272:15510–15515.
- Inoue K, Takai D, Soejima A, Isobe K, Yamasoba T, Oka Y, Goto Y, Hayashi J. 1996. Mutant mtDNA at 1555 A to G in 12S rRNA gene and hypersusceptibility of mitochondrial translation to streptomycin can be co-transferred to rho 0 HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 223:496–501.
- Kallianpur AR, Hulgán T. 2009. Pharmacogenetics of nucleoside reverse-transcriptase inhibitor-associated peripheral neuropathy. *Pharmacogenomics* 10:623–637.
- Kazuno AA, Munakata K, Kato N, Kato T. 2008. Mitochondrial DNA-dependent effects of valproate on mitochondrial calcium levels in trans-mitochondrial cybrids. *Int J Neuropsychopharmacol* 11:71–78.
- Kenyon L, Moraes CT. 1997. Expanding the functional human mitochondrial DNA database by the establishment of primate xenomito-mitochondrial cybrids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:9131–9135.
- Kern AD, Kondrashov FA. 2004. Mechanisms and convergence of compensatory evolution in mammalian mitochondrial tRNAs. *Nat Genet* 36:1207–1212.
- King MP, Attardi G. 1989. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* 246:500–503.
- Koch CJ, Biaglow JE. 1983. Cyanide insensitive respiration in mammalian cells: an artifact of mycoplasma contamination. *Adv Exp Med Biol* 159:337–345.

- Krejčová D, Procházková J, Kubala L, Pachernik J. 2009. Modulation of cell proliferation and differentiation of human lung carcinoma cells by the interferon- α . *Gen Physiol Biophys* 28:294–301.
- Kukat A, Kukat C, Brocher J, Schafer I, Krohne G, Trounce IA, Villani G, Seibel P. 2008. Generation of rho0 cells utilizing a mitochondrially targeted restriction endonuclease and comparative analyses. *Nucleic Acids Res* 36:e44.
- Levy SE, Waymire KG, Kim YL, MacGregor GR, Wallace DC. 1999. Transfer of chloramphenicol-resistant mitochondrial DNA into the chimeric mouse. *Transgenic Res* 8:137–145.
- Luca CC, Lam BL, Moraes CT. 2004. Erythromycin as a potential precipitating agent in the onset of Leber's hereditary optic neuropathy. *Mitochondrion* 4:31–36.
- Mamaeva SE. 1998. Karyotypic evolution of cells in culture: a new concept. *Int Rev Cytol* 178:1–40.
- Marroquin LD, Hynes J, Dykens JA, Jamieson JD, Will Y. 2007. Circumventing the Crabtree effect: replacing media glucose with galactose increases susceptibility of HepG2 cells to mitochondrial toxicants. *Toxicol Sci* 97:539–547.
- Martínez-Romero I, Emperador S, Llobet L, Montoya J, Ruiz-Pesini E. 2011. Mitogenomics: recognizing the significance of mitochondrial genomic variation for personalized medicine. *Curr Pharmacogenomics Person Med* 9:84–93.
- Mizutani S, Miyato Y, Shidara Y, Asoh S, Tokunaga A, Tajiri T, Ohta S. 2009. Mutations in the mitochondrial genome confer resistance of cancer cells to anticancer drugs. *Cancer Sci* 100:1680–1687.
- Montoya J, Lopez-Gallardo E, Diez-Sanchez C, Lopez-Perez MJ, Ruiz-Pesini E. 2009. 20 years of human mtDNA pathologic point mutations: carefully reading the pathogenicity criteria. *Biochim Biophys Acta* 1787:476–483.
- Mostert MM, van de Pol M, van Echten J, Olde Weghuis D, Geurts van Kessel A, Oosterhuis JW, Looijenga LH. 1996. Fluorescence in situ hybridization-based approaches for detection of 12p overrepresentation, in particular i(12p), in cell lines of human testicular germ cell tumors of adults. *Cancer Genet Cytogenet* 87:95–102.
- Pacheu-Grau D, Gomez-Duran A, Lopez-Gallardo E, Pinos T, Andreu AL, Lopez-Perez MJ, Montoya J, Ruiz-Pesini E. 2011. "Progress" renders detrimental an ancient mitochondrial DNA genetic variant. *Hum Mol Genet* 20:4224–4231.
- Pacheu-Grau D, Gomez-Duran A, Lopez-Perez MJ, Montoya J, Ruiz-Pesini E. 2010a. Mitochondrial pharmacogenomics: barcode for antibiotic therapy. *Drug Discov Today* 15:33–39.
- Pacheu-Grau D, Gomez-Duran A, Montoya J, Ruiz-Pesini E. 2010b. Influence of mtDNA genetic variation on antibiotic therapy. *Pharmacogenomics* 11:1185–1187.
- Pahlman S, Mamaeva S, Meyerson G, Mattsson ME, Bjelfman C, Ortoft E, Hammerling U. 1990. Human neuroblastoma cells in culture: a model for neuronal cell differentiation and function. *Acta Physiol Scand Suppl* 592:25–37.
- Palmeira CM, Rolo AP, Berthiaume J, Bjork JA, Wallace KB. 2007. Hyperglycemia decreases mitochondrial function: the regulatory role of mitochondrial biogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 225:214–220.
- Peters U, Preisler-Adams S, Lanvers-Kaminsky C, Jurgens H, Lamprecht-Dinnesen A. 2003. Sequence variations of mitochondrial DNA and individual sensitivity to the ototoxic effect of cisplatin. *Anticancer Res* 23(2B):1249–1255.
- Pochini L, Galluccio M, Scumaci D, Giangregorio N, Tonazzi A, Palmieri F, Indiveri C. 2008. Interaction of beta-lactam antibiotics with the mitochondrial carnitine/acylcarnitine transporter. *Chem Biol Interact* 173:187–194.
- Presgraves SP, Ahmed T, Borwege S, Joyce JN. 2004. Terminally differentiated SH-SY5Y cells provide a model system for studying neuroprotective effects of dopamine agonists. *Neurotox Res* 5:579–598.
- Prezant TR, Agapian JV, Bohlman MC, Bu X, Oztas S, Qiu WQ, Arnos KS, Cortopassi GA, Jaber L, Rotter JI, et al. 1993. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat Genet* 4:289–294.
- Reitzer LJ, Wice BM, Kennell D. 1979. Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J Biol Chem* 254:2669–2676.
- Robinson BH, Petrova-Benedict R, Buncic JR, Wallace DC. 1992. Nonviability of cells with oxidative defects in galactose medium: a screening test for affected patient fibroblasts. *Biochem Med Metab Biol* 48:122–126.
- Ruiz-Pesini E, Mishmar D, Brandon M, Procaccio V, Wallace DC. 2004. Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA. *Science* 303:223–226.
- Schmidt TR, Wildman DE, Uddin M, Opazo JC, Goodman M, Grossman LI. 2005. Rapid electrostatic evolution at the binding site for cytochrome c on cytochrome c oxidase in anthropoid primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:6379–6384.
- Schule B, Pera RA, Langston JW. 2009. Can cellular models revolutionize drug discovery in Parkinson's disease? *Biochim Biophys Acta* 1792:1043–1051.
- Schwartz CM, Spivak CE, Baker SC, McDaniel TK, Loring JF, Nguyen C, Chrest FJ, Wersto R, Arenas E, Zeng X, et al. 2005. NTera2: a model system to study dopaminergic differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 14:517–534.
- Smits P, Smeitink JA, van den Heuvel LP, Huynen MA, Ettema TJ. 2007. Reconstructing the evolution of the mitochondrial ribosomal proteome. *Nucleic Acids Res* 35:4686–4703.
- Spengler BA, Biedler JL, Ross RA. 2002. A corrected karyotype for the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *Cancer Genet Cytogenet* 138:177–178.
- Storch A, Paul G, Csete M, Boehm BO, Carvey PM, Kupsch A, Schwarz J. 2001. Long-term proliferation and dopaminergic differentiation of human mesencephalic neural precursor cells. *Exp Neurol* 170:317–325.
- Studer L, Csete M, Lee SH, Kabbani N, Walikonis J, Wold B, McKay R. 2000. Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. *J Neurosci* 20:7377–7383.
- Sun G, Xu X, Wang Y, Shen X, Chen Z, Yang J. 2008. Mycoplasma pneumoniae infection induces reactive oxygen species and DNA damage in A549 human lung carcinoma cells. *Infect Immun* 76:4405–4413.
- Swiss R, Will Y. 2011. Assessment of mitochondrial toxicity in HepG2 cells cultured in high-glucose- or galactose-containing media. *Curr Protoc Toxicol* 49:2.20.1–2.20.14.
- Thompson L, Wang S, Tawfik O, Templeton K, Tancabelic J, Pinson D, Anderson HC, Keighley J, Garimella R. 2012. Effect of 25-hydroxyvitamin D(3) and 1 alpha,25 dihydroxyvitamin D(3) on differentiation and apoptosis of human osteosarcoma cell lines. *J Orthop Res* 30:831–844.

