



Universidad
Zaragoza

TESIS DOCTORAL
UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

**FARMACOGENÓMICA MITOCONDRIAL:
CÓDIGO DE BARRAS PARA LA TERAPIA
CON ANTIBIÓTICOS.**

DAVID PACHEU GRAU



Universidad
Zaragoza

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

**FARMACOGENÓMICA MITOCONDRIAL:
CÓDIGO DE BARRAS PARA LA TERAPIA CON
ANTIBIÓTICOS.**

Memoria presentada por David Pacheu Grau

Licenciado en Bioquímica

Para optar al Grado de Doctor

Dirigida por el Dr. Eduardo Ruiz Pesini

Zaragoza, Diciembre 2011

D. EDUARDO RUIZ PESINI, investigador de la fundación ARAID,

CERTIFICA:

Que la Tesis doctoral “**Farmacogenómica mitocondrial: Código de barras para la terapia con antibióticos**”, 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 reúne, a su juicio, las condiciones para optar al grado de doctor.

Zaragoza, Diciembre de 2011

Fdo: Eduardo Ruiz Pesini

Este trabajo ha sido realizado con una subvención del Centro de Investigación Biomédico en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) (INTRA07/727.1), con una ayuda del fondo de investigación sanitaria del instituto de salud Carlos III (PI 080264), con subvenciones de la Diputación General de Aragón (PI 083-08, Grupo Consolidado B33) y una ayuda de la fundación ARAID (Proyecto Jóvenes Investigadores 2010). Asimismo, el doctorando disfrutó de una beca lanzadera del CIBERER y una beca de formación de personal investigador de la DGA (B120/08).

Parte de este trabajo ha sido presentado en:

- I Reunión Anual del CIBERER. Barcelona. Noviembre 2007.
- XXXI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Bilbao. Septiembre 2008.
- French-Spanish Partnership Hubert Curien-Picasso Le Teich. Francia. Octubre 2008.
- V Encuentro de Neurociencias. Zaragoza. Diciembre 2008.
- III Reunión Anual del CIBERER. Madrid. Octubre 2009.
- 1º Meeting of the European Academy of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery (EAORL-HNS). Alemania. Noviembre 2009.
- VI Encuentro de Neurociencias. Zaragoza. Diciembre 2009.
- 49th Annual Meeting of the Society of Toxicology. Salt Lake City. 2010.
- XXXIII Congreso de la sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Córdoba. Septiembre 2010.
- IV Reunión anual del CIBERER. Madrid. Octubre 2010.
- European Meeting on Mitochondrial Pathology (EUROMIT 8). Zaragoza. Junio 2011

Y se ha publicado en:

Montoya, J., López-Gallardo, E., Herrero-Martín, M. D., Carreras, M., Martínez-Romero, I., Gómez-Durán, A., **Pacheu, D.**, Rhouda, T., López-Pérez, M. J., Ruiz-Pesini, E.
Rev Dismor Epidemiol V (7), 96-112, 2008

Montoya, J., López-Gallardo, E., Herrero-Martín, M. D., Martínez-Romero, I., Gómez-Durán, A., **Pacheu, D.**, Carreras, M., Díez-Sánchez, C., López-Pérez, M. J., Ruiz-Pesini, E.
Inherited Neuromuscular Diseases: Translation from Pathomechanisms to Therapies. Chapter 5. Eds. Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer. 2009. Vol.: 652. Pg: 47-67. ISBN: 978-90-481-2812-9

Pacheu-Grau D, Gómez-Durán A, López-Pérez MJ, Montoya J, Ruiz-Pesini E.
Drug Discovery Today. Volume 15, Numbers 1/2 Pg: 33-39. January 2010

Gómez-Durán A, **Pacheu-Grau D**, López-Gallardo E, Díez-Sánchez C, Montoya J, López-Pérez MJ, Ruiz-Pesini E.
Hum Mol Genet. 2010 Sep 1;19(17):3343-53. 21 Jun 2010

Pacheu-Grau D., Gómez-Durán A., Montoya J., Ruiz-Pesini E.
Pharmacogenomics (2010) 11(9), 1185–1187

Gómez-Durán A, **Pacheu-Grau D**, López-Pérez MJ, Montoya J, Ruiz-Pesini E
Drug Discovery Today Volume 16, Numbers 5/6 March 2011

David Pacheu-Grau, Aurora Gómez-Durán, Ester López-Gallardo, Tomàs Pinós, Antoni L. Andreu, Manuel J. López-Pérez, Julio Montoya, Eduardo Ruiz-Pesini.
Hum Mol Genet. 2011 Nov 1;20(21):4224-31.

Montoya, J., López-Gallardo, E., Herrero-Martín, M. D., Martínez-Romero, I., **Pacheu, D.**, Gómez-Durán, A., Carreras, M., Díez-Sánchez, C., López-Pérez, M. J., Ruiz-Pesini, E.
Mitochondrial Pathophysiology. Chapter 4. Eds. Transworld Research Network. 2011. Pg: 65-80. ISBN: 978-81-7895-514-8

Nota: La revista del trabajo citado en 7º lugar dedicó la portada del número a dicho artículo.

Alea iacta est
Cayo Julio Cesar

Que algo no funcione como tu esperabas no significa que sea inútil
Thomas Alva Edison

A mi familia y a Kinga

AGRADECIMIENTOS

Han pasado unos 4 años y medio desde que llegue a este laboratorio. Muchas cosas han cambiado desde entonces. Mucha gente ya no está, pero otros nuevos han llegado. También yo he cambiado en este tiempo y creo que para mejor. No solo he aprendido como científico sino que también he ganado como persona. Me gustaría agradecer aquí a todas aquellas que de alguna manera han contribuido a esto.

En primer lugar me gustaría darles las gracias a las personas que en mayor o menor medida han compartido mí tiempo en este laboratorio:

A mi director de tesis, Eduardo, más conocido como Dr.Tronchis o Dr.Tronco. Ya casi no puedo contar el número de nombres con el que me has llamado a lo largo de estos años: Golfín, Gañan, Chispis, Chispiritrin...nunca los voy a olvidar. Muchas gracias por haber confiado en mí estos años, por haber hecho de tus ideas las mías, por haberme sabido ilusionar con tus proyectos y también por enseñarme a hacer buena ciencia. Gracias por tu amistad, por haberme escuchado siempre que lo he necesitado. Espero que eso no cambie aunque ya no este en el laboratorio. Te deseo lo mejor con tus chicas, te lo mereces!

A Julio. Gracias por haberme transmitido con tus clases el deseo de conocer la ciencia más de cerca, sin eso posiblemente no me hubiera introducido en el mundo de la mitocondria. Gracias también por haberme acogido en tu grupo y haberme ayudado tanto durante estos años. Sobretudo gracias por tu amistad y tu preocupación por mí, espero que sepas que puedes contar conmigo si algún día lo necesitas.

A Manolo. Gracias por acogerme sin reservas, por haberme dado mi primer sitio en el laboratorio y por tu amabilidad. Estaría bien si pudieras pasar más a menudo por el laboratorio.

A Ester. Gracias por tener siempre tiempo para los demás, por nunca negar un minuto o los que hicieran falta cuando alguien tenía algún problema en el laboratorio. Gracias por todo lo que me has enseñado. Gracias por tu cariño, por hacerme saber aunque nunca lo necesité que tu casa podía ser la mía, gracias también a Raúl por su amistad y a mi tocayo favorito por permitirme ser un niño otra vez cada vez que venía de visita.

A Marora. Todavía me acuerdo del día que nos conocimos en la parada del autobús! Hemos formado un equipo desde entonces, compartiendo pipetas, poyata y horas intempestivas en el laboratorio. Gracias también por todo lo que me has enseñado, tu cariño, por preocuparte por mí dentro y fuera del trabajo y por no dejarme ser tan molotes. Espero que me invites a Newcastle, aunque no sea a dar una conferencia por lo menos a tomar una cerveza.

A Malenita. Otra de mis madres del laboratorio! Ya sé que aunque me hayas echado algún grito que otro, era por que aprecias mucho. Muchas gracias por todo. Animo! Sigue adelante y no te desanimes que eres una gran luchadora y seguro que dentro de poco volverás a estar trabajando! Un abrazo para Rubén, ojala que siga persiguiendo su sueño con éxito.

A Iñigo. Gañancin, o "Chapela Veloz", menos mal que no echamos ese combate de boxeo que proponía Eduardo... Te deseo lo mejor, tanto fuera como dentro del laboratorio. Nos tomamos una cerveza cuando quieras, ya pagaré yo para variar!!

A Sonia. Eres de esas personas que transmiten alegría a los demás cuando estás presente, espero que no cambies. Gracias por tu generosidad hacia los demás, por prestarme algún gel que otro y por ser siempre tan majica! Ánimo con tu tesis!!

A Belén. También te deseo lo mejor, con tu trabajo nos has enseñado un campo diferente de lo que estamos acostumbrados. Que risas nos hemos echado en las comidas de navidad!

A Janne. Aunque has tenido un paso fugaz por aquí, nos has dado un ejemplo de rigurosidad al trabajar! Cuida mucho de tu mujer y tu hijo, son un tesoro. A ver cuando volvemos a ir de cañas otra vez!

A Eldris y Laura. Nuestras recientes incorporaciones en el laboratorio! Eldris, aunque he imitado tu acento cubano un millón de veces, y he hecho 150000 bromas sobre Cuba siempre me has respondido con una sonrisa, muchas gracias y animo con tu tesis, lo harás muy bien. Laura, ahora vas a ser la representación oscense del laboratorio, no nos dejes en mal lugar. No te preocupes que estoy seguro que vas a tener una carrera científica muy brillante.

A los que ya no están. Taha, Diana y Paco Montiel, mis primeros compañeros en el laboratorio de Manolo. A Loli, espero que seas feliz con la docencia. A Carmen Diez, gracias por tu amabilidad y tener siempre tu puerta abierta a los demás. A Ruth, gracias por darnos alegría y banda sonora a las mañanas del laboratorio, espero verte pronto.

A los que vinieron de lejos, Tomas, Federica y Pía. Tomas, un placer haber colaborado contigo, espero que esto pueda continuar por muchos años. Federica, como nos costó entender aquellos papers de los orígenes de replicación, y cuantos folios gastamos haciendo esquemas de la región de control! Me gustó mucho trabajar contigo ese tiempo, te deseo mucha suerte en tu vida y de verdad espero que nos visites o te podamos visitar pronto. Pía, gracias por librarme de la “maldición de Tutankamon” (yo sé lo que me digo) y por tu alegría.

A nuestros antiguos vecinos, los GENOXPHOS. En general, gracias a todos por los ratos compartidos entre experimentos, por las comidas juntos (muy al principio), por los buenos ratos pasados en algún que otro patrón y por las preguntas, protocolos, reactivos que me habéis contestado/pasado/dejado en estos años. Gracias a Acisclo, Patricio, Toño, Pilar, Patricia, Nieves, Erika, Raquel, Ricardo, Ester Perales y Nuria. Tengo un recuerdo especial para mis compañeras de “promoción” de tesis, Ester Lapuente, Elena y Ana, que sepáis que todavía no he olvidado la jugareta de Bilbao.

A todos los compañeros de pasillo. Por las conversaciones en los pasillos, la asistencia técnica y esas comilonas tan buenas que organizabais de vez en cuando en el laboratorio de prácticas. Gracias a Ignacio, Carmen Colas, Noelia, Natalia, Juan, Cristina, Edith, Adela, Carol, Roberto, Angie, Mario, Sara, Clara...y los que seguramente se me olvidan. En especial, gracias a Ramiro, por tus ánimos continuos y recordarme que soy hijo de medico constantemente, te deseo lo mejor. A Pepin y a Tere. Gracias por tener siempre tiempo para contestar cualquier duda o intentar resolver cualquier problema. Pepin, gracias también por ficharme para la Resaca, me lo he pasado pipa jugando.

A Santi, hombre para todo. La de chorradas que te he debido preguntar en estos años y tú siempre has contestado sin réírte! Nunca ha habido problema grande para ti, muchas gracias por todo, aunque nunca sepamos realmente cuando nos estás tomando el pelo.

A todas las personas que se han encargado del trato con los pacientes. A Covadonga, Mari Luz y Laura, sin vuestro esfuerzo y dedicación parte de esta tesis doctoral no se habría podido realizar.

En segundo lugar me gustaría dar las gracias a mis amigos, que me han ayudado a desconectar de la rutina diaria y que me han aguantado estos años:

A mis amigos de toda la vida de Huesca. Juan, Jorge, Fernando, Antonio y Diego. Gracias por estos y muchos años de amistad, vosotros me conocéis tal y como soy y siempre me habéis aceptado así. Espero que sigamos siendo una piña, que sigamos viajando juntos y a pesar de que cada uno vaya haciendo su camino no perdamos nunca el contacto. Gracias también a las chicas, Tamara, Cristina, Olga y Raquel.

A mis amigos de Zaragoza. A la mayoría os he conocido en mis últimos años en la universidad pero aun así hemos compartido muchas cosas juntos (sobre todo risas). Gracias a Javi, Jorge, Miguel Ángel y Caco. Gracias a todos los colegas del equipo de voleibol, ahí va nuestro grito: CIENNNNNNCIAS!! Un saludo cariñoso también para todos los facinerosos de la Resaca.

A todos mis amigos y amigas “internacionales” que ido conociendo estos años. Gracias por acogerme como uno más, compartir conmigo buenos momentos y tener paciencia con mi alemán. Gracias a Bettina, Meike, Kasia, Philipp, Julia, Sabrina, Anika y Amy. Un recuerdo especial para Herr. Naumann y su familia, gracias por acogerme tan bien en vuestra casa, espero que te puedas recuperar pronto.

Por último, aunque no menos importante, me gustaría dar las gracias a mi familia, ya que sin ellos de verdad que no hubiera sido posible acabar esta tesis:

A mis padres. Sin vosotros no sería como soy ahora, os lo debo casi todo. Muchas gracias por la educación que me habéis dado, por hacer que me esforzara cuando no me apetecía, por hacer entender que cosas son importante y cuáles no. Por haber pensado siempre en mí, por haber puesto siempre nuestros intereses por delante de los vuestros y por haber hecho que no tuviera que preocuparme por otras cosas fuera del laboratorio. Pero sobretodo gracias por vuestro amor, gracias por quererme tal y como soy, por apoyarme y escucharme. Aunque no lo diga muy a menudo, os quiero mucho, estoy muy orgulloso de los padres que tengo y ojala vosotros también estéis orgullosos de mí.

A mi hermana Clarita. Gracias por haberme acompañado todos estos años, que sepas que estoy muy orgulloso de ti aunque no te lo diga, que lo vas a hacer fenomenal en la vida y que si alguna vez necesitas a tu hermano mayor siempre estaré allí. Te quiero mucho.

A mi abuela. Gracias por ser una segunda madre, por preocuparte siempre más por los demás que por ti misma, por ser siempre la “jefa” de la familia. Gracias por todo el

amor que me has dado estos años, siempre lo llevaré en mi corazón. A mis tíos en Zaragoza, por tener siempre su casa abierta para mí.

A Kinga. Cariño, tú has formado parte de esta tesis casi tanto como yo. Nos conocimos cuando la estaba empezando y todo el camino que he recorrido durante ella ha sido de tu mano. Tu has sido lo mejor que ha salido de ella. Muchas gracias por todo. Gracias por tu amor, que me has dado cada día, y que me ha hecho sentir tan especial. Gracias por tu apoyo, por saber entenderme, por comprender cuando no he estado en casa o cuando tenía que ir un domingo a trabajar. Gracias también por aceptarme tal y como soy. Te quiero mucho y espero que ahora emprendamos también esta nueva etapa juntos. Muchas gracias también a tus padres, Peter y Silvia por abrirme las puertas de su casa y aceptarme como a un hijo.

Para todos ellos, y para las personas de las que seguramente ahora no me acuerdo y han contribuido igualmente de alguna manera durante este tiempo: **Muchas Gracias.**

David

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ADP: Adenosin difosfato

APS: Persulfato de amonio

ATP: Adenosin trifosfato

BIAP: *Bureau International d'audiophonologie*

BSA: Albumina sérica bovina

BSN: Buffer Schafer-Nielsen

Cox: Citocromo c oxidasa

CPEO: Oftalmoplegia externa progresiva crónica

CR: Región de control

CS: Citrato sintasa

Db: Decibelios

DMEM: *Dulbecco's modified eagle medium*

DMSO: Dimetil sulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DTNB: Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

FADH₂: Dinucleótido de flavina-adenina en forma reducida

FBS: Suero fetal bovino

G418: Geneticina

GDP: Guanosín difosfato

GFM1: Factor de elongación G mitocondrial 1

GFM2: Factor de elongación G mitocondrial 2

GTP: Guanosín trifosfato

H: Pesada (hebra)

HBSS: *Hank's buffered salt solution*

Hg: Haplogrupo

IAC: Cloroformo-alcohol isoamílico

IC: Índice de conservación.

IP: Ioduro de propidio

Kb: Kilobase

Ksg: Kasugamicina

L: Ligera (hebra)

LHON: Neuropatía óptica hereditaria de Leber

MELAS: Encefalopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios de apoplejía

MERRF: Epilepsia mioclónica asociada a fibras rojas rasgadas

mRNA: RNA mensajero

MRP: Proteína del ribosoma mitocondrial

MRP-RNAasa: RNAasa de procesamiento de RNA mitocondrial

mtDNA: DNA mitocondrial

mTERF: Factor de terminación de la transcripción mitocondrial

MTIF2: Factor de iniciación de la traducción mitocondrial 2

MTIF3: Factor de iniciación de la traducción mitocondrial 3

mtRF1: Factor de liberación de la traducción mitocondrial 1

mtRPOL o POLRMT: RNA polimerasa mitocondrial

mtRRF: Factor de liberación del ribosoma mitocondrial

mt-rRNA: RNA ribosómico mitocondrial

mtSSB: Proteína de unión a DNA mitocondrial de hebra única

mt-tRNA: RNA transferente mitocondrial

NADH: Dinucleótido de nicotinamida-adenina reducido

nDNA: DNA nuclear

NPA: No pérdida de audición

OAA: Oxalacetato

O_H: Origen de replicación de la hebra pesada

O_L: Origen de replicación de la hebra ligera

OXPHOS: Fosforilación oxidativa

PA: Pérdida de audición.

PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida

Pb: Pares de bases

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PEG: Polietilenglicol

POLG: DNA polimerasa gamma

Post: Después del tratamiento

PreT: Antes del tratamiento

PTC: Centro peptidil transferasa

PVDF: Fluoruro de polivinilideno

rCRS: Secuencia de referencia de Cambridge revisada

RFLP: Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción

RNA: Ácido ribonucleico

ROS: Especies reactivas de oxígeno

Rpm: Revoluciones por minuto

rRNA: RNA ribosómico

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

SDS: Dodecilsulfato sódico

Sitio A: Sitio aminoacil del ribosoma

Sitio E: Sitio de salida del ribosoma

Sitio P: Sitio peptidil del ribosoma

SNP: Polimorfismo de nucleótido único

TBE: Tris-ácido bórico-EDTA

TE: Tris-EDTA

TEMED: N,N,N',N'-tetrametil- etano-1,2-diamina

TFAM: Factor de transcripción mitocondrial A

TFBM: Factor de transcripción mitocondrial B

TFB1M o mtTFB1: Factor de transcripción mitocondrial B1

TOP1: Topoisomerasa de tipo 1

TRMU: 5-metilaminometil-2-tiouridilato-metiltransferasa mitocondrial

tRNA: RNA transferente

TSFM: Factor de elongación mitocondrial Ts

TUFM: Factor de elongación mitocondrial

UV: Ultravioleta

ÍNDICE

CAPITULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
1. La mitocondria	2
1.1. El sistema de fosforilación oxidativa	2
1.2. Origen de la mitocondria	4
2. El DNA mitocondrial	5
3. Replicación del mtDNA	6
4. Transcripción del mtDNA	7
5. Síntesis de proteínas codificadas en el mtDNA	8
5.1. Los mitorribosomas	9
5.2. Mt-rRNAs	10
5.3. MRPs	10
5.4. Otros factores de la traducción mitocondrial	11
5.5. Mecanismo de la traducción de proteínas mitocondriales	12
6. Enfermedades mitocondriales asociadas a defectos en la síntesis de proteínas	15
6.1. Mutaciones en el nDNA	16
6.1.1. Mutaciones en proteínas ribosomales mitocondriales (MRPs)	16
6.1.2. Mutaciones en otros factores de la traducción mitocondrial	17
6.2. Mutaciones en el mtDNA	18
6.2.1. Características de la patología mitocondrial	18
6.2.2. Mutaciones en tRNAs	19
6.2.3. Mutaciones en los mt-rRNAs	20
7. Variabilidad del genoma mitocondrial	25
7.1. Fondos genéticos mitocondriales europeos	27
7.2. Posibles efectos fenotípicos de la variación genética en los mt-rRNAs	27
8. Antibióticos y rRNAs	29
9. Antibióticos y síntesis mitocondrial de proteínas	30
9.1. Antibióticos que se unen a la subunidad pequeña ribosomal	31
9.1.1. Aminoglicósidos	31
9.1.1.1. Kasugamicina	33
9.1.2. Tetraciclina	34
9.2. Antibióticos que se unen a la subunidad ribosomal grande	35
9.2.1. Macrólidos	35
9.2.2. Cloranfenicol	37
9.2.3. Oxazolidinonas	39
9.2.4. Avilamicina y evernimicina	40

10. Farmacogenómica mitocondrial	41
10.1. Líneas híbridas transmitocondriales para el estudio del efecto de los antibióticos	42
CAPITULO 2. OBJETIVOS	45
CAPITULO 3. RESULTADOS	48
1. Búsqueda de nuevas mutaciones patológicas en los mt-rRNAs	49
1.1. Criterios de selección de pacientes para búsqueda de nuevas mutaciones en los mt-rRNAs	49
1.2. Secuenciación de los genes de los mt-rRNAs en pacientes con déficit multienzimático	50
2. Búsqueda de las mutaciones patológicas clásicas en los mt-rRNAs asociadas con sordera no sindrómica	52
2.1. Criterios de selección de pacientes con sordera no sindrómica	52
2.2. Búsqueda de las mutaciones m.1555A>G y m.1494C>T en pacientes con sordera no sindrómica	53
3. Estudio de híbridos transmitocondriales con la mutación m.1555A>G	55
3.1. Secuenciación del mt-rRNA 12S para descartar otras variantes con un posible efecto	56
3.2. Estudio de la síntesis mitocondrial de proteínas	57
3.3. Estudio de la actividad específica y cantidad de complejo IV	61
4. Estudio evolutivo de la mutación patológica m.1494C>T en el mt-rRNA 12S	64
4.1. La mutación patológica m.1494C>T está fijada en <i>Cercopithecidae</i>	64
4.2. La posición m.1494 es importante para la función del 12S rRNA	67
4.3. Las líneas celulares de <i>Cercopithecidae</i> son fundamentalmente resistentes a los aminoglicósidos	68
4.4. Una sustitución Arginina >Leucina en la proteína MRPS12 podría compensar la mutación m.1494C>T en macaco	77
4.5. La variación genética en la proteína MRPS12 podría actuar como un factor modificador para explicar la penetrancia incompleta de la mutación m.1494C>T en humanos	82
5. Estudio evolutivo de la mutación patológica m.1555A>G en el mt-rRNA 12S	84

5.1. La transición m.1555A>G en orangután es una mutación antigua	84
5.2. La selección natural está actuando sobre la posición 1555	85
5.3. Mutaciones compensatorias no son la causa de la fijación de la mutación m.1555A>G en orangután	87
5.4. Elección de las líneas celulares y confirmación del origen de las especies	92
5.5. Los aminoglicósidos afectan el crecimiento de las células de orangután	94
5.6. Los aminoglicósidos afectan negativamente la función OXPHOS de orangután	96
6. Estudios del efecto de las variantes de los mt-rRNAs en pacientes con la enfermedad de Ménière	107
6.1. Estudio de la influencia de la capacidad basal OXPHOS y del haplogrupo del mtDNA en pacientes con la enfermedad de Ménière	109
6.2. Búsqueda de mutaciones y estudio de la influencia de variantes poblacionales en los mt-rRNAs en pacientes con la enfermedad de Ménière	111
6.3. Estudio de la variación genética en los genes de la proteína ribosomal S12 (MRPS12) y de la 12S rRNA metiltransferasa (TFB1M) en pacientes con la enfermedad de Ménière	114
7. Estudio de la variabilidad genética mitocondrial en sordera asociada a la edad: Presbiacusia	116
7.1. Selección de pacientes con sordera asociada a la edad	116
7.2. Demografía de la participación en el estudio sobre la sordera asociada a la edad o presbiacusia	117
7.3. Variación genética mitocondrial en la sordera asociada a la edad o presbiacusia	118
8. Estudio de la variabilidad genética mitocondrial en sordera asociada al tratamiento con cisplatino	119
8.1. Selección de pacientes con sordera asociada al tratamiento con cisplatino	120
8.2. Variación genética mitocondrial en la sordera asociada al tratamiento con cisplatino	120
9. Antibiograma mitocondrial: Código de barras para el tratamiento con antibióticos	121
9.1. Líneas celulares transmitocondriales utilizadas para el estudio del efecto de antibióticos ribosomales	122

9.2. Estudio del efecto del antibiótico linezolid sobre líneas celulares transmitocondriales	125
9.3. Estudio de la cantidad de p.MT-CO1 y SDHA en cíbridos transmitocondriales tratados con linezolid	126
9.4. Estudios de la síntesis mitocondrial de proteínas en cíbridos transmitocondriales tratados con linezolid	129
9.5. Estudio de la cantidad del complejo respiratorio IV en cíbridos transmitocondriales tratados con linezolid	136
9.6. Estudio de la actividad del complejo respiratorio IV en cíbridos transmitocondriales tratados con linezolid	137
9.7. Estudios de crecimiento competitivo en cíbridos transmitocondriales tratados con linezolid	139
9.8. Estudio de la cantidad de p.MT-CO1 y SDHA en cíbridos transmitocondriales tratados con el aminoglicósido paromomicina	141
9.9. Estudio de la cantidad de p.MT-CO1 y SDHA en 5 cíbridos transmitocondriales pertenecientes al haplogrupo mitocondrial Uk	142
9.10. Estudio de la cantidad de p.MT-CO1 y SDHA en cíbridos transmitocondriales tratados con Cloranfenicol	144
9.11. Análisis de la influencia de las variantes m.2706 y m.3010 en parámetros mitocondriales de líneas celulares tratadas con antibióticos ribosomales	146
10. Estudio de la variación en los mt-rRNAs en pacientes tratados con linezolid	150
10.1 Criterios de selección de pacientes tratados con linezolid	151
10.2 Búsqueda de mutaciones y estudio de la influencia de variantes poblacionales en los mt-rRNAs en pacientes tratados con linezolid	152
11. Uso de aminoglicósidos para el tratamiento de enfermedades mitocondriales causadas por codones de terminación prematura	154
11.1 Modelo celular para el estudio del tratamiento de enfermedades causadas por codones de terminación prematura	155
11.2. Estudio del efecto de los aminoglicósidos sobre la viabilidad en medio de cultivo sin glucosa	155
11.3. Estudio de la actividad y cantidad de la citocromo c oxidasa en presencia de aminoglicósidos	157
11.4. Estudio del efecto molecular de los aminoglicósidos sobre la subunidad p.MT-CO1	159

CAPITULO 4. DISCUSIÓN	162
1. Búsqueda de nuevas mutaciones patológicas en los mt-rRNAs	163
2. Búsqueda de las mutaciones patológicas clásicas en los mt-rRNAs asociadas con sordera no sindrómica	164
3. Estudio de híbridos transmitocondriales con la mutación m.1555A>G	165
4. Estudio evolutivo de la mutación patológica m.1494C>T en el mt-rRNA 12S	166
5. Estudio evolutivo de la mutación patológica m.1555A>G en el mt-rRNA 12S	168
6. Estudio de los mt-rRNAs en pacientes con la enfermedad de Ménière	170
7. Estudio de la variabilidad genética mitocondrial en sordera asociada a la edad: Presbiacusia	172
8. Estudio de la variabilidad genética mitocondrial en sordera asociada al tratamiento con cisplatino	173
9. Antibiograma mitocondrial: Código de barras para el tratamiento con antibióticos	174
10. Uso de aminoglicósidos para el tratamiento de enfermedades mitocondriales causadas por codones de terminación prematura	177
CAPITULO 5. CONCLUSIONES	179
CAPITULO 6. MATERIAL Y METODOS	183
1. Material y Reactivos	184
1.1. Material biológico y líneas celulares	184
1.2. Aparataje	186
1.3. Reactivos	190
2. Métodos	191
2.1. Aislamiento de DNA total	191
2.1.1. A partir de células sanguíneas	191
2.1.2. A partir de células epiteliales de bulbo piloso	193
2.1.3. A partir de cultivos celulares	194
2.2. Cuantificación de ácidos nucleicos	194
2.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	195
2.3.1. Preparación de las muestras	195
2.3.2. Proceso de amplificación	195
2.4. Digestión de productos de PCR con enzimas de restricción	198

2.5. Separación electroforética de ácidos nucleicos: geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio	199
2.6. Patrones de corte de las enzimas de restricción para la detección de polimorfismos y mutaciones puntuales en el mtDNA	200
2.7. Secuenciación de los genes de los rRNAs mitocondriales a partir de DNA total	207
2.8. Secuenciación del gen del rRNA pequeño mitocondrial de especies de primates a partir de DNA total	208
2.9. Secuenciación del gen de la proteína ribosomal mitocondrial MRPS12 a partir de DNA total	210
2.9.1. A partir de DNA total humano	210
2.9.2. A partir de DNA total de primates <i>Cercopithecidae</i>	211
2.10. Secuenciación de los 7 exones del gen de la rRNA metiltransferasa mitocondrial TFB1M a partir de DNA total	211
2.11. Secuenciación completa del DNA mitocondrial	212
2.12. Secuenciación automática	213
2.13. Detección de polimorfismos en el mtDNA mediante PCR cuantitativa a tiempo real	214
2.14. Determinación del genotipo mitocondrial	216
2.15. Cultivos celulares	217
2.15.1. Componentes y medios	217
2.15.2. Incubación con antibióticos	217
2.15.3. Siembra y cultivo celular	218
2.15.4. Congelación y descongelación de líneas celulares	218
2.15.5. Recuento celular	219
2.15.6. Análisis y tratamiento de contaminación por micoplasma	220
2.16. Generación de cíbridos transmitocondriales	221
2.16.1. Extracción y conservación de plaquetas	221
2.16.1.1. Extracción de plaquetas	221
2.16.1.2. Congelación y descongelación de plaquetas	221
2.16.2. Fusión de plaquetas con líneas rho ⁰	222
2.17. Cariotipado de líneas celulares	223
2.18. Estudios de viabilidad celular	225
2.18.1. Determinación de viabilidad celular por citometría de flujo	225
2.18.2. Determinación de viabilidad celular por espectroscopía	226
2.19. Estudios de competición celular con antibióticos	227
2.20. Preparación de extractos celulares totales	227

2.20.1. Para ensayos espectrofotométricos	227
2.20.2. Para Western blot en geles desnaturalizantes	228
2.21. Purificación de mitocondrias para análisis de complejos por <i>Blue-Native</i>	228
2.22. Determinaciones enzimáticas	229
2.22.1. Determinación de la actividad enzimática del complejo respiratorio IV	229
2.22.2. Determinación de la actividad enzimática de la citrato sintasa	230
2.22.3. Determinación de la cantidad de proteínas totales por el método de Bradford	231
2.22.4. Determinación de la actividad enzimática y cantidad del complejo respiratorio IV mediante un kit comercial	233
2.23. Determinación de la cantidad de p.MT-CO1 y la cantidad SDHA mediante un Kit comercial	233
2.24. Electrodo de oxígeno de alta resolución (Oroboros) en células intactas	235
2.25. Síntesis “in vivo” de proteínas mitocondriales marcadas con ³⁵ S-Metionina	236
2.26. Electroforesis de proteínas	237
2.26.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	237
2.26.2. Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes en gradiente de poliacrilamida	240
2.26.3. Electroforesis en geles nativos: Blue Native	242
2.27. Tinción de geles de <i>síntesis de proteínas</i> con azul de Coomassie	245
2.28. Secado de geles	245
2.29. Medida de actividades enzimáticas de los complejos respiratorios “in gel”	246
2.30. Transferencia a membranas PVDF	246
2.31. Inmunodetección de proteínas mediante Western-blot	248
2.31.1. Incubación con los anticuerpos primario y secundario	248
2.31.2. Detección de proteínas	249
2.32. Estudios bioinformáticos	249
2.32.1. Estudios de conservación interespecíficos	249
2.32.2. Identificación de secuencias	249
2.32.3. Modelado Molecular	250

2.33. Tratamientos estadísticos	250
CAPITULO 7. BIBLIOGRAFÍA	251
ANEXO	275

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. La mitocondria.

La mitocondria es un orgánulo intracelular de doble membrana, que está presente en mayor o menor número en prácticamente todos los organismos eucariotas (Cavalier-Smith 1987).

Es un elemento clave del metabolismo celular. Por un lado, es el compartimento celular responsable de la síntesis de la mayor parte del principal equivalente energético celular, el adenosín trifosfato (ATP). Por otro lado, la mitocondria está implicada en la producción de calor, en la regulación de la apoptosis, en el mantenimiento de los niveles intracelulares de calcio y en la generación de las especies reactivas de oxígeno (ROS). El calcio, los ROS y el ATP pueden activar distintas rutas metabólicas y cambiar el estado metabólico de la célula (Montoya, Lopez-Gallardo et al. 2009). En la siguiente figura (Fig.1.1) podemos observar la estructura de una mitocondria.

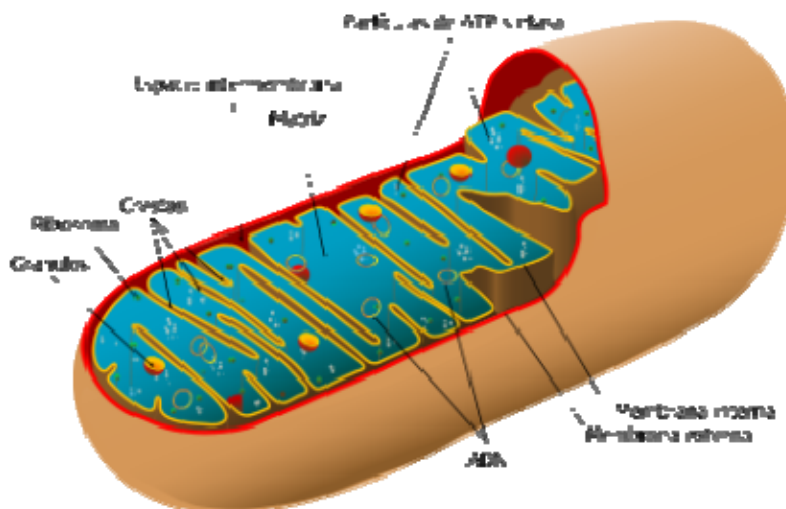


Fig.1.1. Esquema de una mitocondria. Consta de membrana externa, espacio intermembrana, membrana interna, y matriz mitocondrial.

1.1. El sistema de fosforilación oxidativa.

El encargado de la producción del ATP dentro de la mitocondria es el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS). Este sistema está localizado en la membrana interna mitocondrial y consta de 5 complejos enzimáticos

(complejos respiratorios I, II, III, IV y complejo V) y dos transportadores móviles de electrones (coenzima Q y citocromo c).

Los equivalentes de reducción (NADH y FADH_2) producidos en el metabolismo catabólico de la célula ceden sus electrones a los complejos respiratorios I y II. Estos electrones fluyen entre los distintos complejos enzimáticos, hasta llegar al oxígeno molecular, al que reducen para obtener agua como producto final. Este flujo de electrones va acompañado de un bombeo de protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana a través de los complejos respiratorios I, III y IV. El bombeo de protones genera un gradiente electroquímico. El retorno de estos protones a favor de gradiente y a través del complejo respiratorio V (ATP sintasa) produce energía en forma de ATP (Elston, Wang et al. 1998; Noji and Yoshida 2001). A continuación podemos ver (Fig.1.2) un esquema de este sistema y su funcionamiento.

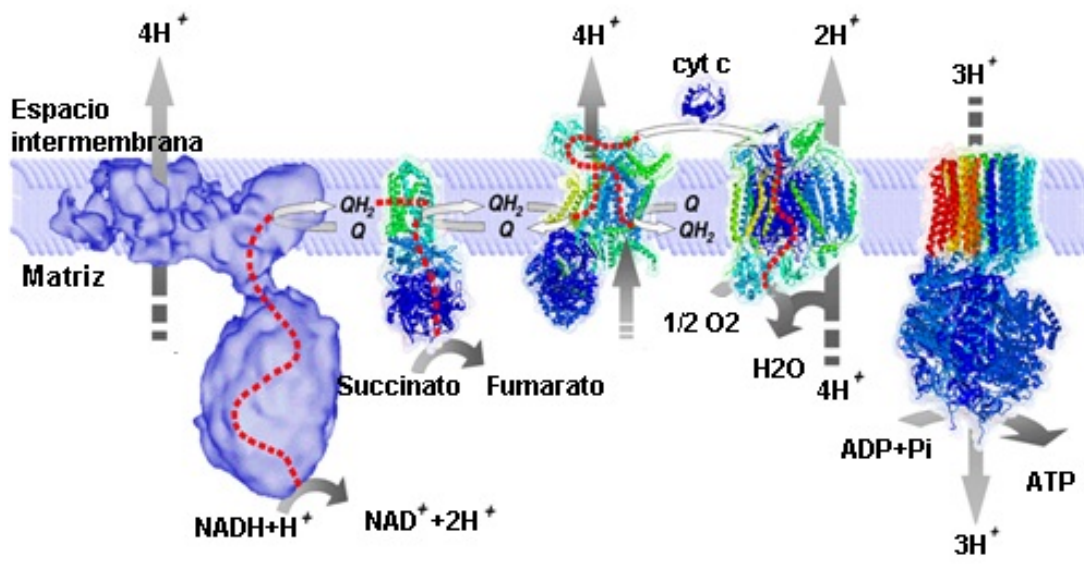


Fig.1.2. Esquema del sistema OXPHOS y de su funcionamiento.

Sin embargo, parte de la energía producida por este flujo de electrones es liberada en forma de calor y una fracción de estos electrones reacciona tempranamente con el oxígeno produciendo ROS (Fridovich 1999).

1.2. Origen de la mitocondria.

El origen de las células con núcleo y de algunos orgánulos intracelulares como las mitocondrias, ha sido durante mucho tiempo objeto de especulación y de debate. Hoy en día, la teoría de la endosimbiosis como explicación del origen de mitocondrias y otros plástidos esta ampliamente aceptada (Sagan 1967). Sin embargo, quedan todavía numerosas cuestiones por resolver, tanto en la naturaleza de esta unión, como en las características del organismo hospedador (de Duve 2007).

El organismo endosimbionte, una α -proteobacteria próxima al orden *Rickettsiaceae*, se unió con el hospedador entre hace 2,7 y 0,9 mil millones de años (Emelyanov 2001; de Duve 2007). Las visiones clásicas del origen de la mitocondria postulan que el beneficio que proporcionó el simbiote con esta relación fue una mayor eficacia en la producción de ATP, a través de la respiración. Sin embargo, otras teorías postulan que el principio selectivo que forzó la simbiosis fue la dependencia del hidrógeno molecular por parte del organismo hospedador, compuesto que el simbiote producía como producto de desecho de su metabolismo (Martin and Muller 1998).

Este origen bacteriano de la mitocondria permite explicar muchas de las características propias de este orgánulo, y que se irán detallando a lo largo de este capítulo. Por ejemplo, poseen su propio material genético, el DNA mitocondrial (mtDNA); un código genético diferente al nuclear, y su propia maquinaria de traducción. Los ribosomas mitocondriales humanos se asemejan más a los bacterianos que a los eucariotas citosólicos, a pesar de que se han sustituido parte de los RNAs bacterianos por proteínas ribosomales (O'Brien 2003).

2. El DNA mitocondrial.

Al igual que un genoma bacteriano típico, el mtDNA humano está formado por moléculas de DNA de doble hebra, circulares, cerradas y superenrolladas. Cada célula del cuerpo humano contiene cientos de mitocondrias y en cada una de ellas hay entre 2 y 10 copias de mtDNA, fenómeno conocido como poliploidía. Estas moléculas de DNA están asociadas con proteínas formando unos complejos denominados nucleoides (Garrido, Griparic et al. 2003; Legros, Malka et al. 2004).

El mtDNA humano consta de 16569 pares de bases y su secuencia se conoce completamente (Anderson, Bankier et al. 1981; Andrews, Kubacka et al. 1999). Las dos hebras que forman el mtDNA se denominan cadena pesada (H) y cadena ligera (L). Este DNA codifica la información de 37 genes: 2 RNA ribosómicos (rRNAs), 12S y 16S; 22 RNAs de transferencia (tRNAs) y 13 proteínas constituyentes de los complejos enzimáticos del sistema OXPHOS, 7 (ND1, 2, 3, 4L, 4, 5 y 6) del complejo respiratorio I; 1 (cytb) del complejo respiratorio III, 3 (CO1, 2 y 3) del complejo respiratorio IV; y 2 (ATP 6 y 8) de la ATP sintasa. La siguiente figura (**Fig.1.3**) ilustra la estructura de este genoma.

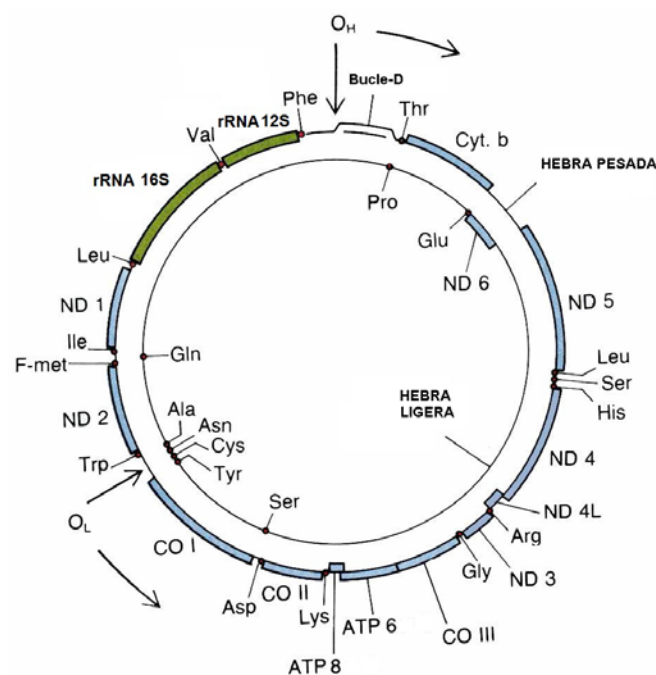


Fig.1.3. Mapa genético del mtDNA. En azul podemos ver los genes que codifican para las 13 proteínas del sistema OXPHOS. En verde los genes de los dos rRNAs (12S y 16S). En círculo rojo podemos observar los genes de los 22 tRNAs mitocondriales. O_H y O_L denotan los orígenes de replicación de la hebra pesada y ligera respectivamente.

Una característica del genoma mitocondrial humano es su organización genética extremadamente compacta. No existen en el mtDNA intrones ni regiones intergénicas. Además, existe solapamiento entre algunos genes contiguos, como es el caso de los genes *ATP6* y *ATP8*; y *ND4* y *ND4L*. Por último, la mayor parte de los genes codificantes de proteínas no tienen un codón de terminación completo, sino que este se forma con la poliadenilación del extremo 3' del RNA mensajero (mRNA) (Montoya and Attardi 1986). La única región del mtDNA que no codifica ningún gen es la llamada región de control (CR), pequeña zona de unas 1100 pb en la que se localiza el origen de replicación de la hebra pesada (O_H). Recibe este nombre, ya que a pesar de no ser codificante en ella se encuentran los promotores de la transcripción y los elementos reguladores de la expresión del mtDNA.

3. Replicación del mtDNA.

El modelo clásico de replicación del mtDNA 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. Se produce de forma continua en las dos hebras del mtDNA, a partir de dos orígenes de replicación distintos. Hay un origen para la hebra pesada (O_H), situado en la CR, próximo al bucle D (D-loop) y otro para la hebra ligera (O_L), localizado entre los genes $tRNA^{Cys}$ y $tRNA^{Asn}$ (Clayton 1982). La replicación se inicia con la síntesis de un pequeño fragmento de transcrito de la cadena L por la RNA polimerasa mitocondrial (POLRMT). A continuación, una endorribonucleasa específica, la MRP-RNasa, cortará este RNA en unos lugares específicos, originando un extremo 3' libre, que actúa como sustrato para la extensión de la nueva hebra por la DNA polimerasa gamma (DNA POLG). Para el inicio y el mantenimiento de la replicación del mtDNA es necesaria la acción de ciertas proteínas, como son el factor de transcripción mtTFA (TFAM) y la topoisomerasa de tipo 1 (TOP1), que relajan el DNA

superenrollado; la helicasa TWINKLE, que separa la doble hebra del mtDNA o la proteína de unión al DNA de hebra única (mtSSB), que previene la renaturalización de la doble cadena y acelera la síntesis de DNA.

En primer lugar se produce la replicación de la cadena H y su elongación continua hasta que tras recorrer dos tercios de la molécula, se encuentra con el O_L. En este momento comenzará la síntesis de la cadena L, también de forma unidireccional pero en el sentido contrario que la hebra H (Clayton 1982).

Recientemente, ha surgido un nuevo modelo para explicar la replicación del mtDNA. Basado en los resultados obtenidos usando técnicas de geles bidimensionales, se ha propuesto que el mtDNA se replica de un modo bidireccional y simétrico desde un único origen de replicación, a semejanza del DNA bacteriano (Bowmaker, Yang et al. 2003; Yasukawa, Yang et al. 2005). A pesar de su posible coherencia con el origen endosimbionte de la mitocondria, este modelo no es capaz de explicar la mayoría de los datos que se habían obtenido y que eran explicados por el modelo anterior.

4. Transcripción del mtDNA.

La transcripción del mtDNA se inicia a partir de 3 promotores distintos, uno para la cadena ligera (L) y dos para la cadena pesada (H₁ y H₂) (Montoya, Christianson et al. 1982). Así, se generan 3 moléculas policistrónicas largas que serán procesadas por cortes endonucleolíticos precisos justo antes y después de los tRNAs. Las enzimas de procesamiento reconocen la conformación en hoja de trébol que adoptan los tRNAs, que actúan como un *sistema de puntuación* (Ojala, Montoya et al. 1981).

Así, la cadena pesada se transcribe mediante dos unidades de transcripción solapadas en la región de los rRNA (Montoya, Gaines et al. 1983). La primera, que se transcribe muy frecuentemente, comienza en H₁ y es responsable de la síntesis de los rRNAs 12S y 16S, y de los tRNA^{Phe} y

tRNA^{Val}. El segundo proceso de transcripción, muchos menos frecuente, comienza en H₂ y genera un RNA policistrónico que, al procesarse, da lugar a 12 polipéptidos y 12 tRNAs. De la misma manera, la hebra ligera se transcribe mediante una única unidad de transcripción que comienza en L, y que da lugar a 8 tRNAs y al único mRNA que codifica dicha cadena (ND6) (Dubin, Montoya et al. 1982).

Para llevar a cabo la transcripción del mtDNA se necesita una RNA polimerasa específica (mtRPOL), dos factores de transcripción relacionados con la iniciación (TFAM y TFBM) y uno implicado en la terminación (mTERF). Todos ellos están codificados en el DNA nuclear (Fisher and Clayton 1985; Kruse, Narasimhan et al. 1989; Tiranti, Savoia et al. 1997; Falkenberg, Gaspari et al. 2002).

5. Síntesis de proteínas codificadas en el mtDNA.

Los mRNAs, tRNAs y rRNAs obtenidos en la transcripción del mtDNA, sufrirán algunas modificaciones post-transcripcionales. A los tRNAs se les añade un triplete CCA a su extremo 3', que permitirá que el aminoácido se una al tRNA, por acción de la aminoacil-tRNA sintetasa correspondiente. Mientras que los rRNAs están oligoadenilados (1-10 A), los mRNAs serán poliadenilados por una poli(A) polimerasa mitocondrial (Ojala, Montoya et al. 1981). Esta poliadenilación parece contribuir a la estabilidad del RNA (Montoya, Lopez-Perez et al. 2006).

Siguiendo la ruta de la información genética, los mRNAs ya maduros se traducirán a proteínas en los ribosomas mitocondriales (mitorribosomas). La mitocondria posee su propio código genético, diferente al nuclear. Así, en la traducción mitocondrial los codones AGA y AGG, que en el código genético universal codifican para arginina, se utilizan junto con los codones UAA y UAG para la terminación de la traducción. Además, UGA sirve como codón para triptófano en vez de determinar terminación y el codón AUA ha sido reasignado

a metionina en lugar de codificar para isoleucina (Barrell, Anderson et al. 1980). A continuación se detallaran los elementos que participan en dicho proceso y su mecanismo.

5.1. Los mitorribosomas.

Los mitorribosomas son las *nano-maquinas* que traducen el código genético a proteínas dentro de la mitocondria, ofreciendo un marco para el correcto posicionamiento del resto de los participantes de este proceso fundamental. De esta manera, posibilitan la decodificación, la sucesiva formación de enlaces peptídicos y la protección de las cadenas polipeptídicas recién sintetizadas (Yonath 2009).

Las mitocondrias humanas contienen ribosomas 55S. Están constituidos por dos subunidades de distinto tamaño: la pequeña (28S) y la grande (39S), ambas formadas por RNA y proteínas (O'Brien 1971). Los mitorribosomas se asemejan a los ribosomas bacterianos en sus funciones principales, aunque difieren de ellos y de otros tipos de ribosomas en su estructura química y sus propiedades físico-químicas. A pesar de tener una masa similar a los ribosomas bacterianos (70S), los mitorribosomas tienen la mitad de RNA y el doble de proteínas que estos (O'Brien 2003). Sin embargo, sus dimensiones son mayores que las de los ribosomas bacterianos 70S, ya que para compensar su bajo contenido en RNA han alargado e incorporado más proteínas (Sharma, Koc et al. 2003). Además, los mitorribosomas humanos han adquirido una proteína de unión a GTP intrínseca en la subunidad ribosomal pequeña, hecho sin precedentes en los sistemas de traducción (Denslow, Anders et al. 1991).

A continuación se detallaran las características de los distintos componentes de los mitorribosomas: rRNAs y proteínas ribosomales (MRPs).

5.2. Mt-rRNAs.

Los mitoribosomas son ribozimas, ya que sus funciones más importantes están catalizadas por rRNA. De esta manera, el sitio decodificante, el centro peptidil transferasa (PTC), y el túnel de salida de proteínas están formados por rRNAs (Pacheu-Grau, Gomez-Duran et al. 2010).

Dentro de la subunidad ribosomal pequeña, el rRNA presente en humanos es el 12S, que con sus 954 nt de longitud, presenta una reducción de tamaño de aproximadamente el 40%, si lo comparamos con el rRNA bacteriano de la subunidad ribosomal pequeña (16S). En la subunidad ribosomal grande de los mitoribosomas humanos encontramos el rRNA 16S, que tiene una longitud de 1558 nt y corresponde a la mitad del tamaño del bacteriano 23S. Una característica importante que comparten los mitoribosomas de animales y hongos, es que carecen de rRNA 5S, que sin embargo está presente en bacterias y plantas (O'Brien 2003; Perez-Martinez, Funes et al. 2008). Además, los rRNAs mitocondriales (mt-rRNAs) están metilados y pseudouridilados (Sirum-Connolly, Peltier et al. 1995). A pesar de que los sitios de modificación son menos numerosos que los encontrados en otros rRNAs, estos están muy conservados (Dubin, Montoya et al. 1982; Sirum-Connolly, Peltier et al. 1995). Aproximaciones genéticas en levadura han permitido identificar de forma inequívoca los enzimas modificadores de los rRNAs en mitocondria. Sin embargo, todavía falta una confirmación similar en mamíferos (Shutt and Shadel 2010). Una excepción es la N6-dimetilación de dos residuos de adenina adyacentes, localizados al final del rRNA 12S, y que en células humanas es realizada por el mtTFB1 (Seidel-Rogol, McCulloch et al. 2003; Cotney, McKay et al. 2009).

5.3. MRPs.

El endosimbionte ancestral que dio posiblemente origen a la mitocondria, tuvo un ribosoma similar al de las bacterias actuales, es decir un ribosoma 70S. Los mitoribosomas han sufrido un proceso de remodelación estructural durante

su evolución intracelular, que les ha llevado a perder RNA y a adquirir nuevas proteínas. Muchas de las MRPs humanas que tienen homólogos en bacteria tienen también homólogos en levadura, reminiscentes de su origen ancestral común. Sin embargo, en pocos casos las nuevas MRPs que no tienen homólogos bacterianos lo tienen en fungi, ya que posiblemente estas proteínas aparecieron en respuesta a distintos eventos moleculares, como la pérdida de elementos estructurales de RNA, que ocurrieron solo en el desarrollo evolutivo humano pero no en el de levaduras (O'Brien 2003). Además, muchas MRPs de mamíferos exhiben funciones extra ribosomales, relacionadas con la regulación del ciclo celular o la apoptosis (Cavdar Koc, Ranasinghe et al. 2001).

Se conoce la secuencia de aminoácidos de un total de 78 MRPs en los mitoribosomas humanos, 30 localizadas en la subunidad ribosomal pequeña y 48 localizadas en la subunidad ribosomal grande (O'Brien 2003).

Las proteínas ribosomales mitocondriales se han adaptado para sustituir las estructuras de RNA que se han perdido en los mitoribosomas de mamíferos. Además, las MRPs evolucionan más rápido que las citosólicas. Un estudio comparativo entre estas proteínas, en rata y en especies bovinas, encontró que las MRPs tienen una tasa de cambio unas 13 veces mayor a las localizadas en los ribosomas del citosol. Un análisis del ratio de sustituciones de los mt-rRNAs indicó que estos evolucionan unas 23 veces más rápido que los rRNAs citoplasmáticos (Pietromonaco, Hessler et al. 1986). El hecho que las MRPs y los mt-rRNAs tengan una tasa de cambio similar es muy interesante, teniendo en cuenta que están codificados por dos genomas que tienen una tasa mutacional de entre 3 y 10 veces diferente. Esto sugiere que, existe una restricción funcional que actúa de la misma forma en ambos tipos de moléculas dentro de los ribosomas (O'Brien 2003).

5.4. Otros factores de la traducción mitocondrial.

Además de los elementos que constituyen los ribosomas mitocondriales, y que ya han sido descritos, muchos otros factores codificados en el DNA

nuclear (nDNA) son necesarios para la iniciación, elongación y terminación de la traducción mitocondrial (Shutt and Shadel 2010).

Los factores de iniciación son proteínas conservadas requeridas para el ensamblaje de los ribosomas y la iniciación de la traducción. A diferencia de las bacterias, que requieren 3 factores de iniciación, las mitocondrias de mamíferos tienen solo dos de estos factores (MTIF2 y MTIF3) (Ma, Farwell et al. 1995).

El factor de elongación mitocondrial (TUFM) interacciona con tRNAs aminoacilados y es importante para la fidelidad de traducción (Nagao and Suzuki 2007). El factor de elongación mitocondrial Ts (TSFM) es el elemento responsable del intercambio de nucleótidos de guanina con el factor TUFM.

Las mitocondrias utilizan dos factores de elongación G homólogos, GFM1 y GFM2. GFM1 hidroliza GTP para proporcionar la energía necesaria para el paso de translocación en la elongación de proteínas. GFM2 tiene un papel vital en la disociación a través de interacciones con el factor de reciclaje del ribosoma (RRF) (Savelsbergh, Rodnina et al. 2009).

Hace más de 10 años se identificaron, por homología con sus equivalentes bacterianos, dos supuestos factores requeridos para la terminación de la traducción, el factor de liberación del ribosoma (mtRRF) y el factor de liberación de la traducción (mtRF1) (Zhang and Spemulli 1998). Se ha observado que mtRRF interacciona específicamente con GFM2 y promueve la disociación del ribosoma (Tsuboi, Morita et al. 2009). Recientemente, varios estudios han identificado un nuevo homólogo de mtRF1 (MTRF1L), y demostraron la capacidad de este nuevo factor de liberación para terminar la traducción en codones de parada UAA y UAG (Soleimanpour-Lichaei, Kuhl et al. 2007; Nozaki, Matsunaga et al. 2008).

5.5. Mecanismo de la traducción de proteínas mitocondriales.

La síntesis de proteínas se divide en tres fases: iniciación, elongación y terminación. Se desconoce el mecanismo exacto de la iniciación del proceso de

la traducción mitocondrial. Los mRNAs mitocondriales carecen de una secuencia *Shine-Dalgarno* o de una capucha con 7-metilguanilato. Por lo tanto, estas estructuras no pueden facilitar la unión del mensajero al ribosoma, ni la colocación del ribosoma en el codón de iniciación. Se piensa que la puerta de entrada del mRNA a la subunidad pequeña ribosomal ha evolucionado de tal manera que reconoce los mensajeros mitocondriales con sus secuencias 5' poco estructuradas (Sharma, Koc et al. 2003; Jones, Wilkinson et al. 2008). Todavía se desconoce la secuencia precisa de eventos durante la iniciación de la traducción mitocondrial. En el modelo actual, el factor MTIF3 cataliza la disociación del mitorribosoma y se piensa que facilita la unión del mRNA a la subunidad pequeña ribosomal, de tal forma que el codón de inicio (AUG) se posicione correctamente en el sitio peptidil (P) del ribosoma. La unión del fMet-tRNA^{Met} a la subunidad 28S requiere del factor MTIF2 y además esta favorecida por GTP. La unión de las dos subunidades del mitorribosoma probablemente estimula la liberación de MTIF3, mientras que la liberación de MTIF2 se produce gracias a la hidrólisis de GTP por parte de la subunidad 39S (Liao and Spremulli 1990; Christian and Spremulli 2009). Con esto se completa la fase de iniciación y la traducción se continúa con el proceso de elongación.

El factor de elongación TUFM forma un complejo ternario con GTP y un tRNA aminoacilado. TUFM protege al tRNA de la hidrólisis y, después de un paso de *proofreading*, lo conduce al sitio aceptor o sitio aminoacil (A). Allí tendrá lugar la decodificación del mRNA por interacciones codón-anticodón, tras la cual el mitorribosoma estimula la hidrólisis del GTP asociado al TUFM y produce la liberación de este factor, ahora asociado a GDP. La proteína de intercambio de nucleótidos, TSFM convierte el TUFM-GDP de nuevo en TUFM-GTP activo. A continuación, el extremo 3' del tRNA aminoacilado se mueve al centro peptidil transferasa, donde se cataliza la formación de enlaces peptídicos, añadiéndose un aminoácido al péptido creciente. El factor de elongación GFM1, que lleva unido una molécula de GTP, cataliza el proceso de translocación por cambios conformacionales tanto en el factor de elongación como en el mitorribosoma. Durante este proceso, los tRNAs de los sitios A y P se mueven a los sitios P y de salida (E), respectivamente. Consecuentemente

CAPITULO 1

el tRNA abandona el mitoribosoma por el sitio E y un nuevo ciclo de elongación puede comenzar (Smits, Smeitink et al. 2010).

El tercer y último paso en la síntesis de proteínas, es la terminación. Comienza cuando un codón de paro (UAA, UAG, AGA o AGG) se encuentra en el sitio A. Un factor de liberación mitocondrial, MTRF1L y posiblemente también mtRF1, reconocen el codón de terminación y causan que la proteína que se encuentra unida al último tRNA en el sitio P se libere. El enlace ester entre el polipéptido recién sintetizado y el tRNA se hidroliza en una reacción mediada por el PTC, provocada por el factor de liberación y que está catalizada por GTP. A continuación, los factores mtRRF y GFM2 interaccionan con el ribosoma y provocan su disociación (Chrzanowska-Lightowlers, Pajak et al. 2011). Sin embargo, estudios recientes han postulado que los tripletes AGA y AGG no son verdaderos codones de terminación. Estos tripletes provocan un cambio -1 del marco de lectura, generando un codón de terminación clásico que si que puede ser reconocido por los factores de liberación mitocondriales y conducir a la terminación de la traducción (Temperley, Richter et al. 2010). En la siguiente figura (**Fig.1.4**) se puede observar un esquema de todo el proceso.

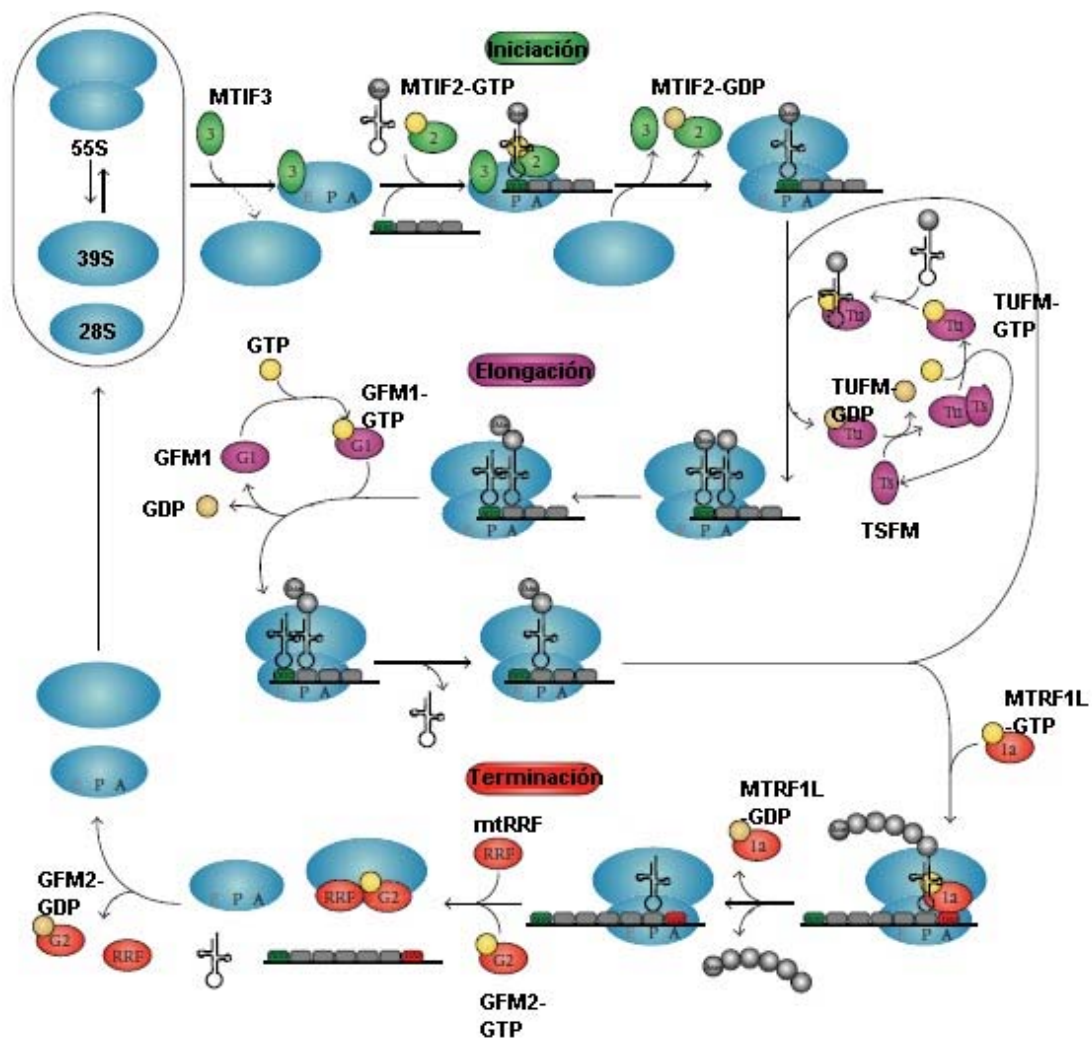


Fig.1.4. Esquema de las 3 fases del proceso de traducción mitocondrial, iniciación, elongación y terminación. (Smits, Smeitink et al. 2010).

6. Enfermedades mitocondriales asociadas a defectos en la síntesis de proteínas.

En los apartados anteriores se ha descrito el funcionamiento y los elementos que constituyen la maquinaria de traducción en la mitocondria. Dicha maquinaria necesita de la coordinación de dos genomas, el nuclear y el mitocondrial. Mutaciones en estos elementos provocarán defectos en la síntesis de proteínas en la mitocondria y conducirán al desarrollo de enfermedades mitocondriales. A continuación se describirán las mutaciones en

elementos de la traducción codificados tanto en el DNA nuclear, como en el mtDNA, que provocan enfermedades mitocondriales.

6.1. Mutaciones en el nDNA.

Se han descrito mutaciones en elementos de la maquinaria de síntesis de proteínas mitocondriales, pero codificados en el nDNA. Es el caso de mutaciones en las MRPs y mutaciones en otros factores de la traducción mitocondrial. Suelen ser causantes de síndromes muy severos y debido a esto se suelen eliminar rápidamente de las poblaciones.

6.1.1. Mutaciones en proteínas ribosomales mitocondriales (MRPs).

Las proteínas que son esenciales para la correcta función de los mitorribosomas se consideran candidatas a causar enfermedades genéticas en los seres humanos. Se espera que las consecuencias de mutaciones en las MRPs varíen entre la letalidad y una disminución moderada del metabolismo energético. Las mutaciones o la ausencia de proteínas críticas para el ensamblaje del ribosoma mitocondrial, como la proteína MRPL12, pueden ser letales debido a la ausencia de cantidades apropiadas de ribosomas funcionales. Este hecho disminuirá la cantidad de productos de la traducción mitocondrial, que no serán suficientes para mantener el metabolismo basal. Otras mutaciones que no inactiven completamente la función de la proteína tendrán un efecto moderado, con una ligera disminución de la capacidad OXPHOS y anomalías en el crecimiento y desarrollo (Sylvester, Fischel-Ghodsian et al. 2004). Además, mutaciones que afecten a isoformas de MRPs específicas de tejido darán lugar a un amplio espectro de desordenes como neuropatías, miopatías, desordenes del desarrollo o enfermedades sensoriales (Spirina, Bykhovskaya et al. 2000).

Se ha encontrado un caso de una enfermedad mitocondrial grave causada por una mutación en la proteína MRPS16. Una transición de C a T genera un codón de terminación prematura en la arginina 111, que da lugar a

una proteína truncada que carece de los últimos 26 aminoácidos. Este defecto afecta el ensamblaje de la subunidad ribosomal 28S y la estabilidad del mt-rRNA 12S, inhibiendo notablemente la traducción mitocondrial. El paciente que portaba esta mutación padecía acidosis láctica neonatal, agénesis del cuerpo calloso, malformación facial y falleció a los 3 días de edad (Miller, Saada et al. 2004). Otro ejemplo se dio en 3 pacientes nacidos de padres consanguíneos que presentaron edema de piel neonatal, hipotonía, cardiomiopatía y tubulopatía. Las actividades enzimáticas de los complejos enzimáticos OXPHOS estaban reducidos en músculo. Además, se encontró en fibroblastos de los mismos una gran reducción de los niveles del rRNA mitocondrial 12S. Técnicas de mapeo cromosómico junto con secuenciación genómica permitieron encontrar que el fenotipo de estos pacientes estaba causado por una mutación en la proteína MRPS22. Esta mutación producía el cambio de la arginina 170, altamente conservada, por una histidina (Saada, Shaag et al. 2007).

Además, los genes de muchas de estas MRPs han sido mapeados en regiones cromosómicas ya asociadas con enfermedades mitocondriales, o enfermedades con una afectación del metabolismo energético, sugiriendo que las MRPs podrían ser candidatas para causar estas enfermedades. Ejemplos de este tipo son, la ataxia cerebelar, el síndrome de Usher, ceguera, sordera, síndrome de Leigh...etc. (O'Brien, O'Brien et al. 2005).

6.1.2. Mutaciones en otros factores de la traducción mitocondrial.

Al igual que ocurre con las MRPs, se han encontrado mutaciones en otros factores de la traducción mitocondrial codificados en el nDNA, asociados a síndromes muy severos.

Un estudio de 2 hermanos con un fenotipo que incluía un fallo hepático postnatal reveló que los fibroblastos de dichos pacientes tenían una deficiencia generalizada de síntesis mitocondrial de proteínas. En este caso, se identificó por medio de transferencia de cromosomas, secuenciación y utilización de

cultivos celulares, una mutación en GFM1, uno de los genes que codifican el factor de elongación de la traducción G (Coenen, Antonicka et al. 2004). En otro estudio, el análisis genético de pacientes con defectos en la síntesis proteica mitocondrial llevo al descubrimiento de nuevas mutaciones en el gen GFM1 en uno de los bebes afectados y una mutación en el factor TUFM en otro de ellos. Ambos pacientes padecían una acidosis láctica severa y encefalopatía progresiva rápida. El paciente con el GFM1 mutado desarrolló un síndrome de Leigh temprano, mientras que el paciente con el TUFM mutado presentó una leucodistrofia infantil macrocítica severa (Valente, Tiranti et al. 2007).

6.2. Mutaciones en el mtDNA.

La mayoría de las mutaciones asociadas a deficiencias en el sistema OXPHOS y combinadas con defectos en la traducción mitocondrial se localizan en el genoma mitocondrial. Se han descrito aproximadamente unas 150 mutaciones de este tipo en tRNAs (aunque en muchas no se ha determinado todavía su patogenicidad) y unas pocas en los rRNAs (Ruiz-Pesini, Lott et al. 2007). Dado que las propiedades del genoma mitocondrial determinan que las patologías derivadas de mutaciones en dicho sistema genético tengan unas características particulares, en primer lugar se describirán este tipo de enfermedades. Seguidamente, se presentan las mutaciones más significativas de cada clase.

6.2.1. Características de la patología mitocondrial.

El mtDNA posee unas características genéticas propias, diferentes a las del genoma nuclear. Su modo de herencia es exclusivamente por vía materna (Giles, Blanc et al. 1980). El número de moléculas de mtDNA es muy elevado, la mayor parte de los tejidos poseen entre 1000 y 10000 copias por célula. En un principio todas las células de un individuo normal tienen el mismo tipo de mtDNA (homoplasmia). Sin embargo, cuando aparece una mutación, es posible que dentro de la misma célula coexistan dos poblaciones de mtDNA, una normal y otra mutada (heteroplasmia). El grado de heteroplasmia de cada

célula o tejido, que viene determinado por la segregación al azar de las copias de mtDNA de células madres a hijas, determinará su funcionamiento. Cuando una mutación se encuentre por encima de un determinado umbral, la producción de ATP de esa célula o tejido no alcanzará los niveles requeridos y se producirá la enfermedad (Montoya, Lopez-Gallardo et al. 2009). Por último, la tasa de mutación del mtDNA es mayor que la del nDNA. A lo largo de la vida de los individuos se van acumulando mutaciones somáticas en el mtDNA que podrían ser responsables de la disminución de la capacidad respiratoria de los tejidos, asociada al proceso de envejecimiento (Michikawa, Mazzucchelli et al. 1999; Larsson 2010).

Debido a estas características, las enfermedades mitocondriales son complejas. Este tipo de patologías son en general mutisistémicas, ya que muchos órganos y tejidos se ven afectados. Además, no es raro que una misma mutación de lugar a fenotipos muy diferentes o que distintas mutaciones produzcan el mismo fenotipo. En algunos casos los síntomas de la enfermedad pueden encuadrarse en síndromes bien definidos, aunque otras veces se produce un solapamiento de síntomas. Asimismo, las enfermedades mitocondriales también pueden afectar solamente a un tejido específico, como el nervio óptico en el caso de la neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON), o las células cócleares en el caso de la sordera neurosensorial no sindrómica (Montoya, Lopez-Gallardo et al. 2009).

6.2.2. Mutaciones en tRNAs.

Se han detectado mutaciones en todos los genes que codifican para tRNAs. Se espera que una mutación patológica en un tRNA produzca un defecto OXPHOS mediado por una disminución en la síntesis mitocondrial de proteínas. Los complejos específicos que mostrarán una deficiencia dependerán de cada mutación, dependiendo parcialmente del tRNA que este afectado y de los porcentajes del aminoácido correspondiente en las diferentes subunidades del sistema OXPHOS (Smits, Smeitink et al. 2010). Existen muchos efectos posibles de estas mutaciones sobre los tRNAs, como

interferencia en la maduración del extremo 3', prevención de la aminoacilación, rotura de la unión de factores de transcripción o problemas con el reconocimiento de codones (Yarham, Elson et al. 2010). Este tipo de mutaciones suele causar enfermedades muy graves y por lo tanto suelen ser eliminadas de las poblaciones por selección natural.

La primera mutación patológica heteroplásmica encontrada en un tRNA mitocondrial (mt-tRNA) fue la m.8344A>G, localizada en el mt-tRNA^{Lys}. Es una de las mutaciones más comunes en genes mitocondriales que codifican para tRNAs y se ha asociado con un fenotipo de epilepsia mioclónica y fibras rojo-rasgadas (MERRF) (Shoffner, Lott et al. 1990). Estudios celulares de esta mutación confirmaron que producía defectos en la síntesis mitocondrial de proteínas, en el consumo de oxígeno y en la actividad COX (Chomyn, Meola et al. 1991).

La mutación m.3243A>G, localizada en el mt-tRNA^{Leu (UUR)}, causa el 80% de los casos de encefalopatía mitocondrial con acidosis láctica y episodios de apoplejía (MELAS). También se ha asociado esta mutación con otros fenotipos como diabetes, pérdida de audición y oftalmoplejia crónica externa progresiva (CPEO) (van den Ouweland, Lemkes et al. 1994). Trabajos con cíbridos transmitocondriales mostraron que la mutación m.3243A>G causa defectos en la traducción mitocondrial y consecuentemente en las actividades de la cadena respiratoria (Chomyn, Martinuzzi et al. 1992; King, Koga et al. 1992).

Otro ejemplo es la mutación homoplásmica m.7445A>G, localizada en el mt-tRNA^{Ser (UCN)}. Esta mutación ha sido asociada con pérdida de audición (Hyslop, James et al. 1997). Esta mutación afecta al procesamiento del transcrito de la hebra L, reduciendo los niveles normales de productos procesados. Sin embargo, esta mutación es insuficiente por si misma para causar la enfermedad y parece actuar de manera sinérgica con la mutación m.1555A>G en el gen *MT-RNR1* (Chen, Yuan et al. 2008).

6.2.3. Mutaciones en los mt-rRNAs.

Curiosamente, a diferencia de lo que ocurre en los genes de los mt-tRNAs, existen solo unas pocas mutaciones en los rRNAs mitocondriales que se hayan asociado con patología. La mayor parte de las mutaciones se han descrito en el gen *MT-RNR1* y todas ellas se han asociado con sordera neurosensorial no sindrómica o sordera inducida por aminoglicósidos. Las dos mutaciones más comunes dentro de este gen son la m.1555A>G y la m.1494C>T (Prezant, Agapian et al. 1993; Zhao, Li et al. 2004). Estudios con líneas celulares híbridas que portaban la transición m.1555A>G mostraron una disminución en síntesis mitocondrial de proteínas, un menor consumo de oxígeno y un tiempo de doblaje más elevado que los híbridos sin la mutación (Guan, Fischel-Ghodsian et al. 2001). De la misma manera, híbridos transmitocondriales con la mutación m.1494C>T tuvieron menor consumo de oxígeno, y menor síntesis de proteínas codificadas en el mtDNA que híbridos *wild-type* (Zhao, Zhao et al. 2005).

Sin embargo, no está claro que la presencia de estas mutaciones sea suficiente para provocar la enfermedad. En primer lugar, ambas son mutaciones frecuentes. La mutación m.1555A>G es bastante común en España, debido a su adquisición en muchos casos de un ancestro materno común. Se han encontrado pedigríes con esta mutación que no estaban relacionados en las 4 generaciones anteriores, por lo que el ancestro materno común no puede ser muy reciente. Por lo tanto, esta mutación se ha podido transmitir sin problemas durante muchas generaciones (Torrioni, Cruciani et al. 1999). Algo parecido ocurre con la variante m.1494C>T. Esta transición se encontró en un individuo normal de un estudio poblacional y define un pequeño cluster del haplogrupo mitocondrial A (Wang, Kong et al. 2006). Por todo ello, es razonable pensar que estas mutaciones requieren de otros factores para que se desarrolle el fenotipo patológico.

De hecho, se ha visto que el tratamiento con aminoglicósidos desencadena la pérdida de audición en individuos con estas mutaciones

(Prezant, Agapian et al. 1993; Zhao, Li et al. 2004; Rodriguez-Ballesteros, Olarte et al. 2006; Wang, Kong et al. 2006). Esta observación se ha visto confirmada a su vez por estudios celulares. De esta manera, células HeLa con la mutación m.1555A>G mostraron una mayor susceptibilidad a la estreptomicina que las células control cuando se midió la capacidad de síntesis proteica mitocondrial (Inoue, Takai et al. 1996). Cíbridos transmitocondriales con esta misma mutación mostraron una tasa de crecimiento menor en presencia de aminoglicósidos que los cíbridos *wild-type* (Giordano, Pallotti et al. 2002). De la misma forma, estudios con líneas celulares híbridas que portaban la mutación m.1494C>T exhibieron un menor crecimiento en presencia de estos antibióticos que las líneas celulares sin la mutación (Zhao, Zhao et al. 2005). La posición equivalente a la m.1555 en el rRNA bacteriano (rRNA 16S) forma un par de bases Watson-Crick con el nucleótido equivalente al 1494, y esto es importante para la unión de los aminoglicósidos. Este par de bases no está presente en el rRNA 12S humano *wild-type*, pero la aparición de la mutación m.1555A>G o m.1494C>T lo reconstruye. De esta manera, el rRNA 12S se asemeja más al bacteriano y favorece la unión de los aminoglicósidos, produciendo efectos tóxicos (Hobbie, Akshay et al. 2008). A continuación, podemos observar la estructura secundaria del mt-rRNA 12S en humanos y en bacteria, y la localización de las mutaciones m.1494C>T y m.1555A>G en esta estructura (**Fig.1.5**).

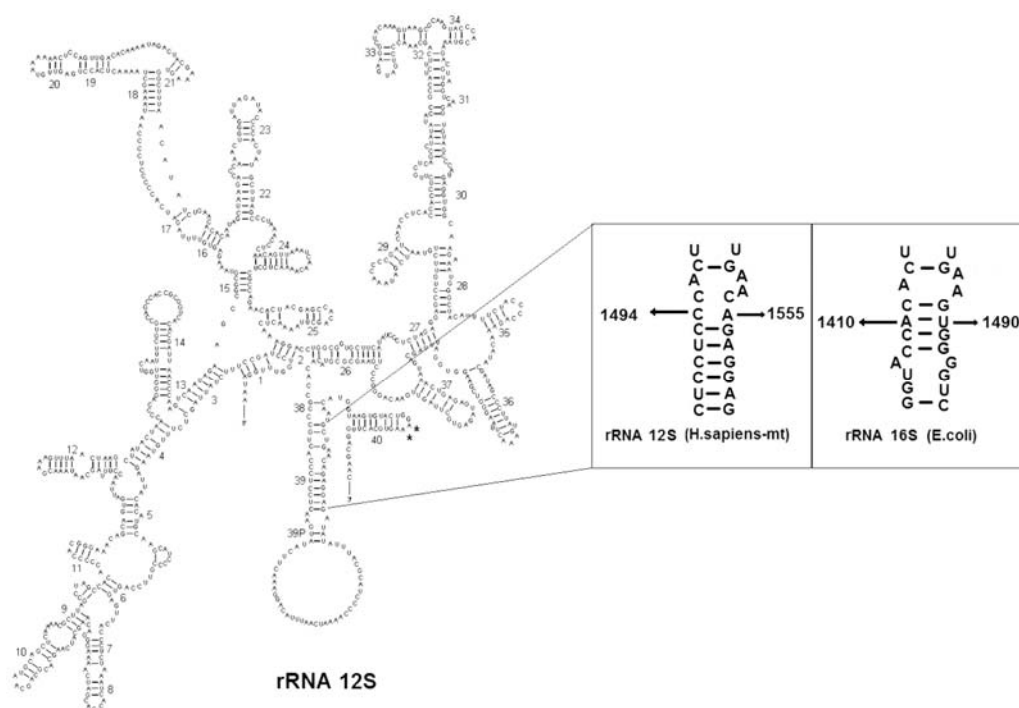


Fig.1.5. Estructura secundaria del mt-rRNA 12S. Se encuentra resaltados la estructura de parte del sitio decodificante *wild-type* en humanos, las mutaciones m.1494 y m.1555 y la composición de esta estructura en *Escherichia coli*.

Se han descrito otros factores que pueden modular el efecto de estas dos mutaciones. En primer lugar, se piensa que algunas variantes genéticas poblacionales del mtDNA (haplotipos mitocondriales) pueden modificar la penetrancia de la mutación m.1555A>G (Lu, Qian et al. 2010). Además, también se han identificado factores nucleares que son modificadores de la mutación m.1555A>G. Por ejemplo, se ha demostrado que híbridos con esta mutación exhiben una hipermetilación del rRNA 12S, posiblemente debido a una perturbación del RNA que lo hace un mejor sustrato para el mt-TFB1 (Cotney, McKay et al. 2009). Estas células mostraron un aumento aberrante en la biogénesis mitocondrial y además eran más susceptibles a la muerte celular inducida por estrés. Estos resultados sugieren que la hipermetilación podría estar causando una señal mitocondrial retrograda que hace a las células más sensibles a la apoptosis. Este escenario podría ser relevante en la naturaleza irreversible del daño en las células de la cóclea, que sufren los pacientes de sordera con la mutación m.1555A>G. Así se podría explicar que este tipo de sordera lleve implicada una pérdida de estas células por apoptosis u otros tipos de muerte celular (Shutt and Shadel 2010). Otro ejemplo de factor modificador

sería la proteína 5-metilaminoetil-2-tiouridilato-metiltransferasa (TRMU), implicada en la modificación post-transcripcional de mt-tRNAs. Estudios de genotipado permitieron identificar una mutación en dicha proteína (A10S), que estaba presente en individuos que portaban a su vez la mutación m.1555A>G y que mostraban una sordera profunda. Estudios funcionales demostraron que a pesar de que esta mutación no afectaba el importe de precursores de TRMU dentro de la mitocondria, el cambio A10S producía un gran defecto en el metabolismo de los mt-tRNAs, reduciendo sus niveles normales. Como consecuencia de estos defectos, se producía una disminución de la síntesis mitocondrial de proteínas (Guan, Yan et al. 2006).

Se han descrito otras mutaciones en el rRNA 12S, menos frecuentes y que también se han asociado principalmente con sordera neurosensorial no sindrómica e inducida por aminoglicósidos. La mutación m.1095C>T se describió por primera vez en una familia italiana con sordera, neuropatía y parkinsonismo (Thyagarajan, Bressman et al. 2000). Esta transición rompe un par de bases conservado en un tallo de la hélice 25 del rRNA (Neefs, Van de Peer et al. 1993) que resulta en un decaimiento en la traducción mitocondrial y una disminución significativa de la actividad de la citocromo c oxidasa (Thyagarajan, Bressman et al. 2000).

Otro ejemplo son varias mutaciones que se han encontrado esporádicamente en la posición m.961 del gen *MT-RNR1* en individuos y familias no relacionadas genéticamente con sordera inducida por aminoglicósidos o sordera neurosensorial no sindrómica. Esto incluye la m.961delTinsC(n), que supone la delección del nucleótido T en esa posición, combinado con un aumento variable de nucleótidos C alrededor de la posición m.961. Esta alteración se ha encontrado en pacientes caucásicos y asiáticos (Bacino, Prezant et al. 1995; Casano, Johnson et al. 1999; Li, Xing et al. 2004). También incluye la mutación m.961T>G, que se ha encontrado en pacientes caucásicos y la mutación m.961C>T que se han encontrado en individuos chinos (Li, Greinwald et al. 2004; Li, Li et al. 2005). La posición m.961 se localiza en una región entre los giros 21 y 22 del rRNA 12S que no esta

evolutivamente muy conservada. Se postula que, la alteración en la estructura terciaria y cuaternaria del mt-rRNA que provocan las mutaciones en las posiciones m.961 pueden afectar de manera indirecta la unión de los aminoglicósidos y producir un defecto en la traducción mitocondrial (Guan 2004).

Por último, se ha encontrado la transición homoplásmica m.827A>G en dos familias chinas con sordera neurosensorial no sindrómica heredada por vía materna (Xing, Chen et al. 2006; Xing, Chen et al. 2006). En una de ellas, sin embargo, la pérdida de audición solo se desarrolló tras recibir tratamiento con aminoglicósidos. Esta mutación también se había detectado previamente en varios individuos esporádicos con sordera neurosensorial no sindrómica o inducida por aminoglicósidos (Li, Greinwald et al. 2004; Li, Li et al. 2005). Este hecho, unido a que la mutación está localizada en el sitio A del rRNA 12S, muy conservado evolutivamente, apoyan la patogenicidad de esta mutación.

Sin embargo y a pesar de las evidencias encontradas tampoco está clara la patogenicidad de las mutaciones en las posiciones m.1095, m.961 y m.827, ya que se han encontrado estos cambios en individuos normales en estudios genéticos del mtDNA (Kong, Yao et al. 2003; Achilli, Rengo et al. 2004; Tanaka, Cabrera et al. 2004). Quizás solo actúen como factores de susceptibilidad en la sordera neurosensorial no sindrómica e inducida por aminoglicósidos.

7. Variabilidad del genoma mitocondrial.

Cuando una mutación causa un fenotipo muy dramático es eliminada por selección purificadora, minimizando de esta manera el impacto que esta pudiera tener sobre las aptitudes de los individuos de una población (Fan, Waymire et al. 2008). En el otro extremo, cuando una mutación no tiene ningún efecto, será el azar el que determinará si se transmitirá a las siguientes generaciones y permanecerá en esa población. En un punto intermedio entre

esos dos extremos se sitúan las mutaciones que tienen un efecto moderado sobre los individuos. Estas mutaciones incrementarán sus frecuencias en la población dependiendo de la combinación del azar y de las ventajas selectivas. Podrán ser beneficiosas en determinados ambientes pero perjudiciales en otras condiciones (Ruiz-Pesini, Mishmar et al. 2004).

Debido a su localización particular y sus características genéticas, en el mtDNA se acumulan un gran número de mutaciones (Montoya, Lopez-Gallardo et al. 2009). Prácticamente toda la secuencia del mtDNA es codificante, por lo que la mayoría de las mutaciones que se produzcan van a afectar a un gen. Cuando estas mutaciones tienen lugar en la línea germinal y sobreviven en las poblaciones se originan nuevos fondos genéticos del mtDNA. Dado que el mtDNA es transmitido exclusivamente por vía materna, los nuevos genotipos estarán relacionados directamente con sus progenitores y además serán muy similares a otros descendientes de este mtDNA progenitor. Los grupos de genotipos del mtDNA filogenéticamente relacionados se conocen como haplogrupos mitocondriales o haplogrupos del mtDNA. Las mutaciones que definen estos genotipos mitocondriales tendrán un efecto moderado en los individuos, probablemente modificando las características de sus sistemas OXPHOS (Montoya, Lopez-Gallardo et al. 2009).

El mtDNA ha sido ampliamente utilizado para estudios de genética de poblaciones y en concreto los haplogrupos mitocondriales han servido para seguir los movimientos migratorios humanos. Hoy en día está generalmente aceptado que el progenitor de todos los mtDNAs modernos se originó en África. La secuencia del mtDNA evolucionó de la misma manera que la distribución de las poblaciones humanas a lo largo de los distintos continentes. Como resultado, durante la migración de las mujeres desde África hacia el resto de los continentes se acumularon secuencialmente polimorfismos en el mtDNA. Esto dio lugar a que los haplotipos del mtDNA o haplogrupos se encuentren distribuidos de manera específica en cada continente (Wallace, Brown et al. 1999). Así, existen haplogrupos del mtDNA asiáticos, africanos, europeos y americanos.

