

ANEXOS:

ANEXO I

Tabla 2: Composición de las disoluciones para la preparación de los geles separador (12.5%) y concentrador (5%) para electroforesis de proteínas en SDS-PAGE.

COMPONENTE	Gel separador	Gel concentrador
Acrilamida:Bisacrilamida (30:0.8; 30%)	2.084 ml	0.333 ml
Tampón 4x	1.25 ml	0.5 ml
SDS 20%	25 µl	10 µl
H ₂ O destilada	1.641 ml	1.167 ml
APS 20%	15 µl	10 µl
TEMED	5 µl	5 µl

Tabla 3: Anticuerpos usados en Western Blot.

Detección	Anticuerpos primario	Anticuerpo secundario	Marca comercial
Complejo I	Anti-NDUFB6 (1:5000)	Anti-IgG ratón (1:5000)	Mitoscience
Complejo II	Anti- Fp70 (1:5000)	Anti-IgG ratón (1:5000)	Abcam
Complejo III	Anti-Core2 (1:5000)	Anti-IgG ratón (1:5000)	Mitoscience
Complejo IV	Anti-CoI (1:5000)	Anti-IgG ratón (1:5000)	Mitoscience
Complejo IV	Anti-CoIV (1:5000)	Anti-IgG ratón (1:5000)	Mitoscience
β-actina	Anti-actina (1:5000)	Anti-IgG ratón (1:5000)	SIGMA

ANEXO II. RESULTADOS

Subcloning:

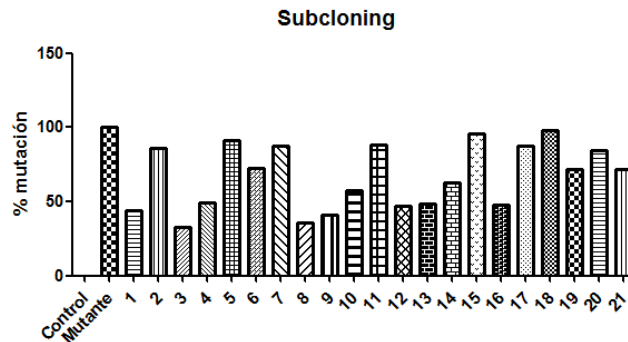


Figura 1. Cuantificación del grado de heteroplasmia en los diferentes subclones. En la gráfica se muestra el porcentaje de mutación de cada nuevo subclon, junto con la muestra control y la mutante 100%. En el eje de ordenadas está representado el % de mutación que tiene cada subclon, numerados en el eje de abscisas.

Azul de Comassie:

A partir del gel resultante del BN se realizó una tinción simple con Azul de Comassie. En ella ya se puede observar una clara diferencia entre la línea mutante 100% y las demás, ya que no aparece la banda correspondiente al complejo IV ni la banda que indica la formación de supercomplejos. A primera vista, los altos porcentajes de mutación parecen tener un patrón de bandas similar al de la línea control, es decir, hay asociación de supercomplejos.

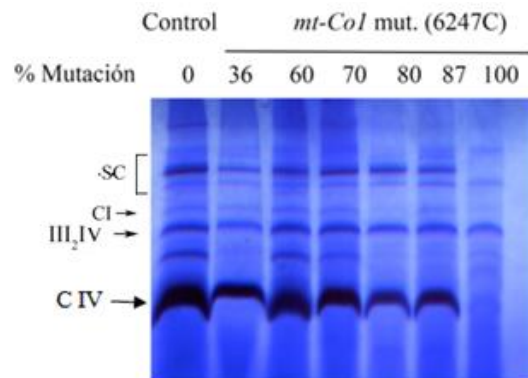


Figura 2. Resultado del gel BN teñido con Azul de Comassie. En cada carril hemos cargado las muestras proteicas procedentes de la extracción mitocondrial de cada una de nuestras líneas celulares.