- Tokuda Y, Crane S, Yamaguchi Y, Zhou L, Falanga V. 2000. The levels and kinetics of oxygen tension detectable at the surface of human dermal fibroblast cultures. *J Cell Physiol* 182:414–420.
- Trimmer PA, Borland MK. 2005. Differentiated Alzheimer's disease transmitochondrial cybrid cell lines exhibit reduced organelle movement. *Antioxid Redox Signal* 7:1101–1109.
- Trounce I, Wallace DC. 1996. Production of transmitochondrial mouse cell lines by cybrid rescue of rhodamine-6G pre-treated L-cells. *Somat Cell Mol Genet* 22:81–85.
- Vergani L, Malena A, Sabatelli P, Loro E, Cavallini L, Magalhaes P, Valente L, Bragantini F, Carrara F, Leger B, et al. 2007. Cultured muscle cells display defects of mitochondrial myopathy ameliorated by anti-oxidants. *Brain* 130(Pt 10):2715–2724.
- Wallace DC. 1981. Assignment of the chloramphenicol resistance gene to mitochondrial deoxyribonucleic acid and analysis of its expression in cultured human cells. *Mol Cell Biol* 1:697–710.
- Wallace DC. 2007. Why do we still have a maternally inherited mitochondrial DNA? Insights from evolutionary medicine. *Annu Rev Biochem* 76:781–821.
- Wallace DC, Bunn CL, Eisenstadt JM. 1975. Cytoplasmic transfer of chloramphenicol resistance in human tissue culture cells. *J Cell Biol* 67:174–188.
- Wallace DC, Bunn CL, Eisenstadt JM. 1977. Mitotic segregation of cytoplasmic determinants for chloramphenicol resistance in mammalian cells II: fusions with human cell lines. *Somatic Cell Genet* 3:93–119.
- Washizuka S, Ikeda A, Kato N, Kato T. 2003. Possible relationship between mitochondrial DNA polymorphisms and lithium response in bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 6:421–424.
- Weber K, Ridderskamp D, Alfert M, Hoyer S, Wiesner RJ. 2002. Cultivation in glucose-deprived medium stimulates mitochondrial biogenesis and oxidative metabolism in HepG2 hepatoma cells. *Biol Chem* 383:283–290.
- Wong A, Cavelier L, Collins-Schramm HE, Seldin MF, McGrogan M, Savontaus ML, Cortopassi GA. 2002. Differentiation-specific effects of LHON mutations introduced into neuronal NT2 cells. *Hum Mol Genet* 11:431–438.
- Zhao H, Li R, Wang Q, Yan Q, Deng JH, Han D, Bai Y, Young WY, Guan MX. 2004. Maternally inherited aminoglycoside-induced and nonsyndromic deafness is associated with the novel C1494T mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in a large Chinese family. *Am J Hum Genet* 74:139–152.
- Zhao H, Young WY, Yan Q, Li R, Cao J, Wang Q, Li X, Peters JL, Han D, Guan MX. 2005. Functional characterization of the mitochondrial 12S rRNA C1494T mutation associated with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss. *Nucleic Acids Res* 33:1132–1139.

Mitogenomics: Recognizing the Significance of Mitochondrial Genomic Variation for Personalized Medicine

Íñigo Martínez-Romero¹, Sonia Emperador¹, Laura Llobet¹, Julio Montoya¹ and Eduardo Ruiz-Pesini^{1,2,*}

¹Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular, Centro de Investigaciones Biomédicas En Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (I+CS) and ²Fundación ARAID, Universidad de Zaragoza, 50013-Zaragoza, Spain

Abstract: Over evolutionary time, human mitochondrial DNA (mtDNA) has accumulated many mutations. Because mtDNA is exclusively inherited from the maternal lineage, these mtDNA mutations have given rise to different mtDNA genetic backgrounds, or haplogroups. Human mtDNA codes subunits of the oxidative phosphorylation system and the RNAs required for the expression of these subunits. As this cell pathway is significant in cell homeostasis, mtDNA population polymorphisms may affect cell function, tissue dynamics and, finally, the health status of individuals. Supporting this idea, transmitochondrial cell lines differ in cellular, biochemical and molecular-genetic properties among mtDNA haplogroups. Moreover, several epidemiological studies suggest that population genetic variation in mtDNA can have important phenotypic effects and modify the predisposition of human beings toward different disorders. Human mitogenomics, the study of mtDNAs in humans, will allow the development of mtDNA barcodes connecting particular mtDNA haplotypes with higher/lower propensity to particular diseases. Importantly, mitogenomics offers a previously neglected avenue for the development of drugs to treat individuals according their mtDNA genetic background, raising the possibility of mitochondrially-personalized medicine.

Keywords: Haplogroup, mitogenomics, MtDNA, OXPHOS, personalized medicine.

1. INTRODUCTION

Eukaryotic cells first arose as a result of an endosymbiotic event. One of the organisms involved in that process, the antecessor of mitochondria, was an α -proteobacterium [1]. After the establishment of symbiosis, many of the genes required for free-living and those that were duplicated probably disappeared. This proteobacterium supplied the capacity to perform respiratory electron transport; however, this process also produces reactive oxygen species (ROS). These compounds are mutagenic and, therefore, this environment was not very convenient for maintaining genomic stability [2]. Thus, many genes migrated to the proto-nucleus, and the products that they coded needed to be sent back into the mitochondria. If most of the proto-mitochondrial genes were relocated to the nucleus, why were not all of them transferred? What was the advantage of maintaining a mitochondrial genome? Several explanations have been advanced, such as divergence in the mitochondrial genetic code, the potential toxic effects of mitochondrial DNA (mtDNA)-encoded polypeptides in the cytosol or the impossibility of importing very hydrophobic proteins into the mitochondria. However, two other theories suggest the importance of having an organelle genome. They propose that these genes are required for the correct function of the organelle, offering the

quickest, finest and most local regulation [3] or because the presence of an mtDNA genome allows the co-evolution of genes involved in the same function [4].

Thus, the mitochondrial genome comprises the mtDNA and more than 1,500 genes located in the nuclear chromosomes that code for mitochondrial products [4]. Therefore, the term “mitogenomics” or mitochondrial genomics could be applied to the study of all these nuclear [5] and mitochondrial genes in different organisms. However, in a more restricted sense, the term “mitogenomics” has been mainly used in phylogenetic studies of mtDNA from extinct and extant species to reconstruct relationships among divergent lineages [6, 7]. Although the comparison of mtDNAs from other species can give us information on genetic variants found in human beings, we will use the term “mitogenomics” in this review in reference to the study of mtDNAs from our own species, thus remarking on the great genetic variability in this organelle genome. Therefore, we will consider in this paper some critical aspects of human mitogenomics and the potential avenues for the development of an mtDNA barcode system. Human mitogenomics, offers a hitherto neglected strategy for the development of drugs to treat individuals according their mtDNA genetic background, raising the possibility of mitochondrially-personalized medicine.

2. MITOCHONDRIAL DNA AND OXIDATIVE PHOSPHORYLATION FUNCTION

Human mtDNA consists of super-coiled, closed circular, double-stranded DNA molecules of approximately 16.5 ki-

*Address correspondence to this author at the Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza. C/ Miguel Servet 177, 50013-Zaragoza, Spain; Tel: +34-976761640; Fax: +34-976761612; E-mail: eduruiz@unizar.es

lobases, located in the mitochondrial matrix. There are several copies per mitochondrion, and they are organized into nucleoids. Human mtDNA encodes 13 polypeptides of the oxidative phosphorylation (OXPHOS) system and the RNAs required for their expression, 2 rRNAs (12S and 16S rRNAs) and 22 tRNAs [8, 9]. Of these polypeptides, seven (p.MT-ND1-6 and p.MT-ND4L) are part of the 46 subunits from the NADH:ubiquinone oxidoreductase (respiratory complex I, CI), one (p.MT-CYB) of the 11 subunits from the ubiquinol:cytochrome c oxidoreductase (cytochrome reductase, cytochrome bc1 or respiratory complex III, CIII), three (p.MT-CO1-3) of the 13 subunits from the cytochrome c oxidase (respiratory complex IV, CIV) and two (p.MT-ATP6,8) of the 16 from the ATP synthase (complex V, CV). Indicating the importance of these polypeptides, the seven mtDNA-encoded CI polypeptides are the only membrane subunits of the bacterial CI [10] and the three mtDNA-encoded CIV polypeptides are the only subunits of the bacterial CIV [11]. MtDNA also contains a non-coding region, including important sequences for the regulation of the mtDNA replication and transcription (Fig. 1).

