

TRABAJO DE FIN DE GRADO  
GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

**PAPEL DEL COMPLEJO IV SOBRE EL ENSAMBLAJE  
Y ESTABILIDAD DE LOS COMPLEJOS Y  
SUPERCOMPLEJOS RESPIRATORIOS**

**ROLE OF COMPLEX IV IN THE ASSEMBLY AND  
STABILITY OF RESPIRATORY COMPLEXES AND  
SUPERCOMPLEXES**

**Autora: Ester Casajús Pelegay**

**Directores:**

**Raquel Moreno Loshuertos**

**Patricio Fernández Silva**

**Grupo GENOXPHOS**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular**

**Universidad de Zaragoza**

**Junio 2016**



**Universidad  
Zaragoza**



**Facultad de Ciencias  
Universidad Zaragoza**

# ÍNDICE

<b>RESUMEN/ABSTRACT .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
1. Mitocondrias .....	2
2. El sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS).....	3
3. Organización y ensamblaje del sistema OXPHOS.....	4
4. Complejo IV: Citocromo C oxidasa.....	5
5. Enfermedades asociadas a déficit en el complejo IV .....	6
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>7</b>
<b>DESARROLLO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>8</b>
1. <b>Cultivos celulares:</b> .....	8
1.1. Líneas celulares y medios de cultivo .....	8
1.2. Subcloning .....	8
1.3. Determinación del tiempo de duplicación en glucosa y galactosa .....	9
1.4. Ensayos de toxicidad con azida sódica .....	9
2. <b>Extracción y manipulación de DNA:</b> .....	10
2.1. Extracción de DNA.....	10
2.2. Análisis de mutación por RFLP.....	10
2.3. Cuantificación del porcentaje de mutación.....	10
3. <b>Preparación de extractos celulares totales y purificación mitocondrial:</b> .....	10
3.1. Preparación de extractos celulares .....	10
3.1.1.Extracción de proteínas totales .....	10
3.1.2.Preparación de extractos para ensayos enzimáticos.....	11
3.2. Purificación de mitocondrias para análisis por BN .....	11
4. <b>Manipulación y análisis de proteínas:</b> .....	12
4.1. Cuantificación de proteínas por Bradford.....	12
4.2. Electroforesis de proteínas.....	12
4.2.1.SDS-PAGE .....	12
4.2.2.Electroforesis nativa Blue Native (BN) .....	13
4.3. Transferencia de proteínas a membranas de PVDF.....	13
4.4. Análisis por Western Blot.....	14
4.5. Reutilización de membranas .....	14
5. <b>Medida de la función OXPHOS:</b> .....	15
5.1. Ensayos de respiración endógena y desacoplada mediante electrodo de oxígeno..	15
5.2. Medida de la actividad COX por espectrofotometría .....	15
5.3. Ensayos de la actividad del complejo CI y CIV en genes nativos PAA.....	16
6. <b>Análisis estadístico:</b> .....	16
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>17</b>
1. Generación de líneas celulares de ratón con diferente porcentaje de heteroplasma para la mutación del complejo IV .....	17
2. Detección de la citocromo c oxidasa.....	18
3. Análisis de la velocidad de crecimiento celular en distintos medios de cultivo .....	18
4. Valoración de la actividad de la citocromo c oxidasa .....	19

5. Valoración de la actividad del sistema OXPHOS .....	19
6. Estimación de la supervivencia celular en presencia de azida sódica .....	20
7. Evaluación de los complejos y supercomplejos de la cadena respiratoria .....	21
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>23</b>
<b>CONCLUSIONES/CONSLUSIONS .....</b>	<b>24</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>25</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>26</b>
Anexo I. Información adicional del desarrollo experimental.....	26
Anexo II. Información adicional de los resultados.....	27
Anexo III. Análisis estadístico de los resultados.....	28

## **RESUMEN**

El correcto funcionamiento del sistema OXPHOS depende del ensamblaje y actividad de cada uno de los complejos de la cadena de transporte electrónico. Por tanto, cualquier mutación que afecte a la integridad de éstos, se reflejará en la funcionalidad de este sistema. La estabilidad de los diferentes complejos no es aislada, sino que se han descrito relaciones de interdependencia entre ellos para formar los supercomplejos respiratorios y llevar a cabo la respiración celular.

En este TFG, se ha estudiado el efecto de las variaciones en el complejo IV sobre el ensamblaje y función de los complejos y supercomplejos respiratorios. Para ello hemos utilizado como modelo líneas celulares con distintos porcentajes de la mutación C6247T en la subunidad Cox1 del complejo IV codificada en el DNA mitocondrial (mtDNA). Esta mutación induce un cambio de aminoácido que impide el correcto ensamblaje de la citocromo c oxidasa provocando un déficit de este complejo. De esta manera, conseguimos líneas celulares con un rango de carga mutacional que nos permitirá comprobar hasta qué punto la célula sigue manteniendo la actividad OXPHOS y el ensamblaje de supercomplejos.

Los ensayos para estudiar la presencia de asociaciones de supercomplejos respiratorios y la actividad del sistema revelaron que incluso con altos porcentajes de heteroplasmia (hasta un 87% de mtDNA mutado), la célula es capaz de mantener buenos niveles de funcionalidad y supervivencia. Esto puede deberse a mecanismos de compensación por parte de la célula ante el déficit en el complejo IV.

## **ABSTRACT**

The proper function of OXPHOS system depends on the assembly and stability of each one of the respiratory chain complexes. Therefore, any mutation which affects to their integrity will be reflected in the functionality of the system. The stability of the different complexes is not isolated, as dependence relations among them have been described to form respiratory supercomplexes and perform the cellular respiration.

In this TFG, it has been studied the effect of variations in complex IV on the assembly and function of respiratory complexes and supercomplexes. For this purpose, we took advantage of mouse cell lines with harboring the C6247T mutation within Cox1, a complex IV subunit which is encoded in the mtDNA, in different proportions. This mutation induces an aminoacid change that prevents the correct assembly of cytochrome c oxidase causing a deficit of this complex. In this way, we obtained cell lines with a range of mutational charge that will allow us to verify how far the cell retains the OXPHOS activity and supercomplexes assembly.

The trials to study the presence of supercomplexes associations and activity, revealed that the cells were able to maintain good levels of functionality and survival even with high percentages of heteroplasmy (up to 87% of mutant mtDNA). This might be due to compensatory mechanisms of cell to make up for the deficit in the complex IV.

# INTRODUCCIÓN

## **1. Mitocondrias**

Las mitocondrias son unos orgánulos de origen endosimbiótico que se encuentran en el citoplasma de casi todas las células eucariotas. Su estructura se compone de dos membranas, una externa y otra interna que se encuentra plegada formando las llamadas crestas mitocondriales, que aumentan en gran medida su área. La doble membrana de la mitocondria nos permite definir dos espacios, el espacio intermembrana, situado entre ambas, y la matriz mitocondrial, rodeada por la membrana interna. La membrana externa es muy permeable ya que es muy rica en unas proteínas transmembrana formadoras de canales llamadas porinas, que permiten el paso de moléculas de hasta un peso molecular de 10kDa. Sin embargo, la membrana interna es más selectiva ya que carece de poros. En su lugar, cuenta con numerosos complejos enzimáticos y sistemas de transporte muy selectivos para diferentes moléculas. En la matriz mitocondrial se encuentra el DNA mitocondrial y los ribosomas, así como gran cantidad de enzimas implicadas en las funciones del orgánulo. [1-4]

El material genético contenido en las mitocondrias es una molécula de DNA bicatenaria y circular capaz de replicarse y transcribirse, presente en un número de copias variable (entre 2 y 10 por mitocondria según muchos estudios). Este DNA codifica 37 genes, que son: 13 proteínas, todas ellas componentes del sistema de fosforilación oxidativa, así como los dos RNA ribosómicos (12S y 16S) y 22 RNAs de transferencia necesarios para su traducción. Estas 13 proteínas codificadas en el mtDNA constituyen sólo el 1% de todas las proteínas que forman parte de la mitocondria. Las proteínas de origen nuclear son necesarias para la replicación, transcripción y traducción del mtDNA, así como para el resto de los procesos metabólicos que tienen lugar en el interior de la mitocondria. Por este motivo, la biogénesis de las mitocondrias constituye un caso único en la célula animal al encontrarse bajo la regulación y coordinación de los dos sistemas genéticos.

La función principal de las mitocondrias es la respiración celular, gracias a la cual se produce una oxidación de sustratos generados por el metabolismo celular, con el fin de producir energía para la célula. Estos sustratos provienen de diferentes fuentes: por un lado, la glucosa se metaboliza en el citosol dando lugar a piruvato que, en el interior de la mitocondria, es oxidado a Acetil-CoA. El Acetil-CoA es el principal precursor del Ciclo de Krebs y acaba siendo degradado a CO<sub>2</sub> y agua, generando moléculas energéticas (ATP) y moléculas con alto poder reductor (NADH y FADH<sub>2</sub>). Estas moléculas transformarán su energía química en la fosforilación oxidativa, generando grandes cantidades de ATP. Por otro lado, la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos en la mitocondria los metaboliza hasta Acetil-CoA, que llevará el mismo camino descrito anteriormente, generando energía gracias al metabolismo oxidativo. [4]

Además de la fosforilación oxidativa, las mitocondrias tienen otras funciones importantes entre las que se encuentran la síntesis de nucleótidos, la del grupo hemo, así como mantener la homeostasis intracelular de metabolitos e iones, como por ejemplo el calcio, y juega un papel relevante en algunos procesos más complejos como son el cáncer, la diabetes o la apoptosis. [4]

## **2. El sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS)**

Este sistema OXPHOS está situado en la membrana interna de la mitocondria y consta de dos procesos. Uno de ellos es el transporte de electrones que llevan a cabo los complejos multiproteicos que forman la cadena respiratoria. El otro proceso es la quimiósmosis, que está acoplada al primero, y es realizado por la ATP sintasa.

La fosforilación oxidativa comienza con la entrada de electrones a la cadena respiratoria, a través de los nucleótidos de nicotinamida (NADH) o de flavina (FADH<sub>2</sub>) reducidos, procedentes de los procesos catabólicos de hidratos de carbono, ácidos grasos o esqueletos carbonados de los aminoácidos. [4]

Durante este proceso van a intervenir cuatro complejos respiratorios (complejo I, II, III y IV), la ATP sintasa (complejo V) y los transportadores de electrones ubiquinona y citocromo c.