ANEXO III. ESTADÍSTICAS

Tiempo de duplicación:

Fisher's PLSD for DT Gal/Glu

Effect: % mutación

Significance Level: 5 %

Row exclusion: DT.ssd

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value	
0, 036	-,217	,204	,0393	S
0, 060	-,215	,204	,0410	S
0, 070	-,089	,307	,5397	
0, 080	-,256	,204	,0184	S
0, 087	-,252	,204	,0197	S
036, 060	,002	,229	,9840	
036, 070	,128	,323	,4049	
036, 080	-,039	,229	,7184	
036, 087	-,035	,229	,7411	
060, 070	,126	,323	,4126	
060, 080	-,041	,229	,7036	
060, 087	-,038	,229	,7261	
070, 080	-,167	,323	,2828	
070, 087	-,164	,323	,2919	
080, 087	,003	,229	,9757	

Means Table for DT Gal/Glu

Effect: % mutación

Row exclusion: DT.ssd

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
0	5	1,053	,028	,012
036	3	1,269	,040	,023
060	3	1,267	,090	,052
070	1	1,141	.	.
080	3	1,308	,157	,091
087	3	1,305	,251	,145

Actividad COX:

Fisher's PLSD for COX esp (%)

Effect: % Mutación

Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value	
0, 036	-2,923	35,440	,8592	
0, 060	42,047	35,440	,0242	S
0, 071	41,865	39,623	,0402	S
0, 080	44,960	39,623	,0296	S
0, 087	55,610	39,623	,0103	S
0, 100	100,000	35,440	<.0001	S
036, 060	44,970	35,440	,0175	S
036, 071	44,788	39,623	,0301	S
036, 080	47,883	39,623	,0222	S
036, 087	58,533	39,623	,0077	S
036, 100	102,923	35,440	<.0001	S
060, 071	-,182	39,623	,9921	
060, 080	2,913	39,623	,8744	
060, 087	13,563	39,623	,4670	
060, 100	57,953	35,440	,0042	S
071, 080	3,095	43,405	,8781	
071, 087	13,745	43,405	,5003	
071, 100	58,135	39,623	,0080	S
080, 087	10,650	43,405	,5999	
080, 100	55,040	39,623	,0109	S
087, 100	44,390	39,623	,0314	S

Means Table for COX esp (%)

Effect: % Mutación

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
0	3	100,000	12,346	7,128
036	3	102,923	40,309	23,272
060	3	57,953	14,948	8,630
071	2	58,135	16,440	11,625
080	2	55,040	2,517	1,780
087	2	44,390	0,000	0,000
100	3	0,000	0,000	0,000

Respiración endógena:

Fisher's PLSD for Resp. Endógena

Effect: % Mutación

Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value	
0, 036	,206	,922	,6456	
0, 060	1,933	,922	,0003	S
0, 070	2,249	1,088	,0003	S
0, 080	1,343	,922	,0065	S
0, 087	,948	1,088	,0842	
0, 100	4,858	,922	<.0001	S
036, 060	1,726	1,155	,0054	S
036, 070	2,042	1,292	,0036	S
036, 080	1,137	1,155	,0534	
036, 087	,741	1,292	,2453	
036, 100	4,651	1,155	<.0001	S
060, 070	,316	1,292	,6155	
060, 080	-,589	1,155	,3000	
060, 087	-,985	1,292	,1274	
060, 100	2,925	1,155	<.0001	S
070, 080	-,905	1,292	,1593	
070, 087	-1,301	1,415	,0695	
070, 100	2,609	1,292	,0004	S
080, 087	-,396	1,292	,5301	
080, 100	3,514	1,155	<.0001	S
087, 100	3,910	1,292	<.0001	S

Means Table for Resp. Endógena

Effect: % Mutación

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
0	11	5,019	,768	,232
036	3	4,812	1,046	,604
060	3	3,086	,088	,051
070	2	2,770	,014	,010
080	3	3,675	,714	,412
087	2	4,071	,181	,128
100	3	,161	,152	,088

IC50:

Fisher's PLSD for IC50 azida (mM)

Effect: %mutación

Significance Level: 5 %

Row exclusion: IC50 mut CIV.ssd

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value	
0, 36	,214	,308	,1623	
0, 60	,371	,404	,0694	
0, 70	,477	,343	,0089	S
0, 80	,675	,343	,0006	S
0, 87	,821	,343	<.0001	S
36, 60	,157	,451	,4753	
36, 70	,263	,398	,1826	
36, 80	,461	,398	,0255	S
36, 87	,607	,398	,0048	S
60, 70	,106	,476	,6462	
60, 80	,304	,476	,1972	
60, 87	,450	,476	,0625	
70, 80	,198	,425	,3430	
70, 87	,344	,425	,1072	
80, 87	,146	,425	,4813	

Means Table for IC50 azida (mM)

Effect: %mutación

Row exclusion: IC50 mut CIV.ssd

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
0	10	1,271	,272	,086
36	4	1,057	,260	,130
60	2	,900	,141	,100
70	3	,794	,161	,093
80	3	,596	,306	,176
87	3	,450	,156	,090