The OXPHOS system is a key pathway in the cell. It occurs in the mitochondrial inner membrane and is composed of the ATP synthase and the electron transport chain (ETC), or the respiratory chain [12]. The ETC includes respiratory complexes CI-IV, cytochrome c and the lipid coenzyme Q (Q). The nutrients that we ingest are broken down in the digestive system, passed circulated through the blood and delivered to the target tissues. There, they pass into the cell and

continue their digestion. Here, the process is called oxidation and requires the extraction of their electrons, which are passed on to the ETC. Moreover, the oxygen that we inhale through our lungs diffuses into our blood, tissues and cells. There, it enters the ETC to collect the electrons from the nutrients. Thus, we eat and respire mainly to acquire electron donors and acceptors for the ETC. This is important because the flow of electrons through the ETC is accompanied by the pumping of protons into the intermembrane space, thus generating an electrochemical gradient. The CV complex uses this gradient to synthesize ATP, the molecule that harbors the energy required to live (Fig. 2).

However, the OXPHOS system is much more than an energy-generating cellular pathway. The proton gradient produced by the electron flow is used for many different purposes, such as the import of substrates and proteins into the mitochondria, the regulation of apoptosis, heat generation, the maintenance of cytosolic calcium levels and the production of ROS [12]. ATP, ROS, calcium and the red-ox state of the cell can behave as second messengers and trigger different cellular responses, thus connecting the mitochondrial OXPHOS function with the rest of the cytoplasm [13]. They can also affect the expression of chromosomal genes [14], thus connecting the OXPHOS function with the nucleus. The OXPHOS system also participates in the *de novo* synthesis of pyrimidines. For example, to produce orotate, a precursor of uridine, the dihydroorotate dehydrogenase oxidizes dihydroorotate and sends electrons to the ETC [15]. Next, uridine, through uridine triphosphate (UTP), will pro-

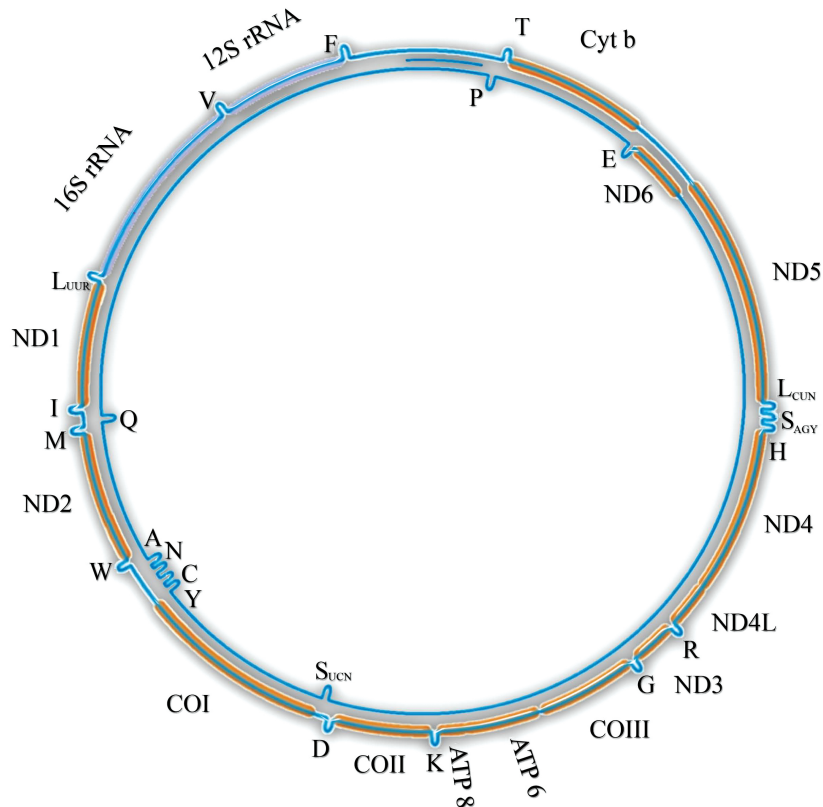


Fig. (1). Human mitochondrial DNA. Genes encoded on the heavy strand are shown in the outer circle and those on the light strand are shown in the inner circle.

OXPHOS SYSTEM

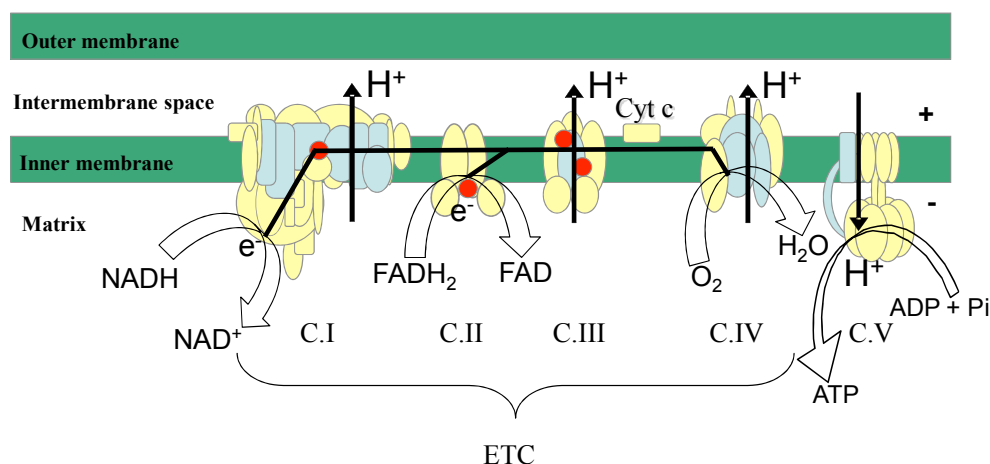


Fig. (2). Oxidative phosphorylation system. Electrons (e^-) from nutrients go through the respiratory complexes (CI-IV) of the electron transport chain (ETC) and reduce oxygen to water. This electron flow is accompanied by the pumping of protons (H^+) into the intermembrane space and causes an electrochemical gradient (+/-). This gradient is used by ATP synthase (CV) to produce ATP. OXPHOS subunits, coded in mitochondrial and nuclear DNA, are represented in blue and yellow colors, respectively. The red circle represents the lipid coenzyme Q.

duce cytidine triphosphate (CTP). These nucleotides are required not only for DNA replication and expression, but also for the synthesis of plasma membrane components. UTP is necessary to provide the glycidic part of the membrane glycolipids and glycoproteins. CTP is required for phospholipid synthesis [16]. Thus, these processes connect the OXPHOS system with the remodeling of the plasma membrane. Moreover, forcing cells to perform respiration leads to increased MHC-I expression at the RNA and protein levels [17]. Because these proteins mediate self-recognition and also present antigens, there is a connection between the OXPHOS system and immunity.

Mature cells require OXPHOS function to perform many of their activities. However, cellular differentiation also relies on this pathway. Thus, the induction of differentiation is accompanied by an increase in mtDNA copy number, mtDNA-encoded polypeptide levels, oxygen consumption rates and intracellular ATP. These findings suggest that differentiation leads to a transition in energy production, from glycolysis to OXPHOS [18, 19]. Therefore, proper OXPHOS function is also important for tissue dynamics.

MtDNA genetic variation, affecting some of these cellular processes, may alter cellular homeostasis, tissue dynamics and the health status of individuals.

3. MTDNA GENETIC VARIATION

MtDNA is bound to the mitochondrial inner membrane. The ETC is located in this membrane and is the main source of ROS in somatic cells; ROS are mutagenic compounds and, although there are proteins covering the mtDNA, this molecule is not very well protected from ROS [20]. This fact probably contributed to the exclusively maternal inheritance of the mtDNA. Mitochondria from spermatozoa are selec-

tively removed during the first zygote's cell divisions [21] and, even before the elimination of the spermatozoa mitochondria, the mtDNA is degraded [22]. Despite the fact that spermatozoa are germ cells, their mitochondria behave similar to those of somatic cells. They are very active and produce many mutagenic ROS [23]. Thus, by removing the paternal mtDNA, the possibility of transmitting mtDNA mutations greatly decreases. It has been proposed that male gametes maximize energy production for motility by sacrificing mtDNA to mutagenic ROS, while non-motile female gametes repress mitochondrial OXPHOS, thus protecting the mtDNA for faithful transmission between generations [24]. However, during the development of female germ cells, from the primordial germ cell to oocyte, there is a massive replication of the mitochondria [25]. This frequent mtDNA replication might favor long segments of the molecule remaining as a single strand, allowing the formation of secondary structures that may hamper the progress of DNA polymerase and promote the appearance of new mutations. Therefore, along generations, mtDNA from female germ cells can accumulate mutations and, because mtDNA is exclusively inherited from the mother and there is no recombination with the father's mtDNA, each new mutation in the female germ line will generate a new mtDNA lineage.

Since most of the mtDNA encodes genes or contain regulatory sequences, many mutations will very negatively affect the phenotype, and they will be removed by purifying selection [26]. Some others will have not phenotypic effects at all and their survival will be a matter of chance. In between, there will be mutations with mild or moderate phenotypic effects [27] and their population frequencies will depend on a combination of random chance and past selective advantage [28]. The surviving mutations will produce new mtDNA lineages known as mtDNA haplogroups. Thus, a haplogroup

is defined as a combination of phylogenetically related mtDNAs.