En primer lugar el complejo I, también llamado NADH ubiquinona oxidoreductasa o NADH deshidrogenasa, va a catalizar la transferencia de un ión hidruro del NADH hacia la ubiquinona, a través de flavoproteínas (FMN) y centros ferro-sulfurados. Además gracias a la energía de la transferencia electrónica, se van a impulsar protones a través del complejo desde la matriz mitocondrial, hacia el espacio intermembrana. El complejo II o succinato deshidrogenasa, es el único enzima del ciclo del ácido cítrico acoplado a la membrana. Este complejo también va a transportar los electrones a través de tres centros ferro-sulfurados hasta la ubiquinona, pero en este caso, los electrones van a proceder del FAD reducido, el FADH<sub>2</sub>, por la reacción de succinato a fumarato y sin translocación de protones.

Las ubiquinonas reducidas, pequeñas moléculas liposolubles procedentes de estas dos reacciones, van a interaccionar con el siguiente complejo respiratorio, el complejo III (citocromo c reductasa). Su núcleo funcional se compone de 3 subunidades: el citocromo b, el citocromo c<sub>1</sub> (con sus grupos hemo) y una proteína ferro-sulfurada. Los electrones procedentes de la ubiquinona reducida pasarán a través de los diferentes centros redox del complejo III hasta el citocromo c, que pasará de un estado oxidado a reducido. También va a estar acoplada al transporte direccional de protones al espacio intermembrana.

El citocromo c (Cyt c) es una proteína soluble y abundante que se asocia mediante interacciones electroestáticas con la parte exterior de la membrana mitocondrial interna, y que lleva los electrones desde el complejo III, hasta el complejo IV o citocromo c oxidasa. Este último (CIV) va a captar los electrones del citocromo c, que pasarán a lo largo de varios transportadores del complejo hasta llegar al aceptor final, el O<sub>2</sub>, que se reducirá dando moléculas de H<sub>2</sub>O. En este complejo, con la transferencia de electrones, también se bombean protones al espacio intermembrana.

Todo este proceso tiene como fin la generación de energía, como describió Peter Mitchell en 1961 [5] cuando propuso el mecanismo acoplado de energía conocido como teoría quimiosmótica. La energía de transferencia de electrones se conserva eficientemente en forma de gradiente de protones. Por cada par de electrones transferidos al O<sub>2</sub>, se bombean cuatro protones por parte del complejo I, otros cuatro por el complejo III y dos por el complejo IV. Esta energía almacenada, denominada fuerza protón-motriz, es debida a la

**Complex: I**

Intermembrane space

Inner mitochondrial membrane

Mitochondrial matrix

NADH dehydrogenase

Subunits: >41/7

**Complex: II**

Succinate dehydrogenase

Subunits: 4/0

**Complex: III**

Cytochrome bc1 complex

Subunits: 10/1

**Complex: IV**

Cytochrome c oxidase

Subunits: 10/3

**Complex: V**

ATP synthase

Subunits: 14/2

### 3. Organización y ensamblaje del sistema OXPPOS

En la actualidad, gracias a nuevos métodos y técnicas, se ha confirmado la presencia de supercomplejos asociados aunque sin la restricción del modelo sólido. Se ha visto que los dos modelos, sólido y fluído, no son excluyentes y podrían estar presentes al mismo tiempo. Por esta razón se han propuesto nuevos modelos integradores de ambas visiones como el modelo de plasticidad [8,9]. Este nuevo modelo presenta una red dinámica más compleja en la que los complejos respiratorios pueden coexistir entre formas tanto libres como asociadas, cuya regulación va a depender de cambios en las necesidades metabólicas o condiciones ambientales, como por ejemplo las situaciones de estrés y alta demanda de energía [8].

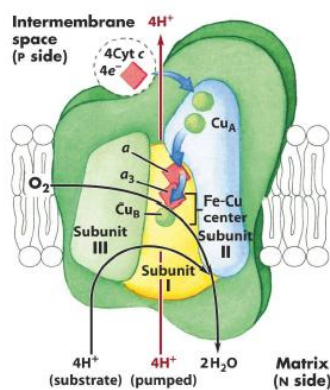
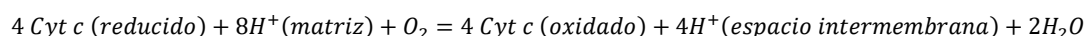
4

pequeñas cantidades del complejo III ensamblado son suficientes para la estabilización del complejo I. De cara a entender mejor la interdependencia y relaciones entre los complejos y la formación de supercomplejos, sería interesante comprobar si un fenómeno similar se produce entre el complejo IV y el complejo I. La dinámica de la formación de supercomplejos tiene como objetivo poder optimizar la utilización de sustratos disponibles mediante una apropiada organización del flujo de electrones [13].

#### **4. Complejo IV: Citocromo C oxidasa (COX)**

Como hemos dicho, el complejo IV es el encargado de transportar electrones desde el citocromo c hasta el  $O_2$ . Este complejo es una enzima muy grande compuesta por 13 subunidades. La comparación con la forma sencilla de esta enzima que poseen las bacterias ha llevado a sugerir que sólo 3 de las 13 subunidades de este complejo resultan esenciales para la función. Estas son las subunidades I, II y III y están codificadas en el mtDNA. La subunidad II contiene los dos iones cobre que forman un complejo con los grupos SH de residuos de Cys, llamado centro binuclear  $Cu_A$  (se asemeja a los centros  $2Fe-2S$  de las proteínas ferro-sulfuradas). La subunidad I contiene dos grupos hemo denominados  $a$  y  $a_3$  y otro ión cobre llamado  $Cu_B$ . Este  $Cu_B$  y el hemo  $a_3$  forman el segundo centro binuclear que hace de puente entre el hemo  $a$  y el  $O_2$  (unido a hemo  $a_3$ ) [4].

Como se observa en la figura 2, el camino que siguen los electrones en el complejo 4 será: del citocromo c pasarán a  $Cu_A$ , de éste al hemo  $a$  y posteriormente al centro hemo  $a_3-Cu_B$  que cederá los electrones al aceptor final de la cadena, el  $O_2$ . La citocromo c oxidasa utiliza la energía redox para bombear protones al espacio intermembrana, un protón bombeado por cada electrón transferido de manera que el balance es el siguiente:



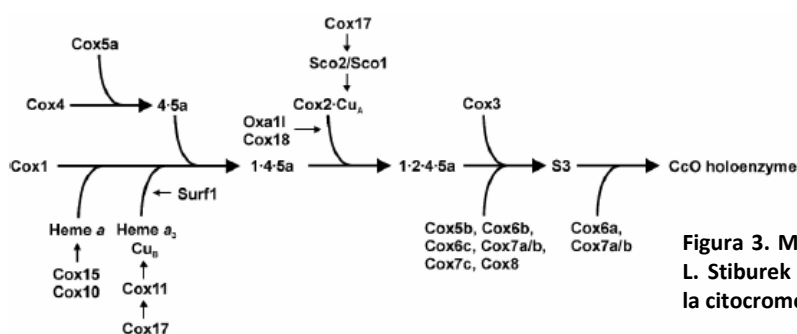
**Figura 2. Paso de los electrones a través del complejo IV (COX).** Remarcadas las subunidades implicadas y los centros redox, así como el paso de protones al espacio intermembrana y la reducción del aceptor final que es el  $O_2$  a dos  $H_2O$ .

El ensamblaje de la COX es un proceso complejo y altamente regulado en el cual intervienen proteínas tanto de origen genético mitocondrial como nuclear. Las proteínas implicadas procedentes del DNA nuclear incluyen chaperonas encargadas de asegurar el correcto ensamblaje entre los diferentes intermediarios del proceso, así como de ayudar la correcta colocación de elementos implicados en las reacciones redox, como los iones cobre [14].

El núcleo catalítico del complejo IV está formado por tres subunidades (Cox1, Cox2, Cox3) transmembrana, muy hidrofóbicas y codificadas en el mtDNA. Alrededor de éstas



encontramos 10 subunidades más pequeñas, codificadas por el DNA nuclear y encargadas de la regulación de la función COX y la estabilización del complejo multimérico. En los últimos años se han planteado diferentes modelos de la asociación y ensamblaje de estas subunidades. En 1998 Nijtmans et al. [15] planteaban el primer modelo que describe una serie de intermediarios, de S1 a S4, donde S1 es la subunidad Cox1 y se van asociando diferentes subunidades hasta S4, la holoenzima completa. Posteriormente estos modelos de ensamblaje fueron añadiendo elementos e intermediarios hasta llegar al modelo propuesto en 2006 por L. Stiburek et al. [14], que se muestra en la figura 3. Es una progresión de diversos pasos entre los cuales se forman intermediarios con una corta vida media y que requiere numerosos factores adicionales además de todas las subunidades del complejo para que se lleve a cabo un correcto ensamblaje.



**Figura 3. Modelo propuesto en 2006 por L. Stiburek et al. [15] del ensamblaje de la citocromo c oxidasa en humanos.**

## **5. Enfermedades asociadas a déficit en el complejo IV**

La deficiencia de la citocromo c oxidasa es una de las causas más comunes en los defectos de la cadena respiratoria en humanos, y está asociada a un amplio espectro de fenotipos clínicos.

En cuanto al complejo multiproteico, hasta ahora sólo se habían encontrado mutaciones en las 3 subunidades catalíticas codificadas en el mtDNA, aunque no son muy usuales. Estudios recientes han demostrado que también existen mutaciones en las subunidades pequeñas procedentes del DNA nuclear que causan problemas [16]. Estas mutaciones tienen efectos fenotípicos muy variados, desde una miopatía aislada hasta enfermedades multisistémicas. Estas deficiencias comienzan mayoritariamente a edades muy tempranas y suelen conllevar un desenlace fatal.

Además de fallos en el complejo, se han identificado numerosas mutaciones en los factores adicionales de ensamblaje codificados por el DNA nuclear [17], provocan enfermedades y síndromes. Así, mutaciones en el factor de ensamblaje SURF1 se asocian con síndrome de Leigh; en SCO2, con cardiopatía hipertrófica; alteraciones en SCO1 son la causa de insuficiencia hepática y coma por cetoacidosis; y fallos en COX10 provocan encefalopatía y tubulopatía.