7.1. Fondos genéticos mitocondriales europeos.

La mayoría de los tipos de mtDNA europeos consisten en un pequeño número de haplogrupos mitocondriales bien caracterizados filogenéticamente (Roostalu, Kutuev et al. 2007). Las filogenias mitocondriales europeas más importantes son HV, U y JT, que agrupan el 90% de esta población (Macaulay, Richards et al. 1999).

El haplogrupo europeo mayoritario es el H, que forma parte de la filogenia HV y representa aproximadamente el 45% de la población (Roostalu, Kutuev et al. 2007). Este linaje mitocondrial está definido entre otros polimorfismos, por el m.2706A, localizado en el gen *MT-RNR2*. Este nucleótido se encuentra en la hélice 38 del rRNA mitocondrial 16S, cerca del PTC (Pacheu-Grau, Gomez-Duran et al. 2010). A su vez, este haplogrupo se puede dividir en varios sub-haplogrupos (Achilli, Rengo et al. 2004). El más importante y que agrupa aproximadamente el 20% de la población, es el haplogrupo H1 (Pereira, Richards et al. 2005). Este linaje mitocondrial esta definido, además de por el cambio m.2706A y otras mutaciones localizadas en otros genes, por el m.3010A, que también está localizado en el gen que codifica para el mt-rRNA 16S. Esta variante reconstruye un par de bases en un pequeño tallo de la hélice 48, que se encuentra en el sitio A del ribosoma (Pacheu-Grau, Gomez-Duran et al. 2010).

La filogenia mitocondrial JT se puede dividir en los haplogrupos mitocondriales J y T. El fondo genético mitocondrial J, que supone aproximadamente el 9% de la población, consta de varios sub-haplogrupos (Carelli, Achilli et al. 2006). Una de las variantes que define al sub-haplogrupo J1 es la m.3010A, localizada en la subunidad grande del mitorribosoma.

7.2. Posibles efectos fenotípicos de la variación genética en los mt-rRNAs.

Algunos de los fondos genéticos europeos más significativos están definidos entre otras variantes por dos posiciones localizadas en el mt-rRNA 16S, la m.2706 y la m.3010. Una forma de valorar el posible efecto de estas

variantes sobre el mtDNA, y sobre la función mitocondrial de los individuos que las portan, es analizar si han sido asociadas con determinados efectos fenotípicos.

Estudios epidemiológicos han asociado al haplogrupo mitocondrial H con varios fenotipos. Entre ellos podemos encontrar una mayor probabilidad de supervivencia a procesos de infección generalizada o sepsis (Baudouin, Saunders et al. 2005). De la misma manera, también se ha descrito a esta filogenia mitocondrial como un factor de riesgo asociado a la enfermedad de Alzheimer de aparición tardía (Maruszak, Safranow et al. 2011) o como un factor de predisposición a sufrir un fallo cardíaco (Gallardo, Garcia-Pavia et al. 2011). Por otro lado, estudios relacionados con la motilidad espermática, no solo mostraron que este fondo genético era más común en poblaciones con una elevada motilidad, sino que además encontraron evidencias bioquímicas, en forma de una mayor actividad de complejo respiratorio IV, que apoyaban esta observación fenotípica (Ruiz-Pesini, Lapena et al. 2000). Por último, estudios celulares encontraron que existían diferencias entre las líneas celulares con este genotipo mitocondrial y las del haplogrupo mitocondrial Uk en parámetros como niveles de mtDNA y RNA mitocondrial (mtRNA), síntesis de proteínas mitocondriales, potencial de membrana, consumo de oxígeno o tasa de crecimiento celular (Gomez-Duran, Pacheu-Grau et al. 2010).

El haplogrupo H1, que constituye el subgrupo más frecuente dentro de la filogenia mitocondrial H (Pereira, Richards et al. 2005), ha sido particularmente asociado como factor de protección frente a la apoplejía isquémica (Rosa, Fonseca et al. 2008) y como factor de protección en la diabetes mellitus tipo 2 (Achilli, Olivieri et al. 2011). Además, posiblemente habrá contribuido a los efectos fenotípicos observados para el haplogrupo H.

Estudios epidemiológicos han encontrado una sobrerrepresentación del fondo genético mitocondrial J1 en individuos cuyos progenitores padecían diabetes tipo 2 (Mohlke, Jackson et al. 2005; Feder, Ovadia et al. 2009). Por otro lado, esta variante del mtDNA aumenta el riesgo de sufrir una pérdida de

visión cuando convive con alguna de las mutaciones m.11778G>A o m.14448T>C, ambas causantes de la neuropatía óptica hereditaria de Leber (Carelli, Achilli et al. 2006; Hudson, Carelli et al. 2007).

Debido a la existencia de numerosas asociaciones entre estos haplogrupos mitocondriales y efectos fenotípicos, parece probable que las posiciones m.2706 y m.3010 puedan tener una importancia funcional. Ambas se sitúan en el mt-rRNA 16S, próximas al PTC, corazón catalítico del mitorribosoma y que juega un papel crítico en la síntesis de proteínas (Polacek and Mankin 2005). Además, los rRNAs mitocondriales son diana para algunos antibióticos ribosomales que alteran o inhiben el proceso de la traducción (Bottger, Springer et al. 2001). Quizás estas variantes poblaciones pueden modificar la interacción con estos antibióticos y evidenciar nuevos efectos fenotípicos.

8. Antibióticos y rRNAs.

Los antibióticos representan un arsenal químico impresionante para la lucha contra los patógenos. Solo aquellos compuestos que alteren procesos celulares fundamentales, con consecuencias negativas importantes para la supervivencia del patógeno y sin efectos secundarios para los humanos, se considerarán como antibióticos potencialmente útiles (Pacheu-Grau, Gomez-Duran et al. 2010). Aproximadamente el 40 % de los antibióticos interfieren con la síntesis de proteínas y se unen a sitios funcionalmente importantes dentro del ribosoma (Bashan, Zarivach et al. 2003). La síntesis de proteínas es un proceso universal y la alta conservación de sitios funcionales en los rRNAs, que son dianas para drogas ribosomales implica limitaciones con respecto a la selectividad y a la toxicidad (Bottger, Springer et al. 2001). Sin embargo, existen pequeñas diferencias entre bacterias y eucariotas en estas posiciones, que podrían llevar a la selectividad de estas drogas (Auerbach, Bashan et al. 2004). De esta manera, un único nucleótido podría determinar la selectividad de los antibióticos que afectan a la síntesis mitocondrial de proteínas. Sin

embargo, una multitud de nucleótidos diferentes localizados en los rRNAs participan en la unión de la droga a su región diana; por eso, las sustituciones de varios nucleótidos podrían estar asociadas con la selectividad y toxicidad de la droga (Bottger, Springer et al. 2001). Como resultado, el mismo antibiótico podría unirse de diferentes maneras a bolsillos ribosomales ligeramente diferentes, y esto podría estar influenciado no solo por los sitios funcionales generalmente conservados, sino también por otros residuos periféricos del rRNA menos conservados (Tenson and Mankin 2006).

Algunas mutaciones en los rRNAs de microorganismos modifican el sitio de unión al antibiótico y producen una resistencia al mismo. Algunas de estas mutaciones de resistencia en bacterias están presentes en el rRNA humano *wild-type* y pueden influir en la selectividad del antibiótico (Andersson 2003). Además, si mutaciones en los rRNAs bacterianos pueden inducir resistencia a un antibiótico, mutaciones en los rRNAs humanos que imitan los nucleótidos *wild-type* en los rRNAs bacterianos podrían aumentar la toxicidad de los antibióticos. Este hecho podría ser responsable de los efectos secundarios que se producen tras la terapia con antibióticos. De esta manera, el conocimiento de la interacción de determinados antibióticos con los diferentes rRNAs humanos es crucial para evitar la toxicidad de los antibióticos (Pacheu-Grau, Gomez-Duran et al. 2010).

9. Antibióticos y síntesis mitocondrial de proteínas.

El tratamiento con antibióticos está basado en la toxicidad selectiva, lo que significa que solo deberían afectar al microorganismo pero no al hospedador. Sin embargo, y debido al origen bacteriano de la mitocondria, algunos antibióticos pueden afectar también la síntesis mitocondrial de proteínas y por lo tanto provocar efectos secundarios en los seres humanos. A continuación se detallan las familias de antibióticos que se unen al ribosoma, y su posible interacción con la mitocondria.

9.1. Antibióticos que se unen a la subunidad pequeña ribosomal.

9.1.1. Aminoglicósidos

Los aminoglicósidos son una familia de antibióticos que estimulan la incorporación errónea de aminoácidos durante la síntesis de proteínas (Pape, Wintermeyer et al. 2000). Por otro lado, también muestran una inhibición potente de la traslocación y un aumento de la retro-traslocación, efecto que es suficiente por si solo para explicar su actividad inhibitoria (Borovinskaya, Shoji et al. 2007). La estructura de estos antibióticos se compone de un anillo de 2-deoxiestreptamina con distintos azúcares sustituyentes dependiendo del aminoglicósido en cuestión. A esta familia pertenecen entre otros, la paromomicina, neomicina, gentamicina, kanamicina, tobramicina, amikacina y estreptomicina. Todos ellos se unen a un lazo interno de la hélice 44 de la subunidad ribosomal pequeña, que incluye el sitio decodificante (Wilson 2009). Durante la decodificación, el ribosoma monitoriza la interacción entre el codón y el anticodón para asegurar que el aminoácido que porta el tRNA del sitio A es semejante al que codifica el mRNA. Dos adeninas universalmente conservadas del rRNA bacteriano 16S (1492A y 1493A en *Escherichia coli*), que están localizadas dentro de la hélice 44 (estado "off"), se voltean e interaccionan con el complejo codón-anticodón (estado "on"). Este cambio conformacional determina la continuación de la traducción. Los aminoglicósidos estabilizan el estado "on" incluso en la ausencia del complejo entre el mRNA y el tRNA correcto, por lo que la afinidad por tRNAs incorrectos aumenta. Esto provoca que no haya una discriminación eficiente y que se sinteticen proteínas con secuencias incorrectas (Vicens and Westhof 2002; Wilson 2009). La selectividad de los aminoglicósidos depende fundamentalmente de un único nucleótido dentro del rRNA. Los citoribosomas son insensibles a los aminoglicósidos por la presencia de una G en la posición 1645 (Fan-Minogue and Bedwell 2008). La sensibilidad de los ribosomas procariotas es debido a la presencia de una A en la posición 1408 en el rRNA 16S de *E. coli*. Las bacterias se pueden volver resistentes a estos antibióticos mutando esta posición al nucleótido de eucariotas (1408A>G) (Bottger 2007).

El rRNA 12S mitocondrial humano tiene una A en la posición equivalente, la m.1492A, y es sensible a los aminoglicósidos. De esta manera, los aminoglicósidos son neurotóxicos y ototóxicos en humanos. A pesar de que la inhibición de la función renal es moderada y reversible, la ototoxicidad es irreversible (Forge and Schacht 2000; Talaska, Schacht et al. 2006). A continuación podemos observar el sitio decodificante del ribosoma mitocondrial humano y las dos adeninas altamente conservadas que participan en la decodificación (**Fig.1.6**).

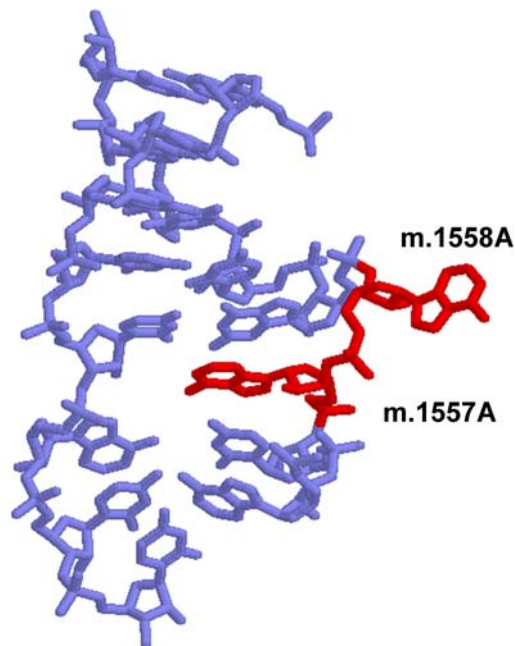


Fig.1.6. Estructura molecular de parte del sitio decodificante del mitorribosoma. Las dos adeninas señaladas (m.1557A y m.1558A) equivalen a las posiciones 1492A y 1493A en *Escherichia coli*.

Además, dos mutaciones en el mt-rRNA han sido asociadas con sordera familiar relacionada con aminoglicósidos (m.1494C>T y m.1555A>G) (Prezant, Agapian et al. 1993; Zhao, Li et al. 2004). Las posiciones equivalentes en el rRNA 16S bacteriano, que forman un par de bases Watson-Crick, son importantes para la unión del antibiótico. Las mitocondrias *wild type* carecen de este par de bases, sin embargo este se reconstruye cuando alguna de las dos mutaciones patológicas está presente. Esto aumenta la similitud con su homólogo bacteriano permitiendo la unión de los aminoglicósidos (Hobbie, Akshay et al. 2008). La siguiente figura (**Fig.1.7**) muestra la estructura química de varios aminoglicósidos.

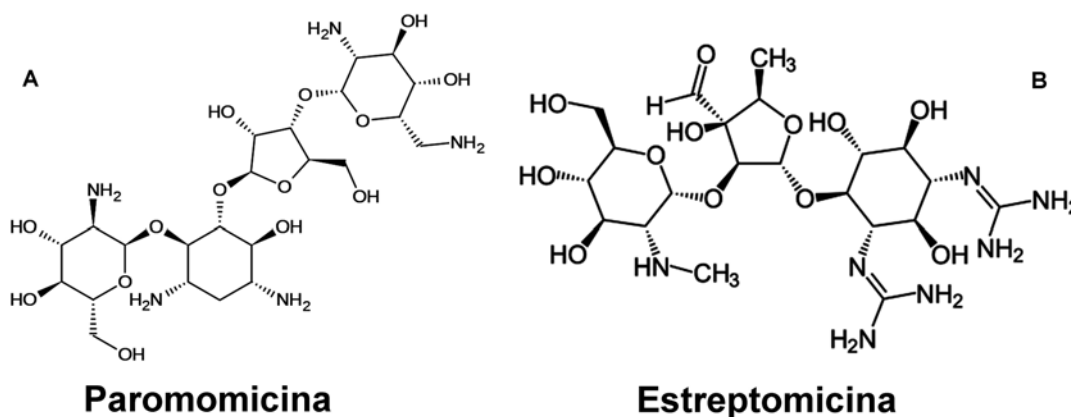


Fig.1.7. Estructura química de varios aminoglicósidos. A. Paromomicina. B. Estreptomicina.

9.1.1.1. Kasugamicina.

La Kasugamicina (Ksg) es otro antibiótico de la familia de los aminoglicósidos producido por *Streptomyces kasugiensis*, que exhibe una actividad contra muchos microorganismos pero que tiene una baja toxicidad contra humanos y plantas. El sitio de unión de la Ksg se encuentra en la hélice 44 en la subunidad pequeña ribosomal, aunque también contacta con las hélices 28 y 23 (Schluenzen, Takemoto et al. 2006; Wilson 2009). El sitio de unión de este antibiótico se muestra a continuación (**Fig.1.8**).

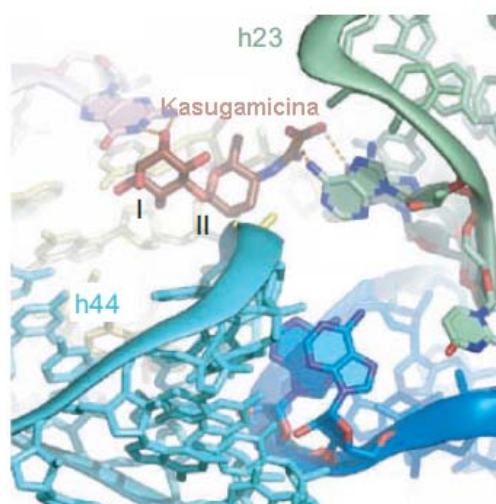


Fig.1.8. Sitio de unión de la Kasugamicina a la subunidad pequeña ribosomal. H23 y h44 denotan hélices 23 y 44 respectivamente.

Mutaciones en este sitio de unión confieren un alto nivel de resistencia a la kasugamicina. Además, la resistencia a este antibiótico se puede obtener a partir de alteraciones fuera del sitio primario de unión, ya que la alteración del

gen *ksgA* que codifica para una metiltransferasa responsable de la metilación de dos adeninas universalmente conservadas en el extremo 5' del rRNA 16S bacteriano, produce un bajo nivel de resistencia a la kasugamicina (Vila-Sanjurjo, Squires et al. 1999). En la mitocondria existe una enzima metiltransferasa equivalente, el TFB1M. Como ya se ha mencionado previamente, esta proteína puede estar implicada en la patogenicidad de la mutación m.1555A>G, localizada en el mt-rRNA 12S (Cotney, McKay et al. 2009).

9.1.2. Tetraciclinas.

Otra familia de antibióticos que se une a la subunidad pequeña ribosomal es la de las tetraciclinas. La tetraciclina es producida por *Streptomyces aureofaciens* y se ha utilizado para tratar un gran variedad de infecciones bacterianas desde su introducción en la medicina en los años 50. El sitio primario de unión de la tetraciclina está localizado en la subunidad pequeña ribosomal, donde la droga interactúa con las hélices 34 y 31 (Pioletti, Schlunzen et al. 2001). Este sitio de unión se superpone ligeramente con la estructura del anticodón de un tRNA en el sitio A, siendo esto consistente con la observación de que la tetraciclina previene la unión estable del complejo ternario formado por el aminoacil-tRNA, el TUFM y GTP al sitio A del ribosoma. De esta manera, los aminoacil-tRNAs que alcanzan el sitio decodificante, no se pueden acomodar en la subunidad grande ribosomal y desaparecen del ribosoma (Blanchard, Gonzalez et al. 2004).

Se ha visto que las tetraciclinas también actúan sobre el rRNA 12S mitocondrial, por lo que pueden provocar efectos secundarios en humanos. El tratamiento con este antibiótico produjo una inmunosupresión y además afectó la actividad de la citocromo c oxidasa en células del timo estimuladas con concavalina A y en células HepG2 (Van den Bogert, Melis et al. 1989; Nadanaciva, Willis et al. 2009). En la siguiente figura (**Fig.1.9**) podemos observar la estructura química de un antibiótico de esta familia.

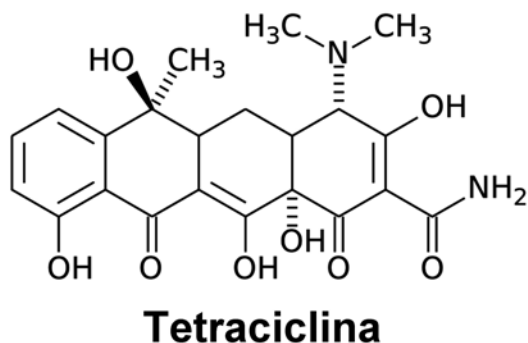


Fig.1.9. Estructura química de la tetraciclina.

9.2. Antibióticos que se unen a la subunidad ribosomal grande.

9.2.1. Macrólidos.

Los macrólidos representan una amplia gama de compuestos sintetizados por los *actinomicetos* que inhiben la síntesis proteica en eubacterias pero no en arqueobacterias o en eucariotas (Gaynor and Mankin 2003). Se unen en una posición adyacente al sitio peptidil transferasa (PTC), localizada en el túnel de salida de la subunidad ribosomal grande, por el que las cadenas polipeptídicas nacientes pasan durante la traducción. Los macrólidos usados en la práctica clínica constan de un anillo de lactona de 14, 15 o 16 miembros con amino-azúcares unidos a diversas posiciones. Entre los más comúnmente utilizados podemos encontrar la eritromicina, azitromicina, espiramicina o carbomicina. Sin embargo, a pesar de sus diferencias estructurales todos se unen de la misma manera, y la orientación del anillo de lactona y su conformación para producir interacciones con el rRNA 23S bacteriano son similares (Hansen, Ippolito et al. 2002; Wilson, Harms et al. 2005). La aparición de resistencia bacteriana a los macrólidos dio lugar al desarrollo de los ketólidos, derivados semi-sintéticos de los macrólidos, con un mayor espectro de acción. Entre los ketólidos podemos encontrar la cetromicina y la telitromicina (Hansen, Ippolito et al. 2002; Wilson 2009). La inhibición de la traducción por los macrólidos restringe la síntesis proteica a pequeños oligopéptidos que eventualmente caen del ribosoma en un proceso poco definido (Tenson, Lovmar et al. 2003). Además, el tamaño de los

oligopéptidos parece estar relacionado con el grado de oclusión del túnel de salida del ribosoma por parte de los macrólidos.

Se ha descrito que la eritromicina, un antibiótico de esta familia, aceleró una crisis bioenergética en un paciente que padecía una neuropatía óptica hereditaria de Leber. Utilizando líneas celulares derivadas de este paciente, se observó que la eritromicina inhibía la tasa de crecimiento de estas células en medio de galactosa y que la síntesis mitocondrial de proteínas estaba disminuida (Luca, Lam et al. 2004). Por otro lado, se ha visto que la resistencia a este antibiótico se puede heredar en ocasiones de forma citoplasmática (Doersen and Stanbridge 1979).

La transición m.3096T>C, localizada en el gen *MT-RNR2*, se ha encontrado una vez en un análisis de 2959 secuencias de mtDNA (Ruiz-Pesini, Lott et al. 2007). Esta transición es equivalente al cambio 2609T>C en *Escherichia coli*. Esta posición está localizada a menos de 4,4 Å de distancia de los grupos 11-OH y 12-OH del anillo de lactona de los macrólidos (Schlunzen, Zarivach et al. 2001). La mutación facilita la interacción del antibiótico con un sitio de alta afinidad (Petropoulos, Kouvela et al. 2009), disminuye la concentración inhibitoria mínima y aumenta la afinidad por la eritromicina y la azitromicina. De esta manera, se incrementa moderadamente la sensibilidad a estos antibióticos (Garza-Ramos, Xiong et al. 2001).

La estructura química de algunos de estos antibióticos se puede observar a continuación (**Fig.1.10**).

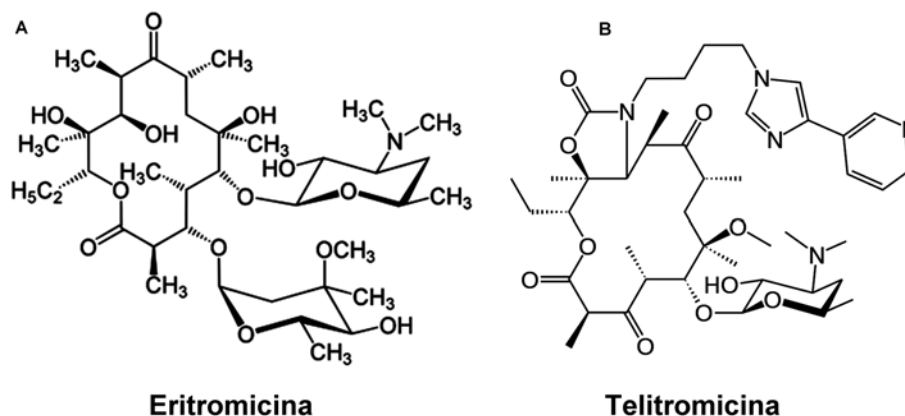


Fig.1.10. Estructura química de algunos macrólidos. A. Eritromicina. B. Telitromicina.

9.2.2. Cloranfenicol.

El Cloranfenicol se une al centro peptidil transferasa y muestra una inhibición específica de sustrato. Fue aislado originalmente a partir de *Streptomyces venezuelae* y es un antibiótico de amplio espectro, que inhibe la traducción de un amplio rango de bacterias Gram positivas y Gram negativas pero no de eucariotas (Wilson 2009). El cloranfenicol se une al sitio A del centro peptidil transferasa del ribosoma bacteriano (Schlunzen, Zarivach et al. 2001). Es un inhibidor clásico de la elongación, en el sentido que la adición de la droga bloquea a los ribosomas con el mRNA y protege al tRNA en el sitio P de la hidrólisis. Se ha visto que 7 nucleótidos altamente conservados constituyen el sitio de unión del cloranfenicol, aunque puede formar otras interacciones con otras posiciones del PTC e incluso con algunas del túnel ribosomal (Rodríguez-Fonseca, Amils et al. 1995; Schlunzen, Zarivach et al. 2001). Sin embargo, las mutaciones que confieren resistencia a este antibiótico suelen estar localizadas en el sitio de unión o próximos a él (Wilson 2009). A continuación (**Fig.1.11**) se muestra la estructura química del cloranfenicol.

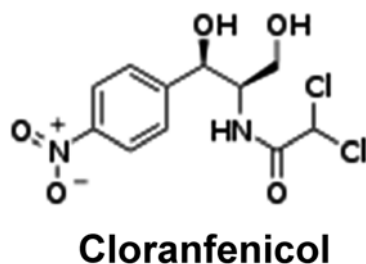


Fig.1.11. Estructura química del cloranfenicol.

El cloranfenicol inhibe el proceso de traducción en la mitocondria. Este hecho ha podido explicar la supresión celular de la medula ósea observada tras un tratamiento prolongado con este antibiótico (Yunis 1989). Además, se ha descrito que la terapia con cloranfenicol puede desencadenar una neuropatía óptica y periférica, fenotipos muy frecuentes en las patologías mitocondriales (Carelli, Ross-Cisneros et al. 2002).

La transición 2452C>T en *Escherichia coli* está implicada en la resistencia al cloranfenicol en bacterias. En humanos, las posiciones del rRNA 16S mitocondrial, m.2939 y m.2991 están implicadas en la resistencia a este antibiótico. De esta manera, líneas celulares humanas con las mutaciones m.2939C>A y m.2991T>C son resistentes al cloranfenicol (Blanc, Adams et al. 1981). A continuación se muestra la estructura del centro peptidil transferasa (PTC) y la mutación 2452C>T en *Escherichia coli* (**Fig.1.12**).

PTC

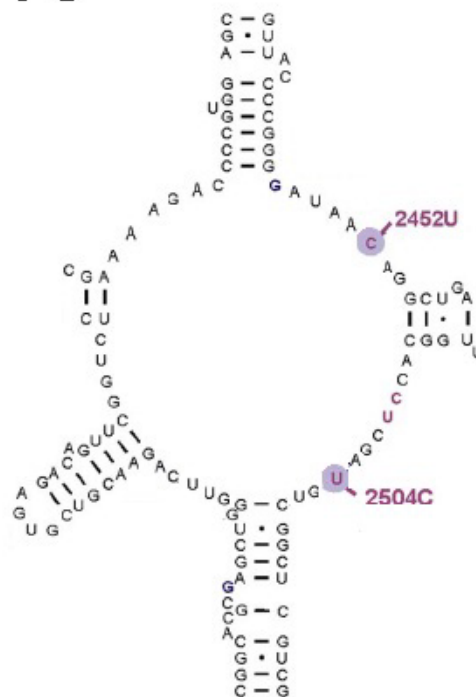


Fig.1.12. Estructura del PTC bacteriano. En morado se muestran la posición de las transiciones 2452C>T en *Escherichia coli* (m.2939C>A en humanos) y de la 2504T>C en *Escherichia coli* (m.2991T>C en humanos), implicadas en la resistencia al cloranfenicol.

9.2.3. Oxazolidinonas.

Las oxazolidinonas son un tipo de antibióticos sintéticos que actúan contra un amplio espectro de bacterias Gram positivas y anaerobias, incluyendo patógenos multiresistentes. Uno de estos antibióticos, el linezolid, fue aprobado para el tratamiento en humanos en el año 2000. Estudios cristalográficos mostraron que el linezolid se une al sitio A del PTC, en una posición que se superpone al sitio de unión del cloranfenicol (Wilson 2009). Un esquema del sitio de unión de este antibiótico se muestra en la siguiente figura (Fig.1.13).

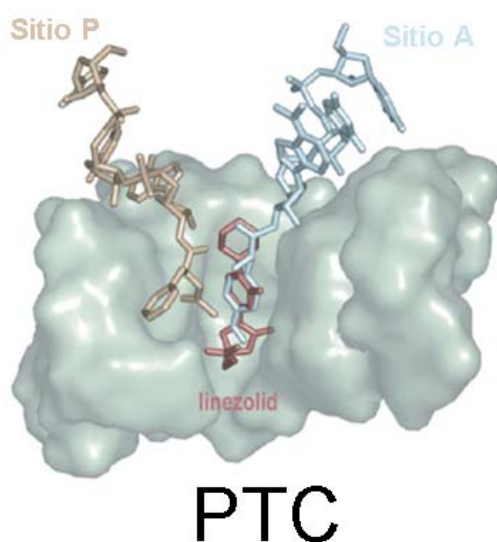


Fig.1.13. Sitio de unión del linezolid al centro peptidil transferasa, en la subunidad grande ribosomal.

A pesar de que la buena caracterización del sitio de unión de las oxazolidinonas, no se conoce con exactitud el mecanismo de acción de las mismas. Por un lado, parecen estar implicadas en la inhibición del complejo de iniciación de la traducción, al no permitir que se fusionen las subunidades ribosomales 30S y 50S (Swaney, Aoki et al. 1998). Sin embargo, parece que el linezolid también es capaz de estabilizar un estado estructural del ribosoma en el cual los tRNAs no se pueden acomodar en el sitio A y por lo tanto no se puede llevar a cabo la formación de enlaces peptídicos (Wilson, Schlutzen et al. 2008).

El linezolid ha demostrado ser un potente inhibidor de la traducción mitocondrial, en numerosos tejidos de mamíferos (McKee, Ferguson et al. 2006). Por otro lado, pacientes tratados de forma prolongada con linezolid desarrollaron acidosis láctica, un fenotipo común cuando existen defectos en el mtDNA. Además, utilizando tejidos o células humanas se pudo observar una disminución en el crecimiento celular, la masa mitocondrial, las actividades enzimáticas de los complejos respiratorios, los niveles de p.MT-CO1 y p.MT-CO2 y la síntesis de proteínas mitocondriales después de ser tratados con linezolid. Estos parámetros tendieron a volver a la normalidad cuando se retiró el antibiótico (Soriano, Miro et al. 2005; Garrabou, Soriano et al. 2007).

Se han encontrado las transiciones m.2706A>G y m.3010G>A, presentes en alta frecuencia en la población europea, en dos individuos que desarrollaron una acidosis láctica tras el tratamiento con linezolid (Palenzuela, Hahn et al. 2005; Carson, Cerda et al. 2007).

9.2.4. Avilamicina y evernimicina.

La avilamicina y la evernimicina son antibióticos oligosacáridos que muestran una gran actividad contra un amplio rango de bacterias Gram positivas, tanto *in vivo* como *in vitro*. La evernimicina se aisló a partir de *Micromonospora carbonaceae* y se ha utilizado para el tratamiento de infecciones provocadas por microorganismos multiresistentes. Sin embargo, se interrumpieron los estudios clínicos en fase III y se descubrió que este antibiótico provocaba anomalías en los genitales externos de ratas hembra y una disminución en la capacidad reproductiva (Poulet, Veneziale et al. 2005). La avilamicina es producida por *Streptomyces viridochromogenes* y es utilizado como factor de crecimiento en alimentación animal (Wilson 2009). El sitio de unión de estos antibióticos está en la base del tallo ribosomal, alejado del PTC y el túnel de salida de péptidos. De hecho, este tipo de antibióticos son los únicos que se conoce que interactúan con esta región del ribosoma. El mecanismo de acción de la evernimicina y la avilamicina previene la asociación del complejo de pre-iniciación de la traducción con la subunidad grande del

ribosoma. Esto ocurre a través de la perturbación de la interacción del factor IF2 con la subunidad ribosomal 50S, durante la unión de las dos subunidades del ribosoma (Belova, Tenson et al. 2001).

Se han descrito mutaciones en la hélice 48 del rRNA 23S que confieren resistencia a estos antibióticos (Kofoed and Vester 2002). En la hélice equivalente del mt-rRNA 16S, se localiza la variante m.3010G>A, que junto con otras variantes, define alguno de los haplogrupos mitocondriales europeos mayoritarios (Pacheu-Grau, Gomez-Duran et al. 2010). A continuación se muestra la estructura de la hélice 48, donde se localiza la variante m.3010G>A (Fig.1.14).

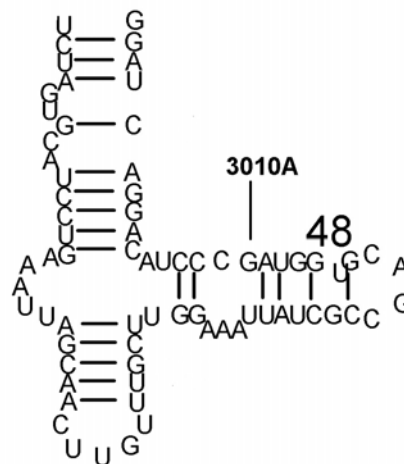


Fig.1.14. Estructura de la hélice 48 del mt-rRNA 16S, donde se encuentra el sitio de unión de la evermicina y la avilamicina. En la figura se muestra la posición de la variante m.3010G>A, muy frecuente entre la población europea.

10. Farmacogenómica mitocondrial.

Se han encontrado numerosas evidencias de los efectos secundarios que producen determinados antibióticos ribosomales sobre la función mitocondrial. Para optimizar el tratamiento con antibióticos, parece necesario tener un conocimiento profundo del fondo genético de cada paciente. Esto no solo ayudará a evitar la aparición de efectos secundarios tóxicos, sino que podría aumentar el número de antibióticos potenciales. Por lo tanto, un uso

más racional de estas drogas posiblemente reducirá la aparición de bacterias resistentes (Pacheu-Grau, Gomez-Duran et al. 2010). Además del conocimiento de las variantes genéticas de los pacientes, será importante conocer la naturaleza de las interacciones entre estas variantes y los antibióticos. Es necesario definir las herramientas adecuadas para el estudio de estas interacciones.

10.1. Líneas híbridas mitocondriales para el estudio del efecto de los antibióticos.

Idealmente, para analizar el efecto de un polimorfismo particular en los mt-rRNAs se debería utilizar un modelo de estudio en el que el resto de variables sean homogéneas. A pesar de algunas limitaciones, este modelo de estudio ya existe: son las líneas celulares mitocondriales. En este sistema, se elimina el mtDNA de una línea celular parental y las células obtenidas (denominadas rho⁰) se fusionan con citoplastos (células enucleadas) o con plaquetas (que carecen de núcleo). De esta manera se obtienen nuevas líneas celulares que se conocen como “híbridos citoplasmáticos” o simplemente “híbridos”. Usando la misma línea celular rho⁰ y diferentes fondos mitocondriales obtendremos líneas celulares que comparten el mismo fondo genético nuclear y que crecerán en las mismas condiciones ambientales. De esta forma, las únicas diferencias entre ellas serán sus genotipos mitocondriales y si existen diferencias fenotípicas, estas se deberán necesariamente a las variantes particulares del mtDNA que contengan (Pacheu-Grau, Gomez-Duran et al. 2010). El proceso de construcción de estas líneas celulares se muestra en la siguiente imagen (**Fig.1.15**).

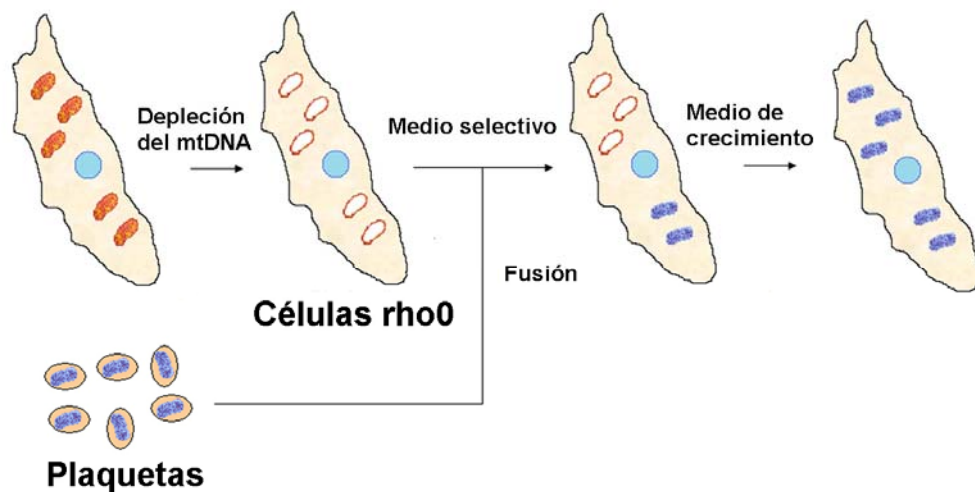


Fig.1.15. Esquema de la construcción de líneas celulares híbridas mitocondriales.

De hecho, el modelo de híbridos ha sido utilizado para demostrar la herencia de la resistencia en humanos al cloranfenicol. Esta resistencia era debida a las mutaciones m.2939C>A y m.2991T>C (Blanc, Adams et al. 1981), cuya implicación en la resistencia al cloranfenicol ya había sido demostrada en bacterias. Además, este sistema ha sido muy útil estudiando la susceptibilidad a antibióticos ribosomales, como la eritromicina (Doersen and Stanbridge 1979; Luca, Lam et al. 2004) y los aminoglicósidos (Zhao, Young et al. 2005) (Inoue, Takai et al. 1996; Guan, Fischel-Ghodsian et al. 2001; Giordano, Pallotti et al. 2002; Zhao, Young et al. 2005).

Una desventaja de este modelo de estudio deriva de su origen. Las líneas celulares parentales son células tumorales con una tasa proliferativa muy alta, que generan casi todo su ATP por glicólisis, a pesar de tener mitocondrias funcionales y abundancia de oxígeno. Estas células podrían ser resistentes a xenobióticos que disminuyan su función mitocondrial, como es el caso de los antibióticos ribosomales. Sin embargo, para incrementar la detección de efectos mitocondriales inducidos por estas drogas podemos sustituir la glucosa por galactosa en el medio de cultivo (Marroquin, Hynes et al. 2007). El metabolismo de la galactosa es muy lento en estas células y a veces no es suficiente para sintetizar el ATP requerido por glicólisis cuando el sistema

CAPITULO 1

OXPPOS se encuentra inhibido (Robinson, Petrova-Benedict et al. 1992). De esta manera, estaríamos aumentando la posibilidad de encontrar una susceptibilidad a los antibióticos ribosomales mitocondriales.

Si comparamos híbridos transmitocondriales que portan determinados genotipos del mtDNA y los crecemos en presencia de diferentes antibióticos, podemos analizar la relación entre una variante genética del mtDNA y la susceptibilidad a un antibiótico (Pacheu-Grau, Gomez-Duran et al. 2010; Pacheu-Grau, Gomez-Duran et al. 2010).

OBJETIVOS

Derivadas de la revisión bibliográfica previamente realizada, surgen varias preguntas importantes que necesitan explicación. A pesar de que se han descrito un gran número de mutaciones patológicas en elementos de la traducción mitocondrial asociados a fenotipos muy severos, ¿por qué solo se han descrito únicamente dos mutaciones patológicas en los mt-rRNAs? y ¿por qué se han asociado únicamente con sordera neurosensorial no sindrómica? Hemos comprobado que existe un gran número de antibióticos de acción ribosomal que producen una serie de efectos tóxicos debido a su acción sobre la mitocondria. Además, existen variantes genéticas poblacionales en los mt-rRNAs en posiciones cercanas a los sitios de unión de estos antibióticos que han sido asociadas con distintos fenotipos. Por lo tanto, ¿pueden ser estas variantes genéticas poblacionales en los mt-rRNAs responsables del efecto tóxico de determinados antibióticos ribosomales? ¿Pueden existir genotipos mitocondriales que sean más resistentes o susceptibles a determinados antibióticos? El objetivo principal de esta tesis doctoral es intentar encontrar una respuesta a estas preguntas. Para ello se va a analizar en profundidad la variación genética de los rRNAs mitocondriales y su posible efecto.

En primer lugar, buscaremos nuevas mutaciones patológicas en los mt-rRNAs que puedan causar fenotipos similares a los que producen mutaciones en otros elementos del sistema de traducción mitocondrial. Además, también buscaremos las dos mutaciones patológicas ya descritas y estudiaremos en profundidad sus mecanismos de patogenicidad.

Otro de nuestros objetivos es comprobar si la variación genética poblacional en los mt-rRNAs puede tener un efecto asociada con determinados antibióticos ribosomales. Por ello buscaremos una asociación de estas variantes poblacionales del mtDNA con fenotipos que puedan evidenciar algún defecto en la síntesis mitocondrial de proteínas. Esto podría mostrar que estas variantes tienen por si solas un efecto. Por otro lado, tenemos modelos de laboratorio para analizar variantes particulares del mtDNA. Por lo tanto, sería importante establecer una correlación entre los polimorfismos de los mt-rRNA

de humanos y la sensibilidad o resistencia de la síntesis proteica mitocondrial a los inhibidores de la traducción bacteriana. Tal enfoque farmacogenómico podría ayudar a optimizar el régimen de antibióticos basándose en el trasfondo genético del paciente e incrementar el elenco de antibióticos disponibles.

Por último, otro de los objetivos de esta tesis doctoral es intentar utilizar el tratamiento con aminoglicósidos, un tipo de antibióticos de acción ribosomal con claros efectos sobre la traducción mitocondrial, como tratamiento para enfermedades mitocondriales causadas por codones de terminación prematura.

RESULTADOS

1. Búsqueda de nuevas mutaciones patológicas en los mt-rRNAs.

La síntesis de proteínas mitocondriales es un proceso clave para el funcionamiento de las células eucariotas. Se ha descrito que fallos en elementos que componen este sistema de síntesis proteica, ya sea en proteínas ribosomales u otros factores, pero todos codificados en el DNA nuclear, pueden producir fenotipos similares a aquellos causados por mutaciones en los tRNAs mitocondriales (Miller, Saada et al. 2004; Valente, Tiranti et al. 2007). Los tRNAs ocupan en total una extensión de 1491 pb dentro del mtDNA y se han descrito más de 180 mutaciones patológicas en estos genes, con fenotipos muy variables. Sin embargo los rRNAs abarcan 2511 pb y solo se han encontrado dos mutaciones claramente patológicas y siempre asociadas a sordera neurosensorial no sindrómica. Debido a la función vital de los rRNAs en la síntesis mitocondrial de proteínas, quizás se debería enfocar la búsqueda de nuevas mutaciones en estos genes en otros fenotipos diferentes de la sordera no sindrómica y similares a los que se producen por mutaciones en otros elementos de la maquinaria de síntesis proteica mitocondrial (tRNAs y MRPs).

1.1. Criterios de selección de pacientes para búsqueda de nuevas mutaciones en los mt-rRNAs.

Se seleccionaron pacientes que presentaron un déficit multienzimático en aquellos complejos del sistema OXPHOS con subunidades codificadas en el mtDNA, es decir complejo I, complejo III, complejo IV, complejo V, pero no complejo II. Esta menor actividad, podría derivarse de una menor cantidad de subunidades OXPHOs, codificadas en el mtDNA y podría indicar por lo tanto un fallo en la síntesis mitocondrial de proteínas. Todos los pacientes fueron estudiados en nuestro laboratorio para depleción y delección del mtDNA, fenómenos que también podrían explicar este defecto multienzimático del sistema OXPHOS, pero resultaron negativos. A continuación, se presenta una lista de los 17 pacientes seleccionados así como sus fenotipos (**tabla 3.1**).

Paciente	Fenotipo
1468	Hipotonía, acidosis láctica, cuadro de regresión
1477	Acidosis láctica, exitus
1504	Enfermedad mitocondrial
1579	Mioglobinuria
1654	Enfermedad mitocondrial
1737	Hipotonía, hiperaminoaciduria, acidosis láctica, debilidad muscular, retraso del crecimiento
1746	Acidosis láctica, atrofia cerebelosa, epilepsia, tetraparesia espástica
1785	Cardiomiopatía, acidosis láctica, hipotonía, retraso ponderal, agénesis del cuerpo caloso
1991	Hiperecplexia, reflujo gastroesofágico, convulsiones, sepsis
2072	Hipotonía, cojera, retraso del área motora, acidosis láctica
2081	Paraparesia espástica, fallo hepático, hipoglucemia, transaminasemia, acidosis metabólica, exitus
2107	Encefalopatía epiléptica, taquicardia auricular, exitus
2189	Acidosis láctica, miocardiopatía, sepsis
2200	Degeneración de la sustancia blanca y de la mielina de los nervios periféricos
2306	Retraso psicomotor, acidosis láctica
2337	Encefalopatía severa con tetraparesia espástica con atrofia cerebral y retraso mental
2445	Encefalopatía epiléptica, atrofia cerebral progresiva

Tabla 3.1. Listado de pacientes con déficit multienzimático y sus fenotipos.

1.2. Secuenciación de los genes de los mt-rRNAs en pacientes con déficit multienzimático.

Se secuenciaron los genes del mtDNA, *MT-RNR1* y *MT-RNR2*, a partir de muestras de estos pacientes. Se compararon las secuencias obtenidas con la secuencia de referencia revisada del mtDNA (rCRS) (Andrews, Kubacka et al. 1999) y se comprobó si los cambios observados habían sido alguna vez descritos en un conjunto de más de 3000 secuencias humanas de mtDNA (Ruiz-Pesini, Lott et al. 2007). A continuación se presenta una tabla con las mutaciones encontradas en cada muestra (**tabla 3.2**).

Paciente	Variantes encontradas en los mt-rRNAs
1468	m.750A>G m.1438A>G
1477	m.750A>G m.1438A>G
1504	m.750A>G m.1438A>G m.1719G>A
1579	m.750A>G m.1438A>G
1654	m.750A>G m.1438A>G
1737	m.750A>G m.1438A>G
1746	m.750A>G m.1438A>G m.2706A>G
1785	m.750A>G m.1438A>G
1991	m.750A>G m.1438A>G m.1811A>G m.2706A>G m.2792A>G m.709G>A m.750A>G m.1438A>G m.1888G>A m.2706A>G
2072	m.2850T>C
2081	m.750A>G m.1438A>G m.3010G>A
2107	m.750A>G m.1438A>G
2189	m.750A>G m.1189T>C m.1438A>G m.1811A>G m.2706A>G
2200	m.750A>G m.1438A>G m.2706A>G
2306	m.750A>G m.769G>A m.1018G>A m.1438A>G m.2416T>C m.2706A>G m.2789C>T m.3010G>A
2337	m.709G>A m.750A>G m.930G>A m.1438A>G m.1688A>C m.1888G>A m.2706A>G
2445	m.750A>G m.1021T>G m.1438A>G m.2393C>T

Tabla 3.2. Listado de mutaciones encontradas por secuenciación de los mt-rRNAs en los pacientes con déficit multienzimático. En rojo se indican las mutaciones no descritas previamente.

La mayor parte de las mutaciones encontradas en estos pacientes habían sido previamente descritas y se consideran polimorfismos poblacionales (varían entre las poblaciones). Entre las más frecuentes, se hallaron los cambios m.750A>G, m.1438A>G y m.2706A>G. Las variantes m.750A y m.1438A, ambas localizadas dentro del gen *MT-RNR1*, se consideran polimorfismos raros de la secuencia de referencia del mtDNA, por lo que los cambios m.750A>G y m.1438A>G son muy frecuentes en la población. El cambio m.2706A>G, localizado en el gen *MT-RNR2*, define el haplogrupo mitocondrial H, el más frecuente dentro de la población caucásica (Roostalu, Kutuev et al. 2007). Sin embargo, se encontraron 3 mutaciones que no habían sido previamente halladas en este conjunto de más de 3000 secuencias y que

además no habían sido descritas como patológicas. Son los cambios m.1021T>G localizado en el gen *MT-RNR1* y los cambios m.1688A>C y m.2393C>T localizados en el gen *MT-RNR2*. Los 3 cambios se encontraron en homoplasmia, es decir que todas las copias del mtDNA de cada paciente portaban estas variantes. Una posible medida de la importancia funcional de estas posiciones es el índice de conservación (IC) entre especies, dado que generalmente posiciones con relevancia funcional, se encuentran conservadas a lo largo de la evolución. Con el estudio del IC de estas posiciones en más de 300 especies de mamíferos pudimos observar que el grado de conservación de las posiciones m.1021T y m.1688A era bajo (48% y 37% respectivamente), comparado con la conservación media del gen *MT-RNR1*, que medida como el IC promedio entre las posiciones situadas cada 50 nucleótidos, tiene un valor del 71% (Pacheu-Grau, Gomez-Duran et al. 2011). El índice de conservación de la posición m.2393C no se pudo calcular, ya que en muchas especies no se alineaba ningún nucleótido en esta posición.

2. Búsqueda de las mutaciones patológicas clásicas en los mt-rRNAs asociadas con sordera no sindrómica.

Se estudiaron las dos mutaciones definidas como patológicas en los mt-rRNAs, la m.1555A>G y la m.1494C>T, ambas localizadas en el sitio decodificante de la subunidad pequeña del ribosoma mitocondrial, y que se han asociado con sordera neurosensorial no sindrómica (Prezant, Agapian et al. 1993; Zhao, Li et al. 2004).

2.1. Criterios de selección de pacientes con sordera no sindrómica.

Se escogieron pacientes que presentaron una pérdida de audición neurosensorial no sindrómica. Esta disminución de la capacidad auditiva podía darse en un oído o en los dos. Además, se seleccionaron pacientes con antecedentes familiares de sordera por vía materna, lo que podía evidenciar un tipo de herencia genética mitocondrial. Otro criterio de inclusión en el estudio

fue la presencia en los pacientes o en sus familiares por vía materna, de otros síntomas asociados con una posible influencia mitocondrial (pero independientes de la sordera), como es el caso de la *diabetes mellitus* (Maassen, Jansen et al. 1996).

2.2. Búsqueda de las mutaciones m.1555A>G y m.1494C>T en pacientes con sordera no sindrómica.

Se analizaron 56 muestras de pacientes sospechosos de padecer sordera mitocondrial. A partir de sangre o pelos de ceja se aisló el DNA, y se analizó por PCR/RFLP la presencia o ausencia de las dos mutaciones patológicas en los mt-rRNAs. La mutación m.1494C>T no se encontró en ninguna de las muestras analizadas. Sin embargo, se identificaron varios pedigrís que portaban la mutación m.1555A>G. A continuación (**Fig. 3.1**) se muestra la foto de un gel de electroforesis que muestra varias muestras positivas con esta mutación.

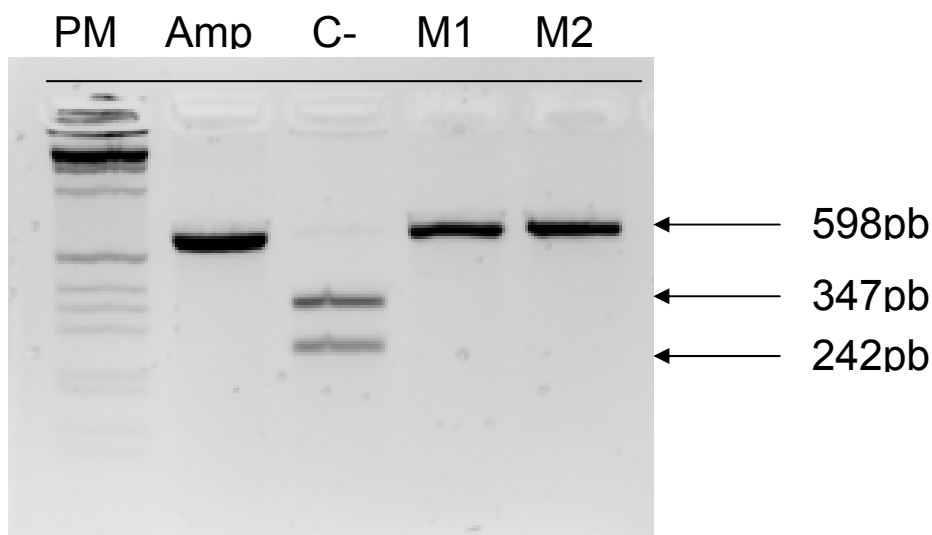


Fig. 3.1. Ejemplo del RFLP para detectar la mutación m.1555A>G en pacientes con sordera mitocondrial. La presencia de la mutación rompe el sitio de corte de la enzima de restricción sustituyendo el patrón de 2 bandas (de 347 y 242 pb) por una única banda de 598pb. PM denota patrón de pesos moleculares, Amp amplificado, C- control negativo y M1 y M2 muestra 1 y 2 respectivamente.

Cuando se encontró la mutación m.1555A>G se intentó ampliar el estudio de dicha mutación en familiares del sujeto probando, relacionados por

vía materna. Se analizaron 6 muestras pertenecientes a familiares maternos de individuos que portaban la variante m.1555G, encontrándose en todos ellos a su vez dicha mutación. En todos los casos, tanto en pacientes como en familiares, esta variante patológica se encontró en homoplasma, es decir presente en todas las copias de mtDNA. A continuación, podemos observar una tabla resumen con los datos del estudio (**tabla 3.3**).

Muestras analizadas	62
Pacientes	56
m.1555A>G positivos	15
m.1494C>T positivos	0
Familiares de positivos analizados	6

Tabla 3.3. Resultados de los análisis de las mutaciones patológicas en los mt-rRNAs en los pacientes de sordera no sindrómica.

En la familia de uno de los pacientes estudiados y que portaba la mutación m.1555A>G se pudo rastrear la presencia de la mutación, así como la capacidad auditiva, en varias generaciones. La mutación se encontró en homoplasma, en todas las muestras analizadas, sin embargo solo dos miembros del pedigrí presentaron problemas de audición. Aquí se muestra el árbol genealógico con los datos sobre esta familia estudiada (**Fig. 3.2**).

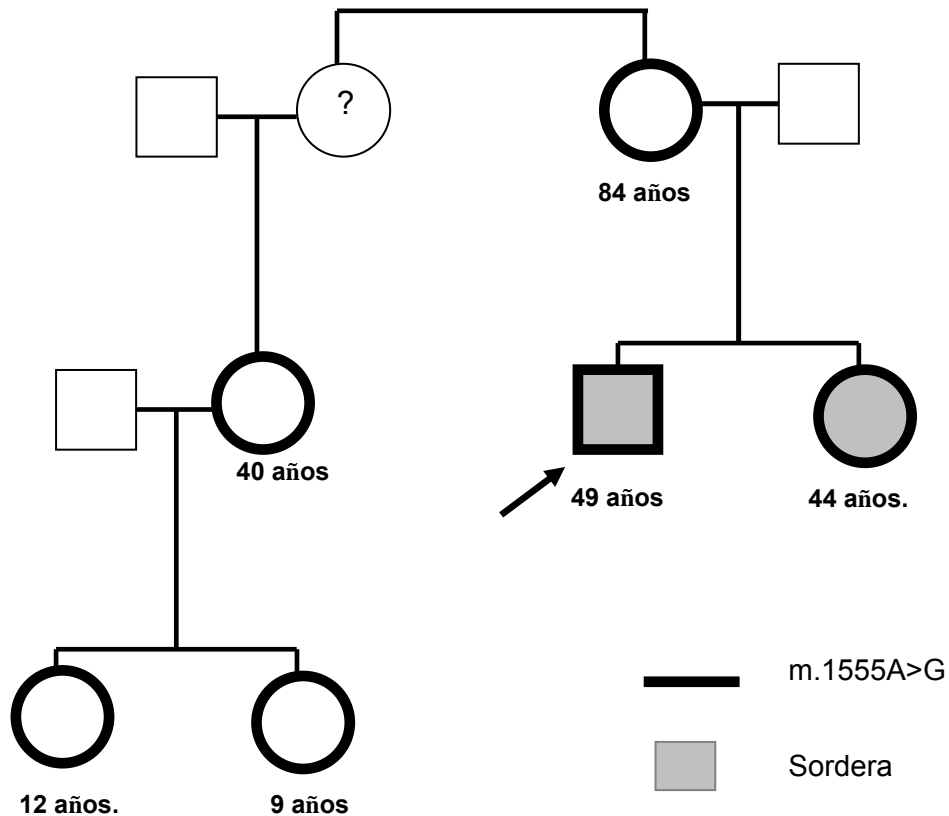


Fig. 3.2. Pedigrí de un paciente con sordera mitocondrial y portador de la mutación m.1555A>G. En negro intenso se muestran los positivos para la mutación y en color gris los miembros de la familia con pérdida de audición.

3. Estudio de cíbridos transmitocondriales con la mutación m.1555A>G.

En colaboración con el *Departament de Patologia Mitocondrial i Neuromuscular, del Institut de Recerca del Hospital Universitari Vall d'Hebron* de Barcelona, se realizó un estudio de la patogenicidad de la mutación m.1555A>G, utilizando para ello, cíbridos transmitocondriales que portaban esta mutación.

Estos se construyeron utilizando la línea celular de *osteosarcoma* 143B. Partiendo de plaquetas de un paciente que portaba la mutación en heteroplasmia, se aislaron 2 clones isogénicos. Uno de ellos portaba la mutación m.1555A>G en homoplasmia (**Clon M14**), y el otro clon aislado portaba a su vez la variante m.1555A (*wild type*) en todas sus copias de mtDNA (**Clon M2**). Los dos clones, que compartían toda la secuencia de mtDNA

excepto la posición m.1555, pertenecían al haplogrupo mitocondrial J1. De manera independiente se construyó otro cíbrido transmitocondrial a partir de plaquetas de un paciente que portaba la mutación m.1555G en homoplasmia y que pertenecía al haplogrupo mitocondrial H3 (línea celular **IP1**). Como control para esta última línea celular se utilizó un cíbrido transmitocondrial del haplogrupo H1 y que no portaba la mutación (línea celular **ACH**).

3.1. Secuenciación del mt-rRNA 12S para descartar otras variantes con un posible efecto.

Tras la construcción de las líneas celulares cíbridas, se descartó la presencia de otras variantes en el gen *MT-RNR1*, que pudieran tener un efecto añadido al de la mutación m.1555A>G, mediante secuenciación del mismo. No se encontró ninguna variante privada en el gen *MT-RNR1* de dichas líneas celulares que pudiera tener efecto, y además como se muestra en la siguiente figura (**Fig. 3.3**), se pudo comprobar la presencia o ausencia de la mutación m.1555A>G en las líneas celulares estudiadas.

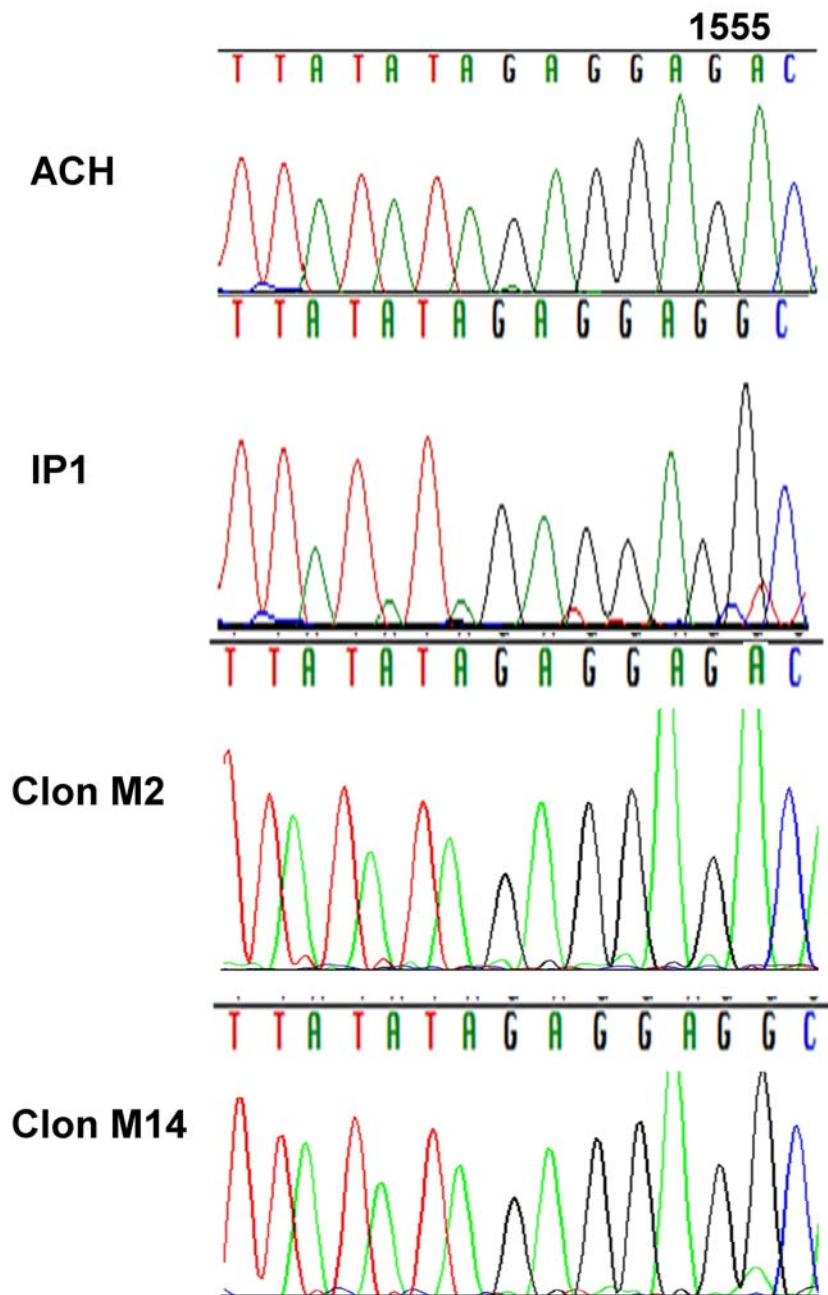


Fig.3.3. Electroferograma de un fragmento del mt-rRNA 12S de las líneas celulares transmitocondriales construidas para el estudio de la mutación m.1555A>G.

3.2. Estudio de la síntesis mitocondrial de proteínas.

Estudios previos sobre la patogenicidad de esta mutación sugerían que la mera presencia de la misma provocaba un defecto en la síntesis mitocondrial de proteínas (Guan, Fischel-Ghodsian et al. 2001), mientras que otros estudios o bien no conseguían asociar la presencia de la mutación con un defecto en la síntesis mitocondrial de proteínas (Giordano, Pallotti et al. 2002) o bien lo

asociaban uniendo el efecto de la mutación con la presencia de aminoglicósidos (Inoue, Takai et al. 1996). Para analizar el comportamiento de nuestros cíbridos transmitocondriales que portaban la mutación m.1555A>G y evaluar su capacidad de síntesis de proteínas mitocondriales, se midió este parámetro utilizando 2 concentraciones de paromomicina (2 mg/ml y 6 mg/ml). En la siguiente figura (**Fig. 3.4**) podemos observar el resultado de este experimento utilizando la concentración mas baja del aminoglicósido.

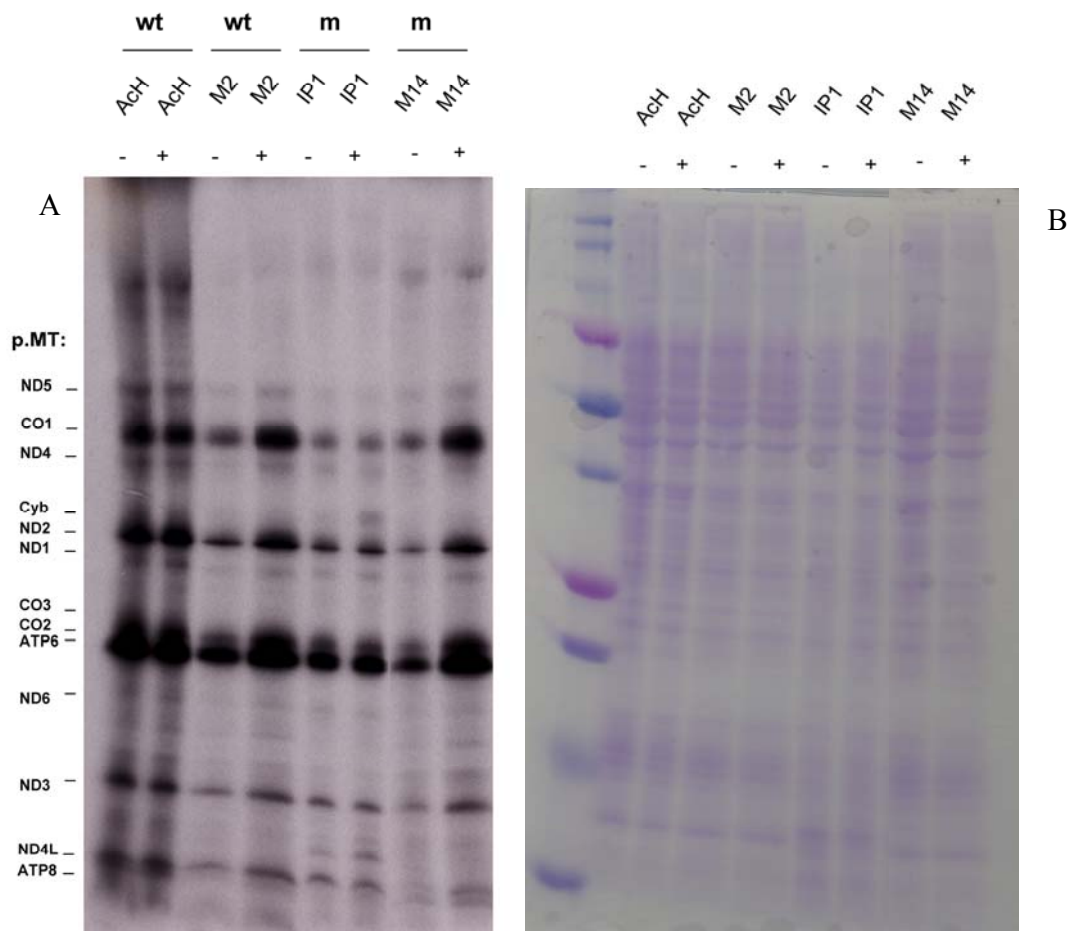


Fig.3.4. Síntesis mitocondrial de proteínas en líneas celulares con la mutación m.1555A>G. A. Gel de síntesis mitocondrial de proteínas. - y + indican ausencia y presencia de 2 mg/ml de paromomicina respectivamente. Wt y m denotan *wild type* y mutante respectivamente. A la izquierda de la figura se indica el nombre del polipéptido equivalente a cada banda resuelta del gel. B. Control de carga con azul de Coomassie.

Si analizamos la tinción con azul de Coomassie podemos observar que no hubo diferencias en la carga total de proteínas en el gel. No se observaron diferencias en la síntesis mitocondrial de proteínas, en los híbridos ACH (*wild-type*) e IP1 (mutante), cuando estos fueron tratados con el aminoglicósido. Sin embargo, los dos clones isogénicos, Clon M2 (*wild type*) y Clon M14 (mutante) mostraron un incremento en este parámetro al ser tratados con el antibiótico.

En la siguiente figura (**Fig. 3.5**) podemos observar el resultado de este experimento utilizando la concentración mas alta del aminoglicósido.

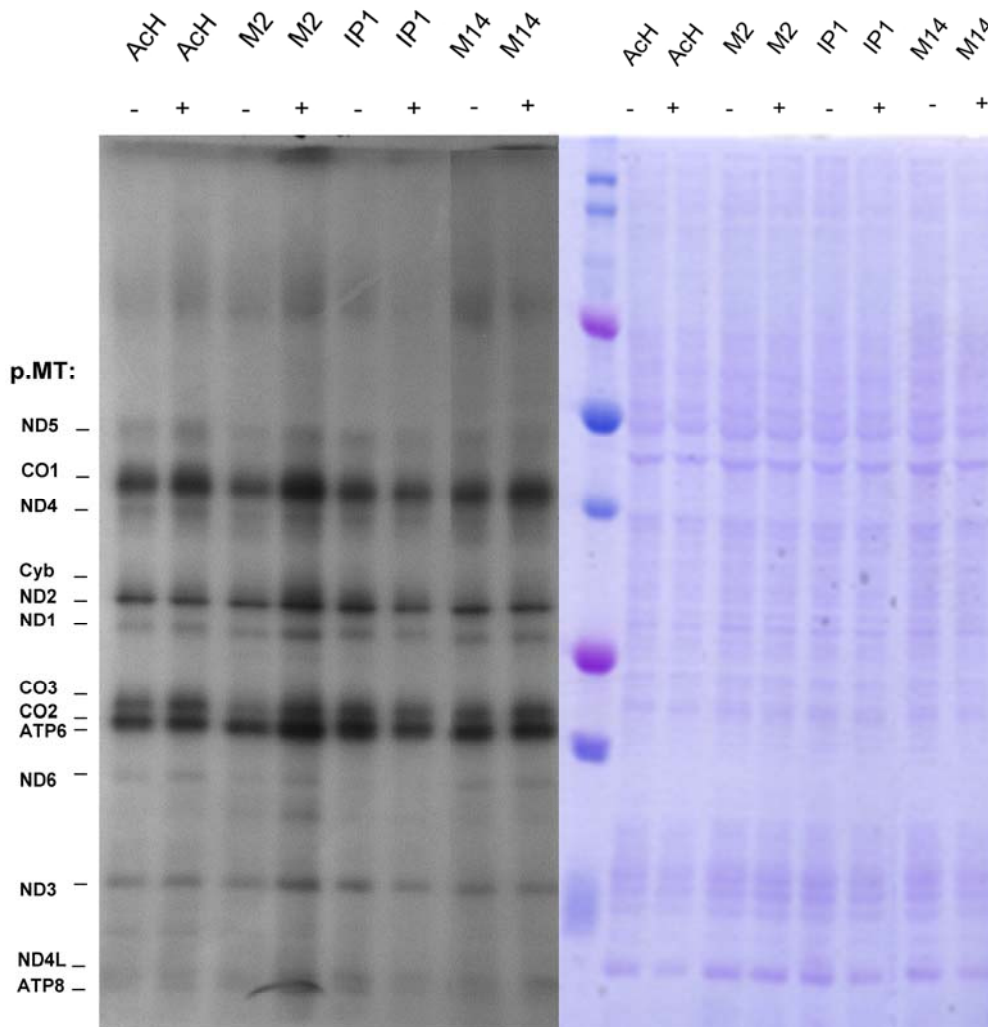


Fig. 3.5. Síntesis mitocondrial de proteínas en líneas celulares con la mutación m.1555A>G. A. Gel de síntesis mitocondrial de proteínas. - y + indican ausencia y presencia de 6 mg/ml de paromomicina respectivamente. Wt y m denotan *wild type* y mutante respectivamente. A la izquierda de la figura se indica el nombre del polipéptido equivalente a cada banda resuelta del gel. B. Control de carga con azul de Coomassie.

De nuevo podemos observar que no hubo diferencias en la carga total de proteínas en el gel, gracias a la tinción con azul de Coomassie. No se observaron diferencias en la síntesis mitocondrial de proteínas, en los híbridos ACH (*wild-type*) y el clon isogénico Clon M14 (mutante), cuando estos fueron tratados con el aminoglicósido. Sin embargo, el clon isogénico Clon M2 (*wild type*) mostró un aumento en la síntesis mitocondrial de proteínas, cuando se le añadió el antibiótico. Por último, el híbrido mutante IP1, tuvo una ligera disminución en este parámetro, cuando fue tratado con paromomicina a esta concentración.

Tras los experimentos, se cuantificaron por densitometría 3 bandas de cada gel (situadas en la parte superior, central e inferior del mismo), que correspondían a las subunidades p.MT-CO1, p.MT-ND2 y p.MT-ND3, respectivamente. La intensidad media de las 3 bandas del híbrido ACH, incubado sin antibiótico, se estableció como el 100% de cada gel, y con este valor se normalizaron el resto de los valores. En la siguiente figura (**Fig. 3.6**) se muestran las medias de dicha cuantificación de las líneas celulares mutantes y *wild type* en las distintas condiciones del ensayo.

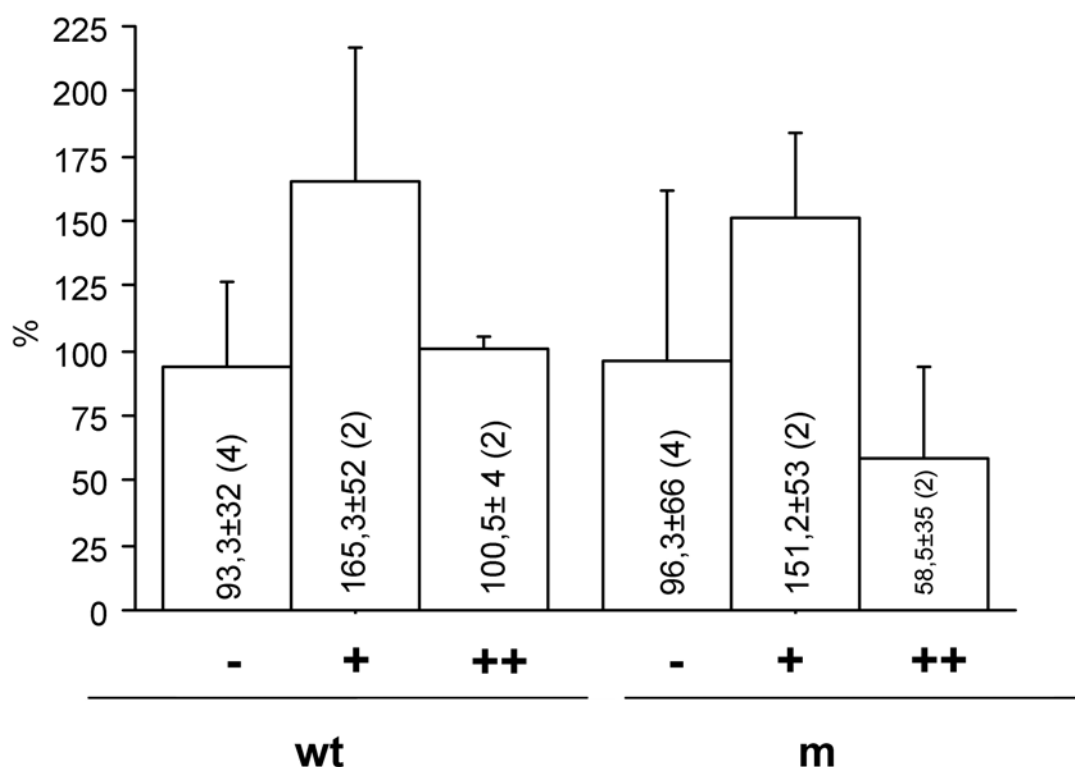


Fig. 3.6. Cuantificación de la intensidad óptica de las bandas de los geles de síntesis de proteínas. -, + y ++ denotan ausencia, 2 mg/ml y 6mg/ml de paromomicina respectivamente. Wt y m denotan *wild type* y mutante respectivamente.

En primer lugar pudimos observar en la figura, que no existían diferencias en la síntesis mitocondrial de proteínas entre las líneas celulares con y sin la mutación m.1555A>G, cuando el ensayo se realizó en ausencia de aminoglicósidos. De la misma manera, cuando el experimento se realizó en presencia de alguna de las dos concentraciones de aminoglicósidos, ni las líneas celulares *wild type* ni las que portan la mutación m.1555A>G vieron modificada su tasa de síntesis proteica, comparando estos valores con el experimento sin antibiótico.

3.3. Estudio de la actividad específica y cantidad de complejo IV.

No se encontraron diferencias significativas en la síntesis mitocondrial de proteínas, entre las líneas celulares mutantes y *wild type*, al tratarlas con aminoglicósidos. Sin embargo, los aminoglicósidos pueden alterar la conformación de los mt-rRNAs, provocando una incorporación errónea de aminoácidos durante la síntesis mitocondrial de proteínas (Zingman, Park et al. 2007). Para comprobar si este hecho pudo afectar de alguna manera a los

complejos del sistema OXPHOS y sobretodo de manera diferencial a las líneas que portaban la mutación m.1555A>G, realizamos ensayos de actividad y cantidad de complejo IV en placa, con nuestras líneas celulares. En este caso se analizaron los dos clones isogénicos, uno de ellos con la variante *wild type* (clon M2) y el otro con la variante mutante (clon M14). Se midió también la actividad específica de la citrato sintasa (CS) para tener en cuenta el número de mitocondrias por célula. En la siguiente figura (**Fig. 3.7**), podemos observar los resultados de actividad específica de complejo IV.

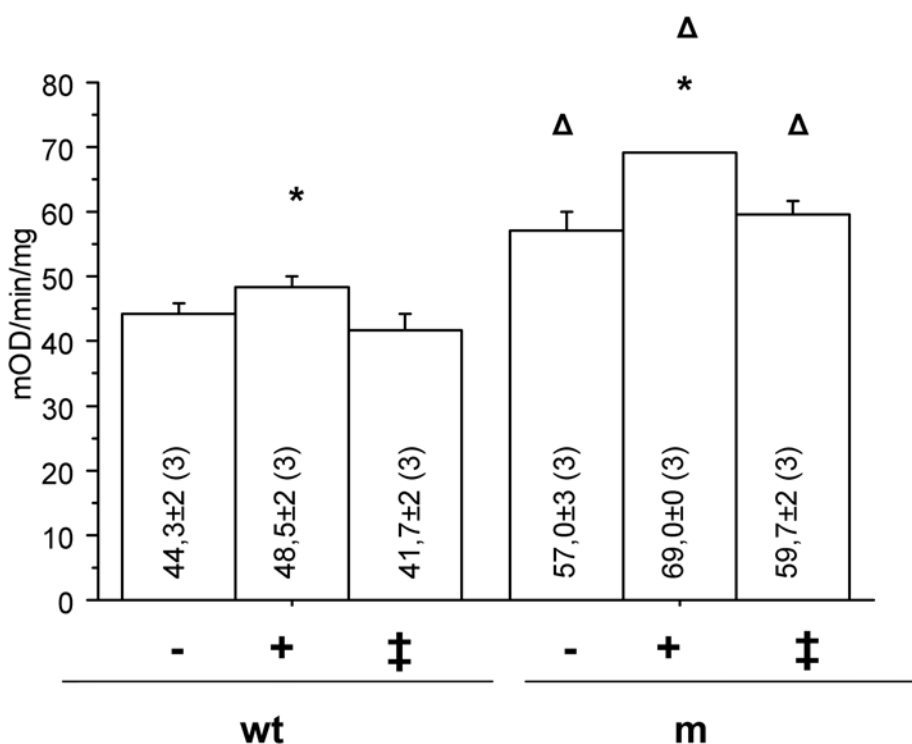


Fig. 3.7. Actividad específica de complejo IV corregida por actividad específica de la CS. -, + y ‡ denotan ausencia, 2 mg/ml de paromomicina y 2 mg/ml de neomicina respectivamente. Wt y m denotan *wild type* y mutante respectivamente. * indica significativamente diferente a la condición sin antibiótico. Δ indica significativamente diferente a la línea celular *wild type* en las mismas condiciones.

La línea celular que porta la mutación m.1555A>G tiene una actividad específica de complejo IV significativamente mayor que la línea celular *wild type*, en todas las condiciones del ensayo. Las células sin la mutación experimentan un aumento significativo en esta actividad específica cuando se les añade 2 mg/ml de paromomicina. Sin embargo, este parámetro no varía cuando se les añade otro aminoglicósido, como la neomicina, a la misma

concentración. En las células con la mutación se puede observar un aumento significativo en su actividad específica de complejo IV cuando se incubaron con paromomicina. Tras medir la actividad específica del complejo IV, es posible medir la cantidad del mismo, mediante un ensayo tipo ELISA. A continuación, podemos ver los resultados obtenidos (**Fig. 3.8**).

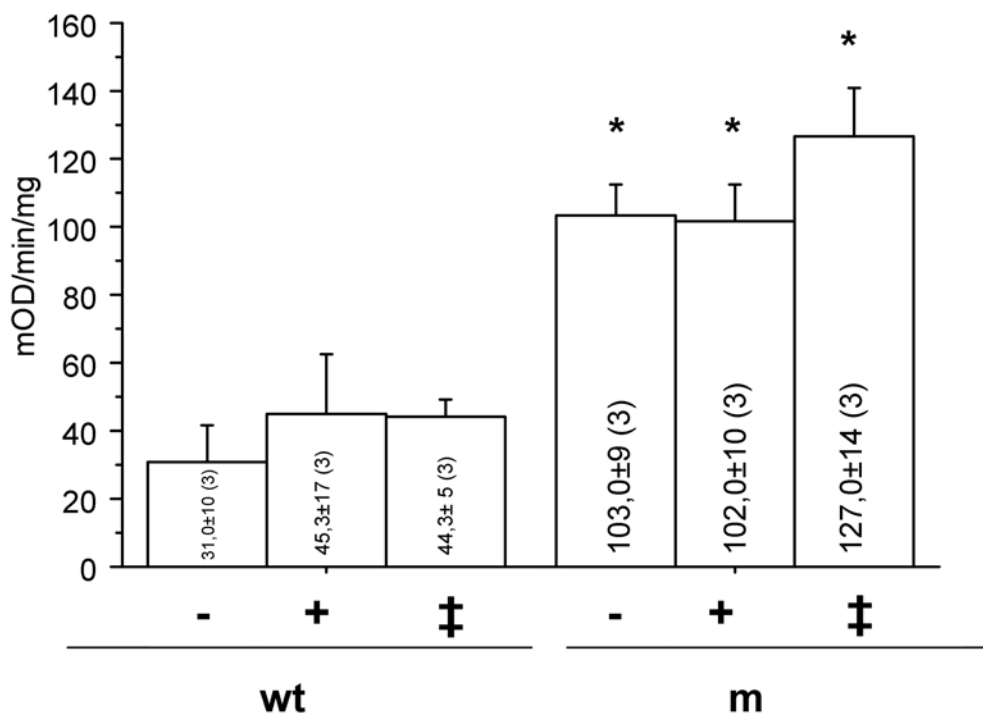


Fig.3.8. Cantidad de complejo IV corregida por actividad específica de la CS. - + y ‡ denotan ausencia, 2 mg/ml de paromomicina y 2 mg/ml de neomicina respectivamente. Wt y m denotan *wild type* y mutante respectivamente. * indica significativamente diferente a la condición sin antibiótico.

De nuevo, la línea celular que porta la mutación m.1555A>G tuvo significativamente más cantidad de complejo IV que la línea celular *wild type*, en todas las condiciones del ensayo. Sin embargo, la incubación de la línea celular mutante y la línea celular *wild type* con paromomicina o neomicina no produjo ningún cambio en este parámetro respecto a la misma línea celular pero sin antibiótico.

Al comparar los valores de actividad específica y de cantidad de complejo IV en estas líneas celulares, se observó que existía una correlación significativa entre ellos ($r = 0,812$ y $p < 0,0001$). Esto sugería que las diferencias

en actividad de complejo IV observadas se debían a diferencias en la cantidad del mismo.

4. Estudio evolutivo de la mutación patológica m.1494C>T en el mt-rRNA 12S.

La mutación del mtDNA m.1494C>T, localizada en el gen *MT-RNR1* (12S rRNA), se ha encontrado en varios pacientes de un pedigrí chino que padecían sordera neurosensorial no sindrómica (Zhao, Li et al. 2004). Para analizar la importancia funcional de dicha mutación y su posible presencia en otras especies, se estudió su conservación a través de la evolución.

4.1. La mutación patológica m.1494C>T está fijada en *Cercopithecidae*.

Para analizar la presencia de la mutación m.1494T en mamíferos, alineamos las secuencias del gen *MT-RNR1* de 316 especies de mamíferos. En 24 de ellas, esta mutación patológica humana era el alelo *wild-type* y, en particular, en 17 primates de la familia *Cercopithecidae*. Sin embargo, la función auditiva de estos monos se parece a la de los humanos, incluyendo las funciones del oído medio, de la cóclea y funciones neuronales, indicando aparentemente que no padecen ninguna pérdida auditiva debida a la presencia de esta mutación.

El Orden de los primates se puede dividir en los subórdenes *Strepsirrhini* y *Haplorrhini*. Los *Haplorrhini* se pueden dividir en los parvoordenes *Platyrrhini* y *Catarrhini*. Estos últimos se pueden dividir en las superfamilias *Hominoidea* y *Cercopithecoidea* (Perelman, Johnson et al. 2011). Esta clasificación se puede observar de manera visual en la siguiente figura (**Fig. 3.9**).

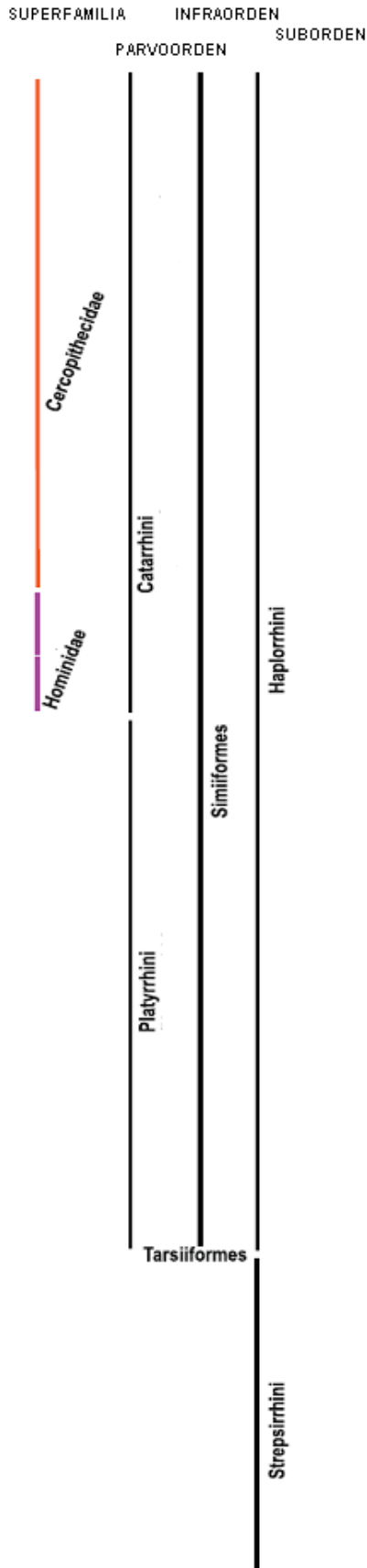


Fig. 3.9. Clasificación de los primates. El orden primate, se puede dividir en los subórdenes *Strepsirrhini* y *Haplorrhini*. Los *Haplorrhini* se pueden dividir en los infraordenes *Tarsiiformes* y *Simiiformes*. Los *Simiiformes* a su vez se dividen en los parvoordenes *Platyrrhini* y *Catarrhini*. Estos últimos se dividen en las superfamilias *Hominioidea* y *Cercopithecoidea*.