Early in the 1980s, mtDNA started to be used as a tool in population genetics [29, 30]. These studies confirmed the African origin of modern humans. All extant human mtDNA lineages are derived from a single woman who lived in Africa around 200,000 years ago [31]. From her, several mtDNA lineages specific to sub-Saharan Africans (haplogroups L) originated. Two new lineages, designated M and N, arose in northeastern Africa. Then, some human beings left Africa, through the Bab al Mandab Strait at the far southwestern point of the Arabian Peninsula, 65,000 years ago [32, 33], and colonized the rest of the world. Despite being less numerous, only individuals from these M and N lineages left Africa to populate other continents. One migration moved along the southeastern Asian coast to colonize Australia while others radiated into Eurasia. In Europe, the major clusters HV, U, JT and IWX were all derived from macrohaplogroup N. In Asia, there is a plethora of haplogroups, both from macrohaplogroup N (including A, B and F) and M (including C, D and G). Among all of the Asian mtDNA lineages, only A, B, C, D and X finally colonized America. Thus, of the extensive mtDNA variation present in Africa, only two mtDNA lineages succeeded in colonizing all of Eurasia and of the plethora of Asian mtDNA types subsequently accumulated, with only five going on to colonize America [34] (Fig. 3).

New environments exerted new challenges and new selective pressures. Therefore, it is possible that the new conditions selected for particular mtDNA genetic backgrounds. Thus, the relative frequency and amino acid conservation of internal branch replacement mutations increased from tropical Africa to temperate Europe and arctic northeastern Siberia, and highly conserved amino acid substitutions are found at the roots of multiple mtDNA lineages from higher latitudes. Thus, it is possible that specific mtDNA replacement mutations permitted humans to adapt to more northern climates [28, 35, 36]. If this is true, then individuals from

different mtDNA haplogroups should show OXPHOS differences and variants defining these haplogroups, potentially influencing our health today.

4. WHICH MTDNA POPULATION GENETIC VARIANTS HAVE PHENOTYPIC EFFECTS? HOW CAN WE ANALYZE THEM?

Over evolutionary time, human mtDNA have accumulated many mutations. Some of them have phenotypic effects, but which? Two bioinformatic approaches may give us an idea of what mutations should be targeted for further studies. The first is the construction of an mtDNA phylogenetic tree. By comparing mtDNA sequences, it is possible to determine the relative age of each mutation. Mutations harbored by only one individual will be very recent events and will be located in the tips of the tree. Those changes harbored by two or more individuals will be more ancient and they will produce a node in the phylogenetic tree. Thus, the phylogenetic tree will also give us an idea of the frequency of a particular mutation and its impact on populations.

The second approach to select a mutation for further studies is to estimate its conservation index. Functionally-important amino acids are highly conserved throughout evolution. For example, Gly351 in the p.MT-CO1 subunit is conserved in 1302 (99.6 %) of 1307 species, from protists to mammals, and a substitution to Asp351 causes a mitochondrial disease [37]. Amino acid substitutions commonly found in human populations do not affect such highly conserved positions. Thus, Phe18Leu and Asp171Asn mutations in the p.MT-CYB subunit define the mtDNA haplogroups J1c/Uk and J2, respectively. Phe18 and Asp171 are conserved in 364 (27.9 %) and 1075 (82.2 %) of 1307 species from protists to mammals, respectively. However, they are conserved in 197 (79.8 %) and 240 (97.2%) of 247 mammal species, respectively. These conservation indices are surprising if we consider that mammals have evolved for millions of years and colonized many different environments.

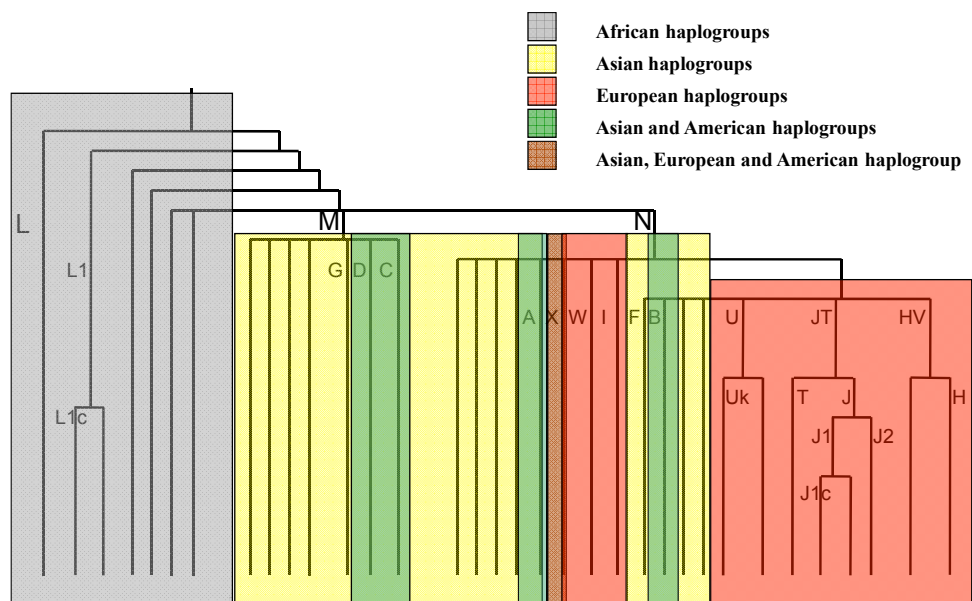


Fig. (3). Human MtDNA phylogenetic tree. Only those mitochondrial haplogroups highlighted in the text are represented.

These two cheap, fast and easy approaches allow us to select interesting candidate polymorphisms for further analysis. Now, to show the phenotypic effect of mtDNA polymorphisms, we need convenient models. There are two reasons to rule out animal models: First, it is still impossible to introduce a particular mutation into an animal's mtDNA. However, it would be possible to select a human-homologue animal mtDNA mutation to determine its phenotypic effect; Second, there are large differences in the genetic environment between animals and humans. The OXPHOS system includes many nuclear chromosomes-encoded polypeptides. Furthermore, many other nuclear DNA (nDNA)-encoded proteins are necessary to build a functional OXPHOS system. Thus, genetic variants in all these proteins could affect this cellular pathway. Moreover, the evolution rate of the mtDNA is much higher than that of the nDNA [38] and nuclear genes for proteins that interact with mtDNA-encoded products also evolve faster than other nDNA genes to maintain a successful interaction [39-41]. In fact, some clearly pathologic mtDNA mutations are the wild-type allele in other species [42, 43] probably because the gene has coevolved with other genes. The interaction of that selected particular animal mtDNA mutation with other gene products would be different from that found in humans [44-47], and the results cannot be extrapolated to the human variant. Thus, animal models will not be convenient for the analysis of population polymorphisms with slight or moderate individual phenotypic effects, although they can be useful for analyzing clearly pathologic mutation with a higher penetrance. Models based on human genomes will be more appropriate and, therefore, cellular models will be required. However, cells directly derived from individuals will differ in genetic (nuclear and mitochondrial) and environmental factors and, again, they will not be suitable because particular nDNA genotypes can compensate for mtDNA mutations [48], or many xenobiotics can modify the activity of different OXPHOS complexes. Fortunately, there is a way to homogenize all these nuclear and environmental factors in association with different mtDNA genetic backgrounds: the use of transmitochondrial cell lines, cytoplasmic hybrids or cybrids.

Cybrids are built by removing the mtDNA of a parental cell line and fusing it with cell fragments without a nucleus as mitochondrial donors, such as cytoplasts (enucleated cells) [49], platelets [50] or synaptosomes [51], or with whole cells previously treated with nuclear poisons [52]. By using different mitochondrial sources, it is possible to obtain cell lines sharing the same nuclear background and growing in the same environmental conditions. After several generations, the only difference between them will be the mtDNA genotype and the possible phenotypic differences will necessarily be due to the particular organelle genotype that they contain [53].

Cybrids have been very useful in determining the dramatic effects of clearly pathological mtDNA mutations [54]. However, it would be expected that population genetic variants would have small effects on function, and that these effects would be highly dependent on the context in which the genetic variant is acting. So, the use of model systems that are appropriate for detecting the large effects of patho-

logic mutations might not be optimal for the analysis of population genetic variants [55]. These less-severe mtDNA genetic variants should show only small differences in the studied parameters and technical matters might mask these differences in the phenotypic effects. Thus, several basic considerations must be seriously taken into account to study them.