Es decir, aunque sea un complejo mitocondrial, debido a su codificación dual por parte del DNA mitocondrial y nuclear, vamos a encontrar mutaciones en ambos lugares dando lugar a enfermedades mitocondriales con un alto espectro de manifestaciones, y en general, con mal pronóstico.

## OBJETIVOS

El ensamblaje y mantenimiento de los complejos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial es crucial para el correcto funcionamiento del sistema OXPHOS y para la formación de supercomplejos. Aunque la mayoría de las proteínas que forman parte de este sistema están codificadas en el DNA nuclear, 13 subunidades de los complejos del mismo están codificadas por el DNA mitocondrial. El correcto ensamblaje de los complejos es indispensable para su función y por tanto, mutaciones en esas subunidades son responsables de fallos en la biogénesis de los enzimas de los que forman parte [8,18].

Como se ha indicado anteriormente en la introducción, la estabilidad del complejo I de la cadena respiratoria depende de la presencia física de otros complejos como el III [19-26] o el IV [21,23] y pequeñas cantidades del complejo III ensamblado son suficientes para la estabilización del complejo I, de manera que la formación de estructuras supramoleculares se encuentra favorecida para optimizar la generación de ATP en la mitocondria [13]. De cara a entender mejor la interdependencia y relaciones entre los complejos y la formación de supercomplejos, sería interesante comprobar si un fenómeno similar se produce entre el complejo IV y el complejo I.

Una de las características del DNA mitocondrial (mtDNA) es la poliploidía (múltiples copias por célula). Esta propiedad abre la posibilidad de que existan variantes alélicas del mtDNA en un mismo individuo (heteroplasma). Por ello, que se manifieste o no un fenotipo patológico va a depender del porcentaje de moléculas de mtDNA que se encuentren alteradas. Disponemos de una línea celular mutante en la subunidad 1 de la enzima Citocromo c oxidasa (C6247T) que, en homoplasma (100% de moléculas mutantes), impide el ensamblaje del complejo IV, además de varios subclones con la misma mutación pero con distinto porcentaje de heteroplasma.

Los objetivos de este TFG son los siguientes:

- Evaluar las consecuencias de distintos grados de heteroplasma de la mutación C6247T sobre la función OXPHOS en fibroblastos de ratón.
- Estudiar el efecto de dicha mutación sobre el ensamblaje de complejos y supercomplejos respiratorios.
- Determinar el valor umbral máximo de mutación que permite el ensamblaje del complejo IV y analizar sus consecuencias sobre la estabilidad del complejo I.

## DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 1. Cultivos celulares:

#### 1.1. Líneas celulares y medios de cultivo

Las líneas celulares que se han utilizado a lo largo de todo este trabajo son líneas transmitocondriales generadas en nuestro laboratorio mediante transferencia de mitocondrias de la línea control (3T3) y mutante (C2C12) al entorno nuclear de fibroblastos carentes de mtDNA,  $\rho^0$  L929. La línea celular mutante es portadora de una mutación de C por T en la posición 6247 del gen *mt-CoI* que induce un cambio de serina por leucina en el residuo 307 de la proteína.

Las células se sembraron en medio DMEM (GIBCO™), glucosa (4,5 g/l), piruvato (0,11 g/l), glutamina (584 mg/l), 10% de suero fetal bovino (SFB), uridina (50 µg/ml), 1% de antibióticos compuestos por una mezcla de 1000 unidades/ml de penicilina G sódica y 10000 µg/ml de sulfato de estreptomicina (Invitrogen). El medio de galactosa, utilizado en las curvas de crecimiento se preparó usando medio comercial DMEM sin glucosa ni piruvato (GIBCO™) al que se le añadió un 10% de SFB, 0.9 g/l de galactosa, 0.11 g/l de piruvato de sodio y 1% de la mezcla de antibióticos.

Cuando las células alcanzaron la confluencia fueron repicadas. Para ello se eliminó el medio por aspiración, se lavaron las células con PBS (0,05 ml/cm<sup>2</sup>) (GIBCO™) y se incubaron con tripsina de origen pancreático (0,033 ml/cm<sup>2</sup> de una mezcla 0,05% tripsina (SIGMA) y 0,02% EDTA preparada en PBS y esterilizada por filtración) para favorecer la separación de las células del fondo de la placa. Una vez despegadas, las células se recogieron en PBS suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB) para inactivar la acción de la tripsina. Seguidamente se transvasaron a un tubo falcon de 15ml y se centrifugaron a 1250 x g durante 5 minutos eliminando el sobrenadante por aspiración. Este precipitado se resuspendió en 2-3 ml de cultivo para proceder a su división, conteo o congelación, dependiendo de la aplicación inmediata que se les quisiera dar.

#### 1.2. Subcloning

La línea FC2C12 se trató con bromuro de etidio (50 µg/ml) que se intercala en la doble hélice de DNA e inhibe preferentemente la replicación del mtDNA, durante 7 días para reducir el número de copias de mtDNA a 1 (idealmente). Tras dejar recuperar las células durante 5 días en el medio habitual sin bromuro de etidio, se subclonaron sembrando 1 célula por pocillo en una placa de 96 pocillos. Aproximadamente a los 7 días después del subclonaje comienzan a verse clones, que se seleccionaron para determinar su porcentaje de mutación.

Para obtener un mayor rango de porcentaje de mutación y poder estudiar todos los casos, subclonamos una de las líneas mutantes, la línea 4, que posee un 60% de mutación aproximadamente en el gen *mt-CoI*.

### 1.3. Determinación del tiempo de duplicación en glucosa y galactosa

Para determinar la velocidad de crecimiento celular en glucosa y galactosa se evaluó el tiempo de duplicación celular en cada uno de los medios utilizados.

En este experimento, se sembraron placas de microcultivo con 50000 células de la línea sujeta a estudio en cada uno de los medios de cultivo (glucosa y galactosa). El recuento se realizó a las 96 horas, realizándose un cambio de medio a mitad del experimento

Para calcular el tiempo de duplicación celular o tiempo de doblaje, se representó en una gráfica el número de células frente al tiempo transcurrido y se ajustó a una curva exponencial del tipo  $N=ax10^{bt}$ , de forma que el tiempo de doblaje se obtuvo utilizando la fórmula:  $D_T = \text{Log } 2/b$

### 1.4. Ensayos de toxicidad con azida sódica

Para evaluar la importancia del complejo IV en nuestras líneas con diferente porcentaje de mutación en el mismo, se realizó un estudio de citotoxicidad frente a azida sódica que es un inhibidor específico de dicho complejo. Se sembraron todas las líneas mutantes y las células control en placas de 96 pocillos a una densidad de 1000 células por pocillo.

Una vez sembradas se dejaron crecer durante 72 horas hasta que las células alcanzaron una tasa de crecimiento exponencial. Transcurrido ese tiempo, el medio de cultivo se cambió, añadiendo diferentes concentraciones de droga en medio de galactosa para forzar a las células a cambiar de un metabolismo glucolítico a la utilización del sistema OXPHOS. Tras incubar con azida sódica durante 48 horas, se eliminó la droga y se mantuvo a las células en un medio de galactosa durante otras 48 horas (aproximadamente 2 divisiones celulares) En el caso de la línea mutante 100%, tras eliminar el inhibidor, las células se crecieron en medio rico en glucosa suplementado con uridina ya que son incapaces de sobrevivir en otras condiciones. Transcurrido este tiempo, se añadieron 50 µl de MTT (5 mg/ml en agua) y las placas se incubaron a 37 °C durante un periodo de entre de 1 y 4 horas en oscuridad. En este tiempo las células vivas son capaces de reducir el MTT pasando de ser una solución acuosa de color amarillento a generar unos cristales de formazán de color azul. Después de ese tiempo se retiró el medio y se añadió DMSO para solubilizar cristales de formazán, dando una solución coloreada que absorbe a 550 nm y se midió dicha absorbancia en un lector de placas de ELISA.

La absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de las células viables en los pocillos por lo que, tras restar el valor de la absorbancia de los pocillos blanco, se utilizó para calcular la viabilidad celular mediante la fórmula:

$$\text{Viabilidad células (Azida)} = \frac{\text{Abs células (Azida)}}{\text{Abs células (medio control)}} \times 100$$

## **2. Extracción y manipulación de DNA**

### **2.1. Extracción de DNA**

Para la extracción de DNA a partir de cultivos celulares se utilizó el kit comercial *DNA miniKit*, de QIAGEN. Para medir la concentración de DNA, usamos el espectrofotómetro *NanoDrop*.

### **2.2. Análisis de la mutación por RFLP**

Para confirmar la presencia de la mutación C6247T en el gen *mt-Co1* así como para determinar el porcentaje de heteroplasmia, se realizó análisis por RFLP. Para ello, se amplificó un fragmento de PCR de 310 pb con los oligos:

**6211L:** 5'-TAGGATTAGA TGTAGACACA CGAGCTTACT TTACcT-3'

**6520H:** 5'-GGGAATCAGT GAACAAATCC-3'

El amplicón contiene dos sitios de restricción para MnlI que generan tres fragmentos de 214, 52 y 44 pb. La combinación de la mutación generada en el primer 6211L con la versión mutante 6247C elimina uno de los sitios de reconocimiento de MnlI de manera que en presencia de la mutación obtenemos dos bandas de 214 y 96 pb.

La reacción de digestión se llevó a cabo mediante incubación del fragmento de PCR y la enzima a 37°C durante toda la noche y los resultados se comprobaron mediante electroforesis en poliacrilamida al 10% en TBE (90 minutos a 80V). La visualización de las bandas se llevó a cabo en un transiluminador GelDoc tras incubar el gel en una disolución de bromuro de etidio en agua (0.75 µg/ml) durante 10-15 minutos a temperatura ambiente.

### **2.3. Cuantificación del porcentaje de mutación**

Una vez tenemos nuestros resultados de la electroforesis, escaneamos el gel para poder usar un programa informático que nos permitirá comparar la intensidad de las diferentes bandas respecto al control WT. En este caso usaremos el programa *Imagen J*.