Excepto en las especies de la superfamilia *Cercopithecoidea*, el alelo m.1494C es el alelo *wild-type* en todos los primates. Para confirmar que esta mutación patológica humana, la m.1494C>T es el alelo salvaje en los primates de esta superfamilia, recogimos 41 secuencias totales o parciales del gen *MT-RNR1* de distintas especies de primates de la familia *Cercopithecidae*, única familia dentro de la ya mencionada superfamilia. El alineamiento de estas especies se puede observar en la siguiente figura (**Fig. 3.10**)

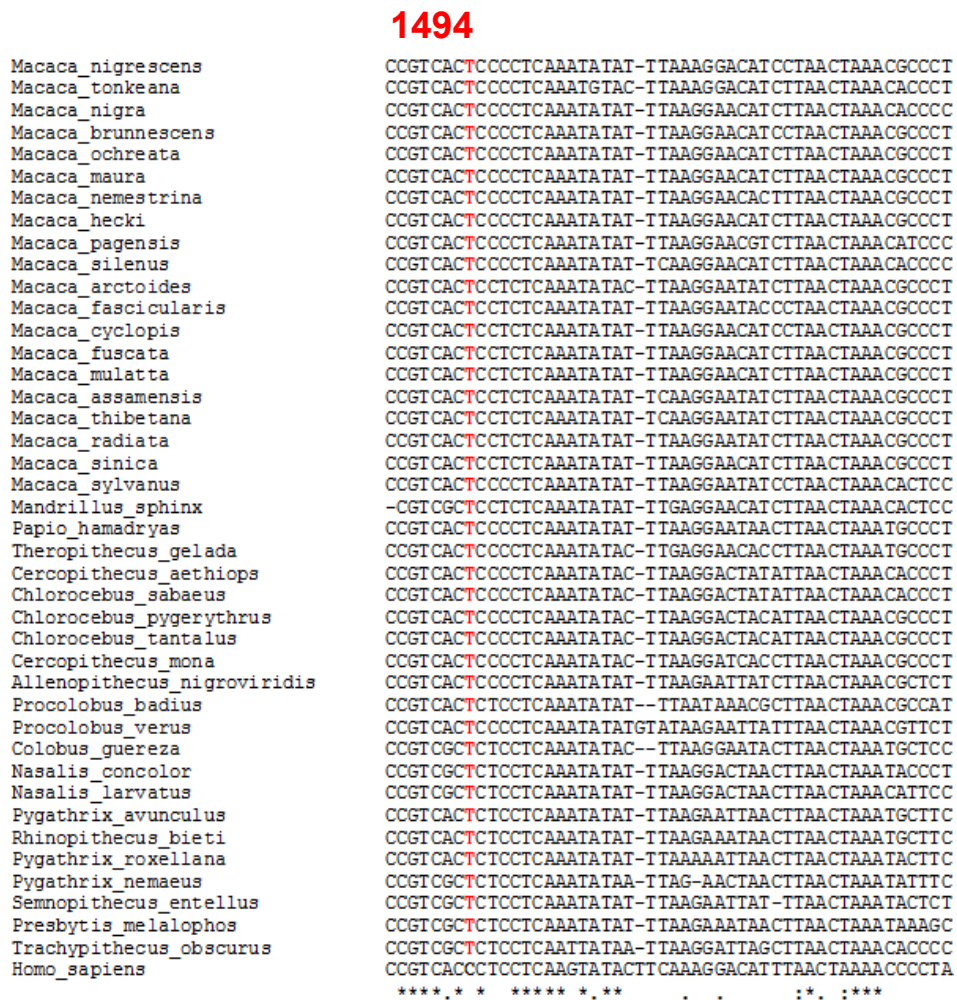


Fig. 3.10. Alineamiento de un segmento de las 41 secuencias del mt-rRNA 12S de especies de la familia de primates *Cercopithecidae*. En rojo se ha marcado la mutación m.1494C>T.

De todas estas especies con las que se ha realizado el alineamiento, 12 pertenecían a la subfamilia *Colobinae* (3 y 9 de las tribus *Colobini* y *Presbytini* respectivamente) y 29 pertenecían a la subfamilia *Cercopithecinae* (6 y 23 de las tribus *Cercopithecini* y *Papioni* respectivamente). Pero todas las especies de la familia *Cercopithecidae*, contenían una T en la posición m.1494. Por lo

tanto, se confirma que la mutación m.1494C>T es el alelo *wild-type* en esta familia de primates.

Además, podemos estimar la edad de aparición de esta mutación. Los *Hominoidea* divergieron de los *Cercopithecoidea* hace unos 32 millones de años, y por otro lado las especies de esta superfamilia divergieron entre sí hace unos 18 millones de años (Perelman, Johnson et al. 2011). Por lo tanto esta mutación apareció en el genoma mitocondrial de estas especies entre hace 32 y 18 millones de años.

4.2. La posición m.1494 es importante para la función del 12S rRNA.

Si la mutación m.1494C>T es patológica, sería lógico pensar que habría sido eliminada por la selección natural a lo largo de 18 millones de años. Quizás esta mutación se ha fijado en el genoma de los *Cercopithecidae* porque produce un fenotipo post-reproductivo y por lo tanto su permanencia en estas especies de mamíferos podría explicarse por una ineficacia de la selección negativa o purificadora. Sin embargo, la ineficacia de la selección natural se puede descartar, ya que varios individuos de los pedigríes humanos donde se describió esta mutación se volvieron sordos en años reproductivos (Zhao, Li et al. 2004; Wang, Li et al. 2006; Chen, Tsai et al. 2007; Han, Dai et al. 2007; Yuan, Chen et al. 2007)

El mtDNA es heredado exclusivamente por vía materna, por lo tanto si esta mutación patológica solo produjera un fenotipo asociado a hombres, la selección negativa que solo actuaría sobre ellos no afectaría a la frecuencia de la mutación en la población, en la siguiente generación. Sin embargo, varios individuos de estos pedigríes eran mujeres (Zhao, Li et al. 2004; Rodriguez-Ballesteros, Olarte et al. 2006; Wang, Li et al. 2006; Chen, Tsai et al. 2007; Han, Dai et al. 2007). Este resultado sugiere que la pérdida de audición no sindrómica heredada por vía materna puede estar de hecho bajo el efecto de la selección negativa. Para comprobarlo analizamos el índice de conservación (IC) de la mutación en 316 especies de mamíferos y lo comparamos con la media

del IC de 20 posiciones, separadas por 50 nucleótidos, dentro del gen *MT-RNR1*. Esto se puede observar en la siguiente figura (**Fig. 3.11**)

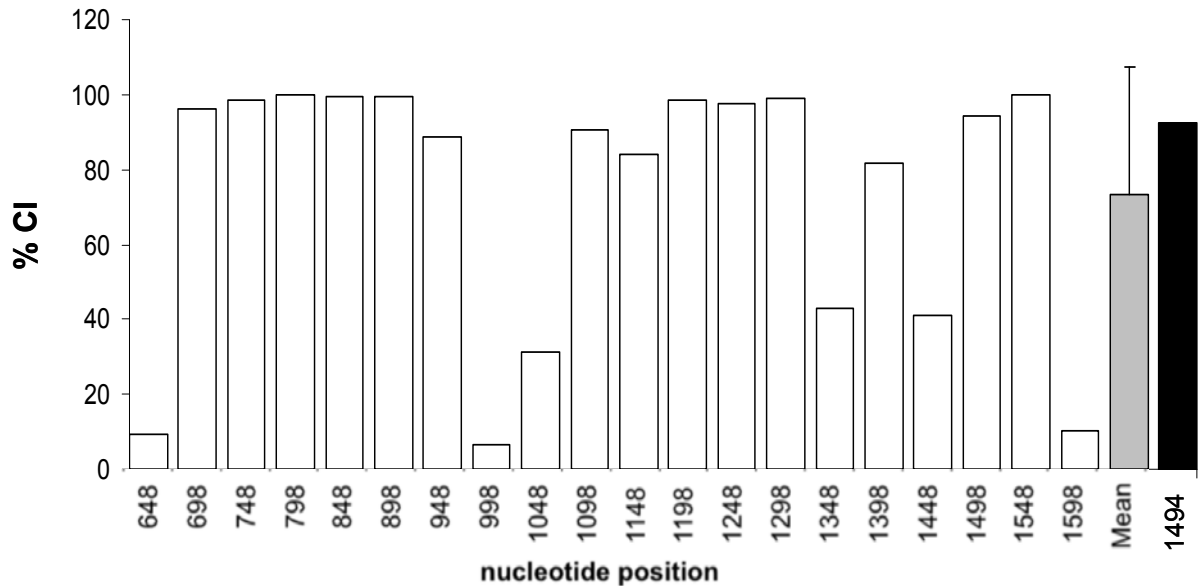


Fig. 3.11. Índice de conservación (IC) del gen mt-rRNA 12S y la posición 1494. Se ha representado el IC de 20 posiciones dentro del gen, separadas cada 50 nucleótidos (posiciones m.648, m.698, m.748 y así sucesivamente), la media del IC de esas posiciones y el IC de la posición 1494.

La posición m.1494C está conservada en un 92,4% de las especies de mamíferos estudiadas, mientras que el IC medio del gen *MT-RNR1* es de 70,2%. Además si utilizamos la herramienta **ConSurf**, que calcula el IC teniendo en cuenta la topología del árbol filogenético de las especies estudiadas, obtuvimos un IC = 9, siendo 9 totalmente conservado. Estos resultados confirman que la selección purificadora esta de hecho actuando sobre la posición m.1494 y que además esta posición es funcionalmente importante para los mamíferos.

4.3. Las líneas celulares de *Cercopithecidae* son fundamentalmente resistentes a los aminoglicósidos.

La ausencia de efecto fenotípico en parientes maternos, que presentaban la mutación m.1494C>T en homoplasmia, sugería que la mutación tenía penetrancia incompleta y que requería de otros factores para que se desarrollara el fenotipo patológico.

En este sentido, se ha encontrado que los aminoglicósidos desencadenan la pérdida de audición en individuos que portan esta mutación (Zhao, Li et al. 2004; Rodriguez-Ballesteros, Olarte et al. 2006; Wang, Li et al. 2006; Zhu, Qian et al. 2006; Han, Dai et al. 2007; Yuan, Chen et al. 2007). El efecto de los aminoglicósidos se ha confirmado a su vez en distintas líneas celulares. De esta forma, cuando se cultivó con aminoglicósidos, los tiempos de doblaje de las líneas celulares mutantes fueron más altos que los de las *wild-type* (Zhao, Li et al. 2004; Zhao, Zhao et al. 2005).

Las posiciones equivalentes a m.1555 y m.1494 en el rRNA bacteriano (16S rRNA) se encuentran formando un par bases Watson-Crick, unión que resulta importante para la interacción con los aminoglicósidos. El mt-rRNA 12S humano *wild-type* carece de este apareamiento de bases, pero este se reconstruye con la mutación m.1494C>T (Hobbie, Akshay et al. 2008).

Por todo esto, decidimos analizar el efecto de los aminoglicósidos en la función OXPHOS de las especies *Cercopithecidae*. Para ello obtuvimos fibroblastos primarios a partir de un explante de piel de *Macaca nemestrina* (macaco de la tribu de los *Papioni*) y una línea celular de *Cercopithecus aethiops* (cercopiteco de la tribu de los *Cercopithecini*). Primero, confirmamos el origen de las especies y la presencia de la mutación m.1494C>T por secuenciación. En la siguiente figura (**Fig. 3.12**) podemos ver las secuencias de un fragmento del gen *MT-RNR1* de estas especies.

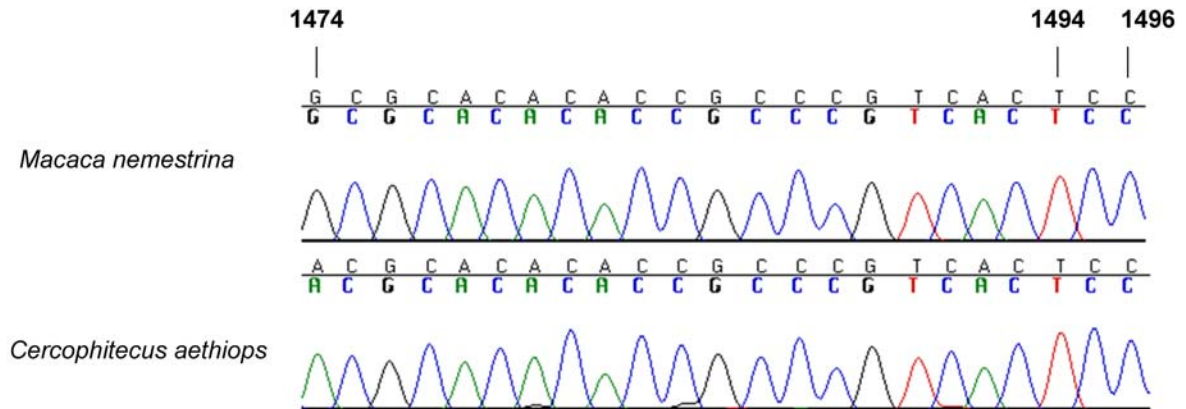


Fig.3.12. Electroferograma de un segmento del gen *MT-RNR1* (12S rRNA) de células de macaco y de cercopiteco. Se han marcado las posiciones m.1474, m.1494, m.1496.

Como se puede apreciar en la figura, la posición m.1474 sirve para diferenciar entre las dos especies *Cercopithecidae*, la línea celular de *Macaca nemestrina* tiene la variante m.1474G, y la de *Cercopithecus aethiops* la m.1474A. Por otro lado, pudimos comprobar que las dos especies portan la mutación m.1494C>T. Además de en esta familia de primates, esta mutación solo se ha descrito en el topo marsupial (*Notoryctes typhlops*), en el koala (*Phascolarctos cinereus*), en la rata-topo de Ehrenbergs (*Nannospalax ehrenbergi*), en los elefantes asiáticos y africanos (*Elephas maximus*, *Loxodonta africana*), en las dos especies extintas, mastodonte (*Mamut americanum*) y mamut lanudo (*Mamuthus primigenius*) y en los humanos mutantes (*Homo sapiens*), sin embargo podemos diferenciar las especies de *Cercopithecidae* de estas otras mencionadas, porque la variante m.1496C que como podemos observar, esta presente en nuestras dos líneas celulares, y no se ha encontrado en las otras especies previamente comentadas.

Un análisis con la herramienta *Blast*, de estos segmentos del gen *MT-RNR1*, confirmó el origen *Cercopithecidae* de estas líneas celulares. La secuencia de la primera línea celular tuvo un 97% de homología con una secuencia previamente descrita de *Macaca nemestrina nemestrina*. La secuencia de la segunda línea celular tuvo un 98% de homología con una secuencia ya descrita de *Cercopithecus aethiops*.

Se había descrito que líneas celulares linfoblastoides inmortalizadas y cíbridos transmitocondriales de la línea de *osteosarcoma* 143B, que portaban la mutación m.1494C>T, mostraron una disminución en su tasa de crecimiento, cuando fueron incubadas con 2 mg/ml del aminoglicósido paromomicina (Zhao, Li et al. 2004; Zhao, Zhao et al. 2005). Además, otras líneas celulares que portaban la otra mutación causante de sordera neurosensorial no sindrómica en humanos, la mutación m.1555A>G, también se vieron afectadas por este aminoglicósido (Guan, Fischel-Ghodsian et al. 2001; Giordano, Pallotti et al. 2002; Pacheu-Grau, Gomez-Duran et al. 2011). Por todo esto, decidimos analizar el efecto de los aminoglicósidos en la síntesis de proteínas mitocondrial en nuestras líneas celulares, utilizando para ello 2 y 4 mg/ml de paromomicina.

Primero analizamos la producción de subunidades OXPHOS codificadas en el mtDNA. Para ello, realizamos experimentos de síntesis mitocondrial de proteínas en nuestras líneas celulares en ausencia y presencia de 2 y 4 mg/ml de paromomicina. En resultado de dichos experimentos puede observarse a continuación (**Fig.3.13**).

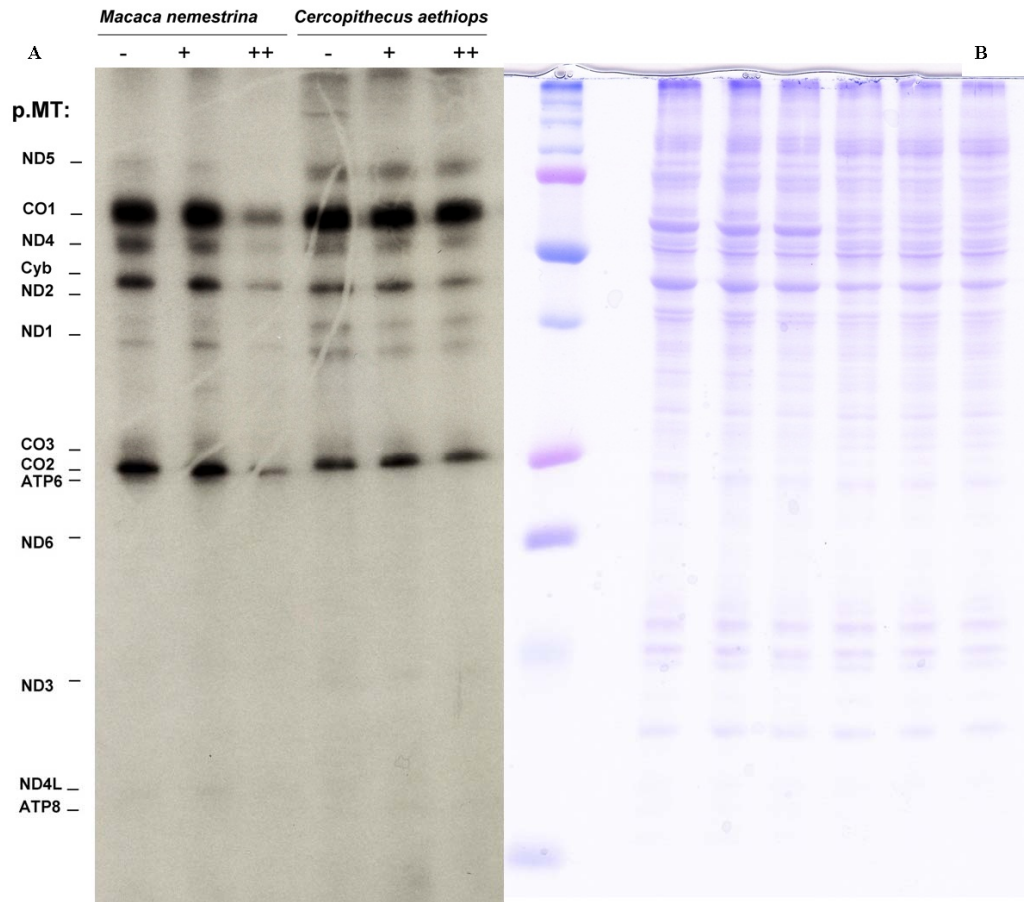


Fig. 3.13. Síntesis mitocondrial de proteínas en líneas celulares *Cercopithecidae*. A. Gel de síntesis mitocondrial de proteínas. -, + y ++ indican ausencia y presencia de 2 y 4 mg/ml de paromomicina respectivamente. A la izquierda de la figura se indica el nombre del polipéptido equivalente a cada banda resuelta del gel. B. Control de carga con azul de Coomassie.

No hubo diferencias en la carga total de proteínas en el gel, según la tinción con azul de Coomassie. En ambas líneas celulares pudimos observar una disminución en la síntesis de subunidades OXPHOS codificadas en el mtDNA al añadir el antibiótico.

A continuación, estudiamos la cantidad del polipéptido p.MT-CO1, una subunidad de la citocromo c oxidasa, codificada en el mtDNA. Para ello realizamos un ensayo de Western blot, en distintas condiciones. Utilizamos la cantidad de la proteína actina, codificada en el nDNA, para normalizar los valores de p.MT-CO1. En la siguiente figura (**Fig.3.14**) podemos observar el resultado de estos experimentos.

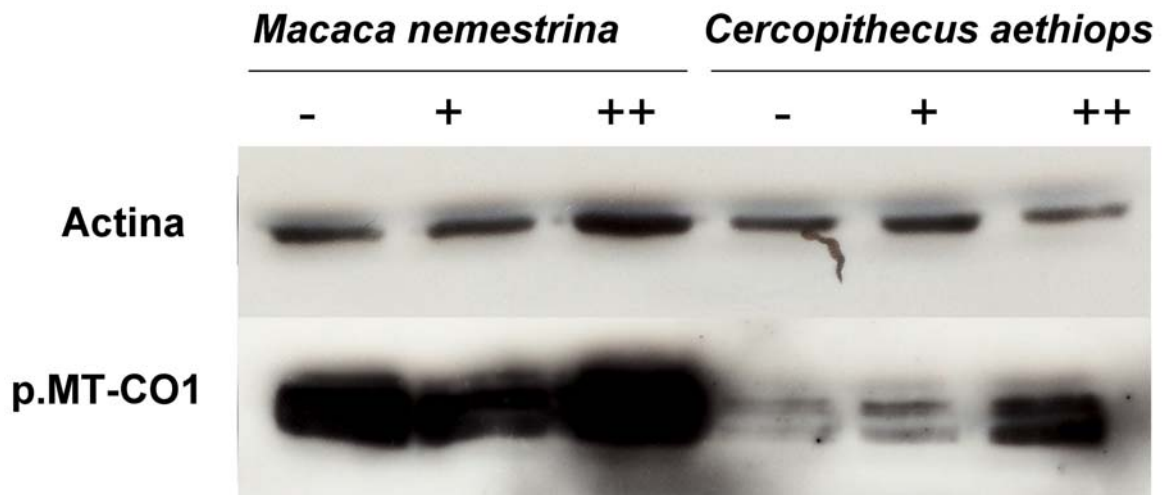


Fig. 3.14. Western Blot para la proteína p.MT-CO1. -, + y ++ indican la ausencia, 2 mg/ml y 4 mg/ml de paromomicina respectivamente.

Se puede apreciar que, para la línea celular de macaco, los niveles de p.MT-CO1 eran similares en todas las condiciones. Sin embargo, en las células de cercopiteco, pudo observarse un aumento de la subunidad p.MT-CO1 al añadir el antibiótico. Estos resultados sugirieron por tanto, que los aminoglicósidos no tienen un efecto muy importante sobre la cantidad total de esta subunidad mitocondrial en estas líneas celulares. Esto nos indicaba, que quizás la mutación m.1494C>T estaba compensada de alguna manera en estas especies. Para obtener valores numéricos, cuantificamos la intensidad de las bandas del Western blot en las distintas condiciones. En la siguiente figura (**Fig.3.15**) podemos ver el resultado de dicha cuantificación.

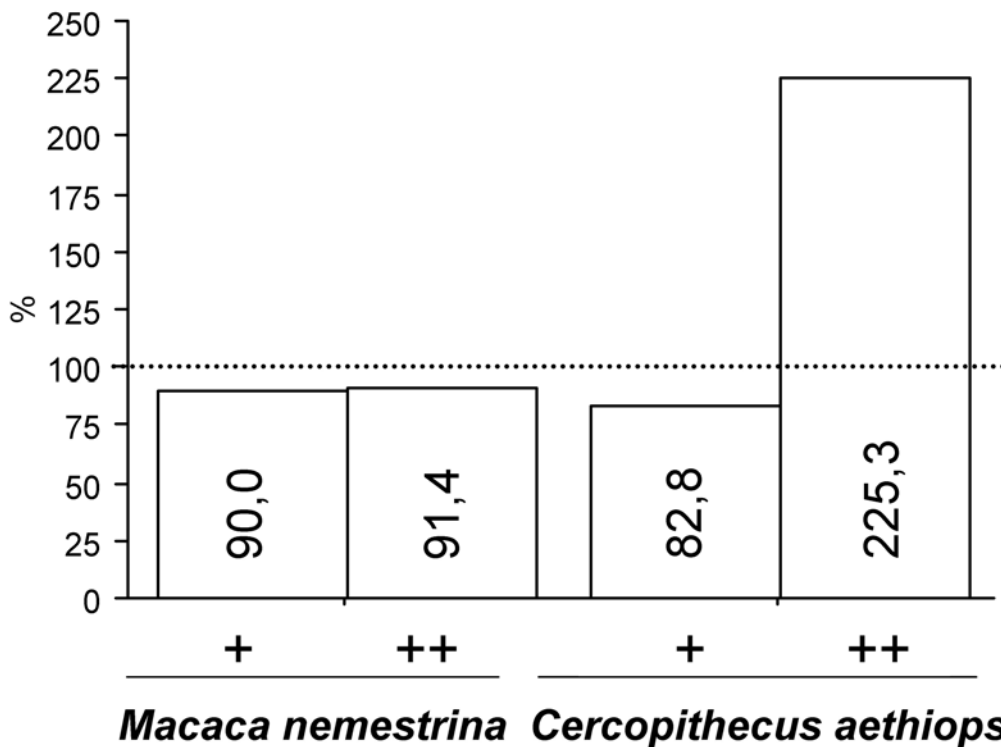


Fig.3.15. Cuantificación de los experimentos de Western blot. La intensidad de la proteína mitocondrial p.MT-CO1, ha sido normalizada por la intensidad de la proteína actina, codificada en el núcleo. La intensidad normalizada de p.MT-CO1 de cada línea sin antibiótico se ha establecido como el 100%. + y ++ denotan 2 y 4 mg/ml de paromomicina respectivamente.

Tras la cuantificación, pudimos comprobar que prácticamente no había disminución en los niveles de p.MT-CO1 al añadir el antibiótico en la línea celular de macaco. En la línea celular de cercopiteco se produjo una pequeña inhibición de la cantidad de p.MT-CO1 con la dosis más baja de antibiótico, pero sin embargo se produjo un gran aumento en estos niveles, al añadir la concentración más alta de paromomicina.

En la presencia de aminoglicósidos, la conformación del rRNA se ve alterada y se pueden incorporar aminoácidos erróneos a las proteínas nacientes (Zingman, Park et al. 2007). Las subunidades catalíticas del complejo IV están codificadas en el mtDNA. Por lo tanto, para comprobar la existencia de posibles subunidades del complejo respiratorio IV anómalas y además comprobar los resultados obtenidos en el Western blot en estas células, determinamos la actividad específica y los niveles del complejo respiratorio IV,

mediante un ensayo espectrofotométrico. En la siguiente figura (Fig. 3.16) podemos contemplar estos resultados.

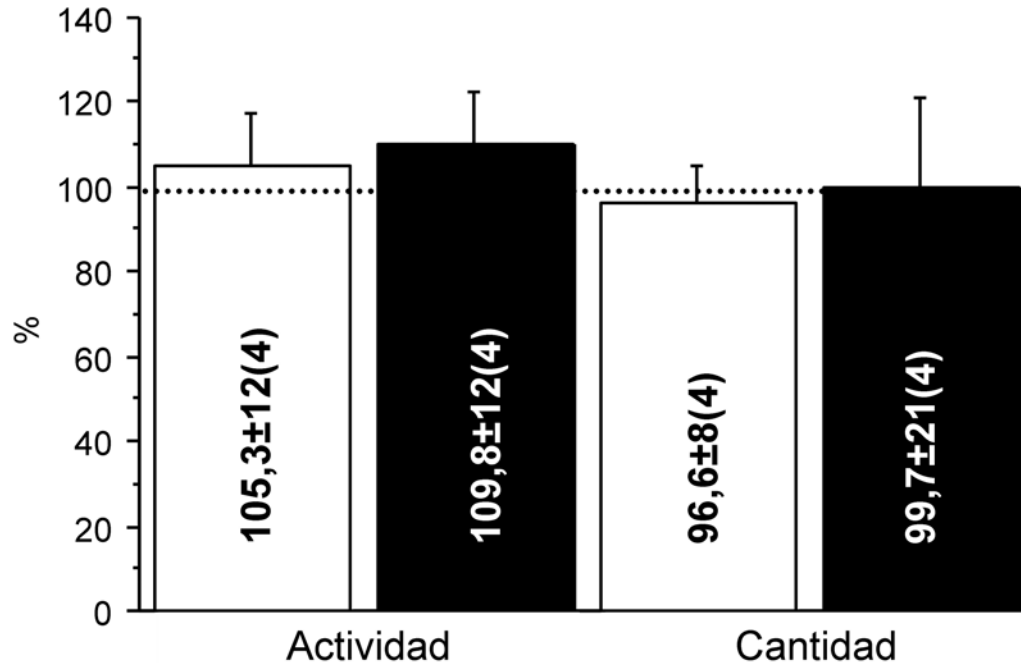


Fig.3.16. Actividad específica y cantidad de complejo respiratorio IV. La actividad específica y cantidad de complejo IV de cada línea sin antibiótico se han establecido como 100%. En fondo blanco se muestran los valores para la línea celular de *Macaca nemestrina* y en fondo negro los valores de *Cercopithecus aethiops*. En cada barra se indica la media \pm desviación estándar (nº ensayos).

No se observaron diferencias significativas en la actividad específica ni en la cantidad de complejo respiratorio IV, en ninguna de las líneas celulares, cuando estas fueron incubadas con aminoglicósidos.

Estos resultados sugieren que las células de *Cercopithecidae* solo se ven afectadas por los aminoglicósidos en los ensayos de síntesis mitocondrial de proteínas. Por lo tanto, parece que la mutación m.1494C>T fundamentalmente no tiene efecto en estas células, ya que posiblemente este compensada de alguna manera.

Cuando existen defectos en el sistema de fosforilación oxidativa y se crecen las células en medio de cultivo suplementado con galactosa en lugar de glucosa, estas no pueden producir el ATP necesario para sus requerimientos

energéticos y el crecimiento celular se ve afectado. Por esta razón, crecimos estas células con distintos aminoglicósidos (paromomicina 2 y 4 mg/ml, geneticina 1 mg/ml) en medio DMEM suplementado con galactosa. Imágenes representativas de estos experimentos y su cuantificación, se pueden ver en la siguiente figura (**Fig. 3.17**).

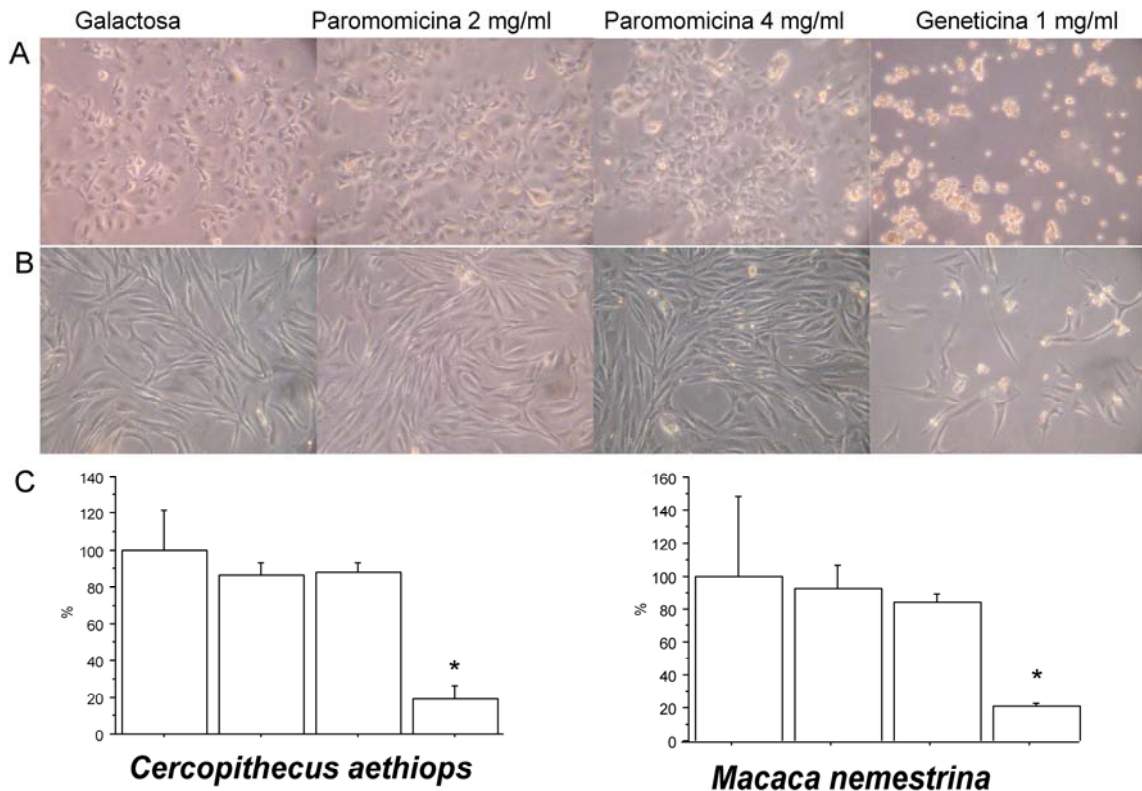


Fig.3.17. Ensayos de viabilidad de células de 2 especies de *Cercopithecidae* y su cuantificación. A. Imágenes representativas de experimentos de crecimiento celular de *Cercopithecus aethiops* en distintas condiciones. B. Imágenes representativas de experimentos de crecimiento celular de *Macaca nemestrina* en distintas condiciones. C. Cuantificación de los experimentos anteriores. * denota significancia estadística. % viabilidad. *Cercopithecus aethiops*: Galactosa 100,0±22 (3). Paromomicina 2 mg/ml 86,5±7 (3). Paromomicina 4 mg/ml 87,9±5 (3). Geneticina 1 mg/ml 19,2±7 (3). *Macaca nemestrina*: *Cercopithecus aethiops*: Galactosa 100,0±48 (2). Paromomicina 2 mg/ml 92,1±15 (2). Paromomicina 4 mg/ml 84,1±5 (2). Geneticina 1 mg/ml 20,8±1 (3).

Las células de cercopiteco y de macaco no vieron inhibido su crecimiento al ser tratadas con 2 y 4 mg/ml de paromomicina. Sin embargo cuando estas células fueron crecidas con 1 mg/ml de geneticina, murieron.

4.4. Una sustitución Arginina >Leucina en la proteína MRPS12 podría compensar la mutación m.1494C>T en macaco.

Se ha propuesto que mutaciones compensatorias son una posible explicación para la fijación de mutaciones en proteínas (Azevedo, Carneiro et al. 2009) y tRNAs (Kern and Kondrashov 2004) codificados en el mtDNA, y que han sido asociadas con distintas patologías. Además se han encontrado frecuentemente mutaciones compensatorias en los mt-rRNAs (Springer, Hollar et al. 1995). Sin embargo, a pesar de la existencia de mutaciones compensatorias en la hélice 39 del sitio decodificante del rRNA de *Cercopithecidae*, la mutación m.1494C>T no ha sido compensada por una transición m.1555A>G. Podemos ver un segmento del sitio decodificante en el rRNA de estas líneas celulares en la siguiente figura (Fig. 3.18)

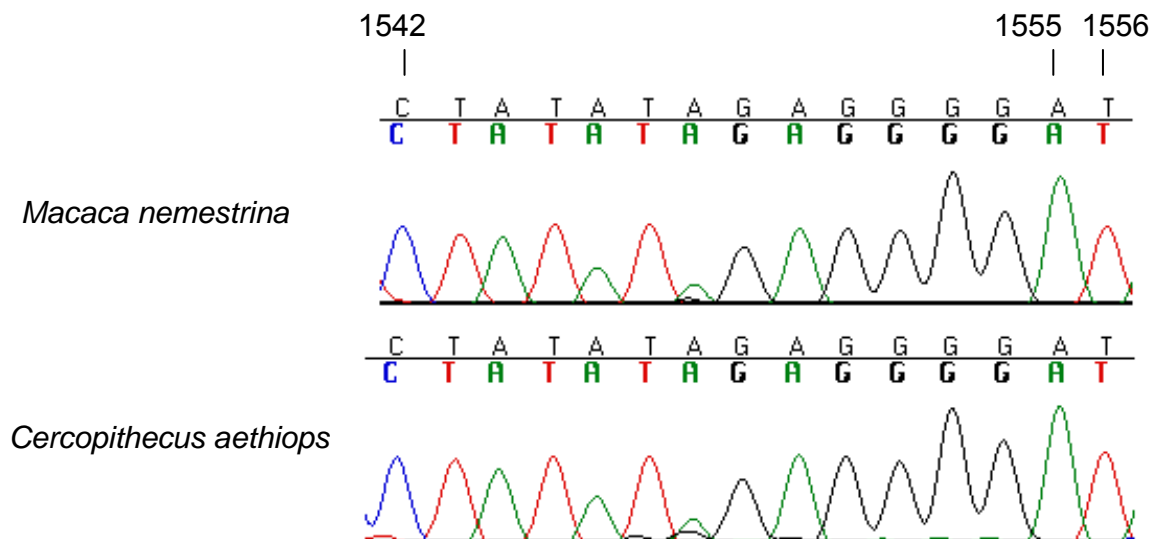


Fig.3.18. Electroferograma de un segmento del gen *MT-RNR1* (12S rRNA) de células de macaco y de cercopiteco. Se han marcado las posiciones m.1542, m.1555 y m.1556.

Pudimos confirmar de nuevo el origen *Cercopithecidae* de estas células, ya que la combinación de las variantes m.1542C y m.1556T, no se encontró en más de 3000 secuencias humanas, ni en otros primates más filogenéticamente relacionados con el *Homo sapiens* (Pacheu-Grau, Gomez-Duran et al. 2011), pero si en estas líneas celulares. Además, pudimos comprobar que no existe una transición en la posición m.1555 que compensara la presencia de la mutación m.1494C>T, en ambas líneas celulares.

La proteína ribosomal mitocondrial S12 (MRPS12) es un componente muy importante del sitio decodificante (Vila-Sanjurjo, Lu et al. 2007) y se han descrito interacciones compensatorias entre esta proteína ribosomal y variantes en el rRNA (O'Connor, De Stasio et al. 1991). Por ello, comparamos la secuencias de esta proteína en humano, en *Macaca mulatta* y en dos ortólogos bacterianos, para buscar posibles diferencias que compensaran la presencia de la mutación situada en el mt-rRNA. Esta comparación se puede observar en la siguiente figura (Fig. 3.19).



Fig.3.19. Alineamiento de las secuencias de la proteína MRPS12 de macaco, humano, *Thermus thermophilus* y *Escherichia coli*. Se muestra subrayado la secuencia de importe a la mitocondria y en rojo se muestran los cambios entre las secuencias de macaco y humano.

Se encontraron 5 diferencias entre la proteína madura de humano y macaco (es decir, sin considerar la secuencia de importe a la mitocondria). Los aminoácidos Cisteína 64, Arginina 68, Treonina 101, Glutamina 106 e Isoleucina 107 en humano corresponden con Serina 64, Leucina 68, Asparragina 101, Histidina 106 y Valina 107 en macaco. Para valorar la importancia funcional de estas posiciones, analizamos su índice de conservación (IC) en 41 especies de vertebrados y obtuvimos un 10%, 97.5%, 25%, 15% y 25%, respectivamente. Además, empleando la herramienta **Consurf** obtuvimos unos valores de 5, 9, 1, 7 y 4 respectivamente, donde 9 indica totalmente conservada y 1 nada conservada. Curiosamente, la posición arginina 68 está conservada en todos los vertebrados excepto en macacos, como se puede ver en la siguiente figura (**Fig. 3.20**).



Fig. 3.20. Alineamiento de 41 secuencias de la proteína MRPS12 en vertebrados. Se ha marcado la posición de la Arginina 68. En rojo se ha marcado la Leucina 68, presente en macaco.

Utilizando la secuencia del ortólogo bacteriano *Thermus thermophilus*, se modelaron estas diferencias en la estructura secundaria de la proteína ribosomal y se estudiaron las posibles interacciones con el rRNA, como se puede observar en la siguiente figura (Fig.3.21).

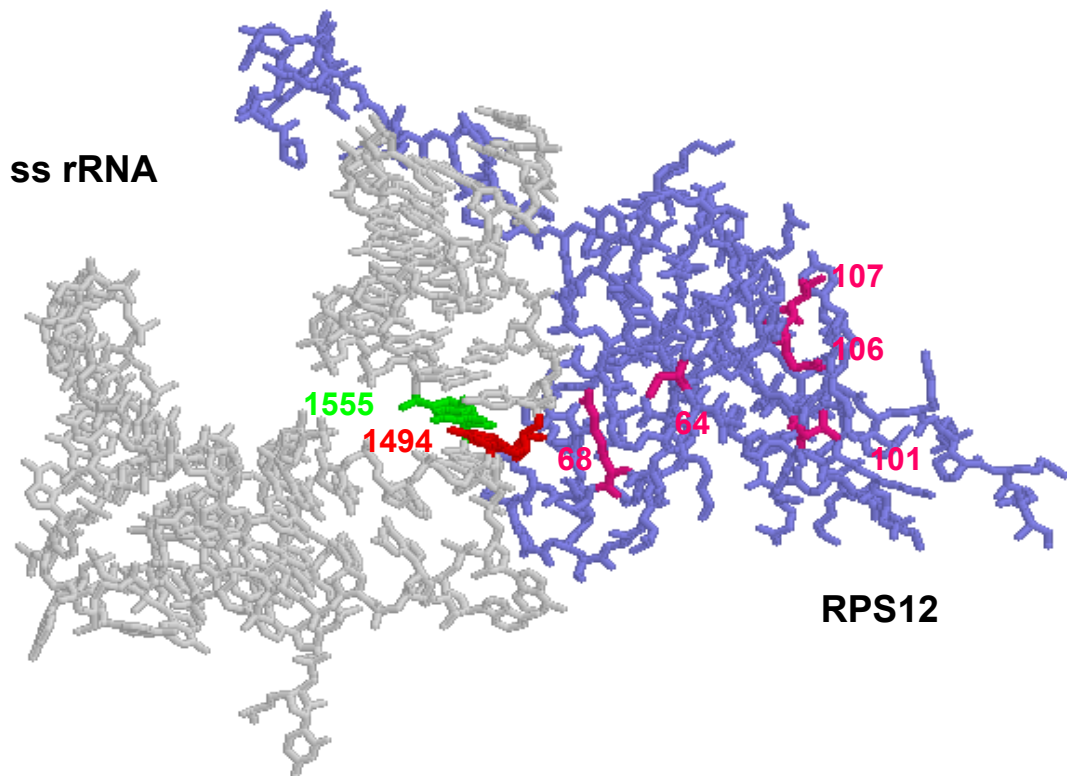


Fig.3.21. Representación de la interacción entre el rRNA 12S (en gris) y la proteína MRPS12 (en azul). En color morado se aprecian los cinco aminoácidos (S64, L68, N101, H106 y V107) presentes en la secuencia de macaco. En verde y rojo se encuentran las posiciones 1555 y 1494 del rRNA 12S respectivamente.

Pudimos observar que de todas las diferencias encontradas entre la proteína ribosomal S12 humana y de macaco, el cambio R>L en la posición 68, parece interactuar directamente con la mutación m.1494T en el mt-rRNA. Por otro lado el cambio de un aminoácido básico (arginina) por uno apolar (leucina) podría modificar la naturaleza de las interacciones producidas entre la proteína y el rRNA.

De todas las especies de vertebrados estudiadas, solo en *Macaca mulatta*, primate perteneciente a los *Cercopithecidae* se encontró una Leucina en la posición 68. La Arginina estaba conservada en el resto de especies de vertebrados analizadas. También pudimos observar que esta posición está adyacente a un motivo proteico (KPKKPNSA) que está totalmente conservado en vertebrados y que parece ser vital para la función de esta proteína (Shah, O'Dell et al. 1997). Además, mutaciones en la proteína RPS12 en *Escherichia coli* en posiciones equivalentes a las posiciones 64, 68 y 106 confieren a la bacteria un fenotipo restrictivo (Agarwal, Gregory et al. 2011), que confiere resistencia a los errores de traducción inducidos por aminoglicósidos (Maisnier-Patin, Paulander et al. 2007). Por lo tanto, parece que esta posición puede ser funcionalmente importante y que la familia de los *Cercopithecidae* presenta una mutación en ella, que podría explicar la compensación de la mutación m.1494C>T en estas especies.

A continuación, para comprobar que las dos líneas celulares que hemos utilizado en este estudio (*Macaca nemestrina* y *Cercopithecus aethiops*), portaban este cambio de aminoácido, secuenciamos la proteína madura MRPS12, en estas células. En la siguiente figura (**Fig. 3.22**) podemos ver un segmento del electroferograma de esta proteína.

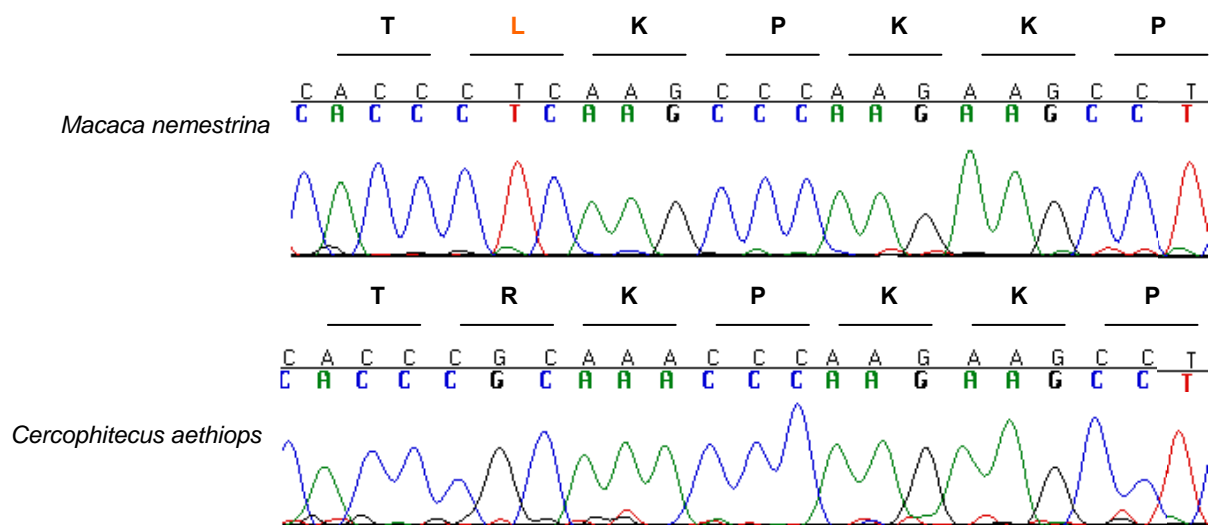


Fig.3.22. Electroferograma de un segmento del gen de la proteína MRPS12 de células de macaco y de cercopiteco. En la parte superior de cada electroferograma se ha indicado el aminoácido correspondiente a cada triplete de nucleótidos. En rojo se ha marcado el aminoácido Leucina 68.

Curiosamente, encontramos que solo las células de *Macaca nemestrina* portaban una Leucina en la posición 68, mientras que las células de *Cercopithecus aethiops* tenían una Arginina en esa posición, al igual que ocurre en humanos. Esto podría explicar el comportamiento diferencial cuando estas células fueron tratadas con aminoglicósidos.

4.5. La variación genética en la proteína MRPS12 podría actuar como un factor modificador para explicar la penetrancia incompleta de la mutación m.1494C>T en humanos.

Se han descrito numerosos factores que podrían modificar la susceptibilidad a la sordera no-sindrómica familiar o inducida por aminoglicósidos (Fischel-Ghodsian 1999). Los resultados obtenidos en células de la familia de primates *Cercopithecidae* indican que quizás la variación genética en la proteína MRPS12 podría actuar como un factor de susceptibilidad en la sordera causada por mutaciones heredadas del mtDNA y explicar la penetrancia incompleta de la mutación m.1494C>T. De hecho, se han encontrado 6 posiciones polimórficas en humanos dentro de la proteína madura. Son los cambios R44G, L58P, T67S, R68C, R84W y V125I. Para comprobar la importancia funcional de estas posiciones, medimos su IC y obtuvimos un 35%, 97.5%, 20%, 97.5%, 100% y 85% respectivamente. Además, utilizando la herramienta **Consurf**, los valores de índice de conservación fueron 1, 7, 7, 9, 9 y 7, respectivamente. Curiosamente, los polimorfismos encontrados en humanos afectan posiciones altamente conservadas. A continuación, se modelaron estas posiciones en la estructura de la proteína ribosomal y se estudiaron sus interacciones con el rRNA, como se puede observar en la siguiente figura (**Fig.3.23**).

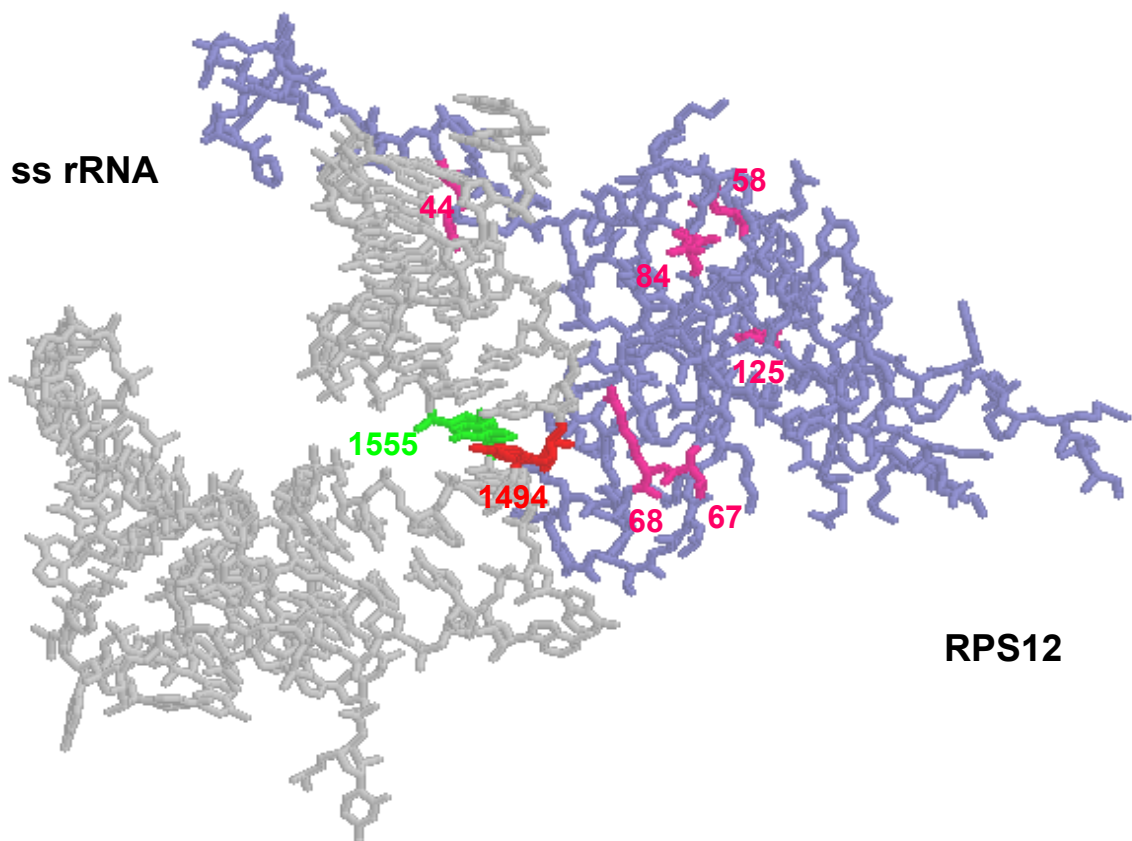


Fig.3.23. Representación de la interacción entre el rRNA 12S (en gris) y la proteína MRPS12 (en azul). En color morado se aprecian los 6 aminoácidos (R44, L58, T67, R68, R84 y V125) que son polimórficos en humanos. En verde y rojo se encuentran las posiciones 1555 y 1494 del rRNA 12S respectivamente.

La posición R68 se encuentra muy próxima (menos de 6 Å) a la posición m.1494. El resto de polimorfismos se encuentran bastante alejados de esta posición en el rRNA.

Se han considerado mutaciones patológicas en la proteína ribosomal S12 como posibles causantes de sordera autosómica dominante, y se ha secuenciado esta proteína en dos familias con sordera asociada al gen *DFNA4* y en controles, sin embargo no se encontró ninguna mutación que pudiera explicar el fenotipo en estos pacientes (Shah, Toompuu et al. 2001). Para confirmar el papel de las variantes R68, C68 u otros aminoácidos de la proteína MRPS12, en esta patología, se deberían estudiar familiares maternos con la mutación m.1494C>T en homoplasmia, que hubieran sido tratados con aminoglicósidos, y que hubieran desarrollado o no sordera. Sin embargo, en ninguno de los pedigríes publicados con esta mutación, se informó si los

miembros del mismo con audición normal, habían sido tratados con aminoglicósidos (Zhao, Li et al. 2004; Rodríguez-Ballesteros, Olarte et al. 2006; Wang, Li et al. 2006; Zhu, Qian et al. 2006; Han, Dai et al. 2007; Yuan, Chen et al. 2007). Por este motivo, secuenciamos la proteína MRPS12 madura en 21 pacientes de la enfermedad de Ménière, que habían sufrido una laberintectomía química utilizando gentamicina. 10 se quedaron sordos tras el tratamiento y 11 permanecieron normales tras el mismo. Sin embargo, no encontramos ningún cambio de aminoácido en la proteína que pudiera explicar el fenotipo.

5. Estudio evolutivo de la mutación patológica m.1555A>G en el mt-rRNA 12S.

Una de las mutaciones descrita como patológicas en los mt-rRNAs, la m.1555A>G, es el alelo *wild-type* en algunas especies de mamíferos, entre ellas el orangután, una especie filogenéticamente cercana a los humanos. Para intentar explicar como una mutación patológica en humanos se ha fijado en el genoma mitocondrial del orangután, se plantearon varias hipótesis, como la de un efecto fundador, la ineficacia de la selección natural debido a fenotipos post-reproductivos o la presencia de mutaciones compensatorias.

5.1. La transición m.1555A>G en orangután es una mutación antigua.

Para descartar la mutación m.1555 A>G como un error en la secuencia de referencia del mtDNA de orangután, que fuera un polimorfismo privado del animal utilizado para realizar esa secuenciación, o un posible efecto fundador, obtuvimos las secuencias de referencia del gen que codifica para el mt-rRNA 12S (donde se encuentra la mutación) del orangután de Borneo (*Pongo pygmaeus*) y del orangután de Sumatra (*Pongo abelii*) así como 15 secuencias parciales de ese gen de ambas especies. En las 17 secuencias podemos ver como hay presente una guanina en la posición 1555 tal y como se muestra a continuación (**Fig. 3.24**).

	1542	155115551556
<i>Homo sapiens</i> (NC_012920)		TTATATAGAGGAGAC
<i>Pan paniscus</i> (NC_001644)		TTATATAGAGGAGAT
<i>Pongo pygmaeus</i> (NC_001646)		CTATATAGAAGAGGC
<i>Pongo pygmaeus_ora#001</i> (AB050156)		CTATATAGAAGAGGC
<i>Pongo pygmaeus_ora#002</i> (AB050157)		CTATATAGAAGAGGC
<i>Pongo pygmaeus_ora#003</i> (AB050158)		CTATATAGAAGAGGC
<i>Pongo pygmaeus_ora#006</i> (AB050161)		CTATATAGAAGAGGC
<i>Pongo pygmaeus_ora#007</i> (AB050163)		CTATATAGAAGAGGC
<i>Pongo pygmaeus_ora#014</i> (AB050170)		CTATATAGAAGAGGC
<i>Pongo pygmaeus_ora#015</i> (AB050171)		CTATATAGAAGAGGC
<i>Pongo abelii</i> (NC_002083)		CTATATAGAGGAGGC
<i>Pongo abelii_ora#005</i> (AB050160)		CTATATAGAGGAGGC
<i>Pongo abelii_ora#008</i> (AB050164)		CTATATAGAGGAGGC
<i>Pongo abelii_ora#009</i> (AB050165)		CTATATAGAGGAGGC
<i>Pongo abelii_ora#010</i> (AB050166)		CTATATAGAGGAGGC
<i>Pongo abelii_ora#011</i> (AB050167)		CTATATAGAGGAGGC
<i>Pongo abelii_ora#012</i> (AB050168)		CTATATAGAGGAGGC
<i>Pongo abelii_ora#013</i> (AB050169)		CTATATAGAGGAGGC
<i>Pongo abelii_ora#016</i> (AB050172)		CTATATAGAGGAGGC

Fig. 3.24. Alineamiento de las 2 secuencias de referencia del mt-rRNA 12S de orangután de Sumatra, orangután de Borneo y 15 secuencias parciales de ambas especies.

Dado que las dos especies de orangután divergieron hace 400.000 años, y que ambas tienen la mutación, la mutación no solo está conservada sino que además es una variante antigua.

5.2. La selección natural está actuando sobre la posición 1555.

Podemos descartar la ineficacia de la selección natural debido a un fenotipo post-reproductivo de la mutación, ya que si observamos el pedigrí arabo-israelí donde se describió por primera vez esta mutación (Prezant, Agapian et al. 1993), podemos ver que 53 de los 55 miembros sordos sufrieron la pérdida de audición durante la infancia o en la niñez temprana. Otro posible factor, que podría hacer que la selección natural no actuara en esta posición del mtDNA, sería que la sordera mitocondrial producida por la misma fuera específica de varones, por lo que las mujeres no tendrían ningún impedimento para transmitir la mutación a las siguientes generaciones. Sin embargo en el mismo pedigrí arabo-israelí podemos observar que 26 de los 53 miembros sordos eran mujeres. En cualquier caso, esto no confirma la actuación de la selección natural sobre esta variante genética del mtDNA. Para poder

comprobar esto directamente, obtuvimos las secuencias del gen *MT-RNR1* de 316 especies de mamíferos, estudiamos el índice de conservación (IC) de la posición 1555 y lo comparamos con la conservación media de 20 posiciones (escogidas cada 50 nucleótidos) dentro del mismo gen, para tener una idea de su conservación. A continuación, se pueden observar estos resultados en la siguiente figura (**Fig. 3.25**).

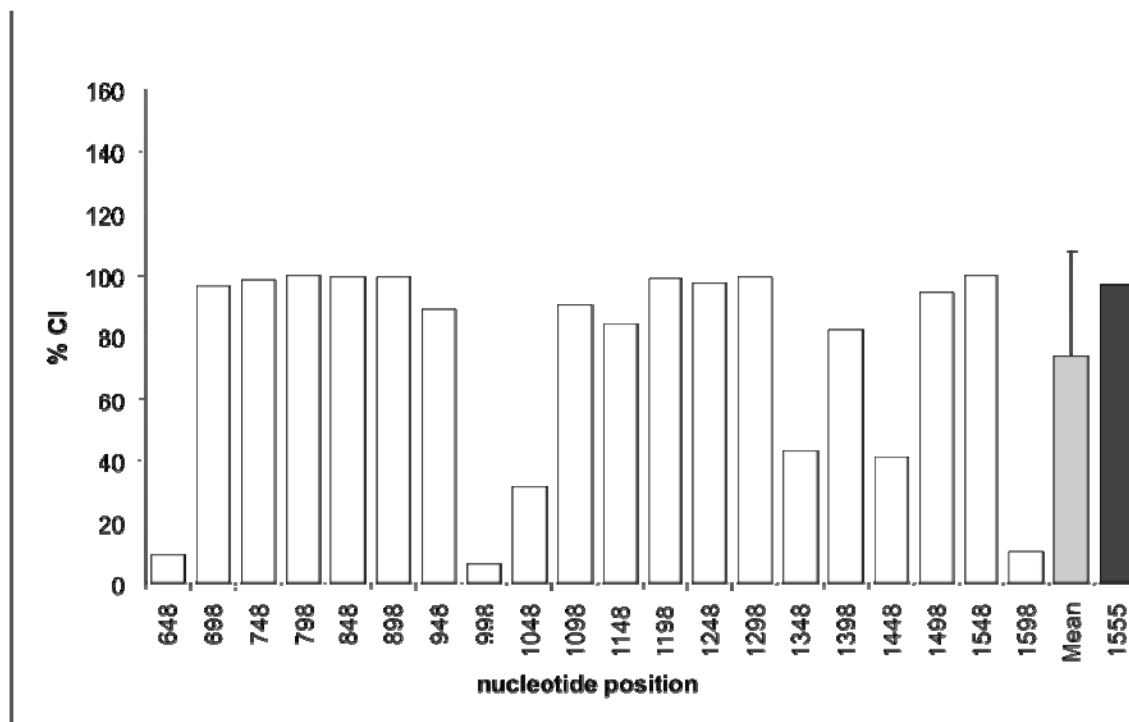


Fig. 3.25. Índice de conservación (IC) del gen mt-rRNA 12S y la posición 1555. Se ha representado el IC de 20 posiciones dentro del gen, separadas cada 50 nucleótidos (posiciones m.648, m.698, m.748 y así sucesivamente), la media del IC de esas posiciones y el IC de la posición 1555.

La variante m.1555A está conservada en 306 de 316 especies de mamíferos analizadas (IC= 96,8 %) mientras que el índice de conservación medio del gen mt-rRNA 12S es 70,2 %. Esto indica que la selección negativa actúa de hecho en la posición 1555.

Se ha descrito que los orangutanes tienen gasto de energía por masa corporal de los menores de todos los mamíferos euterianos, debido a un metabolismo energético bastante bajo (Pontzer, Raichlen et al. 2010). Quizás esta adaptación biológica fuera acompañada de un relajamiento mutacional en

CAPITULO 3

los genes del sistema OXPHOS (directamente implicado en la producción de energía) codificados en el mtDNA. Para comprobar esta posibilidad, analizamos en el mtDNA del orangután 40 mutaciones en tRNAs y 2 en rRNAs mitocondriales, descritas en humanos como patológicas (Prezant, Agapian et al. 1993; McFarland, Elson et al. 2004; Zhao, Li et al. 2004). Solo dos (m.1555A>G y m.5703G>A) eran el alelo *wild-type* en orangután. Sin embargo la mutación m.5703G>A (localizada en el tRNA asparragina) estaba compensada por una transición en la base complementaria (m.5687C>T), como se puede ver en la siguiente figura (Fig. 3.26).

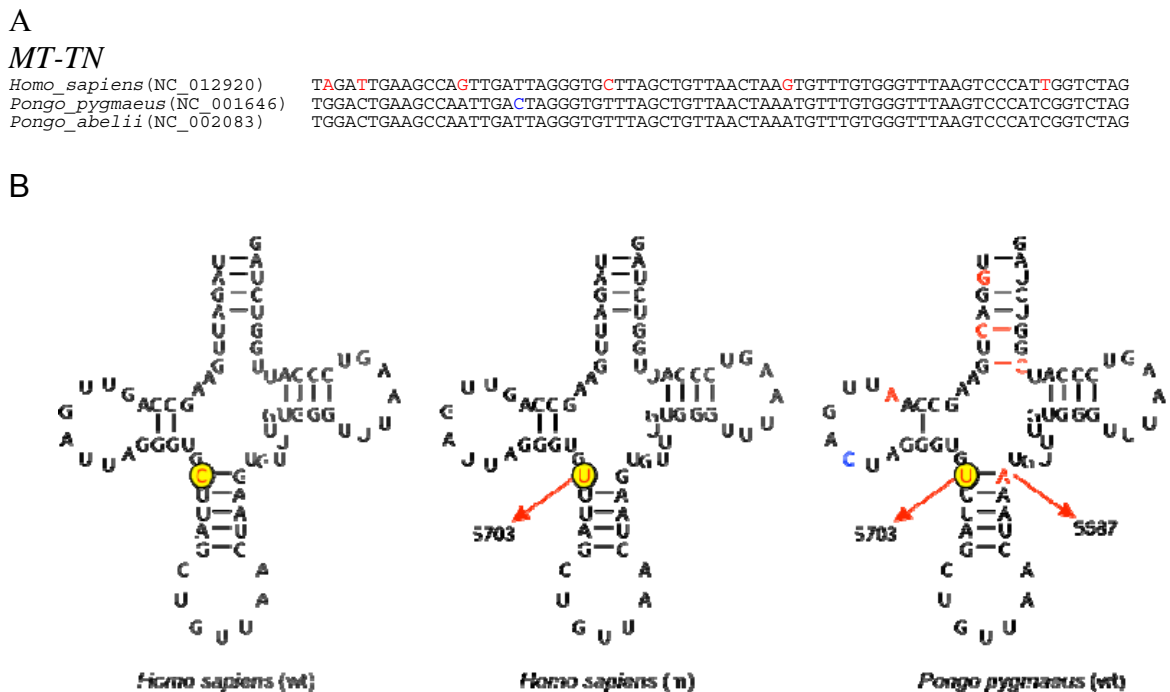


Fig.3.26. Diferencias entre el tRNA Asn de humano y orangután. Las diferencias entre estas especies están marcadas en rojo, y las diferencias entre las subespecies de orangután están marcadas en azul. A) Alineamiento de secuencias. Los números de acceso de GenBank están entre paréntesis. B) La mutación patológica en el mtDNA humano m.5703C>U, que es el alelo *wild-type* en orangután ha sido compensada por la transición m.5687G>A.

5.3. Mutaciones compensatorias no son la causa de la fijación de la mutación m.1555A>G en orangután.

Una posible explicación para la fijación de mutaciones causantes de enfermedades y que se producen en proteínas y tRNAs codificados en el

mtDNA es la presencia de mutaciones compensatorias (Kern and Kondrashov 2004; Azevedo, Carneiro et al. 2009). También se han descrito mutaciones compensatorias en los mt-rRNAs (Springer, Hollar et al. 1995).

Para comprobar esta hipótesis en el caso de la mutación m.1555G en orangután, comparamos la secuencia del mt-rRNA 12S en esta especie y en homo sapiens, y como podemos ver en la siguiente figura (**Fig. 3.27**), aunque existen mutaciones compensatorias en las hélices 39 y 40 del sitio decodificante del orangután, la mutación m.1555A>G no ha sido compensada por una transición m.1494C>T en la posición complementaria.

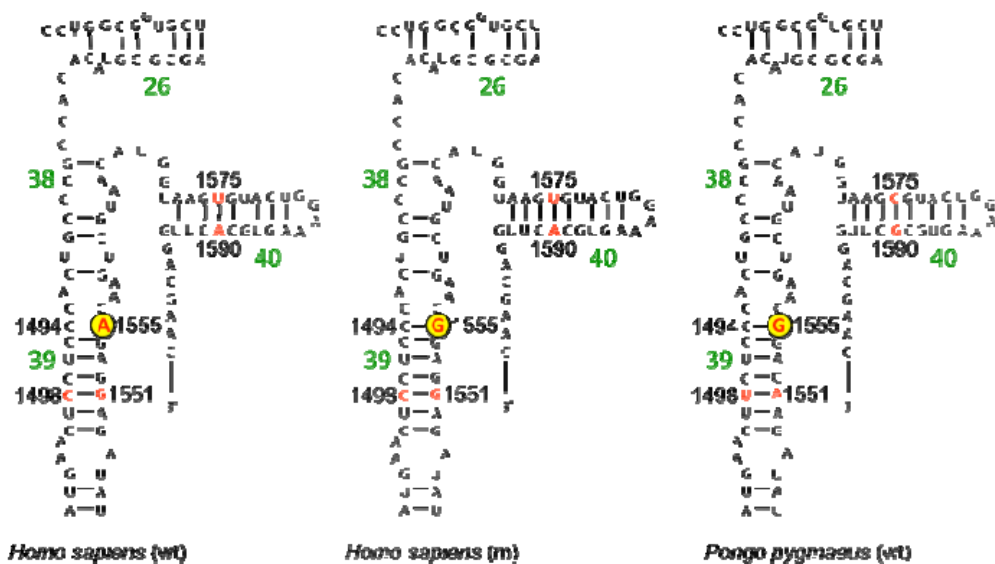


Fig.3.27. Mutaciones compensatorias en el sitio decodificante del mt-rRNA 12S. En rojo se marcan aquellas transiciones presentes en el orangután de Borneo y que se encuentran compensadas. En amarillo podemos ver la mutación m.1555A>G. Los números de las hélices se indican en verde, y wt y m denotan *wild-type* y mutante respectivamente.

La proteína ribosomal S12 (MRPS12) es un componente fundamental del sitio decodificante en la subunidad pequeña del mito-ribosoma. Se han descrito mutaciones compensatorias proteína-rRNA que podrían explicar la fijación de la mutación m.1555A>G. Por esta razón, se compararon las secuencias de esta proteína entre orangután y humano, tal y como se muestra en la siguiente figura (**Fig. 3.28**):

CAPITULO 3

```

Homo_sapiens MRPS12 (NP_203527)      MSWSGLLHGLNTSLTCGPALVPRLWATCSMATLNQMHLGPPK-RPPRKL 49
Pongo_abelii MRPS12 (NP_001125594)  MSWSGPLRGLNTSLTCGPALVPRLWATCSMATLNQMHLGPPK-RPPQKL 49
Thermus_thermophilus_S12 (AAG38586)  -----NQLVRKGREKVRKSKV 17

Homo_sapiens MRPS12 (NP_203527)      GPTEGRPQLKGVVLCFTFRKPKKPNNSANRKCCRVRLSTGREAVCFIPGEG 99
Pongo_abelii MRPS12 (NP_001125594)  GPTEGRPQLKGVVLCFTFRKPKKPNNSANRKCCRVRLSTGQEAVCFIPGEG 99
Thermus_thermophilus_S12 (AAG38586)  PALKGAPFRRGCTVVRTVTPKKPNSALRKVAKVRLTSGYEVTAIIPGEG 67

Homo_sapiens MRPS12 (NP_203527)      HTLQEHQIVLVEGGRTQDLPGVKLTVVVRGKYDCGHVQKK----- 138
Pongo_abelii MRPS12 (NP_001125594)  HTLQEHQIVLVEGGRTQDLPGVKLTVVVRGKYDCGHVQKK----- 138
Thermus_thermophilus_S12 (AAG38586)  HNLQEHSVVLIIRGGRVKDLPGVRYHIVRGVYDAAGVKDRKKSRSKYGTKK 117

Homo_sapiens MRPS12 (NP_203527)      -----
Pongo_abelii MRPS12 (NP_001125594)  -----
Thermus_thermophilus_S12 (AAG38586)  PKEAAKTAACK 128

```

Fig.3.28. Alineamiento de las secuencias de la proteína MRPS12 de orangután, humano y *Thermus thermophilus*. En rojo se muestran los cambios entre las secuencias de orangután y humano. Subrayada se muestra la secuencia de importe a la mitocondria.

Los dos únicos cambios entre las proteínas maduras de ambas especies son las argininas en posiciones 18 y 60 en humano (R18 y R60) que equivalen a dos glutaminas en las posiciones 18 y 60 (Q18 y Q60) en orangután. No se conoce la estructura cristalina del ribosoma mitocondrial en mamíferos, por lo tanto utilizamos un ortólogo bacteriano (*Thermus thermophilus*) y en él modelamos la estructura de la proteína MRPS12 para comprobar si los dos cambios observados en la secuencia de orangután, podrían estar compensando la presencia de la mutación m.1555G en el mt-rRNA 12S. Como ilustra la siguiente figura (**Fig. 3.29**), las dos glutaminas en posiciones 18 y 60 presentes en la proteína MRPS12 de orangután parecen bastante alejadas de la región del rRNA donde se encuentra la posición 1555. Por lo que tampoco parece existir en este caso una compensación proteína-rRNA que pudiera explicar la fijación de esta mutación patológica en el genoma mitocondrial del orangután.

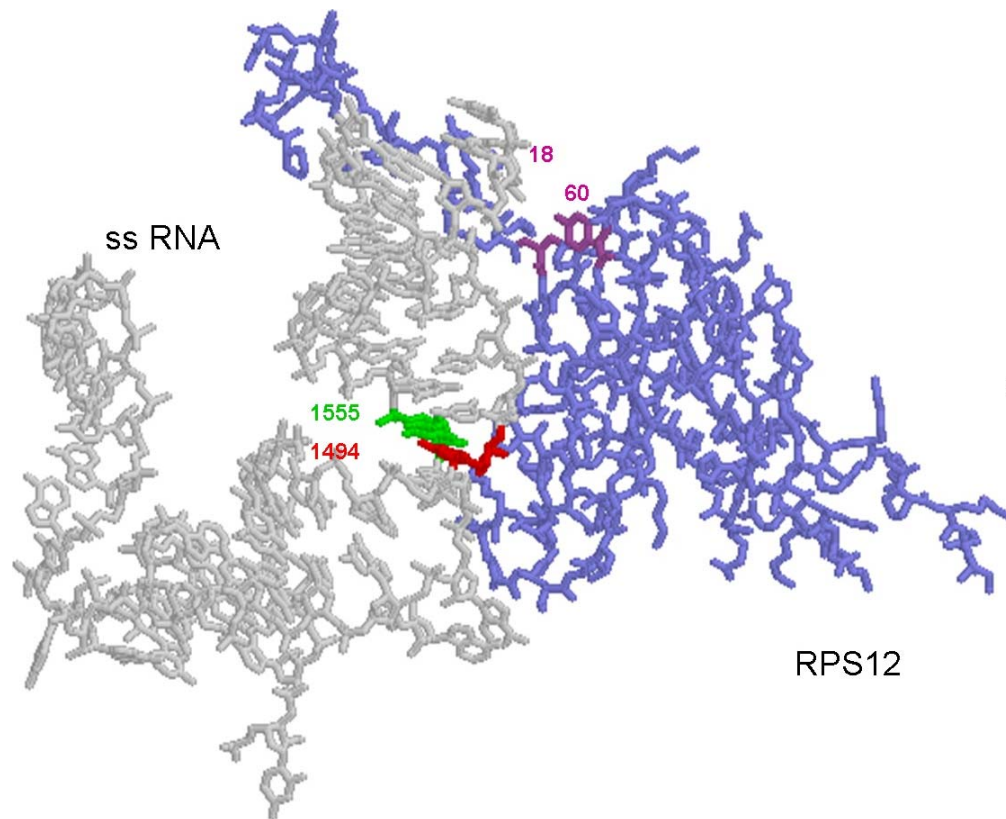


Fig.3.29. Representación de la interacción entre el rRNA 12S (en gris) y la proteína RPS12 (en azul). En color morado se aprecian los dos aminoácidos (Q18 y Q60) presentes en la secuencia de orangután. En verde y rojo se encuentran las posiciones 1555 y 1494 del rRNA 12S, respectivamente.

Con estos análisis habríamos descartado mutaciones compensatorias estructurales, tanto inter como intra-génicas. Sin embargo todavía podrían existir mutaciones compensatorias de tipo funcional, como se ha descrito que ocurre para explicar la permanencia en la población de una mutación patológica homoplásmica en un mt-tRNA (Moreno-Loshuertos, Ferrin et al. 2011). La mutación m.1555A>G produce una hipermetilación de las posiciones m.1583A y m.1584A del mt-rRNA 12S, induciendo una señal retrograda de biogénesis mitocondrial y predisponiendo a las células a una muerte celular inducida por estrés (Cotney, McKay et al. 2009). Quizás, una rRNA metiltransferasa mitocondrial (MTFB1) menos activa en orangután, podría compensar funcionalmente la presencia de la mutación en el mt-rRNA. Por ello comparamos la secuencia de esta proteína en humano y orangután y solo encontramos una variación entre ambas en un dominio encargado de la

metilación (O'Farrell, Scarsdale et al. 2004). Esto se ilustra en la siguiente figura (Fig. 3.30).

```

Homo_sapiens_MTFB1(AAH05183)      MAASGKLSTCRLLPPLPTIREIIKLLRLQAAKQLSQNFLDLLRLTDKIVRK 50
Pongo_abelii_MTFB1(NP_001126887) MAASGKLSTWRLLPPLPTIREIIKLLRVQAAKQLSQNFLDLLRLTDKIVRK 50
Escherichia_coli_KsgA(P06992)    --MNNRVHQHGL-----ARKRFGQNFLNDQFVIDSIVSA 32

Homo_sapiens_MTFB1(AAH05183)      AGNLTNAVYVEVGPGGITRSILNADVAELLVVEKDTRFIPGLQMLSDA 100
Pongo_abelii_MTFB1(NP_001126887) AGNLTNAVYVEVGPGGITRSILNADVAELLVVEKDTRFVPGLQMLSDA 100
Escherichia_coli_KsgA(P06992)    INPQKGQAMVEIGPGLAALTEPVG-ERLDQLTVIELDRDLAARLQTHPFL 81
                                     I      II

Homo_sapiens_MTFB1(AAH05183)      APGKLRIVHGDVLTFFKVEKAFSESLKRPWEDDPPNVHIIIGNLPFSVSTPL 150
Pongo_abelii_MTFB1(NP_001126887) APGKLRIVHGDVLTFFKVEKAFSESLKRPWEDDPPDVHIIIGNLPFSVSTPL 150
Escherichia_coli_KsgA(P06992)    GP-KLTIYQODAMTFNFG-ELAEMKQPLR-----VFGNLPYNISTPL 122
                                     III      IV

Homo_sapiens_MTFB1(AAH05183)      IIKWLENISCRDGPFFVYGRTQMTLTFQKEVAERLAANTGSKQRSRLSVMA 200
Pongo_abelii_MTFB1(NP_001126887) IIKWLENISCRDGPFFVYGRTQMTLTFQKEVAERLAANTGSKQRSRLSVMA 200
Escherichia_coli_KsgA(P06992)    MFHLES-----YTDAIADMHFMLQKEVVNRLVAGPNSKAYGRLSVMA 164
                                     V      VI

Homo_sapiens_MTFB1(AAH05183)      QYLCNVRHIFTIPGQAFVVPKPEVDVGVVHFTP-LIQPKIEQPFKLVEVV 249
Pongo_abelii_MTFB1(NP_001126887) QYLCNVRHIFTIPGRAFVVPKPEVDVGVVHFTP-LIQPKIEQPFKLVEVV 249
Escherichia_coli_KsgA(P06992)    QYYCNVIVPLEVPPSAFTPPPKVDSAVVRLVPHATMPHVKDVRVLSRIT 214
                                     VII      VIII

Homo_sapiens_MTFB1(AAH05183)      QNVFQFRRYCHRGLRMLFPEAQRLESTGRLLLELADIDPTLRPQLSISH 299
Pongo_abelii_MTFB1(NP_001126887) QNVFQFRRYCHRGLRMLFPEAQRLESTGRLLLELADVDPTLRPQPSISH 299
Escherichia_coli_KsgA(P06992)    TEAFNQRRTIRNSLGNLF-----SVEVLTGMGIDPAMRAENISVAQ 256

Homo_sapiens_MTFB1(AAH05183)      FKSLCDVYRKMCDEDPQLFAYNFREELKRRKSKKKKKKKKKK-- 341
Pongo_abelii_MTFB1(NP_001126887) FKSLCDVYRKMCDEDPQLFAYNFREELKQKSKNEEKEEDDAEN 343
Escherichia_coli_KsgA(P06992)    YCQMANYLAENAPLQES----- 273
    
```

Fig.3.30. Alineamiento de la secuencia de MTFB1 en orangután, humano y su ortólogo en *Escherichia coli*. Los dominios importantes para la metilación se denotan por números romanos en color azul, y en rojo podemos ver los cambios entre las secuencias de orangután y humano.

Para poder ver la posible influencia de este cambio en la metilación del mt-rRNA, utilizamos la estructura cristalina de un ortólogo bacteriano (*Escherichia coli*) del MTFB1 y situamos esta posición junto con las adeninas diana en el rRNA. Esto lo podemos ver en la siguiente figura (Fig. 3.31).

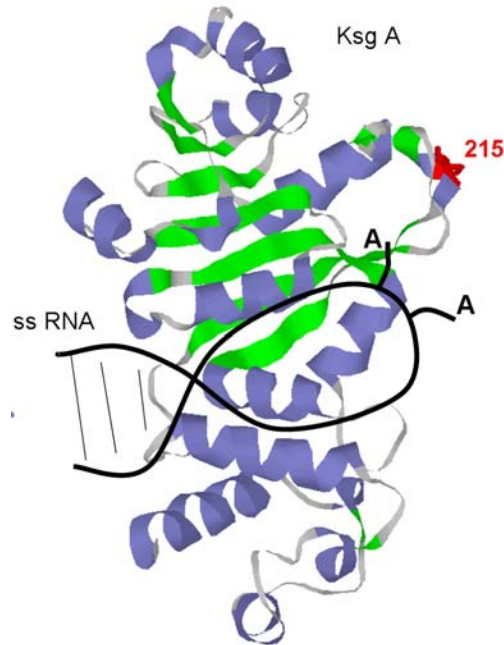


Fig. 3.31. Interacción entre el MTFB1 (se ha representado el ortólogo bacteriano KsgA) y el rRNA de la subunidad pequeña ribosomal. En rojo vemos el cambio encontrado en la secuencia de orangután modelado en la estructura bacteriana y en negro las dos adeninas diana (m.1583A y m.1584A).

La Arginina 215 (R215) de orangután no interactúa con la hélice del rRNA donde se encuentran las adeninas diana. Por lo tanto no parece haber mutaciones compensatorias ni estructurales ni funcionales de los elementos más relacionados con el mt-rRNA 12S que puedan explicar la fijación de la mutación m.1555A>G en orangután.

5.4. Elección de las líneas celulares y confirmación del origen de las especies.

Dado que ninguna de las anteriores hipótesis parecen explicar la fijación de esta mutación patológica en orangután, es posible que la posición m.1555G tenga penetrancia incompleta y requiera un co-factor para producir su efecto patológico (Guan, Fischel-Ghodsian et al. 2001). De hecho los aminoglicósidos disparan la pérdida de audición en individuos que portan esta mutación y sus efectos se han confirmado en líneas celulares transmitocondriales (Prezant, Agapian et al. 1993). La posición equivalente a la m.1555 en el rRNA bacteriano (16S rRNA) forma un par de bases Watson-Crick con el nucleótido

en la posición 1494, unión que resulta importante para la interacción con los aminoglicósidos. El mt-rRNA 12S humano *wild-type* carece de este apareamiento de bases, pero este se reconstruye con la mutación m.1555A>G (Hobbie, Akshay et al. 2008). Por todo esto, decidimos estudiar el efecto de los aminoglicósidos sobre las células de orangután, para comprobar si la mutación m.1555A>G realmente tenía un papel funcional en esta especie y si los aminoglicósidos constituían una condición de estrés para estas células. Para realizar el estudio elegimos cuatro líneas celulares:

- 1-Fibroblastos primarios de explante de piel de orangután (*Pongo pygmaeus*).
- 2-Cíbrido transmitocondrial de la línea de osteosarcoma humano 143B y que porta la mutación m.1555G como control positivo.
- 3-Fibroblastos primarios de explante de piel de bonobo (*Pan paniscus*) como control negativo.
- 4- Cíbrido transmitocondrial de la línea de osteosarcoma humano 143B y que porta la variante m.1555A como control negativo.

Primero comprobamos la especie y el genotipo en cada línea celular mediante secuenciación. El nucleótido m.1542C no se ha encontrado en más de 3000 secuencias humanas ni en 37 secuencias de bonobo pero está presente en el mtDNA de orangután. Por otro lado, la variante m.1556T no se ha encontrado en más de 3000 secuencias humanas ni en 17 secuencias de orangután pero se encuentra en el mtDNA de bonobo. Por esto, los genotipos T/T, T/C y C/C en las posiciones m.1542 y m.1556 confirman que estas líneas celulares pertenecen a las especies de bonobo, humano y orangután respectivamente, tal y como podemos ver en la siguiente figura (**Fig. 3.32**).

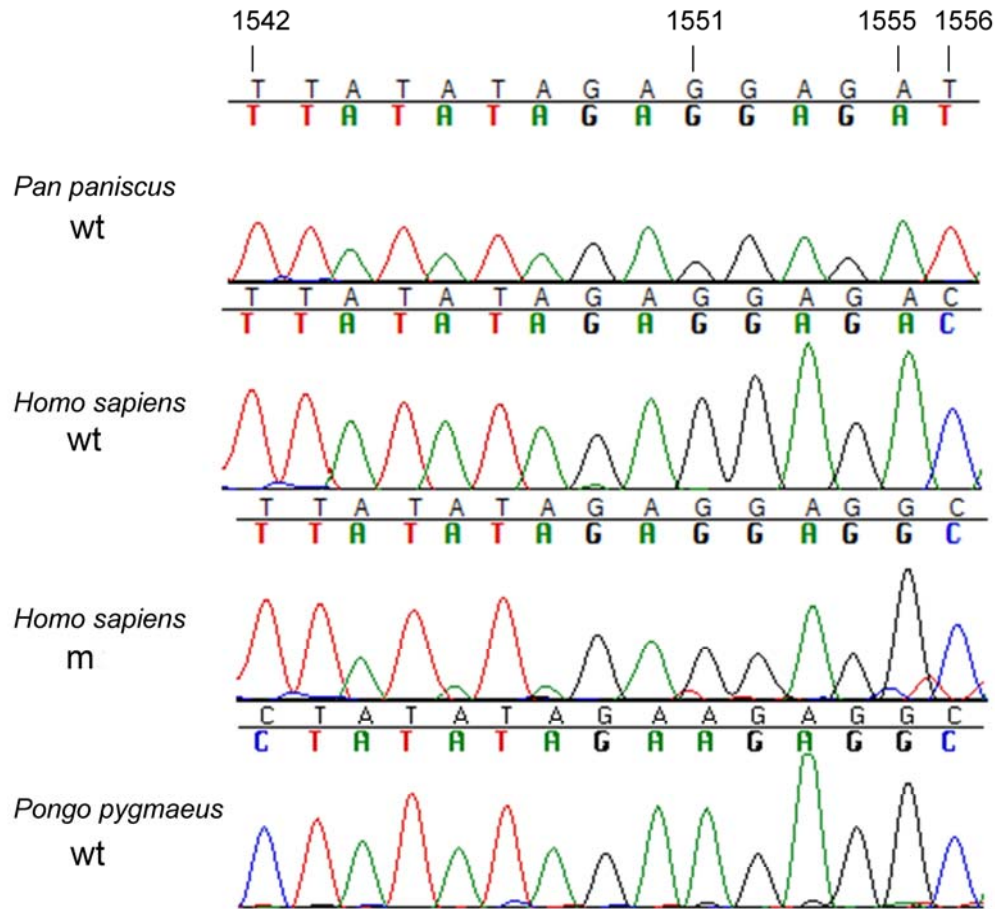


Fig.3.32. Electroferograma de un segmento del gen del mt-rRNA 12S de células de humano, bonobo y orangután. *Wt* y *m* representan *wild-type* y mutante respectivamente.

La variante m.1551A muestra que los fibroblastos de orangután pertenecen a la subespecie de orangután de Borneo (*Pongo pygmaeus*). Además la presencia de la mutación m.1555A>G confirma, junto con los resultados anteriores, que esta mutación no es un error en la secuencia de referencia del orangután o una variante privada.

5.5. Los aminoglicósidos afectan el crecimiento de las células de orangután.

Cuando existen defectos en el sistema OXPHOS, las células cultivadas en medio de cultivo enriquecido con galactosa y que no contiene glucosa no pueden sintetizar el ATP necesario por glucólisis y el crecimiento celular se inhibe (Robinson, Petrova-Benedict et al. 1992). Crecimos las células en medio de galactosa sin y con 2 mg/ml de paromomicina. Después de 72 horas, la

línea celular humana *wild type* y la de bonobo crecieron de la misma forma tanto con antibiótico como sin él. Sin embargo, la línea celular humana mutante y la de orangután mostraron una menor tasa de crecimiento en presencia del antibiótico. Esto se puede observar en la siguiente figura (Fig. 3.33).