5. PHENOTYPIC DIFFERENCES DUE TO MTDNA POLYMORPHISMS

Using spermatozoa, it was shown that there is a difference in CIV specific activity and sperm motility between samples harboring H and T mtDNAs, and it was thus suggested that mitochondrial tRNA mutations m.10463T>C/MT-TR or m.15928G>A/MT-TT, or both synergically, could influence mitochondrial protein synthesis in individuals from haplogroup T [56]. Using cybrids and taking into consideration the problems associated with this model, it was recently shown that mtDNA and mtRNA levels, mitochondrial protein synthesis, cytochrome oxidase activity and amount, normalized oxygen consumption, mitochondrial inner membrane potential and growth capacity were all different between cybrids from the H and Uk mtDNA haplogroups. It was suggested that the Uk m.14798T>C/p.MT-CYB:Phe18Leu mutation was the best candidate polymorphism for explaining these results and that this mutation favored the transport of some electrons without the formation of a proton gradient [27]. This position is located close to the inner-ubiquinone-binding site of the cytochrome b polypeptide [57], in a helical region parallel to the plane of the membrane and might participate in relaying conformational information between the cytochrome b monomers [58]. Interestingly, a similar change alters the susceptibility of yeast to diuron [59]. In addition to polymorphisms in mtDNA genes, other Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in mtDNA regulatory regions could also induce phenotypic differences. Thus, a haplogroup J m.295C>T/MT-DLOOP mutation increases TFAM binding, the capacity of *in vitro* L-strand transcription and the mtDNA copy number [60].

Cybrids have also been used to show that mtDNA haplogroups can modify the pathogenic potential of mutations causing i) Leber's Hereditary Optic Neuropathy (LHON) by affecting the overall assembly kinetics of OXPHOS complexes [61] or ii) Neuropathy, Ataxia and Retinitis Pigmentosa/Maternally Inherited Leigh Syndrome (NARP/MILS) by destabilizing the respiratory chain [62].

Thus, mtDNA polymorphisms are able to affect different mitochondrial and cell parameters. Do these phenotypic differences at cellular level contribute to the health status of the individuals?

6. ASSOCIATIONS BETWEEN MTDNA HAPLOGROUPS AND HUMAN DISEASES

LHON was the first human disease proven to be caused by a point mutation within the mitochondrial genome [63]. Over 95% of LHON pedigrees harbor one of these three mtDNA point mutations: m.3460G>A, m.11778G>A and m.14484T>C. Contrary to most mtDNA diseases, where pathologic mutations are commonly found in heteroplasmy (mix of wild-type and mutant genotypes) and many tissues

can be affected, these mutations are usually homoplasmic (all organelle genomes in the patient are mutant), and, in the majority of cases, the pathology is limited to the retinal ganglion cells in eye. Males are mainly affected and, frequently, individuals from the same pedigree are homoplasmic mutants but do not develop the disease. Moreover, the prevalence of these mutations varies among different geographic regions. Thus, m.11778G>A is the most prevalent (69%) mutation in European LHON patients. In the Far East, this mutation accounts for around 90% of all cases [64]. All these observations suggest that other factors must be involved in the development of this disease.

Early in the 1990s, some mtDNA SNPs, such as m.4216T>C or m.13708G>A, were found to be much more frequent in patients suffering from LHON that harbored some of the three mtDNA pathologic mutations [65]. The combination of these two SNPs defines mtDNA haplogroup J. In 1997, analyzing North American, German, Finish and Italian white patients, four different groups were found in which this haplogroup was overrepresented in LHON patients [66-69]. It was concluded that SNPs defining this haplogroup contributed to the pathologic phenotype. More recently, these studies were refined, and it was reported that the risk of visual failure was greater when the m.11778G>A pathologic mutation was present in mtDNA haplogroup J2, m.14484T>C in J1 and m.3460G>A in Uk. The risk of visual failure was significantly lower when m.11778G>A occurred in mtDNA haplogroup H. Because Uk and J1c, the major European J1 subhaplogroup, and J2 harbor interesting amino acid substitutions in mtDNA-encoded cytochrome b, it was suggested that these mutations could provide an explanation for the associations [70].

LHON is not the only visual phenotype related to mtDNA haplogroups. Age-Related Macular Degeneration (ARMD) has been associated with mtDNA haplogroups J, T and U [71-74]. In addition, vision is not the only sense related to mtDNA haplogroups; haplogroups U and Uk are associated with a higher prevalence of Age-Related Hearing Loss (ARHL) [75]. Very curiously, some of these haplogroups that increase the susceptibility to visual and hearing failure in LHON, ARMD and ARHL patients are overrepresented in aging individuals [76-82]. Therefore, they behave as resistance factors against aging and susceptibility factors against some neurodegenerative diseases. More intriguingly, these haplogroups are also resistance factors against other neurodegenerative disorders. Thus, mtDNA haplogroups J and Uk are underrepresented in patients suffering from Parkinson's or Alzheimer's disease and haplogroup H is overrepresented in these disorders [83-94].

Interestingly LHON, aging and age-linked diseases share several features. First, LHON pathologic mutations and stress over the lifetime are stressor conditions that exacerbate the mild phenotypic effects of haplogroup-defining SNPs. It is possible that without stress, the mild effects of these polymorphisms cannot be observed. Second, purifying selection due to these disorders will not affect, or only very slightly, the population frequencies of these haplogroups in the next generation. This is due to the fact that aging and age-linked diseases are post-reproductive phenotypes, the frequency of each LHON pathologic mutation is very low

and the disease mainly affects men, but mtDNA is exclusively inherited by maternal lineage. These factors can also be found in other phenotypes. Thus, the increased pH of seminal plasma triggers motility in ejaculated sperm through the activation of flagellum dynein ATPase activity, and the huge ATP consumption requires a high OXPHOS function [95]. Moreover, sperm motility is a male-specific phenotype and, due to the fact that mtDNA is maternally inherited, would not suffer selective pressure [96]. By checking sperm motility, we found that asthenozoospermia is associated with mtDNA haplogroups. Haplogroups H and T are significantly more abundant in nonasthenozoospermic and asthenozoospermic individuals, respectively, and show significant differences in their OXPHOS performance [56]. Prostate cancer is another male-specific phenotype and it has also been associated with mtDNA polymorphisms [97]. Despite they are not male-specific phenotypes, there is evidence supporting a relationship between mtDNA haplogroups and other cancers [98].

Many other disorders, such as cardiovascular and infectious diseases, have been related to mtDNA haplogroups [27], and this is not rare because mitochondrial OXPHOS is ubiquitous, plays a key role in cell and disequilibria in some of the functions performed by this system due to mtDNA SNPs and may alter many cell and tissue mechanisms and individual health status.

7. MITOCHONDRIAL TOXICOGENOMICS AND PHARMACOGENOMICS

It is possible that mtDNA genetic backgrounds show differential effects after their interaction with the environment. For example, many pesticides are inhibitors of the coenzyme Q-binding (Q) sites in the mitochondrial cytochrome b. Because there are population genetic variants defining mtDNA haplogroups that affect these Q sites, it is potentially possible that particular xenobiotics differentially affect individuals from distinct mtDNA genetic backgrounds [99]. Therefore, new compounds that spill out into the environment could be more detrimental to some mtDNA genotypes. In addition, mtDNA SNPs might affect OXPHOS function and, thus, make these mitochondria particularly susceptible to different xenobiotics. Thus, it was recently shown that n-hexane might act as an exogenous trigger for LHON. The sensitivity to cell death induced by its neurotoxic metabolite 2,5-hexanedione (2,5-HD) was greatly increased in cybrids carrying LHON mutations on haplogroup J [100].

The mitochondrial genetic background might have also an indirect effect on a patient's response to different clinical drugs. Lithium is the first drug of choice for treatment of bipolar disorders. However, more than 50% of patients with this disorder do not completely respond to maintenance treatment with this drug. Therefore, predictors of lithium response would be helpful to minimize the risk of relapse. Recent preliminary results suggest that mtDNA m.10398A/p.MT-ND3:Thr114 polymorphism may be a genetic marker predicting the efficacy of lithium treatment in patients with bipolar disorder [101]. Along with m.8701A/p.MT-ATP6:Thr59 and other synonymous SNPs, m.10398A defines mtDNA macrohaplogroup N, widely represented in

most of the continents except Africa. Therefore, this is a potentially very important genetic marker. Valproate is also used for prophylactic treatment of bipolar disorder. Mitochondrial calcium levels were significantly decreased by treatment with valproate in cybrids from mtDNA macrohaplogroup N, but this does not happen in those from other macrohaplogroups [102]. Valproic acid is also an antimigraine agent. Other compounds, such as the OXPHOS enhancer riboflavin, can also be used to prevent migraines. Although their efficacy is lower, they have the advantage of being virtually devoid of side effects. Interestingly, individuals from mtDNA haplogroup H do not respond to riboflavin and those from non-H mostly do respond [103].

In mouse cybrids that produce more ROS and have higher mtDNA levels, the antioxidant N-acetyl-cysteine (NAC) decreases these levels. However, the mtDNA amount is unaffected in those cybrids producing less ROS [104]. In human cybrids, NAC significantly decreases mtDNA levels and the effect is larger for cybrids from mtDNA haplogroup H [27]. This is important because expression of mtDNA genes is proportional to the mtDNA copy number [105].