## **3. Preparación de extractos celulares totales y purificación mitocondrial**

### **3.1. Preparación de extractos celulares**

#### **3.1.1. Extracción proteínas totales**

Para extraer proteínas totales a partir de células en cultivo, partimos de placas al 80% de confluencia y se siguió el proceso de tripsinización detallado en el apartado 1.1. Tras la centrifugación, los pellet se lavaron dos veces con PBS frío. El pellet celular se resuspendió en un volumen adecuado de tampón de extracción de proteínas RIPA (Tris-HCl mM 7.4, NaCl 50mM, TritonX100 1%, Na-desoxicolato 0,5%, EDTA 5mM) con inhibidores de proteasas (Complete protease inhibitor cocktail de Roche), que se añaden en el momento de su utilización y se trasvasó a un tubo eppendorf. A continuación se incubó en una rueda giratoria durante 15 minutos a 4°C y posteriormente se centrifugó a 16100 x g otros 15 minutos a 4°C. Se recogió el sobrenadante. Una parte se utilizó para la cuantificación de

proteínas mediante el método de Bradford (ver apartado 4.1) y la otra se guardó a -80°C hasta su posterior uso para electroforesis y WB.

### **3.1.2. Preparación de extractos para ensayos enzimáticos**

Para realizar ensayos enzimáticos se prepararon extractos celulares totales a partir de células en cultivo. Para ello, se tripsinizaron las células, se contaron y se resuspendieron en tampón fosfato (KP), 20 mM, pH=7.0 a una concentración de 40000 células por  $\mu$ l. Las células se rompieron tras someterlas a varios ciclos (4 ó 5) de “freeze-thawing” en los cuales la mezcla se congeló en N<sub>2</sub> (l) y se descongeló rápidamente en un baño de agua a 37°C.

Los extractos celulares así preparados se utilizaron para determinar espectrofotométricamente la actividad citocromo c oxidasa (complejo IV de la cadena respiratoria).

### **3.2. Purificación de mitocondrias para análisis por BN**

La purificación de mitocondrias se realiza con el fin de poder analizar mediante electroforesis nativa y Western Blot los complejos y supercomplejos de la cadena respiratoria de las mitocondrias de nuestras líneas celulares, control y mutantes. Las células sembradas en 5 placas de 150mm de diámetro al 80% de confluencia se recogieron por tripsinización (ver apartado 1.1). Seguidamente se lavó el pellet un par de veces con PBS frío y se eliminó el sobrenadante. Se congelaron a -80°C hasta el momento de la utilización para facilitar la ruptura celular.

Todo el proceso de extracción de mitocondrias se realizó en hielo, con el fin de inhibir la acción de las proteasas y conseguir que los supercomplejos se mantengan unidos.

Los pellets se descongelaron lentamente en hielo y se resuspendieron en un volumen de medio hipotónico (sacarosa 83mM, MOPS 10mM, pH 7.2) en relación 7:1 (medio hipotónico:pellet), y se mantuvieron dos minutos en hielo. Seguidamente, se transfirieron a un homogeneizador Potter-Dounce con émbolo de teflón y se homogeneizaron mediante 8-10 "pops" en los que se consigue la ruptura por efecto del vacío y posteriormente, se le añadió el mismo volumen de medio hipertónico (sacarosa 250mM, MOPS 30mM, EDTA 1mM, pH 7.4) que el añadido de hipotónico. A continuación, se centrifugó a 1000 x g durante 5 minutos a 4°C. Esta centrifugación favorece la sedimentación de restos celulares tales como núcleos o células que no se han roto. Por tanto lo que nos interesa es el sobrenadante que se recogió en tubos eppendorf y se centrifugaron a máxima velocidad durante 2 minutos a 4°C. Los pellets mitocondriales resultantes, se resuspendieron en medio A (sacarosa 0,32M, Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 7.4) juntando las mitocondrias de dos tubos eppendorf en uno. Este paso de lavado y centrifugación se repitió hasta tener todas las mitocondrias en un tubo. En el último lavado se tomó una pequeña cantidad para cuantificar la cantidad de proteínas que tenemos mediante Bradford (ver apartado 4.1.). Tras centrifugar a máxima velocidad durante 2 minutos a 4°C, el pellet se resuspendió en la cantidad necesaria del medio de resuspensión (0.75M aminocaproico en 50mM Bis-Tris pH 7.0) para que la concentración final de proteínas fuese 10 $\mu$ g/ $\mu$ l.

A continuación se lisaron las mitocondrias mediante el uso de digitonina 10%, que es un detergente suave que permite que los supercomplejos respiratorios se mantengan unidos, a una proporción de 4 gramos de digitonina por cada gramo de proteína de la muestra. Tras incubar las muestras durante 5 minutos en hielo, se centrifugaron durante 30 minutos a máxima velocidad a 4°C para sedimentar los restos de la membrana que no nos interesan. Guardamos el sobrenadante en otro tubo y se le añade tampón de carga (Blue G 5%) en un volumen igual a 1/3 del volumen del tampón de resuspensión. Se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

#### **4. Manipulación y análisis de proteínas**

##### **4.1. Cuantificación de proteínas por Bradford**

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo por espectrofotometría, utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976). Primero se construyó una curva de calibrado con 6 *standards* de 1 a 20 µg de albúmina sérica bovina (BSA). Las muestras, que pueden estar diluidas o no, se midieron por triplicado utilizando 3 volúmenes distintos. Tanto las muestras, como los *standards* y los blancos, se llevaron hasta un volumen final de 800 µl y se les añadió 200 µl del reactivo de Bradford (Bio-Rad Protein Assay) concentrado. Se les dejó desarrollar el color (entre 5 minutos y una hora) y finalmente, se procedió a la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. Con los *standards* se construyó una recta de calibrado en la que se interpolaron los valores de absorbancia obtenidos en cada una de las muestras para calcular la concentración de proteína presente en las mismas.

##### **4.2. Electroforesis en proteínas**

###### **4.2.1. SDS-PAGE**

Las proteínas de los extractos celulares totales obtenidos se separaron mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de SDS:PAA con el sistema Mini Protean III de BioRad.

Se realiza sobre dos geles en diferentes composiciones, por un lado, el gel concentrador en la parte superior va a compactar la muestra para que todas partan del mismo punto, y por otro lado, el gel separador en la parte inferior, separa electroforéticamente las proteínas de las muestras. Los componentes de estos geles se especifican en el anexo I.

El gel separador se vierte entre dos cristales que forman un soporte (uno de 10,1 x 8,3 cm y otro de 10,1 x 7,3 cm con espaciadores de 0.75 mm), dejando unos 2 cm por encima para el gel concentrador. Se vierte isopropanol por encima del gel separador para crear un frente recto y evitar la entrada de oxígeno que dificultaría la polimerización. Cuando el gel separador ya ha polimerizado, se quita el isopropanol y se lava con agua destilada. A continuación vertemos encima el gel concentrador e introducimos el peine. Una vez haya polimerizado, retiramos el peine y lavamos los pocillos con el propio tampón de electroforesis.

Se colocan los cristales en el bastidor y de ahí a la cubeta que se llena con tampón de electroforesis 1x (10x: Tris-HCl 250 mM, glicina 1.92 M, SDS 1% (p/v)).

Las muestras se mezclaron con tampón de carga de 1x (4x: Glicerol 20%, Tris-HCl 0,16 M pH 6.8, EDTA 20 mM, SDS 8% (p/v), azul de bromofenol 0,4% (p/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 4% (v/v)) antes de cargarse en el gel. Para determinar el tamaño de las proteínas se utilizó el marcador de peso molecular *Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Dual color* de BioRad.

#### **4.2.2. Electroforesis nativa Blue Native (BN)**

Los geles nativos en gradiente de concentración de poliacrilamida permiten separar eletroforéticamente complejos formados por más de una proteína por lo que nos sirve para estudiar los supercomplejos de la cadena respiratoria en muestras de mitocondrias permeabilizadas con digitonina.

Se usaron unos geles comerciales con un gradiente de PAA del 3 al 12% en Bis-Tris de Novex®. Se retiró el peine del gel comercial y se introdujo en la cubeta con un soporte adecuado a esta electroforesis. En la cámara fría se vertieron los tampones del cátodo en el interior, entre los cristales, y el ánodo en la zona exterior. En los pocillos se cargaron las muestras que previamente se habían mezclado con tampón de carga (Blue G 5%).

Se conectó a la fuente de alimentación a 50 V. Tras media hora de electroforesis, subimos el voltaje a 150 V y tras otra media hora cambiamos el tampón del cátodo A, que es el que ya habíamos añadido por el tampón del cátodo B, que contiene 10 veces menos cantidad de colorante lo que permite visualizar mejor las bandas de los complejos proteicos a lo largo del recorrido electroforético.

#### **4.3. Transferencia de proteínas a membranas PVDF**

Las proteínas separadas electroforéticamente se transfirieron a membranas de PVDF mediante electrotransferencia húmeda.

Se cortó una membrana de PVDF (Hybond-P de Amersham) de un tamaño adecuado para nuestro gel. Para activar la membrana se introdujo durante 10 segundos en metanol y posteriormente se lavó con agua destilada unos 5 minutos y se equilibró con BSN que es el tampón de transferencia (Tris 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20% (v/v)) durante 10 minutos. El gel también se equilibró con BSN aproximadamente otros 10 minutos.

En el soporte de transferencia se dispone en forma de "sándwich" estos elementos: primero una esponja, papeles Whatman 3MM cortados de un tamaño similar a la membrana, después el gel de electroforesis y encima la membrana, por último otra vez los papeles Whatman y otra esponja, todo ello impregnado con BSN. Se cierra el soporte con todos estos elementos en su interior y se introduce en el bastidor que contiene los electrodos, todo ello introducido en la cubeta, se cubre con BSN y se conecta a una fuente de alimentación.

Se dejó transferir a 100V a 4°C durante una hora. Una vez pasado este tiempo se dejó secar la membrana y se fijaron las proteínas sumergiendo la membrana 10 segundos en metanol, después se lavó con agua destilada. Se guardó a 4°C para sus posteriores usos.



#### **4.4. Análisis de proteínas por Western Blot (WB)**

Para detectar las proteínas de interés en las muestras se llevaron a cabo experimentos de inmunodetección mediante *Western Blot*.

La membrana se rehidrató en PBS-Tween 0,1% (PBS-T) y posteriormente se bloqueó con una disolución de leche en polvo al 5% en PBS-T incubándola durante una hora en agitación a temperatura ambiente. Este bloqueo se realiza para minimizar la posibilidad de uniones inespecíficas del anticuerpo con la membrana.

Tras la incubación con la solución de bloqueo, se realizaron varios lavados con PBS-Tween20 al 0,1% para eliminar el exceso de ésta. El anticuerpo primario comercial se diluyó en la proporción adecuada (ver tabla del anexo I) en PBS-T con 0,1% de leche en polvo. Se incubó durante toda la noche esta solución con la membrana en agitación a 4°C.