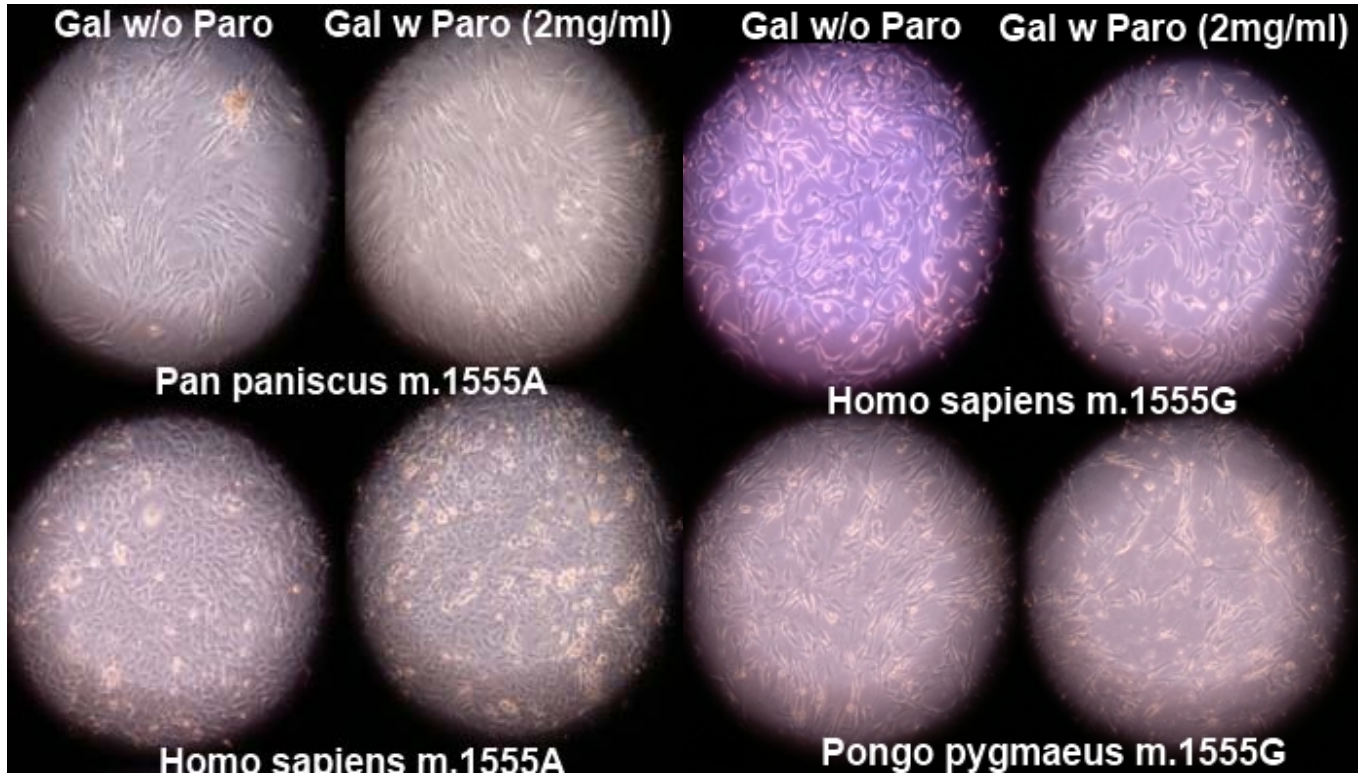


Fig. 3.33. Fotografías obtenidas a partir de microscopía óptica y representativas del crecimiento celular a las 72 h de las distintas líneas celulares en medio de cultivo enriquecido con galactosa, en presencia o ausencia de 2 mg/ml de paromomicina.

El uso de otro aminoglicósido, como la geneticina o G418, también produjo una inhibición del crecimiento de las células humanas mutantes y de las células de orangután pero no de las células de bonobo. Debido al mayor efecto de este antibiótico, la inhibición del crecimiento pudo verse ya a las 48 horas de cultivo, como se muestra a continuación (Fig. 3.34).

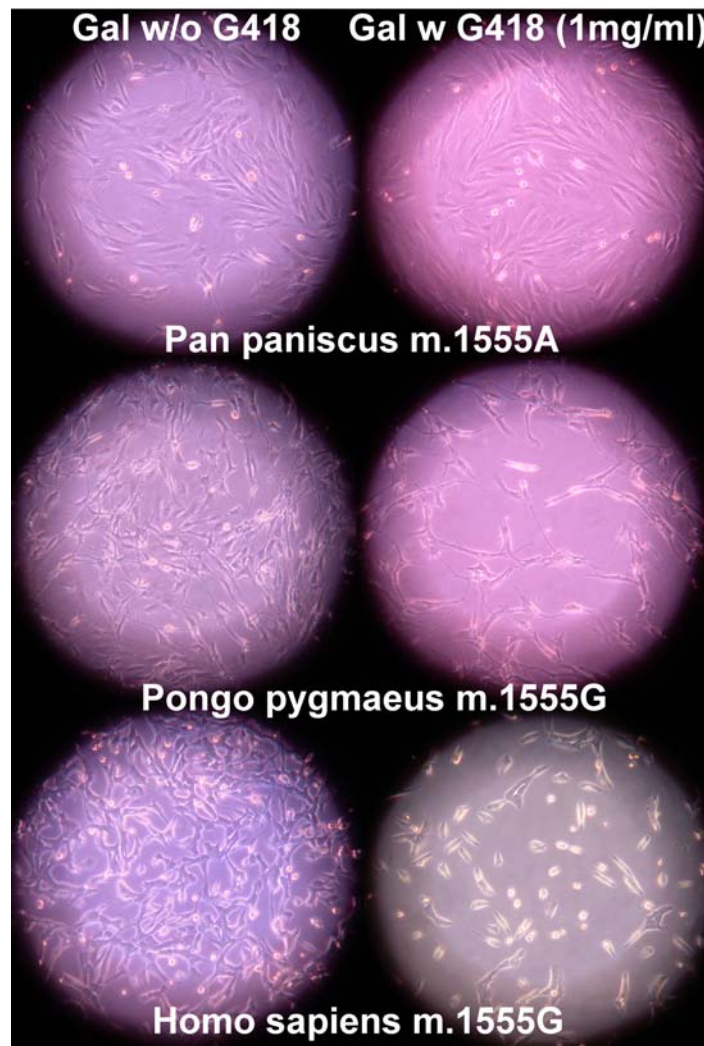


Fig. 3.34. Fotografías obtenidas a partir de microscopía óptica y representativas del crecimiento celular a las 48h de las distintas líneas celulares en medio de cultivo enriquecido con galactosa, en presencia o ausencia de 1 mg/ml de Geneticina (G418).

5.6. Los aminoglicósidos afectan negativamente la función OXPPOS de orangután.

Dado que los aminoglicósidos tienen abundantes aminoácidos con carga positiva, pueden unirse a partículas cargadas negativamente como son RNAs no ribosómicos o incluso fosfolípidos (Hermann 2007; Hainrichson, Nudelman et al. 2008). Por la tanto, quizás la menor tasa de crecimiento de la línea celular de orangután no estaba relacionada con una inhibición del sistema OXPPOS. Para evidenciar un posible efecto OXPPOS de los aminoglicósidos sobre esta línea celular, y dado que las subunidades catalíticas del complejo IV

respiratorio están codificadas en el mtDNA, realizamos un ensayo de actividad de complejo IV *in gel*. Tras 72 horas de incubación con 2 mg/ml de paromomicina, la línea celular de orangután experimentó una disminución en la actividad *in gel* del complejo IV, si la comparamos con la misma línea celular pero sin antibiótico, mientras que las líneas celulares humanas y de bonobo no experimentaron ninguna disminución. Podemos apreciar esto en la siguiente figura (**Fig. 3.35**).

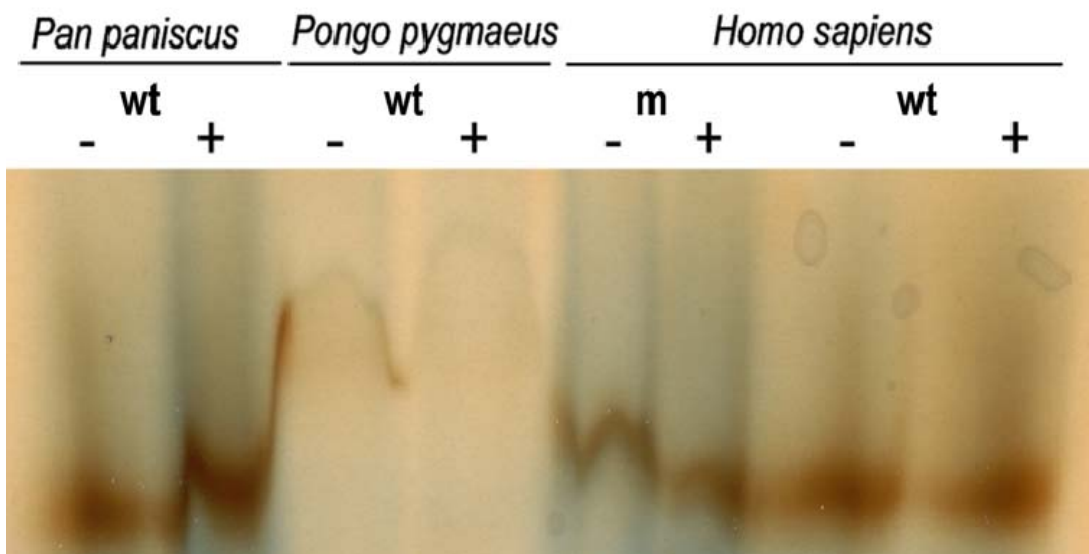


Fig.3.35. Actividad de complejo IV *in gel*. – y + indican ausencia o presencia de 2 mg/ml de paromomicina respectivamente. M y wt indican mutante y *wild type* respectivamente.

Sin embargo este ensayo no es cuantitativo. Por ello, medimos por espectrofotometría la actividad específica del complejo IV después de incubar las células durante 72 horas en presencia o ausencia de 2 mg/ml de paromomicina. No hubo diferencias en la actividad específica del complejo IV entre las células humanas *wild type* o en las células de bonobo tratadas y sin tratar con el antibiótico. Sin embargo esta actividad fue significativamente menor en células humanas mutantes y en células de orangután tratadas con aminoglicósidos. Esto se muestra en la siguiente figura (**Fig. 3.36**).

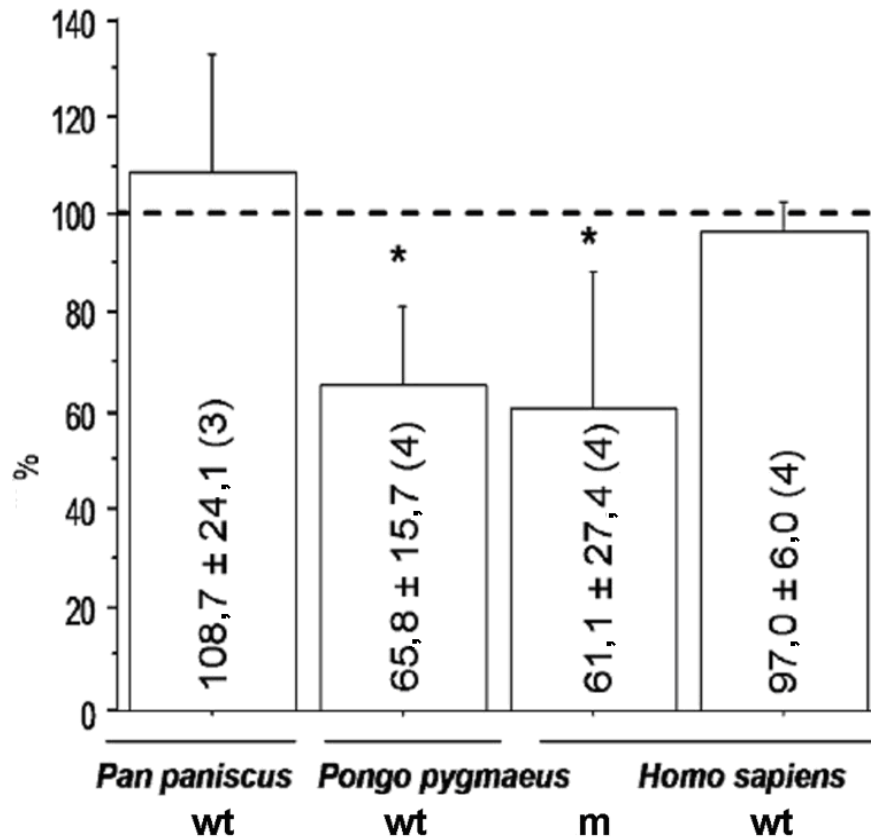


Fig. 3.36. Actividad específica del complejo respiratorio IV. La actividad específica de cada línea celular sin antibiótico se ha establecido como 100%. * denota diferencias significativas con la línea celular sin antibiótico. Wt y m denotan wild type y mutante respectivamente. En cada barra se indica la media \pm desviación estándar (n° ensayos).

También observamos que el efecto de los aminoglicósidos era dependiente de la dosis, ya que al incubar las células de orangután durante 72 horas con 4 mg/ml de paromomicina, la actividad específica del complejo IV disminuía todavía más (52,9 % de la actividad específica de la misma línea sin el antibiótico). Sin embargo la línea celular de bonobo no experimentaba diferencias en la actividad específica de complejo IV en presencia o ausencia de paromomicina a esta concentración. Del mismo modo, se descartó un efecto específico de la paromomicina, repitiendo este ensayo con un aminoglicósido distinto, como es el caso de la estreptomicina. Las células de orangután se incubaron con este antibiótico (100 ng/ml) y la actividad específica volvió a verse inhibida en presencia del aminoglicósido (hasta el 65,88% de la actividad de la misma línea celular sin el antibiótico). Todo ello se puede observar en la siguiente figura (**Fig. 3.37**).

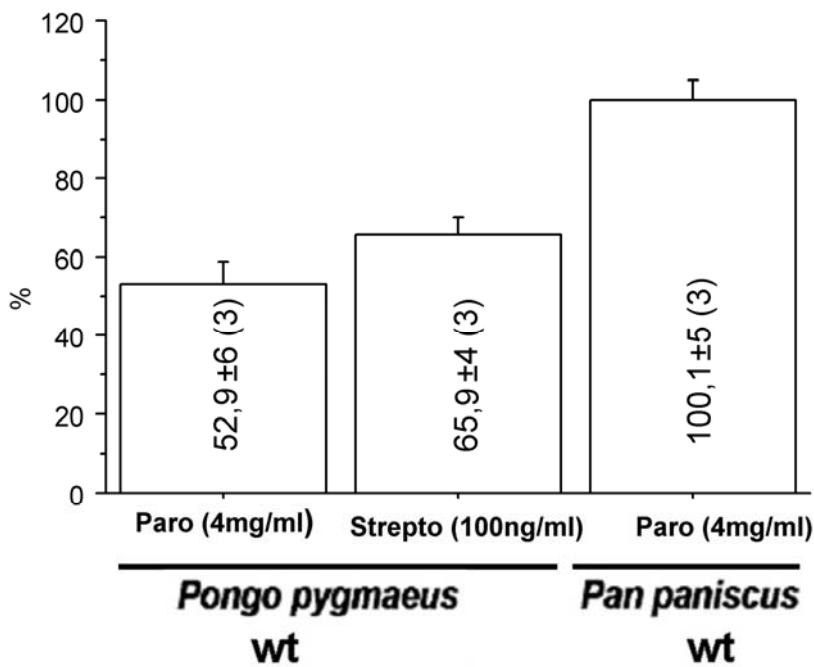


Fig.3.37. Actividad específica del complejo IV respiratorio. La actividad específica de cada línea celular sin antibiótico se ha establecido como 100%. wt denota *wild type*. En cada barra se indica la media \pm desviación estándar (n° ensayos).

Los aminoglicósidos alteran la conformación de los mt-rRNAs, lo que provoca una incorporación errónea de aminoácidos durante la síntesis mitocondrial de proteínas (Zingman, Park et al. 2007). Por lo tanto, para determinar si la menor actividad específica en las células de orangután observada en presencia de aminoglicósidos se debía a la síntesis de subunidades anómalas de complejo IV, o a una menor cantidad de estas subunidades, medimos los niveles totales de complejo IV. Pudimos observar que la cantidad total de complejo IV era también significativamente menor en las células humanas mutantes y en las células de orangután en presencia de 2 mg/ml de paromomicina, como muestra la siguiente figura (**Fig. 3.38**).

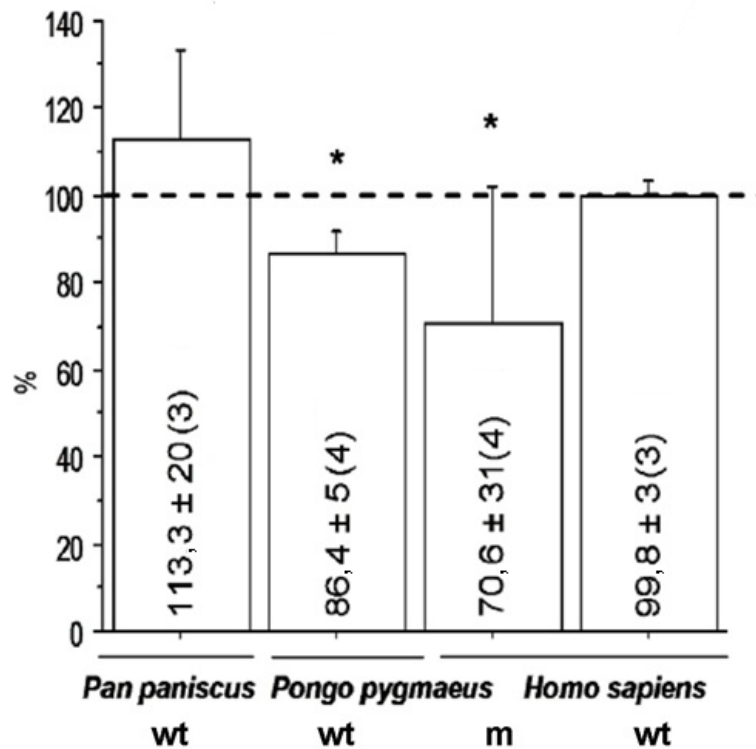


Fig. 3.38. Cantidad de complejo IV. La cantidad de complejo IV de cada línea celular sin antibiótico se ha establecido como 100%. * denota diferencias significativas con la línea celular sin antibiótico. wt y m denotan *wild type* y mutante respectivamente. En cada barra se indica la media \pm desviación estándar (n° ensayos).

De nuevo pudimos comprobar que la inhibición de la cantidad de complejo IV en las células de orangután era dependiente de la dosis de aminoglicósido y que además el efecto no era solo específico de un único antibiótico, paromomicina en este caso. Al incubar las células con 4 mg/ml de paromomicina pudimos observar una mayor disminución en la cantidad de complejo IV (82,7 % de la cantidad de complejo IV de las células sin el antibiótico) y al incubarlas con otro aminoglicósido (estreptomicina 100 ng/ml) la cantidad de complejo IV seguía viéndose afectada (81,3 % de la cantidad de complejo IV de las células sin la estreptomicina). Esto se muestra en la siguiente figura (**Fig. 3.39**).

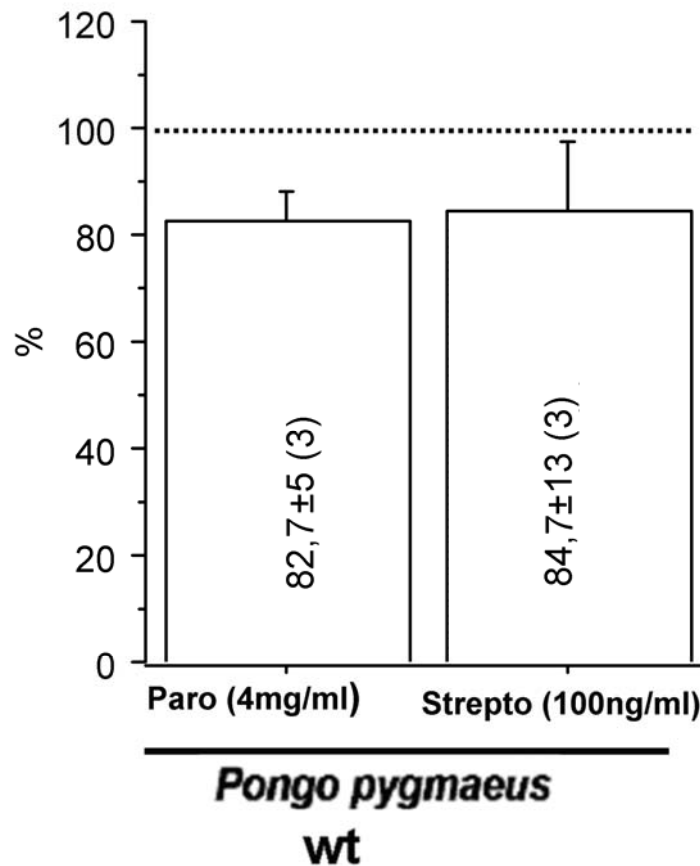


Fig.3.39. Cantidad del complejo respiratorio IV. La cantidad de complejo IV de cada línea celular sin antibiótico se ha establecido como 100%. wt denota *wild type*. En cada barra se indica la media \pm desviación estándar (n° ensayos).

Además de estos resultados, pudimos observar que la actividad específica y la cantidad de complejo IV correlacionaban significativamente ($r = 0.774$, $P = 0.021$). Por lo tanto podemos afirmar que la menor actividad específica de complejo respiratorio IV en las células humanas mutantes y *wild type* de orangután tratadas con aminoglicósidos es debida a una menor cantidad de complejo IV en estas células. Estos resultados se muestran en la siguiente figura (**Fig. 3.40**).

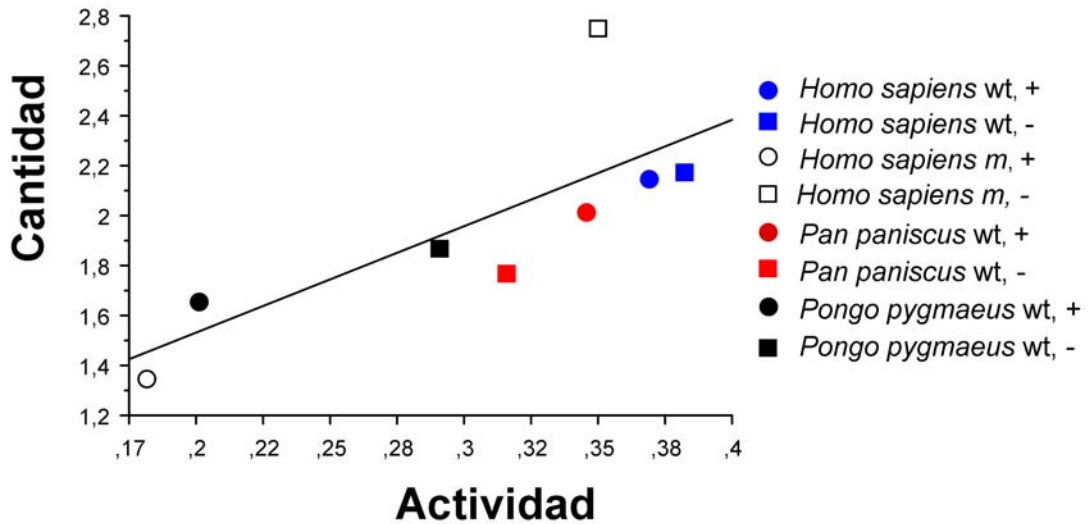


Fig. 3.40. Correlación entre la actividad y cantidad de complejo IV. Wt y m denotan *wild type* y mutante respectivamente. + y - denotan presencia o ausencia de 2 mg/ml de paromomicina respectivamente.

El primer paso en la ruta de ensamblaje del complejo IV es la inserción de la subunidad p.MT-CO1, codificada en el mtDNA, en la membrana interna mitocondrial (Fernandez-Vizarra, Tiranti et al. 2009). La menor actividad y cantidad de complejo IV podría explicarse por una síntesis disminuida de esta subunidad (p.MT-CO1) mitocondrial. Por ello medimos la cantidad de este polipéptido mediante Western blot. Incubamos las células en distintas condiciones, y para normalizar la carga de proteínas en el gel, utilizamos una proteína codificada en el núcleo, actina.

La primera condición que utilizamos fue incubando las células con 2 mg/ml de paromomicina. Los resultados se pueden observar en la siguiente figura (**Fig. 3.41**).

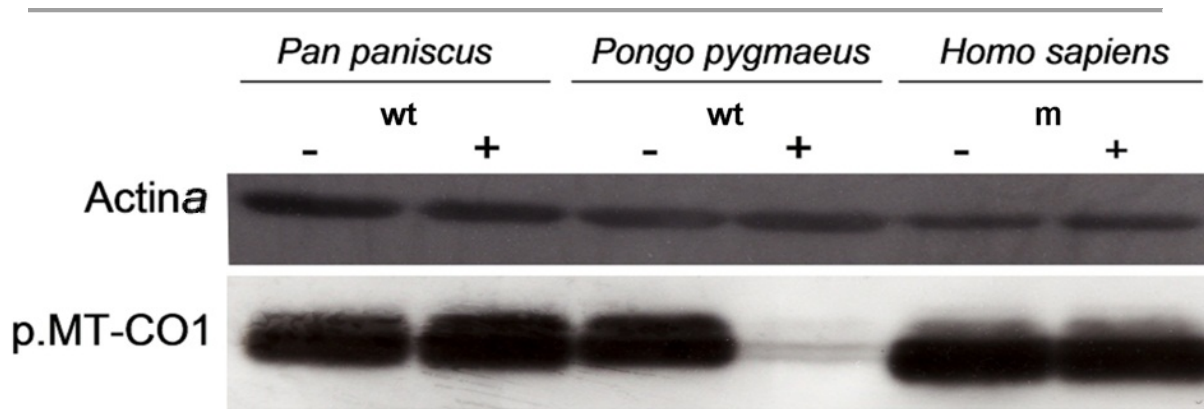


Fig. 3.41. Western blot para la proteína p.MT-CO1. – y + indican la ausencia o presencia de 2 mg/ml de paromomicina respectivamente. Wt y m denotan *wild type* y mutante respectivamente.

Con esta concentración de paromomicina podemos observar una gran inhibición de p.MT-CO1 en la línea celular de orangután. A pesar de que, aparentemente, los niveles de p.MT-CO1 en la línea humana mutante apenas disminuyen al incubarla con el antibiótico, cuando tenemos en cuenta la corrección por la actina, si que podemos observar una ligera inhibición. También realizamos un Western blot incubando las células con 4 mg/ml de paromomicina, esperando obtener una mayor inhibición de esta subunidad mitocondrial en presencia del antibiótico. La siguiente figura (**Fig. 3.42**) muestra una clara inhibición tanto de la línea celular de orangután como de la línea humana mutante y en mayor grado que cuando las mismas células fueron tratadas con solo 2 mg/ml de paromomicina.

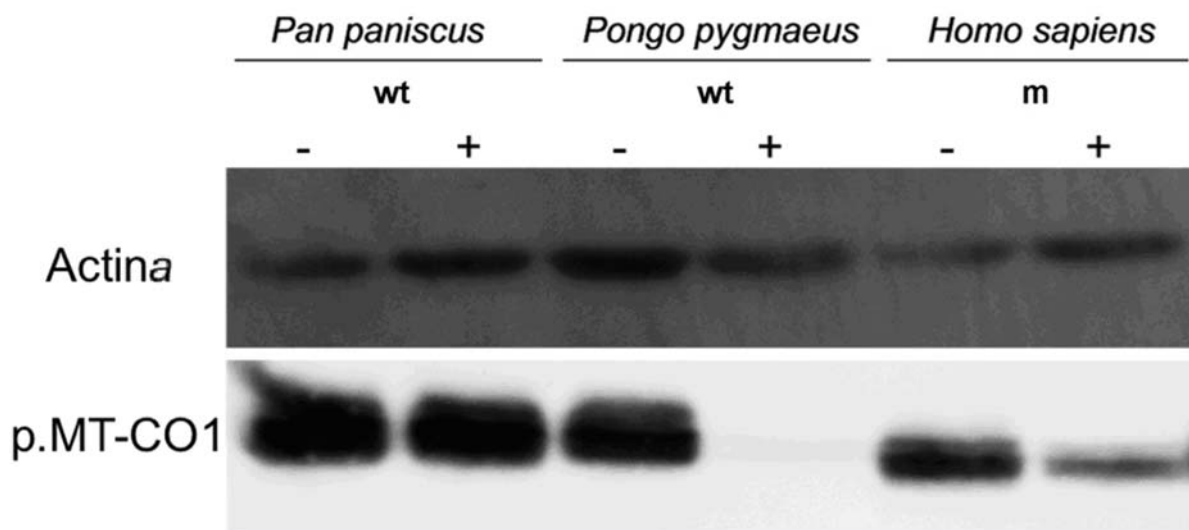


Fig. 3.42. Western blot para la proteína p.MT-CO1. – y + indican la ausencia o presencia de paromomicina (4 mg/ml) respectivamente. Wt y m denotan *wild type* y mutante respectivamente.

Por último, realizamos un Western blot incubando las células en las dos condiciones anteriores, es decir con paromomicina (2 y 4 mg/ml). De nuevo, pudimos observar una inhibición de la subunidad p.MT-CO1 en las células de orangután y en las células humanas mutantes, como se muestra en la siguiente figura (Fig. 3.43).

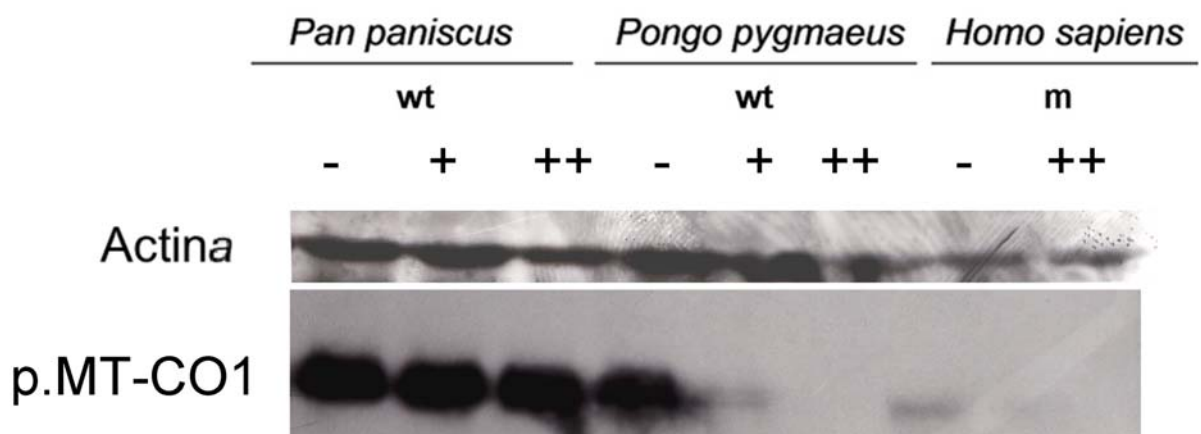


Fig.3.43. Western blot para la proteína p.MT-CO1. – + y ++ indican la ausencia, 2 mg/ml y 4 mg/ml de paromomicina, respectivamente. Wt y m denotan *wild type* y mutante, respectivamente.

La subunidad p. MT-CO1 del complejo IV es solo uno de los 13 polipéptidos del sistema OXPHOS codificados en el mtDNA. Para comprobar el efecto de los aminoglicósidos sobre el resto de subunidades OXPHOS

codificadas en el mtDNA, realizamos un ensayo de síntesis mitocondrial de proteínas en la línea celular de orangután. Esto permite, tras inhibir la síntesis de proteínas citoplasmática, marcar con aminoácidos radioactivos y cuantificar únicamente los polipéptidos mitocondriales.

Para ello incubamos las células en presencia o ausencia de paromomicina (2 mg/ml) durante 72 horas. Para controlar que la cantidad de proteínas totales cargadas en el gel fueran idénticas para todas las líneas celulares y condiciones, teñimos el gel con azul de Coomassie como control de carga. Un ejemplo representativo de estos resultados se muestra a continuación (**Fig. 3.44**).

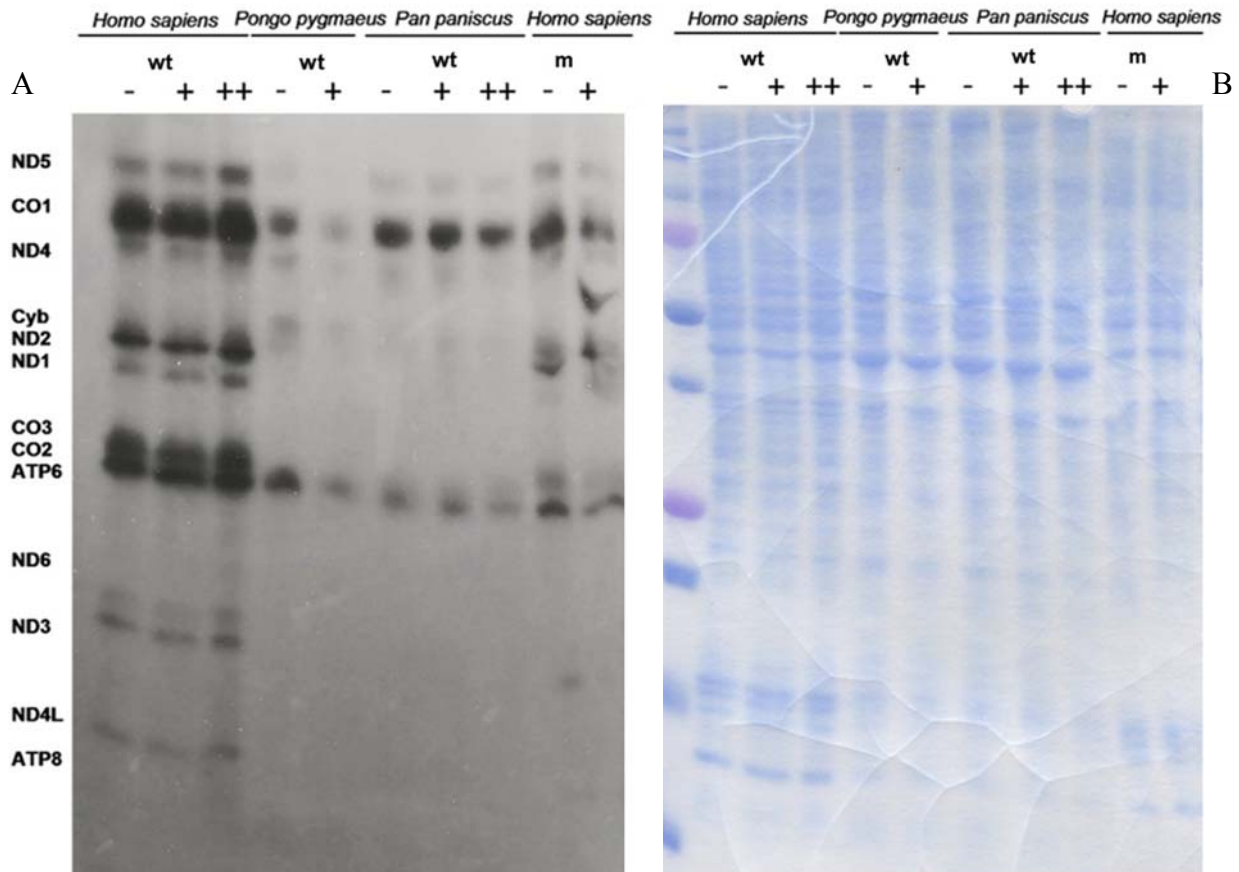


Fig. 3.44. Ejemplo representativo de la síntesis mitocondrial de proteínas. A. Gel de síntesis mitocondrial de proteínas. -, + y ++ indican ausencia, 2 mg/ml y 4 mg/ml de paromomicina, respectivamente. wt y m denotan *wild type* y mutante, respectivamente. A la izquierda de la figura se indica el nombre de la subunidad mitocondrial equivalente a cada banda resuelta del gel. B. Control de carga con azul de Coomassie.

Las líneas celulares *wild type* humana y de bonobo no experimentaron ninguna inhibición en la síntesis de productos de la traducción mitocondrial cuando fueron incubadas con 2 mg/ml de paromomicina, ni tampoco cuando se aumentó la dosis de este aminoglicósido hasta los 4 mg/ml. Sin embargo, la síntesis de las subunidades del sistema OXPHOS codificadas en el mtDNA se vio disminuida en las líneas celulares humana mutante y de orangután cuando fueron incubadas con 2 mg/ml de paromomicina.

Los geles se cuantificaron mediante densitometría de la intensidad de las bandas de dos productos de la traducción mitocondrial. En concreto se cuantificaron las intensidades de las bandas correspondientes a las subunidades mitocondriales p.MT-CO1 y p.MT-ATP6, que se localizaban en la parte superior y media del gel. En la siguiente figura (**Fig. 3.45**) podemos confirmar los resultados cualitativos observados en la imagen del gel de síntesis de proteínas.

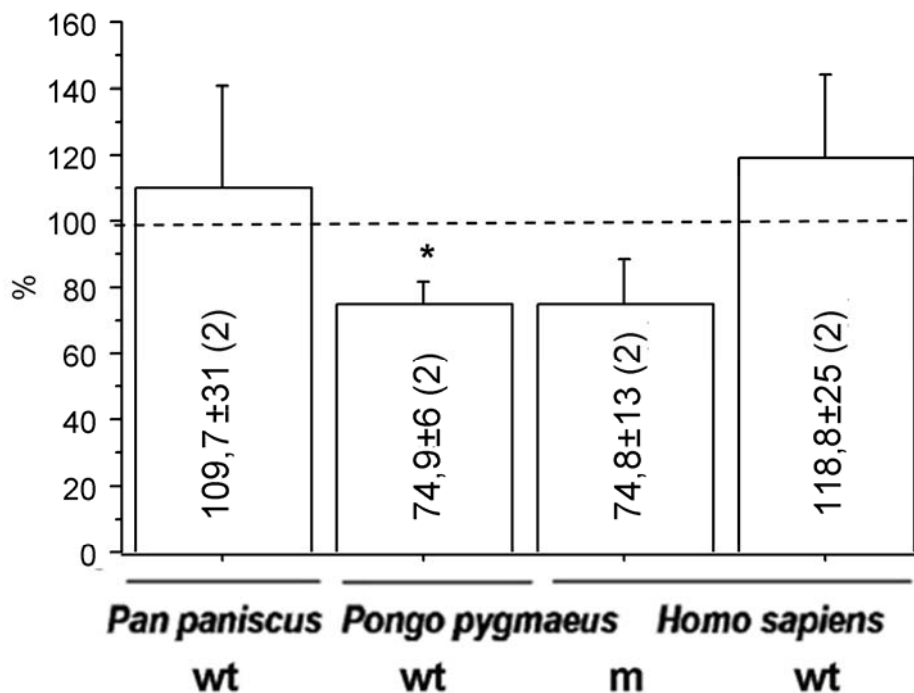


Fig.3.45. Cuantificación de la síntesis mitocondrial de proteínas. Se han cuantificado por densitometría dos bandas (p.MT-CO1 y p.MT-ATP6) para cada línea celular y condición, realizándose la media de la intensidad de las mismas. La síntesis de proteínas de cada línea sin antibiótico se ha establecido como 100%. * denota diferencias significativas con la línea celular sin antibiótico. wt y m denotan *wild type* y mutante respectivamente. En cada barra se indica la media \pm desviación estándar (nº ensayos).

Solo en la línea celular *wild type* de orangután hay una disminución significativa de la síntesis de proteínas mitocondrial en presencia de 2 mg/ml paromomicina comparando con la línea celular incubadas sin el antibiótico.

6. Estudios del efecto de las variantes de de los mt-rRNAs en pacientes con la enfermedad de Ménière.

El estudio del efecto de las variantes genéticas poblacionales de los mt-rRNAs asociadas a determinados fenotipos nos permitirá evaluar si dichas posiciones pueden ser importantes.

Se han estudiado 71 pacientes con la enfermedad de Ménière, a los que se les practicó una laberintectomía química, utilizando para ello inyecciones intratimpánicas del aminoglicósido gentamicina. Se obtuvieron los umbrales tonales medios a 500, 1000 y 3000 Hz antes y después del tratamiento, del peor examen auditivo realizado. Según las guías de la *Academia Americana de Otorrinolaringología- Cirugía de Cabeza y Cuello* para el tratamiento de la enfermedad de Ménière, se consideró que los pacientes sufrieron una pérdida de audición cuando la diferencia entre los umbrales tonales medios antes y después del tratamiento era igual o superior a 10 dB. Según estos criterios, 13 pacientes sufrieron una pérdida de audición tras el tratamiento con la gentamicina intratimpánica, de los cuales 12 fueron incluidos en este estudio. También se incluyeron en el mismo, otros 12 individuos que no sufrieron pérdida de audición tras la laberintectomía química. Debido a la conocida asociación entre el efecto de los aminoglicósidos en la función auditiva y algunas mutaciones en los mt-rRNAs, este estudio trató de encontrar variantes en el mtDNA, y en concreto en los mt-rRNAs, que pudieran explicar esta pérdida de audición en los pacientes de la enfermedad de Ménière.

Dado que los distintos fondos genéticos del mtDNA varían según los continentes, todos los pacientes del estudio tenían el mismo origen étnico. Se tuvo un especial cuidado en que las variables clínicas de estos dos grupos

fueran lo más homogéneas posible. Estas variables clínicas están resumidas en la siguiente tabla (**tabla 3.4**).

Variabes	NPA	PA	P
Edad(años)	52,3 ± 9,3 (12)	54,7 ± 10,0 (12)	NS
Ratio sexo (M/F)	4/8	5/7	NS
Duración enfermedad (años)	11,1 ± 4,1 (12)	9,1 ± 4,1 (12)	NS
Control médico (meses)	30,8 ± 36,2 (12)	18,5 ± 14,6 (12)	NS
Oído afectado (D/I)	8/4	6/6	NS
Estado enfermedad PreT	3,00 ± 0,43 (12)	2,92 ± 0,52 (12)	NS
Escala funcional vértigo PreT	4,50 ± 0,52 (12)	4,75 ± 0,45 (12)	NS
Crisis vértigo PreT (último mes)	10,5 ± 11,2 (12)	9,3 ± 6,3 (12)	NS
UTM PreT (dB)	54,7 ± 12,6 (12)	50,6 ± 11,2 (12)	NS
Dosis primera serie	3,75 ± 0,62 (12)	3,58 ± 0,67 (12)	NS
Dosis otras series	0,75 ± 1,06 (12)	1,45 ± 1,13 (12)	NS
Administración una serie (S/N)	7/5	8/3	NS
Gentamicina (mg)	183,3 ± 49,6 (12)	193,3 ± 50,7 (12)	NS
Estado enfermedad PostT	2,75 ± 0,45 (12)	3,75 ± 0,45 (12)	0,0007
Escala funcional vértigo PostT	1,75 ± 1,22 (12)	2,25 ± 1,29 (12)	NS
Crisis vértigo PostT (mes siguiente)	0,22 ± 0,59 (12)	0,75 ± 1,14 (12)	NS
Control vértigo PostT (A/B/C)	9/2/1	8/3/1	NS
UTM PostT (dB)	49,3 ± 13,1 (12)	84,1 ± 22,4 (11)	0,0001
Inestabilidad vértigo PostT (S/N)	3/9	4/8	NS
Tiempo recurrencia PostT (días)	15,0 ± 37,3 (12)	46,1 ± 111,3 (12)	NS
Tiempo seguimiento PostT (semanas)	43,6 ± 18,3 (12)	22,7 ± 18,9 (12)	0,0086
Otros tratamientos médicos (S/N)	5/7	6/6	NS
Otros tratamientos químicos (S/N)	1/11	1/11	NS
Crisis Turmakin (S/N)	1/11	1/11	NS
Cambio audición subjetivo (S/N)	7/5	9/3	NS
Evolución subjetiva tratamiento (muy bueno/bueno/moderado/malo)	10/2/0/0	5/4/2/1	NS

Tabla 3.4. Variables clínicas en la enfermedad de Ménière en pacientes con o sin pérdida de audición tras el tratamiento con gentamicina. NPA, PA, P, NS, M, F, D, I, PreT, PostT, UTM, dB, S y N denotan no pérdida de audición, pérdida de audición, probabilidad, no significativo, masculino, femenino, derecho, izquierdo, pre-tratamiento, post-tratamiento, umbral tonal medio, decibelios, si y no, respectivamente.

Como se puede observar en la tabla, solamente 3 variables fueron significativamente diferentes entre los grupos *No pérdida de audición* (NPA) y *Pérdida de audición* (PA). Estos parámetros fueron el umbral tonal medio PostT, el estado de la enfermedad PostT y el tiempo de seguimiento PostT. Los dos primeros parámetros evalúan el estado auditivo de los pacientes, y las diferencias muestran por tanto la pérdida de audición del grupo PA. El último parámetro era significativamente más alto en el grupo NPA, descartando una posible pérdida de audición de aparición más tardía.

6.1. Estudio de la influencia de la capacidad basal OXPHOS y del haplogrupo del mtDNA en pacientes con la enfermedad de Ménière.

Se ha demostrado recientemente que algunos fondos genéticos del mtDNA (haplogrupos) pueden afectar la función del sistema OXPHOS (Gomez-Duran, Pacheu-Grau et al. 2010). La función auditiva es muy dependiente del sistema OXPHOS y dado que el mtDNA solo codifica para subunidades de este sistema, comprobamos si existían diferencias basales en él, comparando la actividad específica y cantidad del complejo IV en plaquetas de individuos de los grupos NPA y PA. Podemos ver estos resultados en la siguiente figura (**Fig.3.46**).

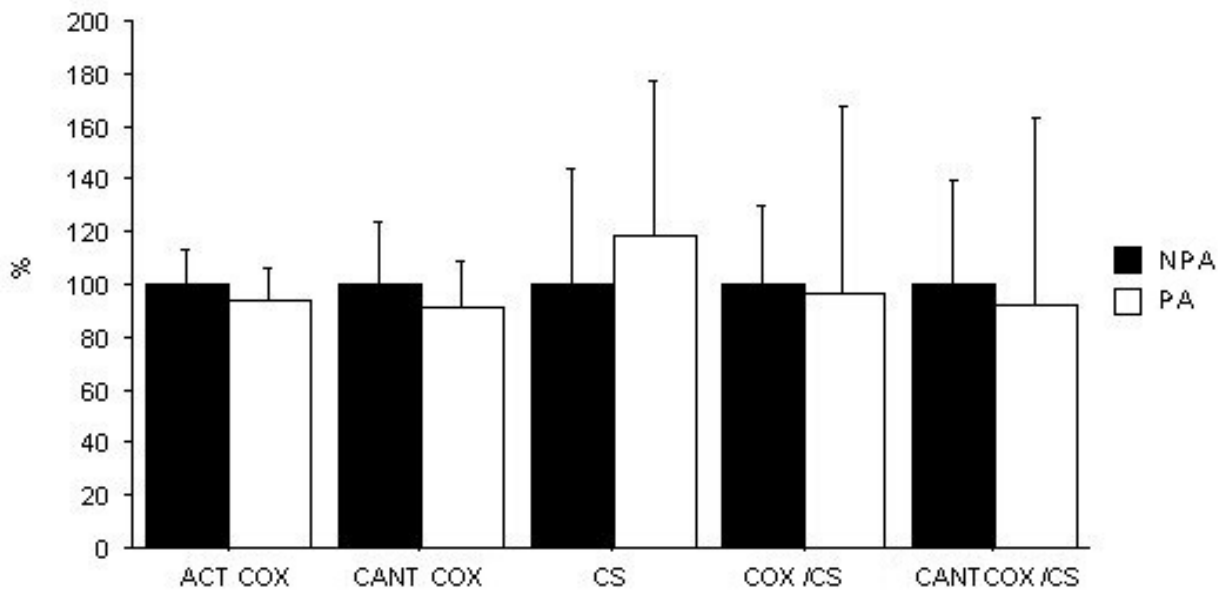


Fig.3.46. Actividad específica y cantidad de la citocromo c oxidasa (COX) y actividad específica de la citrato sintasa (CS) en plaquetas de pacientes de la enfermedad de Ménière. Los valores de los pacientes NPA se han establecido como el 100%. Actividad específica COX - NPA, 100,0 ± 13,5 (12); PA, 94,1 ± 12,3 (11). Cantidad COX - NPA, 100,0 ± 23,4 (12); PA, 91,0 ± 17,8 (11). CS- NPA, 100,0 ± 44,2 (12); PA, 118,7 ± 58,6 (11). Actividad COX normalizada- NPA, 100,0 ± 29,7 (12); PA, 96,7 ± 70,6 (11). Cantidad COX normalizada- NPA, 100,0 ± 39,6 (12); PA, 92,5 ± 70,6 (11).

En la figura podemos observar, que no se encontraron diferencias significativas en ninguna de estas variables entre los dos grupos. Dado que fracción mitocondrial es un parámetro que podría variar entre plaquetas, se normalizaron los valores previos por la actividad específica de la citrato sintasa, un enzima de la matriz mitocondrial. De nuevo, no se encontraron diferencias significativas en los valores normalizados de actividad y cantidad COX.

A continuación, y dado que algunos haplogrupos del mtDNA (haplotipos del mtDNA filogenéticamente relacionados) han sido asociados con problemas de audición (Manwaring, Jones et al. 2007), analizamos la distribución de estos haplogrupos en ambos grupos. Esta distribución se refleja en la siguiente tabla (tabla 3.5).

Hg	NPA	PA
HV	6	6
U	1	1
JT	3	2
O	2	3

Tabla 3.5. Distribución de los haplogrupos del mtDNA en los pacientes de la enfermedad de Ménière con o sin pérdida de audición tras el tratamiento. HV, U y JT son los haplogrupos del mtDNA mayoritarios. O denota otros, que constituyen un grupo heterogéneo con aquellos haplogrupos del mtDNA que no pertenecen a los mayoritarios.

La distribución de haplogrupos mitocondriales entre ambos grupos era prácticamente idéntica, por lo que no se hallaron diferencias significativas entre ellos.

6.2. Búsqueda de mutaciones y estudio de la influencia de variantes poblacionales en los mt-rRNAs en pacientes con la enfermedad de Ménière.

Después de descartar que existieran diferencias basales en la capacidad del sistema OXPHOS entre los pacientes de ambos grupos, y sabiendo que la gentamicina interactúa específicamente con los mt-rRNA, se analizó la presencia de posibles mutaciones en estos genes, que pudieran afectar esta interacción. Esto podría causar un fenotipo diferencial entre ambos grupos. Se buscó la mutación m.1555A>G mediante PCR/RFLP. A continuación (**Fig.3.47**) podemos ver un ejemplo del RFLP para esta mutación, en estas muestras.

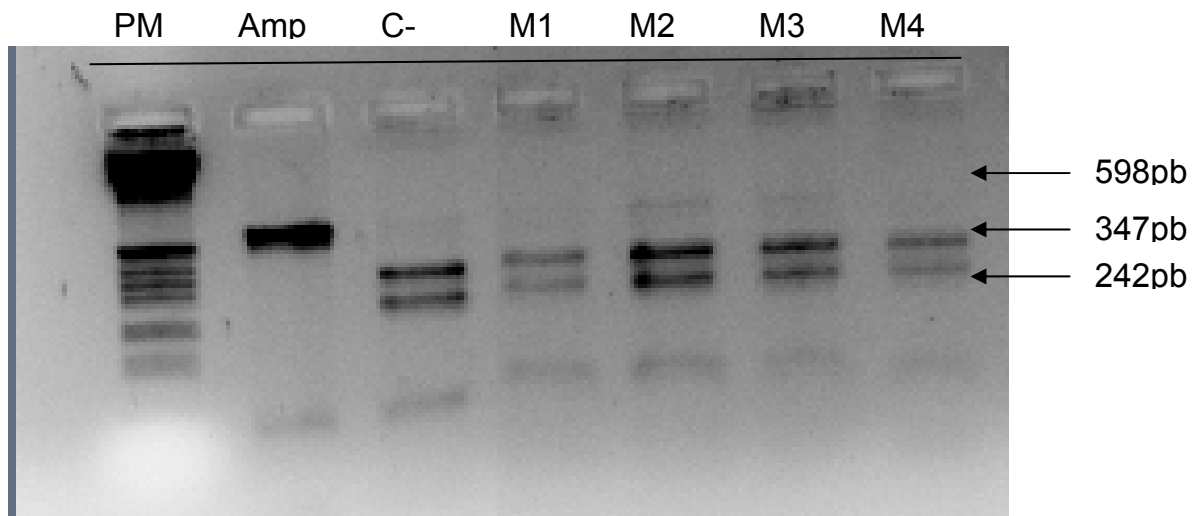


Fig. 3.47. Ejemplo del RFLP para detectar la mutación m.1555A>G en pacientes de la enfermedad de Ménière. La presencia de la mutación rompe el sitio de corte de la enzima de restricción sustituyendo el patrón de 2 bandas (de 347 y 242 pb) por una única banda de 598 pb. PM denota patrón de pesos moleculares, Amp amplificado, C- control negativo y M1, M2, M3 y M4 muestras 1, 2, 3, 4 respectivamente.

La mutación m.1555A>G no se encontró en ninguno de los pacientes estudiados. Para analizar la variación genética poblacional, o la presencia de otras mutaciones patológicas en los genes de los mt-rRNA, se secuenciaron estos dos genes (*MT-RNR1* y *MT-RNR2*). Las variantes genéticas encontradas en estos dos genes están resumidas en la siguiente tabla (**tabla 3.6**).

CAPITULO 3

Loci	Posición	Cambio	IC	NPA	PA
A					
<i>MT-RNR1</i>	m.709	G>A	35,0	1	3
	m.750	A>G	99,1	12	12
	m.870	C>T	14,0	0	1
	m.1243	T>C	46,2	1	2
	m.1406	T>C	69,7	1	1
	m.1438	A>G	94,9	12	12
<i>MT-RNR2</i>	m.1811	A>G	23,8	0	1
	m.1850	T>C	96,1	1	0
	m.1888	G>A	1,0	0	1
	m.2141	T>C	14,2	0	1
	m.2351	T>C	22,3	1	0
	m.2387	T>C	21,1	0	1
	m.2442	T>C	11,4	1	0
	m.2706	A>G	86,2	7	6
	m.3010	G>A	17,1	3	3
	m.3116	C>T	12,4	0	1
	m.3197	T>C	48,1	1	1

Tabla 3.6. Mutaciones en los genes de los mt-rRNAs (*MT-RNR1*, *MT-RNR2*). IC, NPA, PA, denotan índice de conservación, no pérdida de audición y pérdida de audición respectivamente. Todas las mutaciones en el mtDNA son homoplásmicas.

Ninguno de los pacientes presentó la otra mutación patológica descrita en el gen *MT-RNR1* y que se ha asociado con pérdida de audición y tratamiento con aminoglicósidos, la mutación m.1494C>T (Zhao, Li et al. 2004). Sin embargo, se encontraron 17 variantes genéticas al comparar las secuencias obtenidas en estos pacientes con la rCRS. 3 de estas variantes afectaban posiciones con un índice de conservación mayor que las mutaciones patológicas descritas en estos genes (m.1494C = 90,2% y m.1555A = 96,3%). Por lo tanto, es posible que esas posiciones fueran funcionalmente importantes. A pesar de ello, dos de ellas (m.750A>G y m.1438A>G) estaban distribuidas de igual manera entre pacientes NPA y PA. La tercera variante, que se encontró en un paciente NPA, la m.1850T>C, esta localizada en el rRNA 16S. Aunque el principal sitio de unión de los aminoglicósidos se encuentra en el rRNA 12S, se ha descrito que también se unen a la subunidad ribosomal grande (Scheunemann, Graham et al. 2010), pero en zonas alejadas de la posición m.1850 en la estructura secundaria del rRNA 16S.

6.3. Estudio de la variación genética en los genes de la proteína ribosomal S12 (MRPS12) y de la 12S rRNA metiltransferasa (TFB1M) en pacientes con la enfermedad de Ménière.

Dado que la sensibilidad a los aminoglicósidos puede modularse por el estado de metilación del rRNA 12S, y la proteína TFB1M es la responsable de esta actividad, secuenciamos todos los exones y segmentos adyacentes de esta proteína.

Esta sensibilidad la pueden modular también proteínas del sitio decodificante mitocondrial, como por ejemplo la proteína ribosomal S12 (MRPS12). Se ha considerado previamente que mutaciones patológicas en este polipéptido pueden ser causas potenciales de sordera. Esta proteína fue secuenciada en dos familias con una sordera ligada a DFNA4 y en controles, pero no se encontró ninguna mutación que pudiera ser la causante de la sordera (Shah, Toompuu et al. 2001). Por ello, secuenciamos el exón que codifica para esta proteína madura.

CAPITULO 3

Las diferentes variantes encontradas para estos dos genes se pueden observar en la siguiente tabla (**tabla 3.7**).

Loci	Posición	Cambio	IC	NPA	PA
<i>TFB1M</i>	c.1-23 (rs162981) Exón 1 (5'- UTR)	T>G	-	5 He/5 Ho	3 He/7 Ho
	c.633 (rs324356) Exón 5	G>A	S	7 He/2 Ho	6 He/3 Ho
	c.648 Exón 5	T>A	S	1 He	0
	c.795-30 (rs3734322) Intrón 6	T>G	-	3 He/5 Ho	6 He/4 Ho
<i>MRPS12</i>	c.78 (rs2070251) Exón 2	T>C	S	1 He	0

Tabla 3.7. Mutaciones en los genes *TFB1M* y *MRPS12*. IC, NPA, PA, S, He y Ho denotan índice de conservación, no pérdida de audición, pérdida de audición, cambio sinónimo, heterocigoto y homocigoto respectivamente. La numeración "rs" indica la el número de identificación del polimorfismo en la base de datos del NCBI.

Se encontraron cuatro SNPs en el gen *TFB1M* de estas muestras. Tres de ellos habían sido previamente descritos, y además sus frecuencias eran similares a las que se habían descrito para la población española (Alonso-

Montes, Castro et al. 2008). Dos de los polimorfismos no implicaban a la secuencia codificante de la proteína y los otros dos eran mutaciones sinónimas (no había cambio de aminoácido). Además, no hubo diferencias importantes entre los grupos PA y NPA.

Solo encontramos un cambio en el gen *MRPS12* de una muestra del grupo NPA que era además heterocigótico y sinónimo.

7. Estudio de la variabilidad genética mitocondrial en sordera asociada a la edad: Presbiacusia.

Otro de los fenotipos que hemos escogido para evaluar el efecto de las variantes genéticas poblacionales del mtDNA es la presbiacusia.

La pérdida de audición asociada a la edad o presbiacusia, es la forma más común de sordera, con una incidencia en las sociedades occidentales de entre un 29% y 46% (Cruickshanks, Wiley et al. 1998). Se caracteriza por una pérdida de audición bilateral, especialmente a altas frecuencias y que está causada por una degeneración de las células cocleares dentro del oído interno. Las mutaciones en el mtDNA se han asociado a procesos relacionados con el envejecimiento (Larsson 2010). Dado que la presbiacusia tiene una etiología multifactorial, en la que pueden tomar parte factores genéticos y ambientales, se analizó la posible influencia de las variantes genéticas del mtDNA en este desorden asociado a la edad.

7.1. Selección de pacientes con sordera asociada a la edad.

Se realizaron audiometrías en ambos oídos a las frecuencias de 500, 1000, 2000 y 4000 Hz. Se utilizaron los criterios de audición publicados en el **BIAP** (*Bureau international d'audiophonologie*) y que definen los límites de la presbiacusia en función de la edad. Estos criterios se resumen en la siguiente tabla (**tabla 3.8**).

Edad (años)	Umbral Audición (db)
40-49	15
50-59	20
60-69	30
70-79	40
80+	50

Tabla 3.8. Umbrales de audición según la edad, publicados por el BIAP. Este umbral se calcula como la media de los umbrales a 500, 1000, 2000 y 4000 Hz.

Se dividió la cohorte de estudio en dos grupos en función de su capacidad auditiva. Si el umbral de audición medio era igual o superior al establecido por el BIAP como pérdida de audición para su edad, se incluyeron en el grupo de Pacientes. Cuando el umbral de audición permanecía en niveles considerados normales según la edad, los individuos se incluyeron en el grupo de Controles.

7.2. Demografía de la participación en el estudio sobre la sordera asociada a la edad o presbiacusia.

En este estudio se analizaron un total de 204 muestras, 127 se incluyeron en el grupo de pacientes y 77 en el grupo de controles. Todos los individuos de este estudio eran de etnia caucásica. Además, se recogieron algunos datos demográficos de estos individuos, como la edad o el sexo. Finalmente, se comprobó que los umbrales de audición medios de ambos oídos eran diferentes entre los dos grupos, ya que este criterio se utilizó para dividir a los individuos entre los dos grupos de estudio. Estos datos pueden verse resumidos en la siguiente tabla (**tabla 3.9**).

	Pacientes	Controles	P
Individuos	127	77	-
Edad (años)	70,5±9 (127)	67,8±7 (76)	<0,05
Sexo (H/M)	50/77	21/56	NS
UTM-OD	45,1±12 (126)	26,9±6 (77)	<0,0001
UTM-OI	43,7±12 (126)	25,8±5 (77)	<0,0001

Tabla 3.9. Datos demográficos en el estudio de sordera asociada a la edad o presbiacusia. P, UTM-OD, UTM-OI denotan probabilidad, umbral tonal medio para el oído derecho y umbral tonal medio para el oído izquierdo respectivamente. Los valores de Edad, UTM-OD y UTM-OI indican media ± desviación estándar (nº de muestras) y los valores de Sexo indican nº hombres/nº mujeres.

No hubo diferencias significativas en la distribución de sexos entre ambos grupos. Sin embargo, los individuos que presentaban presbiacusia tenían una edad significativamente mayor que los individuos del grupo de controles. Por ultimo, pudimos observar que la pérdida de audición en ambos oídos era diferente y significativamente mayor en los individuos del grupo de pacientes.

7.3. Variación genética mitocondrial en la sordera asociada a la edad o presbiacusia.

Se ha descrito que los haplogrupos mitocondriales puedan ser factores de susceptibilidad en la sordera asociada a la edad o presbiacusia (Manwaring, Jones et al. 2007). Por este motivo, analizamos la distribución de los fondos genéticos mitocondriales más comunes de la población europea entre nuestros grupos de estudio. Podemos ver estos resultados en la siguiente figura (Fig. 3.48)

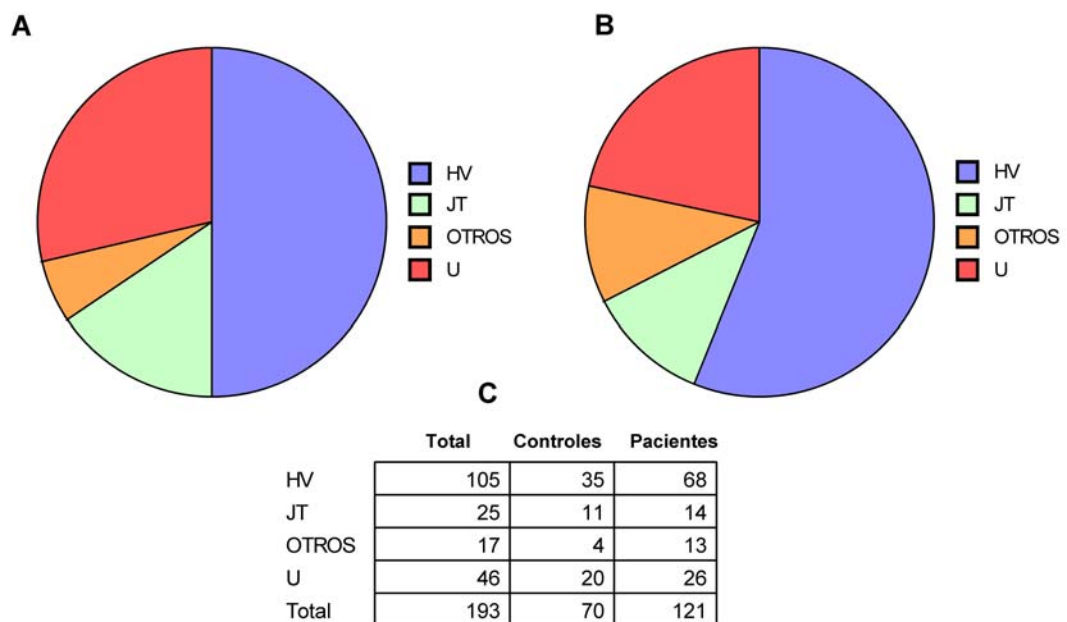


Fig.3.48. Distribución de los haplogrupos mitocondriales europeos en los grupos de estudio de la sordera asociada a la edad o presbiacusia. A. Distribución en el grupo de controles. B. Distribución en el grupo de pacientes. C. Frecuencias de cada haplogrupo en los dos grupos, pacientes y controles. OTROS denota, aquellos haplogrupos que no pertenecen al resto de haplogrupos mayoritarios (HV, U y JT).

El análisis de las frecuencias de los fondos genéticos mitocondriales en los grupos de estudio, reflejó que no había diferencias significativas en la distribución de los mismos.

Estudios previos con un tamaño de muestra mayor, ya habían analizado las frecuencias de los haplogrupos mitocondriales entre la población española (Dahmani, Marcuello et al. 2006). No se encontraron diferencias significativas entre la distribución de los linajes mitocondriales de nuestro grupo de controles y los utilizados en este estudio previo, por lo que podemos decir que las frecuencias de los haplogrupos encontrados en los individuos que no desarrollaron presbiacusia eran representativos de la población española en general.

8. Estudio de la variabilidad genética mitocondrial en sordera asociada al tratamiento con cisplatino.

El cisplatino es un agente de quimioterapia muy eficaz, sin embargo su uso clínico está limitado por su nefro, neuro y ototoxicidad. La ototoxicidad producida por el cisplatino está mediada por una degeneración de las células ciliadas de la cóclea, que acaba provocando una pérdida de audición (McAlpine and Johnstone 1990). La sordera producida por aminoglicósidos, una familia de antibióticos que producen una ototoxicidad similar a la del cisplatino, se ha asociado a mutaciones en el mtDNA (Fischel-Ghodsian, Prezant et al. 1993; Prezant, Agapian et al. 1993). Por otro lado, líneas celulares de carcinoma resistentes al cisplatino, mostraron cambios en parámetros mitocondriales como el potencial de membrana (Andrews and Albright 1992). Por último, se ha encontrado una asociación entre el haplogrupo mitocondrial J y la pérdida de audición causada por el tratamiento con cisplatino (Peters, Preisler-Adams et al. 2003). Por todo ello, decidimos analizar la variación genética mitocondrial en pacientes tratados con cisplatino y que habían desarrollado una pérdida de audición.

8.1. Selección de pacientes con sordera asociada al tratamiento con cisplatino.

En todos los individuos del estudio, se realizaron audiometrías en ambos oídos a las frecuencias de 500, 1000, 2000 y 4000 Hz, tras el tratamiento con cisplatino. Se utilizaron 3 criterios para la inclusión de los individuos en el grupo de pacientes. Los individuos a los que se les realizó una audiometría previa al tratamiento con cisplatino, fueron incluidos en el grupo de pacientes cuando el umbral tonal medio fue al menos 10 db mayor en la prueba de audición tras la quimioterapia. Cuando no se disponía de audiometría previa, además de valorar los umbrales tonales medios tras la terapia, los individuos fueron incluidos en el grupo de pacientes, cuando desarrollaron un acúfeno, o bien cuando refirieron una pérdida de audición de manera subjetiva. Los individuos que se incluyeron en el grupo de controles, no presentaron cambios en los umbrales tonales medios tras el tratamiento con cisplatino, ni desarrollaron acúfenos o sordera subjetiva provocados por el mismo.

En el estudio se incluyeron un total de 22 individuos, 11 se incluyeron en el grupo de pacientes, tras sufrir una pérdida de audición asociada con el tratamiento y 11 se incluyeron en el grupo de controles, al no desarrollar ningún defecto auditivo tras ser expuestos al cisplatino.

8.2. Variación genética mitocondrial en la sordera asociada al tratamiento con cisplatino.

El análisis del fondo genético mitocondrial en nuestros grupos de estudio, se puede observar en la siguiente figura (**Fig.3.49**).

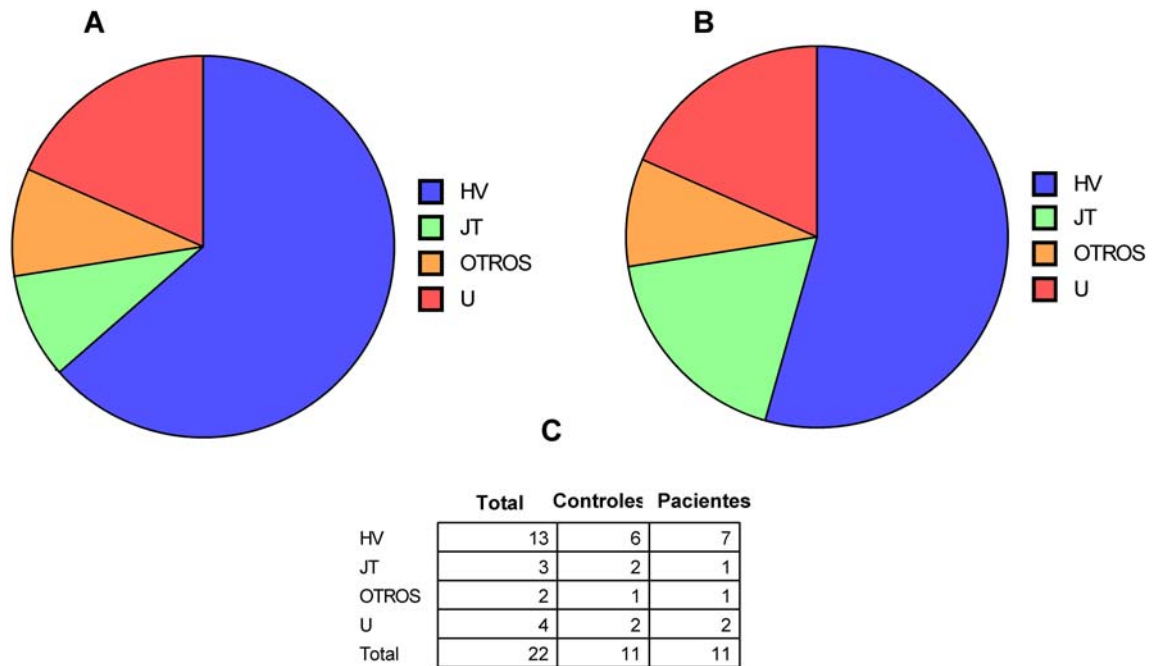


Fig.3.49. Distribución de los haplogrupos mitocondriales europeos en los grupos de estudio de la sordera asociada al tratamiento con cisplatino. A. Distribución en el grupo de pacientes. B. Distribución en el grupo de controles. C. Frecuencias de cada haplogrupo en los dos grupos, pacientes y controles. OTROS denota, aquellos haplogrupos que no pertenecen al resto de haplogrupos mayoritarios (HV, U y JT).

La distribución de los haplogrupos mitocondriales mayoritarios fue estadísticamente similar en los dos grupos de estudio, pacientes y controles.

9. Antibiograma mitocondrial: Código de barras para el tratamiento con antibióticos.

Mutaciones antiguas y muy frecuentes en las poblaciones son normalmente descartadas como causantes de enfermedad. Sin embargo, es posible que factores ambientales interaccionen con estas variantes genéticas para producir un efecto fenotípico. Como un ejemplo, los orangutanes portan una mutación en su mtDNA, que equivale a la m.1555A>G humana. Esta variante, que comparten todos los orangutanes, no altera su función auditiva. Sin embargo, el tratamiento con aminoglicósidos produce un defecto OXPHOS en estas células (Pacheu-Grau, Gomez-Duran et al. 2011). Por lo tanto, variantes humanas antiguas y muy frecuentes entre las poblaciones podrían tener un papel en la interacción con determinados xenobióticos. Existen

númerosas evidencias que muestran que la terapia con diversos antibióticos de acción ribosomal inhibe la síntesis de proteínas en la mitocondria y produce efectos secundarios tóxicos en los seres humanos. Para optimizar la terapia con antibióticos e intentar minimizar estos efectos secundarios es importante conocer la constitución genética mitocondrial de los individuos y además comprender de una manera precisa las interacciones entre las variantes genéticas mitocondriales y los antibióticos.

Algunos de las filogenias mitocondriales mas frecuentes entre la población europea están definidas, entre otras posiciones, por dos variantes localizadas en los mt-rRNAs. Estos cambios son el m.2706A>G y el m.3010G>A y están localizados en el gen *MT-RNR2*, muy próximos al centro peptidil transferasa (PTC). El PTC es uno de los centros catalíticos más importantes durante la síntesis de proteínas y además es una diana muy frecuente para muchos antibióticos de acción ribosomal. Estas variantes ribosomales han sido asociadas con diversos efectos fenotípicos, por lo tanto pueden tener una importancia funcional y, en concreto, quizás están implicadas en la interacción de los mt-rRNAs con algunos antibióticos ribosomales. Para analizar esta posible interacción, se utilizaron líneas celulares transmitocondriales y se estudió el efecto de distintos antibióticos de acción ribosomal sobre ellas.

9.1. Líneas celulares transmitocondriales utilizadas para el estudio del efecto de antibióticos ribosomales.

Se utilizaron inicialmente 20 líneas celulares construidas en el fondo genético de osteosarcoma 143B, con combinaciones de estas dos variantes del mtDNA:

- 5 de la filogenia mitocondrial H1, con las variantes m.2706A y m.3010A.
- 5 de la filogenia mitocondrial H, pero no H1, con las variantes m.2706A y m.3010G.
- 5 de la filogenia mitocondrial J1, con las variantes m.2706G y m.3010A.

- 5 de la filogenia mitocondrial T, con las variantes m.2706G y m.3010G.

Debemos tener en cuenta ciertas consideraciones a la hora de utilizar el modelo de cíbridos transmitocondriales. Es sabido, que estas líneas celulares son aneuploides, y se ha observado que cíbridos con este fondo genético nuclear pueden tener distinto número de cromosomas (Hao, Morrison et al. 1999). Para evitar efectos clónales, se utilizaron 5 líneas de cada filogenia mitocondrial. Además, se cariotiparon algunas de las líneas celulares utilizadas y no se encontraron diferencias en el número de cromosomas entre los cíbridos de distintos fondos genéticos mitocondriales (Gomez-Duran, Pacheu-Grau et al. 2010). El micoplasma es una contaminación muy habitual cuando se trabaja con líneas celulares humanas y además puede interferir en las determinaciones de parámetros mitocondriales. Por ello, se descartó de forma rutinaria la presencia de esta contaminación mediante PCR, en las líneas celulares con las que trabajamos. A continuación, podemos observar un ejemplo de esta determinación en algunas de las líneas celulares (**Fig.3.50**).



Fig.3.50. PCR para la detección de micoplasmas en cíbridos transmitocondriales. B, C- y C+ denotan blanco, control negativo y control positivo respectivamente. El resto de las calles corresponden a las líneas celulares analizadas.

Dado que estamos interesados en los posibles efectos de las variantes de los mt-rRNAs m.2706 y m.3010, debemos descartar la presencia de variantes privadas en los rRNAs o en el mtDNA que pueden contribuir a estas interacciones. Para ello se obtuvo la secuencia completa del mtDNA de las líneas celulares utilizadas. En la siguiente tabla (**tabla 3.10**) podemos ver los polimorfismos encontrados en los mt-rRNAs en cada uno de los cíbridos transmitocondriales utilizados.

Posición (nt)	Gen	Cambio	25H	RicH	613H	612H	AcH	2128	A1H3	38H2	39H	58H	13T	15T	237T	611T	610T	5J	78J	128J	134J	139J	Cambio aminoácido
709	<i>MT-RNR1</i>	G → A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A	A	A	A	G	G	G	G	G	NC
710	<i>MT-RNR1</i>	T → C	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NC
750	<i>MT-RNR1</i>	A → G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	-	-	-	-	-	consenso
930	<i>MT-RNR1</i>	G → A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NC
951	<i>MT-RNR1</i>	G → A	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NC
1187	<i>MT-RNR1</i>	T → C	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NC
1438	<i>MT-RNR1</i>	A → G	G	G	G	G	G	G	G	G	-	G	G	G	G	G	G	-	-	-	-	-	consenso
1719	<i>MT-RNR1</i>	G → A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NC
1888	<i>MT-RNR2</i>	G → A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A	A	A	A	-	-	-	-	-	NC
2158	<i>MT-RNR2</i>	T → C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	NC
2259	<i>MT-RNR2</i>	C → T	-	T	-	-	-	-	-	T	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NC
2352	<i>MT-RNR2</i>	T → C	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NC
2387	<i>MT-RNR2</i>	T → C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	NC
2706	<i>MT-RNR2</i>	A → G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	NC
2943	<i>MT-RNR2</i>	G → A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NC
3010	<i>MT-RNR2</i>	G → A	-	-	A	A	A	A	-	-	-	A	-	-	-	-	-	A	A	A	A	A	NC

Tabla 3.10. Polimorfismos encontrados por secuenciación en los mt-rRNAs en las líneas celulares utilizadas en este estudio. Para poder acceder a la secuencia completa del mtDNA se puede utilizar el número de acceso de Genbank. Los números de acceso son los siguientes: 25H, **HM103356.1**. RicH, **HM103355.1**. 613H, **HM103358.1**. 612H, **HM103357.1**. AcH, **HM103354.1**. 611T, **FJ178379.1**. 5J, **JN635298**. 78J, **JN635300**. 128J, **JN635301**. 139J, **JN635302**. NC denota no codificante

Todos los polimorfismos encontrados ya habían sido descritos en una base de datos con más de 3000 secuencias de mtDNA humanos (Ruiz-Pesini, Lott et al. 2007). Además se confirmó la presencia de las variantes de interés en cada línea celular.

9.2. Estudio del efecto del antibiótico linezolid sobre líneas celulares transmitocondriales.

El linezolid es un antibiótico de acción ribosomal que ha demostrado ser un potente inhibidor de la traducción mitocondrial, en numerosos tejidos de mamíferos (McKee, Ferguson et al. 2006). Por otro lado, pacientes tratados de forma prolongada con linezolid desarrollaron acidosis láctica, un fenotipo común en la patología mitocondrial (Garrabou, Soriano et al. 2007). Por ello, se estudió el efecto del linezolid en los cíbridos transmitocondriales que portaban las variantes en las posiciones m.2706 y m.3010 de los mt-rRNAs. En primer lugar, para seleccionar el rango de concentraciones óptimo en el que trabajar, se midió el consumo de oxígeno endógeno en una línea celular del haplogrupo H1, utilizando dosis similares a las existentes en la bibliografía (McKee, Ferguson et al. 2006). En la siguiente figura (**Fig.3.51**), se muestran los cambios en el consumo de oxígeno endógeno con las distintas dosis de linezolid.

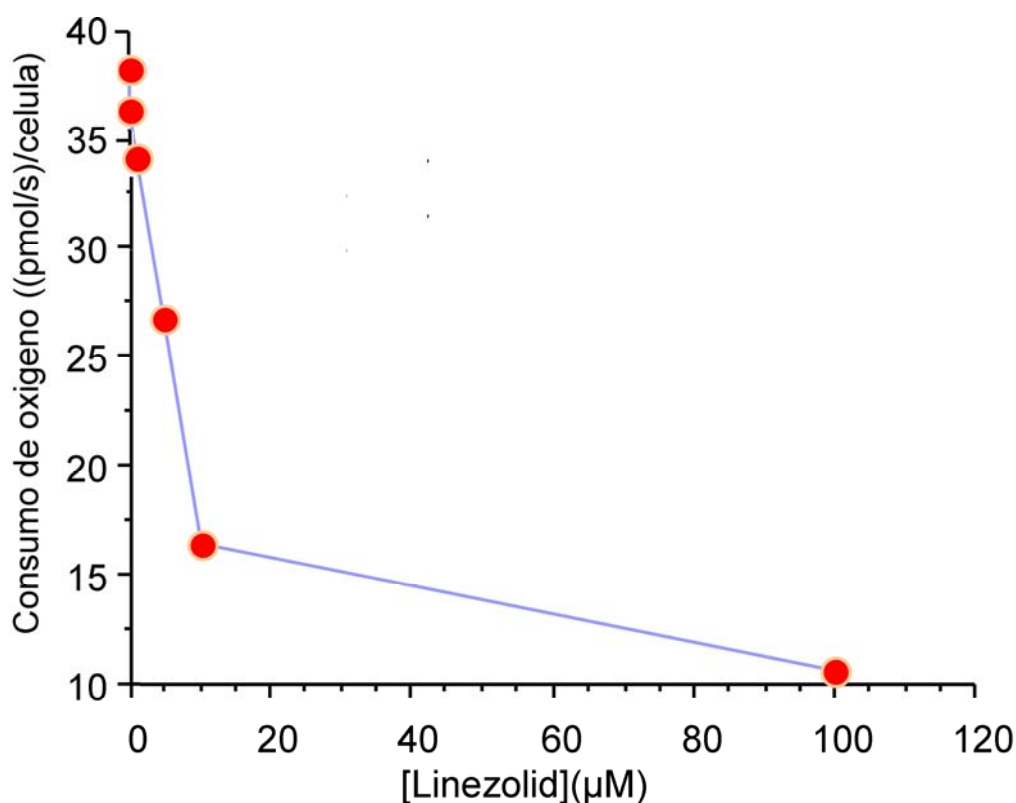


Fig.3.51. Consumo de oxígeno de la línea celular ACH en presencia de distintas dosis de linezolid. Los valores de consumo de oxígeno a 0, 0,1, 1, 5, 10 y 100 µM de linezolid son $38,2 \pm 4$ (3), $36,3 \pm 4$ (3), $38,0 \pm 4$ (3), $26,7 \pm 7$ (3), $16,4 \pm 3$ (3), $10,7 \pm 4$ (3) respectivamente.

Podemos observar que el aumento de la concentración de linezolid produce una disminución del consumo de oxígeno endógeno en estas células. Debemos ser cuidadosos a la hora de escoger el rango de concentraciones de antibiótico con las que vamos a trabajar. Una dosis de droga demasiado baja prácticamente no inhibirá el sistema de traducción mitocondrial y por lo tanto será muy difícil encontrar diferencias entre las líneas celulares que portan distintas variantes del mtDNA. De la misma manera, dosis muy elevadas mostrarán un efecto muy dramático sobre la función mitocondrial, dificultando la evidencia de un posible efecto diferencial. Por esta razón, escogimos 5 dosis de linezolid en un rango intermedio de concentración, que puedan tener un efecto moderado y permitan hallar diferentes interacciones entre el antibiótico y las variantes en los mt-rRNAs. A continuación se muestran las dosis de linezolid elegidas y que se utilizarán en sucesivos experimentos (**tabla 3.11**).

Condición	L1	L2	L3	L4	L5
[Linezolid](μM)	0,1	1	2,5	5	10

Tabla 3.11. Concentraciones de linezolid que se utilizarán en las distintas condiciones de los sucesivos experimentos.

9.3. Estudio de la cantidad de p.MT-CO1 y SDHA en cíbridos transmitocondriales tratados con linezolid.

Para estudiar el efecto del linezolid sobre la síntesis mitocondrial de proteínas se midió la cantidad de la subunidad p.MT-CO1, codificada en el mtDNA. Este valor se corrigió por la cantidad de la subunidad del complejo respiratorio II SDHA, para tener en consideración la masa mitocondrial total en cada condición. El valor de cada línea celular crecida sin antibiótico se tomo como el 100%, y se calculó el % de p.MT-CO1 corregido respecto a ese valor en cada condición con antibiótico. En la siguiente figura (**Fig.3.52**), se muestra el % de p.MT-CO1 obtenido para las 20 líneas celulares con las 5 concentraciones de linezolid.

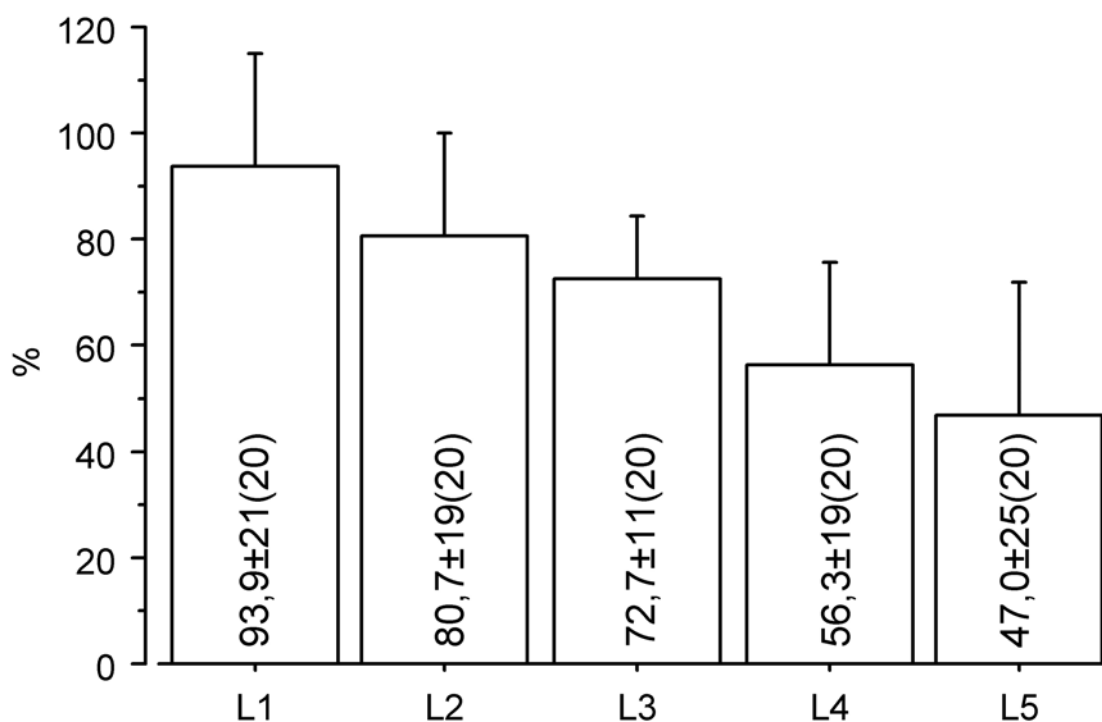


Fig.3.52. Cantidad de p.MT-CO1 de las 20 líneas celulares con las distintas dosis de linezolid. En cada barra se indica la media \pm desviación estándar (n° líneas celulares).

De la misma manera que ocurría en el consumo de oxígeno endógeno, pudimos observar que conforme aumentaba la concentración de linezolid, se producía una mayor inhibición de p.MT-CO1 en todas las líneas celulares. De hecho, se encontró una correlación negativa entre la cantidad de esta subunidad mitocondrial y la concentración de linezolid, que además era estadísticamente significativa ($r = -0,94$, $p = 0,013$).

Para evaluar el efecto de las variantes m.2706 y m.3010 en la inhibición de la síntesis de p.MT-CO1 por acción del linezolid, separamos los valores obtenidos en este experimento según el haplogrupo mitocondrial de cada línea celular (**Fig.3.53**).