Acquired immunodeficiency syndrome morbidity and mortality have been reduced by antiretroviral therapy. Nucleoside reverse transcriptase inhibitors were the first drugs approved to treat human immunodeficiency virus infection. However, these drugs can inhibit human mtDNA polymerase- γ and cause peripheral neuropathy, lipoatrophy and sometimes hearing loss. It has recently been shown that European T and African L1c mitochondrial haplogroups are independent predictors of peripheral neuropathy in these patients [106-109]. On the other hand, the mtDNA haplogroup H is strongly associated with increased atrophy [110], while mtDNA haplogroup J provides relative protection against lipoatrophy [111].

Mitochondrial genetic background may also affect the appearance of side effects after anticancer therapy. Cisplatin is a highly effective chemotherapeutic agent, but its use is limited by its nephrotoxicity, neurotoxicity and ototoxicity. It was recently shown that 5 of 20 patients with hearing impairment under therapeutic doses of cisplatin belonged to the mtDNA haplogroup J, but only 1 of 19 patients without hearing impairment belonged to this haplogroup [112]. Hearing is a sense frequently affected in mitochondrial pathology. It has been shown that a mtDNA polymorphism can become particularly deleterious and provoke deafness after its interaction with a xenobiotic. Thus, the m.1494C>T mutation in the 12S rRNA is associated with non-syndromic hearing loss. However, many matrilineal relatives that are homozygous for this mutation do not develop the phenotype. This mutation is also the wild-type allele in some primate species, such as *Macaca mulatta* and *Macaca sylvanus*. Therefore, the mutation shows incomplete penetrance, and other factors are required for developing deafness. It has been reported that the equivalent position in the bacterial rRNA form a Watson-Crick base pair that it is important for aminoglycoside binding. Wild-type mitochondrial 12S rRNA lacks this base pair but the mutation rebuilt it, making it more similar to the bacterial rRNA and favoring aminoglycoside binding. Aminoglycosides induce or worsen deafness in individuals with this mutation [113]. Interestingly, this mutation defines

a small cluster in mtDNA haplogroup A and, therefore it has probably been present in the population for thousands of years [114]. Due to the kinship between mitochondria and bacteria, other ribosomal antibiotics could have similar effects [115, 116].

CONCLUSIONS AND OUTLOOK

Evidence from epidemiologic studies suggests that population genetic variation in the mtDNA can have important phenotypic effects and modify the predisposition of human beings to different disorders. The unraveling of the molecular mechanisms using cell models will be necessary before considering the impact of this information on human health. However, once the link between the mtDNA genotype and the individual phenotype is confirmed, it will be possible to develop an mtDNA barcode system connecting particular mtDNA haplotypes with resistance/susceptibility to particular diseases. Moreover, this barcode system will permit the development of clinical drugs to treat individuals according to their specific mtDNA genetic background, giving rise to mitochondrially-personalized medicine.

ABBREVIATIONS

ARHL	=	Age-related hearing loss
ARMD	=	Age-related macular degeneration
CI-V	=	OXPHOS complexes I to V
ETC	=	Electron transport chain
2,5-HD	=	2,5-hexanedione
LHON	=	Leber's hereditary optic neuropathy
MHC-I	=	Major histocompatibility complex I
mtDNA	=	Mitochondrial DNA
mtRNA	=	Mitochondrial RNA
NAC	=	N-acetyl cysteine
NARP/MILS	=	Neuropathy, ataxia and retinitis pigmentosa/maternally inherited Leigh syndrome
nDNA	=	Nuclear DNA
OXPHOS	=	Oxidative phosphorylation
Q	=	Coenzyme Q
ROS	=	Reactive oxygen species
rRNA	=	Ribosomal RNA
SNP	=	Single nucleotide polymorphism
tRNA	=	Transfer RNA.

CONFLICT OF INTEREST

None declared/applicable.

ACKNOWLEDGEMENTS

Our work is supported by grants from Instituto de Salud Carlos III-FIS (PI08-0264, PI10-00662) and Diputación General de Aragón (Grupos Consolidados B33 and PIPAMER 10-010). IM-R and SE are supported by a grant from the Instituto de Salud Carlos III (ISC-PI07/00184) and

CIBERER, respectively. The CIBERER is an initiative of the ISCIII.

REFERENCES

- [1] Emelyanov VV. Rickettsiaceae, rickettsia-like endosymbionts, and the origin of mitochondria. *Biosci Rep* 2001; 21(1): 1-17.
- [2] Montoya J, Lopez-Gallardo E, Díez-Sánchez C, *et al.* 20 years of human mtDNA pathologic point mutations: carefully reading the pathogenicity criteria. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1787(5): 476-83.
- [3] Allen JF. Control of gene expression by redox potential and the requirement for chloroplast and mitochondrial genomes. *J Theor Biol* 1993; 165(4): 609-31.
- [4] Wallace DC. Why do we still have a maternally inherited mitochondrial DNA? Insights from evolutionary medicine. *Annu Rev Biochem* 2007; 76: 781-821.
- [5] Alesci S, Manoli I, Michopoulos VJ, *et al.* Development of a human mitochondria-focused cDNA microarray (hMitChip) and validation in skeletal muscle cells: implications for pharmacogenomics. *Pharmacogenomics J* 2006; 6(5): 333-42.
- [6] Curole JP, Kocher TD. Mitogenomics: digging deeper with complete mitochondrial genomes. *Trends Ecol Evol* 1999; 14(10): 394-8.
- [7] Ho SY, Gilbert MT. Ancient mitogenomics. *Mitochondrion* 2010; 10(1): 1-11.
- [8] Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, *et al.* Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981; 290(5806): 457-65.
- [9] Chomyn A, Cleeter MW, Ragan CI, *et al.* URF6, last unidentified reading frame of human mtDNA, codes for an NADH dehydrogenase subunit. *Science* 1986; 234(4776): 614-8.
- [10] Friedrich T, Scheide D. The respiratory complex I of bacteria, archaea and eukarya and its module common with membrane-bound multisubunit hydrogenases. *FEBS Lett* 2000; 479(1-2): 1-5.
- [11] Michel H, Behr J, Harrenga A, *et al.* Cytochrome c oxidase: structure and spectroscopy. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1998; 27: 329-56.
- [12] Wallace DC, Fan W, Procaccio V. Mitochondrial energetics and therapeutics. *Annu Rev Pathol* 2010; 5: 297-348.
- [13] Finley LW, Haigis MC. The coordination of nuclear and mitochondrial communication during aging and calorie restriction. *Ageing Res Rev* 2009; 8(3): 173-88.
- [14] Butow RA, Avadhani NG. Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Mol Cell* 2004; 14(1): 1-15.
- [15] Khutorenko AA, Roudko VV, Chernyak BV, *et al.* Pyrimidine biosynthesis links mitochondrial respiration to the p53 pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(29): 12828-33.
- [16] Wurtman RJ, Cansev M, Sakamoto T, *et al.* Use of phosphatide precursors to promote synaptogenesis. *Annu Rev Nutr* 2009; 29: 59-87.
- [17] Charni S, de Bettignies G, Rathore MG, *et al.* Oxidative phosphorylation induces de novo expression of the MHC class I in tumor cells through the ERK5 pathway. *J Immunol* 2010; 185(6): 3498-503.
- [18] Chen CT, Shih YR, Kuo TK, *et al.* Coordinated changes of mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2008; 26(4): 960-8.
- [19] Chen CT, Hsu SH, Wei YH. Upregulation of mitochondrial function and antioxidant defense in the differentiation of stem cells. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1800(3): 257-63.
- [20] Yakes FM, Van Houten B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(2): 514-9.
- [21] Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, *et al.* Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature* 1999; 402(6760): 371-2.
- [22] Nishimura Y, Yoshinari T, Naruse K, *et al.* Active digestion of sperm mitochondrial DNA in single living sperm revealed by optical tweezers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(5): 1382-7.
- [23] Ruiz-Pesini E, Díez-Sánchez C, Lopez-Perez MJ, *et al.* The role of the mitochondrion in sperm function: is there a place for oxidative phosphorylation or is this a purely glycolytic process? *Curr Top Dev Biol* 2007; 77: 3-19.
- [24] Allen JF. Separate sexes and the mitochondrial theory of ageing. *J Theor Biol* 1996; 180(2): 135-40.
- [25] Jansen RP, Burton GJ. Mitochondrial dysfunction in reproduction. *Mitochondrion* 2004; 4(5-6): 577-600.
- [26] Fan W, Waymire KG, Narula N, *et al.* A mouse model of mitochondrial disease reveals germline selection against severe mtDNA mutations. *Science* 2008; 319(5865): 958-62.
- [27] Gomez-Duran A, Pacheu-Grau D, Lopez-Gallardo E, *et al.* Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups. *Hum Mol Genet* 2010; 19(17): 3343-53.
- [28] Ruiz-Pesini E, Mishmar D, Brandon M, *et al.* Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA. *Science* 2004; 303(5655): 223-6.
- [29] Brown WM. Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77(6): 3605-9.
- [30] Denaro M, Blanc H, Johnson MJ, *et al.* Ethnic variation in Hpa I endonuclease cleavage patterns of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78(9): 5768-72.
- [31] Cann RL, Stoneking M, Wilson AC. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 1987; 325(6099): 31-6.
- [32] Quintana-Murci L, Semino O, Bandelt HJ, *et al.* Genetic evidence of an early exit of Homo sapiens sapiens from Africa through eastern Africa. *Nat Genet* 1999; 23(4): 437-41.
- [33] Mishmar D, Ruiz-Pesini E, Golik P, *et al.* Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(1): 171-6.
- [34] Wallace DC. The mitochondrial genome in human adaptive radiation and disease: on the road to therapeutics and performance enhancement. *Gene* 2005; 354: 169-80.
- [35] Ruiz-Pesini E, Wallace DC. Evidence for adaptive selection acting on the tRNA and rRNA genes of human mitochondrial DNA. *Hum Mutat* 2006; 27(11): 1072-81.
- [36] Montiel-Sosa F, Ruiz-Pesini E, Enriquez JA, *et al.* Differences of sperm motility in mitochondrial DNA haplogroup U sublineages. *Gene* 2006; 368: 21-7.
- [37] Herrero-Martin MD, Pineda M, Briones P, *et al.* A new pathologic mitochondrial DNA mutation in the cytochrome oxidase subunit I (MT-CO1). *Hum Mutat* 2008; 29(8): E112-22.
- [38] Brown WM, George M Jr, Wilson AC. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76(4): 1967-71.
- [39] Schmidt TR, Wildman DE, Uddin M, *et al.* Rapid electrostatic evolution at the binding site for cytochrome c on cytochrome c oxidase in anthropoid primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(18): 6379-84.
- [40] Brindefalk B, Viklund J, Larsson D, *et al.* Origin and evolution of the mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases. *Mol Biol Evol* 2007; 24(3): 743-56.
- [41] Smits P, Smeitink JA, van den Heuvel LP, *et al.* Reconstructing the evolution of the mitochondrial ribosomal proteome. *Nucleic Acids Res* 2007; 35(14): 4686-703.
- [42] Kern AD, Kondrashov FA. Mechanisms and convergence of compensatory evolution in mammalian mitochondrial tRNAs. *Nat Genet* 2004; 36(11): 1207-12.
- [43] de Magalhães JP. Human disease-associated mitochondrial mutations fixed in nonhuman primates. *J Mol Evol* 2005; 61(4): 491-7.
- [44] Kenyon L, Moraes CT. Expanding the functional human mitochondrial DNA database by the establishment of primate xenomito-chondrial cybrids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(17): 9131-5.
- [45] Barrientos A, Kenyon L, Moraes CT. Human xenomito-chondrial cybrids. Cellular models of mitochondrial complex I deficiency. *J Biol Chem* 1998; 273(23): 14210-7.
- [46] Bayona-Bafaluy MP, Muller S, Moraes CT. Fast adaptive coevolution of nuclear and mitochondrial subunits of ATP synthetase in orangutan. *Mol Biol Evol* 2005; 22(3): 716-24.
- [47] Potluri P, Davila A, Ruiz-Pesini E, *et al.* A novel NDUFA1 mutation leads to a progressive mitochondrial complex I-specific neurodegenerative disease. *Mol Genet Metab* 2009; 96(4): 189-95.
- [48] Guan MX, Fischel-Ghodsian N, Attardi G. Nuclear background determines biochemical phenotype in the deafness-associated mitochondrial 12S rRNA mutation. *Hum Mol Genet* 2001; 10(6): 573-80.