Al día siguiente para continuar con la técnica se realizaron un par de lavados de unos 10 minutos con PBS-T y después se incubó 50-60 minutos con el anticuerpo secundario, que reconocerá al anticuerpo primario que haya quedado unido a la membrana. Este anticuerpo se prepara también en PBS-T y 0,1% de leche en polvo (anticuerpos en el anexo I).

Transcurrido el tiempo de incubación, realizamos una serie de lavados con PBS-T, primero uno de 15 minutos y luego tres más de 5 minutos cada uno. Ahora la membrana está lista para detectar la proteína de interés.

Para la detección de la proteína debemos preparar una mezcla a partes iguales de los reactivos del kit de (luminol + peróxido de hidrógeno) y se deja incubar unos 5 minutos. Se vertió por encima de la membrana y se incubó otros cinco minutos. La peroxidasa que está conjugada con el anticuerpo secundario en presencia de peróxido de hidrógeno cataliza la oxidación del luminol que provoca que pase a un estado excitado que al volver al estado original emite luz (sustrato quimioluminiscente). Para revelar el resultado, debemos disponer de un cuarto sin luz para proteger el material de revelado. Se cubrió con un film transparente y se llevó a cabo la exposición a una placa de autorradiografía dentro de una *cassette* durante unos minutos. A continuación, se sumergió la placa en líquido revelador hasta que aparezcan las bandas y seguido se lava en agua destilada para, por último introducirla en el líquido fijador. La placa se lavó con agua destilada y se dejó secar al aire.

#### **4.5. Reutilización de membranas**

Con el fin de eliminar los anticuerpos unidos a las proteínas fijadas en la membrana y hacer posible la reutilización de ésta en otra inmunodetección, la membrana se sumergió en solución de *stripping* (2-mercaptoetanol 100 mM, SDS 2%, Tris-HCl 1M pH 6.7) y se incubó a 58°C durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, se realizaron tres lavados de 10 minutos a temperatura ambiente con PBS-T. En ese momento, la membrana estaba lista para volver a ser utilizada.

## **5. Medida de la funcionalidad OXPHOS**

### **5.1. Ensayos de respiración endógena y desacoplada mediante electrodo de oxígeno**

Para evaluar la funcionalidad de la cadena de transporte electrónico realizamos medidas de la respiración celular, es decir, medidas del consumo de oxígeno por parte de las células intactas en un electrodo de tipo Clark termostatzado (Oxytherm, Hansatech Instruments) compuesto por un cátodo de platino (Pt) y un ánodo de plata-cloruro de plata (Ag-AgCl) inmersos en una solución de cloruro potásico saturado al 50% y separados por una membrana de teflón permeable al oxígeno. Sobre la pieza que alberga los electrodos se coloca una cámara de reacción donde se van a depositar las células, y donde se incluye un imán para mantenerlo en agitación constantemente. Esta cámara está rodeada por otra cámara termostatzada que mantiene la reacción a 37°C. La cámara de reacción se cierra con un émbolo con una apertura capilar que permite la salida de aire y la adición de reactivos.

Antes de comenzar con la realización de las medidas, es necesario fijar la temperatura del Oxytherm a 37°C y también calibrar el aparato, estableciendo el cero al añadir a la cámara de reacción un agente oxidante, en nuestro caso el hidrosulfito de sodio.

Las células sembradas en placas se recogieron mediante tripsinización y centrifugación (ver apartado 1.1). El pellet se resuspendió en medio DMEM rico en glucosa. Una pequeña fracción del contenido del tubo se utilizó para contar las células y el resto se añadió a la cámara de reacción donde se comenzó a medir el consumo de oxígeno. Esta primera medida es la correspondiente a la respiración endógena, es decir, cuando dicha respiración está acoplada a la síntesis de ATP. Pero además nos interesa medir la respiración máxima, es decir, la respiración cuando se desacopla de la síntesis de ATP. Se utilizó el agente desacoplante DNP (dinitrofenol 6,5 mM). Para asegurarnos de que ese consumo de oxígeno proviene de la respiración de nuestras células debemos pararla usando KCN 400mM como inhibidor, de manera que cese el consumo de oxígeno.

El reactivo DNP es un ácido débil que capta los protones del espacio intermembrana mitocondrial generados por la cadena respiratoria y difunde hasta la matriz donde se desprotona. Por tanto, se va a eliminar el gradiente creado de protones que genera el ATP gracias a la ATP sintasa, desacoplando los procesos de consumo de oxígeno y síntesis de ATP. Al no sintetizar ATP, la célula va a responder aumentando la respiración para intentar suplir esa falta de energía, por eso de esta manera podemos medir la respiración máxima. El cianuro potásico (KCN) bloquea el paso de los electrones entre el complejo IV y el oxígeno molecular (O<sub>2</sub>), que es el aceptor final de electrones, por tanto, se inhibe la respiración.

### **5.2. Medida de la actividad COX por espectrofotometría**

Las determinaciones se llevaron a cabo en un espectrofotómetro UV-Visible UV 500 de Unicam termostatzado mediante un sistema Peltier PCB150 de DBS y los datos se registraron utilizaron el software Vision 32, versión 1.05. Las muestras se depositaron en cubetas de plástico de 1 ml y se incubaron a la temperatura de medida durante un tiempo antes de añadir el iniciador de la reacción y registrar la actividad.

Para comprobar la funcionalidad del complejo IV vamos a medir la reacción de oxidación del citocromo c en homogenados celulares.

En primer lugar debemos preparar una disolución de citocromo c al 1% reducido en tampón fosfato (0,1 M pH 7). Para tener el citocromo totalmente reducido añadimos ditionito de sodio que es un agente reductor. Esta solución debe incubarse en hielo durante media hora.

El siguiente paso es preparar las muestras para ser medidas en el espectrofotómetro, debemos añadir en la cubeta: 100 µl de tampón fosfato 100 mM pH 7, 100 µl de citocromo c reducido, 795 µl de agua destilada y 5 µl de la muestra que queremos cuantificar.

Cada muestra se midió por triplicado. La fórmula que se usó para calcular la actividad citocromo oxidasa específica fue la siguiente (hay que tener en cuenta que para obtener la actividad específica necesitamos medir previamente la concentración de proteína que tenemos de cada muestra mediante el método de Bradford, apartado 4.1):

$$\text{Actividad COX específica} = \frac{\frac{\text{Abs (550 nm)}}{21} \times \frac{1000}{\text{Volumen de la muestra}}}{\text{Concentración de proteína}}$$

### 5.3. Ensayos de la actividad del complejo CI y CIV en geles nativos PAA

Para evaluar la funcionalidad de los complejos y supercomplejos respiratorios separados mediante BNE en nuestras líneas celulares, se llevaron a cabo experimentos de determinación de la actividad en gel de los complejos I y IV (CI- o CIV-IGA). Para ello, una vez desarrollada la electroforesis, los geles se sumergieron en una de las siguientes disoluciones:

- Complejo I (NADH deshidrogenasa): una disolución 5 mM Tris-HCl, pH 7,4 con NADH (0,1 mg/ml) y NBT (2.5 mg/ml). El resultado fue visible en unos pocos minutos.
- Complejo IV (citocromo oxidasa): en este caso una disolución de TPK 50 mM pH 7,2 con 0,05% de DAB y citocromo c 50 µM (para ello añadimos 100 µl de una disolución de 10 ml de citocromo c a una concentración de 5 mM). Tras menos de media hora comenzaron a verse las diferentes bandas.

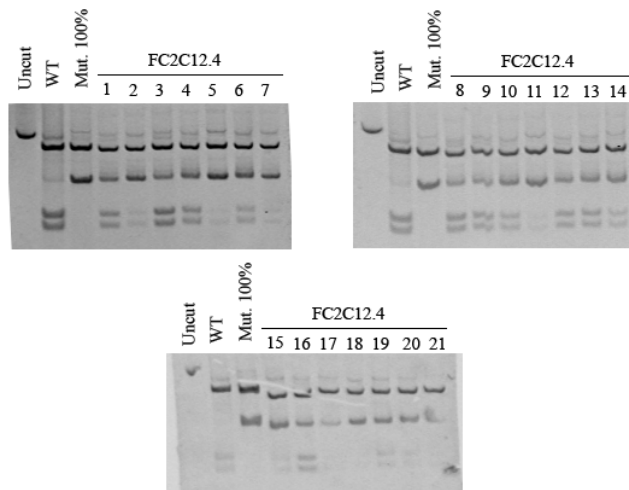
## 6. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos en los ensayos se realizó mediante los programas StatView 5.0 y GraphPad Prism 5. Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante análisis de varianza ANOVA y para encontrar diferencias estadísticamente significativas (p-value < 0,05) se utilizó el Post-hoc Fisher's PLSD test.

## RESULTADOS

### 1. Generación de líneas celulares de ratón con diferente porcentaje de heteroplasmia para la mutación del complejo IV

La línea celular utilizada en este TFG procedente de fibroblastos de ratón es la FC2C12, que posee una mutación mitocondrial en la subunidad 1 de la citocromo c oxidasa (complejo IV). Tras el primer tratamiento con bromuro de etidio y subcloning, obtuvimos cuatro clones, dos de ellos presentaban alrededor del 80% de mutación y los otros dos aproximadamente un 60%. Seleccionamos uno de cada porcentaje: FC2C12\_1 (80%) y FC2C12\_4 (60%). Para ampliar el rango de porcentajes de heteroplasmia mitocondrial, a partir de la línea FC2C12\_4, volvimos a realizar un tratamiento con bromuro de etidio y el subcloning. Tras seleccionar 21 clones distintos, extrajimos su DNA y analizamos la presencia y porcentaje de mutación por RFLP (figura 4), comparando la intensidad de sus bandas con las de las líneas control (*wild-type* F3T3) y mutante 100% (FC2C12\_11.15). Los resultados se muestran en el anexo II, figura 1.



**Figura 4. Digestión de las muestras de DNA resultantes del subcloning.** En la primera calle encontramos un control sin enzimas de restricción donde no se debe ver digestión y a continuación tenemos los controles WT y 100% mutante. Seguidamente encontramos la digestión del DNA resultante de los subclones obtenidos a partir del clon 4.

Para abarcar un mayor rango de % de mutación, elegimos las líneas FC2C12\_4.8 (36%), FC2C12\_4.21 (70%) y la FC2C12\_4.2 (87%).