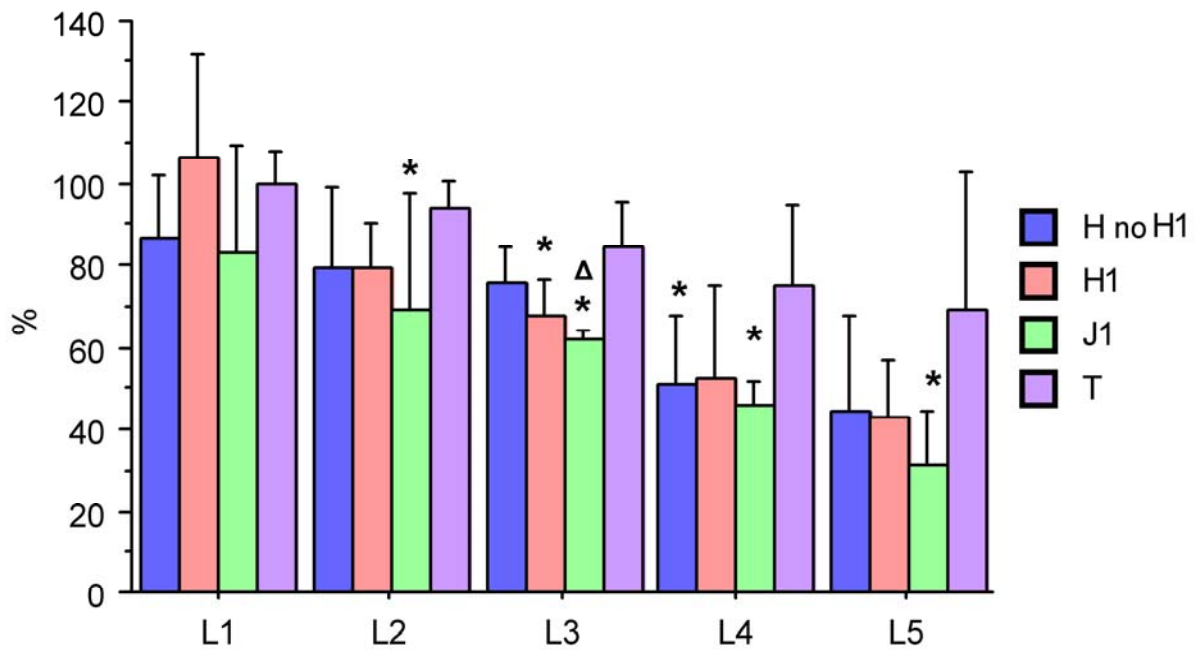


Fig.3.53. Cantidad de p.MT-CO1 de las 20 líneas celulares con las distintas dosis de linezolid, separadas según su haplogrupo mitocondrial. Los valores de p.MT-CO1 son los siguientes: L1. Haplogrupo H no H1, $86,9 \pm 15$ (5). Haplogrupo H1, $106,3 \pm 26$ (5). Haplogrupo J1, $82,8 \pm 26$ (5). Haplogrupo T, $99,6 \pm 9$ (5). L2. Haplogrupo H no H1, $79,8 \pm 19$ (5). Haplogrupo H1, $79,5 \pm 11$ (5). Haplogrupo J1, $69,3 \pm 28$ (5). Haplogrupo T, $94,2 \pm 6$ (5). L3. Haplogrupo H no H1, $76,2 \pm 8$ (5). Haplogrupo H1, $68,0 \pm 9$ (5). Haplogrupo J1, $62,2 \pm 2$ (5). Haplogrupo T, $84,5 \pm 11$ (5). L4. Haplogrupo H no H1, $51,1 \pm 17$ (5). Haplogrupo H1, $52,8 \pm 22$ (5). Haplogrupo J1, $46,2 \pm 5$ (5). Haplogrupo T, $75,2 \pm 19$ (5). L5. Haplogrupo H no H1, $44,6 \pm 23$ (5). Haplogrupo H1, $42,85 \pm 14$ (5). Haplogrupo J1, $31,5 \pm 12$ (5). Haplogrupo T, $69,1 \pm 34$ (5). * y Δ denotan diferencias estadísticamente significativas de T y de H no H1 respectivamente.

Como se observa en la figura, las dosis crecientes de linezolid parecen afectar de forma diferente a los distintos genotipos mitocondriales. Con todas las concentraciones de linezolid, el haplogrupo mitocondrial T muestra una mayor cantidad de la proteína mitocondrial p.MT-CO1 que el resto de filogenias mitocondriales analizadas. Por otro lado, el haplogrupo mitocondrial J1 mostró siempre una menor cantidad de p.MT-CO1 que el resto de grupos mitocondriales a todas las dosis de antibiótico utilizadas. Excepto para la concentración L1, en el resto de condiciones las líneas celulares H no H1 y H1 mostraron valores de p.MT-CO1 intermedios entre J1 y T. Un análisis estadístico ANOVA mostró que para la concentración de linezolid L3, las variables haplogrupo y cantidad de p.MT-CO1 eran dependientes ($p= 0,0032$). Esto indica que, en esas condiciones existe una relación entre la cantidad de la subunidad p.MT-CO1 y el fondo genético mitocondrial. Además, el hecho de encontrar las mayores diferencias entre las filogenias mitocondriales con una

concentración intermedia de linezolid (L3) nos reafirma que es importante trabajar en un rango de concentraciones que produzcan un efecto moderado. A las concentraciones L1 y L2, el linezolid produce solo un pequeño efecto, por lo que apenas encontramos diferencias entre los genotipos mitocondriales. A pesar de encontrar diferencias significativas a las concentraciones L4 y L5, estas no son suficientes para poder afirmar que en esas condiciones las variables haplogrupo y cantidad de p.MT-CO1 son dependientes. Esto se deberá posiblemente a que la inhibición del linezolid es bastante potente a esas dosis, por lo que es probable que todas las líneas celulares estén igualmente afectadas.

9.4. Estudios de la síntesis mitocondrial de proteínas en cíbridos transmitocondriales tratados con linezolid.

El linezolid es un potente inhibidor de la traducción mitocondrial (Bozdogan and Appelbaum 2004). Pudimos observar este efecto midiendo la cantidad de la subunidad p.MT-CO1, proteína sintetizada en los mitorribosomas. Para estudiar si el linezolid afectaba a síntesis del resto de las subunidades codificadas en el mtDNA, realizamos ensayos de síntesis mitocondrial de proteínas en las 20 líneas celulares. Utilizamos la dosis de linezolid L3, donde se encontraron las mayores diferencias en la cantidad de p.MT-CO1 entre haplogrupos mitocondriales. A continuación, se muestra el gel de síntesis de proteínas de las 5 líneas celulares del haplogrupo T, en ausencia y presencia de la concentración de linezolid L3 (**Fig.3.54**).

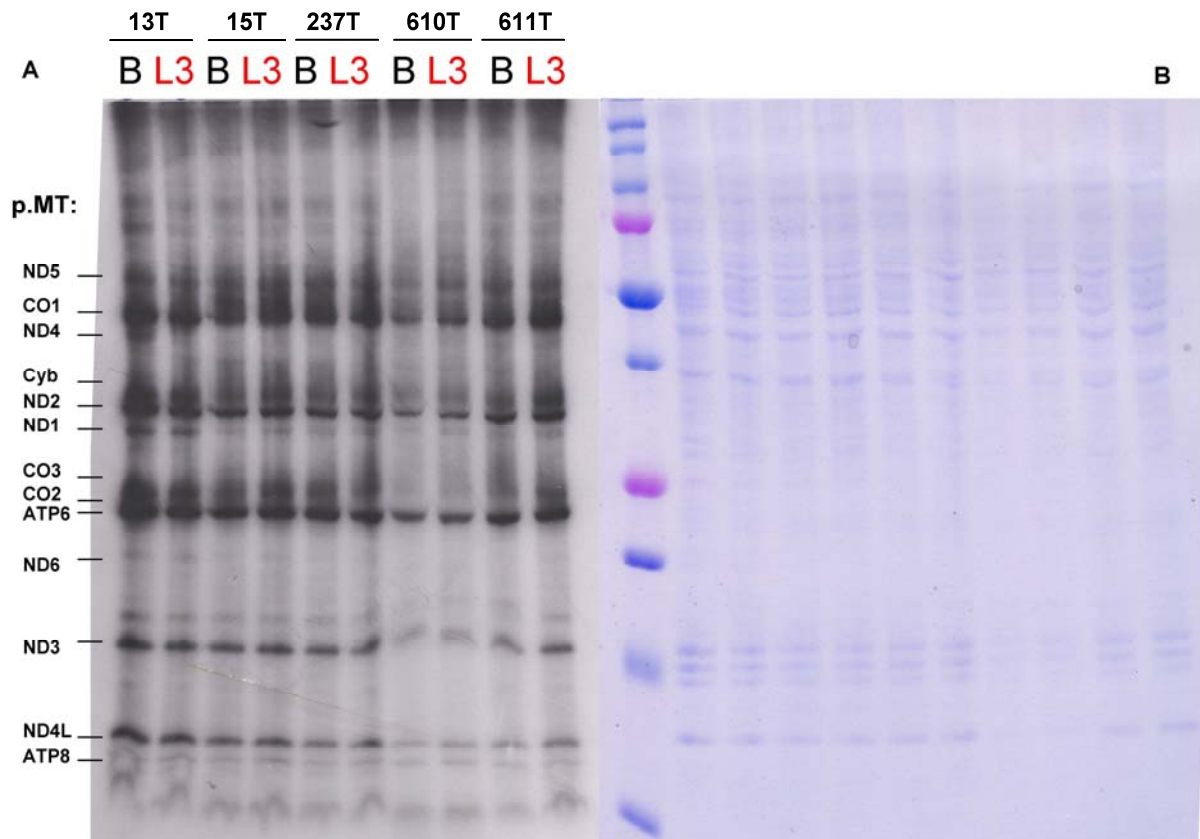


Fig.3.54. Síntesis mitocondrial de proteínas de las líneas celulares del haplogrupo T tratadas con linezolid. A. Gel de síntesis de proteínas. B y L3 indican ausencia y presencia de linezolid a la dosis L3 respectivamente. A la izquierda de la figura se indica el nombre del polipéptido equivalente a cada banda resuelta del gel. B. Control de carga con azul de Coomassie.

En primer lugar, se descartó que cualquier diferencia en la intensidad de las bandas en el gel de síntesis de proteínas se debiera a diferencias en la carga total de proteínas en el gel. Podemos realizar esta observación, porque no se observaron diferencias en el control de carga teñido con azul de Coomassie. En general, los niveles de todas las subunidades codificadas en el mtDNA de cada línea celular eran similares en ausencia o presencia de linezolid. A continuación se muestra el mismo experimento realizado con 5 líneas celulares del haplogrupo mitocondrial J1 (**Fig.3.55**).

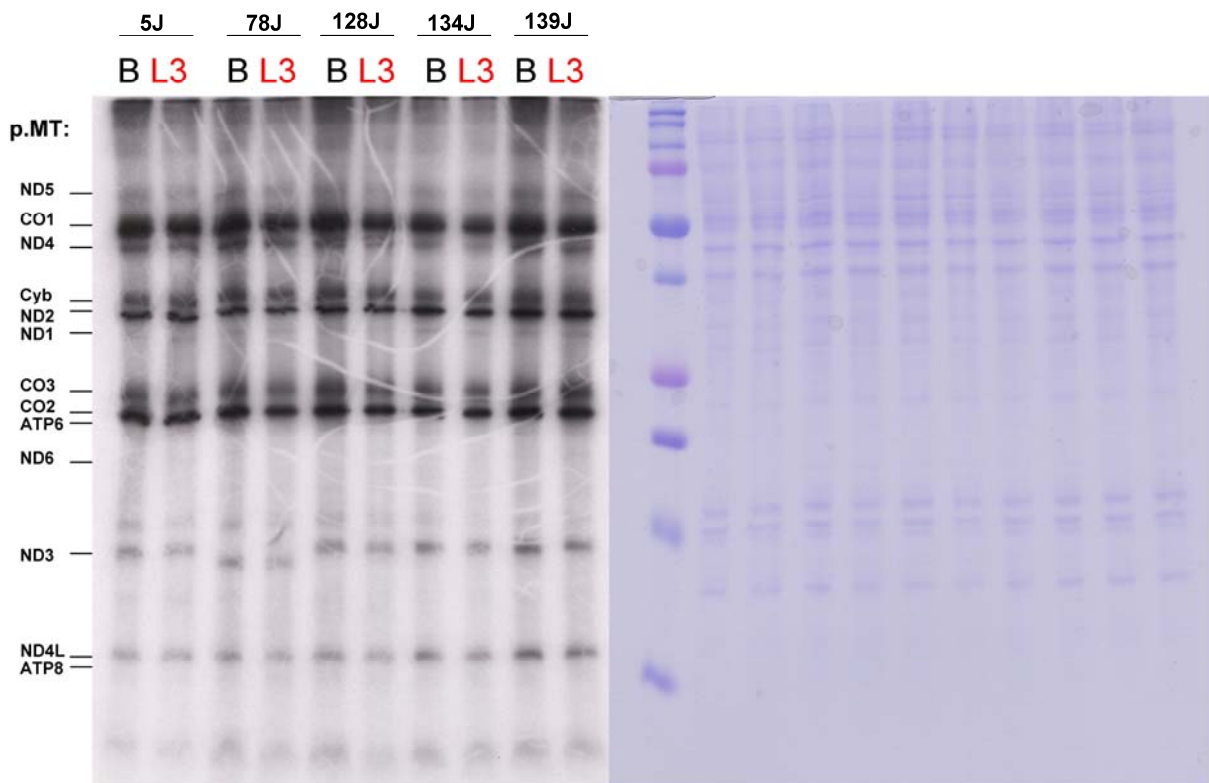


Fig.3.55. Síntesis mitocondrial de proteínas de las líneas celulares del haplogrupo J1 tratadas con linezolid. A. Gel de síntesis de proteínas. B y L3 indican ausencia y presencia de linezolid a la dosis L3 respectivamente. A la izquierda de la figura se indica el nombre del polipéptido equivalente a cada banda resuelta del gel. B. Control de carga con azul de Coomassie.

No se observaron diferencias en la carga total de proteínas en el gel, según la tinción de azul de Coomassie. A simple vista, parece que en las líneas celulares de este genotipo mitocondrial se produce una inhibición en la síntesis de proteínas cuando estas se tratan con el antibiótico linezolid. Por último, se realizaron los mismos ensayos con las 5 líneas celulares del haplogrupo H1 y las 5 del haplogrupo H. En la siguiente figura (**Fig.3.56**), se muestra el resultado del ensayo de traducción mitocondrial con 3 cíbridos del haplogrupo H1 y uno del haplogrupo H no H1, en presencia y ausencia de linezolid.

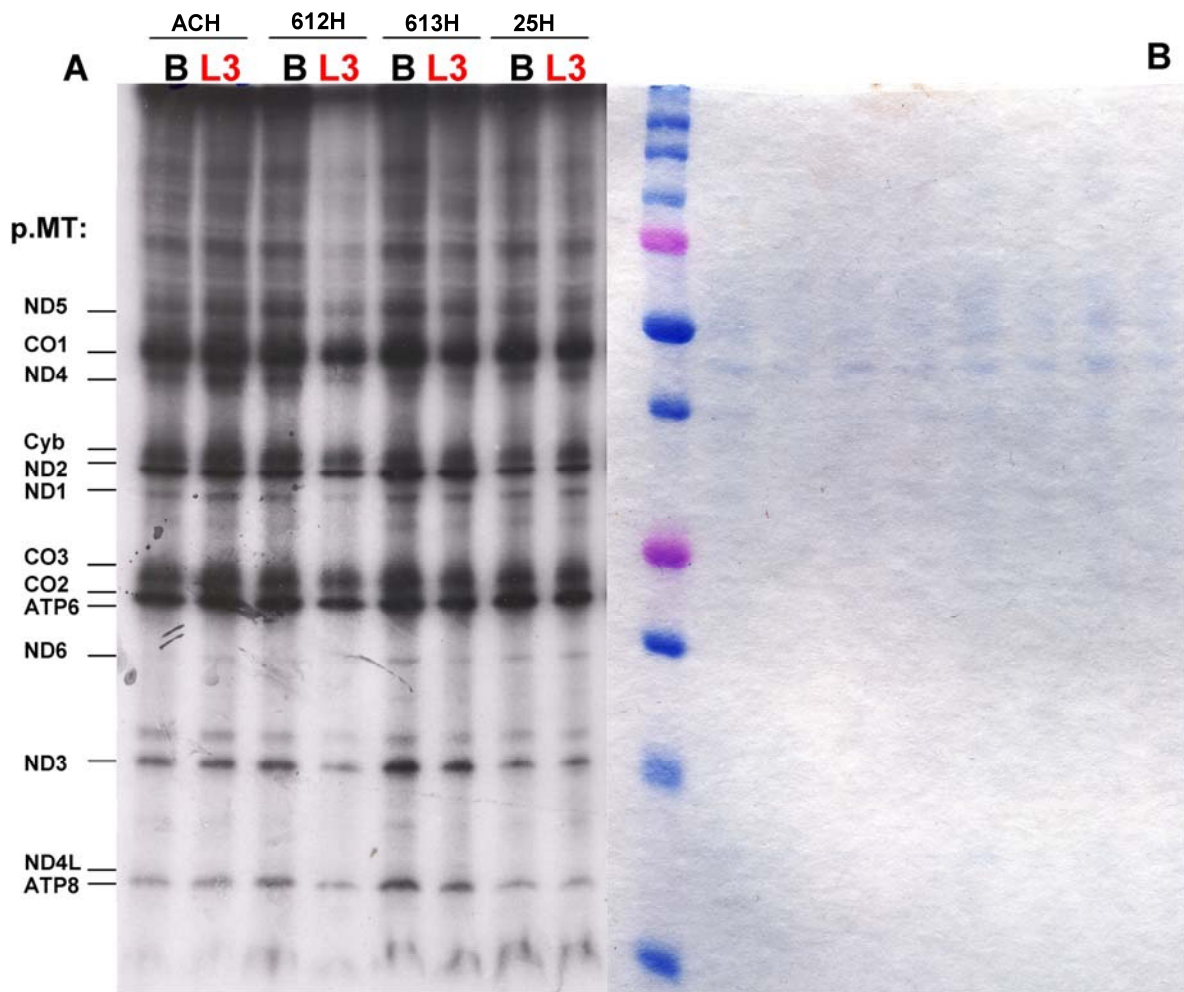


Fig.3.56. Síntesis mitocondrial de proteínas de las líneas celulares de los haplogrupos H no H1 y H1 tratadas con linezolid. A. Gel de síntesis de proteínas. B y L3 indican ausencia y presencia de linezolid a la dosis L3 respectivamente. A la izquierda de la figura se indica el nombre del polipéptido equivalente a cada banda resuelta del gel. B. Control de carga con azul de Coomassie.

No se encontraron diferencias en la carga total de proteínas para las distintas líneas celulares en presencia o ausencia de antibiótico. Algunas de las líneas celulares mostraron menos síntesis de polipéptidos mitocondriales en presencia de la dosis L3 de linezolid. Sin embargo, en algunos de los híbridos transmitocondriales no se observaron diferencias en la traducción mitocondrial en presencia o ausencia del antibiótico. Finalmente, la siguiente figura presenta el último de los ensayos de síntesis de proteínas, con 4 híbridos del genotipo mitocondrial H no H1 y 2 del H1 (**Fig.3.57**).

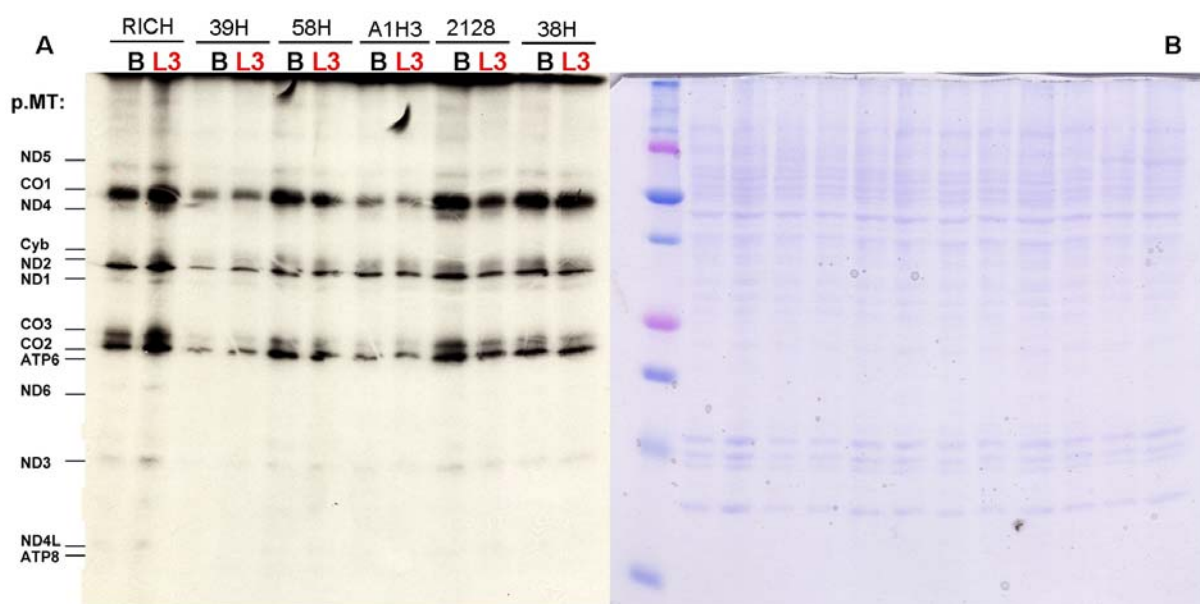


Fig.3.57. Síntesis mitocondrial de proteínas de las líneas celulares de los haplogrupos H y H1 tratadas con linezolid. A. Gel de síntesis de proteínas. B y L3 indican ausencia y presencia de linezolid a la dosis L3 respectivamente. A la izquierda de la figura se indica el nombre del polipéptido equivalente a cada banda resuelta del gel. B. Control de carga con azul de Coomassie

En este caso tampoco hubo diferencias en la carga de proteínas totales entre las distintas líneas celulares. En algunas líneas celulares se observó una inhibición en la síntesis de subunidades codificadas por el mtDNA cuando se las trató con el antibiótico. Por otro lado, en algunas líneas híbridas no se observaron diferencias en este parámetro en ausencia o presencia de linezolid.

Con el fin de obtener valores numéricos, para valorar de una forma cuantitativa la capacidad de traducción mitocondrial de las distintas líneas celulares en ausencia o presencia de antibiótico, se densitometraron los geles de síntesis de proteínas obtenidos. Para ello, se cuantificaron las bandas correspondientes a las subunidades p.MT-ND5, p.MT-CO3 y p.MT-ND3 y se calculó la media. Estas proteínas además de pertenecer a dos complejos respiratorios distintos, estaban situadas en las partes superior, media e inferior de los geles respectivamente. Se representó el % de cambio de cada línea celular al ser tratada con antibiótico, respecto a la condición sin linezolid. En la siguiente figura (**Fig.3.58**) se muestra el resultado de dicha cuantificación, separado según el haplogrupo de cada línea celular.

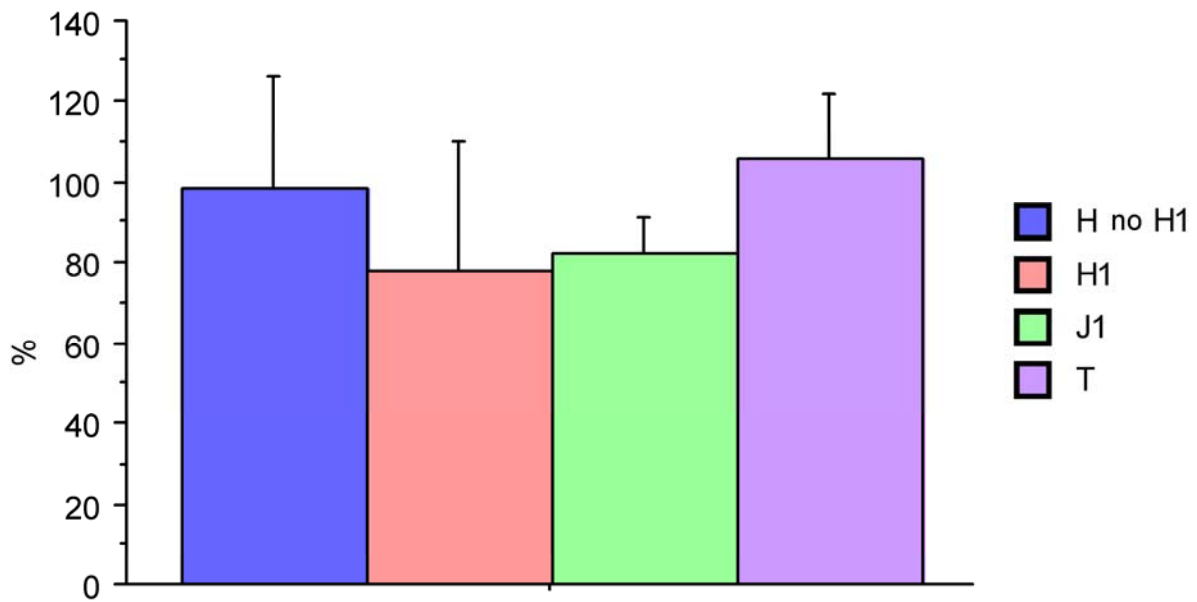


Fig.3.58. Cuantificación de la síntesis mitocondrial de proteínas en las 20 líneas celulares con la dosis L3 de linezolid, separadas según su haplogrupo mitocondrial. Los valores de la cuantificación son los siguientes: Haplogrupo H no H1, $98,3 \pm 27$ (5). Haplogrupo H1, $78,0 \pm 32$ (5). Haplogrupo J1, $82,3 \pm 9$ (5). Haplogrupo T, $105,6 \pm 16$ (5).

Tal y como observamos con la cantidad de p.MT-CO1, el tratamiento con linezolid parece afectar de forma diferente a los distintos haplogrupos mitocondriales. De nuevo, el haplogrupo T seguido del H no H1, parecen ser los menos afectados por este antibiótico, al mostrar una mayor tasa de síntesis de proteínas mitocondriales. Los genotipos H1 y J1 son los más afectados por el linezolid y muestran una menor síntesis de proteínas mitocondriales. Sin embargo, un análisis estadístico ANOVA reflejó que en estas condiciones las variables haplogrupo mitocondrial y síntesis de proteínas eran independientes. Dado que, al estudiar la cantidad de p.MT-CO1 entre las distintas filogenias mitocondriales, obtuvimos una mayor diferencia entre las líneas celulares J1 y T, comparamos los valores de la síntesis de proteínas mitocondriales solo entre estos dos haplogrupos mitocondriales. A continuación (**Fig.3.59**), se muestra dicha representación.

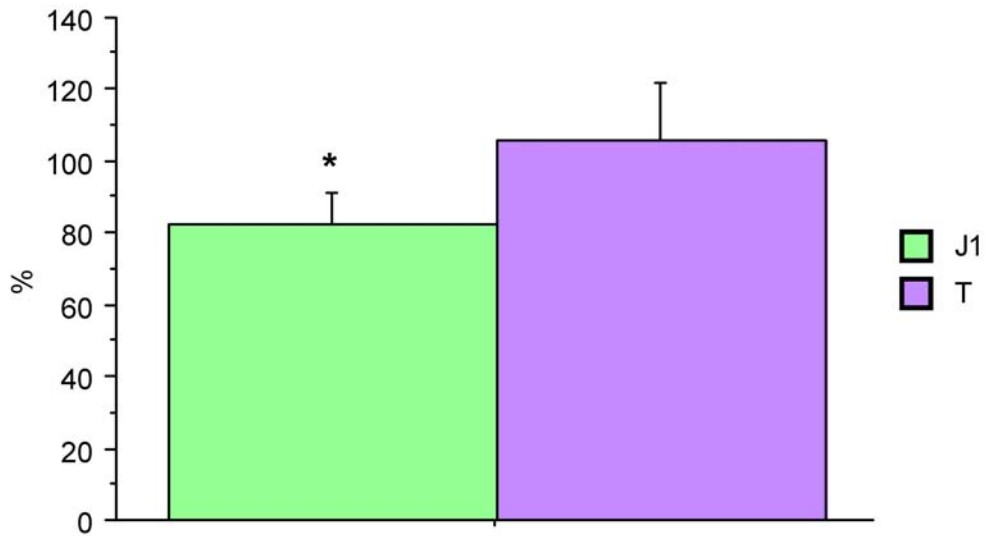


Fig.3.59. Cuantificación de la síntesis mitocondrial de proteínas de las líneas celulares de los haplogrupos J1 y T. Los valores de la cuantificación son los siguientes: Haplogrupo J1, 82,3 ± 9 (5). Haplogrupo T, 105,6 ± 16 (5). * denota significancia estadística.

Las líneas celulares del haplogrupo J1 mostraron una tasa de síntesis de proteínas mitocondriales significativamente menor que las líneas celulares del haplogrupo T. Además, encontramos una correlación significativa ($r= 0,67$, $p= 0,03$) entre los valores de la tasa de síntesis proteica mitocondrial y la cantidad del polipéptido p.MT-CO1 a la dosis de linezolid L3, para estas líneas celulares. A continuación (**Fig.3.60**), se muestra la representación de dicha correlación.

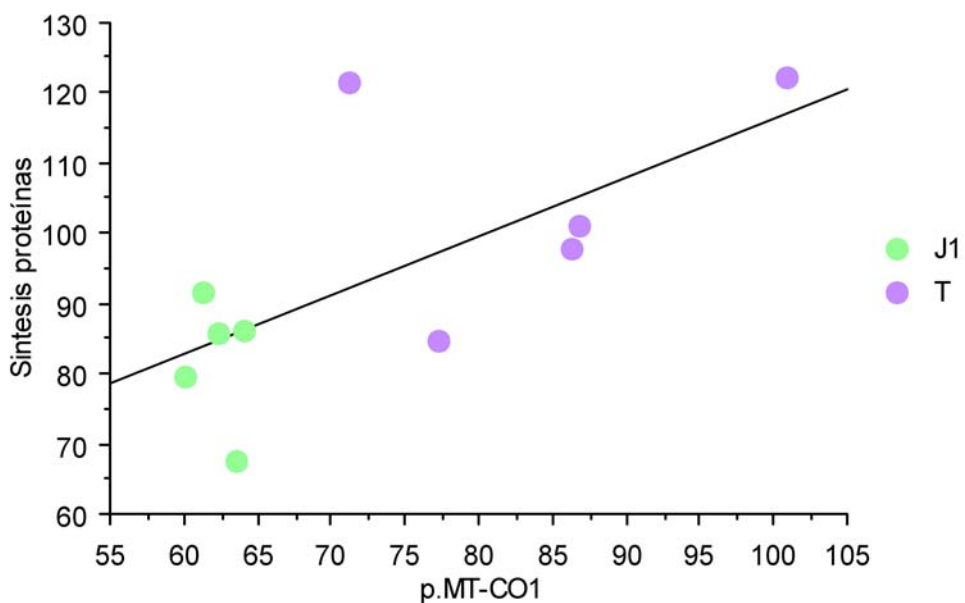


Fig.3.60. Correlación entre los valores de la síntesis mitocondrial de proteínas y de la cantidad del polipéptido p.MT-CO1 de las líneas celulares de los haplogrupos J1 y T.

9.5. Estudio de la cantidad del complejo respiratorio IV en cíbridos transmitocondriales tratados con linezolid.

El primer paso en la ruta de ensamblaje del complejo IV es la inserción de la subunidad p.MT-CO1, codificada en el mtDNA, en la membrana interna mitocondrial (Fernandez-Vizarra, Tiranti et al. 2009). Hemos encontrado que el tratamiento de las líneas celulares de los distintos haplogrupos mitocondriales con el antibiótico linezolid, provoca que los niveles de p.MT-CO1 sean diferentes entre estas células. Estas diferencias podrían afectar al ensamblaje del complejo IV respiratorio. Por ello, medimos la cantidad de este complejo OXPHOS en las 20 líneas celulares tratadas con la dosis de linezolid L3. Estos valores se corrigieron por la actividad enzimática citrato sintasa (CS), una enzima de la matriz (codificada en el nDNA) que refleja el volumen o número de mitocondrias. Se analizó el cambio de cada línea celular entre la condición con antibiótico respecto a la condición en ausencia del mismo. En la siguiente imagen (**Fig.3.61**) se muestra esta representación.

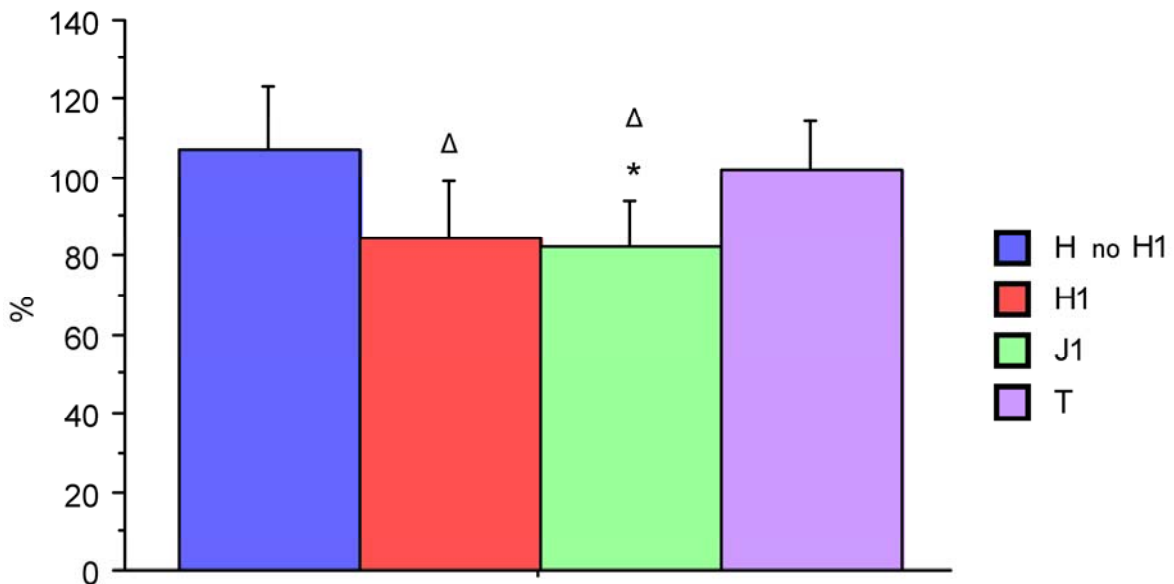


Fig.3.61. Cantidad de complejo respiratorio IV corregido por actividad específica CS de las 20 líneas celulares tratadas con linezolid, separadas según su haplogrupo mitocondrial. Los valores de complejo IV corregido por actividad CS son los siguientes: Haplogrupo H no H1, $106,9 \pm 16$ (5). Haplogrupo H1, $84,2 \pm 15$ (5). Haplogrupo J1, $82,3 \pm 12$ (5). Haplogrupo T, $101,7 \pm 13$ (5). * y Δ denotan diferencias estadísticamente significativas de T y de H no H1 respectivamente.

La cantidad de complejo respiratorio IV es diferente entre las líneas celulares de los distintos genotipos del mtDNA. Aquellas que pertenecen a los haplogrupos T y H no H1 presentan los valores más altos de este complejo respiratorio en presencia de la dosis L3 de Linezolid. Las líneas celulares pertenecientes a los genotipos mitocondriales J1 y H1 mostraron los valores más bajos de este parámetro, confirmando un mayor efecto del antibiótico. Además, un análisis estadístico ANOVA mostró que las variables haplogrupo y cantidad de complejo IV eran dependientes ($p= 0,029$). Esto indica que, en esas condiciones existe una relación entre la cantidad de complejo IV y el fondo genético mitocondrial.

9.6. Estudio de la actividad del complejo respiratorio IV en cíbridos transmitocondriales tratados con linezolid.

Para comprobar si las diferencias en la cantidad de complejo IV tenían efecto sobre la actividad enzimática del mismo, se midió esta actividad enzimática en las 20 líneas celulares, en ausencia y presencia de la dosis L3 de linezolid. Estos valores se corrigieron también por la actividad enzimática de la CS, para valorar la masa mitocondrial de cada línea celular. Además, se analizó el cambio de cada línea celular entre la condición con antibiótico respecto a la condición en ausencia del mismo. A continuación se presentan dichos valores, separados por genotipos mitocondriales (**Fig.3.62**).

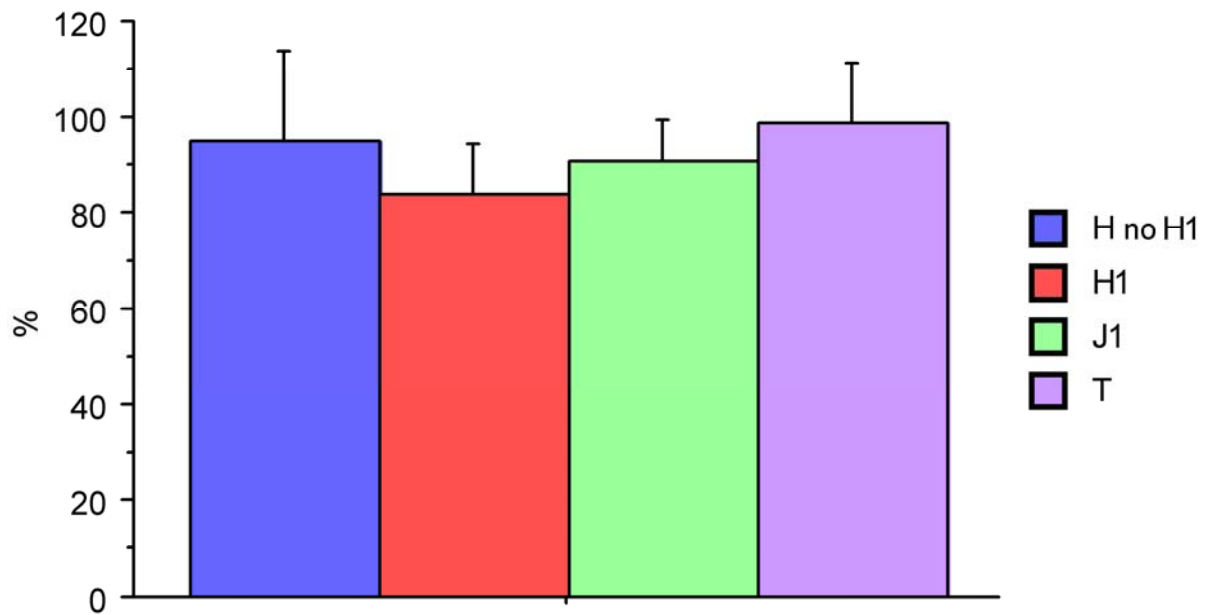


Fig.3.62. Actividad específica de complejo respiratorio IV corregido por actividad específica CS de las 20 líneas celulares tratadas con linezolid, separadas según su haplogrupo mitocondrial. Los valores de complejo IV corregido por actividad CS son los siguientes: Haplogrupo H no H1, $95,0 \pm 18$ (5). Haplogrupo H1, $83,9 \pm 10$ (5). Haplogrupo J1, $90,6 \pm 9$ (5). Haplogrupo T, $98,7 \pm 13$ (5).

No se encontraron diferencias significativas en la actividad del complejo IV respiratorio en presencia de linezolid entre las líneas celulares de los distintos fondos genético del mtDNA. Sin embargo, se encontró una correlación estadísticamente significativa entre la actividad y la cantidad de complejo respiratorio IV corregidos por actividad CS ($r= 0,59$, $p=0,0047$). Esto indica que las diferencias obtenidas en la cantidad de este complejo de la cadena de transporte electrónico, de estas líneas celulares en estas condiciones, deben estar relacionadas con los valores obtenidos en su actividad. En la siguiente imagen (**Fig.3.63**) podemos observar dicha correlación.

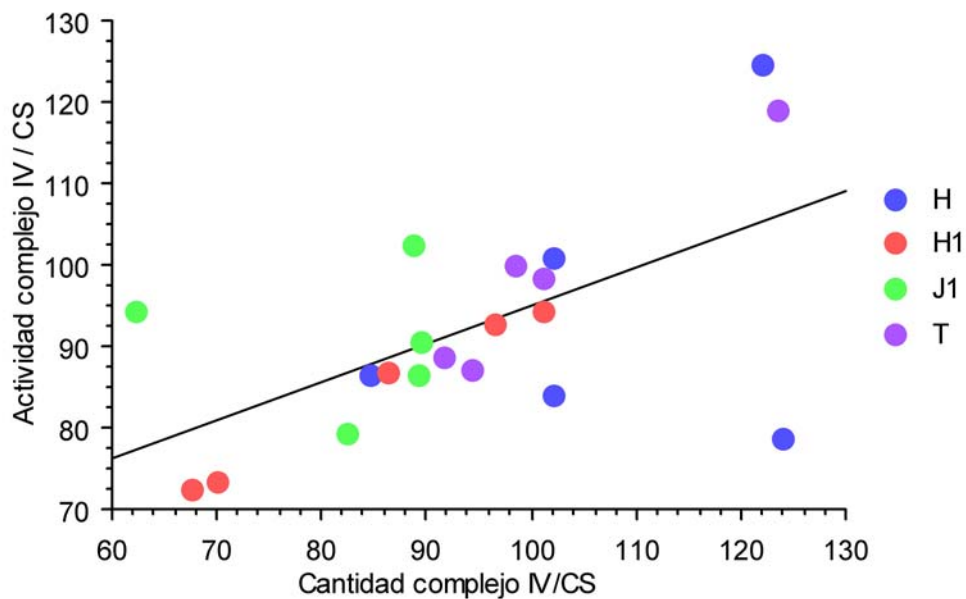


Fig.3.63. Correlación entre los valores de la actividad y la cantidad de complejo respiratorio IV corregidos por actividad CS de las 20 líneas celulares en presencia de la dosis L3 de linezolid.

9.7. Estudios de crecimiento competitivo en híbridos transmitocondriales tratados con linezolid.

Hasta ahora, las pruebas realizadas con las 20 líneas celulares y el antibiótico ribosomal linezolid han encontrado diferencias entre los distintos genotipos del mtDNA a nivel molecular y bioquímico. Para medir si el tratamiento con este fármaco puede afectar de forma diferencial a líneas celulares de distinto fondo genético mitocondrial a un nivel celular, se midió la capacidad de crecimiento de estas células. Se ha demostrado que ensayos de crecimiento competitivo, utilizando híbridos transmitocondriales de distintos haplogrupos, pueden evidenciar diferencias en la tasa proliferativa de los mismos (Gomez-Duran, Pacheu-Grau et al. 2010). En los parámetros estudiados hasta el momento, el haplogrupo mitocondrial T y el J1 parecen ser el menos y el más afectado por el linezolid respectivamente. Por todo ello, realizamos experimentos de crecimiento competitivo con 5 líneas celulares de cada uno de estos haplogrupos tratadas con linezolid. Para ello, mezclamos cada línea celular de una de las filogenias mitocondriales con las 5 líneas celulares del otro genotipo mitocondrial y las crecimos en ausencia y presencia de la dosis L3 de linezolid. Para tomar en consideración las diferencias al

realizar la mezcla inicial de genotipos, restamos el valor obtenido en esta mezcla inicial a los obtenidos en las dos condiciones del ensayo. A continuación, podemos observar los resultados de dichos experimentos (Fig.3.64).

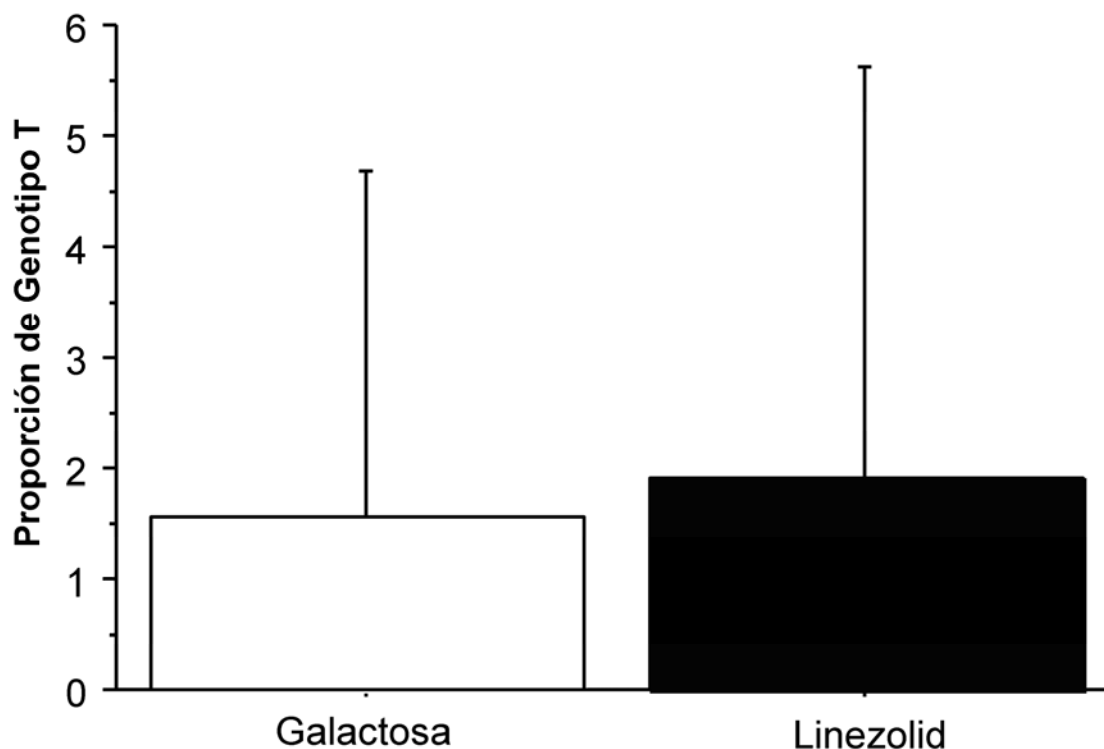


Fig.3.64. Ensayos de crecimiento competitivo entre 5 líneas celulares del haplogrupo J1 y 5 del haplogrupo T en ausencia y presencia de la dosis L3 de linezolid. La diferencia de CT representa el aumento en la proporción de genotipo T en cada mezcla. Los valores son los siguientes: Galactosa, $1,55 \pm 3,1$ (21). Linezolid, $1,92 \pm 3,7$ (21).

La diferencia de CT es una medida del aumento de la proporción del genotipo T en las dos condiciones del ensayo. El haber obtenido dos valores positivos indica que, en ambos casos se ha producido un aumento del genotipo T comparado con la mezcla inicial. Sin embargo, y a pesar de que en el caso del tratamiento con linezolid la media de la diferencia de CT es mayor que en ausencia del mismo, no se encontraron diferencias significativas entre las dos condiciones. Por lo tanto, no podemos afirmar que el tratamiento con linezolid afecte de forma diferencial la tasa de crecimiento entre líneas celulares de los haplogrupos J1 y T.

9.8. Estudio de la cantidad de p.MT-CO1 y SDHA en cíbridos transmitocondriales tratados con el aminoglicósido paromomicina.

El sitio de unión del linezolid está localizado en el mt-rRNA 16S, dentro del centro peptidil transferasa (Long, Munck et al. 2010). Por otro lado, los aminoglicósidos se unen a la subunidad pequeña ribosomal, dentro del sitio decodificante (Hobbie, Akshay et al. 2008). Para comprobar que los efectos diferenciales que hemos observado entre líneas celulares con distinto fondo genético mitocondrial tratadas con linezolid no fueran debidas a efectos inespecíficos del antibiótico, decidimos analizar el efecto del tratamiento con aminoglicósidos sobre estas líneas celulares. Para ello, medimos la cantidad de p.MT-CO1 corregida por la cantidad de SDHA en las 20 líneas celulares tratadas con 2 mg/ml del aminoglicósido paromomicina. Se analizó el cambio de cada línea celular entre la condición con antibiótico respecto a los valores obtenidos en ausencia del mismo. A continuación, la siguiente figura (**Fig.3.65**) ilustra estos resultados.

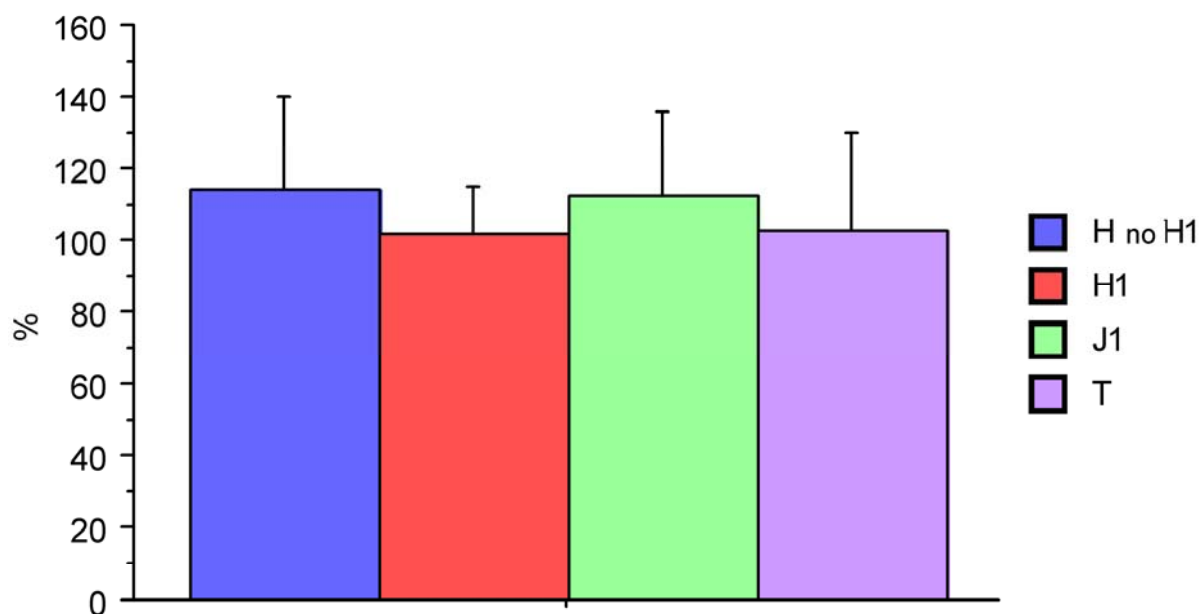


Fig.3.65. Cantidad de p.MT-CO1 corregida por la cantidad de SDHA en 20 líneas celulares tratadas con 2 mg/ml de paromomicina, separadas según su haplogrupo mitocondrial. Los valores de p.MT-CO1 son los siguientes: Haplogrupo H no H1, $114,2 \pm 25$ (5). Haplogrupo H1, $101,2 \pm 14$ (5). Haplogrupo J1, $111,1 \pm 23$ (5). Haplogrupo T, $102,7 \pm 27$ (5).

No se encontraron diferencias significativas en cantidad de p.MT-CO1 entre las líneas celulares de las distintas filogenias mitocondriales cuando estas fueron tratadas con 2 mg/ml de paromomicina. Esto parece indicar que nuestras variantes de estudio no juegan ningún papel en la unión de los aminoglicósidos.

9.9. Estudio de la cantidad de p.MT-CO1 y SDHA en 5 cíbridos transmitocondriales pertenecientes al haplogrupo mitocondrial Uk.

El haplogrupo mitocondrial T está definido entre otras por las variantes m.2706G y m.3010G. Sin embargo, tiene otras variantes en su mtDNA que también lo diferencian del resto de filogenias mitocondriales utilizadas en este estudio (Ruiz-Pesini, Lapena et al. 2000). Las líneas celulares de este genotipo mitocondrial parecen ser las menos afectadas por el tratamiento del antibiótico de acción ribosomal linezolid. Para comprobar si este efecto es debido a estas dos variantes localizadas en el gen *MT-RNR2*, se estudió el efecto de este fármaco sobre 5 cíbridos del haplogrupo Uk. Este fondo genético mitocondrial está más alejado filogenéticamente del T que, por ejemplo, el J1, pero comparte con el T las variantes m.2706G y m.3010G (Ruiz-Pesini, Lott et al. 2007). Por todo ello, medimos la cantidad de p.MT-CO1 corregida por la cantidad de SDHA en estas líneas celulares, con las 5 concentraciones de linezolid y las comparamos con los valores obtenidos con las 20 líneas celulares. Se analizó el cambio de cada línea celular entre cada condición con antibiótico respecto a los valores obtenidos en ausencia del mismo. A continuación, podemos observar estos resultados (**Fig.3.66**).

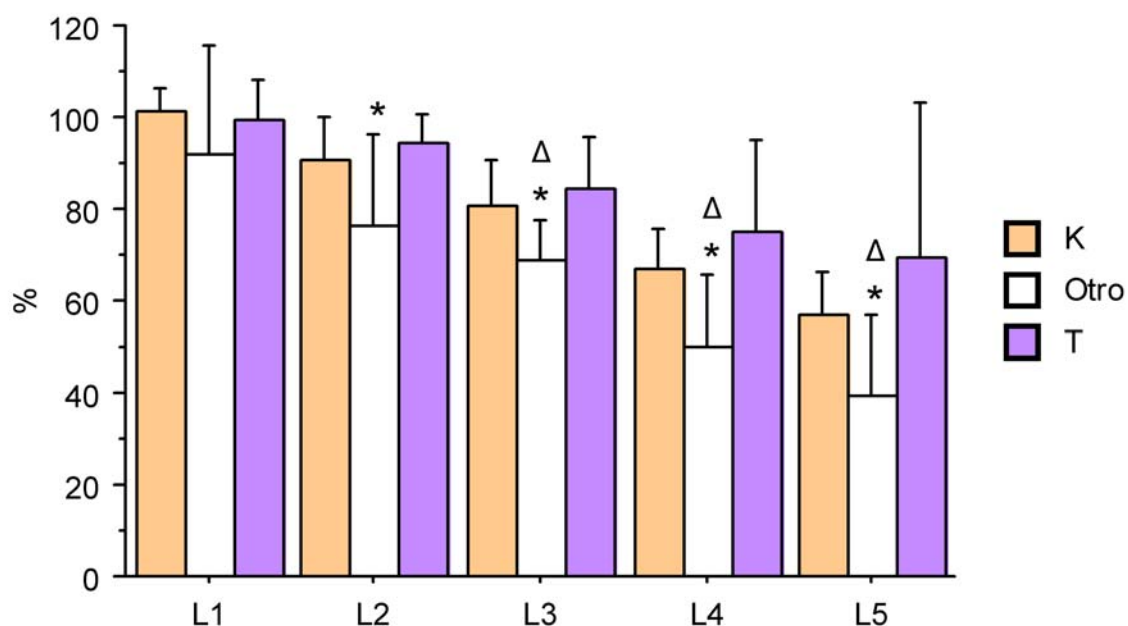


Fig.3.66. Cantidad de p.MT-CO1 de las 20 líneas celulares y las 5 líneas celulares del haplogrupo mitocondrial Uk con las distintas dosis de linezolid. Se han separado en 3 grupos según su fondo genético mitocondrial, T, Uk y Otros. Los valores de p.MT-CO1 son los siguientes: L1. Haplogrupo Uk, $101,0 \pm 5$ (5). Haplogrupo Otros, $98,9 \pm 24$ (15). Haplogrupo T, $99,6 \pm 9$ (5). L2. Haplogrupo Uk, $90,8 \pm 9$ (5). Haplogrupo Otros, $76,2 \pm 20$ (15). Haplogrupo T, $94,2 \pm 6$ (5). L3. Haplogrupo Uk, $80,7 \pm 10$ (5). Haplogrupo Otros, $68,8 \pm 9$ (15). Haplogrupo T, $84,5 \pm 11$ (5). L4. Haplogrupo Uk, $67,2 \pm 9$ (5). Haplogrupo Otros, $50,0 \pm 15$ (15). Haplogrupo T, $75,2 \pm 19$ (5). L5. Haplogrupo Uk, $57,1 \pm 9$ (5). Haplogrupo Otros, $39,7 \pm 17$ (15). Haplogrupo T, $61,4 \pm 34$ (5). * y Δ denotan diferencias estadísticamente significativas de T y de Uk respectivamente.

De nuevo, el tratamiento con las distintas dosis de linezolid produce un efecto diferente en los distintos genotipos del mtDNA. Podemos observar que el haplogrupo T es el que presenta una mayor cantidad de p.MT-CO1 para todas las dosis de linezolid, siendo por lo tanto el que se ve menos afectado por el tratamiento con este antibiótico. El grupo "Otros", que agrupa a las líneas celulares pertenecientes a las filogenias H, H1 y J1 es el que menos cantidad de p.MT-CO1 presenta y es de esta manera el que sufre el mayor efecto de esta droga ribosomal. Las líneas celulares del haplogrupo Uk mostraron unos valores de p.MT-CO1 más similares a los del haplogrupo T que al resto de grupos genéticos mitocondriales. Además, se encontraron diferencias significativas entre la cantidad de esta proteína mitocondrial entre los híbridos del grupo "Otros" y los híbridos T y Uk, cuando estos fueron tratados con las dosis L3, L4 y L5 de linezolid. Sin embargo en ninguno de las condiciones del estudio se encontraron diferencias significativas de cantidad de p.MT-CO1

entre los haplogrupos T y Uk. Por último, un análisis estadístico ANOVA mostró que para las dosis L3 ($p=0,005$), L4 ($p=0,008$) y L5 ($p=0,02$) las variables cantidad de p.MT-CO1 y haplogrupo eran dependientes. Esto vuelve a mostrar que, en estas condiciones existe una relación entre la cantidad de esta subunidad OXPHOS y el tipo de fondo genético mitocondrial.

9.10. Estudio de la cantidad de p.MT-CO1 y SDHA en híbridos transmitocondriales tratados con Cloranfenicol.

El cloranfenicol es otro antibiótico de acción ribosomal que también se une al PTC (Rodríguez-Fonseca, Amils et al. 1995). Esta droga inhibe el sistema de traducción mitocondrial y su administración en células y tejidos humanos produce efectos tóxicos severos ((Yunis 1989; Li, Cheng et al. 2010). Los sitios de unión del cloranfenicol y del linezolid se superponen (Wilson, Schluenzen et al. 2008). Sin embargo, dado que sus estructuras químicas no son idénticas, posiblemente interaccionen de forma diferente con un mismo bolsillo ribosomal o quizás interaccionen de distinta forma con bolsillos ribosomales ligeramente diferentes. Hemos observado que la acción del linezolid sobre la síntesis de proteínas mitocondrial de líneas híbridas transmitocondriales varía en función de su genotipo mitocondrial. Para estudiar el efecto de otro antibiótico de acción ribosomal, que también actúa sobre el PTC pero de forma ligeramente distinta al linezolid, tratamos las 25 líneas celulares con una dosis 10 μ M de Cloranfenicol. A continuación, medimos la cantidad de p.MT-CO1 corregida por la cantidad de SDHA en estas líneas en ausencia y presencia del antibiótico. Se analizó el cambio de cada línea celular entre cada condición con antibiótico respecto a los valores obtenidos en ausencia del mismo. En la siguiente figura (**Fig.3.67**) se pueden observar estos resultados.

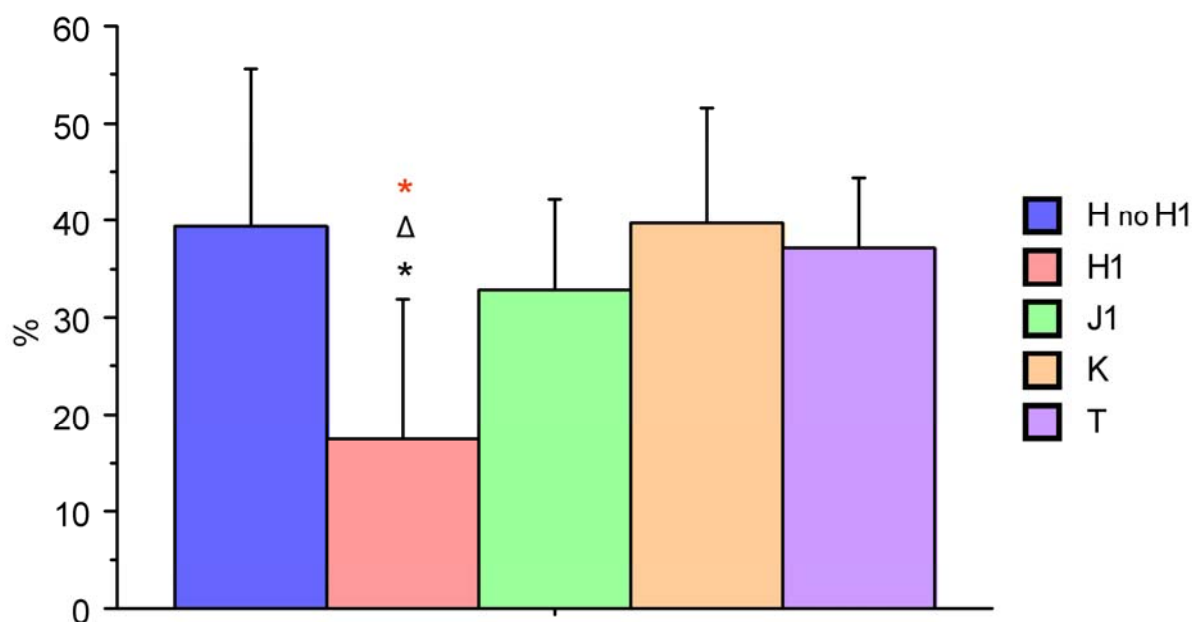


Fig.3.67. Cantidad de p.MT-CO1 corregida por la cantidad de SDHA en 25 líneas celulares tratadas con 10 μ M de cloranfenicol, separadas según su haplogrupo mitocondrial. Los valores de p.MT-CO1 son los siguientes: Haplogrupo H no H1, $39,3 \pm 16$ (5). Haplogrupo H1, $17,5 \pm 14$ (5). Haplogrupo J1, $32,7 \pm 9$ (5). Haplogrupo T, $37,1 \pm 7$ (5). Haplogrupo Uk, $39,5 \pm 12$ (5). *, Δ y * denotan diferencias estadísticamente significativas de T, H no H1 y Uk respectivamente.

El tratamiento con cloranfenicol también afectó de manera diferencial a nuestras líneas celulares. En este caso, las líneas celulares pertenecientes a los haplogrupos H no H1, T y Uk presentaron los mayores niveles de p.MT-CO1 y fueron por lo tanto las menos afectadas por el cloranfenicol. Los híbridos del haplogrupo H1 mostraron los menores niveles de p.MT-CO1, por lo que sufrieron el mayor efecto de esta droga de acción ribosomal. Estos valores fueron significativamente diferentes de los de los haplogrupos H no H1, T y Uk. Las células pertenecientes al fondo genético mitocondrial J1 presentaron valores de p.MT-CO1 intermedios entre aquellas pertenecientes al H1 y las pertenecientes a H no H1, T y Uk. Un análisis estadístico ANOVA mostró que en estas condiciones las variables cantidad de p.MT-CO1 y haplogrupo mitocondrial eran prácticamente dependientes ($p=0,052$), por lo que parece que el efecto de este antibiótico de acción ribosomal y el genotipo mitocondrial están relacionados de alguna manera.

9.11. Análisis de la influencia de las variantes m.2706 y m.3010 en parámetros mitocondriales de líneas celulares tratadas con antibióticos ribosomales.

Hasta ahora hemos analizado el posible efecto de distintos fondos genéticos mitocondriales en el tratamiento con antibióticos ribosomales. Las filogenias mitocondriales que hemos utilizado en este estudio están definidas entre otras por dos variantes localizadas en el rRNA 16S. Son los cambios m.2706A>G y m.3010G>A. Para comprobar si las variantes de alguna de las dos posiciones por separado pueden tener un mayor efecto en la interacción con antibióticos de acción ribosomal como el linezolid o el cloranfenicol, volvimos a analizar los resultados que habíamos obtenido en las 20 o 25 líneas celulares teniendo en cuenta estas dos posiciones. En primer lugar, analizamos la cantidad de p.MT-CO1 en las 25 líneas celulares con las concentraciones de linezolid, como se puede ver a continuación (**Fig.3.68**).

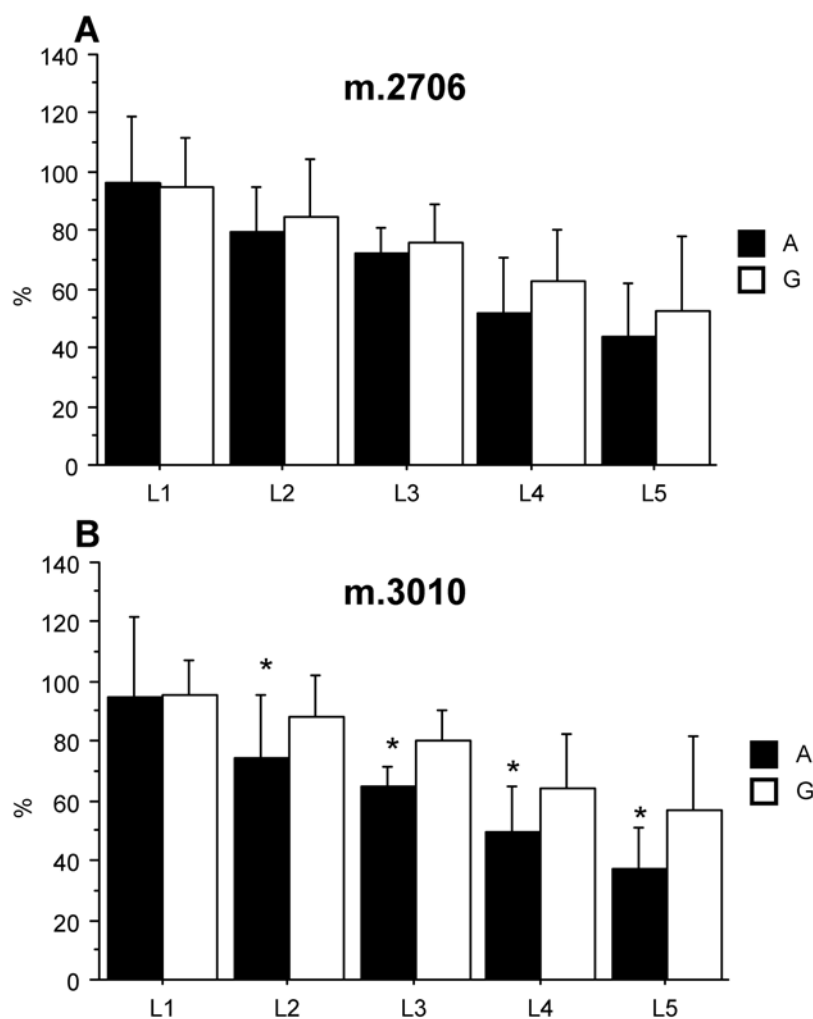


Fig.3.68. Cantidad de p.MT-CO1 corregida por cantidad de SDHA en las 25 líneas celulares tratadas con linezolid, separadas por las variantes m.2706 y m.3010. A. Valores separados por la variante m.2706. Los valores de p.MT-CO1 son los siguientes: L1.m.2706A, $96,6 \pm 22$ (10). m.2706G, $94,5 \pm 17$ (15). L2.m.2706A, $79,7 \pm 15$ (10). m.2706G, $84,7 \pm 20$ (15). L3.m.2706A, $72,1 \pm 9$ (10). m.2706G, $75,8 \pm 13$ (15). L4.m.2706A, $51,9 \pm 18$ (10). m.2706G, $62,8 \pm 17$ (15). L5.m.2706A, $43,7 \pm 18$ (10). m.2706G, $52,6 \pm 26$ (15). B. Valores separados por la variante m.3010. Los valores de p.MT-CO1 son los siguientes: L1.m.3010A, $94,5 \pm 27$ (10). m.3010G, $95,8 \pm 12$ (15). L2. m.3010A, $74,4 \pm 21$ (10). m.3010G, $88,2 \pm 13$ (15). L3. m.3010A, $65,1 \pm 7$ (10). m.3010G, $80,4 \pm 9$ (15). L4. m.3010A, $49,4 \pm 15$ (10). m.3010G, $64,5 \pm 18$ (15). L5. m.3010A, $37,2 \pm 14$ (10). m.3010G, $56,9 \pm 25$ (15). * denota diferencias estadísticamente significativas.

No se encontraron diferencias significativas en la cantidad de p.MT-CO1 con las distintas concentraciones de linezolid, entre las variantes m.2706A y m.2706G. Estas dos variantes dividirían los fondos genéticos mitocondriales analizados en H no H1 y H1 (m.2706A) y J1, T y Uk (m.2706G). Sin embargo, cuando comparamos la cantidad de p.MT-CO1 con las distintas concentraciones de linezolid entre las variantes m.3010A y m.3010G pudimos observar que a todas las condiciones excepto a la dosis L1 de linezolid, las

líneas celulares con la variante m.3010A (H1 y J1) tenían una cantidad significativamente menor de p.MT-CO1 que aquellas que portan la variante m.3010G (H no H1, T y Uk).

A continuación decidimos analizar el impacto individual de estas variantes en otros parámetros ya estudiados como la tasa de síntesis mitocondrial de proteínas, la cantidad y actividad específica del complejo respiratorio IV corregidas por la actividad específica de la CS o la cantidad de p.MT-CO1 en líneas celulares tratadas con cloranfenicol. A continuación podemos observar una figura (**Fig.3.69**) con estos datos representados.

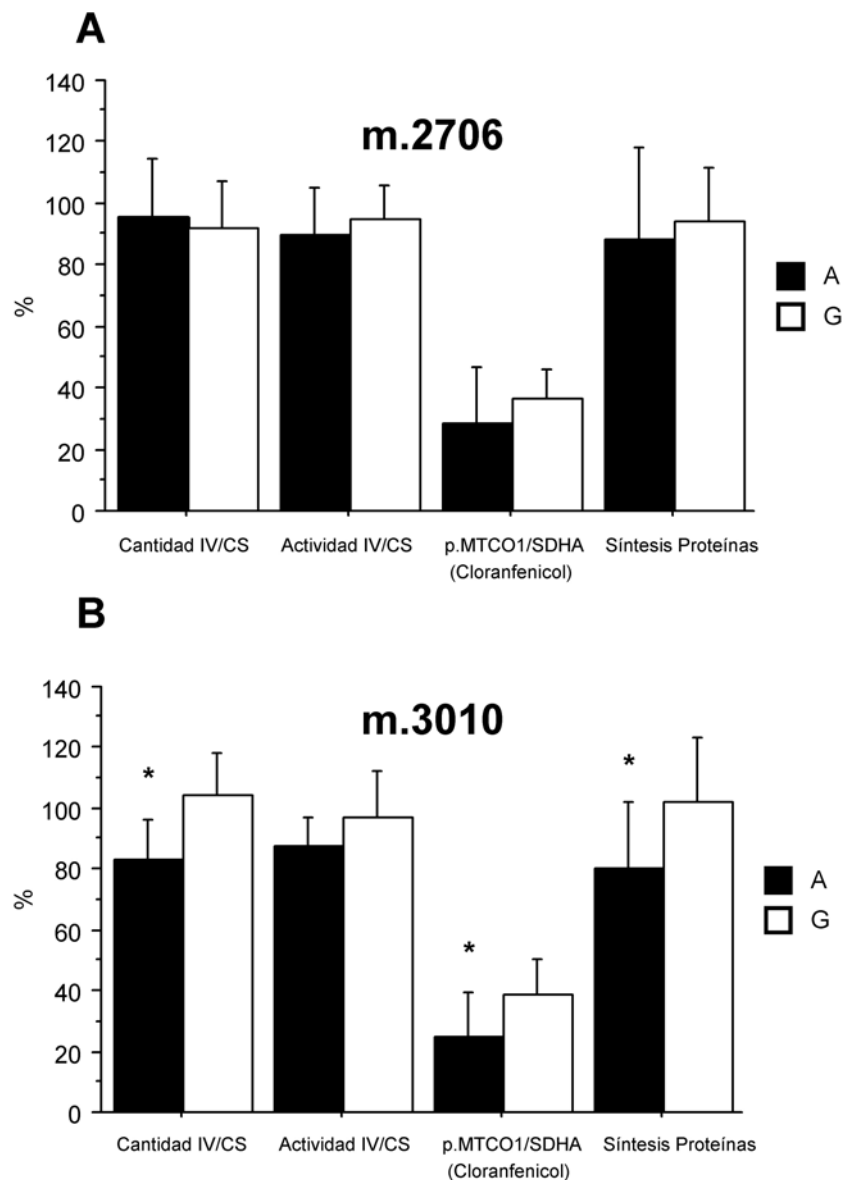


Fig.3.69. Distintos parámetros mitocondriales en las 20 o 25 líneas celulares tratadas con linezolid o cloranfenicol, separadas por las variantes de las posiciones m.2706 y m.3010. A. Valores separados por la variante m.2706. Los valores de cada parámetro son los siguientes: cantidad de complejo IV/ actividad específica de CS. m.2706A, $95,6 \pm 19$ (10). m.2706G, $92,0 \pm 15$ (10). Actividad específica de complejo IV/ actividad específica de CS. m.2706A, $89,5 \pm 15$ (10). m.2706G, $94,6 \pm 11$ (10). Cantidad de p.MT-CO1/cantidad de SDHA en células tratadas con cloranfenicol .m.2706A, $28,4 \pm 18$ (10). m.2706G, $36,5 \pm 9$ (10). Síntesis mitocondrial de proteínas. m.2706A, $88,1 \pm 30$ (10). m.2706G, $93,9 \pm 17$ (10). B. Valores separados por la variante m.3010. Los valores de cada parámetro son los siguientes: cantidad de complejo IV/ actividad específica de CS. m.2706A, $83,3 \pm 13$ (10). m.2706G, $104,3 \pm 14$ (10). Actividad específica de complejo IV/ actividad específica de CS. m.2706A, $87,3 \pm 9$ (10). m.2706G, $96,9 \pm 15$ (10). Cantidad de p.MT-CO1/cantidad de SDHA en células tratadas con cloranfenicol .m.2706A, $25,1 \pm 14$ (10). m.2706G, $38,6 \pm 11$ (10). Síntesis mitocondrial de proteínas. m.2706A, $80,1 \pm 22$ (10). m.2706G, $102,0 \pm 22$ (10). * denota diferencias estadísticamente significativas.

No se encontraron diferencias significativas entre los distintos parámetros mitocondriales analizados entre las variantes m.2706A y m.2706G. Sin embargo cuando se compararon las variantes m.3010A (define a los haplogrupos mitocondriales H1 y J1) y m.3010G (define a las filogenias H no H1, T y Uk), se pudo observar que las líneas celulares con la variante m.3010A presentaron una menor cantidad de complejo respiratorio IV corregido por actividad específica de CS, una menor cantidad de p.MT-CO1 corregido por la cantidad de SDHA cuando las células fueron tratadas con cloranfenicol y una menor tasa de síntesis mitocondrial de proteínas. Además, estas diferencias eran estadísticamente significativas.

Curiosamente, la posición m.3010 se encuentra en un tallo altamente conservado del rRNA 16S. En esta estructura del ribosoma se han descrito mutaciones de resistencia en bacteria a otros antibióticos de acción ribosomal como por ejemplo la avilamicina y la evernimicina (Kofoed and Vester 2002).

10. Estudio de la variación en los mt-rRNAs en pacientes tratados con linezolid.

Como se ha comentado anteriormente el antibiótico linezolid pertenece a la familia de las oxazolidinonas, que inhiben la síntesis proteica bacteriana uniéndose al rRNA bacteriano 23S. Una de las mayores preocupaciones sobre el uso de este antibiótico es su perfil de toxicidad (Hutchinson 2003). Cuando este antibiótico se administra de manera continuada puede producir efectos secundarios, tales como acidosis láctica, neuropatía periférica, o trombocitopenia. Algunos de estos efectos pueden ser debidos a la capacidad del Linezolid de interferir con la síntesis mitocondrial de proteínas (Garrabou, Soriano et al. 2007). Nuestros experimentos utilizando líneas celulares con distintas variantes genéticas poblaciones en los mt-rRNAs y este antibiótico parecen indicar que el efecto del mismo es dependiente del genotipo mitocondrial. Por ello, analizamos las variantes genéticas poblaciones en los mt-rRNAs de pacientes tratados con linezolid.

10.1 Criterios de selección de pacientes tratados con linezolid.

Se seleccionaron pacientes que habían sido tratados durante un periodo prolongado con Linezolid. Algunos de ellos sufrieron distintos efectos secundarios asociados a este tratamiento, mientras que otros no presentaron ninguna complicación relacionada. A continuación se presenta una tabla (**tabla 3.12**), con la sintomatología de cada paciente tras el tratamiento.

Paciente	Fenotipo
1A	Hiperlactatemia.
2A	Hiperlactatemia, anemia, astenia moderada.
3A	Hiperlactatemia.
4A	Hiperlactatemia, astenia moderada.
5A	Hiperlactatemia, alteraciones gastrointestinales.
1	Plaquetopenia.
2	Asintomático.
3	Alteraciones gastrointestinales, anemia, plaquetopenia.
L4	Asintomático.
L5	Asintomático.
L6	Vómitos, astenia severa.
L7	Asintomático.
L8a	Hiperlactatemia.
L9b	Hiperlactatemia.
L10a	Asintomático.

Tabla 3.12. Pacientes tratados de manera prolongada con el antibiótico linezolid y efectos secundarios producidos por el tratamiento.

10.2 Búsqueda de mutaciones y estudio de la influencia de variantes poblacionales en los mt-rRNAs en pacientes tratados con linezolid.

El linezolid bloquea la síntesis de proteínas bacteriana y debido a la similitud entre los sistemas de traducción bacteriana y mitocondrial, se producen efectos secundarios debido al tratamiento prolongado con este antibiótico. Sin embargo, esto solo ocurrió en algunos de los pacientes que reciben esta terapia. Por ello, se analizó la presencia de mutaciones, y la distribución de variantes genéticas poblacionales en los mt-rRNAs, que pudieran modular el efecto de este antibiótico. Se secuenciaron los genes *MT-RNR1* y

MT-RNR2 (12S y 16S). En la siguiente tabla (**tabla 3.13**), se muestran las mutaciones encontradas en estos genes.

Paciente	Variantes encontradas en los mt-rRNAs
1 ^a	m.750A>G, m.1438A>G, m.2706A>G, m.3197T>C
2 ^a	m.750A>G, m.1438A>G, m.3010G>A
3 ^a	m.750A>G, m.1438A>G, m.2098G>A
4 ^a	m.709G>A, m.750A>G, m.1438A>G, m.1888G>A, m.2706A>G, m.2850T>C
5 ^a	m.750A>G, m.1189T>C, m.1438A>G, m.1811A>G, m.2706A>G
1	m.750A>G, m.1438A>G, m.1700T>C, m.2706A>G, m.3197T>C
2	m.750A>G, m.1438A>G
3	m.750A>G, m.961insC, m.1438A>G, m.2706A>G, m.3197T>C
L4	m.750A>G, m.1438A>G, m.2706A>G, m.3010G>A
L5	m.750A>G, m.1438A>G, m.1598G>A, m.1703C>T, m.1719G>A, m.2706A>G
L6	m.750A>G, m.1438A>G, m.2092C>T
L7	m.709G>A, m.750A>G, m.1438A>G
L8a	m.750A>G, m.980T>C, m.1438A>G, m.1811A>G, m.2523C>T, m.2706A>G
L9b	m.750A>G, m.1438A>G
L10a	m.750A>G, m.1438A>G

Tabla 3.13. Listado de mutaciones encontradas por secuenciación de los mt-rRNAs en los pacientes tratados con Linezolid.

Todas las mutaciones encontradas en estos pacientes habían sido previamente descritas y se consideran polimorfismos poblacionales (Ruiz-Pesini, Lott et al. 2007). A continuación, para valorar la posible influencia de la variación genética poblacional de los mt-rRNAs en el tratamiento con linezolid, se determinó el haplogrupo mitocondrial de estas muestras, dilucidando la presencia o ausencia de SNPs en los mt-rRNAs.

Los polimorfismos m.2706A>G y m.3010G>A, localizados en el gen *MT-RNR2*, definen junto con otras posiciones localizadas en otros genes del mtDNA, algunas de las filogenias mitocondriales más importantes de la población caucásica. Las combinaciones de los polimorfismos en estas dos posiciones del gen *MT-RNR2*, nos permiten distinguir 4 grandes grupos de filogenias mitocondriales. La combinación m.2706A-m.3010A permite distinguir al haplogrupo H1, presente en el 20% de la población caucásica. La combinación m.2706A-m.3010G se asocia con el haplogrupo H, el más abundante entre la población caucásica, presente en el 40% de la población.

La combinación m.2706G-m.3010A además de otras variantes del mtDNA define al haplogrupo J1, presente en el 6% de la población europea. Otros fondos genéticos mitocondriales europeos mayoritarios portan las variantes m.2706G-m.3010G. Nuestros estudios en líneas celulares que portan estas variantes genéticas poblacionales del mtDNA parecen indicar que el linezolid tiene un efecto diferencial en esos genotipos. Por lo tanto, para analizar si estos dos polimorfismos poblacionales podían ser responsables del efecto diferencial del linezolid en estos pacientes, se estudió el haplogrupo mitocondrial de estas muestras y se analizó la combinación de las variantes en estas dos posiciones (m.2706 y m.3010), del gen *MT-RNR2*. A continuación (**tabla 3.14**), podemos ver la distribución de estas variantes en los pacientes tratados con el antibiótico linezolid.

Paciente	Variantes definen haplogrupos mitocondriales	Haplogrupo
1a	m.2706G, m.3010G	Otros
2a	m.2706A, m.3010A	H1
3a	m.2706A, m.3010G	H no H1
4a	m.2706G, m.3010G	Otros
5a	m.2706G, m.3010G	Otros
1	m.2706G, m.3010G	Otros
2	m.2706A, m.3010G	H no H1
3	m.2706G, m.3010G	Otros
L4	m.2706G, m.3010A	J1
L5	m.2706G, m.3010G	Otros
L6	m.2706A, m.3010G	H no H1
L7	m.2706A, m.3010G	H no H1
L8a	m.2706G, m.3010G	Otros
L9b	m.2706A, m.3010G	H no H1
L10a	m.2706A, m.3010G	H no H1

Tabla 3.14. Listado de variantes que definen distintos haplogrupos mitocondriales en pacientes tratados con linezolid. m.2706A, m.3010A definen al haplogrupo H1; m.2706A, m.3010G definen al haplogrupo H no H1; m.2706G, m.3010A definen al haplogrupo J1 y m.2706G, m.3010G definen al haplogrupo T u otros haplogrupos que no portan las variantes anteriores.

No se encontraron diferencias significativas en la distribución de los cuatros grupos de haplotipos mitocondriales entre los pacientes que desarrollan síntomas tras el tratamiento, y en los que permanecen asintomáticos tras el mismo.

11. Uso de aminoglicósidos para el tratamiento de enfermedades mitocondriales causadas por codones de terminación prematura.

Más de 1800 mutaciones nucleares terminan prematuramente la traducción y producen proteínas truncadas. Estas mutaciones causan enfermedades hereditarias, como la distrofia muscular de Duchenne y la fibrosis cística. Se ha observado que los aminoglicósidos pueden producir incorporación de aminoácidos en codones de terminación (*readthrough*), evitando la terminación prematura y por tanto permitiendo la recuperación de la función de las proteínas truncadas (Phillips-Jones, Hill et al. 1995). Esto se ha utilizado como terapia en estas enfermedades con un éxito variable. Se han descrito también 18 mutaciones de este tipo en el mtDNA que causan enfermedades muy graves (**tabla 3.15**).

Complejo OXPHOS	Gen mtDNA	Mutación mtDNA	Polipéptido: "nonsense" posición/tamaño	Contexto codón	Mutación (%)	Referencia
CI	<i>MT-ND2</i>	m.4810G>A	W114X/347	cUAAg	94	(Pulkes, Liolitsa et al. 2005)
CIII	<i>MT-ND4</i>	m.11832G>A	W358X/459	uUAAu	54	(Andreu, Tanji et al. 1999)
	<i>MT-CYB</i>	m.15059G>A	G105X/380	cAGAu	63	(Andreu, Bruno et al. 1999)
		m.15084G>A	W113X/380	cUAAa	87	(Andreu, Hanna et al. 1999)
		m.15150G>A	W135X/380	gUAAg	60	(Legros, Chatzoglou et al. 2001)
		m.15168G>A	W141X/380	cUAAg	70	(Andreu, Hanna et al. 1999)
		m.15170G>A	G142X/380	aAGGg	>99	(Bruno, Santorelli et al. 2003)
		m.15242G>A	G166X/380	aAGAg	87	(Keightley, Anitori et al. 2000)
		m.15723G>A	W326X/380	uUAAc	87	(Andreu, Hanna et al. 1999)
	m.15761G>A	G339X/380	cAGAg	73	(Mancuso, Filosto et al. 2003)	
	m.15800C>T	Q352X/380	aUAAg	45	(Lamantea, Carrara et al. 2002)	
CIV	<i>MT-CO1</i>	m.5920G>A	W6X/513	uUAAc	61	(Karadimas, Greenstein et al. 2000)
		m.6930G>A	G343X/513	aAGAu	75	(Bruno, Martinuzzi et al. 1999)
	<i>MT-CO2</i>	m.7896G>A	W104X/227	aUAGu	76	(Campos, Garcia-Redondo et al. 2001)
		m.7970G>T	E129X/227	aUAAc	90	(Horvath, Schoser et al. 2005)
<i>MT-CO3</i>	m.9379G>A	W58X/261	aUAGc	93	(Horvath, Scharfe et al. 2002)	
	m.9952G>A	W249X/261	uUAAc	57	(Hanna, Nelson et al. 1998)	
CV	<i>MT-ATP8</i>	m.8529G>A	W55X/68	aUAAa	90	(Jonckheere, Hogeveen et al. 2008)

Tabla 3.15. Mutaciones "nonsense" en el mtDNA. Se indican las características de cada mutación, el contexto del codón de terminación generado y el estudio que encontró cada mutación.

Se quiso probar la eficacia de la administración de aminoglicósidos como terapia para estas enfermedades mitocondriales, utilizando para ello cultivos celulares.

11.1 Modelo celular para el estudio del tratamiento de enfermedades causadas por codones de terminación prematura.

Para este estudio, se utilizó una línea celular transmitocondrial que porta una mutación “nonsense” en la posición m.6390G>A y genera un *stop-codon* AGA en el gen *MT-CO1*. Para probar el efecto de los aminoglicósidos en el tratamiento de estas enfermedades se intentó recuperar la función de la citocromo c oxidasa en esta línea celular, utilizando para ello distintas concentraciones del aminoglicósido geneticina (G418). También se utilizó como control positivo una línea celular que no portaba la mutación en el gen *MT-CO1* pero idéntica a la línea celular mutante en el resto del mtDNA, y que se denominó *wild type*. Se utilizó una línea celular sin mtDNA, denominada *Rho⁰*, que sirvió como control negativo.

11.2. Estudio del efecto de los aminoglicósidos sobre la viabilidad en medio de cultivo sin glucosa.

La mutación m.6390G>A provoca un codón de terminación prematura que trunca la proteína mitocondrial p.MT-CO1. Se ha visto que, al crecer la línea celular que porta esta mutación en medio de galactosa, estas células mueren (Bruno, Martinuzzi et al. 1999). Esto se debe a que, al tener un defecto en el complejo respiratorio IV y ver limitada la glicólisis al crecer en este medio de cultivo, las células no pueden afrontar sus requerimientos de energía.

En primer lugar, decidimos probar la eficacia de los aminoglicósidos como terapia para enfermedades mitocondriales causadas por codones de terminación prematura, a nivel celular. Por ello y para estudiar si la incubación con el antibiótico G418 era capaz de recuperar la función de la proteína p.MT-CO1, crecimos la línea celular mutante con distintas concentraciones de este antibiótico en medio de galactosa y observamos si las células conseguían

sobrevivir a las 48h. Imágenes representativas de estos ensayos se muestran en la siguiente figura (**Fig.3.70**).

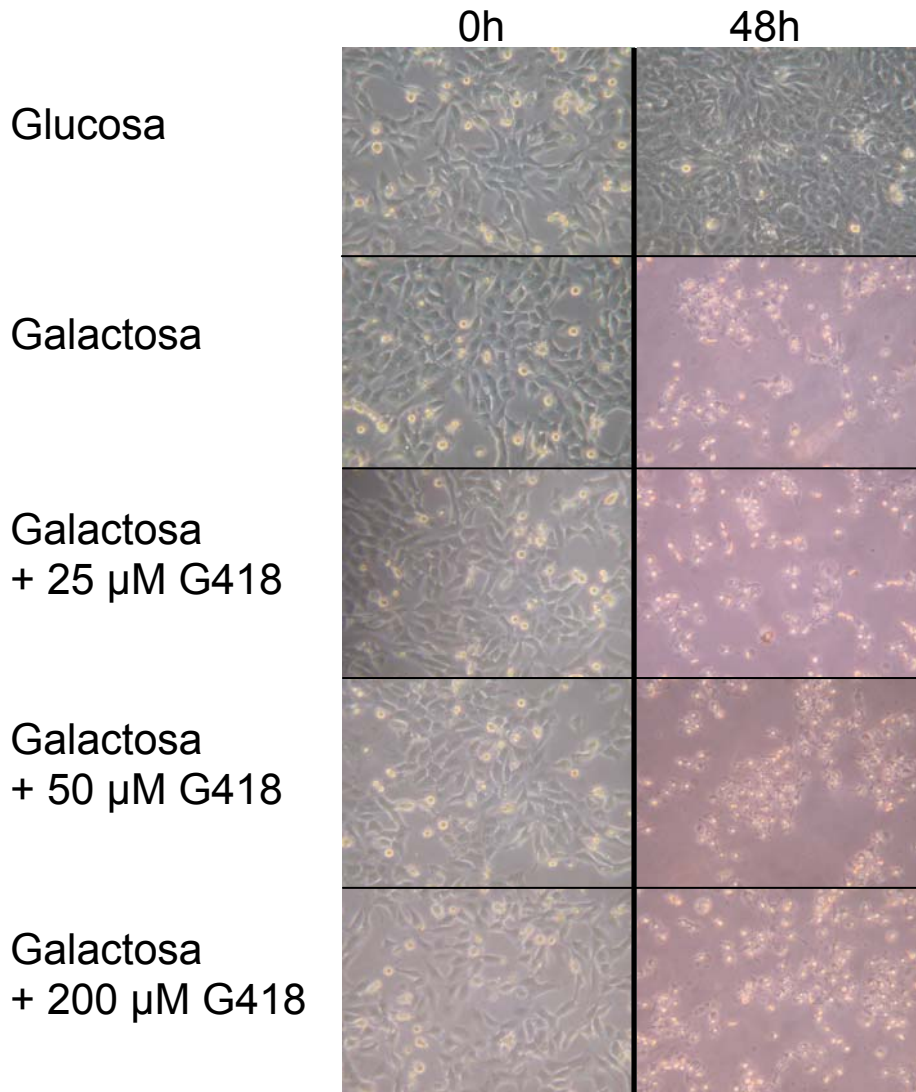


Fig. 3.70. Fotografías obtenidas a partir de microscopía óptica y representativas del crecimiento celular a las 0h y a las 48h de la línea celular con la mutación m.6390G>A, crecida en glucosa, galactosa y distintas concentraciones de geneticina.