- [49] Bunn CL, Wallace DC, Eisenstadt JM. Cytoplasmic inheritance of chloramphenicol resistance in mouse tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71(5): 1681-5.
- [50] Chomyn A, Lai ST, Shakeley R, *et al.* Platelet-mediated transformation of mtDNA-less human cells: analysis of phenotypic variability among clones from normal individuals--and complementation behavior of the tRNALys mutation causing myoclonic epilepsy and ragged red fibers. *Am J Hum Genet* 1994; 54(6): 966-74.
- [51] Inoue K, Ito S, Takai D, *et al.* Isolation of mitochondrial DNA-less mouse cell lines and their application for trapping mouse synaptosomal mitochondrial DNA with deletion mutations. *J Biol Chem* 1997; 272(24): 15510-5.
- [52] Bayona-Bafaluy MP, Manfredi G, Moraes CT. A chemical enucleation method for the transfer of mitochondrial DNA to rho(o) cells. *Nucleic Acids Res* 2003; 31(16): e98.
- [53] King MP, Attardi G. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* 1989; 246(4929): 500-3.
- [54] Hayashi J, Ohta S, Kikuchi A, *et al.* Introduction of disease-related mitochondrial DNA deletions into HeLa cells lacking mitochondrial DNA results in mitochondrial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(23): 10614-8.
- [55] Rebbeck TR, Spitz M, Wu X. Assessing the function of genetic variants in candidate gene association studies. *Nat Rev Genet* 2004; 5(8): 589-97.
- [56] Ruiz-Pesini E, Lapena AC, Diez-Sanchez C, *et al.* Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *Am J Hum Genet* 2000; 67(3): 682-96.
- [57] Fisher N, Rich PR. A motif for quinone binding sites in respiratory and photosynthetic systems. *J Mol Biol* 2000; 296(4): 1153-62.
- [58] Covian R, Trumpower BL. Regulatory interactions in the dimeric cytochrome bc(1) complex: the advantages of being a twin. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1777(9): 1079-91.
- [59] di Rago JP, Perea X, Colson AM. DNA sequence analysis of diuron-resistant mutations in the mitochondrial cytochrome b gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 1986; 208(2): 208-10.
- [60] Suissa S, Wang Z, Poole J, *et al.* Ancient mtDNA genetic variants modulate mtDNA transcription and replication. *PLoS Genet* 2009; 5(5): e1000474.
- [61] Pello R, Martin MA, Carelli V, *et al.* Mitochondrial DNA background modulates the assembly kinetics of OXPHOS complexes in a cellular model of mitochondrial disease. *Hum Mol Genet* 2008; 17(24): 4001-11.
- [62] D'Aurelio M, Vives-Bauza C, Davidson MM, *et al.* Mitochondrial DNA background modifies the bioenergetics of NARP/MILS ATP6 mutant cells. *Hum Mol Genet* 2010; 19(2): 374-86.
- [63] Wallace DC, Singh G, Lott MT, *et al.* Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 1988; 242(4884): 1427-30.
- [64] Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Hudson G, *et al.* Inherited mitochondrial optic neuropathies. *J Med Genet* 2009; 46(3): 145-58.
- [65] Johns DR, Berman J. Alternative, simultaneous complex I mitochondrial DNA mutations in Leber's hereditary optic neuropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 174(3): 1324-30.
- [66] Brown MD, Sun F, Wallace DC. Clustering of Caucasian Leber hereditary optic neuropathy patients containing the 11778 or 14484 mutations on an mtDNA lineage. *Am J Hum Genet* 1997; 60(2): 381-7.
- [67] Hofmann S, Jaksch M, Bezold R, *et al.* Population genetics and disease susceptibility: characterization of central European haplogroups by mtDNA gene mutations, correlation with D loop variants and association with disease. *Hum Mol Genet* 1997; 6(11): 1835-46.
- [68] Lamminen T, Huoponen K, Sistonen P, *et al.* mtDNA haplotype analysis in Finnish families with leber hereditary optic neuroretinopathy. *Eur J Hum Genet* 1997; 5(5): 271-9.
- [69] Torroni A, Petrozzi M, D'Urbano L, *et al.* Haplotype and phylogenetic analyses suggest that one European-specific mtDNA background plays a role in the expression of Leber hereditary optic neuropathy by increasing the penetrance of the primary mutations 11778 and 14484. *Am J Hum Genet* 1997; 60(5): 1107-21.
- [70] Hudson G, Carelli V, Spruijt L, *et al.* Clinical expression of Leber hereditary optic neuropathy is affected by the mitochondrial DNA-haplogroup background. *Am J Hum Genet* 2007; 81(2): 228-33.
- [71] Jones MM, Manwaring N, Wang JJ, *et al.* Mitochondrial DNA haplogroups and age-related maculopathy. *Arch Ophthalmol* 2007; 125(9): 1235-40.
- [72] Canter JA, Olson LM, Spencer K, *et al.* Mitochondrial DNA polymorphism A4917G is independently associated with age-related macular degeneration. *PLoS One* 2008; 3(5): e2091.
- [73] SanGiovanni JP, Arking DE, Iyengar SK, *et al.* Mitochondrial DNA variants of respiratory complex I that uniquely characterize haplogroup T2 are associated with increased risk of age-related macular degeneration. *PLoS One* 2009; 4(5): e5508.
- [74] Udar N, Atilano SR, Memarzadeh M, *et al.* Mitochondrial DNA haplogroups associated with age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50(6): 2966-74.
- [75] Manwaring N, Jones MM, Wang JJ, *et al.* Mitochondrial DNA haplogroups and age-related hearing loss. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2007; 133(9): 929-33.
- [76] Ivanova R, Lepage V, Charron D, *et al.* Mitochondrial genotype associated with French Caucasian centenarians. *Gerontology* 1998; 44(6): 349.
- [77] De Benedictis G, Rose G, Carrieri G, *et al.* Mitochondrial DNA inherited variants are associated with successful aging and longevity in humans. *Faseb J* 1999; 13(12): 1532-6.
- [78] De Benedictis G, Carrieri G, Garasto S, *et al.* Does a retrograde response in human aging and longevity exist? *Exp Gerontol* 2000; 35(6-7): 795-801.
- [79] Ross OA, McCormack R, Curran MD, *et al.* Mitochondrial DNA polymorphism: its role in longevity of the Irish population. *Exp Gerontol* 2001; 36(7): 1161-78.
- [80] Bonafe M, Barbi C, Olivieri F, *et al.* An allele of HRAS1 3'variable number of tandem repeats is a frailty allele: implication for an evolutionarily-conserved pathway involved in longevity. *Gene* 2002; 286(1): 121-6.
- [81] Niemi AK, Hervonen A, Hurme M, *et al.* Mitochondrial DNA polymorphisms associated with longevity in a Finnish population. *Hum Genet* 2003; 112(1): 29-33.
- [82] Dominguez-Garrido E, Martinez-Redondo D, Martin-Ruiz C, *et al.* Association of mitochondrial haplogroup J and mtDNA oxidative damage in two different North Spain elderly populations. *Biogerontology* 2009; 10(4): 435-42.
- [83] Chagnon P, Gee M, Filion M, *et al.* Phylogenetic analysis of the mitochondrial genome indicates significant differences between patients with Alzheimer disease and controls in a French-Canadian founder population. *Am J Med Genet* 1999; 85(1): 20-30.
- [84] Chinnery PF, Taylor GA, Howell N, *et al.* Mitochondrial DNA haplogroups and susceptibility to AD and dementia with Lewy bodies. *Neurology* 2000; 55(2): 302-4.
- [85] Carrieri G, Bonafe M, De Luca M, *et al.* Mitochondrial DNA haplogroups and APOE4 allele are non-independent variables in sporadic Alzheimer's disease. *Hum Genet* 2001; 108(3): 194-8.
- [86] van der Walt JM, Nicodemus KK, Martin ER, *et al.* Mitochondrial polymorphisms significantly reduce the risk of Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 2003; 72(4): 804-11.
- [87] van der Walt JM, Dementieva YA, Martin ER, *et al.* Analysis of European mitochondrial haplogroups with Alzheimer disease risk. *Neurosci Lett* 2004; 365(1): 28-32.
- [88] Ghezzi D, Marelli C, Achilli A, *et al.* Mitochondrial DNA haplogroup K is associated with a lower risk of Parkinson's disease in Italians. *Eur J Hum Genet* 2005; 13(6): 748-52.
- [89] Pyle A, Foltynie T, Tiangyou W, *et al.* Mitochondrial DNA haplogroup cluster UKJT reduces the risk of PD. *Ann Neurol* 2005; 57(4): 564-7.
- [90] Fesahat F, Houshmand M, Panahi MS, *et al.* Do haplogroups H and U act to increase the penetrance of Alzheimer's disease? *Cell Mol Neurobiol* 2007; 27(3): 329-34.
- [91] Gaweda-Walerych K, Maruszak A, Safranow K, *et al.* Mitochondrial DNA haplogroups and subhaplogroups are associated with Parkinson's disease risk in a Polish PD cohort. *J Neural Transm* 2008; 115(11): 1521-6.
- [92] Khusnutdinova E, Gilyazova I, Ruiz-Pesini E, *et al.* A mitochondrial etiology of neurodegenerative diseases: evidence from Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1147: 1-20.
- [93] Maruszak A, Canter JA, Styczynska M, *et al.* Mitochondrial haplogroup H and Alzheimer's disease--is there a connection? *Neurobiol Aging* 2009; 30(11): 1749-55.