Por tanto se va a trabajar durante este TFG con las siguientes líneas:

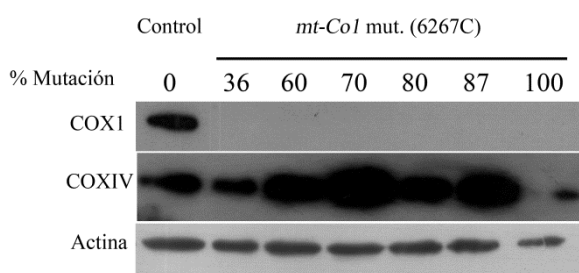
**Tabla 1. Porcentaje de mutación en las líneas celulares utilizadas en el estudio.**

Control F3T3	FC2C12 4.8	FC2C12 4	FC2C12 4.21	FC2C12 1	FC2C12 4.2	FC2C12 11.15
0%	36%	60%	70%	80%	87%	100%

## 2. Detección de la citocromo c oxidasa

Para estudiar el efecto de la mutación sobre la expresión de la proteína, se realizó la inmunodetección de la proteína COX mediante Western Blot (WB) tras separar las proteínas totales extraídas de cada uno de los clones de interés mediante electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE. Como control de carga utilizamos la proteína actina (anticuerpos en el anexo).

Los resultados se pueden ver en la figura 5. En el WB correspondiente a COX1, sólo se detecta citocromo c oxidasa en la muestra control. Esto puede ser debido a que la mutación de las líneas celulares que se encuentra en esa subunidad COX1 del complejo IV, esté interfiriendo en la unión con el anticuerpo. Por esta razón, usamos otro anticuerpo específico para la subunidad COXIV. Recordemos que esta subunidad está codificada en el DNA nuclear. En este caso aparece señal en todas las líneas mutantes, aunque muy poco en el carril de la muestra mutante en homoplasmia. Parece verse un aumento en la cantidad de proteína a partir de la línea con 60% de mutación. Este hecho puede reflejar un mecanismo de compensación en las líneas con mutación en el complejo IV. El control con actina sale positivo para todas las muestras.

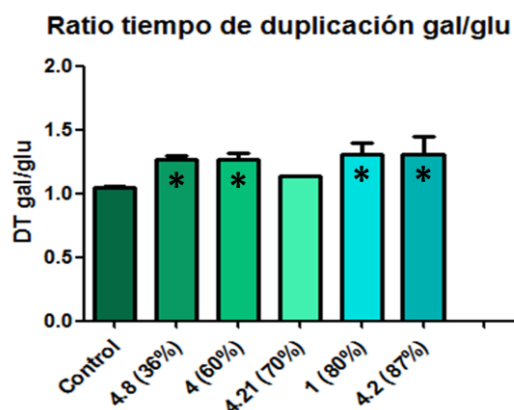


**Figura 5. Resultado del Western Blot de las membranas procedentes de SDS-PAGE.** En cada carril se cargaron las líneas celulares del estudio. En primer lugar aparece la detección del complejo IV (COX1), a continuación la detección del complejo IV (subunidad COXIV) y debajo la detección de la actina como control de carga. Los anticuerpos usados se encuentran descritos en el anexo I.

## 3. Análisis de la velocidad de crecimiento celular en distintos medios de cultivo

Las líneas celulares con deficiencias en su actividad OXPHOS presentan dificultades para crecer en medios de cultivo cuya fuente es la galactosa si las comparamos con su velocidad de crecimiento en glucosa. Por esa razón, evaluamos la capacidad de nuestras líneas celulares para crecer en galactosa, comparando su tiempo de doblaje en este medio con el que presentan en glucosa.

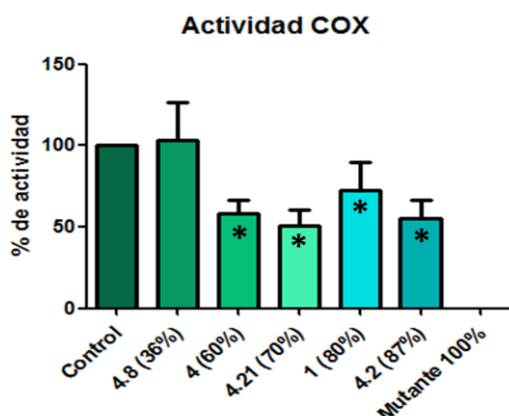
Los resultados obtenidos en este experimento se muestran en la figura 6. Que la ratio alcance valores altos indica que las células necesitan mayor tiempo para crecer en galactosa que en glucosa, es decir, indica una mayor dependencia de las células por la glucosa, evidenciando una deficiencia en la capacidad OXPHOS. El análisis estadístico (anexo III) mostró que entre líneas mutantes FC2C12 4.8, 4, 1 y 4.2 y la línea control había diferencias estadísticamente significativas, lo que demuestra que, ya en presencia de porcentajes bajos de mutación (36%) existe afectación en la función OXPHOS. Sin embargo, la línea 4.21 (70%), no mostró diferencias significativas. Probablemente debido a que sólo poseemos un valor de esta línea y puede no ser representativo. La línea celular homoplásmica para la mutación es incapaz de sobrevivir en medios no fermentativos como el medio de galactosa por lo que no podemos calcular su velocidad de crecimiento en dicho medio.



**Figura 6.** Gráfico que representa la relación entre los tiempos de duplicación en glucosa/galactosa para las líneas indicadas. Cada línea celular está representada por cada una de las barras y su altura indica la ratio DT gal/glu media y la barra superior muestra la desviación estándar. Según el análisis estadístico (anexo III), se observan diferencias estadísticamente significativas de las muestras mutantes respecto la línea control, indicadas con un asterisco ( $p < 0,05$ ).

#### 4. Valoración de la actividad de la citocromo c oxidasa

Para reflejar cómo afecta la mutación en el complejo IV a su actividad oxidasa, medimos la actividad COX específica en extractos celulares por espectrofotometría. Hemos considerado la capacidad de oxidar al citocromo c de la muestra control como el 100% de la actividad, por tanto podemos extrapolar los valores de actividad oxidasa de las demás líneas en esta escala para obtener sus porcentajes de actividad. Como muestra la figura 7 que representa estos porcentajes, la línea con un 36% de mutación tiene una actividad citocromo oxidasa muy similar a las células control y no muestra diferencias estadísticas significativas. Sin embargo las demás líneas con mayor porcentaje de mutación presentan una reducción de la actividad hasta un 50-70%, mostrando una diferencia significativa según el estudio estadístico. Las células mutantes 100% no presentaban actividad oxidasa, es decir, no son capaces de captar los electrones desde el citocromo c para llevar a cabo su transferencia hasta el oxígeno, que es el aceptor final.



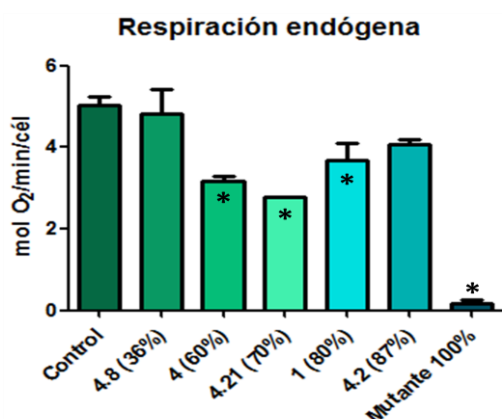
**Figura 7.** Gráfico que representa la actividad oxidasa de cada una de las líneas celulares indicadas en el eje de abscisas. Hemos considerado el valor de la muestra control el 100% de actividad oxidasa, para luego extrapolar en esta escala los demás valores, por tanto la altura de las barras muestra el porcentaje de actividad oxidasa de cada línea. En la gráfica se representa la media  $\pm$  S.D. de la actividad COX específica de cada una de las líneas mutantes normalizada por la actividad del control. Las líneas con diferencias significativas están marcadas con un asterisco ( $p < 0.05$ , Anexo III).

#### 5. Valoración de la actividad del sistema OXPHOS

Con el fin de evaluar de manera directa el efecto de la mutación en el complejo IV sobre la actividad del sistema OXPHOS se realizaron las medidas de respiración endógena y desacoplada para las líneas celulares del estudio.

Como se observa en la figura 8, la tasa de respiración endógena está reducida de manera estadísticamente significativa a partir de un 60% de mutación. La línea mutante 100% presenta valores de respiración prácticamente despreciables. La línea 4.8, con un 36% de

mutación, presenta valores de respiración comparables con los del control. Por último, la línea 4.21, portadora de un elevado porcentaje de moléculas de mtDNA mutadas, presenta una tasa de respiración más baja que el control, pero no significativa.



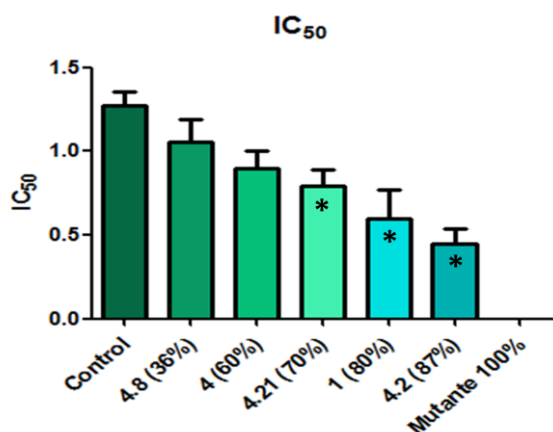
**Figura 8.** Gráfico que representa las medidas de respiración endógena de las líneas celulares del estudio. La altura de las barras de cada línea celular muestra la tasa de consumo de oxígeno por minuto y célula. Las barras superiores muestran las desviaciones estándar, las marcadas con un asterisco muestran diferencias estadísticamente significativas (anexo III).

## 6. Estimación de la supervivencia celular en presencia de azida sódica.

Mediante el ensayo de viabilidad celular y citotoxicidad de la azida sódica, basado en la reducción del MTT, sobre las líneas celulares del estudio con diferentes porcentajes de mutación para el complejo IV, evaluamos la capacidad para crecer en presencia de diferentes concentraciones de un inhibidor específico del complejo IV, la azida.

Así calculamos el  $IC_{50}$  que es una medida de la efectividad de una sustancia para inhibir el crecimiento celular e indica la susceptibilidad de la línea celular a dicho inhibidor. De esta manera vemos cómo afecta la inhibición del complejo IV a la supervivencia de nuestras líneas celulares.