La línea celular mutante presentó un crecimiento normal en medio de glucosa, pero sin embargo murió a las 48 h de crecimiento en medio de galactosa. Estas células no consiguieron sobrevivir a las 48h con ninguna de las concentraciones de geneticina añadidas al medio de galactosa. La incubación con la geneticina no produjo una recuperación de la proteína p.MT-CO1, que tuviera un efecto celular en las células mutantes.

11.3. Estudio de la actividad y cantidad de la citocromo c oxidasa en presencia de aminoglicósidos.

El objetivo de este estudio era recuperar la función de la proteína p.MT-CO1, en una línea celular que tenía esta proteína truncada por un codón de terminación prematura. Por ello, tras los ensayos a nivel celular, medimos espectrofotométricamente la actividad específica de complejo IV en cubeta, en la línea celular que porta la mutación m.6390G>A, habiéndola incubado previamente en ausencia y presencia del aminoglicósido G418 a una concentración 50 μ M. A su vez se midió dicha actividad en la línea celular *wild-type* y en la línea celular *rho0*. En la siguiente figura (**Fig.3.71**) podemos encontrar el resultado de estas medidas.

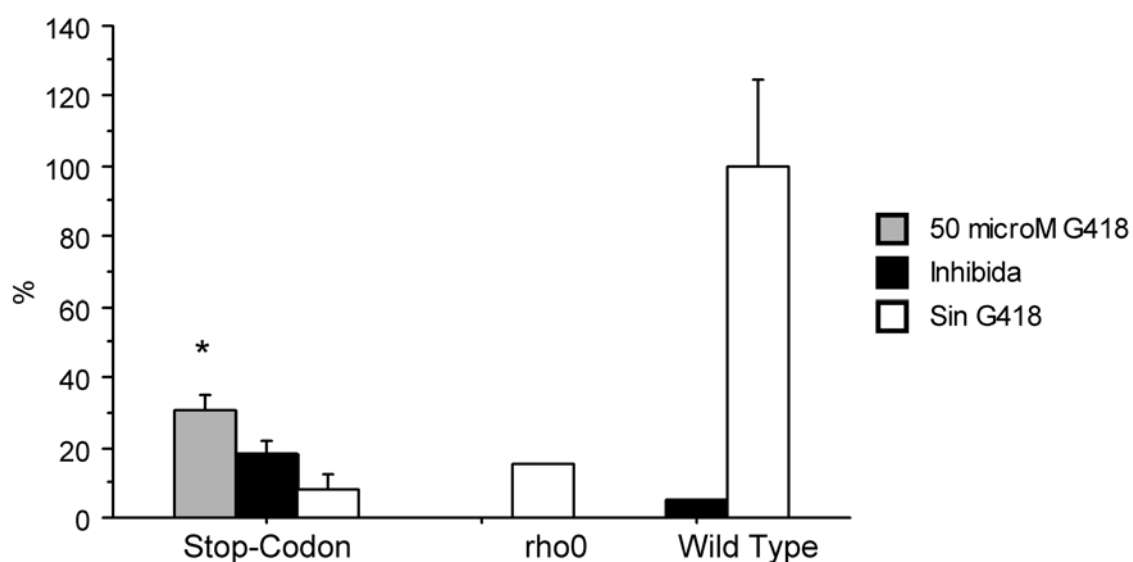


Fig.3.71. Actividad específica del complejo IV en cubeta en la línea que porta la mutación m.6390G>A, el control *wild type* y una línea sin mtDNA (línea Rho⁰). El valor de la actividad específica de la línea celular *wild type* se estableció como el 100%. * denota significancia estadística. %AE. Stop-Codon: 50 μ M G418, 30,76±4,5 (5). Inhibida, 8,03±3,5 (3). Sin G418, 8,22±3,9 (2).Rho⁰: 15,53±0,0 (3). *Wild type*: Inhibida, 5,26±0,0 (1). Sin G418, 100±24,5 (3).

Pudimos observar que, al añadir la geneticina a la línea celular con la mutación, se producía una recuperación significativa en la actividad específica del complejo IV, comparándola tanto con la condición sin antibiótico como con la línea celular *Rho⁰*. Sin embargo, cuando añadimos un inhibidor específico de este complejo (azida sódica) a la línea celular mutante y su control *wild-type*, pudimos observar que en la línea celular control la actividad del complejo IV se

redujo prácticamente a 0, mientras que en la línea celular mutante se observó todavía una actividad residual del complejo IV. Esto parecía indicar que el aumento en el flujo de electrones desde el citocromo c, cuando tratábamos la línea celular mutante con la geneticina, no era específico del complejo respiratorio IV y que podría deberse a otros efectos provocados por el tratamiento con la geneticina.

A continuación, para continuar estudiando el efecto de la geneticina sobre esta línea celular y confirmar si el aumento de la actividad enzimática era específico del complejo IV, medimos la actividad específica y cantidad de complejo IV en placa. Utilizamos la línea celular sin la mutación y la línea celular mutante, incubando esta última en distintas concentraciones de G418 (25, 50 y 100 μM). Esto queda reflejado en la siguiente figura (**Fig. 3.72**).

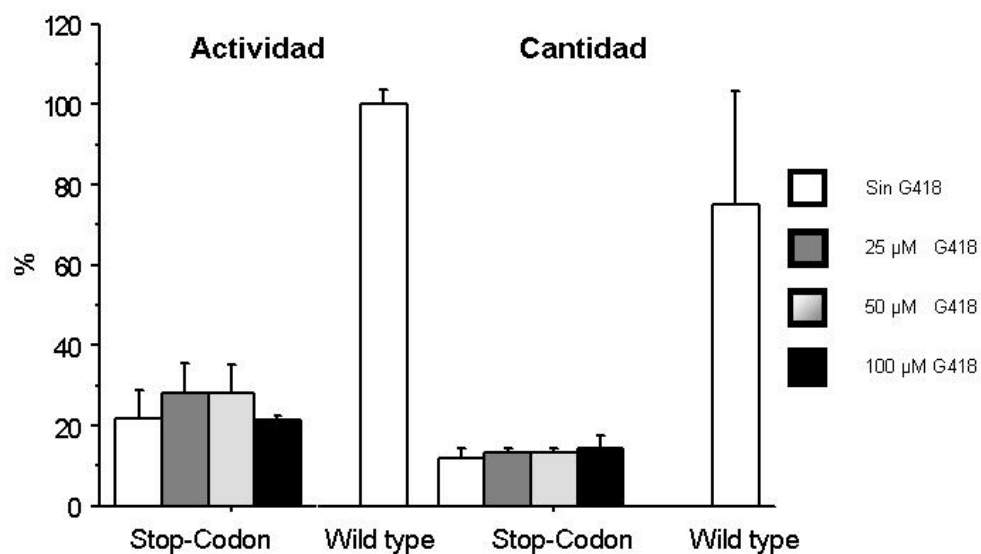


Fig.3.72. Actividad específica y cantidad de complejo IV en la línea celular que porta la mutación m.6390G>A, y su control *wild type*. El valor de la actividad específica y de la cantidad de complejo IV de la línea celular *wild type* se estableció en cada caso como el 100%. % AE. Stop-Codon: Sin G418, 22,16±6,7 (2). 25 μM G418, 27,93±7,4 (2). 50 μM G418, 28,43±6,8 (2). 100 μM G418, 20,93±1,6 (2). Wild type: 100±3,7. % Cantidad. Stop-Codon: Sin G418, 15,70±3,2 (2). 25 μM , G418 17,26±2,1 (2). 50 μM G418, 17,26±2,1 (2). 100 μM G418, 18,82±4,3 (2). Wild type: 100±37,5 (3).

En este caso no hubo diferencias en la actividad específica ni en la cantidad de complejo IV en la línea celular mutante, cuando fue incubada sin o con las distintas concentraciones de G418.

11.4. Estudio del efecto molecular de los aminoglicósidos sobre la subunidad p.MT-CO1.

Los experimentos anteriores mostraron que la incubación con distintas concentraciones de geneticina no era capaz de restablecer la actividad específica del complejo IV en la línea celular con la mutación m.6390G>A. A continuación, se estudió el efecto de este antibiótico en la subunidad p.MT-CO1 de la línea celular mutante a nivel molecular. Por ese motivo, realizamos ensayos de Western-blot para detectar dicha proteína mitocondrial, en distintas condiciones. Como control, detectamos a su vez una proteína del complejo II (codificada en el DNA nuclear). Incubamos la línea celular mutante y el control *wild type* en ausencia y presencia de G418 (50 μ M). Se utilizó la línea celular *Rho*⁰ como control negativo. Para intentar mejorar el límite de detección de la técnica y ser capaces de detectar pequeñas cantidades de p.MT-CO1, cargamos en la parte final del gel 3 veces más proteínas totales de la línea celular mutante sin y con G418. El gel resultante puede verse en la siguiente figura (**Fig. 3.73**).

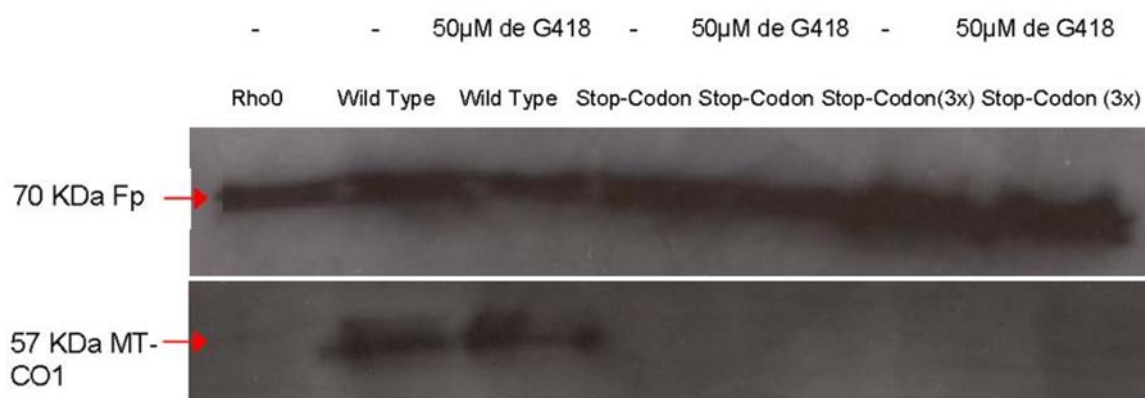


Fig. 3.73. Western blot para la proteína p.MT-CO1. 3x denota que se utilizaron 3 veces más proteínas totales que en el resto de las condiciones.

La proteína codificada en el mtDNA, p.MT-CO1 se detectó en la línea celular *wild type*, tanto en ausencia como en presencia de G418. Como se esperaba no se encontró dicha proteína en la línea celular control *Rho*⁰. Sin embargo, no se pudo detectar la presencia de p. MT-CO1 en la línea celular con la mutación m.6390G>A ni en ausencia ni en presencia de geneticina, ni

tampoco cuando se cargaron 3 veces más proteínas totales que en el resto de condiciones. La proteína del complejo II, SDHA, se detectó en todas líneas celulares y todas las condiciones.

A continuación, y siguiendo con la finalidad de observar una posible recuperación de la subunidad p.MT-CO1 a nivel molecular, gracias a los aminoglicósidos, se realizaron experimentos de síntesis mitocondrial de proteínas. Se utilizó la línea celular *wild type* como control positivo, y la línea celular mutante se incubó en ausencia y presencia de G418 (50 μ M). De nuevo, para intentar mejorar el límite de detección de la técnica, y ser capaces de detectar pequeñas cantidades de p.MT-CO1, cargamos en la parte final del gel 5 veces más proteínas totales de la línea celular mutante sin y con G418. El gel resultante puede verse en la siguiente figura (**Fig. 3.74**).

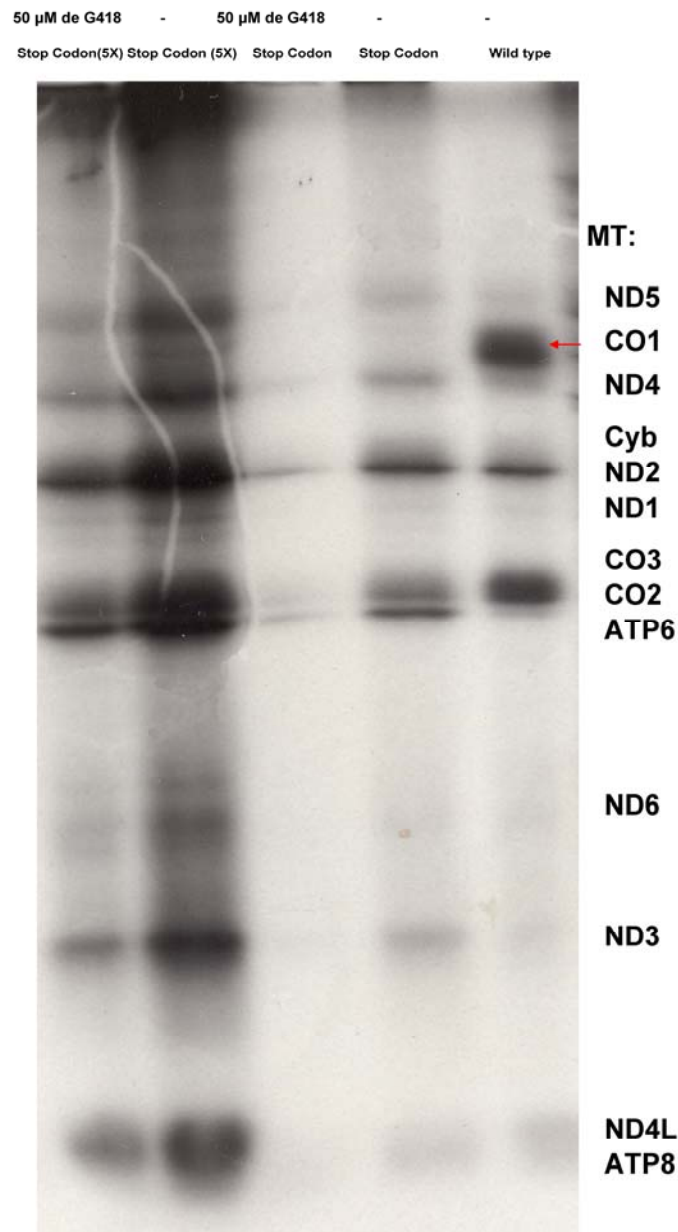


Fig.3.74. Síntesis mitocondrial de proteínas. A derecha de la figura se indica el nombre de la subunidad mitocondrial equivalente a cada banda resuelta del gel. 5x denota que se utilizaron 5 veces más proteínas totales que en el resto de las condiciones.

El control *wild-type* presentó un patrón normal de síntesis mitocondrial de proteínas, incluyendo las 13 proteínas mitocondriales. Sin embargo, la línea celular mutante presentó un patrón de traducción mitocondrial alterado, ya que el péptido p.MT-CO1 no estaba presente. Esto no varió en ninguna de las condiciones del ensayo, ni al añadir G418, ni cuando se cargaron 5 veces más proteínas totales.

DISCUSIÓN

1. Búsqueda de nuevas mutaciones patológicas en los mt-rRNAs.

El análisis de nuevas mutaciones en el mtDNA candidatas a ser causantes de una enfermedad se rige por unos criterios clásicos de patogenicidad. Según estos criterios, algunas de las condiciones que una nueva mutación debe cumplir para poder ser considerada patológica son que se encuentre en una posición evolutivamente conservada del mtDNA y que sea una mutación heteroplásmica (DiMauro and Schon 2001). Sin embargo, a pesar de que estos criterios son ampliamente aceptados, poseen ciertas limitaciones. Por eso, se han descrito nuevos criterios basados en los anteriores para intentar delimitar mejor las posibles mutaciones causantes de enfermedad (Montoya, Lopez-Gallardo et al. 2009; Yarham, Elson et al. 2010).

En la búsqueda de nuevas mutaciones en los mt-rRNAs en pacientes que presentaron un déficit enzimático en complejos OXPHOS con subunidades codificadas en el mtDNA, se encontraron 3 mutaciones no descritas previamente en un conjunto de más de 3000 secuencias de mtDNA humano (Ruiz-Pesini, Lott et al. 2007). Sin embargo, según los criterios clásicos de patogenicidad, no parecen ser las más idóneas para explicar el fenotipo de los pacientes. En primer lugar, las 3 mutaciones son homoplásmicas. Además, su índice de conservación en más de 300 especies de mamíferos es bajo (en todos los casos menor al 50%). Por último, estas 3 posiciones (m.1021T, m.1688A, m.2393C) no se encuentran en ninguno de los grandes centros catalíticos de los mt-rRNAs (sitio decodificante, centro peptidil transferasa o túnel de péptidos nacientes).

Dada la importancia del proceso de la traducción mitocondrial y por lo tanto de los mt-rRNAs, es posible que mutaciones en estos genes fueran incompatibles con la vida. Como un ejemplo, la transmisión a la línea germinal de una mutación localizada en el rRNA 16S de ratón y que confería resistencia al cloranfenicol, producía la muerte de los animales en el útero (*Sligh, Levy et al. 2000*). Por otro lado, ratones *knockout* homocigotos para el gen de la rRNA

metiltransferasa mitocondrial (*TFB1M*), cuya función es crítica para la estabilidad del mt-rRNA 12S, son letales a nivel embrionario (Metodiev, Lesko et al. 2009).

2. Búsqueda de las mutaciones patológicas clásicas en los mt-rRNAs asociadas con sordera no sindrómica.

El 50% de los defectos congénitos de audición son debidos a causas genéticas (Bindu and Reddy 2008), de los cuales solo el 1% está asociado con fallos en el mtDNA (Morton 2002). Las mutaciones m.1494C>T y m.1555A>G se han asociado en numerosas ocasiones con sordera neurosensorial no sindrómica y asociada con aminoglicósidos.

La mutación m.1494C>T no se ha encontrado en ninguno de los pacientes estudiados. A pesar de que esta mutación ha sido encontrada en numerosos pedigríes chinos con sordera (Zhao, Li et al. 2004; Wang, Li et al. 2006; Wang, Yuan et al. 2011) y en 3 familias de la población española (Rodríguez-Ballesteros, Olarte et al. 2006), estudios similares en la población brasileña y en la población surafricana tampoco encontraron esta mutación entre los sujetos de estudio (Bardien, Human et al. 2009; Postal, Palodeto et al. 2009). Dada la baja frecuencia de la mutación entre la población, quizás fuera necesario aumentar el tamaño de muestra de nuestro estudio para poder encontrarla. De hecho, los estudios que consiguieron encontrar esta mutación tenían un tamaño muestral notablemente mayor que aquellos en los que no se pudo encontrar.

En nuestro estudio hemos encontrado la mutación m.1555A>G tanto en individuos sordos como en familiares sanos relacionados por vía materna. Esto confirma la idea de que esta mutación tiene penetrancia incompleta y requiere de otros factores para causar un fenotipo patológico (Guan 2011). Las frecuencias de esta mutación entre individuos con sordera neurosensorial no sindrómica no son muy elevadas, especialmente en poblaciones como por ejemplo la australiana (Vandebona, Mitchell et al. 2009), la griega (Kokotas,

Grigoriadou et al. 2011), la española (Morales Angulo, Gallo-Teran et al. 2011), la marroquí (Nahili, Charif et al. 2010), la húngara, la polaca o la alemana (Kupka, Toth et al. 2002). Sin embargo, esta mutación se ha encontrado en 1 de cada 476 adultos de la población australiana (Vandebona, Mitchell et al. 2009), en 1 de cada 520 recién nacidos sanos del Reino Unido (Bitner-Glindzicz, Pembrey et al. 2009) y en 1 de cada 144 neonatos sanos chinos (Chen, Wang et al. 2011). Dada su penetrancia incompleta, quizás esta mutación permanezca en muchos casos en las poblaciones sin producir ningún efecto si no interactúa con otros factores, como por ejemplo los aminoglicósidos. Esto refuerza la importancia de seguir analizando esta mutación en la población, para poder evitar efectos secundarios producidos por el tratamiento con estos antibióticos (Boles and Friedlich 2010).

3. Estudio de cíbridos transmitocondriales con la mutación m.1555A>G.

Los estudios previos con líneas celulares híbridas que portaban la mutación del mtDNA m.1555A>G han mostrado resultados contradictorios. Un primer estudio llevado a cabo en híbridos transmitocondriales HeLa, encontró una disminución en la síntesis mitocondrial de proteínas en las líneas celulares mutantes pero solo cuando estas se trataron con el aminoglicósido estreptomicina (Inoue, Takai et al. 1996). Otro estudio posterior, que utilizó híbridos transmitocondriales construidos a partir de la línea celular ρ^0 206, encontró diferencias significativas entre híbridos mutantes y controles en la tasa de crecimiento celular, en la síntesis mitocondrial de proteínas y en el consumo de oxígeno (Guan, Fischel-Ghodsian et al. 2001). Finalmente, otro estudio que utilizó híbridos transmitocondriales construidos a partir de la línea celular de osteosarcoma, solo encontró diferencias en la tasa de crecimiento celular entre las líneas celulares mutantes y controles cuando estas fueron tratadas con aminoglicósidos. Sin embargo, en este estudio no se encontraron diferencias en la tasa de traducción mitocondrial o en las actividades enzimáticas de la cadena de transporte electrónico entre estas líneas celulares (Giordano, Pallotti

et al. 2002). Utilizando este mismo fondo genético nuclear, la línea celular de osteosarcoma 143B, para construir nuestros cíbridos transmitocondriales, nosotros tampoco encontramos diferencias en la síntesis mitocondrial de proteínas entre las líneas celulares mutantes y controles en ausencia o presencia de aminoglicósidos. Para ser más rigurosos, en nuestros ensayos de síntesis proteica mitocondrial descartamos que los resultados que se pudieran observar fueran debidos a errores en la carga de proteínas totales en el gel. Para ello utilizamos una tinción con azul de Coomassie. Sin embargo, en ninguno de los estudios antes mencionados se descartó esta posibilidad.

Por otro lado, se observó una mayor actividad y cantidad de complejo respiratorio IV en los cíbridos que portaban la mutación m.1555A>G comparados con las líneas celulares *wild type*. En definitiva, los estudios con cíbridos transmitocondriales siguen sin confirmar de forma contundente la patogenicidad de esta mutación del mtDNA y otras aproximaciones quizás sean necesarias para poder encontrar que factores pueden intervenir en la manifestación de su efecto.

4. Estudio evolutivo de la mutación patológica m.1494C>T en el mt-rRNA 12S.

La mutación humana m.1494C>T es el alelo *wild type* de 24 de las 316 especies de mamíferos analizadas. Además de 17 primates de la superfamilia *Cercopithecidae* esta mutación se encuentra en un marsupial (*Notoryctes typhlops*), en el koala (*Phascolarctos cinereus*), en un roedor (*Nannospalax ehrenbergi*), en dos especies de elefantes (*Elephas maximus* y *Lodoxonta africana*) y en dos especies extintas de mamuts (*Mamut americanum* y *Mamuthus primigenius*). Estudios previos mostraron que los aminoglicósidos aumentaban el tiempo de doblaje de líneas celulares cíbridas humanas que portaban la mutación m.1494C>T (Zhao, Li et al. 2004). De la misma manera, nosotros encontramos una clara disminución en la síntesis mitocondrial de proteínas en las líneas celulares de *Cercopithecidae* cuando las tratamos con el aminoglicósido paromomicina. Dado que los aminoglicósidos son

comúnmente utilizados en la práctica veterinaria (Regula, Torriani et al. 2009), es posible que estas especies puedan ver afectada su maquinaria de traducción mitocondrial si son tratadas con estos antibióticos. Esto plantea la posibilidad de que sean necesarias aproximaciones farmacogenómicas en medicina veterinaria.

Sin embargo, los aminoglicósidos no produjeron ningún efecto en las líneas celulares de *Cercopithecidae* en la cantidad de la subunidad mitocondrial p.MT-CO1, en la actividad y cantidad de complejo IV respiratorio o en el crecimiento celular. Por lo tanto, a pesar del efecto observado sobre la síntesis de proteínas, es posible que existan mecanismos que compensen la presencia de esta mutación. De hecho, se encontró una mutación en la proteína ribosomal MRPS12 que parece interactuar con la posición m.1494 y que podría ser la responsable de esta compensación. Para este estudio, se utilizaron fibroblastos primarios de *Macaca nemestrina* y una línea celular de *Cercopithecus aethiops* inmortalizada con SV40. Al secuenciar la proteína ribosomal S12 en estas dos especies solo encontramos nuestra mutación compensatoria candidata en la línea celular de *Macaca*. Sin embargo, las dos líneas mostraban efectos fenotípicos similares al ser tratadas con aminoglicósidos. Es posible que *Macaca nemestrina*, que pertenece a la tribu de los *Papioni* y *Cercopithecus aethiops*, que pertenece a la tribu de los *Cercopithecini*, hayan desarrollado mecanismos distintos de compensación para la mutación m.1494C>T, ya que ambas especies de primates divergieron entre hace 12 y 8 millones de años (Perelman, Johnson et al. 2011). Otra posibilidad es que solo los primates de la tribu *Papioni* hayan incorporado durante su evolución una compensación genética para la mutación m.1494C>T. De esta manera la similitud fenotípica observada puede deberse a características particulares de las líneas celulares estudiadas. La línea celular de *Cercopithecus aethiops* se ha inmortalizado utilizando SV40. La mayoría de las técnicas de ingeniería genética utilizadas para este proceso incorporan genes de resistencia a aminoglicósidos como mecanismo de selección (Gluzman 1981). La permanencia de estos elementos de resistencia en la línea

celular inmortalizada podría explicar el fenotipo de resistencia a los aminoglicósidos.

La función de las proteínas y de las moléculas de RNA depende de interacciones complejas entre las distintas posiciones. De esta manera, el efecto deletéreo de una mutación puede ser compensado por una segunda sustitución que interaccione con la primera (Kondrashov, Sunyaev et al. 2002). De forma frecuente una posición de una proteína o una molécula de RNA de una especie animal está ocupada por un nucleótido que representa una mutación patológica en humanos, un patrón denominado desviación patológica compensada (CPD). Un organismo que porta una CPD debe tener algún otro tipo de desviación compensatoria respecto a los humanos que suprima el efecto deletéreo de las CPDs (Kern and Kondrashov 2004). Este parece ser el caso de los *Cercopithecidae* y la mutación m.1494C>T. El análisis de los mecanismos compensatorios de mutaciones patológicas humanas que se encuentran fijadas en especies animales podría desvelar factores genéticos de susceptibilidad o de resistencia a estas mutaciones. Esto podría tener especial interés para las mutaciones con penetrancia incompleta como por ejemplo las mutaciones en los rRNAs mitocondriales asociadas a sordera neurosensorial no sindrómica.

5. Estudio evolutivo de la mutación patológica m.1555A>G en el mt-rRNA 12S.

Un efecto fundador reciente, la ineficacia de la selección natural o la presencia de mutaciones compensatorias no parecen ser la causa de la fijación de la mutación patológica humana m.1555A>G en el mtDNA del orangután. Además, los resultados obtenidos con cíbridos transmitocondriales humanos, con el mismo fondo genético nuclear que los que se han usado en esta tesis doctoral, mostraron que la mutación *per se* no era suficiente para causar una disfunción OXPHOS en cíbridos humanos (Giordano, Pallotti et al. 2002). Sin embargo, la exposición a los aminoglicósidos produce una disminución en la función OXPHOS de las células de orangután. Debido a que otros primates

más alejados filogenéticamente de los humanos, como *Erythorcebubus patas*, son susceptibles a los aminoglicósidos, probablemente se puede descartar que factores farmacocinéticos sean responsables de la fijación de la mutación m.1555A>G en el orangután (Hawkins, Stebbins et al. 1977). Por lo tanto, es posible que la penetrancia incompleta de esta mutación junto con la ausencia en el hábitat del orangután de xenobióticos que interactúen con esta posición del mt-rRNA sean la causa de la fijación de esta mutación patológica humana en el orangután. Curiosamente, gorilas, chimpancés y humanos han compartido el mismo ambiente ya que son homínidos africanos. Sin embargo el hábitat del orangután es diferente, ya que viven en el sureste asiático.

De manera más destacada, el nucleótido m.1555G es también el alelo *wild type* en otras 6 de las 316 especies de mamíferos analizadas: un roedor (*Thryonomys swinderianus*), un rumiante (*Budorcas taxicolor*) y 6 osos (*Arctodus simas*, *Melursus ursinus*, *Ursus arctos*, *Ursus maritimus*, *Ursus thibetanus* y *Ursus thibetanus ussuricus*). Dado que los aminoglicósidos son utilizados comúnmente en la medicina veterinaria (Regula, Torriani et al. 2009), estos mamíferos podrían estar en riesgo de sufrir un desorden mitocondrial si se les trata con aminoglicósidos. Sin embargo, se debería confirmar esta posibilidad.

Por otro lado, estos resultados pueden ser importantes para la medicina humana. Las mutaciones del mtDNA antiguas y altamente frecuentes son normalmente descartadas como causantes de enfermedad. Sin embargo, como se ha visto en el caso del orangután, este tipo de mutaciones podrían tener efectos fenotípicos dependiendo de las condiciones ambientales. Por ello, es posible que mutaciones similares, es decir antiguas y muy frecuentes, como por ejemplo los polimorfismos en los mt-rRNAs que definen los haplogrupos del mtDNA humano, sean deletéreas en asociación con determinados xenobióticos. En este sentido, los antibióticos ribosomales se empezaron a utilizar en los años 40 para combatir a las bacterias. Debido a que los aparatos de síntesis proteica bacteriana y mitocondrial son muy similares, estos compuestos podrían provocar efectos secundarios en individuos con

determinados genotipos de mtDNA (Pacheu-Grau, Gomez-Duran et al. 2010; Pacheu-Grau, Gomez-Duran et al. 2010). Por ejemplo, la actividad y cantidad del complejo respiratorio IV en plaquetas de pacientes que sobrevivieron 6 meses a procesos de sepsis eran significativamente mayores que las de los pacientes que no sobrevivieron (Lorente, Martin et al. 2011). Además, los haplogrupos del mtDNA parecen modificar la probabilidad de supervivencia a la sepsis a los 180 días (Baudouin, Saunders et al. 2005). Como los antibióticos se utilizan frecuentemente en pacientes con sepsis, sería posible que la interacción entre variantes genéticas de los mt-rRNAs y determinados antibióticos ribosomales se comportara como un factor de riesgo a la supervivencia a procesos de infección generalizada.

6. Estudio de los mt-rRNAs en pacientes con la enfermedad de Ménière.

La audición es muy dependiente de la función OXPHOS y debido a que el mtDNA humano solo codifica subunidades de este sistema de fosforilación oxidativa, la pérdida de audición es un signo muy frecuente de mutaciones en el mtDNA (Manwaring, Jones et al. 2007). La síntesis mitocondrial de proteínas puede verse afectada por los antibióticos de acción ribosomal usados para combatir las bacterias patógenas (Pacheu-Grau, Gomez-Duran et al. 2010; Pacheu-Grau, Gomez-Duran et al. 2010). Una asociación entre la variación de los mt-rRNAs y la pérdida de audición en pacientes de la enfermedad de Ménière (MD) solo ha sido considerada una vez. En ese trabajo, se estudió la presencia de la mutación m.1555A>G en 8 pacientes con sordera inducida por el tratamiento con gentamicina y no se encontró esta mutación en ninguno de los pacientes estudiados (Chen, Williamson et al. 1996). Nosotros tampoco hemos encontrado ninguna de las mutaciones patológicas en los mt-rRNAs que han sido asociadas con una mayor susceptibilidad a los aminoglicósidos. Además, todos los polimorfismos hallados en los mt-rRNAs ya habían sido previamente descritos, la mayoría no afectan a posiciones altamente conservadas y por último no hay grandes diferencias en sus frecuencias entre los grupos NPA y PA. Tampoco encontramos grandes diferencias entre

pacientes NPA y PA en la variación alélica de los genes *MRPS12* y *TFB1M*. Por lo tanto, aunque no hemos analizado los niveles de expresión de estas proteínas, parece que ni elementos estructurales muy relacionados con los mt-rRNAs ni el estado de metilación del rRNA 12S mitocondrial serían diferentes entre ambos grupos. Por lo tanto, tampoco estos factores explicarían la diferente susceptibilidad al tratamiento con aminoglicósidos.

Hemos intentado emparejar al máximo las variables clínicas y terapéuticas, pero esto no se pudo realizar con todos los parámetros (Perez Delgado, Fraile-Rodrigo et al. 2011). De esta manera, a pesar de que no pudimos determinar la permeabilidad de la ventana redonda a la gentamicina, podemos considerar que fue similar en los dos grupos porque el tratamiento fue igual de exitoso. Otros factores potenciales, como la obliteración del acueducto cóclea (Walsted 2001) no se pudieron determinar. Nuestros resultados parecen descartar un efecto de la variación genética y epigenética en los mt-rRNAs como un factor de riesgo en pacientes de MD que sufrieron una laberintectomía química. Sin embargo, dado que el tamaño de muestra de estudio es limitado, se deberían ampliar estos estudios a un mayor número de muestras para poder descartar completamente esta posibilidad. Además, otros factores genéticos relacionados con los mt-rRNAs y con la síntesis mitocondrial de proteínas podrían estar implicados. De hecho, la variante genética A10S en el gen mitocondrial de la 5-metilaminoetil-2-tiouridilato-metiltransferasa (*TRMU*) produce un fallo grave en el metabolismo de los tRNAs mitocondriales. Esto provoca una disminución de la síntesis mitocondrial de proteínas, agravando de esta manera posibles disfunciones mitocondriales asociadas a mutaciones en los mt-rRNAs (Guan, Yan et al. 2006). De la misma forma, la variación genética en los mt-tRNAs podría también afectar la traducción mitocondrial y secundariamente la susceptibilidad a los aminoglicósidos (Campos, Garcia et al. 2002; Wang, Lu et al. 2008)

7. Estudio de la variabilidad genética mitocondrial en sordera asociada a la edad: Presbiacusia.

Muchos de los estudios previos que han analizado la variación del mtDNA en la sordera asociada a la edad han encontrado asociaciones con mutaciones somáticas y grandes reordenamientos del mtDNA como la delección común, en células de la cóclea obtenidas a partir de hueso temporal (Bai, Seidman et al. 1997; Fischel-Ghodsian, Bykhovskaya et al. 1997; Dai, Yang et al. 2004; Markaryan, Nelson et al. 2009). Un estudio de la presbiacusia entre la población australiana encontró una asociación entre los haplogrupos mitocondriales U y K y el riesgo de padecer esta patología asociada a la edad (Manwaring, Jones et al. 2007). Sin embargo, nosotros encontramos una distribución similar de estos fondos genéticos mitocondriales entre nuestros grupos de estudio. Una de las diferencias entre los dos estudios es el tamaño muestral, que en su caso es unas 10 veces mayor que en nuestro estudio. Por lo tanto, quizás fuera necesario ampliar el número de individuos a analizar. Sin embargo, la distribución de haplogrupos de nuestro grupo de individuos control era estadísticamente similar al de la población española general, por lo que el tamaño de muestra parece suficiente para representar a la población general española.

Por otro lado, otro estudio de esta patología del envejecimiento entre la población belga tampoco fue capaz de encontrar ninguna asociación entre las distintas filogenias mitocondriales y el riesgo a padecer sordera asociada a la edad. Tampoco encontraron ninguna asociación entre esta patología y variantes raras del mtDNA (Bonneux, Fransen et al. 2011). Dado que la presbiacusia es una enfermedad compleja quizás sea difícil encontrar una asociación sencilla entre un único factor y esta patología. Por ejemplo, los mitorribosomas están formados por genes mitocondriales y nucleares que interactúan entre ellos (O'Brien 2003). Es posible que la variación de los mt-rRNAs combinada con variantes en las proteínas ribosomales mitocondriales interactúen para producir una disminución en la traducción mitocondrial, que conlleve un descenso en la cantidad de subunidades OXPHOS y por lo tanto

una disminución en la producción que ATP. Sin embargo, podría ser que la variación en uno solo de estos elementos genéticos no produjera ningún efecto.

8. Estudio de la variabilidad genética mitocondrial en sordera asociada al tratamiento con cisplatino.

El cisplatino es un agente de quimioterapia eficaz pero cuyo uso se ve limitado por su nefro, neuro y ototoxicidad. El efecto ototóxico del cisplatino parece implicar a las células pilosas del interior de la cóclea de una forma parecida al mecanismo tóxico de los aminoglicósidos (Patuzzi, Yates et al. 1989; McAlpine and Johnstone 1990). La susceptibilidad a los aminoglicósidos parece estar modulada por variaciones del mtDNA, tanto mutaciones patológicas (Prezant, Agapian et al. 1993) como polimorfismos poblacionales (Lu, Qian et al. 2010). Se ha observado que, el cisplatino se une al mtDNA con la misma afinidad que al nDNA y que por lo tanto interfiere en su replicación y en su transcripción (Podratz, Knight et al. 2011). De esta forma, siguiendo la ruta de la información genética mitocondrial, quizás variantes genéticas del mtDNA que afectaran a la traducción mitocondrial podrían modular el efecto tóxico del cisplatino. En este sentido, se ha encontrado una asociación entre la filogenia mitocondrial J y la predisposición a sufrir una pérdida de audición asociada al tratamiento con el cisplatino (Peters, Preisler-Adams et al. 2003). Este fondo genético mitocondrial está definido entre otras variantes por el cambio m.2706A>G, localizado en el gen *MT-RNR2*. Además, estudios celulares han mostrado que líneas celulares transmitocondriales que portaban distintas mutaciones en el mtDNA eran resistentes al tratamiento con cisplatino. Una de estas mutaciones era el cambio m.2905A>G, también localizado en el gen *MT-RNR2* (Mizutani, Miyato et al. 2009).

En nuestro estudio no hemos encontrado ninguna asociación entre variantes poblacionales del mtDNA y la ototoxicidad causada por el tratamiento con el cisplatino. Sin embargo, este estudio cuenta con un número de pacientes muy limitado. Dadas las evidencias encontradas en la bibliografía parece muy interesante continuar buscando variantes genéticas poblacionales

en los mt-rRNAs que puedan afectar a la toxicidad asociada al tratamiento con cisplatino u otros agentes de quimioterapia.

9. Antibiograma mitocondrial: Código de barras para el tratamiento con antibióticos.

El linezolid es el único antibiótico de una familia de fármacos de nueva síntesis denominados oxazolidinonas que está aprobado para el uso en la práctica clínica. Ha sido aprobado en los Estados Unidos, Canadá, Japón, algunos países europeos y América central y del sur. En general, se utiliza para el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos Gram-positivos resistentes a otros antibióticos (Chiappini, Conti et al. 2010).

El linezolid tiene un ratio de unión a proteínas bajo, y su adecuada penetración (que le permite alcanzar concentraciones superiores a la concentración inhibitoria mínima de los patógenos) en hueso, pulmón, piel y fluido cerebroespinal hacen a este antibiótico un buen candidato para el tratamiento de infecciones muy graves que requieren terapias muy largas (Wilcox 2005). Sin embargo, existe un riesgo de que este antibiótico provoque efectos tóxicos, especialmente cuando el tratamiento excede el periodo de 28 días aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration Agency*). Se han descrito daños hematológicos causados por el linezolid, sobre todo anemia y trombocitopenia (Attassi, Hershberger et al. 2002; Bernstein, Trotta et al. 2003). También se han descrito casos de neuropatía periférica, hiperlactatemia y acidosis metabólica (Apodaca and Rakita 2003; Bressler, Zimmer et al. 2004). Parece que estos eventos están relacionados con la capacidad del linezolid de inhibir la síntesis mitocondrial de proteínas (Nagiec, Wu et al. 2005; De Vriese, Coster et al. 2006).

En esta tesis doctoral se ha analizado el posible efecto de variantes genéticas poblacionales en los mt-rRNAs y su posible interacción con antibióticos de acción ribosomal como el linezolid. En primer lugar, se delimitó el rango de concentraciones de linezolid que íbamos a utilizar. Escogimos un

rango entre 0,1 μM y 10 μM . Este intervalo de concentraciones sería capaz de afectar de forma activa a los microorganismos patógenos. Por ejemplo, la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) de linezolid en la cepa de *Escherichia coli* UC6782 es aproximadamente 1 μM , mientras que la concentración inhibitoria mínima 90 (MIC_{90}) contra *Staphylococcus aureus*, a la que el 90% de los patógenos estarán inhibidos, es aproximadamente 12 μM (Shinabarger, Marotti et al. 1997). Además, este rango de concentraciones también es similar al utilizado en la práctica clínica. Se han desarrollado numerosos estudios para analizar las propiedades farmacocinéticas del linezolid en distintos grupos de pacientes, pero en general la concentración de linezolid en el plasma permaneció siempre por encima de los 4 mg/L (aproximadamente 12 μM) (Dryden 2011). Por otro lado, el linezolid también se utiliza en el tratamiento pediátrico, y en este caso las propiedades farmacocinéticas de la droga son dependientes de la edad. Para el uso del linezolid con niños se ha recomendado mantener los niveles de droga en un equilibrio en torno a los 2 mg/L (aproximadamente 6 μM) (Chiappini, Conti et al. 2010).

En nuestro estudio hemos encontrado evidencias que parecen indicar que las variantes genéticas poblacionales de los mt-rRNAs pueden influir en el efecto de antibióticos de acción ribosomal como el linezolid o el cloranfenicol. Para ello hemos utilizado el modelo de híbridos transmitocondriales. Este modelo ya ha sido utilizado con anterioridad para demostrar el efecto de mutaciones en el gen *MT-RNR2* en fenómenos de resistencia al cloranfenicol (Blanc, Adams et al. 1981). También ha servido para demostrar las diferencias en parámetros OXPHOS entre distintos genotipos del mtDNA (Gomez-Duran, Pacheu-Grau et al. 2010). Sin embargo, esta es la primera vez que se asocia un posible efecto diferencial de la terapia con antibióticos y los distintos fondos genéticos mitocondriales. En concreto, los haplogrupos mitocondriales T y Uk parecen ser los menos afectados por los efectos tóxicos del linezolid o el cloranfenicol. Por otro lado, las filogenias H1 y J1 son las que muestran una mayor sensibilidad a estos antibióticos de acción ribosomal. El sitio de unión del linezolid se encuentra localizado en la subunidad ribosomal mayor, cerca del centro peptidil transferasa (PTC) (Wilson, Schluenzen et al. 2008). Se han

descrito mutaciones de resistencia a este antibiótico localizadas dentro de este centro catalítico altamente conservado del ribosoma (Auckland, Teare et al. 2002; Wilson, Schluenzen et al. 2008). Las dos posiciones localizadas en los mt-rRNAs que entre otras definen a los grupos genéticos mitocondriales utilizados en este estudio son la m.2706 y m.3010. Ambas se encuentran localizadas cerca del PTC (Pacheu-Grau, Gomez-Duran et al. 2010), y se han encontrado en pacientes que sufrieron efectos tóxicos tras el tratamiento con linezolid (Palenzuela, Hahn et al. 2005; Carson, Cerda et al. 2007). Por lo tanto, podrían ser responsables de la distinta susceptibilidad observada para el linezolid. De hecho, cuando analizamos si alguna de estas posiciones de manera individual podría tener un mayor papel en el efecto, pudimos observar que la posición m.3010 parecía ser la responsable mayoritaria de los efectos observados. La posición m.3010 se encuentra en un tallo altamente conservado de la hélice 48 del mt-rRNA 16S en la que se han descrito mutaciones de resistencia a otros antibióticos de acción ribosomal, como la avilamicina y la evernimicina. Sería interesante poder comprobar el efecto de estos antibióticos en las líneas celulares con variantes en la posición m.3010, pero sin embargo no fue posible adquirirlos. La evernicimina fue retirada de los estudios clínicos en fase III cuando se observó que producía anomalías en los genitales de rata (Poulet, Venezia et al. 2005). La avilamicina se utiliza como un factor de crecimiento en alimentación animal pero tampoco es utilizada en la práctica clínica (Wilson 2009).

Estos resultados tienen una gran importancia en el campo de la medicina personalizada y parecen indicar la necesidad de regular el régimen de antibióticos entre la población para evitar posibles efectos adversos. Este conocimiento, no solo ayudará a evitar efectos secundarios del tratamiento con antibióticos sino que posiblemente aumentará el número de antibióticos disponibles. Individuos que porten estas variantes del mtDNA quizás sean menos susceptibles a determinados antibióticos retirados de la práctica clínica por su toxicidad. De esta manera un uso más racional de estas drogas podría además disminuir la aparición de fenómenos de resistencia bacteriana (Pacheu-Grau, Gomez-Duran et al. 2010). Por lo tanto, podríamos estar ante el

comienzo de la antibiogenómica mitocondrial (Pacheu-Grau, Gomez-Duran et al. 2010).

10. Uso de aminoglicósidos para el tratamiento de enfermedades mitocondriales causadas por codones de terminación prematura.

Durante la decodificación del mRNA en el ribosoma existe un mecanismo de lectura de fallos que comprueba que el aminoácido que está unido al t-RNA en el sitio A es el que corresponde con la secuencia que dictamina el mensajero. En este proceso intervienen dos adeninas altamente conservadas que voltean el RNA para que interactúe con la estructura del codón-anticodón, pasando de esta forma de un estado “off” a un estado “on”. Los antibióticos de la familia de los aminoglicósidos son capaces de estabilizar el estado “on” incluso en ausencia de las interacciones codón-anticodón, provocando que aminoácidos erróneos se puedan incorporar a la síntesis del péptido naciente (Ogle, Murphy et al. 2002; Ogle, Carter et al. 2003).

Esta característica de estos fármacos se ha utilizado para el tratamiento de numerosas enfermedades causadas por mutaciones que generan codones de terminación prematuros. De esta forma, la estabilización del estado “on” del ribosoma por parte de los aminoglicósidos permitiría que no se leyeran estas señales de parada sino que se incorporaran nuevos aminoácidos (Burke and Mogg 1985; Zingman, Park et al. 2007). Este tratamiento se ha ensayado con resultados satisfactorios en modelos celulares de numerosas enfermedades hereditarias, como por ejemplo la fibrosis cística (Byers 2002; Lukacs and Durie 2003; Kellermayer 2006), la distrofia muscular de Duchenne (Barton-Davis, Cordier et al. 1999; Holbrook, Neu-Yilik et al. 2004), o el síndrome de Hurler (Hein, Bawden et al. 2004). Por otro lado, también existen defectos genéticos similares pero que afectan al mtDNA (Bruno, Martinuzzi et al. 1999; D'Aurelio, Pallotti et al. 2001).

En la presente tesis doctoral se han propuesto los aminoglicósidos como posible terapia para enfermedades mitocondriales causadas por codones de

terminación prematura. En nuestro estudio no hemos sido capaces de recuperar la función de la subunidad p.MT-CO1 utilizando esta aproximación, en una línea celular que tiene una versión truncada de dicha proteína. Sin embargo, hay diversas características propias del sistema de traducción mitocondrial que deberían tenerse en cuenta para aplicar dicha aproximación. La mitocondria tiene un código genético propio diferente al universal. En este código genético los codones AGA y AGG codifican para señal de terminación de la traducción. Estudios recientes han postulado que estos tripletes no son verdaderas señales de parada sino que provocan un cambio -1 en el marco de lectura. Esto genera un codón de terminación clásico que provoca que los factores de terminación mitocondriales pongan fin al proceso de traducción (Richter, Pajak et al. 2010; Chrzanowska-Lightowlers, Pajak et al. 2011). Este fenómeno está descrito para explicar la terminación de genes mitocondriales que tienen codones de parada AGA o AGG en condiciones fisiológicas. Sin embargo, no está claro si también puede aplicarse a codones de terminación prematura de este tipo. En nuestro caso, la mutación m.6930G>A genera un codón de terminación AGA, pero la base anterior al codón es una A, por lo que el codón resultante al realizar un cambio -1 en el marco de lectura sería AAG, que no codifica para terminación.

El decaimiento del mRNA mensajero mediado por mutaciones *nonsense* es uno de los mecanismos de control de calidad desarrollados por las células para mantener el *status quo* metabólico. El objetivo de las células en este caso es destruir las especies de mRNA que contienen codones de terminación prematura, de manera que solo proteínas completas son producidas (Byers 2002). Sin embargo, se desconoce si este mecanismo también ocurre con los mRNAs mitocondriales.

Antes de poder continuar con nuestros experimentos quizás sea necesario un conocimiento más profundo del proceso de terminación de la traducción mitocondrial. Otra posibilidad sería, intentar utilizar aminoglicósidos para recuperar la función de proteínas mitocondriales en líneas celulares que tienen codones de terminación prematura UAA o UAG.

CONCLUSIONES

Las conclusiones que se han obtenido de la realización de la presente tesis doctoral son las siguientes:

1. Se han encontrado 3 mutaciones en los mt-rRNAs no descritas previamente en pacientes con fenotipo severo y déficit multienzimático. Otros filtros diferentes podrían contribuir a encontrar los factores responsables de estos fenotipos patológicos.
2. Se ha encontrado la mutación m.1555A>G, localizada en el gen *MT-RNR1*, en 9 pacientes que presentaron sordera neurosensorial no sindrómica y en 6 familiares relacionados por vía materna. La mutación m.1494C>T no se ha encontrado en ninguno de estos pacientes.

La mutación m.1555A>G no produce un efecto en la síntesis mitocondrial de proteínas en líneas celulares transmitocondriales en ausencia ni en presencia de aminoglicósidos.

3. La mutación m.1494C>T esta fijada en el mtDNA de 24 especies de mamíferos, 17 de la superfamilia *Cercopithecidae*. Esta mutación inhibe la síntesis mitocondrial de proteínas en líneas celulares de esta superfamilia de primates tratadas con aminoglicósidos, pero no afecta al resto de parámetros OXPHOS. Se ha encontrado una mutación en la proteína ribosomal S12 que podría interaccionar con la mutación m.1494C>T y explicar los efectos observados. Quizás se debería considerar la aplicación de aproximaciones farmacogenómicas en la medicina veterinaria.

La mutación m.1555A>G se encuentra fijada en el mtDNA de 10 especies de mamíferos, entre ellas el orangután. No hemos encontrado ninguna compensación genética que pudiera explicar la presencia de esta mutación en el genoma mitocondrial del orangután. Además, los aminoglicósidos afectan negativamente el crecimiento y la función OXPHOS de las células de orangután. Quizás, la penetrancia incompleta

CONCLUSIONES

de la mutación junto con la ausencia de los aminoglicósidos en el ambiente del orangután hayan permitido la fijación de esta mutación patológica en el mtDNA de estos primates. **Mutaciones antiguas y muy frecuentes no deben descartarse a priori como causantes de enfermedad, ya que pueden producir su efecto asociadas con determinados agentes ambientales.**

4. Hemos descartado la influencia de la variación genética mitocondrial en los pacientes de la enfermedad de Ménière que sufren una pérdida de audición tras una laberintectomía química.

No hemos encontrado ninguna asociación entre las variantes genéticas poblacionales del mtDNA y la pérdida de audición asociada a la edad o presbiacusia. Tampoco la hemos encontrado entre estas mismas variantes poblacionales y la pérdida de audición asociada al tratamiento con cisplatino.

5. **El antibiótico de acción ribosomal linezolid produce un efecto diferencial sobre la síntesis mitocondrial de proteínas de líneas celulares transmitocondriales que portan variantes genéticas mitocondriales en los mt-rRNAs.** De esta manera los haplogrupos T y Uk son los menos afectados por este antibiótico. Por otro lado, los fondos genéticos mitocondriales H1 y J1 son los más inhibidos por el linezolid. También se observó un efecto diferencial con el antibiótico de acción ribosomal cloranfenicol. Las variantes en la posición m.3010 del gen *MT-RNR2* parecen tener el mayor papel en este efecto diferencial. **Este hecho podría tener una gran importancia en el campo de la medicina personalizada y abrir el campo de la antibiogenómica mitocondrial.**
6. El tratamiento con aminoglicósidos no fue capaz de recuperar la función de la proteína p.MT-CO1 en una línea celular que portaba un codón de terminación prematuro en dicha subunidad. Sin embargo, se debería

tener un conocimiento más profundo del proceso de terminación de la traducción mitocondrial antes de continuar evaluando los aminoglicósidos como terapia a enfermedades mitocondriales causados por codones de terminación prematuros.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material y Reactivos.

1.1. Material biológico y líneas celulares.

El DNA humano se obtuvo a partir de sangre o de pelo. La sangre fue tratada durante las 24 horas siguientes a su extracción, o se congeló a -80°C y se almacenó durante más tiempo. Cuando fue necesario, se aislaron plaquetas a partir de muestras de sangre durante las 24 horas posteriores a su extracción, para la posterior construcción de líneas celulares transmitocondriales. Las muestras provinieron de los siguientes centros:

- Centro de Salud San José de Zaragoza.
- Hospital universitario Miguel Servet de Zaragoza.
- Fundación Jiménez Díaz de Madrid.
- Hospital Vall d'Hebron de Barcelona.

Las líneas híbridas transmitocondriales se construyeron a partir de la línea celular Rho0 (carente de DNA mitocondrial) 143B de osteosarcoma, cedidas por el laboratorio del Profesor Giuseppe Attardi, del *California Institute of Technology* en Pasadena (Estados Unidos). Los fibroblastos de primates fueron cedidos por el Profesor Werner Schempp del *Institute of Human Genetics* de la Universidad de Freiburg, en Freiburg (Alemania) y por el Profesor Javier Naval, de la Facultad de Ciencias en la Universidad de Zaragoza. A continuación se presenta una tabla (**tabla 6.1**) con las líneas celulares utilizadas en esta tesis doctoral y su origen.

CAPITULO 6

Línea Celular	Tipo Celular	Origen
ACH	Cíbrido transmitocondrial 143B	Cíbridoteca propia de nuestro grupo.
613H	Cíbrido transmitocondrial 143B	Cíbridoteca propia de nuestro grupo.
612H	Cíbrido transmitocondrial 143B	Cíbridoteca propia de nuestro grupo.
2128	Cíbrido transmitocondrial 143B	Cíbridoteca propia de nuestro grupo.
A39H	Cíbrido transmitocondrial 143B	Cíbridoteca propia de nuestro grupo.
25H	Cíbrido transmitocondrial 143B	Cíbridoteca propia de nuestro grupo.
RicH	Cíbrido transmitocondrial 143B	Cíbridoteca propia de nuestro grupo.
A1H3	Cíbrido transmitocondrial 143B	Cíbridoteca propia de nuestro grupo.
A58H	Cíbrido transmitocondrial 143B	Cíbridoteca propia de nuestro grupo.
A38H	Cíbrido transmitocondrial 143B	Cíbridoteca propia de nuestro grupo.
13T	Cíbrido transmitocondrial 143B	Cíbridoteca propia de nuestro grupo.
15T	Cíbrido transmitocondrial 143B	Cíbridoteca propia de nuestro grupo.
237T	Cíbrido transmitocondrial 143B	Cíbridoteca propia de nuestro grupo.
610T	Cíbrido transmitocondrial 143B	Cíbridoteca propia de nuestro grupo.
611T	Cíbrido transmitocondrial 143B	Cíbridoteca propia de nuestro grupo.
A5J	Cíbrido transmitocondrial 143B	Cíbridoteca propia de nuestro grupo.

A134J	Cíbrido transmitocondrial 143B	Cíbridoteca propia de nuestro grupo.
A78J	Cíbrido transmitocondrial 143B	Cíbridoteca propia de nuestro grupo.
A128J	Cíbrido transmitocondrial 143B	Cíbridoteca propia de nuestro grupo.
A139J	Cíbrido transmitocondrial 143B	Cíbridoteca propia de nuestro grupo.
IPG	Cíbrido transmitocondrial 143B	Hospital Vall d'Hebron Barcelona
MBM2	Cíbrido transmitocondrial 143B	Hospital Vall d'Hebron Barcelona
MBM14	Cíbrido transmitocondrial 143B	Hospital Vall d'Hebron Barcelona
<i>Pan paniscus</i>	Fibroblastos primarios de explante de piel	Universidad de Freiburg, Alemania
<i>Pongo pygmaeus</i>	Fibroblastos primarios de explante de piel	Universidad de Freiburg, Alemania
<i>Macaca nemestrina</i>	Fibroblastos primarios de explante de piel	Universidad de Freiburg, Alemania
<i>Cercopithecus aethiops</i>	Fibroblastos inmortalizados	Grupo de apoptosis, inmunidad y cáncer. Universidad de Zaragoza
CO1-Stop codon	Cíbrido transmitocondrial 143B	Hospital Vall d'Hebron Barcelona
CO1- isogénico	Cíbrido transmitocondrial 143B	Hospital Vall d'Hebron Barcelona

Tabla 6.1. Resumen de las líneas celulares utilizadas en esta tesis doctoral, junto con su origen y tipo celular.

1.2. Aparataje.

El agua empleada fue purificada por ósmosis inversa en el sistema de purificación de agua **Milli-Ro 4** de **Millipore** y posteriormente desionizada.

CAPITULO 6

La esterilización de las soluciones y material de plástico se llevó a cabo en un autoclave marca **Selecta** modelo **437- G** a 1 atmósfera de presión, durante 20 minutos. El material de vidrio se esterilizó en una estufa **Selecta**, a 140°C durante 6 horas.

Las pesadas de reactivos se realizaron en balanzas electrónicas **AND** modelos **ER 120A** y **FA2000**.

Las medidas de pH se llevaron a cabo en un pHmetro digital **Crison micropH 2000**, con electrodo combinado de pH **Crison**.

El hielo se obtuvo en una máquina **Iberna** y fue triturado en una picadora **Staff**.

Para manejar pequeños volúmenes se usaron pipetas automáticas graduables marca **Nichiryo**, modelos **Nichipet EX Plus** de 1000, 200, 20 y 10 µl.

En los procedimientos de extracción de DNA y aislamiento de plaquetas a partir de muestras de sangre, se utilizaron las centrifugas **Sorvall RC 5B plus** con el rotor **SS34**, y **Hermle Z200A** con el rotor **297.11**. Los pequeños volúmenes se centrifugaron en microcentrifugas **Eppendorf** modelo **5415C (rotor F45-18-11)**, y modelo **5415R (rotor F45-18-24)**, para centrifugaciones a temperatura controlada.

Para la eliminación de los restos de etanol en la preparación del DNA y otras evaporaciones de disolvente, se utilizó un concentrador a vacío de la marca **Eppendorf**, modelo **5301**.

La cuantificación de ácidos nucleicos fue medida en el **ND-1000 spectrophotometer**, de la marca **Nanodrop**.

La amplificación de ácidos nucleicos por PCR se realizó en el termociclador de la marca **Biometra**, modelo **T3 Thermocycler**, en el de la

marca **Applied Biosystems** modelo **Veriti Thermal cycler**, y en el de la marca **Eppendorf**, modelo **Mastercycler personal**.

Para la secuenciación automática se utilizó un secuenciador **ABI PRISM 377** de **Applied Biosystems**.

Las técnicas basadas en PCR cuantitativa en tiempo real se realizaron con un **Step-ONE** de la marca **Applied Biosystems**.

La incubación con temperatura para pequeños volúmenes fue realizada en los incubadores **Thermomixer compact**, de la marca **Eppendorf** y en el **Mixing Block MB-102** de la marca **BIOER**.

Para la realización de electroforesis horizontales se utilizaron los sistemas de **Biorad**: **Mini-sub Cell GT**, **Wide Mini-sub Cell GT** y **Sub Cell GT**, así como las fuentes de alimentación **Power Pac HC** y **Power Pac 300** también de **Biorad**. Las electroforesis verticales se realizaron en los sistemas **Mini Protean**, **Mini Protean tetra Cell**, **Protean II xi Cell** y se utilizó la fuente de alimentación de alto voltaje **Power Pac Universal**, todo ello de **Biorad**.

Se utilizó un formador de gradiente **Hoefler SG30**, de la marca **Amersham Biosciences** y una bomba peristáltica modelo **Ecoline**, de la marca **Ismatec** para producir los geles con gradiente de acrilamida.

Los geles de acrilamida se secaron en un secador de geles modelo **583** de **Biorad**.

La transferencia de proteínas desde geles de acrilamida a membranas de PDVF se realizó con el sistema **Trans-blot SD Semi-dry transfer cell** de la marca **Biorad**.

La exposición autorradiografía de membranas conteniendo reactivos luminescentes, o de geles conteniendo radiactividad se realizó en casetes

herméticos y con pantallas amplificadoras en caso necesario, de las marcas **Amersham y Kodak** respectivamente.

Los geles de agarosa conteniendo bromuro de etidio, se visualizaron en un transiluminador **Geldock** de **Biorad**.

Las medidas espectrofotométricas en cubeta se realizaron en un espectrofotómetro UV-Visible **UV 500** de **Unicam**, termostatzado mediante un sistema **Peltier** también de **Unicam**.. Todas las medidas espectrofotométricas en placa se realizaron en un lector de placas **NovoStar**, con sistema de pipeteador e inyector automático de **BMG Labtech**.

El consumo de oxígeno se midió en un oxígrafo de alta resolución modelo **Oroboros**, de la marca **Oroboros**.

El trabajo con líneas celulares fue realizado en campanas de flujo laminar modelos **LaminAir** y **NU-437-400E** de las marcas **Holten y Nuair** respectivamente. Las líneas celulares se guardaron en incubadores de CO₂, modelos **DHD AutoFlow Incubator** de la marca **Nuair**. Las células se visualizaron en un microscopio invertido modelo **DMIL**, de la marca **Leica**. El conteo del número de células se determinó mediante un contador celular modelo **Z2**, de la marca **Beckman Coulter**. Se utilizó una centrifuga **Allegra X-22** de la marca **Beckman Coulter** para la centrifugación de suspensiones celulares. Los medios de cultivo y otros reactivos se atemperaron previamente a su utilización, en un baño termostatzado modelo **Precisitem** de la marca **P-Selecta**. Para el manejo de volúmenes en condiciones de esterilidad se utilizó un pipeteador automático de la marca **PipetBoy**. La congelación de líneas celulares se realizó en sistemas **Mr.Frosty**.

Para la obtención de una fracción mitocondrial enriquecida, a partir de cultivos celulares, se utilizó un homogenizador modelo **Eurostar digital** de la marca **Ika-Werke**.

Los reactivos que lo requirieron, así como las muestras biológicas y celulares se almacenaron en una nevera marca **Lynx**, un congelador de -20°C **Veredeca** y un ultracongelador (-80°C) de la marca **Koxka**.

1.3. Reactivos

Todos los productos químicos usados fueron, al menos, de grado analítico (PA). Las principales casas comerciales utilizadas en este trabajo fueron **Sigma-Aldrich**, **Panreac**, **Roche**, **Amersham**, **Promega**, **Merck**, **Invitrogen**, **Serva**, **Applied Biosystems**.

Las enzimas de restricción utilizadas son de **Roche**, **Takara**, **New England Biolabs**, **Promega**, **GIBCO**, **SIGMA-Aldrich**, **Invitrogen** y **Fermentas**. La polimerasa utilizada para las reacciones de PCR fue la *Taq DNA Polimerase* de **Roche**. Los reactivos para la RT-PCR fueron de **Applied-Biosystems**.

Los oligonucleótidos para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizados en esta tesis fueron sintetizados por **Sigma-Genosys** y purificados mediante el método del desalado. Los oligonucleótidos y sondas para PCR cuantitativa fueron sintetizados por **Applied-Biosystems** y purificadas por HPLC.

El purificado de fragmentos de DNA, para su posterior secuenciación se realizó con *ExoSAP-IT[®] for PCR* de **USB**.

La sonda fluorescente yoduro de propicio, utilizada en citometría de flujo se obtuvo de **Molecular Probes**.

En la presente tesis doctoral se utilizaron los siguientes Kits comerciales: *Complex IV Duplexing (Activity + Quantity) Microplate Assay Kit* de **MitoSciences**, para la determinación de la actividad y cantidad de complejo IV; *MitoBiogenesis In-cell ELISA kit* de **MitoSciences** para determinar la cantidad

de p.MT-CO1 y SDHA; e *In Vitro Toxicology Assay Kit, Neutral Red based* de **Sigma**, para la determinación de la viabilidad celular en placa.

Los medios utilizados en el cultivo celular, así como el suero fetal bovino (FBS) procedían de **Invitrogen**.

Los productos radiactivos utilizados [³⁵S] se obtuvieron de **Perkin-Elmer**. El revelador (P7042) y el fijador (P7167) son de **SIGMA**.

Los anticuerpos utilizados para el western-blot provinieron de la casa comercial **MitoSciences**.

Las membranas de PVDF para la fijación de proteínas fueron membranas Hybond™ -P de **Amersham**. Las autorradiografías utilizadas en la detección de proteínas mediante western blot fueron las Hyperfilm™ ECL de **Amersham** y en el caso del marcaje radioactivo de la síntesis de proteínas con S³⁵, fueron las Kodak Biomax MR film de **Sigma**.

Para las sucesivas extracciones fenólicas se utilizó una mezcla de fenol con cloroformo-alcohol isoamílico (25:25:1) llevada a un embudo de decantación al que se añadió 8-hidroxiquinoleína hasta una concentración de 0,1%. La mezcla resultante se saturó con Tris-HCl 10 mM pH=7,4, NaCl 0,1 M, SDS 0,5% y EDTA-Na 1 mM. Una vez separadas las fases se recogió la fase fenólica y se almacenó a 4°C en un frasco oscuro.

2. Métodos.

2.1. Aislamiento de DNA total.

2.1.1. A partir de células sanguíneas.

La sangre se colocó en tubos de centrifuga estériles y se diluyó con cuatro volúmenes de tampón TE (20:5) (TRIS-HCl 20 mM pH=8, EDTA-Na 5

mM). Los tubos se agitaron suavemente y se colocaron en un baño de hielo durante 15 minutos. A continuación, se centrifugó a 5000 rpm en la centrífuga Sorvall con el rotor SS-34 durante 15 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante, que contenía la mayor parte de la fracción de células rojas lisadas, y el pellet celular obtenido se resuspendió en 15 ml de tampón TE (20:5) con agitación en Vortex. Una vez resuspendido, se completó el volumen del tubo de centrifuga y se volvió a centrifugar de nuevo a 5000 rpm en la centrífuga Sorvall con el rotor SS-34 durante 15 minutos a 4°C. Este lavado se repitió hasta que se obtuvo un pellet celular blanquecino, libre de restos de eritrocitos. El pellet celular, compuesto principalmente por leucocitos, se resuspendió en TE (20:5) en un volumen de 3 ml. Para la lisis de las células se adicionó proteinasa K (200 µg/ml) y SDS hasta una concentración final de 0,4 %. Se incubó esta mezcla a 37°C durante toda la noche.

La extracción de ácidos nucleicos se realizó al día siguiente con una mezcla de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (Fenol-IAC 25:25:1). Para ello, se añadieron en primer lugar 1/10 volúmenes de acetato amónico 7,5 M con el fin de facilitar la formación de la interfase con las proteínas y seguidamente se añadieron 1,5 volúmenes de Fenol-IAC. Se agitó vigorosamente durante 2 minutos utilizando para ello un vortex, para mezclar de forma homogénea las dos fases, acuosa y fenólica. Se centrifugó a 3000 rpm en una centrífuga **Hermite Z200A** (rotor **220.97**), durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Separadas las dos fases, se procedió a recoger la fase acuosa (superior) con pipeta Pasteur, en un tubo falcón de 50 ml, y se repitió de nuevo todo el proceso de extracción con Fenol-IAC. A la fase acuosa final se le añadieron 1,5 volúmenes de una mezcla de cloroformo-álcohol isoamílico (24:1) que nos ayudó a retirar los restos de fenol que se pudieran haber arrastrado. Se agitó manualmente con un vortex durante 2 minutos y se centrifugó nuevamente a 3.000 rpm en una centrífuga **Hermite Z200A** (rotor **220.97**), durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los ácidos nucleicos, presentes en la fase acuosa (superior) recogida en este último paso, se precipitaron por adición de dos volúmenes de etanol a -20°C. Tras varias inversiones del tubo falcon para mezclar bien el etanol con la fase acuosa se observó la aparición de un ovillo

de DNA que se recogió con una pipeta Pasteur estéril y se transfirió a un tubo *ependorf* de 1,5 ml. Se dejó secar en un concentrador (**Eppendorf Concentrator 5301**) para eliminar los restos de etanol y el DNA ya seco se resuspendió en 300 µl de agua destilada estéril, que se dejó agitando en un termoblock a 37°C durante un día para su completa disolución.

2.1.2. A partir de células epiteliales de bulbo piloso.

Para la obtención de DNA a partir de células del bulbo piloso, se partió de varios pelos (normalmente procedentes de la ceja) que conservaran su raíz intacta. Se procedió a la separación de los bulbos pilosos (raíces de los cabellos), del resto de los mismos mediante un bisturí estéril y se transfirió a un tubo *ependorf*, donde se resuspendieron en 0,5 ml del tampón 1xRSB cuya composición era: 10 mM TRIS-HCl pH 7,4, 10 mM NaCl, 25 mM EDTA. Las células se lisaron mediante la adición de proteinasa K (200 µg/ml) y SDS hasta una concentración final de 1%. Esta mezcla se incubó a 37°C toda la noche. Al día siguiente, los ácidos nucleicos se extrajeron con una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (Fenol-IAC). Para esto, se añadió un volumen de Fenol-IAC, se agitó vigorosamente durante 2 minutos con un vortex, para mezclar de forma homogénea las dos fases, acuosa y fenólica. A continuación se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente en una centrifuga **Eppendorf 5415C**. Se recogió la fase acuosa (fase superior) en un nuevo tubo *ependorf* y se extrajo con cloroformo-alcohol Isoamílico (24:1) para retirar los restos de fenol. Se volvió a centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente en una centrifuga **Eppendorf 5415C (rotor F45-18-11)**. A la fase acuosa recogida, se le añadieron dos volúmenes de etanol frío. Si tras varias inversiones se observó la aparición de un ovillo de DNA, este se recogió con una pipeta Pasteur y se transfirió a un nuevo tubo *ependorf*. Se dejó secar en un concentrador (**Eppendorf Concentrator 5301**) para eliminar los restos de etanol y el DNA ya seco se resuspendió en 300 µl de agua destilada estéril, que se dejó agitando en un termoblock a 37°C durante un día, para su completa disolución. Si no se observó la aparición del ovillo de DNA, la mezcla de la fase acuosa con el etanol se mantuvo a -20°C

durante toda la noche ó a -70°C durante una hora y el DNA se recogió por centrifugación durante 30 minutos a 13.000 rpm en una centrifuga **Eppendorf modelo 5415R (rotor F45-24-11)**, con la temperatura fija a 4°C . Una vez eliminados los restos de etanol secándolos en un **Eppendorf Concentrator 5301**, el DNA se resuspendió en 200 μl de agua. Se dejó agitando en el termoblock a 37°C durante un día para la completa disolución del DNA.

2.1.3. A partir de cultivos celulares.

Como material de partida se utilizó un pellet celular, previamente lavado 2 veces con PBS (tampón fosfato salino). La extracción de los ácidos nucleicos se realizó siguiendo el mismo protocolo que a partir de las células sanguíneas, pero utilizando 0,25 ml de tampón TE (10:1) (TRIS-HCl 10 mM pH=8, EDTA-Na 1mM), y adicionando 1,25 l de proteinasa K (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y 5 l de SDS (al 25%). Se realizó una sola extracción con Fenol-IAC en lugar de dos.

2.2. Cuantificación de ácidos nucleicos.

La cantidad de ácidos nucleicos obtenidos se determinó utilizando un ND-1000 spectrophotometer de la marca **Nanodrop**. Este aparato realiza una lectura espectrofotométrica a 260 nm y 280 nm de longitud de onda, utilizando un volumen de trabajo muy pequeño (1-2 microlitos). Tras la realización de un blanco, utilizando para ello el mismo disolvente en el que esté disuelta la muestra de ácidos nucleicos (generalmente agua destilada), la medida de las muestras da directamente el valor de la concentración de ácidos nucleicos. El cálculo se realiza utilizando la formula:

$$\text{ng.DNA } /\mu\text{l} = \text{Abs}_{260} \times 50 \times \text{Vdilución}$$

El ratio de absorbancia a 260 y 280 nm sirve para evaluar la pureza de los ácidos nucleicos, considerándose un valor óptimo un ratio entre 1,8 y 2.

2.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

2.3.1. Preparación de las muestras.

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

2.3.2. Proceso de amplificación.

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 de la enzima *Taq DNA Polimerasa* de **Roche** (la utilizada en este caso), realizándose en tubos de 200 μ l y en un volumen final de 50 μ l que contenía:

- 100-500 μ g de DNA total.
- 5 μ l del tampón 10X (100 mM TRIS, 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl, pH 8,3).
- 200 μ M dNTPs (1 μ l de una mezcla de dNTPs, 10 mM de cada uno).
- 0,2 μ M de cada uno de los oligonucleótidos (0,5 μ l de oligonucleótidos disueltos a una concentración 25 μ M).
- 1,25 unidades de la enzima Taq DNA Polimerasa (0,25 μ l de la enzima suministrada a 5 U/ μ l).
- agua para alcanzar los 50 μ l del tubo.

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. En cada tubo de reacción se puso el agua necesaria para llevar el volumen a 50 μ l, se añadió la parte proporcional de la mezcla previa y a continuación se introdujo 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.

Variando la secuencia de los oligonucleótidos empleados, podemos amplificar cualquier región del DNA. Este cambio de oligonucleótidos deberá reflejarse a su vez en el ajuste de las condiciones generales de amplificación, estableciendo una temperatura de hibridación adecuada para cada par de oligonucleótidos empleados. Las condiciones generales de amplificación son las siguientes (**tabla 6.2**):

Temperatura	Tiempo
95°C	5 minutos
95°C	45 segundos
Tª Hibridación	45 segundos
72°C	45 segundos
72°C	5 minutos

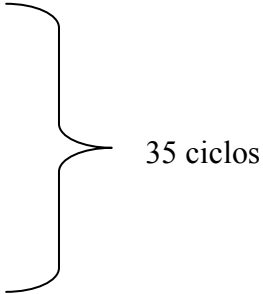


Tabla 6.2. Condiciones generales de la PCR.

Las secuencias de oligonucleótidos utilizados de forma rutinaria durante el presente trabajo, así como las temperaturas de hibridación a las que se emplearon, se muestran en la siguiente tabla (**tabla 6.3**).

CAPITULO 6

PCR	Secuencia oligonucleótido Directo (5'-3')	Secuencia oligonucleótido Reverso (5'-3')	Tª Hibridación
C1494T	GTCGAAGGTGGATTTAGCAGT	GCAGAAGGTATAGGGGTTAG	54°C
A1555G	GTAAGCGCAAGTACCCACG	CTTTGGCTCTCCTTGCAAAGT	64°C
A1811G	GGAGATTTCAACTTAACTTG	ATTGGTGGCTGCTTTTAGGC	60°C
G3010A	GTCCTAAACTACCAAACCTGC	ATGATGGCTAGGGTGACTTC	60°C
T4216C	CTACTTCTAACCTCCCTGTT	CTTACTTTAGGATGGGGTGT	64°C
T4336C	CTACTTCTAACCTCCCTGTT	TGTGCCTGCAAAGATGGTAG	60°C
A4769G	ATAATAGGAGCTTAAACCCCC	AGCTAACATGACTAACACCC	60°C
A4917G	ATAGCCCCCTTTCACTTCTG	AGAGGTTAAGGAGGGTGATG	63°C
C7028T	TCGCCACACTCCACGGAAG	TGGCGTAGGTTTGGTCTAGG	65°C
G9744A	CTCTACCTGCACGACAACAC	GCCAATAATGACGTGAAGTCC	60°C
T10873C	CTACAAAAGGATTAGACTG	GAGTTTGATAGTTCTTGGGCAGT	60°C
A12308G	CTCAACCCCGACATCATTACC	ATTACTTTTATTTGGAGTTGCACCAAGATT	64°C
G13708A	TCTTCTCACCTAACAGGTC	GTTGGTTAGGTAGTTGAGGT	63°C
T14766C	TATTCTCGCACGGACTACAA	GGTCGATGAATGAGTGGTTA	64°C
A14793G	TATTCTCGCACGGACTACAA	CCCCTCAGAATGATATTTGGC	60°C
T14798C	CAAGACCTCAACCCCTGA	TCATCGACCTCCCCACCCATCCAACATC	60°C
G15218A	CATTATCCTCCTGCTTGCAACTATA	CTCAGATTCATTGAACTAGGTCGG	60°C
G15257A	TCTCCGCATGATGAAACTC	GATCCCGTTTCGTGCAAGAA	63°C
T15693C	TTCGCCTACACAATTCTCCG	TCTCCGGTTTACAAGACTGG	60°C

Tabla 6.3. Secuencia de los oligonucleótidos directos y reversos así como de las temperaturas de hibridación necesarias para cada PCR.

2.4. Digestión de productos de PCR con enzimas de restricción.

Una vez amplificado el material genético, pueden realizarse con él varios ensayos. Uno de ellos es la determinación de la presencia o ausencia de polimorfismos o mutaciones puntuales. Para ello se utilizan enzimas de restricción. Cada una de ellas reconoce un determinado sitio de corte, los polimorfismos o mutaciones rompen o generan estos sitios de corte, produciendo un patrón de bandas que permite identificar estos cambios puntuales en el DNA.

Los productos de PCR se digirieron tomando 5 μ l de los mismos llevándolos a un volumen final de 10 μ l, que contenía 5U del enzima, el tampón de incubación del mismo y agua destilada para completar el volumen total.

A continuación (**tabla 6.4**), se presenta la lista de enzimas de restricción y las temperaturas de incubación necesarias para la determinación de la presencia de los polimorfismos y mutaciones incluidas en el apartado de PCR:

Polimorfismo/ Mutación	Enzima de Restricción	Tª Incubación
C1494T	<i>HphI</i>	37°C
A1555G	<i>Alw26I</i>	37°C
A1811G	<i>PsiI</i>	37°C
G3010A	<i>BccI</i>	37°C
T4216C	<i>AfIII</i>	37°C
T4336C	<i>Avall</i>	37°C
A4769G	<i>AluI</i>	37°C
A4917G	<i>MaeI</i>	45°C
C7028T	<i>AluI</i>	37°C
G9744A	<i>AcsI</i>	37°C
T10873C	<i>MnII</i>	37°C
A12308G	<i>Hinfl</i>	37°C
G13708A	<i>MvaI</i>	37°C
T14766C	<i>TruI</i>	65°C
A14793G	<i>MbiI</i>	37°C
T14798C	<i>DdeI</i>	37°C
G15218A	<i>HaeIII</i>	37°C
G15257A	<i>AccI</i>	37°C
T15693C	<i>SspI</i>	37°C

Tabla 6.4. Enzimas de restricción y temperatura de incubación para la detección de cada polimorfismo/ mutación puntual.

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

Para comprobar la amplificación del material genético mediante PCR y para determinar la presencia de polimorfismos o mutaciones puntuales mediante patrones de corte con enzimas de restricción, se utilizaron geles de agarosa de distinto porcentaje para separar los ácidos nucleicos.

La agarosa se fundió en un horno microondas en el tampón TBE (50 mM Tris, 50 mM Acido Bórico, 1mM EDTA-Na, pH 8,3), después se añadió el Bromuro

de Etidio (1 µg/ml) y se dejó que la solución gelificara en las camas de electroforesis pequeñas o grandes de la marca **BIORAD**. Las muestras se mezclaron con 2 µl de mezcla colorante (Ficoll 400 15%, azul de Bromofenol 0,2%), la electroforesis se desarrolló a 100 voltios durante media hora en el caso de la comprobación de la amplificación por PCR y se desarrolló a 60 voltios durante una hora en el caso de los productos de digestión con enzimas de restricción. El resultado se visualizó tras la exposición del gel a una fuente de radiación ultravioleta. Se confirmó el tamaño de las bandas de ácidos nucleicos utilizando marcadores de peso molecular de **Roche** de 1kb o de 12 Kb (en función de los tamaños de los fragmentos obtenidos) (**Fig. 6.1, A y B respectivamente**).

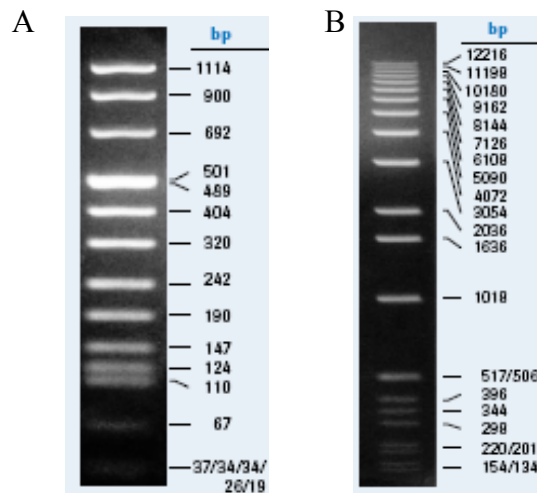


Fig. 6.1. Marcador es de pesos moleculares de. A. Marcador de 1 Kb. B. Marcador de 12 Kb.

2.6. Patrones de corte de las enzimas de restricción para la detección de polimorfismos y mutaciones puntuales en el mtDNA.

Una vez separados los productos de digestión de las enzimas de restricción mediante la electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa, debemos observar el patrón de bandas obtenido, para dilucidar la presencia o ausencia de polimorfismos o mutaciones puntuales en el mtDNA. En la electroforesis previa se cargaron un producto de PCR sin digerir y un control (positivo o negativo según el

caso) para poder comparar el patrón de bandas obtenido en nuestras muestras con el de los controles. A continuación se presenta en primer lugar, un resumen (**tabla 6.5**) con los patrones de corte de los polimorfismos y mutaciones detallados anteriormente. Seguidamente se presentan ejemplos gráficos de estos patrones de corte de la mayoría de los *SNPs* y mutaciones analizadas, así como el porcentaje de agarosa necesario para la correcta separación de las bandas: (**Figs. 6.2-6.16**).

Polimorfismo/ Mutación	<i>Wild type</i>	<i>Mutante</i>
C1494T	371 pb+70 pb	441 pb
A1555G	347 pb+251 pb	598 pb
A1811G	365 bp+168 pb	533 pb
G3010A	294 pb+225 pb+214 pb+180 pb+39 pb	439 pb+294 pb+180 pb+39 pb
T4216C	312 pb	121 pb+191 pb
T4336C	425 pb	256 pb+169 pb
A4769G	221 pb+186 pb + 116 pb+101 pb+84 pb+54 pb 47 pb + 48 pb+16 pb+ 10 pb+9 pb	305 pb+186 pb+116 pb+101 pb+54 pb+47 pb+48 pb+16 pb+10 pb+9 pb
A4917G	345 pb+120 pb+85 pb	306 pb+39 pb+120 pb+85 pb
C7028T	183 pb+78 pb	152 pb+ 31 pb+78 pb
G9744A	656 pb	362 pb+294 pb
T10873C	8 pb+15 pb+22 pb+30 pb+58 pb+61 pb+63 pb+69 pb+105 pb+109 pb+166 pb+243 pb	8 pb+15 pb+22 pb+30 pb+61 pb+63 pb+69 pb+105 pb+109 pb+166 pb+301 pb
A12308G	168 pb+67 pb	138pb+67 pb+30 pb
G13708A	164 pb+85 pb	249 pb
T14766C	93 pb+17 pb+20 pb+4 pb	110 pb+20 pb+4 pb
A14793G	520pb	380 pb+140 pb
T14798C	219pb+174 pb+28	190 pb+174 pb+29 pb+28 pb
G15218A	70 pb+60 pb+20 pb	60 pb+45 pb+25 pb+20 pb
G15257A	430 pb+105 pb	535 pb
T15693C	238 pb+123 pb	361 pb

Tabla 6.5. Resumen de los patrones de corte para la detección de cada polimorfismo o mutación puntual.

m.1494C>T

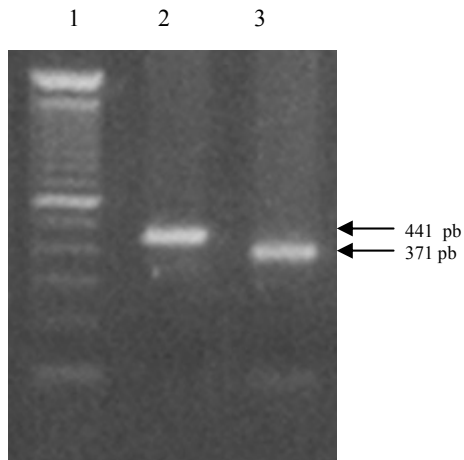


Fig. 6.2. Patrón de bandas para la mutación m.1494C>T en un gel de agarosa del 2%. Calle 1 patrón de pesos moleculares. Calle 2 amplificado sin digerir. Calle 3 control negativo.

m.1555A>G

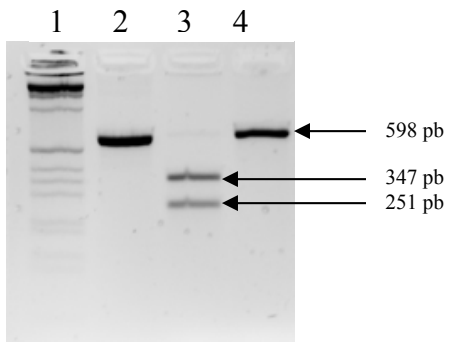


Fig.6.3. Patrón de bandas para la mutación m.1555A>G en un gel de agarosa del 2%. Calle 1 patrón de pesos moleculares. Calle 2 amplificado sin digerir. Calle 3 control negativo. Calle 4 control positivo.

m.3010G>A

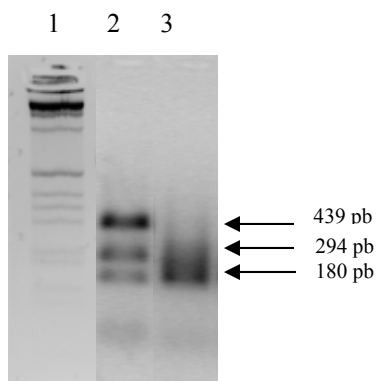


Fig.6.4. Patrón de bandas para la mutación m.3010G>A en un gel de agarosa del 2%. Calle 1 patrón de pesos moleculares. Calle 2 control positivo. Calle 3 control negativo.