- [94] Kruger J, Hinttala R, Majamaa K, *et al.* Mitochondrial DNA haplogroups in early-onset Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration. *Mol Neurodegener* 2010; 5: 8.
- [95] Ruiz-Pesini E, Diez C, Lapena AC, *et al.* Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. *Clin Chem* 1998; 44(8 Pt 1): 1616-20.
- [96] Frank SA, Hurst LD. Mitochondria and male disease. *Nature* 1996; 383(6597): 224.
- [97] Petros JA, Baumann AK, Ruiz-Pesini E, *et al.* mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(3): 719-24.
- [98] Bayona-Bafaluy MP, Lopez-Gallardo E, Montoya J, *et al.* Maternally inherited susceptibility to cancer. *Biochim Biophys Acta* 2010 Aug 21. [Epub ahead of print].
- [99] Gomez-Duran A, Pacheu-Grau D, Lopez-Perez MJ, *et al.* Mitochondrial pharma-Q-genomics: Targeting the OXPHOS cytochrome b. *Drug Discov Today* 2010 Nov 26. [Epub ahead of print].
- [100] Ghelli A, Porcelli AM, Zanna C, *et al.* The background of mitochondrial DNA haplogroup J increases the sensitivity of Leber's hereditary optic neuropathy cells to 2,5-hexanedione toxicity. *PLoS One* 2009; 4(11): e7922.
- [101] Washizuka S, Ikeda A, Kato N, *et al.* Possible relationship between mitochondrial DNA polymorphisms and lithium response in bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 2003; 6(4): 421-4.
- [102] Kazuno AA, Munakata K, Kato N, *et al.* Mitochondrial DNA-dependent effects of valproate on mitochondrial calcium levels in transmitochondrial cybrids. *Int J Neuropsychopharmacol* 2008; 11(1): 71-8.
- [103] Di Lorenzo C, Pierelli F, Coppola G, *et al.* Mitochondrial DNA haplogroups influence the therapeutic response to riboflavin in migraineurs. *Neurology* 2009; 72(18): 1588-94.
- [104] Moreno-Loshuertos R, Acin-Perez R, Fernandez-Silva P, *et al.* Differences in reactive oxygen species production explain the phenotypes associated with common mouse mitochondrial DNA variants. *Nat Genet* 2006; 38(11): 1261-8.
- [105] Williams RS. Mitochondrial gene expression in mammalian striated muscle. Evidence that variation in gene dosage is the major regulatory event. *J Biol Chem* 1986; 261(26): 12390-4.
- [106] Hulgan T, Haas DW, Haines JL, *et al.* Mitochondrial haplogroups and peripheral neuropathy during antiretroviral therapy: an adult AIDS clinical trials group study. *Aids* 2005; 19(13): 1341-9.
- [107] Canter JA, Haas DW, Kallianpur AR, *et al.* The mitochondrial pharmacogenomics of haplogroup T: MTND2*LHON4917G and antiretroviral therapy-associated peripheral neuropathy. *Pharmacogenomics J* 2008; 8(1): 71-7.
- [108] Kallianpur AR, Hulgan T. Pharmacogenetics of nucleoside reverse-transcriptase inhibitor-associated peripheral neuropathy. *Pharmacogenomics* 2009; 10(4): 623-37.
- [109] Canter JA, Robbins GK, Selph D, *et al.* African mitochondrial DNA subhaplogroups and peripheral neuropathy during antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2010; 201(11): 1703-7.
- [110] Hendrickson SL, Kingsley LA, Ruiz-Pesini E, *et al.* Mitochondrial DNA haplogroups influence lipoatrophy after highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009; 51(2): 111-6.
- [111] Hulgan T, Tebas P, Canter JA, *et al.* Hemochromatosis gene polymorphisms, mitochondrial haplogroups, and peripheral lipoatrophy during antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2008; 197(6): 858-66.
- [112] Peters U, Preisler-Adams S, Lanvers-Kaminsky C, *et al.* Sequence variations of mitochondrial DNA and individual sensitivity to the ototoxic effect of cisplatin. *Anticancer Res* 2003; 23(2B): 1249-55.
- [113] Zhao H, Li R, Wang Q, *et al.* Maternally inherited aminoglycoside-induced and nonsyndromic deafness is associated with the novel C1494T mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in a large Chinese family. *Am J Hum Genet* 2004; 74(1): 139-52.
- [114] Wang CY, Kong QP, Yao YG, *et al.* mtDNA mutation C1494T, haplogroup A, and hearing loss in Chinese. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 348(2): 712-5.
- [115] Pacheu-Grau D, Gomez-Duran A, Lopez-Perez MJ, *et al.* Mitochondrial pharmacogenomics: barcode for antibiotic therapy. *Drug Discov Today* 2010; 15(1-2): 33-9.
- [116] Pacheu-Grau D, Gomez-Duran A, Montoya J, *et al.* Influence of mtDNA genetic variation on antibiotic therapy. *Pharmacogenomics* 2010; 11(9): 1185-7.