En la figura 9 se representan los datos obtenidos y según el análisis estadístico las líneas con 70%, 80% y 87% son estadísticamente diferentes. La línea celular mutante 100% no muere en presencia del inhibidor a las concentraciones ensayadas ya que, al carecer de complejo IV, presenta un metabolismo glucolítico que no va a verse afectado por la inhibición de la actividad COX. Vemos que las células control son más resistentes al inhibidor que el resto de las líneas, ya que si éstas tienen menos complejo IV funcional, su inhibición se conseguirá con dosis más bajas de azida.

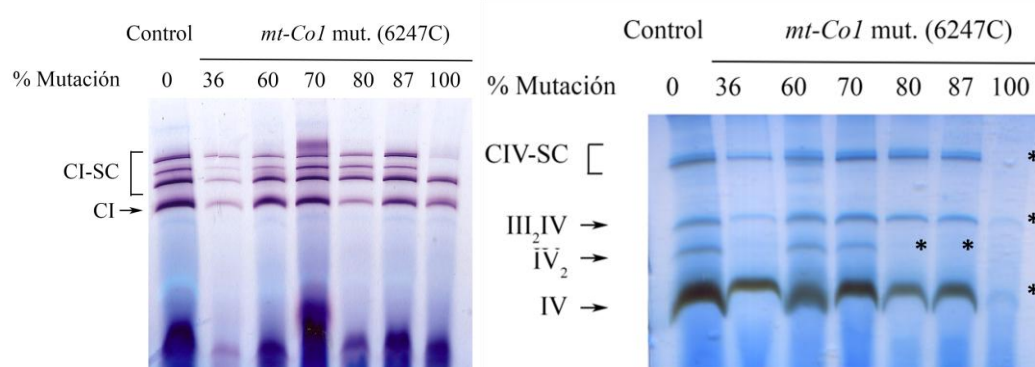


**Figura 9.** Gráfico que indica la  $IC_{50}$  de las líneas celulares en presencia de azida, inhibidor del complejo IV. Cada barra corresponde a una línea celular y su altura indica el  $IC_{50}$  de cada una. Las barras superiores muestran las desviaciones estándar y los asteriscos indican que hay diferencias estadísticamente significativas. (estadística anexo III).

## 7. Evaluación de los complejos y supercomplejos de la cadena respiratoria mitocondrial

El ensamblaje y la estabilidad de los complejos y supercomplejos respiratorios se evaluaron mediante técnicas de electroforesis nativa (*Blue Native*, BN). Se realizó un tinción simple del gel con Azul de Coomassie que se encuentra en el anexo II, figura 2.

Para evaluar la actividad de los complejos I y IV y la formación de supercomplejos que los contienen, se usó la técnica *In gel activity* (IGA) sobre los geles procedentes del BN. En la figura 10 se muestran los resultados obtenidos. A la izquierda un IGA correspondiente al complejo I y en la derecha correspondiente al complejo IV. En ambos se ven bandas correspondientes a la formación de supercomplejos, lo cual quiere decir que además de ensamblarse, muestran actividad, tanto el complejo I como el IV. Las bandas muestran actividad enzimática del respirasoma (CI+III+IV) en todas las líneas celulares, excepto en la mutante 100%. En la muestra mutante homoplásmica sí vemos actividad NADH deshidrogenasa tanto en la banda correspondiente al complejo I libre como a la del supercomplejo I+III, pues este no está mutado y no debería haber problemas en su actividad. Pero no se observa la banda I+III+IV porque no se llega a formar el respirasoma. En cambio, como era de esperar, no se observa actividad citocromo c oxidasa. Como se observa en la figura 10, gel de la derecha, a partir del 80% de mutación no se observa la banda correspondiente al complejo IV dimérico.

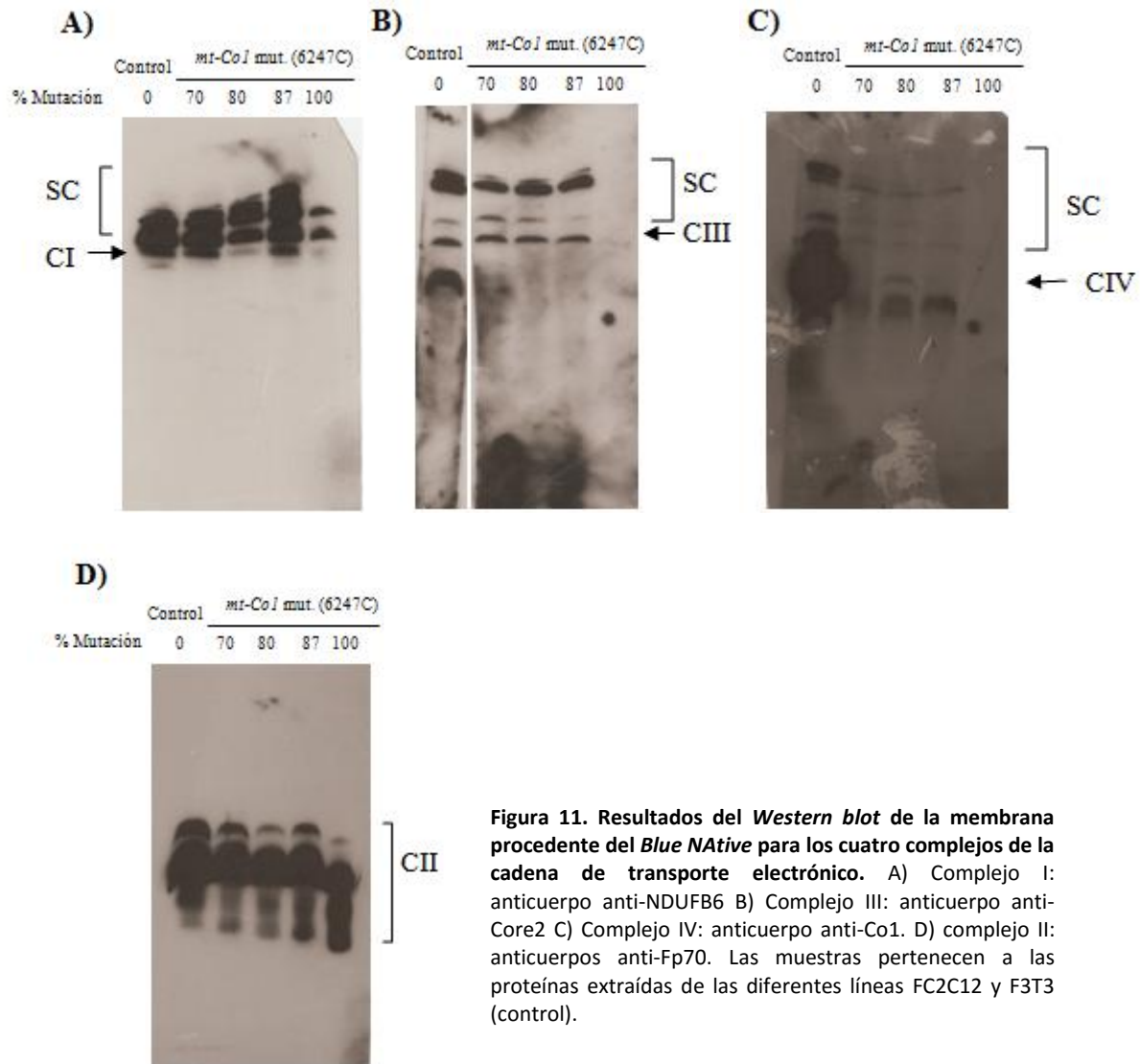


**Figura 10. Resultado del *In Gel Activity*.** En la izquierda se muestra el gel correspondiente al ensayo del complejo I y a la derecha el correspondiente al ensayo del complejo IV. En ambos tenemos la muestra control, seguido de las diferentes líneas mutantes hasta llegar a la 100% mutante. En cada línea se cargaron 100 µg de mitondrías permeabilizadas con digitonina. El asterístico indica las bandas que deberían aparecer.

Por último, la formación y estabilidad de SCs, se evaluó mediante Western Blot (WB), utilizando anticuerpos específicos de cada uno de los complejos respiratorios (ver tabla en el anexo I). Basándonos en los resultados de los ensayos de IGA, utilizamos las líneas con porcentaje de mutación igual o superior al 70% para el WB. En la figura 11A se muestra la inmunodetección del complejo I que confirma lo que habíamos visto mediante IGA, es decir, la formación del respirasoma incluso en presencia de un 87% de mutación. En cuanto al complejo III (figura 11B), vemos que las líneas FC2C12 4.21 (70%), 1 (80%) y 4.2 (87%), tienen un patrón de formación de complejos similar a la línea control. En el caso de la línea mutante 100%, vemos una débil señal en la banda del complejo III. Esta falta de intensidad puede deberse a que una menor carga en dicha calle, produzca un efecto umbral en el que la señal aparezca mucho más débil, ya que este complejo III no está mutado y



debería aparecer. Además en la figura 12 de *IGA*, aparecía la banda correspondiente al supercomplejo I+III. En la figura 11C se observa la inmunodetección correspondiente al complejo IV. En ella se ve claramente la presencia del complejo IV y los supercomplejos en la muestra control. En las diferentes líneas mutantes se puede apreciar pero no de manera tan intensa. En la muestra mutante 100% como era de esperar no aparece complejo IV libre ni asociado con otros complejos. Como vemos en la figura 11D, el patrón de complejo II es idéntico en todas las líneas celulares estudiadas.



**Figura 11. Resultados del Western blot de la membrana procedente del Blue Native para los cuatro complejos de la cadena de transporte electrónico.** A) Complejo I: anticuerpo anti-NDUFB6 B) Complejo III: anticuerpo anti-Core2 C) Complejo IV: anticuerpo anti-Co1. D) complejo II: anticuerpos anti-Fp70. Las muestras pertenecen a las proteínas extraídas de las diferentes líneas FC2C12 y F3T3 (control).