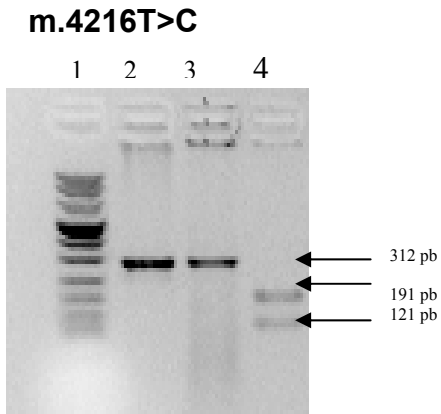


Fig.6.5. Patrón de bandas para el polimorfismo m.4216T>C en un gel de agarosa del 2 %. Calle 1 patrón de pesos moleculares. Calle 2 amplificado sin digerir. Calle 3 control negativo. Calle 4 control positivo.

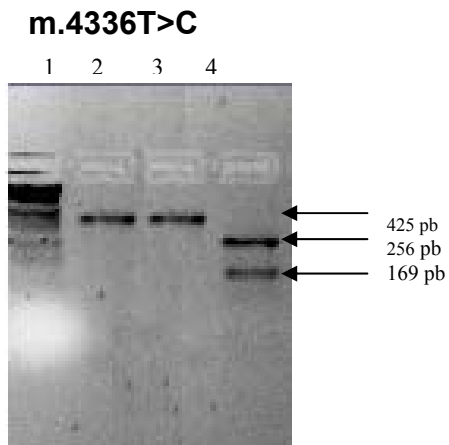


Fig.6.6. Patrón de bandas para el polimorfismo m.4336T>C en un gel de agarosa del 2 %. Calle 1 patrón de pesos moleculares. Calle 2 amplificado sin digerir. Calle 3 control negativo. Calle 4 control positivo.

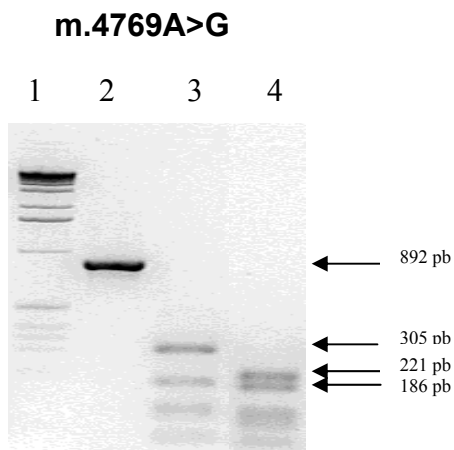


Fig.6.7. Patrón de bandas para el polimorfismo m.4769A>G en un gel de agarosa del 2 %. Calle 1 patrón de pesos moleculares. Calle 2 amplificado sin digerir. Calle 3 control positivo. Calle 4 control negativo.

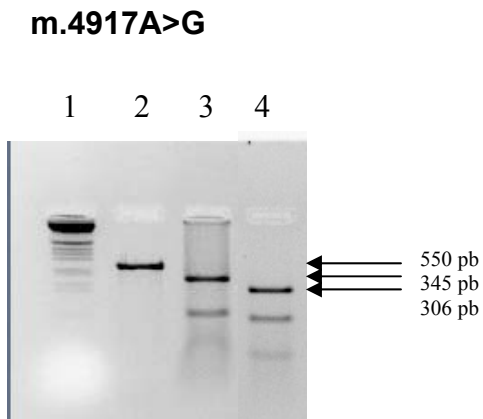


Fig.6.8. Patrón de bandas para el polimorfismo m.4917A>G en un gel de agarosa del 2 %. Calle 1 patrón de pesos moleculares. Calle 2 amplificado sin digerir. Calle 3 control negativo. Calle 4 control positivo.

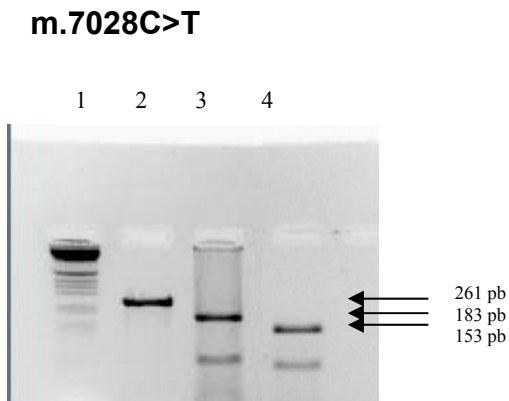


Fig.6.9. Patrón de bandas para el polimorfismo m.7028C>T en un gel de agarosa del 2 %. Calle 1 patrón de pesos moleculares. Calle 2 amplificado sin digerir. Calle 3 control negativo. Calle 4 control positivo.

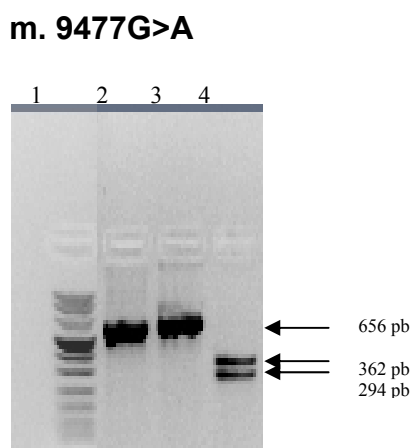


Fig.6.10. Patrón de bandas para el polimorfismo m.9477G>A en un gel de agarosa del 2 %. Calle 1 patrón de pesos moleculares. Calle 2 amplificado sin digerir. Calle 3 control negativo. Calle 4 control positivo.

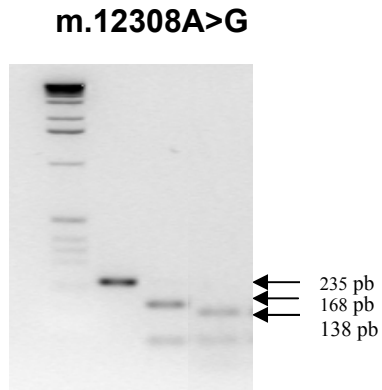


Fig.6.11. Patrón de bandas para el polimorfismo m.12308A>G en un gel de agarosa del 2 %. Calle 1 patrón de pesos moleculares. Calle 2 amplificado sin digerir. Calle 3 control negativo. Calle 4 control positivo.

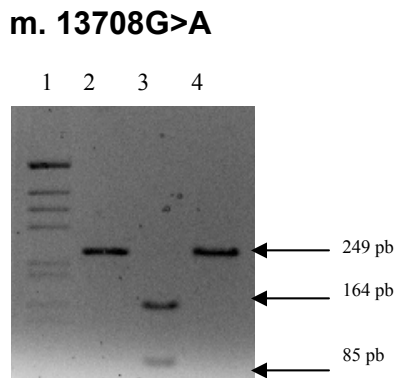


Fig.6.12. Patrón de bandas para el polimorfismo m.13708G>A en un gel de agarosa del 2 %. Calle 1 patrón de pesos moleculares. Calle 2 amplificado sin digerir. Calle 3 control negativo. Calle 4 control positivo.

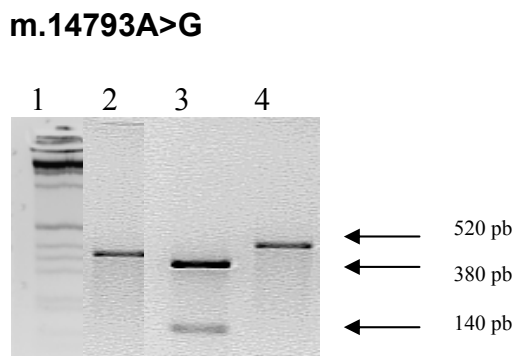


Fig.6.13. Patrón de bandas para el polimorfismo m.14793A>G en un gel de agarosa del 2 %. Calle 1 patrón de pesos moleculares. Calle 2 amplificado sin digerir. Calle 3 control positivo. Calle 4 control negativo.

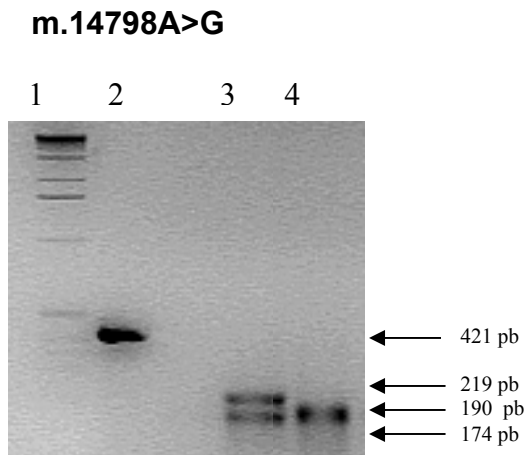


Fig.6.14. Patrón de bandas para el polimorfismo m.14798A>G en un gel de agarosa del 2 %. Calle 1 patrón de pesos moleculares. Calle 2 amplificado sin digerir. Calle 3 control negativo. Calle 4 control positivo.

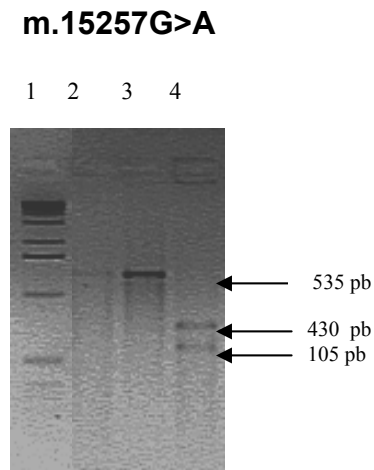


Fig.6.15. Patrón de bandas para el polimorfismo m.15257G>A en un gel de agarosa del 2 %. Calle 1 patrón de pesos moleculares. Calle 2 amplificado sin digerir. Calle 3 control positivo. Calle 4 control negativo.

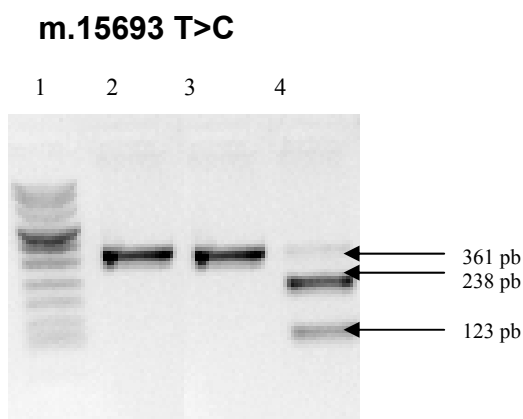


Fig.6.16. Patrón de bandas para el polimorfismo m.15693T>C en un gel de agarosa del 2 %. Calle 1 patrón de pesos moleculares. Calle 2 amplificado sin digerir. Calle 3 control positivo. Calle 4 control negativo.

2.7. Secuenciación de los genes de los rRNAs mitocondriales a partir de DNA total.

Otro de los posibles ensayos a realizar con los productos de amplificación de la PCR, es la secuenciación de dichas regiones. En este caso se secuenciaron completamente los genes que codifican para los dos RNAs ribosómicos mitocondriales, el rRNA 12S y el rRNA 16 S. Para ello, se realizó la PCR con las concentraciones de reactivos ya descritas, pero utilizando los siguientes oligonucleótidos y condiciones (**tablas 6.6 y 6.7**):

Gen	Secuencia oligonucleótido directo (5'-3')	Secuencia oligonucleótido Reverso (5'-3')
12S rRNA	AACCAAACCCCAAAGACACC	ATTGGTGGCTGCTTTTAGGC
16S rRNA	GTAAGCGCAAGTACCCACG	ATGATGGCTAGGGTGACTTC

Tabla 6.6. Secuencia de los oligonucleótidos necesarios para amplificar los genes de los rRNAs mitocondriales.

Temperatura	Tiempo
95°C	5 minutos
95°C	45 segundos
56°C	30 segundos
72°C	3 minutos
72°C	5 minutos

} 35 ciclos

Tabla 6.7. Condiciones de la PCR para amplificar los genes de los rRNAs mitocondriales.

Una vez comprobada la amplificación de los productos de PCR (ver apartado 2.5), estos se purificaron para eliminar todo el exceso de oligonucleótidos y nucleótidos que podrían interferir en la reacción de secuenciación. Para ello, se añadieron 2 µl de *Exosap* (que contiene una enzima exonucleasa y otra fosfatasa alcalina) por cada 5 µl de producto de PCR. La mezcla resultante se incubó durante 15 minutos a 37° C para que tuvieran lugar las reacciones de los enzimas y 15 minutos a 80° C para la inactivación de los mismos.

El amplificado purificado se cuantificó realizando un electroforesis en geles de agarosa (ver apartado 2.5), utilizando como patrón de pesos moleculares el **Low DNA Mass Ladder™**, que por comparación de intensidad nos permite calcular la concentración de nuestros purificados. Los oligonucleótidos de secuenciación fueron los mismos utilizados para la amplificación por PCR.

2.8. Secuenciación del gen del rRNA pequeño mitocondrial de especies de primates a partir de DNA total.

Se realizó la secuenciación del gen que codifica el rRNAs 12S mitocondrial en varias especies de primates. Para ello, se aisló el DNA total a partir de cultivos celulares (ver apartado 2.1.3). El proceso de amplificación de la región deseada del mtDNA, así como su purificación, fue similar a lo anteriormente descrito (ver apartado 2.7), pero se diseñaron oligonucleótidos específicos para este gen mitocondrial, que estuvieran conservados en las principales especies de primates, permitiendo así la amplificación de este gen en varias especies utilizando los mismos oligonucleótidos. El alineamiento de estas especies de primates se puede observar en la siguiente figura (**Fig.6.17**).

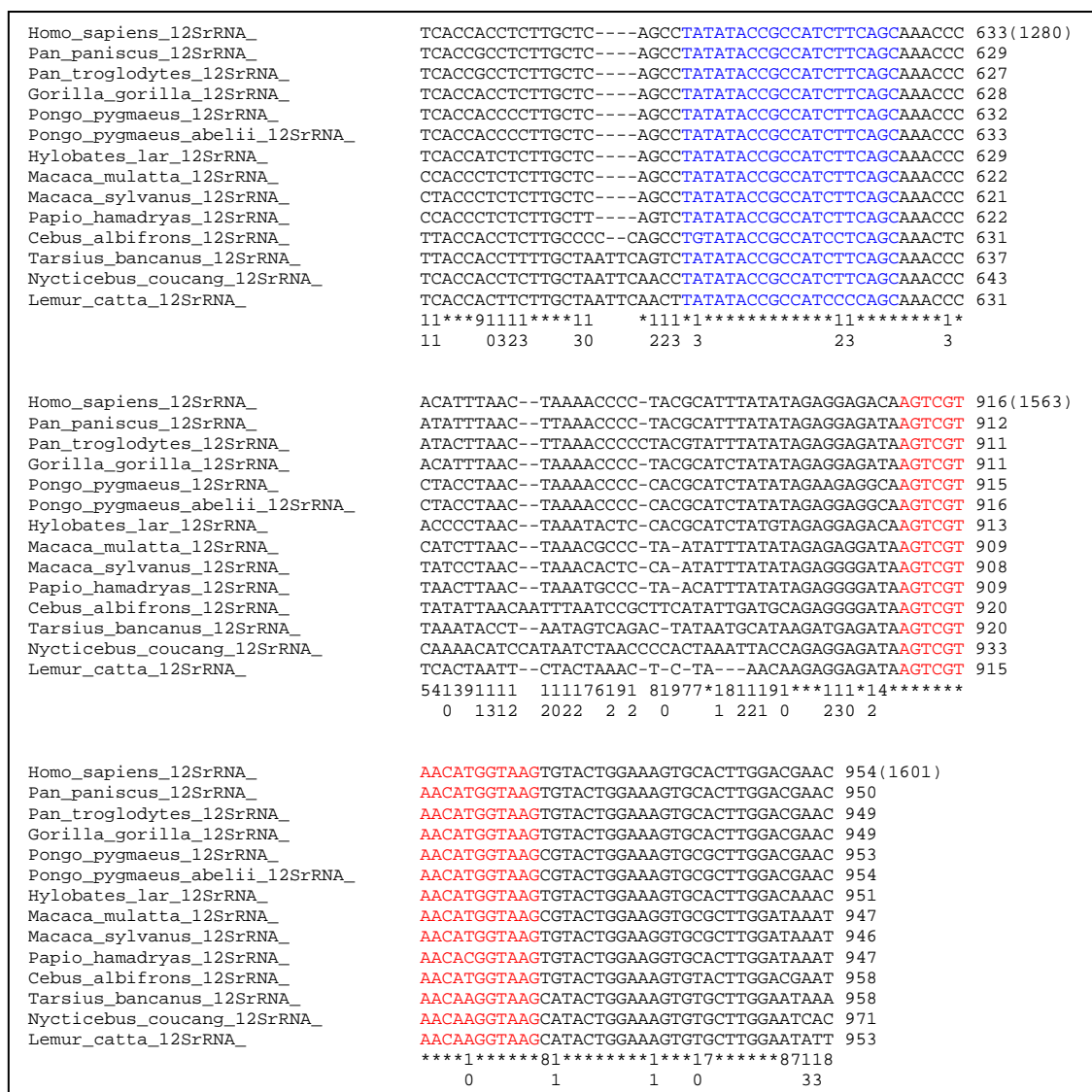


Figura.6.17. Alineamiento de dos regiones del gen *MT-RNR1* en las principales especies de primates. En azul se puede observar la región donde aparece el oligonucleótidos directo. En rojo se puede observar la secuencia donde aparece el oligonucleótidos reverso.

Se presenta a continuación la secuencia de estos oligonucleótidos (tabla 6.8).

Gen	Secuencia oligonucleótido directo (5´-3´)	Secuencia oligonucleótido reverso (5´-3´)
12S rRNA	TATACCGCCATCTTCAGC	CTTACCATGTTACGACT

Tabla 6.8. Secuencia de los oligonucleótidos para amplificar el gen del rRNA mitocondrial 12S en especies de primates.

2.9. Secuenciación del gen de la proteína ribosomal mitocondrial MRPS12 a partir de DNA total.

2.9.1. A partir de DNA total humano.

La proteína MRPS12 humana consta de dos exones. Sin embargo, en el segundo exón esta codificada la totalidad de la proteína madura. Por esta razón, se secuenció solo este segundo fragmento de DNA. A continuación se detallan las condiciones generales de la PCR (**tabla 6.9**).

Temperatura	Tiempo
95°C	5 minutos
95°C	30 segundos
58°C	60 segundos
72°C	60 segundos
72°C	5 minutos

} 33 ciclos

Tabla 6.9. Condiciones de amplificación para la secuenciación de la proteína MRPS12.

Asimismo, se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar esta región del DNA, que se muestran a continuación (**tabla 6.10**).

Exón	Secuencia oligonucleótido directo (5'-3')	Secuencia oligonucleótido reverso (5'-3')	Tamaño amplicón
2	CTCTAAGATCTGTTCTCTGGG	GAGCCAGGACTTGAATCCATG	330

Tabla 6.10. Secuencia de los oligonucleótidos para amplificar el gen de la proteína ribosomal mitocondrial MRPS12 en humanos.

Las condiciones de purificación y cuantificación fueron idénticas a las descritas en apartados anteriores (ver apartado 2.7).

2.9.2. A partir de DNA total de primates *Cercopithecidae*.

También se secuenció el gen de esta proteína en especies de la familia de primates *Cercopithecidae*. En este caso el gen consta de 3 exones, que se secuenciaron completamente, divididos en 2 amplificados. Las condiciones de PCR, purificación y cuantificación fueron similares a las utilizadas con DNA humano, pero se diseñaron oligonucleótidos específicos para estas especies. A continuación, se muestra una tabla con la secuencia de los mismos (**tabla 6.10**).

Exón	Secuencia oligonucleótido directo (5´-3´)	Secuencia oligonucleótido reverso (5´-3´)	Tamaño amplicón
1 y 2	TTCCTACAATAGGTTTCGCC	AAGTCCCAGAGCGAATAACC	480
3	CACTAAGATCTGTTCTCTGCC	ACTCCACAAGGGTTCACATC	315

Tabla 6.11. Secuencia de los oligonucleótidos para amplificar el gen de la proteína ribosomal mitocondrial MRPS12 en primates *Cercopithecidae*.

2.10. Secuenciación de los 7 exones del gen de la rRNA metiltransferasa mitocondrial TFB1M a partir de DNA total.

Para la secuenciación de los 7 exones del gen TFB1M se emplearon los mismos reactivos para el proceso de amplificación de DNA total por PCR, y para la purificación y cuantificación de los productos amplificados (ver apartados 2.3 y 2.7). Sin embargo las condiciones de amplificación y los oligonucleótidos utilizados fueron específicos para este gen (Alonso-Montes, Castro et al. 2008). Se presentan a continuación las condiciones para la realización de la PCR y la secuencia de los oligonucleótidos empleados (**tablas 6.12 y 6.13**).

Temperatura	Tiempo
95°C	5 minutos
95°C	30 segundos
Tª hibridación	60 segundos
72°C	60 segundos
72°C	5 minutos

} 33 ciclos

Tabla 6.12. Condiciones de amplificación para la secuenciación de los 7 exones del gen TFB1M.

Exón	Secuencia oligonucleótido directo (5´-3´)	Secuencia oligonucleótido reverso (5´-3´)	Tª hibridación	Tamaño amplificón
1	TGGGGCTGACTCCGAGGC	GACGTGCAAGACCCCCCG	65°C	324
2	CATACGTTGAAATTTGCCAAG	GGGGTTTAAGCATCATGGC-	58°C	281
3	GCACAGGTTTAAAAAGTTTAGTTTT	GGAAGCAAGTAGCAAGAGAAAA-	58°C	350
4	CTTTGATGCTATTAATATCCAGTCTG	TTAACTTAGAAAACACAGACTGTGG	59°C	353
5	GTCCACCTAGTGTTCCAGAAATAATG	GGGAACAAACGTCCTAATTCC-	58°C	319
6	AGGCTGTTGACAGCCCATC	ATAGAGCAAACAAGTTTCTCACTC	59°C	317
7	GAGGGTTAAAAAGTGCATGATT	CCACGTAGTGCAAATCGAC	58°C	373

Tabla 6.13. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados, temperaturas de hibridación y tamaño de los fragmentos obtenidos en la amplificación para la secuenciación de los 7 exones del gen TFB1M.

2.11. Secuenciación completa del DNA mitocondrial.

Para la amplificación completa del DNA mitocondrial, se divide el mismo en 8 fragmentos solapantes, que se amplifican por PCR, se purifican y se cuantifican en las condiciones ya descritas (ver apartados 2.3. y 2.7). Los oligonucleótidos para la amplificación de cada fragmento, así como el tamaño de los mismos se muestran a continuación (**tabla 6.14**):

Fragmento	Secuencia oligonucleótido directo (5´-3´)	Secuencia oligonucleótido reverso (5´-3´)	Tamaño amplicón(bp)
F1	AACCAAACCCCAAAGACACC	CTGATCCAACATCGAGGTCG	2452
F2	GTCCTAAACTACCAAACCTGC	GTGTTAGTCATGTTAGCTTG	2436
F3	AGCAGTTCTACCGTACAACC	TTTGAAAAAGTCATGGAGGCC	2476
F4	GATTTGAGAAGCCTTCGCTTC	GCCAATAATGACGTGAAGTCC	2524
F5	TCCCACTCCTAAACACATCC	AAACCCGGTAATGATGTCGG	2539
F6	GCCCACGGGCTTACATC	GATTGTTAGCGGTGTGGTCG	2851
F7	TCTTCCCACTCATCCTAACC	ACAGATACTGCGACATAGGG	2590
F8	TTCGCCTACACAATTCTCCG	TTTATGGGGTGATGTGAGCC	1643

Tabla 6.14. Fragmentos solapantes para la secuenciación completa del mtDNA. Se muestran también las secuencias de los oligonucleótidos para realizar la PCR y el tamaño de los fragmentos.

2.12. Secuenciación automática.

La secuenciación de los distintos productos de amplificación por PCR se llevó a cabo de forma automática en el servicio de secuenciación de ácidos nucleicos de la Universidad Autónoma de Madrid. Para ello, el DNA amplificado, purificado y cuantificado, fue sometido a la reacción de secuenciación utilizando el Kit “Big-Dye Terminators” y el oligonucleótido correspondiente en cada caso. Los oligonucleótidos utilizados para la secuenciación fueron los mismos empleados para obtener los amplificados por PCR. Los resultados de las reacciones se analizaron en un secuenciador **ABI PRISM 377**.

Los electroferogramas recibidos se analizaron mediante el programa *Sequencher 4.2*. Para localizar las mutaciones se utilizó la secuencia humana de referencia de Cambridge (**GenBank NC_012920**) (Andrews, Kubacka et al. 1999).

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

Otra forma de determinar la presencia o ausencia de polimorfismos o mutaciones puntuales en el *mtDNA* es la utilización de PCR cuantitativa a tiempo real y tecnología **Taq Man**. Esta técnica se basa en la aplicación de dos oligonucleótidos y dos sondas específicas para una determinada región del *mtDNA*, cada una de las cuales está marcada con un fluoróforo “reporter” distinto (VIC o FAM) y que además llevan unidas una molécula apantalladora de la fluorescencia o “quencher”. Las sondas son idénticas en secuencia, excepto en la posición del polimorfismo de interés para cada caso, una sonda tendrá el nucleótido complementario para la base del alelo salvaje y la otra sonda tendrá el nucleótido complementario a la base del alelo mutante. Solo hibridará aquella sonda que porte el nucleótido complementario al alelo presente para el polimorfismo de interés.

Cuando se produce la amplificación del DNA por la reacción de PCR, el avance de la polimerasa, libera la sonda que haya hibridado con nuestro DNA y además rompe la unión del “quencher” y de nuestro fluoróforo, el cual una vez libre, emitirá luz a una longitud de onda específica.

Siguiendo esta emisión de fluorescencia podemos identificar la sonda hibridada, y por tanto el alelo presente en nuestra muestra.

Podemos ver un esquema del funcionamiento de esta técnica en la siguiente figura (**Fig. 6.18**).

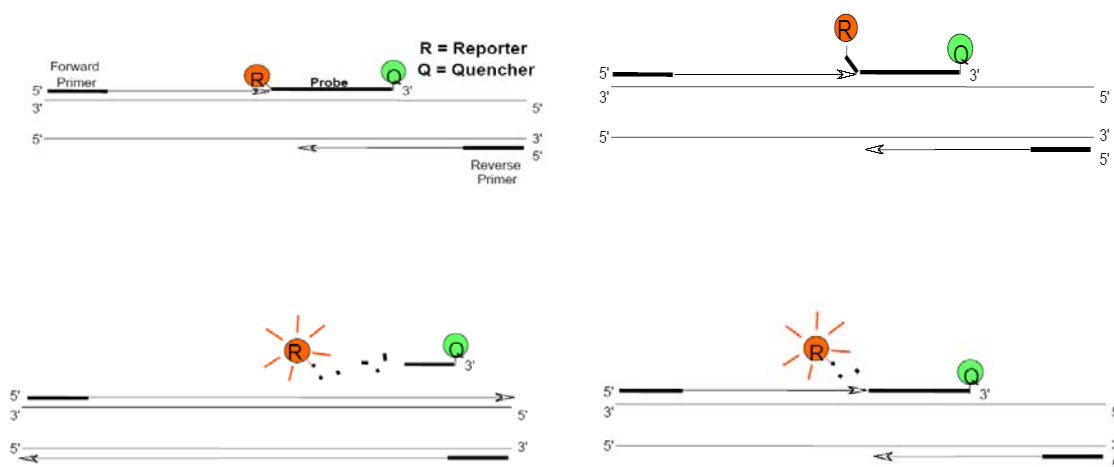


Fig.6.18. Esquema del proceso de hibridación de las sondas Taq Man y la posterior liberación y emisión de fluorescencia.

El material de partida para esta técnica es DNA total. Dada la alta sensibilidad de la técnica, es necesario extremar las precauciones durante la manipulación para evitar posibles contaminaciones.

Las concentraciones y cantidades de los reactivos son los reflejados en la siguiente tabla (**tabla 6.15**):

	Concentración final	Volumen reacción
Gene Expression Master Mix	1X	12,5 µl
Mix sonda / oligonucleótidos	1X	0,66 µl
Agua	-	9,875 µl
DNA	10 ng / µl	2 µl

Tabla 6.15. Reactivos y concentraciones para la detección de polimorfismos y mutaciones puntuales por PCR cuantitativa a tiempo real.

Se trabajó utilizando placas de 48 pocillos de **Applied Biosystems**. 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 reservaron varios pocillos de la placa que solo contenían la mezcla de reacción, pero que carecían de DNA. También se utilizó un control positivo y un control negativo para el polimorfismo de interés en cada caso, para poder confirmar la validez de los resultados.

Las reacciones tuvieron lugar en un **Step-ONE** de la marca **Applied Biosystems**, con las siguientes condiciones (**tabla 6.16**):

Temperatura	Tiempo	
60°C	30 segundos	} 40 ciclos
95°C	10 minutos	
95°C	15 segundos	
60°C	1 minuto	

Tabla 6.16. Condiciones de la PCR cuantitativa en tiempo real.

2.14. Determinación del genotipo mitocondrial.

El genotipo o haplogrupo mitocondrial se determinó, dilucidando la presencia o ausencia de determinados polimorfismos en el mtDNA. Este procedimiento se realizó o bien por PCR/RFLP (ver apartados 2.3 y 2.4) o bien por PCR cuantitativa en tiempo real y tecnología **TaqMan** (ver apartado 2.13). En ambos casos, se siguió un esquema preestablecido de búsqueda de los polimorfismos y que estaba además basado en la abundancia de los mismos dentro de la población, como se había mostrado en estudios previamente publicados (Ruiz-Pesini, Lapena et al. 2000). A continuación se muestra el esquema de trabajo utilizado (**Fig. 6.19**):

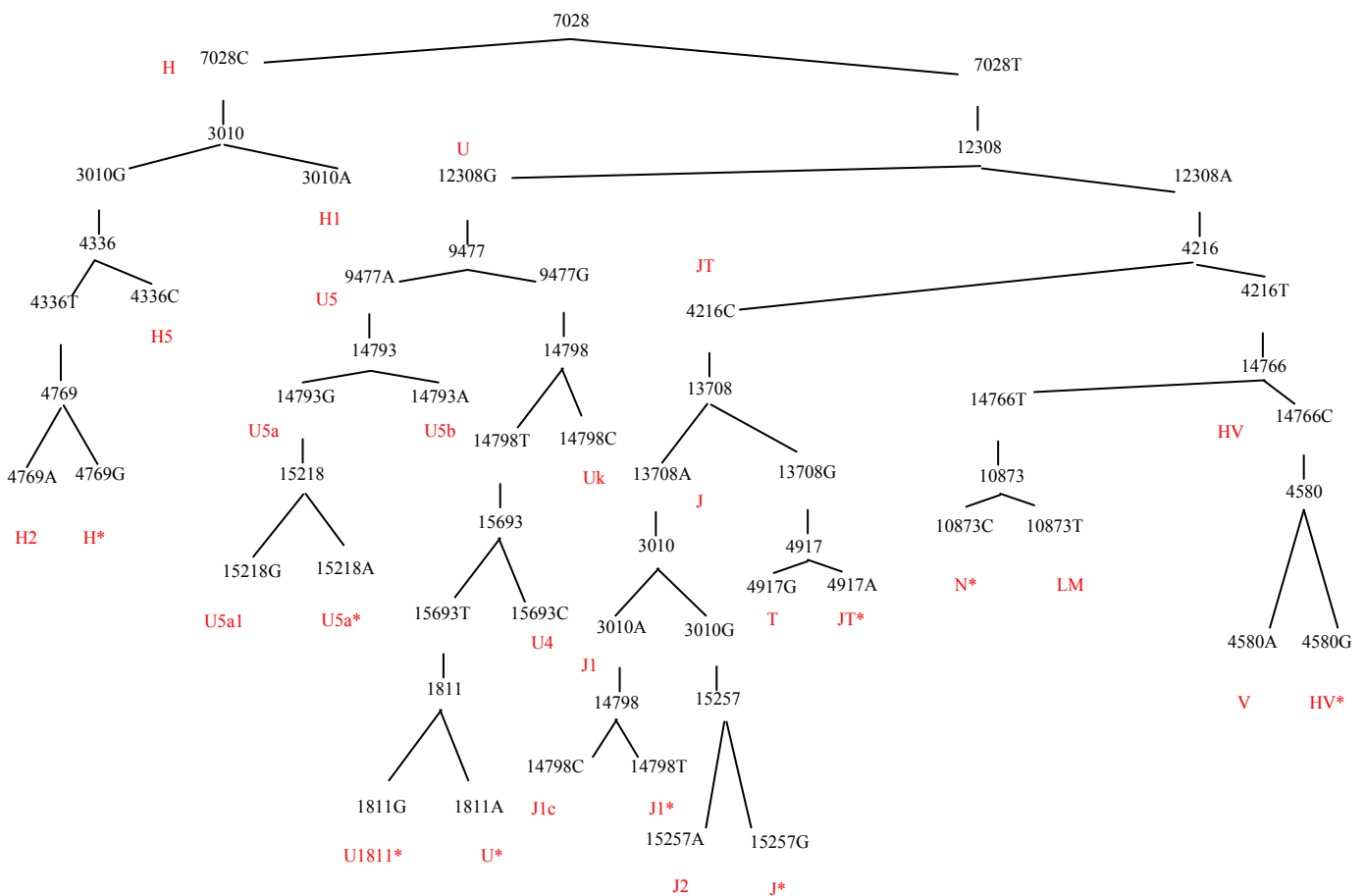


Fig.6.19. Esquema de la estrategia de determinación del genotipo mitocondrial. En negro se muestran los polimorfismos y en rojos los genotipos mitocondriales que definen.

2.15. Cultivos celulares.

2.15.1. Componentes y medios.

Todos los reactivos utilizados provienen de las marcas **Sigma-Aldrich®** e **Invitrogen®**. Tripsina (0,05 p/v), uridina (10 mg/ml), 5-Bromo-deoxi-uridina (5-dBrU) (10 mg/ ml), citrato sódico, polietilenglicol al 42%, DMSO, piruvato, galactosa, PBS pH 7.4, DMEM, FBS y FBS dializado.

Las células se crecieron en general con *Dubelco's modified Eagle medium* (DMEM) normal (5 mM de glucosa, 1mM de piruvato) suplementado con un 5% de suero fetal bovino (FBS). Para el crecimiento de cultivos primarios, como fibroblastos, se utilizó DMEM normal suplementado con 20% de FBS. En algunas excepciones, se añadió al medio de cultivo uridina (50 µg/ ml), como en caso del medio rho⁰ o BrdU (100 µg /ml) y FBS dializado en el caso del medio de selección de las líneas híbridas mitocondriales, para eliminar la fuente de uridina necesaria para que las células rho⁰ sobrevivan (Chomyn, Lai et al. 1994) En numerosos ensayos y con el propósito evidenciar defectos en el sistema de fosforilación oxidativa, limitando para ello la glucólisis, se utilizó DMEM libre de glucosa y suplementado con galactosa 5 mM, piruvato 1 mM y FBS al 5 %. En los experimentos con antibióticos, estos se añadieron al medio DMEM suplementado con galactosa a las concentraciones deseadas. En este caso el medio se cambió cada 48 horas.

2.15.2. Incubación con antibióticos.

En aquellos ensayos destinados a probar el efecto de distintos antibióticos sobre el sistema de fosforilación oxidativa, estos se añadieron a la concentración deseada en el medio de cultivo. Para evitar un potencial efecto sobre la adherencia de las células, estas se sembraron en medio DMEM normal en ausencia de antibióticos. A las 8 h de la siembra se cambio el medio de cultivo por DMEM *free* suplementado con galactosa, piruvato, FBS y el antibiótico a la concentración deseada. Este medio fue renovado cada 48h. hasta que acabo el experimento.

2.15.3. Siembra y cultivo celular.

El trabajo con cultivos celulares tuvo lugar en condiciones de esterilidad, utilizando para ello una campana de flujo laminar, y tomando todas las medidas necesarias para evitar la contaminación. Todo el trabajo de cultivos celulares fue realizado en ausencia de antibióticos, excepto en aquellos experimentos en los que se quiso probar el efecto de los mismos. En general las células se sembraron en las placas de cultivo con una densidad inicial de 300.000 - 1.000.000 células por placa de cultivo (en función del tamaño de las placas), utilizando placas de 40, 100, 150 mm y frascos de 25, 75, 150 y 300 ml y con una cantidad de medio aproximada de 1 ml/10 mm de diámetro. En el trabajo de rutina con cultivos celulares se utilizaron placas de cultivo de 100 mm de diámetro.

Los cultivos se mantuvieron para su crecimiento en una estufa a 37°C, con una atmosfera de CO₂ del 5%, cambiando el medio de cultivo de forma periódica (cada 2-3 días) hasta llegar a una confluencia del 80% en las placas de cultivo, momento en el cuál las células se lavaron con tampón fosfato (PBS) para eliminar las proteínas del suero que inhiben el efecto de la tripsina. Las células se incubaron con tripsina al 0,05 % durante 2-3 min. a 37°C y se comprobó con un microscopio invertido que las células se hubieran despegado de la placa. Se resuspendieron las mismas en un volumen de DMEM 5 veces mayor que el volumen de tripsina utilizado y se centrifugaron a 1500 rpm (**Beckman Coulter Allegra X-22**, rotor **SX4250**) durante 5 min. Una vez obtenido el pellet celular este fue procesado según el uso que se le fuera a dar.

2.15.4. Congelación y descongelación de líneas celulares.

Para la congelación celular se utilizaron criotubos resistentes al N₂ líquido. Una vez tripsinizadas las células y recogido el pellet celular por centrifugación, se resuspendieron en medio de congelación (DMEM suplementado con 20 % de FBS) y un 10 % de DMSO, un compuesto que actúa como crioprotector. A continuación, los criotubos se introdujeron en un

Mr. Frosty, de **Sigma** y este a su vez en un congelador de -80°C . Este **Mr. Frosty** es un contenedor de policarbonato que contiene alcohol isoamílico y cuando es sometido a congelación, permite un descenso gradual de la temperatura de $1^{\circ}\text{C} / \text{min.}$, lo que favorece una buena conservación celular. Las células se mantuvieron en el recipiente aproximadamente durante 24 horas en el congelador de -80°C y a continuación se pasaron a N_2 líquido donde se almacenaron hasta su posterior descongelación. La cantidad de células congeladas por criotubo fue de entre 3 y 5 millones aproximadamente.

Para la descongelación se tomó un criotubo de células del tanque de N_2 líquido y se resuspendió en un tubo falcon de 15 ml con medio de cultivo. Se centrifugaron las células, y se decantó el sobrenadante para eliminar el DMSO. El pellet de células obtenido se sembró en una o dos placas de cultivo en función al tamaño del pellet celular obtenido.

2.15.5. Recuento celular.

El recuento celular se realizó con el contador de células **BECKMAN COULTER®** modelo **Z-2**. El fundamento de la técnica se basa en el conteo de partículas con potencial eléctrico (en este caso células) por medio de un sensor. Para el recuento resuspendimos $100 \mu\text{l}$ de la solución celular procedente de la tripisinización y lo resuspendimos en 10 ml de Isotón (solución isotónica en la que se realiza la medida). A continuación se muestra una figura (**Fig. 6.20**) del aparato utilizado para realizar esta medida.



Fig.6.20. Contador de células Beckman Coulter® modelo z-2.

2.15.6. Análisis y tratamiento de contaminación por micoplasma.

La determinación de contaminación por micoplasma se llevó a cabo periódicamente mediante PCR, a partir del medio de cultivo en el que crecieron las células. Para ello se usó como muestra de partida una alícuota de medio de cultivo que había estado en contacto con las células durante 48 h. Se hirvió durante 10 min. a 90°C y de ahí se cogieron 2 µl para realizar la PCR en un volumen final de 50 µl.

Los oligonucleótidos específicos empleados para esta PCR, Myc A (5'-GGCGAATGGGTGAGTAACACG-3') y Myc B (5'-CGGATAACGCTTGCGACCTATG-3') son capaces de reconocer las ocho especies más comunes de micoplasma (*M. arginini*, *M. hyorhinis*, *M. pneumoniae*, *M. fermentans*, *M. orale*, *Acheoplasma laidlawii*, *Spiroplasma mirum*, *M. pirum*). Las condiciones de amplificación se muestran en la siguiente tabla (**tabla 6.17**):

Temperatura	Tiempo
94°C	3 minutos
95°C	1 minuto
60°C	1 minuto
72°C	1,5 minutos
72°C	5 minutos

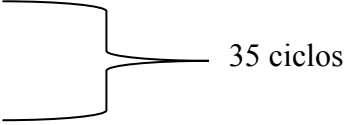


Tabla 6.17. Condiciones de la PCR para la detección de micoplasmas en cultivos celulares,

En cada determinación se añadió un control positivo y un control negativo (medio de cultivo sin haber sido utilizado), que se trataron de la misma forma que nuestras muestras y que sirvió para confirmar el resultado del ensayo. Podemos encontrar un ejemplo de esta determinación en la siguiente figura (**Fig.6.21**).

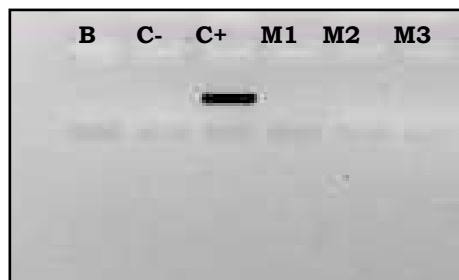


Fig.6.21. Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR de la determinación de micoplasmas. B: Blanco, C-; control negativo, C+; control positivo, M1, M2 y M3 muestras.

2.16. Generación de cíbridos transmitocondriales.

2.16.1. Extracción y conservación de plaquetas.

2.16.1.1. Extracción de plaquetas.

La extracción de plaquetas para la construcción de líneas cíbridas se realizó según Chomyn (Chomyn, Lai et al. 1994). Se recogieron 15-20 ml de sangre en tubos con EDTA (tapón violeta). Se pasó la sangre a un tubo falcon de 15 ml y se le añadió 1/9 de volumen de una solución de citrato (citrato sódico 0,1 M y NaCl 0,15 M). Se mezcló bien por inversión y se centrifugó a 1400 rpm (**Sorvall**, rotor **SS34**), durante 20 min. a 12°C. A continuación, se recogieron $\frac{3}{4}$ partes del plasma de la sangre (sobrenadante) teniendo precaución de no recoger células rojas, y se volvió a centrifugar a 4200 rpm (**Sorvall**, rotor **SS34**), durante 20 min. a 15°C. El pellet de plaquetas obtenido, se lavó con suero salino y, dependiendo de la cantidad de plaquetas (tamaño del pellet) se utilizaron todas para su fusión o se congeló una parte.

2.16.1.2. Congelación y descongelación de plaquetas.

El procedimiento es similar a la congelación y descongelación de células. Utilizando criotubos resistentes al N₂ líquido, el pellet de células se resuspendió en suero salino con FBS al 20 % y 10 % de DMSO. Los criotubos se introdujeron en el recipiente de congelación **Mr. Frosty** de **Sigma**.

Para la descongelación se tomó un criotubo de plaquetas del tanque de N₂ líquido y se resuspendió en un tubo falcon de 15 ml con medio de cultivo. Se centrifugaron las células, y se decanto el sobrenadante para eliminar el DMSO.

2.16.2. Fusión de plaquetas con líneas rho⁰.

Los cíbridos transmitocondriales utilizados en esta tesis han sido generados a partir de plaquetas frescas y congeladas según el protocolo de Chomyn (Chomyn, Lai et al. 1994).

Se tripsinizaron las células rho⁰ (carentes de mtDNA), se contaron y se resuspendieron en medio DMEM con 10% de FBS a una concentración de 5x10⁵ células/ml. Se tomaron aproximadamente 2 ml de esta suspensión celular, para obtener un total de 10⁶ células, que se añadieron suavemente sobre el pellet de plaquetas obtenido (procurando que se forme una capa homogénea de células que cubra las plaquetas). Se centrifugaron a 1400 rpm (**Beckman Coulter Allegra X-22**, rotor **SX4250**) durante 10 min., a temperatura ambiente, sin freno. Se retiró el sobrenadante con cuidado, y sobre el pellet se añadió 0,1 ml de polietilenglicol (PEG) al 42 %, y se resuspendió vigorosamente hasta la disgregación del pellet. Una vez disgregado, se esperó 1 min., para favorecer la fusión de las membranas celulares ayudadas por el detergente. Pasado ese tiempo, se resuspendió el homogenado celular durante 30 s más, y rápidamente se llevó a un volumen de 10 ml de medio de cultivo DMEM para evitar el efecto tóxico del PEG. El homogenado celular se centrifugó a 1400 rpm (**Beckman Coulter Allegra X-22**, rotor **SX4250**) durante 5 min., y el pellet celular obtenido se sembró en medio rho⁰ que suplementamos con 100 µg/ml de 5-Bromo-desoxi-uridina (5-BrdU).

Cuando la placa de cultivo en la que hemos sembrado la fusión alcanza una confluencia del 100%, pasamos las células a dos placas de cultivo y cuando estas a su vez alcanzaron una alta confluencia (más del 80%), las células de una de las placas de cultivo se congelaron y en la otra añadimos

medio selectivo (medio DMEM suplementado con BrdU (100 µg/ml) y 10% de FBS dializado).

El proceso de selección de los cíbridos transmitocondriales se realiza aproximadamente durante 21 días. Durante ese tiempo el medio de cultivo fue renovado periódicamente. A lo largo de este procedimiento es posible observar la formación de clones o agrupamientos de células que provienen todas de una misma célula inicial. Si el crecimiento de estos clones fuera muy elevado, se pueden sembrar a otra placa para su mejor desarrollo.

Una vez pasado el tiempo de selección, en el cual solo habrán sobrevivido las células que hayan incorporado el mtDNA de las plaquetas, las células deben recuperar sus niveles de mtDNA, para ello las células se cultivaron de manera que cada vez que una placa de cultivo alcanzó una confluencia cercana al 100%, esta se dobló. Este proceso se repitió durante 25-30 veces, hasta que se confirmó que los niveles de mtDNA eran constantes.

Durante el proceso de recuperación de los niveles de mtDNA, se congelaron las células de una de las placas de cultivo cada cierto número de doblajes. Alternativamente, cada cierto número de doblajes las células de una de las placas de cultivos se tripsinizaron, el pellet celular obtenido se congeló y se reservó para la extracción de DNA. Esto sirvió por un lado, para confirmar la presencia de la mutación/polimorfismos en nuestro híbrido transmitocondrial y por otro lado para la determinación de los niveles de mtDNA.

2.17. Cariotipado de líneas celulares.

Para el análisis citogenético de las líneas celulares partimos de células en crecimiento exponencial, aproximadamente a un 80 % de confluencia. Les añadimos medio DMEM con colchicina (0.5 µg/ml) y las incubamos durante 4 h a 37°C. Recogemos el medio de cultivo en un tubo falcon de 15 ml, tripsinizamos las células y utilizamos el mismo medio de cultivo ya separado para recogerlas. Centrifugamos a 1400 rpm (**Beckman Coulter Allegra X-22**,

rotor **SX4250**) durante 5 min y, una vez obtenido el pellet celular lo resuspendemos en 2 ml de medio salino hipotónico (0,560 mg de KCl en 100 ml de agua destilada). Una vez resuspendido, añadimos otros 3 ml del medio hipotónico y lo incubamos durante 30 min a 37°C. Pasado ese tiempo le añadimos 3 gotas de fijador *Carnoy* (metanol- ácido acético 3:1), homogeneizamos bien y centrifugamos de nuevo a 1400 rpm (**Beckman Coulter Allegra X-22**, rotor **SX4250**) durante 5 min, para obtener el pellet celular. Eliminamos el sobrenadante y resuspendimos el pellet con 2 ml de fijador *Carnoy*, le añadimos otros 3 ml y lo dejamos a temperatura ambiente durante 20 min. Después de esto, volvimos a centrifugar a 1400 rpm (**Beckman Coulter Allegra X-22**, rotor **SX4250**) durante 5 min, y disolvimos el pellet de células en 5 ml de fijador *Carnoy*, repetimos el paso anterior con otros 5 ml de fijador *Carnoy*, y lo repetimos una última vez pero utilizando un volumen de 0,5 ml de fijador *Carnoy*, para dejar la muestra así preparada para su conteo.

Utilizando una pipeta Pasteur vertimos unas gotas de la solución de células con fijador *Carnoy* en un portaobjetos desde una altura considerable y valoramos en un microscopio de contraste de fases el rendimiento de metafases en nuestras preparaciones. La escala es la siguiente:

- Buen rendimiento: entre 5 y 10 metafases en cada campo de visión.
- Rendimiento normal: entre 1-5 metafases por campo de visión.
- Rendimiento malo: menos de 1 metafase por campo de visión.

A partir de ahí el cariotipado fue realizado por Mamen Martín, Francesco Acquadro y el Dr. Juan Cigudosa del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) según el método SKY, de acuerdo con el protocolo de fábrica (**Applied Spectral Imaging, Migdal HaminEmek**, Israel). Las imágenes fueron captadas con un **SD300 Spectra Cube (Applied Spectral Imaging)** montado en un microscopio **Zeiss Axioplan** utilizando un filtro óptico diseñado para este fin, **SKY-1 (Chroma Technology, Brattleboro, VT)**. Se captaron y analizaron alrededor de veinte metafases para cada línea celular.

2.18. Estudios de viabilidad celular.

Para la determinación de la viabilidad celular se utilizaron dos técnicas; la citometría de flujo con la sonda fluorescente Ioduro de Propidio (IP) (Riccardi and Nicoletti 2006) y absorbancia con el *Neutral Red* para medir en placa de 96 pocillos.

2.18.1. Determinación de viabilidad celular por citometría de flujo.

El IP es un colorante que se une al DNA produciendo una señal lumínica, sin embargo no tiene la capacidad de atravesar las membranas celulares cuando estas se encuentran intactas. De esta forma el IP solo producirá una señal medible mediante el citómetro de flujo, cuando las células estén muertas y su membrana plasmática no se encuentre integra. La viabilidad se cuantifica como el número de células teñidas con el IP, y esto se puede cuantificar en el canal FL4 del citómetro.

Para realizar la determinación, partimos del pellet celular obtenido en fresco. Resuspendimos las células en un volumen final de 500 μ l de *Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)* en un eppendorf y les añadimos 5 μ l de una solución madre de IP (2,5 mg/ml). Incubamos el eppendorf durante 10 min a 37°C protegiéndolo de la luz. Pasado este tiempo, realizamos la medida en las condiciones que se detallan a continuación (**Fig. 6.22**).

FS: 50
 SS: 59
 FL1: 342
 FL4: 304
 Número de eventos: 20.000
 Compensación:
 FL1-FL4: 0
 FL4-FL1: 45,1

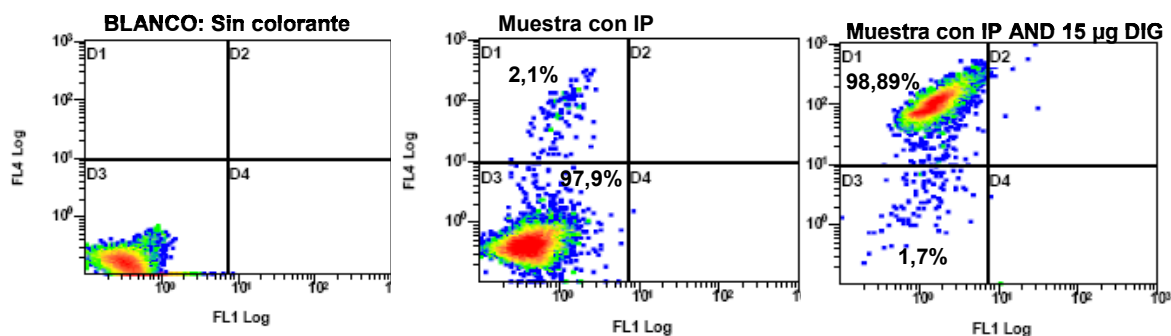


Fig.6.22. Condiciones para la determinación de la viabilidad celular mediante citometría de flujo. La población celular del cuadrante D3 representa el de las células viva, no teñidas con IP, y el cuadrante D1 las células muertas, teñidas con el mismo. La última imagen muestra una población tratada con digitonina como control de muerte celular.

2.18.2. Determinación de viabilidad celular por espectroscopía.

La determinación de viabilidad celular mediante técnicas espectroscópicas se realizó utilizando el colorante *Neutral Red* (NR), que ha sido ampliamente utilizado en estudios de citotoxicidad (Repetto, del Peso et al. 2008). Este compuesto es capaz de atravesar mediante difusión pasiva las membranas celulares, concentrándose en los lisosomas. Las células se incubaron en las condiciones y tiempo deseados según el tipo de experimento. Para realizar la medida de la viabilidad, se añadió a las células un volumen de 1/10 de la solución de *Neutral Red* (**Sigma**), y se incubó durante 2 h a 37°C. A continuación, se realizaron dos lavados con PBS y se añadieron 200 µl/pocillo de una solución de etanol: ácido acético (1:50), para liberar el colorante de los lisosomas. Finalmente, se midió la absorbancia a 550 nm.

2.19. Estudios de competición celular con antibióticos.

Los experimentos de crecimiento celular competitivo (Gomez-Duran, Pacheu-Grau et al. 2010), se realizaron combinando las distintas líneas celulares a estudiar entre sí, y estudiando el crecimiento de dichas combinaciones en ausencia y presencia de distintos antibióticos.

Para ello, partimos de 50.000 células de cada extirpe, que tras ser mezcladas homogéneamente, se sembraron en placas de 150 mm; en medio de galactosa sin y con antibiótico (ver apartado 2.15.2). Se crecieron durante 10 días aproximadamente. Pasado ese tiempo, calculamos la cantidad de cada genotipo mitocondrial utilizando la RT-PCR cuantitativa y refiriendo los resultados a la cantidad inicial de cada genotipo (la mezcla que habíamos sembrado). Las condiciones para obtener el material genético a partir de estas mezclas celulares y para realizar la RT-PCR son similares a los descritos previamente (ver apartados 2.1.2 y 2.13). Los polimorfismos del mtDNA que nos permitieron distinguir entre genotipos mitocondriales, se seleccionaron según la metodología de trabajo descrita en el apartado 2.14.

2.20. Preparación de extractos celulares totales.

Los pellets celulares se obtuvieron y procesaron de manera diferente en función del experimento en el que se fueran a utilizar:

2.20.1. Para ensayos espectrofotométricos.

Se prepararon homogenados celulares totales a partir de células en cultivo, en crecimiento exponencial. Las células se tripsinizaron y se centrifugaron a 1400 rpm durante 5 min (**Beckman Coulter Allegra X-22**, rotor **SX4250**). El pellet celular obtenido se lavó con PBS frío y se repitió el proceso de centrifugación. Tras la centrifugación se desechó el sobrenadante, y las células se resuspendieron a una concentración aproximada de 4×10^6 células en 100 μ l de tampón fosfato (KP 20 mM pH 7,0). Para romper las membranas celulares se realizaron 5 ciclos de congelación-descongelación (*freeze-thawing*)

homogeneizando bien la muestra entre ciclos. Las muestras se almacenaron, a -80 °C hasta su utilización.

2.20.2. Para western blot en geles desnaturalizantes.

Se prepararon homogenados celulares totales a partir de células en cultivo en crecimiento exponencial. Las células se tripsinizaron y se centrifugaron a 1400 rpm durante 5 min (**Beckman Coulter Allegra X-22**, rotor **SX4250**). El pellet celular obtenido se lavó con PBS frío y se repitió el proceso de centrifugación. Tras la centrifugación se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 50- 300 µL de tampón RIPA (50 mM TRIS-HCl pH 7,4 ,50 mM NaCl, 0,5 % Na-deoxicolato, 5 mM EDTA, 1 % Tritón 100X) (el Tritón 100X se añade tras haber autoclavado el tampón), conteniendo inhibidores de proteasas (**Sigma**). La suspensión celular se trasvasó a un tubo eppendorf, y se incubó durante 15 min a 4°C en una noria giratoria, favoreciendo la rotura de las membranas celulares mediante el detergente. A continuación esta suspensión se centrifugó a 4°C y a 13000 rpm (**Eppendorf**, modelo **5415R**, rotor **F45-24-11**), durante 15 min para eliminar los restos celulares. Se recuperó el sobrenadante y se congeló a -80°C hasta su uso (máximo 2- 3 meses).

2.21. Purificación de mitocondrias para análisis de complejos por *Blue-Native*.

La extracción y purificación de mitocondrias para el análisis de los complejos respiratorios por Blue-Native se realizó siguiendo los protocolos ya descritos (Wittig, Braun et al. 2006). Se partió de 10-15 placas de 100 mm en crecimiento exponencial. Las células se tripsinizaron y se centrifugaron a 1400 rpm durante 5 min (**Beckman Coulter Allegra X-22**, rotor **SX4250**). El pellet celular obtenido se lavó con PBS frío y se repitió el proceso de centrifugación, tras este paso el pellet se volvió a lavar con PBS en un volumen de 1 ml y se trasvasó a un tubo eppendorf previamente pesado. La suspensión celular se centrifugó a 4°C y a 13000 rpm (**Eppendorf**, modelo **5415R**, rotor **F45-24-11**)

durante 5 min. Se desechó el sobrenadante y se pesó el pellet húmedo, medida que nos servirá para calcular los reactivos necesarios en determinados puntos del proceso.

Por cada 10-50 mg de pellet celular húmedo este se resuspendió en 500 μ l de tampón sacarosa diluido (sacarosa 83 mM, 6.6 mM imidazol/HCl pH 7.0) al que se le añadió inhibidor de proteasas (**Sigma**). La solución celular se homogenizó mediante 8-10 sacudidas (*pops*) con un potter de vidrio-teflón. A continuación la solución se volvió a recoger y se centrifugó durante 10 min a 13000 rpm (**Eppendorf**, modelo **5415R**, rotor **F45-24-11**) para obtener un pellet celular que contenía núcleos, mitocondrias y otros fragmentos celulares.

Se desechó el sobrenadante y el pellet celular obtenido se congeló/ descongeló en nitrógeno líquido para favorecer la rotura celular, o se almacenó a -80° C, pausando en este punto el procedimiento. Tras el choque de congelación se añadieron 35 μ l de tampón de solubilización A (NaCl 50 mM, imidazol/HCl pH 7.0, ácido 6-aminohexanoico 2 mM, EDTA 1 mM) por cada 20 mg de pellet celular húmedo y se homogenizó vigorosamente con la micropipeta. A continuación, se añadieron 5 μ l de dodecil-maltósido (20%) por cada 20 mg de pellet celular, y se dejó en hielo durante 5-10 min, para que el detergente hiciera efecto. Esta suspensión se centrifugó durante 90 min, a 13.000 rpm (**Eppendorf**, modelo **5415R**, rotor **F45-24-11**), a 4° C para eliminar los restos de membranas celulares. Por último se recogió el sobrenadante y se almacenó a -80° C hasta su utilización.

2.22. Determinaciones enzimáticas.

2.22.1. Determinación de la actividad enzimática del complejo respiratorio IV.

El cambio de absorbancia producido por la oxidación de citocromo c reducido ($\epsilon = 18,7 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) a 550 nm durante 2 min (37°C) sirvió para determinar la actividad enzimática del complejo IV de la cadena respiratoria

mitocondrial, como se había descrito previamente (Tzagoloff, MacLennan et al. 1967).

Para asegurar la repetitividad de las medidas, estas se realizaron al menos por triplicado, y cuando fue necesario se comprobó la especificidad de la actividad del complejo respiratorio IV mediante la adición de un inhibidor del mismo (azida sódica). Las medidas se realizaron en cubetas de plástico de 1 ml, y el cambio de absorbancia fue determinada en un espectrofotómetro UV-Visible **UV 500** de **Unicam**, termostatzado mediante sistema **Peltier** también de **Unicam**.

A continuación se muestran las cantidades y concentraciones de los reactivos utilizados (**tabla 6.18**).

Reactivos	Cantidad para cubeta (μ l)
Tampón KP (100 mM pH 7,0)	100
Agua destilada	780
Muestra	20
Citocromo c reducido	100

Tabla 6.18. Cantidades y concentraciones de reactivos para la determinación de la actividad enzimática del complejo respiratorio IV.

2.22.2. Determinación de la actividad enzimática de la citrato sintasa.

El incremento de absorbancia observado a 412 nm, producido por el cambio a la forma aniónica del 5,5-Ditio-bis-2-nitrobenzónico (DTNB) tras añadir oxalacetato (OAA), a 30° C durante 1 min, sirvió para determinar la actividad enzimática de la citrato sintasa, como ya se había descrito (Faloona and Srere 1969). Esta medida se puede realizar tanto en cubeta de plástico de 1 ml, en un espectrofotómetro UV-Visible **UV 500** de **Unicam**, como en una placa de 96 pocillos en el lector de placas **Novostar** de **BMG-Labtech**. A continuación (**tabla 6.19**), se muestran las cantidades y concentraciones de reactivos para las dos formas de determinar la actividad enzimática de la citrato sintasa. El DTNB, disuelto en tampón de medida y el OAA que se disolvió en agua destilada se prepararon en fresco, mientras que el acetil-CoA se preparó previamente y se guardó alicuotado a -80° C. Las medidas se realizaron por

triplicado, y los valores de actividad se dieron corregidos por la cantidad de proteínas totales de cada muestra.

Reactivo	Cantidad para cubeta	Cantidad lector de placas
Tris-HCl 10 mM pH 8,0	871,7 µl	163,4 µl
Muestra	10 µl	5 µl
Acetil CoA (7 mg/ml)	3,3 µl	0,66 µl
DTNB 1mM	100 µl	20 µl
Tritón X-100 10%	10 µl	2,5 µl
OAA 50 mM	5 µl	1 µl

Tabla 6.19. Cantidades y concentraciones de reactivos para las dos formas de determinar la actividad enzimática de la citrato sintasa.

La actividad de la Citrato sintasa (UI/l) medida en cubeta se define como:

$$((\text{rate}/\text{min})/13.6) * (\text{Vol}_{\text{tot}}/\text{Vol}_{\text{muestra}}) * 1000$$

La actividad específica de la Citrato sintasa medida en placa de 96 pocillos se da como
 mOD/min/mg proteína

2.22.3. Determinación de la cantidad de proteínas totales por el método de Bradford.

Esta técnica nos permitió corregir las actividades enzimáticas o calcular el volumen de muestra necesario para las técnicas basadas en detección de proteínas (Western blot, *blue native*, síntesis de proteínas mitocondrial...etc.), obteniendo la cantidad de proteínas totales presentes en un homogenado celular. El procedimiento está basado en la medida de la cantidad de proteínas totales por una reacción colorimétrica. Realizamos una recta de calibrado con BSA (albúmina sérica bovina), partiendo de un stock de 1 mg/ml. Para ello preparamos en agua destilada una serie de diluciones de concentración perfectamente conocida, como se muestra en la siguiente tabla (**tabla 6.20**)

Concentración mg/ml	Agua μ l	BSA μ l
0,4	600	400
0,3	700	300
0,2	800	200
0,1	900	100
0,05	950	50
Blanco	1000	0

Tabla 6.20. Cantidades para preparar las diluciones de la recta de calibrado, en la determinación de proteínas totales por el método de Bradford.

El reactivo de Bradford se diluyó 1: 5 en agua destilada, y se conservó tapado de la luz. Usamos placas de 96 pocillos y medimos la absorbancia a 595 nm en el lector de placas **Novostar** de **BMG-Labtech**. En cada pocillo de la placa, añadimos los volúmenes de cada dilución de la recta o de la muestra y de reactivo de Bradford, mostrados a continuación (**tabla 6.21**).

	Volumen
Muestra/Puntos de la recta	10 μ l
Reactivo de Bradford	200 μ l

Tabla 6.21. Cantidad de muestra o dilución de la recta y reactivo de Bradford a añadir en cada pocillo de la placa.

Con los valores de absorbancia de las diluciones de BSA construimos una recta de calibrado y en esta interpolamos los valores de absorbancia de nuestras muestras. La absorbancia de las muestras debe quedar en el centro de nuestra de recta de calibrado para obtener exactitud a la hora de calcular la concentración de las mismas y si las hemos diluido para ajustarlas a la recta de calibrado, deberemos tener en cuenta la dilución a la hora de calcular la concentración.

2.22.4. Determinación de la actividad enzimática y cantidad del complejo respiratorio IV mediante un kit comercial.

Para medir la cantidad y la actividad del complejo IV se utilizó un kit comercial llamado “**Complex IV Duplexing (Activity + Quantity) Microplate Assay Kit**” de **Mitosciences**, basado en la inmovilización del complejo respiratorio IV en una placa de 96 pocillos mediante un anticuerpo y la posterior medida de la actividad enzimática y cantidad del mismo. Se siguieron estrictamente los protocolos de la casa comercial, para la correcta determinación. La determinación se realizó por triplicado o cuadruplicado utilizando el lector de placas **Novostar** de **BMG-Labtech**. Los datos se expresaron como mOD/min/mg de proteína.

2.23. Determinación de la cantidad de p.MT-CO1 y la cantidad SDHA mediante un Kit comercial.

El kit comercial “**MitoBiogenesis In-cell ELISA kit**” de **MitoSciences** sirvió para medir la cantidad de dos proteínas del sistema OXPHOS, mediante una reacción colorimétrica basada en la unión de anticuerpos específicos (ELISA). Siguiendo las indicaciones de la casa comercial, se pudo determinar la cantidad de una proteína codificada en el mtDNA (p.MT-CO1) y otra codificada en el nDNA (SDHA).

Se necesitan unas 80.000 células en cada pocillo de una placa de 48 pocillos para realizar la determinación. Tras la última incubación con el reactivo que dio el color, se trasvasaron 100 μ l a una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia en el lector de placas **Novostar** de **BMG-Labtech**. La cantidad de cada proteína se dio como absorbancia en el punto final menos la absorbancia en el punto inicial (blanco). Pudimos observar a continuación (**Fig. 6.23**), que existía una correlación significativa ($p < 0,05$) entre los valores de p.MT-CO1 normalizados por los de SDHA y el número de células sembradas.

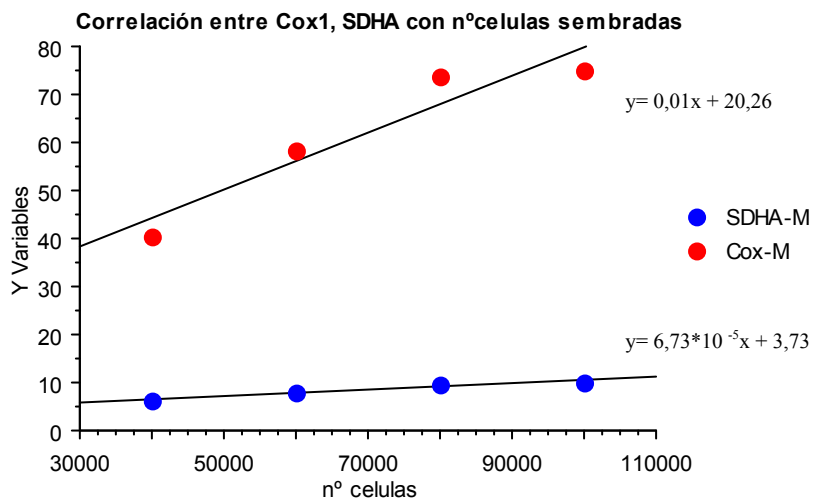


Fig.6.23. Correlación de la cantidad de p.MT-CO1 y SDHA y el número de células sembradas.

Y además también encontramos que las cantidades de las dos proteínas analizadas correlacionaban a su vez de manera significativa ($p < 0,05$). Esto se muestra a continuación (**Fig.6.24**).

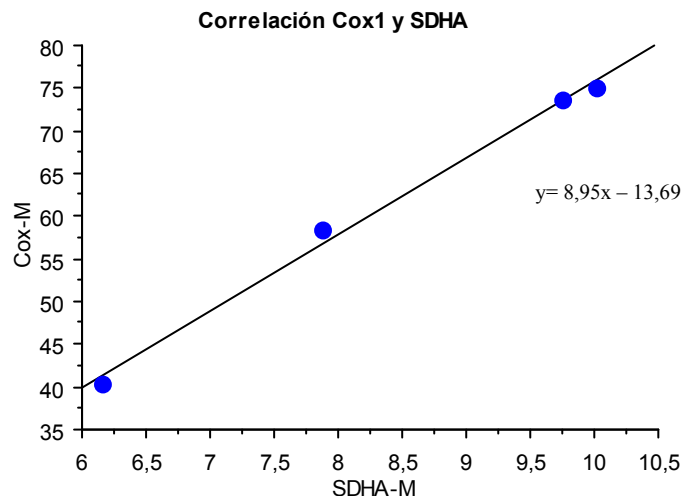


Fig.6.24. Correlación de la cantidad de p.MT-CO1 y SDHA y el número de células sembradas.

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

El principio de la respirometría, señala que 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, podremos obtener la velocidad de consumo de oxígeno. Las características del oxígrafo de alta resolución nos permiten medir velocidades de consumo de oxígeno, con muy poca difusión del mismo y con una gran estabilidad de las señales, a diferencia de otros métodos. Para eliminar todas las posibles fugas de consumo, tipo de medio, cámara se realizan diferentes *background* (cero, químico...etc.)

Partiendo de células en crecimiento exponencial, estas se tripsinizaron, se centrifugaron a 1400 rpm durante 5 min (**Beckman Coulter Allegra X-22, rotor SX4250**) y se contaron. El pellet celular obtenido se diluyó de tal forma que en 2 ml (volumen introducido en la cámara de medida) hubiera 3×10^6 células. Después de introducir la muestra, cerramos la cámara, y una vez se estabilizó el flujo obtendremos la denominada respiración endógena o de rutina. El software utilizado para la adquisición (1s por intervalo de tiempo) y análisis de datos fue el DatLab (**Oroboros Instrument, Innsbruck, Austria**). En la siguiente figura (**Fig. 6.25**) se muestra un ejemplo de una gráfica de consumo de oxígeno con el Oroboros.

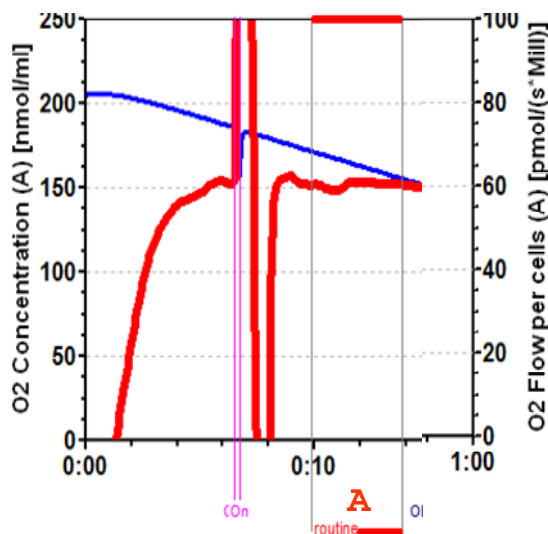


Fig.6.25 Gráfica del consumo de oxígeno con Oroboros, en azul concentración de oxígeno y en rojo flujo de oxígeno en la cámara.

2.25. Síntesis “in vivo” de proteínas mitocondriales marcadas con ³⁵S-Metionina.

Esta técnica, en las condiciones ya descritas (Chomyn 1996) sirvió para cuantificar la síntesis de las proteínas codificadas en el mtDNA en células *in vivo*. Las células se crecieron en placas de cultivo de 100 mm de diámetro y entre 12 y 24h antes del marcaje se renovó el medio de cultivo, para favorecer un crecimiento exponencial de las células sembradas.

Antes de comenzar el experimento de marcaje, se retiró el medio de cultivo, las células se lavaron una vez con PBS y se añadió DMEM libre de metionina y cisteína al que se le añadió 5% de FBS dializado, piruvato 0.11 mg/ml, uridina 50 µg/ml y L-Glutamina 2 mM. La incubación de las células durante 5 minutos a 37°C en este mismo medio permitió que las mismas consumieran su metionina y cisteína endógenas. Transcurrido ese tiempo, se retiró el medio de la placa y se volvió a incubar durante otros 5 minutos a 37° C, en el mismo medio (DMEM sin metionina ni cisteína) suplementado con emetina (100 µg/ml) para producir una inhibición irreversible de 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**, cuya actividad específica era mayor a 1000 Ci/mmol y tras mezclarlo cuidadosamente dejamos las placas de cultivo en el incubador de CO₂ a 37° C, durante un tiempo de 2h. Este tiempo se denomina pulso, y nos permitirá medir la capacidad de síntesis mitocondrial de proteínas.

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 tiempo, denominado caza, que en nuestro caso se redujo a uno o dos minutos, simplemente para que los ribosomas mitocondriales terminasen de sintetizar las cadenas polipeptídicas empezadas.

Finalmente, las células se tripsinizaron y se centrifugación a 1400 rpm durante 5 min (**Beckman Coulter Allegra X-22**, rotor **SX4250**). El pellet celular resultante se lavó con 1 ml de PBS y tras otra centrifugación se resuspendió en un volumen de tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 7.4, SDS 0.1 %) con inhibidor de proteasas (**Sigma**), adecuado al tamaño de pellet celular (entre 60-100 µl). A continuación, o bien se almacenó el pellet celular a -80° C para su posterior uso o bien se continuó con el procedimiento directamente.

Para romper las membranas celulares se realizaron 5 ciclos de congelación-descongelación (*freeze-thawing*) homogeneizando bien la muestra entre cada ciclo. Tras calcular la cantidad de proteínas totales presentes en cada muestra, el extracto de proteínas se cargó en un gel desnaturante en gradiente como se indica más adelante (apartado 2.26.2).

2.26. Electroforesis de proteínas.

2.26.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

La separación electroforética de las proteínas que se aislaron a partir de cultivos celulares se realizó en geles de poliacrilamida, que permiten la separación de las mismas en función de su peso molecular. Para ello, en esta tesis doctoral se utilizó el método de Laemmli (Laemmli 1970) o SDS-tris-glicina.

Los geles de SDS-tris-glicina (Laemmli 1970) están formados por dos fases que difieren en su función y en su composición. La fase superior, que se conoce como fase de concentración o *stacking* contiene un cantidad de poliacrilamida equivalente al 5 % (p/v). La fase inferior, que se conoce como fase de resolución o *running*, tiene una composición del 10% o 12,5% (p/v) de acrilamida- bisacrilamida. Los geles SDS-TRIS-Glicina realizados durante esta tesis se hicieron utilizando el sistema Mini-PROTEAN® 3 Cell (**Fig. 6.26**).

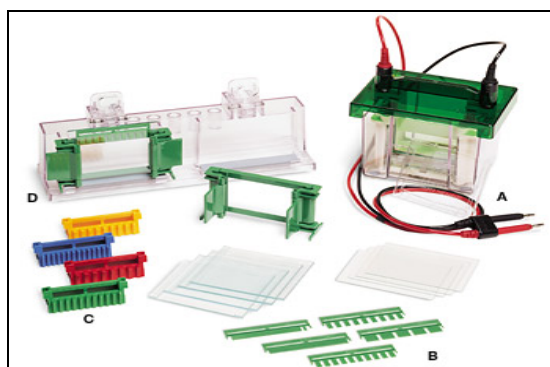


Fig.6.26. Mini-PROTEAN® 3 Cell. Utilizado en la electroforesis de geles de acrilamida en SDS-glicina

A continuación, se resumen las disoluciones necesarias para la realización de estos geles (**tabla 6.22**).

Disolución	Composición
Acrilamida stock	Acrilamida/bisacrilamida 29:1 (30%)
Tampón separador	Tris-HCl 1.5 mM pH 8,8, SDS 0,4 %, EDTA 8 mM
Tampón concentrador	Tris-HCl 0.5 mM pH 6,8, SDS 0,4 %, EDTA 8 mM
Tampón electroforesis 10x	Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%
Tampón de carga 4X	Glicerol 20%, Tris-HCl 0,16 M pH 6,8, EDTA 20mM, SDS 8% , azul de bromofenol 0,4%, β -mercaptoetanol 4%

Tabla 6.22. Composición de las disoluciones necesarias para la electroforesis de proteínas SDS-PAGE.

Para la preparación del gel, se añadió primero la fase del gel separador, cuya composición viene descrita a continuación (**tabla 6.23**).

Componente	10 %	12,5 %
Acrilamida stock	1,7 ml	2,125 ml
Tampón separador 4x	1,25 ml	1,25 ml
SDS 25 %	20 µL	25 µL
Agua	2 ml	1,5 ml
10 % persulfato amónico (APS)	30 µL	30 µL
TEMED (comercial)	5 µL	5 µL

Tabla 6.23. Composición de las disoluciones para la preparación de la fase del gel de separación en la electroforesis de proteínas con SDS-PAGE-glicina. Las cantidades son para espaciadores de 0,75 mm.

La mezcla se añadió en el montaje evitando formar burbujas hasta que llegó a ocupar más o menos $\frac{3}{4}$ partes del montaje. A continuación, añadimos isopropanol para estabilizar el frente del gel y evitar el contacto del mismo con el oxígeno del aire (dificulta la polimerización) y esperamos a que solidificara. Seguidamente retiramos el isopropanol, lavamos los restos 2 o 3 veces con agua destilada y secamos bien el montaje con papel de filtro. Después añadimos la fase del gel concentrador, cuya composición viene descrita en la siguiente tabla (**tabla 6.24**).

Componente	5 %
Acrilamida stock	330 µL
Tampón concentrador 4x	500 µL
SDS 25 %	10 µL
Agua	1,167 ml
10 % persulfato amónico (APS)	20 µL
TEMED (comercial)	5 µL

Tabla 6.24. Cantidad de las disoluciones para la preparación de la fase del gel concentrador en la electroforesis de proteínas con SDS-PAGE-Glicina. Las cantidades son para espaciadores de 0,75 mm.

Tras añadir el volumen necesario de esta fase, se colocó el peine adecuado según nuestro número de muestras. Una vez polimerizado sacamos el peine, se lavaron bien los pocillos con tampón de electroforesis, y se

prepararon las muestras para cargar. Las muestras cuantificadas y preparadas tal y como se explica en el apartado 2.2.19 y 2.22.3 se mezclaron con tampón de carga y se desnaturalizaron durante 10 min a 90° C. A continuación, se cargaron en el gel entre 20 y 50 μg de proteínas totales. La electroforesis se realizó con el tampón de electroforesis 1x a un amperaje constante de 10 mA hasta que las muestras entraron en el gel separador, y a 20 mA el resto del tiempo, hasta que el frente alcanzó la parte inferior del gel.

2.26.2. Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes en gradiente de poliacrilamida.

La separación electroforética de las proteínas mitocondriales sintetizadas *in vivo* se realizó en un gel de gradiente exponencial del 15% al 20%, tal y como ya describió Chomyn (Chomyn 1996). Las disoluciones necesarias para la preparación del gel fueron las mismas que se describieron en la tabla 6.22 del apartado anterior. Sin embargo, para la electroforesis se utilizó el sistema Mini-PROTEAN II xi con cristales de 16x20cm (vidrio interior) y 18,3x20cm (vidrio exterior) y los 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 (tabla 6.25).

Componente	15 %	20 %
Acrilamida stock	12,6 ml	8,6 ml
Gel separador 4x	6,3 ml	3,4 ml
Agua	6,25 ml	1,2ml
APS 10 %	70 μL	40 μL
TEMED (comercial)	12 μL	6 μL

Tabla 6.25. Cantidad de las disoluciones para la preparación de los geles desnaturalizantes en gradiente de poliacrilamida. Las cantidades son para espaciadores de 0,75 mm.

A continuación, se colocaron 14 ml de la disolución de acrilamida al 15% en la cámara 1 del formador de gradiente (la más alejada de la llave de salida)

y 14 ml de la disolución al 20% de acrilamida en la cámara 2 (la más cercana a la llave de salida). La llave intermedia, que permitía la comunicación de líquido entre ambas cámaras permaneció cerrada. Se conectó el formador de gradiente a la bomba peristáltica, a una velocidad de 16 unidades. Cuando la disolución al 20% había recorrido aproximadamente $\frac{3}{4}$ partes de la longitud de la goma, se abrió la llave intermedia, comenzando la formación del gradiente. Se colocó la punta de la goma entre los cristales, tras haber desechado la primera gota de la disolución, y dejamos que se llenara el sistema de líquido. Cuando ya no quedó líquido en el formador de gradiente, añadimos 3 ml más de la disolución al 15% de acrilamida hasta que el líquido alcanzó las $\frac{3}{4}$ partes del sistema. Finalmente, añadimos isopropanol para favorecer la polimerización estabilizar el frente del gel. Una vez polimerizado, se retiró el isopropanol y para eliminar bien los restos del mismo, se realizaron varios lavados con agua destilada. Es recomendable dejar que el gel se estabilice en agua destilada durante toda la noche.

Al día siguiente se eliminó cuidadosamente el agua y se añadió el gel concentrador o *stacking*, cuya composición puede observarse en la siguiente tabla (**tabla 6.26**).

Componente	5 %
Acrilamida stock	1,2 ml
Gel de apilamiento 4x	2,0 ml
SDS 25 %	50 μ L
AGUA	4,7 ml
10 % persulfato amónico (APS)	75 μ L
TEMED (comercial)	20 μ L

Tabla 6.26. Cantidad de las disoluciones para la preparación del gel concentrador en la electroforesis de proteínas en geles desnaturizantes con gradiente de poliacrilamida. Las cantidades son para espaciadores de 0,75 mm.

Una vez polimerizado, se procedió como en los casos anteriores al lavado de los pocillos con tampón de electroforesis y a la carga de las

muestras. En este caso se cargaron entre 40 y 60 μg de proteínas totales. La preparación de las muestras está recogida en el apartado 2.26. La electroforesis se realizó a amperaje constante de 20 mA hasta que las muestras salieron del gel concentrador, y a seguidamente se estableció un amperaje 30 mA hasta media hora después de que el frente saliera del gel. La electroforesis duró aproximadamente unas 5 horas.

Cuando la electroforesis hubo finalizado se procedió a la tinción de gel con azul de Coomassie (ver apartado 2.27) y a continuación se secó (ver apartado 2.28).

2.26.3. Electroforesis en geles nativos: Blue Native.

Los geles nativos en gradiente de poliacrilamida fueron descritos por primera vez por Shägger (Schagger and von Jagow 1991) y permiten la resolución electroforética de complejos proteicos formados por más de una proteína. Esta metodología se puso a punto en 1996 para separar los complejos que componen el sistema de fosforilación oxidativa. Para la preparación del gel necesitamos las siguientes disoluciones “stock”:

- 1 M imidazol
- 1 M imidazol/HCl pH=7
- acrilamida/bisacrilamida 50% (48:1,5)
- Tampón de gel 3X: 1,5 M ácido aminocaproico, 75 mM imidazol/HCl pH=7

Al igual que para los geles desnaturizantes con gradiente de acrilamida, para los geles *Blue Native* se utilizó el sistema Mini Protean II Xi (**Biorad**), utilizando los espaciadores de 0,75 mm.

Prepararemos dos disoluciones, una al 5% y otra al 13% de poliacrilamida con un *stacking* del 4%. Se preparan las diferentes disoluciones necesarias como se indica en la siguiente tabla (**tabla 6.27**).

	Gel 5%	Gel 13%	Stacking
Acrilam/bisacril50%	1,5 ml	3,9 ml	0,8 ml
Tampon Gel 3X	5 ml	5 ml	3,33 ml
Glicerol	-	3gr	-
Agua	Hasta 15 ml	Hasta 15 ml	Hasta 10 ml
TEMED	6 μ l	3 μ l	15 μ l
APS10%	60 μ l	30 μ l	75 μ l

Tabla 6.27. Composición de los distintos geles de la electroforesis de proteínas *Blue Native*. Las cantidades son para espaciadores de 0,75 mm.

A continuación, se colocaron 10 ml de la disolución de acrilamida al 5% en la cámara 1 del formador de gradiente (la más alejada de la llave de salida) y 13 ml de la disolución al 13% de acrilamida en la cámara 2 (la más cercana a la llave de salida). La llave intermedia, que permitía la comunicación de líquido entre ambas cámaras permaneció cerrada. Se conectó el formador de gradiente a la bomba peristáltica, a una velocidad de 16 unidades. Cuando habían entrado 2 ml de la disolución al 13% en el montaje, se abrió la llave intermedia, comenzando la formación del gradiente. Se colocó la punta de la goma entre los cristales, tras haber desechado la primera gota de la disolución, y dejamos que se llene el sistema de líquido. Cuando ya no quedó líquido en el formador de gradiente, añadimos 3 ml más de la disolución al 5% de acrilamida hasta que el líquido alcanzó las $\frac{3}{4}$ partes del sistema. Finalmente, añadimos isopropanol para favorecer la polimerización estabilizar el frente del gel. Una vez polimerizado, se retiró el isopropanol y para eliminar bien los restos del mismo, se realizaron varios lavados con agua destilada. El gel se dejó toda la noche equilibrando en agua destilada. Al día siguiente se preparo el *stacking* tal y como se describe anteriormente (**tabla 6.26**) y se añadió el peine. En el gel se carga un marcador de pesos moleculares *HMW Calibration Kit For Native*

Electrophoresis (Amersham Biosciences) cuyo patrón aparece en la siguiente figura (Fig. 6.27).

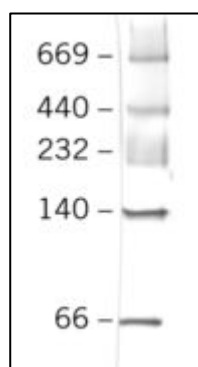


Fig.6.27. Patrón electroforético del marcador de pesos moleculares utilizado en el BN-PAGE

A partir de este momento se trabajó en la cámara fría, para que las bajas temperaturas favorezcan el estado nativo de las proteínas. Se montó el gel en el sistema de electroforesis, vigilando que no se saliera el tampón del cátodo. Se añadió con cuidado el tampón del cátodo A (50 mM Tricina; 7,5 mM imidazol; 0,02% Serva blue G-250) y el tampón del ánodo (25 mM imidazol/HCl pH=7). A continuación, se cargaron las muestras en los pocillos. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100 V hasta que las muestras salieron del stacking y a partir de ese momento, se estableció un voltaje constante de 300 V. Cuando el frente azul había recorrido la mitad del gel se reemplazó el tampón del cátodo A por el B (50 mM Tricina; 7,5 mM imidazol), para intentar minimizar la coloración azul del fondo del gel. Se continuó con la electroforesis hasta que el frente del colorante se escapó.

Por último, se desmonta el sistema y se procede a emplear el gel para sus diferentes usos:

- Determinar la actividad en gel de complejos respiratorios OXPHOS (ver apartado 2.29).
- Transferencia a membranas de PVDF (ver apartado 2.30).

2.27. Tinción de geles de síntesis de proteínas con azul de Coomassie.

Cuando la electroforesis hubo finalizado, se sacó el gel de entre los cristales y se tiñó en una solución de metanol 30%: ácido acético 10% (v/v) a la que se añadió 0,025% de *R Blue* (azul de Coomassie). A continuación se lavó sucesivas veces el gel para desteñirlo, primero con una solución de metanol 30%: ácido acético 10%(v/v) y después con una solución de 50% metanol: 10% ácido acético (v/v). Se realizó una foto del gel para tener el control de carga de todos los carriles. Es importante que en estos pasos el gel quede bien desteñido porque sino el azul de Coomassie interferirá en la emisión radioactiva. Debido a que la solución fijadora redujo el tamaño del gel, este se dejó *overnight* con una solución de metanol 20%: ácido acético 10% (v/v), para que se rehidratara. Una vez desteñido y rehidratado, el gel se sumergió en *amplify* (**Amersham**) durante 30 minutos para potenciar la señal radiactiva de las proteínas y se procedió a su secado (ver apartado 2.28).