## DISCUSIÓN

La actividad del sistema OXPHOS depende de la integridad estructural y funcional de cada uno de los complejos de la cadena respiratoria de manera que se ensamblen correctamente dando lugar a supercomplejos respiratorios activos. En este TFG hemos tratado de evaluar cuál es el límite de porcentaje de mutación en el complejo IV a partir del cual se dejan de formar los supercomplejos respiratorios y el sistema OXPHOS deja de funcionar. Con este objetivo hemos utilizado líneas celulares de ratón que presentan distintas proporciones de la mutación C6247T en el gen de la subunidad 1 de la citocromo c oxidasa mitocondrial (*mt-CoI*) que provoca un cambio de aminoácido de serina por leucina en la posición 307 de la proteína madura. Como resultado de la mutación, la proteína no se incorpora al complejo IV maduro provocando defectos en el sistema OXPHOS. En concreto, se han analizado líneas celulares que presentan 36%, 60%, 70%, 80%, 87% y 100% de mutación y su fenotipo OXPHOS se ha comparado con el de una línea celular isogénica que no presenta la mutación.

Los ensayos realizados se han basado en analizar tanto la funcionalidad de la citocromo c oxidasa (COX), como del sistema OXPHOS completo, así como en evaluar la formación y estabilización de los complejos y supercomplejos respiratorios en líneas celulares con defectos en COX, prestando especial atención a las relaciones de dependencia entre complejos.

En cuanto a los ensayos para determinar la actividad del sistema OXPHOS, hemos demostrado que en presencia de bajos niveles de mutación no se producen diferencias estadísticamente significativas respecto a la muestra control, de manera que la cantidad de proteína nativa expresada es capaz de compensar las deficiencias en función OXPHOS provocadas por la mutación. A partir del 60% de mutación todas las líneas presentan una disminución significativa respecto a la línea control en su función OXPHOS, aunque sin una pérdida total de la misma. La línea celular mutante en homoplasmia, es incapaz de respirar o de crecer en medios de cultivo en los que la función OXPHOS es indispensable.

Las proteínas codificadas en el mtDNA cumplen un papel esencial en el ensamblaje de los complejos. Por otra parte, la formación de los complejos respiratorios individuales es un requisito imprescindible para su incorporación en supercomplejos respiratorios. En este trabajo, hemos demostrado que incluso con bajos niveles de complejo IV ensamblado, es posible la formación y estabilización de supercomplejos respiratorios. En la línea celular 100% mutante no observamos la presencia del respirasoma (CI+III+IV) aunque sí que se encuentran otras estructuras supramoleculares como el supercomplejo I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>. Esto es lógico ya que al no haber complejo IV, no se va a completar la asociación multiproteica que permite llevar a cabo la respiración celular. Ante estos resultados, podemos decir que el complejo IV ensamblado en las líneas celulares con alto porcentaje de mutación (hasta 87%), es suficiente para mantener la estructura de los supercomplejos de la cadena respiratoria.

A la vista de los resultados de este TFG podemos afirmar que hay algún mecanismo de compensación en las células mutantes ya que aún con un alto porcentaje de mutación en el complejo IV, las líneas celulares podían continuar con la respiración de una manera

eficiente, permitiendo su crecimiento y desarrollo. Si bien se ha visto que en muchos aspectos no son tan eficaces como las células control, ya que sí hay diferencias en cuanto a actividad. El comportamiento de las líneas mutantes estudiadas es claramente diferente al de las mutantes 100%, las cuales no mostraban ninguna actividad, ni en respiración ni en la formación de supercomplejos que incluyan al complejo IV.

Estudios anteriores han demostrado la existencia de mecanismos de compensación dependientes de ROS que aumentan la biogénesis mitocondrial frente a fallos en el mtDNA [27]. Por ello sería conveniente realizar ensayos para estudiar si este fenómeno u otros similares ocurren también en este caso, de manera que un aumento en la biogénesis mitocondrial o en el número de copias de mtDNA, permitieran compensar el fallo debido a la mutación en el complejo IV.

Otro paso a realizar en estudios posteriores sería ampliar el rango de mutación a partir del 87% para determinar cuál es realmente el umbral a partir del cual se pierde completamente el ensamblaje del complejo IV y la actividad COX.

Además en cuanto a la detección del complejo IV por el anticuerpo anti-CO1 en los ensayos de *Western Blot*, se debería usar otro anticuerpo para comprobar si de esta manera sí se puede detectar la proteína.

## CONCLUSIONES

Una vez analizados los resultados obtenidos en los distintos ensayos realizados se puede concluir lo siguiente:

- Aún con altos porcentajes de mutación (87%) en el complejo IV, se mantiene la actividad de la citocromo c oxidasa y del sistema OXPHOS lo suficiente como para que las células sean totalmente viables.
- La asociación de supercomplejos se mantiene a lo largo de todo el rango de porcentaje de mutación en el complejo IV (hasta un 87% en este estudio), por tanto bajas cantidades de éste son suficientes para el correcto ensamblaje.
- Hay mecanismos de compensación que permiten mantener la respiración celular en condiciones suficientes para que las células puedan sobrevivir y continuar con su desarrollo.

## CONCLUSIONS

After analyzing the results of the assays we can conclude:

- Even with high percentages of mutation (87%) in the complex IV, the activity of cytochrome c oxidase and OXPHOS system is enough to permit the normal growth of the cells.
- Supercomplexes association is kept throughout the range of percentage of mutation in complex IV (up to 87% in this study), therefore low amounts of this complex are sufficient to get a correct assembly.
- There are compensatory mechanisms that allow maintaining the cellular respiration fit enough so that cell can survive and continue its development.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Cooper, G. M., & Hausman, R. E. (2007). *The Cell: A Molecular Approach*. Sinauer Associates.
- [2] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & And Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Sciencie.
- [3] Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Darnell, J. (2008). *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman.
- [4] Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2005). *Lehninger Principles of Biochemistry. Biological Membranes*. W.H. Freeman.
- [5] Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 191, 144–148.
- [6] Chance, B. and G. R. Williams (1955). A method for the localization of sites for oxidative phosphorylation. *Nature*, 176, 250-254.
- [7] Hackenbrock, C. R., Chazotte, B., & Gupte, S. S. (1986). The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 18, 331–368.
- [8] Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Peleato, M. L., Pérez-Martos, A., & Enriquez, J. A. (2008). Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes. *Molecular Cell*, 32, 529–539.
- [9] Acin-Perez, R., Enriquez, J. (2014). The function of the respiratory supercomplexes: the plasticity model. *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics* 1837, 444–450
- [10] Dudkina, N. V., Kouřil, R., Peters, K., Braun, H. P., & Boekema, E. J. (2010). Structure and function of mitochondrial supercomplexes. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*, 1797, 664–670
- [11] Schägger, H. (2002). Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1555, 154–159.
- [12] Schägger, H., & Pfeiffer, K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *The EMBO journal*, 19, 1777–1783.
- [13] Lapuente-Brun, E., Moreno-Loshuertos, R., Acín-Pérez, R., Latorre-Pellicer, A., Colás, C., Balsa, E., Enriquez, J. A. (2013). Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science (New York, N.Y.)*, 340, 1567–70.
- [14] L. Stiburek, H. Hansikova, M. Tesarova, L. Cerna, J. Zeman, Biogenesis of eukaryotic cytochrome c oxidase, *Physiol. Res.* 55 (Suppl. 2) (2006) S27–S41.
- [15] L.G. Nijtmans, J.W. Taanman, A.O. Muijsers, D. Speijer, C. Van den Bogert, Assembly of cytochrome-c oxidase in cultured human cells, *Eur. J. Biochem.* 254 (1998) 389–394.
- [16] V. Massa, E. Fernandez-Vizarra, S. Alshahwan, E. Bakhsh, P. Goffrini, I. Ferrero, P. Mereghetti, P. D'Adamo, P. Gasparini, M. Zeviani, Severe infantile encephalomyopathy caused by a mutation in COX6B1, a nucleus-encoded subunit of cytochrome
- [17] SHOUBRIDGE EA: Cytochrome c oxidase deficiency. *Am J Med Genet* **106**: 46-52, 2001a.
- [18] Perales-Clemente, E. *et al.* Five entry points of the mitochondrially encoded subunits in mammalian complex I assembly. *Mol Cell Biol* **30**, 3038-3047, doi:10.1128/MCB.00025-10 MCB.00025-10 [pii] (2010).
- [19] Acin-Perez, R. *et al.* Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria. *Mol Cell* **13**, 805-815 (2004).
- [20] Diaz, F., Enriquez, J. A. & Moraes, C. T. Cells lacking Rieske iron-sulfur protein have a reactive oxygen species-associated decrease in respiratory complexes I and IV. *Mol Cell Biol* **32**, 415-429, doi:10.1128/MCB.06051-11. MCB.06051-11 [pii] (2012).
- [21] Diaz, F., Fukui, H., Garcia, S. & Moraes, C. T. Cytochrome c oxidase is required for the assembly/stability of respiratory complex I in mouse fibroblasts. *Mol Cell Biol* **26**, 4872-4881, doi:26/13/4872 [pii]10.1128/MCB.01767-05 (2006).
- [22] Gasparre, G. *et al.* Clonal expansion of mutated mitochondrial DNA is associated with tumor formation and complex I deficiency in the benign renal oncocytoma. *Hum Mol Genet* **17**, 986-995, doi:ddm371 [pii] 10.1093/hmg/ddm371 (2008).
- [23] Kovarova, N. *et al.* Adaptation of respiratory chain biogenesis to cytochrome c oxidase deficiency caused by SURF1 gene mutations. *Biochim Biophys Acta* **1822**, 1114-1124, doi:10.1016/j.bbadis.2012.03.007 S0925-4439(12)00072-5 [pii] (2012).
- [24] Mayr, J. A. *et al.* Spectrum of combined respiratory chain defects. *J Inherit Metab Dis*, doi:10.1007/s10545-015-9831-y (2015).
- [25] Zimmermann, F. A. *et al.* Respiratory chain complex I is a mitochondrial tumor suppressor of oncocytic tumors. *Front Biosci (Elite Ed)* **3**, 315-325, doi:247 [pii] (2011).
- [26] Miyake, N. *et al.* Mitochondrial complex III deficiency caused by a homozygous UQCRC2 mutation presenting with neonatal-onset recurrent metabolic decompensation. *Hum Mutat* **34**, 446-452, doi:10.1002/humu.22257 (2013).
- [27] Raquel Moreno-Loshuertos, Gustavo Ferrín, Rebeca Acín-Pérez, M. Esther Gallardo, Carlo Viscomi, Acisclo Pérez-Martos, Massimo Zeviani, Patricio Fernández-Silva, José Antonio Enriquez. Evolution Meets Disease: Penetrance and Functional Epistasis of Mitochondrial tRNA Mutations. (2011)