2.28. Secado de geles.

Los geles radioactivos se secaron en un secador de geles (**Biorad**) que estaba conectado a una bomba de vacío. Los geles todavía húmedos tras la amplificación de su señal con *Amplify* (**Amersham**), se colocaron sobre un *backing paper* (papel de alto gramaje) y se cubrieron con film transparente, evitando la formación de burbujas. Sobre la lámina porosa del secador se colocó un papel *Whatman*, y sobre éste el *backing paper* con el gel. El secador se conectó a la bomba de vacío y se dejó funcionando durante 1 h y 15 min a 80°C hasta que la superficie del gel estuvo seca.

A continuación, el gel seco se colocó en un cassette (**Kodak**) junto con una placa autorradiográfica *BIOMAX MR Film* (**Kodak**), específica para ^{35}S a -70°C, durante el tiempo necesario para obtener una buena intensidad de la señal (entre 1 y 7 días).

2.29. Medida de actividades enzimáticas de los complejos respiratorios “in gel”.

La actividad catalítica de los complejos del sistema de fosforilación oxidativa se conserva cuando realizamos una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas (BN-PAGE). La combinación de técnicas histoquímicas, que permitan detectar la actividad catalítica de los complejos OXPHOS, con electroforesis *Blue Native* puede aplicarse con buenos resultados para la detección de deficiencias de los complejos respiratorios. Tras la electroforesis, el gel se equilibró con el tampón correspondiente (pero sin los reactivos para la detección catalítica) durante 10 minutos. Seguidamente, cambiamos el tampón por la solución de detección adecuada a cada complejo. Se incubó el tiempo necesario con dicha solución a temperatura ambiente. Se paró la reacción, fijando el gel con 30% metanol y 10% de ácido acético durante 15 minutos. A continuación, pudimos escanear el gel para guardar el resultado. En la siguiente tabla (**tabla 6.28**) se resumen los tampones y los reactivos necesarios para cada complejo realizado en esta tesis doctoral.

Complejo	Buffer	Reactivos
Complejo II	50 mM tampón fosfato pH=7,4	4,5 mM EDTA 84 mM succinato 0,2 mM PMS (metasulfato de fenacina) 2 mg/ml NBT (nitroblue tetrazolium) 10 mM KCN
Complejo IV	50 mM tampón fosfato pH=7,4	1 mg/ml de diaminobenzidina 1 mg/ml citocromo c

Tabla 6.28. Tampones y reactivos necesarios para la determinación de la actividad catalítica en gel de complejos OXPHOS.

2.30. Transferencia a membranas PVDF

Para la transferencia de proteínas a membranas PVDF se utilizó el sistema Transfer-Blot SD (**Biorad**), que es un sistema de transferencia semiseca, en el que tanto el gel como la membrana se equilibran con el tampón

de transferencia, sin necesidad de mantenerlos sumergidos en el mismo mientras dure la transferencia. Una vez terminada la electroforesis, ya sea desnaturizante o en condiciones nativas, se incubó el gel unos 20 min en BSN (Tris 38 mM, Glicina 39 mM, Metanol 20%). Paralelamente se preparó la membrana Hybond™-P (**Amersham**) para la transferencia, para ello se realizaron los siguientes lavados para equilibrarla: 30 s en metanol, 3 min en agua destilada y al menos 15 min en BSN. Cuando ya se habían equilibrado la membrana y el gel en BSN, se realizó el montaje de los elementos necesarios para la transferencia, en el orden que se muestra a en la siguiente figura (**Fig.6.28**).

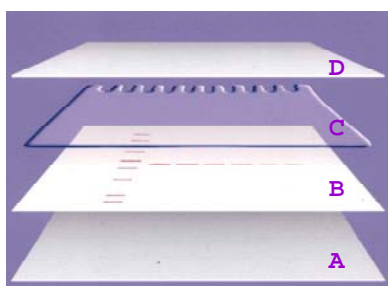


Fig.6.28. Montaje de transferencia semi-seca de proteínas. De abajo arriba: A.3 Papeles Whatman, B. Membrana, C. Gel, D. 3 Papeles Whatman.

La transferencia se realizó a temperatura ambiente a un voltaje constante de 20 V durante el tiempo necesario en función del tamaño del gel. Así, geles pequeños se transfirieron durante 40 min y los grandes 1 h 30 min. A continuación, las proteínas se fijaron a la membrana de PVDF, sumergiéndola durante 10 s en metanol. Seguidamente, la membrana se tiñó con una solución de rojo *Ponceau*, que se une específicamente a las proteínas y nos permitió comprobar la eficacia de la transferencia. Finalmente, la membrana se lavó bien con agua destilada y con PBS, tras lo cual o bien se conservó a 4 °C envuelta en film de plástico hasta su uso, o se continuó con la inmunodetección de proteínas.

2.31. Inmunodetección de proteínas mediante *Western-blot*.

2.31.1. Incubación con 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 en leche desnatada en polvo, por lo que se incubó bien 1 h a temperatura ambiente, o bien *overnight* en la cámara fría. Después se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con PBS-T, para eliminar los restos de la solución de bloqueo, y se incubó con el anticuerpo primario en PBS-T al 1% de leche desnatada en polvo, o bien 1 h a temperatura ambiente o bien *overnight* en la cámara fría.

Transcurrido ese tiempo, se realizaron de nuevo 3 lavados de 10 min con PBS-T, para arrastrar posibles restos de anticuerpo primario. Seguidamente, se incubó la membrana durante 1 hora con el anticuerpo secundario 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 y se procedió a la detección, tal y como se explica en el siguiente apartado. Las concentraciones adecuadas de anticuerpo primario y secundario se muestran en la siguiente tabla (**tabla 6.29**).

	AB Primario (dilución)	Proteína	AB Secundario (dilución)	Origen
Actina	Anti- Acta 1(1/5000)	Actina	Anti-conejo (1/2000)	Sigma
Complejo II	Anti-70 KDa (1/5000)	SDHA	Anti-ratón (1/20000)	Molecular Probes
Complejo IV	Anti-CO1 (1/1000)	p.MT-CO1	Anti-ratón (1/20000)	Molecular Probes
Mt-OXPHOS	Anti-OXPHOS complex kit (1/2000)	OXPHOS subunits	Anti-ratón (1/20000)	MitoSciences

Tabla 6.29. Resumen de anticuerpos primarios, secundarios y diluciones de los mismos empleados para la inmunodetección de proteínas por western-blot.

2.31.2. Detección de proteínas.

La membrana se incubó durante 5 min con el sustrato quimioluminiscente del kit *SuperSignal® West Pico Mouse IgG Detection Kit (Pierce)* y la luminiscencia de dicha reacción se detectó mediante una placa autorradiográfica y su posterior revelado.

2.32. Estudios bioinformáticos.

Durante la presente tesis doctoral se utilizaron diversas aplicaciones bioinformáticas, para completar estudios moleculares y celulares. A continuación se detallarán las mismas, y como se emplearon en los diversos estudios.

2.32.1. Estudios de conservación interespecíficos.

El estudio de la importancia funcional de posiciones concretas dentro de determinados genes, se realizó, analizando el índice de conservación de estas posiciones entre distintas especies. Para ello se recogieron secuencias ya publicadas, de los genes a analizar de www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank .

A continuación estas secuencias se alinearon utilizando el software *ClustalW2*, disponible www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2 .

La herramienta *Consurf*, se utilizó para valorar el índice de conservación de las posiciones estudiadas, teniendo en cuenta la topografía del árbol filogenético. Esta herramienta esta disponible en <http://consurf.tau.ac.il>.

2.32.2. Identificación de secuencias.

Tras la secuenciación de varios genes en líneas celulares no humanas, se confirmó el origen de las mismas utilizando la herramienta *Blast*. A partir de una secuencia génica o proteica, esta aplicación compara la misma con una serie de bases de datos, y obtenemos una lista ordenada según el porcentaje

de coincidencia con nuestra secuencia. *Blast* está disponible en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

2.32.3. Modelado Molecular

El estudio de posibles compensaciones estructurales se realizó con el modelado molecular de proteínas y ácidos nucleicos, utilizando para ello ortólogos bacterianos. En esta tesis doctoral se utilizaron las estructuras 2WDG y 1QYR, correspondientes al ribosoma de *Thermus thermophilus* y a la proteína TFB1 de *Escherichia coli* respectivamente, y obtenidos de <http://www.rcsb.org>.

Para el modelado molecular se utilizaron los programas informáticos *Swiss PDB viewer 4.01* y *RasMol 2.6*.

2.33. Tratamientos estadísticos.

El tratamiento estadístico de los datos se realizó con el programa *STATVIEW* versión 6.0. Varios parámetros estadísticos han sido considerados durante la realización de esta tesis doctoral. En primer lugar se realizó un análisis de la normalidad de todas las variables estudiadas, utilizando para ello el test de *Kolmogorov-Smirnov*. De este modo las variables no normales fueron sometidas a la prueba no paramétrica de *Mann-Whitney*, y las normales fueron comparadas con test *t-student* desapareado de dos colas. Cuando se quiso analizar la dependencia de una variable cuantitativa con una cualitativa se realizó un test *ANOVA*.

En aquellas variables como por ejemplo los experimentos de mezcla, en los que las líneas de partida fueron las mismas y se comparaba un antes y un después utilizamos el test *t-student* pareado. Para estudiar la correlación lineal de dos variables cuantitativas se realizó un test *z-score*. En todos los casos el nivel de significación elegido fue de 0,05.

BIBLIOGRAFÍA

- Achilli, A., A. Olivieri, et al. (2011). "Mitochondrial DNA backgrounds might modulate diabetes complications rather than T2DM as a whole." PLoS One **6**(6): e21029.
- Achilli, A., C. Rengo, et al. (2004). "The molecular dissection of mtDNA haplogroup H confirms that the Franco-Cantabrian glacial refuge was a major source for the European gene pool." Am J Hum Genet **75**(5): 910-918.
- Agarwal, D., S. T. Gregory, et al. (2011). "Error-prone and error-restrictive mutations affecting ribosomal protein S12." J Mol Biol **410**(1): 1-9.
- Alonso-Montes, C., M. G. Castro, et al. (2008). "Mitochondrial transcription factors TFA, TFB1 and TFB2: a search for DNA variants/haplotypes and the risk of cardiac hypertrophy." Dis Markers **25**(3): 131-139.
- Anderson, S., A. T. Bankier, et al. (1981). "Sequence and organization of the human mitochondrial genome." Nature **290**(5806): 457-465.
- Andersson, D. I. (2003). "Persistence of antibiotic resistant bacteria." Curr Opin Microbiol **6**(5): 452-456.
- Andreu, A. L., C. Bruno, et al. (1999). "A nonsense mutation (G15059A) in the cytochrome b gene in a patient with exercise intolerance and myoglobinuria." Ann Neurol **45**(1): 127-130.
- Andreu, A. L., M. G. Hanna, et al. (1999). "Exercise intolerance due to mutations in the cytochrome b gene of mitochondrial DNA." N Engl J Med **341**(14): 1037-1044.
- Andreu, A. L., K. Tanji, et al. (1999). "Exercise intolerance due to a nonsense mutation in the mtDNA ND4 gene." Ann Neurol **45**(6): 820-823.
- Andrews, P. A. and K. D. Albright (1992). "Mitochondrial defects in cis-diamminedichloroplatinum(II)-resistant human ovarian carcinoma cells." Cancer Res **52**(7): 1895-1901.
- Andrews, R. M., I. Kubacka, et al. (1999). "Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA." Nat Genet **23**(2): 147.
- Apodaca, A. A. and R. M. Rakita (2003). "Linezolid-induced lactic acidosis." N Engl J Med **348**(1): 86-87.
- Attassi, K., E. Hershberger, et al. (2002). "Thrombocytopenia associated with linezolid therapy." Clin Infect Dis **34**(5): 695-698.

-
- Auckland, C., L. Teare, et al. (2002). "Linezolid-resistant enterococci: report of the first isolates in the United Kingdom." J Antimicrob Chemother **50**(5): 743-746.
- Auerbach, T., A. Bashan, et al. (2004). "Ribosomal antibiotics: structural basis for resistance, synergism and selectivity." Trends Biotechnol **22**(11): 570-576.
- Azevedo, L., J. Carneiro, et al. (2009). "Epistatic interactions modulate the evolution of mammalian mitochondrial respiratory complex components." BMC Genomics **10**: 266.
- Bacino, C., T. R. Prezant, et al. (1995). "Susceptibility mutations in the mitochondrial small ribosomal RNA gene in aminoglycoside induced deafness." Pharmacogenetics **5**(3): 165-172.
- Bai, U., M. D. Seidman, et al. (1997). "Mitochondrial DNA deletions associated with aging and possibly presbycusis: a human archival temporal bone study." Am J Otol **18**(4): 449-453.
- Bardien, S., H. Human, et al. (2009). "A rapid method for detection of five known mutations associated with aminoglycoside-induced deafness." BMC Med Genet **10**: 2.
- Barrell, B. G., S. Anderson, et al. (1980). "Different pattern of codon recognition by mammalian mitochondrial tRNAs." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(6): 3164-3166.
- Barton-Davis, E. R., L. Cordier, et al. (1999). "Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice." J Clin Invest **104**(4): 375-381.
- Bashan, A., R. Zarivach, et al. (2003). "Ribosomal crystallography: peptide bond formation and its inhibition." Biopolymers **70**(1): 19-41.
- Baudouin, S. V., D. Saunders, et al. (2005). "Mitochondrial DNA and survival after sepsis: a prospective study." Lancet **366**(9503): 2118-2121.
- Belova, L., T. Tenson, et al. (2001). "A novel site of antibiotic action in the ribosome: interaction of evernimicin with the large ribosomal subunit." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(7): 3726-3731.
- Bernstein, W. B., R. F. Trotta, et al. (2003). "Mechanisms for linezolid-induced anemia and thrombocytopenia." Ann Pharmacother **37**(4): 517-520.
- Bindu, L. H. and P. P. Reddy (2008). "Genetics of aminoglycoside-induced and prelingual non-syndromic mitochondrial hearing impairment: a review." Int J Audiol **47**(11): 702-707.

- Bitner-Glindzicz, M., M. Pembrey, et al. (2009). "Prevalence of mitochondrial 1555A-->G mutation in European children." N Engl J Med **360**(6): 640-642.
- Blanc, H., C. W. Adams, et al. (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**(21): 5785-5795.
- Blanchard, S. C., R. L. Gonzalez, et al. (2004). "tRNA selection and kinetic proofreading in translation." Nat Struct Mol Biol **11**(10): 1008-1014.
- Boles, R. G. and P. Friedlich (2010). "Should patients be screened for 12S rRNA mutations before treatment with aminoglycosides?" Mitochondrion **10**(4): 391-392.
- Bonneux, S., E. Fransen, et al. (2011). "Inherited mitochondrial variants are not a major cause of age-related hearing impairment in the European population." Mitochondrion **11**(5): 729-734.
- Borovinskaya, M. A., S. Shoji, et al. (2007). "A steric block in translation caused by the antibiotic spectinomycin." ACS Chem Biol **2**(8): 545-552.
- Bottger, E. C. (2007). "Antimicrobial agents targeting the ribosome: the issue of selectivity and toxicity - lessons to be learned." Cell Mol Life Sci **64**(7-8): 791-795.
- Bottger, E. C., B. Springer, et al. (2001). "Structural basis for selectivity and toxicity of ribosomal antibiotics." EMBO Rep **2**(4): 318-323.
- Bowmaker, M., M. Y. Yang, et al. (2003). "Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone." J Biol Chem **278**(51): 50961-50969.
- Bozdogan, B. and P. C. Appelbaum (2004). "Oxazolidinones: activity, mode of action, and mechanism of resistance." Int J Antimicrob Agents **23**(2): 113-119.
- Bressler, A. M., S. M. Zimmer, et al. (2004). "Peripheral neuropathy associated with prolonged use of linezolid." Lancet Infect Dis **4**(8): 528-531.
- Bruno, C., A. Martinuzzi, et al. (1999). "A stop-codon mutation in the human mtDNA cytochrome c oxidase I gene disrupts the functional structure of complex IV." Am J Hum Genet **65**(3): 611-620.
- Bruno, C., F. M. Santorelli, et al. (2003). "Progressive exercise intolerance associated with a new muscle-restricted nonsense mutation (G142X) in the mitochondrial cytochrome b gene." Muscle Nerve **28**(4): 508-511.

-
- Burke, J. F. and A. E. Mogg (1985). "Suppression of a nonsense mutation in mammalian cells in vivo by the aminoglycoside antibiotics G-418 and paromomycin." Nucleic Acids Res **13**(17): 6265-6272.
- Byers, P. H. (2002). "Killing the messenger: new insights into nonsense-mediated mRNA decay." J Clin Invest **109**(1): 3-6.
- Campos, Y., A. Garcia-Redondo, et al. (2001). "Early-onset multisystem mitochondrial disorder caused by a nonsense mutation in the mitochondrial DNA cytochrome C oxidase II gene." Ann Neurol **50**(3): 409-413.
- Campos, Y., A. Garcia, et al. (2002). "Cosegregation of the mitochondrial DNA A1555G and G4309A mutations results in deafness and mitochondrial myopathy." Muscle Nerve **25**(2): 185-188.
- Carelli, V., A. Achilli, et al. (2006). "Haplogroup effects and recombination of mitochondrial DNA: novel clues from the analysis of Leber hereditary optic neuropathy pedigrees." Am J Hum Genet **78**(4): 564-574.
- Carelli, V., F. N. Ross-Cisneros, et al. (2002). "Optic nerve degeneration and mitochondrial dysfunction: genetic and acquired optic neuropathies." Neurochem Int **40**(6): 573-584.
- Carson, J., J. Cerda, et al. (2007). "Severe lactic acidosis associated with linezolid use in a patient with the mitochondrial DNA A2706G polymorphism." Pharmacotherapy **27**(5): 771-774.
- Casano, R. A., D. F. Johnson, et al. (1999). "Inherited susceptibility to aminoglycoside ototoxicity: genetic heterogeneity and clinical implications." Am J Otolaryngol **20**(3): 151-156.
- Cavalier-Smith, T. (1987). "Eukaryotes with no mitochondria." Nature **326**(6111): 332-333.
- Cavdar Koc, E., A. Ranasinghe, et al. (2001). "A new face on apoptosis: death-associated protein 3 and PDCD9 are mitochondrial ribosomal proteins." FEBS Lett **492**(1-2): 166-170.
- Clayton, D. A. (1982). "Replication of animal mitochondrial DNA." Cell **28**(4): 693-705.
- Coenen, M. J., H. Antonicka, et al. (2004). "Mutant mitochondrial elongation factor G1 and combined oxidative phosphorylation deficiency." N Engl J Med **351**(20): 2080-2086.

- Cotney, J., S. E. McKay, et al. (2009). "Elucidation of separate, but collaborative functions of the rRNA methyltransferase-related human mitochondrial transcription factors B1 and B2 in mitochondrial biogenesis reveals new insight into maternally inherited deafness." Hum Mol Genet **18**(14): 2670-2682.
- Cruickshanks, K. J., T. L. Wiley, et al. (1998). "Prevalence of hearing loss in older adults in Beaver Dam, Wisconsin. The Epidemiology of Hearing Loss Study." Am J Epidemiol **148**(9): 879-886.
- Chen, G., X. Wang, et al. (2011). "Prevalence of A1555G mitochondrial mutation in Chinese newborns and the correlation with neonatal hearing screening." Int J Pediatr Otorhinolaryngol **75**(4): 532-534.
- Chen, J., H. Yuan, et al. (2008). "Mutations at position 7445 in the precursor of mitochondrial tRNA(Ser(UCN)) gene in three maternal Chinese pedigrees with sensorineural hearing loss." Mitochondrion **8**(4): 285-292.
- Chen, J. C., T. C. Tsai, et al. (2007). "Acute hearing loss in a patient with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS)." Acta Neurol Taiwan **16**(3): 168-172.
- Chen, J. M., P. A. Williamson, et al. (1996). "Topical gentamicin-induced hearing loss: a mitochondrial ribosomal RNA study of genetic susceptibility." Am J Otol **17**(6): 850-852.
- Chiappini, E., C. Conti, et al. (2010). "Clinical efficacy and tolerability of linezolid in pediatric patients: a systematic review." Clin Ther **32**(1): 66-88.
- Chomyn, A. (1996). "In vivo labeling and analysis of human mitochondrial translation products." Methods Enzymol **264**: 197-211.
- Chomyn, A., S. T. Lai, et al. (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.
- Chomyn, A., A. Martinuzzi, et al. (1992). "MELAS mutation in mtDNA binding site for transcription termination factor causes defects in protein synthesis and in respiration but no change in levels of upstream and downstream mature transcripts." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(10): 4221-4225.
- Chomyn, A., G. Meola, et al. (1991). "In vitro genetic transfer of protein synthesis and respiration defects to mitochondrial DNA-less cells with myopathy-patient mitochondria." Mol Cell Biol **11**(4): 2236-2244.

-
- Christian, B. E. and L. L. Spremulli (2009). "Evidence for an active role of IF3mt in the initiation of translation in mammalian mitochondria." Biochemistry **48**(15): 3269-3278.
- Chrzanowska-Lightowlers, Z. M., A. Pajak, et al. (2011). "Termination of protein synthesis in mammalian mitochondria." J Biol Chem **286**(40): 34479-34485.
- D'Aurelio, M., F. Pallotti, et al. (2001). "In vivo regulation of oxidative phosphorylation in cells harboring a stop-codon mutation in mitochondrial DNA-encoded cytochrome c oxidase subunit I." J Biol Chem **276**(50): 46925-46932.
- Dahmani, Y., A. Marcuello, et al. (2006). "Mitochondrial lineages distribution in the Spanish population: anticipating association studies." An. R. Acad. Nac. Farm. **72**: 37-47.
- Dai, P., W. Yang, et al. (2004). "Correlation of cochlear blood supply with mitochondrial DNA common deletion in presbycusis." Acta Otolaryngol **124**(2): 130-136.
- de Duve, C. (2007). "The origin of eukaryotes: a reappraisal." Nat Rev Genet **8**(5): 395-403.
- De Vriese, A. S., R. V. Coster, et al. (2006). "Linezolid-induced inhibition of mitochondrial protein synthesis." Clin Infect Dis **42**(8): 1111-1117.
- Denslow, N. D., J. C. Anders, et al. (1991). "Bovine mitochondrial ribosomes possess a high affinity binding site for guanine nucleotides." J Biol Chem **266**(15): 9586-9590.
- DiMauro, S. and E. A. Schon (2001). "Mitochondrial DNA mutations in human disease." Am J Med Genet **106**(1): 18-26.
- Doersen, C. J. and E. J. Stanbridge (1979). "Cytoplasmic inheritance of erythromycin resistance in human cells." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4549-4553.
- Dryden, M. S. (2011). "Linezolid pharmacokinetics and pharmacodynamics in clinical treatment." J Antimicrob Chemother **66 Suppl 4**: iv7-iv15.
- Dubin, D. T., J. Montoya, et al. (1982). "Sequence analysis and precise mapping of the 3' ends of HeLa cell mitochondrial ribosomal RNAs." J Mol Biol **157**(1): 1-19.
- Elston, T., H. Wang, et al. (1998). "Energy transduction in ATP synthase." Nature **391**(6666): 510-513.

- Emelyanov, V. V. (2001). "Rickettsiaceae, rickettsia-like endosymbionts, and the origin of mitochondria." Biosci Rep **21**(1): 1-17.
- Falkenberg, M., M. Gaspari, et al. (2002). "Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA." Nat Genet **31**(3): 289-294.
- 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.
- Fan-Minogue, H. and D. M. Bedwell (2008). "Eukaryotic ribosomal RNA determinants of aminoglycoside resistance and their role in translational fidelity." RNA **14**(1): 148-157.
- Fan, W., K. G. Waymire, et al. (2008). "A mouse model of mitochondrial disease reveals germline selection against severe mtDNA mutations." Science **319**(5865): 958-962.
- Feder, J., O. Ovadia, et al. (2009). "Parental diabetes status reveals association of mitochondrial DNA haplogroup J1 with type 2 diabetes." BMC Med Genet **10**: 60.
- Fernandez-Vizarra, E., V. Tiranti, et al. (2009). "Assembly of the oxidative phosphorylation system in humans: what we have learned by studying its defects." Biochim Biophys Acta **1793**(1): 200-211.
- Fischel-Ghodsian, N. (1999). "Genetic factors in aminoglycoside toxicity." Ann N Y Acad Sci **884**: 99-109.
- Fischel-Ghodsian, N., Y. Bykhovskaya, et al. (1997). "Temporal bone analysis of patients with presbycusis reveals high frequency of mitochondrial mutations." Hear Res **110**(1-2): 147-154.
- Fischel-Ghodsian, N., T. R. Prezant, et al. (1993). "Mitochondrial ribosomal RNA gene mutation in a patient with sporadic aminoglycoside ototoxicity." Am J Otolaryngol **14**(6): 399-403.
- Fisher, R. P. and D. A. Clayton (1985). "A transcription factor required for promoter recognition by human mitochondrial RNA polymerase. Accurate initiation at the heavy- and light-strand promoters dissected and reconstituted in vitro." J Biol Chem **260**(20): 11330-11338.
- Forge, A. and J. Schacht (2000). "Aminoglycoside antibiotics." Audiol Neurootol **5**(1): 3-22.
- Fridovich, I. (1999). "Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen?" Ann N Y Acad Sci **893**: 13-18.

-
- Gallardo, M. E., P. Garcia-Pavia, et al. (2011). "Mitochondrial haplogroups associated with end-stage heart failure and coronary allograft vasculopathy in heart transplant patients." Eur Heart J.
- Garrabou, G., A. Soriano, et al. (2007). "Reversible inhibition of mitochondrial protein synthesis during linezolid-related hyperlactatemia." Antimicrob Agents Chemother **51**(3): 962-967.
- Garrido, N., L. Griparic, et al. (2003). "Composition and dynamics of human mitochondrial nucleoids." Mol Biol Cell **14**(4): 1583-1596.
- Garza-Ramos, G., L. Xiong, et al. (2001). "Binding site of macrolide antibiotics on the ribosome: new resistance mutation identifies a specific interaction of ketolides with rRNA." J Bacteriol **183**(23): 6898-6907.
- Gaynor, M. and A. S. Mankin (2003). "Macrolide antibiotics: binding site, mechanism of action, resistance." Curr Top Med Chem **3**(9): 949-961.
- Giles, R. E., H. Blanc, et al. (1980). "Maternal inheritance of human mitochondrial DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(11): 6715-6719.
- Giordano, C., F. Pallotti, et al. (2002). "Pathogenesis of the deafness-associated A1555G mitochondrial DNA mutation." Biochem Biophys Res Commun **293**(1): 521-529.
- Gluzman, Y. (1981). "SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants." Cell **23**(1): 175-182.
- Gomez-Duran, A., D. Pacheu-Grau, et al. (2010). "Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups." Hum Mol Genet **19**(17): 3343-3353.
- Guan, M. X. (2004). "Molecular pathogenetic mechanism of maternally inherited deafness." Ann N Y Acad Sci **1011**: 259-271.
- Guan, M. X. (2011). "Mitochondrial 12S rRNA mutations associated with aminoglycoside ototoxicity." Mitochondrion **11**(2): 237-245.
- Guan, M. X., N. Fischel-Ghodsian, et al. (2001). "Nuclear background determines biochemical phenotype in the deafness-associated mitochondrial 12S rRNA mutation." Hum Mol Genet **10**(6): 573-580.
- Guan, M. X., Q. Yan, et al. (2006). "Mutation in TRMU related to transfer RNA modification modulates the phenotypic expression of the deafness-associated mitochondrial 12S ribosomal RNA mutations." Am J Hum Genet **79**(2): 291-302.
- Hainrichson, M., I. Nudelman, et al. (2008). "Designer aminoglycosides: the race to develop improved antibiotics and compounds for the treatment of human genetic diseases." Org Biomol Chem **6**(2): 227-239.

- Han, D., P. Dai, et al. (2007). "The mitochondrial tRNA(Ala) T5628C variant may have a modifying role in the phenotypic manifestation of the 12S rRNA C1494T mutation in a large Chinese family with hearing loss." Biochem Biophys Res Commun **357**(2): 554-560.
- Hanna, M. G., I. P. Nelson, et al. (1998). "Cytochrome c oxidase deficiency associated with the first stop-codon point mutation in human mtDNA." Am J Hum Genet **63**(1): 29-36.
- Hansen, J. L., J. A. Ippolito, et al. (2002). "The structures of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit." Mol Cell **10**(1): 117-128.
- Hao, H., L. E. Morrison, et al. (1999). "Suppression of a mitochondrial tRNA gene mutation phenotype associated with changes in the nuclear background." Hum Mol Genet **8**(6): 1117-1124.
- Hawkins, J. E., Jr., W. C. Stebbins, et al. (1977). "The patas monkey as a model for dihydrostreptomycin ototoxicity." Acta Otolaryngol **83**(1-2): 123-129.
- Hein, L. K., M. Bawden, et al. (2004). "alpha-L-iduronidase premature stop codons and potential read-through in mucopolysaccharidosis type I patients." J Mol Biol **338**(3): 453-462.
- Hermann, T. (2007). "Aminoglycoside antibiotics: old drugs and new therapeutic approaches." Cell Mol Life Sci **64**(14): 1841-1852.
- Hobbie, S. N., S. Akshay, et al. (2008). "Genetic analysis of interactions with eukaryotic rRNA identify the mitoribosome as target in aminoglycoside ototoxicity." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(52): 20888-20893.
- Holbrook, J. A., G. Neu-Yilik, et al. (2004). "Nonsense-mediated decay approaches the clinic." Nat Genet **36**(8): 801-808.
- Horvath, R., C. Scharfe, et al. (2002). "Childhood onset mitochondrial myopathy and lactic acidosis caused by a stop mutation in the mitochondrial cytochrome c oxidase III gene." J Med Genet **39**(11): 812-816.
- Horvath, R., B. G. Schoser, et al. (2005). "Mutations in mtDNA-encoded cytochrome c oxidase subunit genes causing isolated myopathy or severe encephalomyopathy." Neuromuscul Disord **15**(12): 851-857.
- Hudson, G., V. Carelli, et al. (2007). "Clinical expression of Leber hereditary optic neuropathy is affected by the mitochondrial DNA-haplogroup background." Am J Hum Genet **81**(2): 228-233.
- Hutchinson, D. K. (2003). "Oxazolidinone antibacterial agents: a critical review." Curr Top Med Chem **3**(9): 1021-1042.

-
- Hyslop, S. J., A. M. James, et al. (1997). "The effect on mitochondrial function of the tRNA Ser(UCN)/COI A7445G mtDNA point mutation associated with maternally-inherited sensorineural deafness." Biochem Mol Biol Int **42**(3): 567-575.
- Inoue, K., D. Takai, et al. (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**(3): 496-501.
- Jonckheere, A. I., M. Hogeveen, et al. (2008). "A novel mitochondrial ATP8 gene mutation in a patient with apical hypertrophic cardiomyopathy and neuropathy." J Med Genet **45**(3): 129-133.
- Jones, C. N., K. A. Wilkinson, et al. (2008). "Lack of secondary structure characterizes the 5' ends of mammalian mitochondrial mRNAs." RNA **14**(5): 862-871.
- Karadimas, C. L., P. Greenstein, et al. (2000). "Recurrent myoglobinuria due to a nonsense mutation in the COX I gene of mitochondrial DNA." Neurology **55**(5): 644-649.
- Kasamatsu, H. and J. Vinograd (1974). "Replication of circular DNA in eukaryotic cells." Annu Rev Biochem **43**(0): 695-719.
- Keightley, J. A., R. Anitori, et al. (2000). "Mitochondrial encephalomyopathy and complex III deficiency associated with a stop-codon mutation in the cytochrome b gene." Am J Hum Genet **67**(6): 1400-1410.
- Kellermayer, R. (2006). "Translational readthrough induction of pathogenic nonsense mutations." Eur J Med Genet **49**(6): 445-450.
- Kern, A. D. and F. A. Kondrashov (2004). "Mechanisms and convergence of compensatory evolution in mammalian mitochondrial tRNAs." Nat Genet **36**(11): 1207-1212.
- King, M. P., Y. Koga, et al. (1992). "Defects in mitochondrial protein synthesis and respiratory chain activity segregate with the tRNA(Leu(UUR)) mutation associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes." Mol Cell Biol **12**(2): 480-490.
- Kofoed, C. B. and B. Vester (2002). "Interaction of avilamycin with ribosomes and resistance caused by mutations in 23S rRNA." Antimicrob Agents Chemother **46**(11): 3339-3342.
- Kokotas, H., M. Grigoriadou, et al. (2011). "Detection of deafness-causing mutations in the Greek mitochondrial genome." Dis Markers **30**(6): 283-289.

- Kondrashov, A. S., S. Sunyaev, et al. (2002). "Dobzhansky-Muller incompatibilities in protein evolution." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(23): 14878-14883.
- Kong, Q. P., Y. G. Yao, et al. (2003). "Phylogeny of east Asian mitochondrial DNA lineages inferred from complete sequences." Am J Hum Genet **73**(3): 671-676.
- Kruse, B., N. Narasimhan, et al. (1989). "Termination of transcription in human mitochondria: identification and purification of a DNA binding protein factor that promotes termination." Cell **58**(2): 391-397.
- Kupka, S., T. Toth, et al. (2002). "Mutation A1555G in the 12S rRNA gene and its epidemiological importance in German, Hungarian, and Polish patients." Hum Mutat **19**(3): 308-309.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lamantea, E., F. Carrara, et al. (2002). "A novel nonsense mutation (Q352X) in the mitochondrial cytochrome b gene associated with a combined deficiency of complexes I and III." Neuromuscul Disord **12**(1): 49-52.
- Larsson, N. G. (2010). "Somatic mitochondrial DNA mutations in mammalian aging." Annu Rev Biochem **79**: 683-706.
- Legros, F., E. Chatzoglou, et al. (2001). "Functional characterization of novel mutations in the human cytochrome b gene." Eur J Hum Genet **9**(7): 510-518.
- Legros, F., F. Malka, et al. (2004). "Organization and dynamics of human mitochondrial DNA." J Cell Sci **117**(Pt 13): 2653-2662.
- Li, C. H., Y. W. Cheng, et al. (2010). "Chloramphenicol causes mitochondrial stress, decreases ATP biosynthesis, induces matrix metalloproteinase-13 expression, and solid-tumor cell invasion." Toxicol Sci **116**(1): 140-150.
- Li, R., J. H. Greinwald, Jr., et al. (2004). "Molecular analysis of the mitochondrial 12S rRNA and tRNASer(UCN) genes in paediatric subjects with non-syndromic hearing loss." J Med Genet **41**(8): 615-620.
- Li, R., G. Xing, et al. (2004). "Cosegregation of C-insertion at position 961 with the A1555G mutation of the mitochondrial 12S rRNA gene in a large Chinese family with maternally inherited hearing loss." Am J Med Genet A **124A**(2): 113-117.

-
- Li, Z., R. Li, et al. (2005). "Mutational analysis of the mitochondrial 12S rRNA gene in Chinese pediatric subjects with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss." Hum Genet **117**(1): 9-15.
- Liao, H. X. and L. L. Spremulli (1990). "Identification and initial characterization of translational initiation factor 2 from bovine mitochondria." J Biol Chem **265**(23): 13618-13622.
- Long, K. S., C. Munck, et al. (2010). "Mutations in 23S rRNA at the peptidyl transferase center and their relationship to linezolid binding and cross-resistance." Antimicrob Agents Chemother **54**(11): 4705-4713.
- Lorente, L., M. M. Martin, et al. (2011). "Platelet cytochrome c oxidase activity and quantity in septic patients." Crit Care Med **39**(6): 1289-1294.
- Lu, J., Y. Qian, et al. (2010). "Mitochondrial haplotypes may modulate the phenotypic manifestation of the deafness-associated 12S rRNA 1555A>G mutation." Mitochondrion **10**(1): 69-81.
- Luca, C. C., B. L. Lam, et al. (2004). "Erythromycin as a potential precipitating agent in the onset of Leber's hereditary optic neuropathy." Mitochondrion **4**(1): 31-36.
- Lukacs, G. L. and P. R. Durie (2003). "Pharmacologic approaches to correcting the basic defect in cystic fibrosis." N Engl J Med **349**(15): 1401-1404.
- Ma, J., M. A. Farwell, et al. (1995). "Cloning and sequence analysis of the cDNA for bovine mitochondrial translational initiation factor 2." Biochim Biophys Acta **1261**(2): 321-324.
- Maassen, J. A., J. J. Jansen, et al. (1996). "The molecular basis and clinical characteristics of Maternally Inherited Diabetes and Deafness (MIDD), a recently recognized diabetic subtype." Exp Clin Endocrinol Diabetes **104**(3): 205-211.
- Macaulay, V., M. Richards, et al. (1999). "The emerging tree of West Eurasian mtDNAs: a synthesis of control-region sequences and RFLPs." Am J Hum Genet **64**(1): 232-249.
- Maisnier-Patin, S., W. Paulander, et al. (2007). "Compensatory evolution reveals functional interactions between ribosomal proteins S12, L14 and L19." J Mol Biol **366**(1): 207-215.
- Mancuso, M., M. Filosto, et al. (2003). "Mitochondrial myopathy and complex III deficiency in a patient with a new stop-codon mutation (G339X) in the cytochrome b gene." J Neurol Sci **209**(1-2): 61-63.

- Manwaring, N., M. M. Jones, et al. (2007). "Mitochondrial DNA haplogroups and age-related hearing loss." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **133**(9): 929-933.
- Markaryan, A., E. G. Nelson, et al. (2009). "Quantification of the mitochondrial DNA common deletion in presbycusis." Laryngoscope **119**(6): 1184-1189.
- Marroquin, L. D., J. Hynes, et al. (2007). "Circumventing the Crabtree effect: replacing media glucose with galactose increases susceptibility of HepG2 cells to mitochondrial toxicants." Toxicol Sci **97**(2): 539-547.
- Martin, W. and M. Muller (1998). "The hydrogen hypothesis for the first eukaryote." Nature **392**(6671): 37-41.
- Maruszak, A., K. Safranow, et al. (2011). "The impact of mitochondrial and nuclear DNA variants on late-onset Alzheimer's disease risk." J Alzheimers Dis **27**(1): 197-210.
- McAlpine, D. and B. M. Johnstone (1990). "The ototoxic mechanism of cisplatin." Hear Res **47**(3): 191-203.
- McFarland, R., J. L. Elson, et al. (2004). "Assigning pathogenicity to mitochondrial tRNA mutations: when "definitely maybe" is not good enough." Trends Genet **20**(12): 591-596.
- McKee, E. E., M. Ferguson, et al. (2006). "Inhibition of mammalian mitochondrial protein synthesis by oxazolidinones." Antimicrob Agents Chemother **50**(6): 2042-2049.
- Metodiev, M. D., N. Lesko, et al. (2009). "Methylation of 12S rRNA is necessary for in vivo stability of the small subunit of the mammalian mitochondrial ribosome." Cell Metab **9**(4): 386-397.
- Michikawa, Y., F. Mazzucchelli, et al. (1999). "Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication." Science **286**(5440): 774-779.
- Miller, C., A. Saada, et al. (2004). "Defective mitochondrial translation caused by a ribosomal protein (MRPS16) mutation." Ann Neurol **56**(5): 734-738.
- Mishmar, D., E. Ruiz-Pesini, et al. (2003). "Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(1): 171-176.
- Mizutani, S., Y. Miyato, et al. (2009). "Mutations in the mitochondrial genome confer resistance of cancer cells to anticancer drugs." Cancer Sci **100**(9): 1680-1687.

-
- Mohlke, K. L., A. U. Jackson, et al. (2005). "Mitochondrial polymorphisms and susceptibility to type 2 diabetes-related traits in Finns." Hum Genet **118**(2): 245-254.
- Montoya, J. and G. Attardi (1986). "ADN mitocondrial humano." Investigación y ciencia **118**: 60-69.
- Montoya, J., T. Christianson, et al. (1982). "Identification of initiation sites for heavy-strand and light-strand transcription in human mitochondrial DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(23): 7195-7199.
- Montoya, J., G. L. Gaines, et al. (1983). "The pattern of transcription of the human mitochondrial rRNA genes reveals two overlapping transcription units." Cell **34**(1): 151-159.
- Montoya, J., E. Lopez-Gallardo, et al. (2009). "20 years of human mtDNA pathologic point mutations: carefully reading the pathogenicity criteria." Biochim Biophys Acta **1787**(5): 476-483.
- Montoya, J., E. Lopez-Gallardo, et al. (2009). "Diseases of the human mitochondrial oxidative phosphorylation system." Adv Exp Med Biol **652**: 47-67.
- Montoya, J., M. J. Lopez-Perez, et al. (2006). "Mitochondrial DNA transcription and diseases: past, present and future." Biochim Biophys Acta **1757**(9-10): 1179-1189.
- Morales Angulo, C., J. Gallo-Teran, et al. (2011). "[Prevalence of the A1555G MTDNA mutation in sporadic hearing-impaired patients without known history of aminoglycoside treatment]." Acta Otorrinolaringol Esp **62**(2): 83-86.
- Moreno-Loshuertos, R., G. Ferrin, et al. (2011). "Evolution meets disease: penetrance and functional epistasis of mitochondrial tRNA mutations." PLoS Genet **7**(4): e1001379.
- Morton, C. C. (2002). "Genetics, genomics and gene discovery in the auditory system." Hum Mol Genet **11**(10): 1229-1240.
- Nadanaciva, S., J. H. Willis, et al. (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.
- Nagao, A. and T. Suzuki (2007). "Aminoacyl-tRNA surveillance by EF-Tu in mammalian mitochondria." Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)(51): 41-42.
- Nagiec, E. E., L. Wu, et al. (2005). "Oxazolidinones inhibit cellular proliferation via inhibition of mitochondrial protein synthesis." Antimicrob Agents Chemother **49**(9): 3896-3902.

- Nahili, H., M. Charif, et al. (2010). "Prevalence of the mitochondrial A 1555G mutation in Moroccan patients with non-syndromic hearing loss." Int J Pediatr Otorhinolaryngol **74**(9): 1071-1074.
- Neefs, J. M., Y. Van de Peer, et al. (1993). "Compilation of small ribosomal subunit RNA structures." Nucleic Acids Res **21**(13): 3025-3049.
- Noji, H. and M. Yoshida (2001). "The rotary machine in the cell, ATP synthase." J Biol Chem **276**(3): 1665-1668.
- Nozaki, Y., N. Matsunaga, et al. (2008). "HMRF1L is a human mitochondrial translation release factor involved in the decoding of the termination codons UAA and UAG." Genes Cells **13**(5): 429-438.
- 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'Brien, T. W., B. J. O'Brien, et al. (2005). "Nuclear MRP genes and mitochondrial disease." Gene **354**: 147-151.
- O'Connor, M., E. A. De Stasio, et al. (1991). "Interaction between 16S ribosomal RNA and ribosomal protein S12: differential effects of paromomycin and streptomycin." Biochimie **73**(12): 1493-1500.
- O'Farrell, H. C., J. N. Scarsdale, et al. (2004). "Crystal structure of KsgA, a universally conserved rRNA adenine dimethyltransferase in Escherichia coli." J Mol Biol **339**(2): 337-353.
- Ogle, J. M., A. P. Carter, et al. (2003). "Insights into the decoding mechanism from recent ribosome structures." Trends Biochem Sci **28**(5): 259-266.
- Ogle, J. M., F. V. Murphy, et al. (2002). "Selection of tRNA by the ribosome requires a transition from an open to a closed form." Cell **111**(5): 721-732.
- Ojala, D., J. Montoya, et al. (1981). "tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria." Nature **290**(5806): 470-474.
- Pacheu-Grau, D., A. Gomez-Duran, et al. (2011). "'Progress' renders detrimental an ancient mitochondrial DNA genetic variant." Hum Mol Genet.
- Pacheu-Grau, D., A. Gomez-Duran, et al. (2010). "Mitochondrial pharmacogenomics: barcode for antibiotic therapy." Drug Discov Today **15**(1-2): 33-39.

-
- Pacheu-Grau, D., A. Gomez-Duran, et al. (2010). "Influence of mtDNA genetic variation on antibiotic therapy." Pharmacogenomics **11**(9): 1185-1187.
- Palenzuela, L., N. M. Hahn, et al. (2005). "Does linezolid cause lactic acidosis by inhibiting mitochondrial protein synthesis?" Clin Infect Dis **40**(12): e113-116.
- Pape, T., W. Wintermeyer, et al. (2000). "Conformational switch in the decoding region of 16S rRNA during aminoacyl-tRNA selection on the ribosome." Nat Struct Biol **7**(2): 104-107.
- Patuzzi, R. B., G. K. Yates, et al. (1989). "Outer hair cell receptor current and sensorineural hearing loss." Hear Res **42**(1): 47-72.
- Pereira, L., M. Richards, et al. (2005). "High-resolution mtDNA evidence for the late-glacial resettlement of Europe from an Iberian refugium." Genome Res **15**(1): 19-24.
- Perelman, P., W. E. Johnson, et al. (2011). "A molecular phylogeny of living primates." PLoS Genet **7**(3): e1001342.
- Perez-Martinez, X., S. Funes, et al. (2008). "Protein synthesis and assembly in mitochondrial disorders." Curr Top Med Chem **8**(15): 1335-1350.
- Perez Delgado, L., J. Fraile-Rodrigo, et al. (2011). "Intratympanic gentamicin in ménière's disease: our experience." Journal of Laryngology & Otology
- Peters, U., S. Preisler-Adams, et al. (2003). "Sequence variations of mitochondrial DNA and individual sensitivity to the ototoxic effect of cisplatin." Anticancer Res **23**(2B): 1249-1255.
- Petropoulos, A. D., E. C. Kouvela, et al. (2009). "Time-resolved binding of azithromycin to Escherichia coli ribosomes." J Mol Biol **385**(4): 1179-1192.
- Phillips-Jones, M. K., L. S. Hill, et al. (1995). "Context effects on misreading and suppression at UAG codons in human cells." Mol Cell Biol **15**(12): 6593-6600.
- Pietromonaco, S. F., R. A. Hessler, et al. (1986). "Evolution of proteins in mammalian cytoplasmic and mitochondrial ribosomes." J Mol Evol **24**(1-2): 110-117.
- Pioletti, M., F. Schlunzen, et al. (2001). "Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3." EMBO J **20**(8): 1829-1839.
- Podratz, J. L., A. M. Knight, et al. (2011). "Cisplatin induced Mitochondrial DNA damage in dorsal root ganglion neurons." Neurobiol Dis **41**(3): 661-668.

- Polacek, N. and A. S. Mankin (2005). "The ribosomal peptidyl transferase center: structure, function, evolution, inhibition." Crit Rev Biochem Mol Biol **40**(5): 285-311.
- Pontzer, H., D. A. Raichlen, et al. (2010). "Metabolic adaptation for low energy throughput in orangutans." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(32): 14048-14052.
- Postal, M., B. Palodeto, et al. (2009). "C1494T mitochondrial DNA mutation, hearing loss, and aminoglycosides antibiotics." Braz J Otorhinolaryngol **75**(6): 884-887.
- Poulet, F. M., R. Veneziale, et al. (2005). "Ziracin-induced congenital urogenital malformations in female rats." Toxicol Pathol **33**(3): 320-328.
- Prezant, T. R., J. V. Agapian, et al. (1993). "Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness." Nat Genet **4**(3): 289-294.
- Pulkes, T., D. Liolitsa, et al. (2005). "Nonsense mutations in mitochondrial DNA associated with myalgia and exercise intolerance." Neurology **64**(6): 1091-1092.
- Regula, G., K. Torriani, et al. (2009). "Prescription patterns of antimicrobials in veterinary practices in Switzerland." J Antimicrob Chemother **63**(4): 805-811.
- Repetto, G., A. del Peso, et al. (2008). "Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity." Nat Protoc **3**(7): 1125-1131.
- Riccardi, C. and I. Nicoletti (2006). "Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry." Nat Protoc **1**(3): 1458-1461.
- Richter, R., A. Pajak, et al. (2010). "Translation termination in human mitochondrial ribosomes." Biochem Soc Trans **38**(6): 1523-1526.
- Robberson, D. L., H. Kasamatsu, et al. (1972). "Replication of mitochondrial DNA. Circular replicative intermediates in mouse L cells." Proc Natl Acad Sci U S A **69**(3): 737-741.
- Robinson, B. H., R. Petrova-Benedict, et al. (1992). "Nonviability of cells with oxidative defects in galactose medium: a screening test for affected patient fibroblasts." Biochem Med Metab Biol **48**(2): 122-126.
- Rodriguez-Ballesteros, M., M. Olarte, et al. (2006). "Molecular and clinical characterisation of three Spanish families with maternally inherited non-syndromic hearing loss caused by the 1494C->T mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene." J Med Genet **43**(11): e54.

-
- Rodriguez-Fonseca, C., R. Amils, et al. (1995). "Fine structure of the peptidyl transferase centre on 23 S-like rRNAs deduced from chemical probing of antibiotic-ribosome complexes." J Mol Biol **247**(2): 224-235.
- Roostalu, U., I. Kutuev, et al. (2007). "Origin and expansion of haplogroup H, the dominant human mitochondrial DNA lineage in West Eurasia: the Near Eastern and Caucasian perspective." Mol Biol Evol **24**(2): 436-448.
- Rosa, A., B. V. Fonseca, et al. (2008). "Mitochondrial haplogroup H1 is protective for ischemic stroke in Portuguese patients." BMC Med Genet **9**: 57.
- Ruiz-Pesini, E., A. C. Lapena, et al. (2000). "Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility." Am J Hum Genet **67**(3): 682-696.
- Ruiz-Pesini, E., M. T. Lott, et al. (2007). "An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny." Nucleic Acids Res **35**(Database issue): D823-828.
- Ruiz-Pesini, E., D. Mishmar, et al. (2004). "Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA." Science **303**(5655): 223-226.
- Saada, A., A. Shaag, et al. (2007). "Antenatal mitochondrial disease caused by mitochondrial ribosomal protein (MRPS22) mutation." J Med Genet **44**(12): 784-786.
- Sagan, L. (1967). "On the origin of mitosing cells." J Theor Biol **14**(3): 255-274.
- Savelsbergh, A., M. V. Rodnina, et al. (2009). "Distinct functions of elongation factor G in ribosome recycling and translocation." RNA **15**(5): 772-780.
- 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.
- Scheunemann, A. E., W. D. Graham, et al. (2010). "Binding of aminoglycoside antibiotics to helix 69 of 23S rRNA." Nucleic Acids Res **38**(9): 3094-3105.
- Schlunzen, F., C. Takemoto, et al. (2006). "The antibiotic kasugamycin mimics mRNA nucleotides to destabilize tRNA binding and inhibit canonical translation initiation." Nat Struct Mol Biol **13**(10): 871-878.
- Schlunzen, F., R. Zarivach, et al. (2001). "Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria." Nature **413**(6858): 814-821.

- Seidel-Rogol, B. L., V. McCulloch, et al. (2003). "Human mitochondrial transcription factor B1 methylates ribosomal RNA at a conserved stem-loop." Nat Genet **33**(1): 23-24.
- Shah, Z. H., K. M. O'Dell, et al. (1997). "Metazoan nuclear genes for mitoribosomal protein S12." Gene **204**(1-2): 55-62.
- Shah, Z. H., M. Toompuu, et al. (2001). "Novel coding-region polymorphisms in mitochondrial seryl-tRNA synthetase (SARSM) and mitoribosomal protein S12 (RPMS12) genes in DFNA4 autosomal dominant deafness families." Hum Mutat **17**(5): 433-434.
- Sharma, M. R., E. C. Koc, et al. (2003). "Structure of the mammalian mitochondrial ribosome reveals an expanded functional role for its component proteins." Cell **115**(1): 97-108.
- Shinabarger, D. L., K. R. Marotti, et al. (1997). "Mechanism of action of oxazolidinones: effects of linezolid and eperezolid on translation reactions." Antimicrob Agents Chemother **41**(10): 2132-2136.
- Shoffner, J. M., M. T. Lott, et al. (1990). "Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation." Cell **61**(6): 931-937.
- Shutt, T. E. and G. S. Shadel (2010). "A compendium of human mitochondrial gene expression machinery with links to disease." Environ Mol Mutagen **51**(5): 360-379.
- Sirum-Connolly, K., J. M. Peltier, et al. (1995). "Implications of a functional large ribosomal RNA with only three modified nucleotides." Biochimie **77**(1-2): 30-39.
- Sligh, J. E., S. E. Levy, et al. (2000). "Maternal germ-line transmission of mutant mtDNAs from embryonic stem cell-derived chimeric mice." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(26): 14461-14466.
- Smits, P., J. Smeitink, et al. (2010). "Mitochondrial translation and beyond: processes implicated in combined oxidative phosphorylation deficiencies." J Biomed Biotechnol **2010**: 737385.
- Soleimanpour-Lichaei, H. R., I. Kuhl, et al. (2007). "mtRF1a is a human mitochondrial translation release factor decoding the major termination codons UAA and UAG." Mol Cell **27**(5): 745-757.
- Soriano, A., O. Miro, et al. (2005). "Mitochondrial toxicity associated with linezolid." N Engl J Med **353**(21): 2305-2306.

-
- Spirina, O., Y. Bykhovskaya, et al. (2000). "Heart-specific splice-variant of a human mitochondrial ribosomal protein (mRNA processing; tissue specific splicing)." Gene **261**(2): 229-234.
- Springer, M. S., L. J. Hollar, et al. (1995). "Compensatory substitutions and the evolution of the mitochondrial 12S rRNA gene in mammals." Mol Biol Evol **12**(6): 1138-1150.
- Swaney, S. M., H. Aoki, et al. (1998). "The oxazolidinone linezolid inhibits initiation of protein synthesis in bacteria." Antimicrob Agents Chemother **42**(12): 3251-3255.
- Sylvester, J. E., N. Fischel-Ghodsian, et al. (2004). "Mitochondrial ribosomal proteins: candidate genes for mitochondrial disease." Genet Med **6**(2): 73-80.
- Talaska, A. E., J. Schacht, et al. (2006). "Molecular and genetic aspects of aminoglycoside-induced hearing loss." Drug Discov. Today Dis. Mech. **3**: 119-124.
- Tanaka, M., V. M. Cabrera, et al. (2004). "Mitochondrial genome variation in eastern Asia and the peopling of Japan." Genome Res **14**(10A): 1832-1850.
- Temperley, R., R. Richter, et al. (2010). "Hungry codons promote frameshifting in human mitochondrial ribosomes." Science **327**(5963): 301.
- Tenson, T., M. Lovmar, et al. (2003). "The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome." J Mol Biol **330**(5): 1005-1014.
- Tenson, T. and A. Mankin (2006). "Antibiotics and the ribosome." Mol Microbiol **59**(6): 1664-1677.
- Thyagarajan, D., S. Bressman, et al. (2000). "A novel mitochondrial 12SrRNA point mutation in parkinsonism, deafness, and neuropathy." Ann Neurol **48**(5): 730-736.
- Tiranti, V., A. Savoia, et al. (1997). "Identification of the gene encoding the human mitochondrial RNA polymerase (h-mtRPOL) by cyberscreening of the Expressed Sequence Tags database." Hum Mol Genet **6**(4): 615-625.
- Torrioni, A., F. Cruciani, et al. (1999). "The A1555G mutation in the 12S rRNA gene of human mtDNA: recurrent origins and founder events in families affected by sensorineural deafness." Am J Hum Genet **65**(5): 1349-1358.
- Tsuboi, M., H. Morita, et al. (2009). "EF-G2mt is an exclusive recycling factor in mammalian mitochondrial protein synthesis." Mol Cell **35**(4): 502-510.

- Tzagoloff, A., D. H. MacLennan, et al. (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**(9): 2051-2061.
- Valente, L., V. Tiranti, et al. (2007). "Infantile encephalopathy and defective mitochondrial DNA translation in patients with mutations of mitochondrial elongation factors EFG1 and EFTu." Am J Hum Genet **80**(1): 44-58.
- Van den Bogert, C., T. E. Melis, et al. (1989). "Mitochondrial biogenesis during the activation of lymphocytes by mitogens: the immunosuppressive action of tetracyclines." J Leukoc Biol **46**(2): 128-133.
- van den Ouweland, J. M., H. H. Lemkes, et al. (1994). "Maternally inherited diabetes and deafness is a distinct subtype of diabetes and associates with a single point mutation in the mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) gene." Diabetes **43**(6): 746-751.
- Vandebona, H., P. Mitchell, et al. (2009). "Prevalence of mitochondrial 1555A-->G mutation in adults of European descent." N Engl J Med **360**(6): 642-644.
- Vicens, Q. and E. Westhof (2002). "Crystal structure of a complex between the aminoglycoside tobramycin and an oligonucleotide containing the ribosomal decoding a site." Chem Biol **9**(6): 747-755.
- Vila-Sanjurjo, A., Y. Lu, et al. (2007). "Modulation of 16S rRNA function by ribosomal protein S12." Biochim Biophys Acta **1769**(7-8): 462-471.
- Vila-Sanjurjo, A., C. L. Squires, et al. (1999). "Isolation of kasugamycin resistant mutants in the 16 S ribosomal RNA of Escherichia coli." J Mol Biol **293**(1): 1-8.
- Walsted, A. (2001). "Unpredictable hearing loss after intratympanic gentamicin treatment for vertigo. A new theory." Acta Otolaryngol **121**(1): 42-44.
- Wallace, D. C., M. D. Brown, et al. (1999). "Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease." Gene **238**(1): 211-230.
- Wang, C. Y., Q. P. Kong, et al. (2006). "mtDNA mutation C1494T, haplogroup A, and hearing loss in Chinese." Biochem Biophys Res Commun **348**(2): 712-715.
- Wang, G., Y. Yuan, et al. (2011). "[Analysis of positive rate of common genetic mutations in 1448 cases with different hearing phenotype]." Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi **25**(10): 445-448.
- Wang, Q., Q. Z. Li, et al. (2006). "Clinical and molecular analysis of a four-generation Chinese family with aminoglycoside-induced and

- nonsyndromic hearing loss associated with the mitochondrial 12S rRNA C1494T mutation." Biochem Biophys Res Commun **340**(2): 583-588.
- Wang, X., J. Lu, et al. (2008). "Mitochondrial tRNAThr G15927A mutation may modulate the phenotypic manifestation of ototoxic 12S rRNA A1555G mutation in four Chinese families." Pharmacogenet Genomics **18**(12): 1059-1070.
- Wilcox, M. H. (2005). "Update on linezolid: the first oxazolidinone antibiotic." Expert Opin Pharmacother **6**(13): 2315-2326.
- Wilson, D. N. (2009). "The A-Z of bacterial translation inhibitors." Crit Rev Biochem Mol Biol **44**(6): 393-433.
- Wilson, D. N., J. M. Harms, et al. (2005). "Species-specific antibiotic-ribosome interactions: implications for drug development." Biol Chem **386**(12): 1239-1252.
- Wilson, D. N., F. Schluenzen, et al. (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.
- Wittig, I., H. P. Braun, et al. (2006). "Blue native PAGE." Nat Protoc **1**(1): 418-428.
- Xing, G., Z. Chen, et al. (2006). "Maternally inherited non-syndromic hearing loss associated with mitochondrial 12S rRNA A827G mutation in a Chinese family." Biochem Biophys Res Commun **344**(4): 1253-1257.
- Xing, G., Z. Chen, et al. (2006). "Mitochondrial 12S rRNA A827G mutation is involved in the genetic susceptibility to aminoglycoside ototoxicity." Biochem Biophys Res Commun **346**(4): 1131-1135.
- Yarham, J. W., J. L. Elson, et al. (2010). "Mitochondrial tRNA mutations and disease." Wiley Interdiscip Rev RNA **1**(2): 304-324.
- Yasukawa, T., M. Y. Yang, et al. (2005). "A bidirectional origin of replication maps to the major noncoding region of human mitochondrial DNA." Mol Cell **18**(6): 651-662.
- Yonath, A. (2009). "Large facilities and the evolving ribosome, the cellular machine for genetic-code translation." J R Soc Interface **6 Suppl 5**: S575-585.
- Yuan, H., J. Chen, et al. (2007). "Coexistence of mitochondrial 12S rRNA C1494T and CO1/tRNA(Ser(UCN)) G7444A mutations in two Han

- Chinese pedigrees with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss." Biochem Biophys Res Commun **362**(1): 94-100.
- Yunis, A. A. (1989). "Chloramphenicol toxicity: 25 years of research." Am J Med **87**(3N): 44N-48N.
- Zhang, Y. and L. L. Spremulli (1998). "Identification and cloning of human mitochondrial translational release factor 1 and the ribosome recycling factor." Biochim Biophys Acta **1443**(1-2): 245-250.
- Zhao, H., R. Li, et al. (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, et al. (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.
- Zhao, S. Y., H. J. Zhao, et al. (2005). "[Establishment of Immortal Lymphoblastoid Cell Lines of Non-syndromic Deafness Family and Several Methods fro Transforming Human B Lyphocyte by EB virus.]" Yi Chuan **27**(3): 447-450.
- Zhu, Y., Y. Qian, et al. (2006). "Aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss is associated with the G7444A mutation in the mitochondrial COI/tRNASer(UCN) genes in two Chinese families." Biochem Biophys Res Commun **342**(3): 843-850.
- Zingman, L. V., S. Park, et al. (2007). "Aminoglycoside-induced translational read-through in disease: overcoming nonsense mutations by pharmacogenetic therapy." Clin Pharmacol Ther **81**(1): 99-103.

ANEXO

Ficha de datos de las sorderas

Apellidos..... Nombre.....
 N°Historia Afiliación.....
 Sexo..... Edad..... Domicilio.....
 Población..... Teléfono.....

Presbiacusia Ototóxicos Familiares no sindrómicas
 Trauma acústico Otras

Antecedentes familiares

Indicar parentesco

Vía materna

Vía paterna

Sordera.....
 Alzheimer.....
 Parkinson.....
 Diabetes.....
 HTA.....
 Esclerosis múltiple.....
 Ceguera.....
 Migrañas.....
 Otras.....

Antecedentes personales

Alzheimer..... Parkinson.....
 Diabetes..... Diabetes gestacional.....
 Ceguera..... HTA.....
 Migrañas..... Esclerosis múltiple.....
 Ttos con aminoglucósidos..... Año..... Tipo..... Motivo.....
 Ttos con citostáticos..... Año..... Tipo..... Motivo.....
 Exposición a ruidos..... Tabaco..... Alcohol.....
 Otros.....

Clínica

Sordera: Inicio..... Progresiva..... Discriminación.....
 Acúfeno..... Unilateral Bilateral
 Vértigos..... Patología ótica asociada.....

0	250	500	1000	2000	4000	6000	8000
10							
20							
30							
40							
50							
60							
70							
80							
90							
100							

0	250	500	1000	2000	4000	6000	8000
10							
20							
30							
40							
50							
60							
70							
80							
90							
100							

OIDO DERECHO

OIDO IZQUIERDO

‘Progress’ renders detrimental an ancient mitochondrial DNA genetic variant

David Pacheu-Grau^{1,2}, Aurora Gómez-Durán^{1,2}, Ester López-Gallardo^{1,2}, Tomàs Pinós^{2,3}, Antoni L. Andreu^{2,3}, Manuel J. López-Pérez^{1,2}, Julio Montoya^{1,2} and Eduardo Ruiz-Pesini^{1,2,4,*}

¹Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain, ²Centro de Investigaciones Biomédicas en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Zaragoza and Barcelona, Spain, ³Departament de Patologia Mitochondrial i Neuromuscular, Institut de Recerca, Hospital Universitari Vall d’Hebron, Barcelona, Spain, and ⁴Fundación ARAID, Zaragoza, Spain

Received July 22, 2011; Revised and Accepted August 4, 2011

A human mitochondrial DNA (mtDNA) transition, m.1555A>G, in the 12S rRNA gene causes non-syndromic hearing loss. However, this pathological mutation is the wild-type allele in orangutan mtDNA. Here we rule out different genetic factors as the reason for its fixation in orangutans and show that aminoglycosides negatively affect the oxidative phosphorylation function by decreasing the synthesis of mtDNA-encoded proteins and the amount and activity of respiratory complex IV. These drugs also diminish the growth rate of orangutan cells. The m.1555G nucleotide is also the wild-type allele in other mammal species and they might be at risk of suffering a mitochondrial disorder if treated with aminoglycosides. Therefore, pharmacogenomic approaches should be used to confirm this possibility. These observations are important for human health. Due to the fact that old age and high frequency are criteria widely used in mitochondrial medicine to rule out a genetic change as being a pathological mutation, our results prevent against simplistic genetic approaches that do not consider the potential effect of environmental conditions. Hence, these results suggest that some ancient and highly frequent human population polymorphisms, such as those defining mtDNA haplogroups, in mitochondrial rRNA genes can be deleterious in association with new environmental conditions. Therefore, as the discovery of ribosomal antibiotics has allowed to fight infectious diseases and this breakthrough can be considered an important scientific advance or ‘progress’, our results suggest that ‘progress’ can also have a negative counterpart and render detrimental many of these mtDNA genotypes.

INTRODUCTION

The human mitochondrial DNA (mtDNA) m.1555A>G transition in the 12S ribosomal RNA (rRNA) gene (*MT-RNR1*) was first reported as causing non-syndromic hearing loss (1) and, since then, it has been frequently associated to this pathological condition (2). Beside this, transmitochondrial cell lines or cytoplasmic hybrids (cybrids), produced by transferring mitochondria from homoplasmic mutant patients to cells without mtDNA (rho0 cells), had decreased mitochondrial protein synthesis and oxygen consumption and increased the cell-doubling time when compared with cybrids without this mutation (3). Because 12S rRNA is required for the expression of the 13

mtDNA-encoded polypeptides of the oxidative phosphorylation system (OXPHOS), which is the major oxygen consumer of the cell, and because mitochondrial energy is important for cell division, these results confirmed the pathogenicity of this mutation. However, the m.1555G allele appears to be the wild-type allele in orangutan (*Pongo* spp.) mtDNA (4–6) (Fig. 1) and, apparently, they do not show hearing problems (7–9). Thus, some mtDNA rare mutations, such as human m.1555G, are etiologic factors for very severe diseases and highly frequent polymorphisms, such as orangutan m.1555G, have not phenotypical effects.

Phenotypes depend on the interaction of genetic background and environment. The genetic makeup of humanity has changed

*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: eduruiz@unizar.es

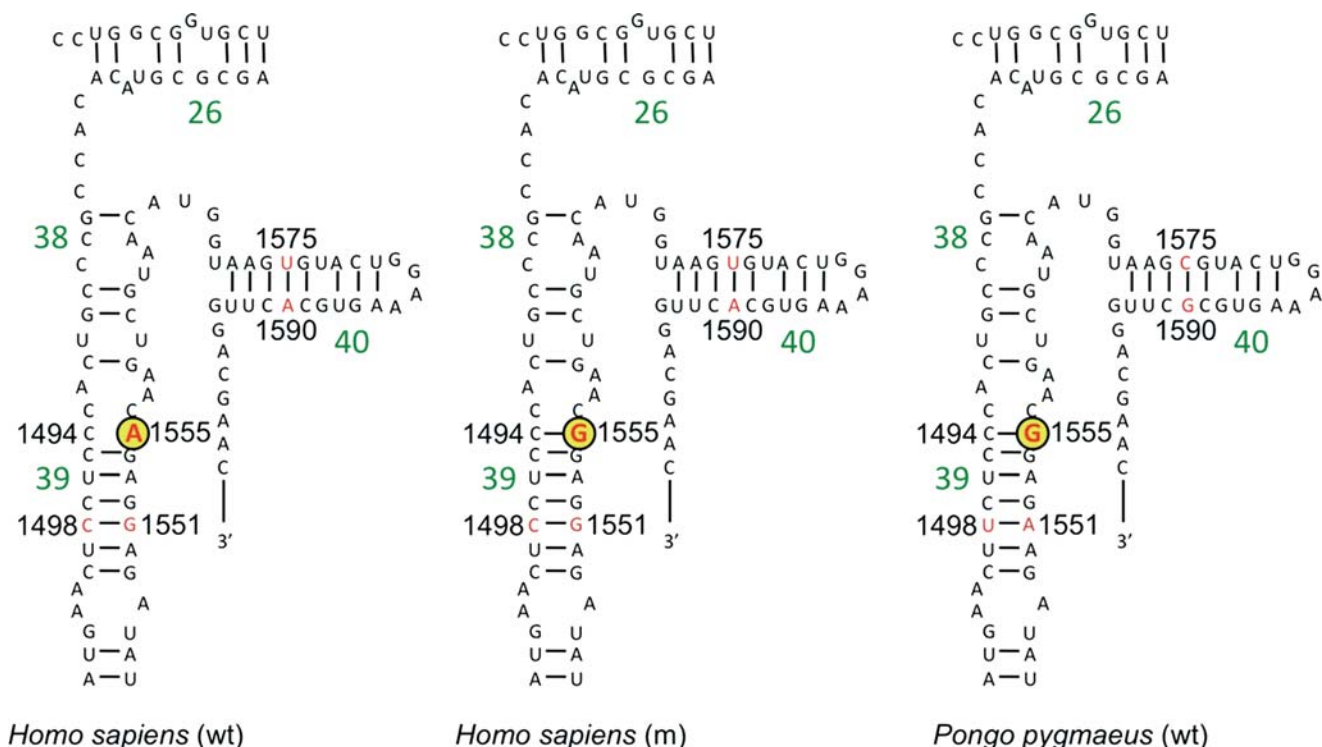


Figure 1. Mitochondrial 12S rRNA decoding site from human and orangutan. A transition (m.1555A>G) in the yellow-encircled nucleotide position is a human pathological mutation (1). Bornean orangutan mtDNA has compensatory mutations in those nucleotide positions marked in red. Sumatran orangutan has a guanine at m.1551, but it has compensated the mutation in helix 40. Nucleotide positions are based on human numeration. Wt and m represent wild-type and mutant alleles, respectively. Green numbers denote helix numbering (55).

little during the last 10 000 years. As an example, major European mtDNA haplogroups (phylogenetically related mtDNA genotypes) were already present in Europe at that time (10). However, in recent times, our lifestyle has been transformed to the point that there is now a mismatch between our ancient genetic constitution and certain aspects of our daily lives. These rapid changes have far outpaced any possible genetic adaptation. Therefore, this discordance can act as a promoter of the so-called diseases of civilization (11). Mitochondria are unintended off targets of different therapeutical drugs (12,13) and other natural and commercial xenobiotics, such as pesticides, can affect mitochondrial function. For example, over 60 different families of compounds are known to inhibit respiratory complex I (14). Thus, environmental changes associated to 'progress', through new interactions with the mitochondrial genome, might affect individual health status.

Here, we explore the reasons for the fixation of the m.1555A>G pathological mutation in the orangutan mitochondrial genome and, to analyze interactions between new environmental stresses and ancient mtDNA makeups, we use orangutan cells as a model of an ancient mtDNA genetic variant and aminoglycosides as an example of a new environmental factor. We have found that the exposition to these ribosomal antibiotics renders detrimental the orangutan mtDNA genotype. Our results suggest that some ancient and highly frequent human population polymorphisms in mitochondrial rRNA genes, such as those defining mtDNA haplogroups, can be deleterious in association with new environmental conditions.

RESULTS

Several hypotheses have been advanced to explain the fixation of human pathological mutations in closely related species, such as a recent founder effect, the inefficiency of natural selection due to post-reproductive phenotypes or the presence of compensatory mutations (15).

Orangutan m.1555A>G transition is an ancient mutation

To rule out m.1555G as an error in the orangutan reference sequence, a private polymorphism or a recent founder effect, we collected the *MT-RNR1* reference sequences for Bornean (*Pongo pygmaeus*) and Sumatran orangutans (*Pongo abelii*) (4,5) as well as 15 partial sequences from both species (16). The 17 sequences have guanine in this position (Fig. 2A). These results rule out this mutation as a sequencing error or a recent mutation because the two species diverged ~400 000 years ago (17).

Negative selection is acting on nucleotide position m.1555

The inefficiency of natural selection that is due to a post-reproductive phenotype can also be ruled out as the reason for the fixation because 53 out of 55 deaf individuals from the Israeli-Arab pedigree, where this mutation was first found, became deaf in infancy or early childhood (1,18). Perhaps mitochondrial deafness due to this pathological mutation is a male-specific phenotype and, because mtDNA is inherited exclusively by maternal lineage (19), natural selection does

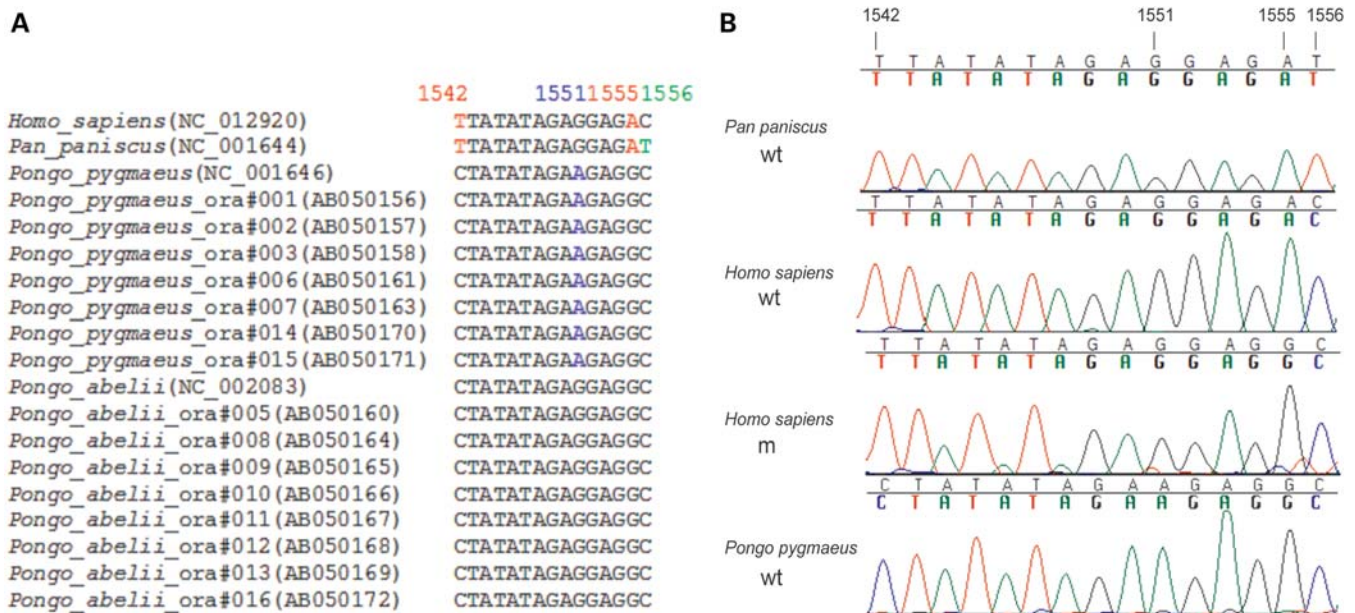


Figure 2. MtDNA sequence variation in primates. Numbers in red, green and blue colors indicate differences among sequences from human/bonobo and orangutan, human/orangutan and bonobo and orangutan species, respectively. Numbers refer to human numeration. (A) Alignment of a segment from human (56), bonobo (4) and 17 orangutan *MT-RNR1* sequences (4,5,16). Genbank codes are in brackets. (B) Electropherograms from a segment of *MT-RNR1* from human, bonobo and orangutan cells. Wt and m represent wild-type and mutant alleles, respectively.

not affect its population frequency (20). However, 26 of those 53 deaf individuals from the Israeli-Arab pedigree were female (18). In any case, these observations do not confirm the action of natural selection on this mtDNA genetic variant. It has recently been found that orangutans use less energy relative to body mass than nearly any eutherian mammal, including sedentary humans. This slow life history of orangutans results from decreased energy throughput (21). It is possible that this physiological adaptation was accompanied by a mutational relaxation in mtDNA-encoded OXPHOS genes. To test this possibility, we checked in the orangutan mtDNA 40 mitochondrial tRNA (mt-tRNA) and 2 mitochondrial rRNA (mt-rRNA) human pathologic mutations (1,22,23). Only two (i.e. m.1555A>G/*MT-RNR1* and m.5703G>A/*MT-TN*) were the wild-type allele in orangutans. However, the tRNA mutation was probably compensated by another m.5687C>T/*MT-TN* transition (Supplementary Material, Fig. S1). Additionally, the m.1555A position is conserved in 306 [conservation index (CI) = 96.8%] of 316 mammal species examined but the mean CI of 20 positions separated by 50 nucleotides along the *MT-RNR1* gene (positions m.648, m.698, m.748 and so on) is 70.2% (Supplementary Material, Fig. S2). Moreover, using the ConSurf tool (<http://consurf.tau.ac.il>) which calculates CI while taking into account the topology of the phylogenetic tree, we obtained a CI = 8, being 9 completely conserved. These results suggest that negative selection is indeed acting on the orangutan mtDNA-encoded OXPHOS genes and in particular on nucleotide position m.1555.

Compensatory mutations do not appear to be the cause for the fixation of m.1555G in orangutan mtDNA

Compensatory mutations have been hypothesized as a probable explanation for many of the fixations of mtDNA-encoded

protein (24) and tRNA (25) disease mutations. Compensatory mutations are also frequently found in mtDNA-encoded rRNAs (26). However, despite the existence of compensatory mutations at helices 39 and 40 of the decoding site from the orangutan rRNA, the pathologic m.1555A>G mutation has not been compensated by an m.1494C>T transition (Fig. 1).

Mitochondrial ribosomal protein S12 (MRPS12) is a critical component of the decoding center (27) and compensatory interactions between ribosomal proteins and rRNA variants have already been reported (28). We analyzed human and orangutan MRPS12 sequences and observed only two differences in the mature proteins. Human R18 and R60 amino acids correspond to Q18 and Q60 amino acids in orangutan (Supplementary Material, Fig. S3A). However, these positions do not interact with the rRNA mutant nucleotide in a reconstruction of bacterial ribosomes (29) (Fig. 3A). Therefore, intra- and inter-gene structural compensatory mutations do not appear to be the cause of the fixation of the m.1555G pathological mutation.

A functional compensation has been recently proposed to explain the population survival of a homoplasmic mt-tRNA pathologic mutation (30). The m.1555A>G mutation causes 12S rRNA hypermethylation at mtDNA positions m.1583A and m.1584A, induces a faulty retrograde mitochondrial biogenesis signal and predisposes cells to stress-induced cell death (31). Therefore, a less active orangutan mitochondrial rRNA methyltransferase (MTFB1) might functionally compensate for the rRNA mutation. After comparing human and orangutan MTFB1, we only found one difference in a protein motif required for these methylations (32) (Supplementary Material, Fig. S3B). However, this amino acid is not interacting with the rRNA helix that includes the methylated adenines (Fig. 3B).

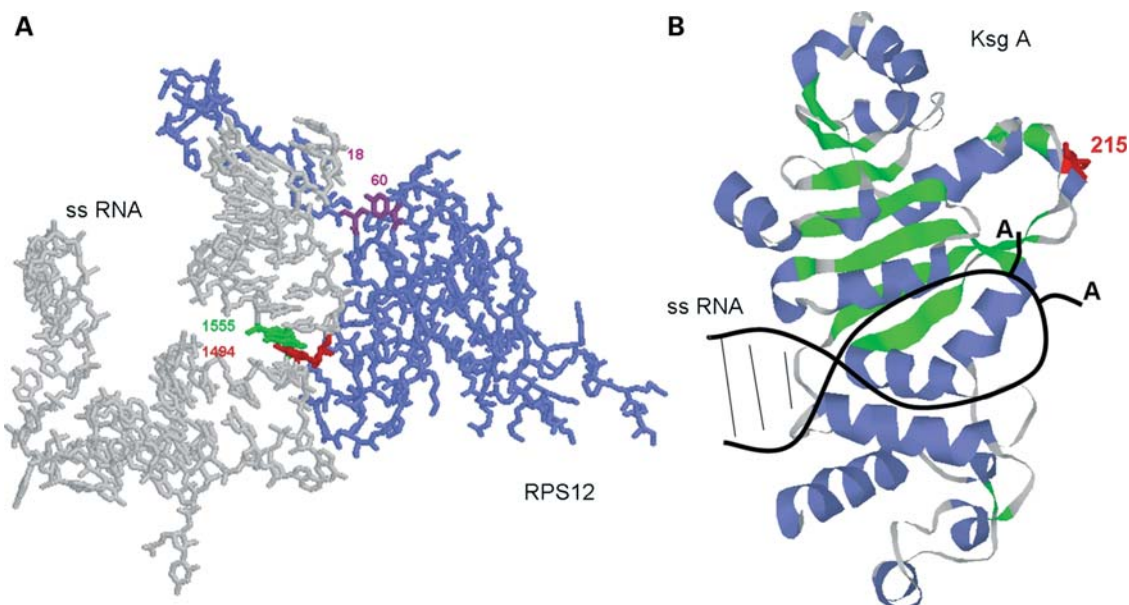


Figure 3. Interactions between ribosomal proteins and small subunit rRNA. (A) Interaction between the ribosomal protein S12 and the small subunit rRNA. Molecular view of small subunit rRNA (ss rRNA) (grey)/ribosomal protein S12 (RPS12) (blue) interaction in the *Thermus thermophilus* ribosome. The mitochondrial 12S rRNA nucleotides (1494 and 1555, red and green, respectively) and the MRPS12 amino acids (18 and 60, shown in pink) have been located in this bacterial structure. (B) Interaction between the ortholog of the mitochondrial rRNA methyltransferase (MTFB1) and the small subunit rRNA. Molecular view of small subunit rRNA (ss rRNA)/Ksg A rRNA methyltransferase (Ksg A) interaction in *Escherichia coli*. The 12S rRNA m.1583A and m.1584A nucleotides and the amino acid at MTFB1 position 215 have been modeled after this bacterial structure.

Other genes less related to the 12S rRNA could be responsible for the fixation. Thus, the A10S mutation in mitochondrial 5-methylaminomethyl-2-thiouridylate-methyltransferase (TRMU) leads to a marked failure in mt-tRNA metabolism and contribute to the impairment of mitochondrial protein synthesis, then aggravating the mitochondrial dysfunction associated to the m.1555G mutation (33). However, orangutan and human harbor the same amino acid at this position (Supplementary Material, Fig. S3C). Hence, a functional compensatory mutation does not appear to be the reason for the fixation of the pathological m.1555G mutation.

Although they diverged between 12 and 16 million years ago, human and orangutan genomes are 97.4% similar and these genes related to 12S rRNA function do not show substantial differences among these species. Bornean and Sumatran Orangutans diverged 400 000 years ago and they are similar in a 99.7% (17). Their genomes have remained very stable during this time. Therefore, although we cannot completely rule out potential genetic compensations, our results suggest that the absence of the phenotypical effect of the m.1555G pathological mutation probably does not depend on the interaction with other genetic factors.

Aminoglycosides negatively affect OXPHOS function in orangutan cells

Since none of the previously advanced hypotheses seems to explain the fixation of this pathological mutation in orangutan, it is possible that the m.1555G position does not have complete penetrance and requires a co-factor to become pathological (3). In fact, antibiotic aminoglycosides trigger

hearing loss in individuals harboring this mutation (1), and their effects have been confirmed in cybrid cell lines. Thus, mitochondrial translation in a HeLa cybrid clone repopulated with the homoplasmic mutation showed a high susceptibility to streptomycin (34) and, despite there were no differences in mitochondrial protein synthesis, cytochrome oxidase activity, oxygen consumption and ATP synthesis between homoplasmic mutant and isogenic control osteosarcoma 143B cybrids, mutant cybrids grew less in the presence of aminoglycosides (35).

The m.1555 equivalent position in the bacterial rRNA (16S rRNA) forms a Watson–Crick base pair with nucleotide 1494, which is important for aminoglycoside binding. Human wild-type mitochondrial 12S rRNA lacks this base pair, but it is rebuilt by the m.1555G mutation (Fig. 1). Thus, human mutant and orangutan wild-type mt-rRNAs are more similar to the bacterial rRNA and favor aminoglycoside binding, which can produce toxic-side effects.

A clue about the effect of aminoglycosides on orangutan cells came from studies with inter-species cybrids (xenocybrids). Thus, some xenocybrid clones were obtained by fusing orangutan rho0 cells and human cytoplasts (enucleated cells) (36). However, no clone was obtained by using human rho0 cells and orangutan cytoplasts (37). Maybe, beside the defective interactions between nuclear chromosomes- and mtDNA-encoded products, aminoglycosides in the cell culture behave as another stress condition for orangutan mtDNAs.

To study the effect of aminoglycosides on orangutan cells, we analyzed four cell lines: (i) orangutan (*Pongo pygmaeus*) primary fibroblasts from skin explants; (ii) human osteosarcoma 143B cybrids harboring the m.1555G mutation as a positive

control; (iii) bonobo (*Pan paniscus*) primary fibroblasts from skin explants; and (iv) human osteosarcoma 143B cybrids harboring the m.1555A nucleotide as negative controls.

We first checked the species origin and the genotypes of these cell lines by sequencing. The m.1542C nucleotide has not been found in >3000 human (38) and 37 bonobo (4,16,39,40) sequences, but it is present in orangutan mtDNA. The m.1556T has not been found in >3000 human (38) and 17 orangutan (4,5,16) sequences, but it is found in bonobo mtDNA. Then, the T/T, T/C and C/C genotypes at m.1542/m.1556 positions confirm that these cell lines are from bonobo, human and orangutan, respectively (Fig. 2B). The m.1551A nucleotide characterizes orangutan primary fibroblasts as belonging to *Pongo pygmaeus* (Fig. 2A). Moreover, the m.1555G nucleotide in this orangutan sequence, along with the other 17 sequences from Figure 2A, reconfirm that this is not a sequencing error or a recent polymorphism.

When oxidative metabolism is impaired, cells cultured in galactose medium without glucose cannot synthesize the bulk of their ATP requirements by glycolysis and the cell growth is inhibited (41). For this reason, we grew these cells without or with paromomycin (2 mg/ml) in the galactose medium. As shown in Supplementary Material, Figure S4, after 72 h, human mutant and wild-type orangutan, but not wild-type human or bonobo, cells with the antibiotic showed a slower growth rate. Another aminoglycoside, geneticin (G418, 1 mg/ml), had a stronger effect on orangutan cells. Thus, orangutan cells died after 48 h with this antibiotic but the growth of bonobo and human cells was not affected (data not shown).

In previous experiments, it was shown that aminoglycosides decreased cell growth in human cybrids harboring the m.1555A>G mutation. However, the OXPHOS function was not affected (35). It would be possible that this growth impairment was not an OXPHOS-mediated effect. Indeed, the abundance of positively charged amino groups predestines aminoglycosides to bind negatively charged molecules, such as non-ribosomal RNAs or phospholipids (42,43). To check whether this growth deficit in orangutan cells was specifically due to an OXPHOS defect and since the catalytic subunits of the OXPHOS complex IV (CIV) are encoded in the mtDNA, we determined the *in gel* CIV activity. This activity was lower in orangutan cells treated with aminoglycosides (Fig. 4A). *In gel* CIV activity is not a quantitative assay. Therefore, we measured CIV-specific activity by spectrophotometry. This activity was significantly lower in human mutant and wild-type orangutan cells treated with paromomycin, but exhibited no difference in wild-type human and bonobo cells (Fig. 4B).

In the presence of aminoglycosides, the conformation of rRNA becomes altered and erroneous amino acids can be incorporated to the proteins (44). Therefore, to check whether lower CIV activities were due to anomalous CIV subunits or a lower CIV amount, we determined CIV levels. We observed that CIV quantities were also significantly lower in human mutant and wild-type orangutan cells with the antibiotic (Fig. 5A). Moreover, there was a significant correlation ($r = 0.774$, $P = 0.021$) between CIV activity and quantity (Fig. 5B). Hence, lower CIV activities in human mutant and wild-type orangutan cells are mainly due to lesser CIV

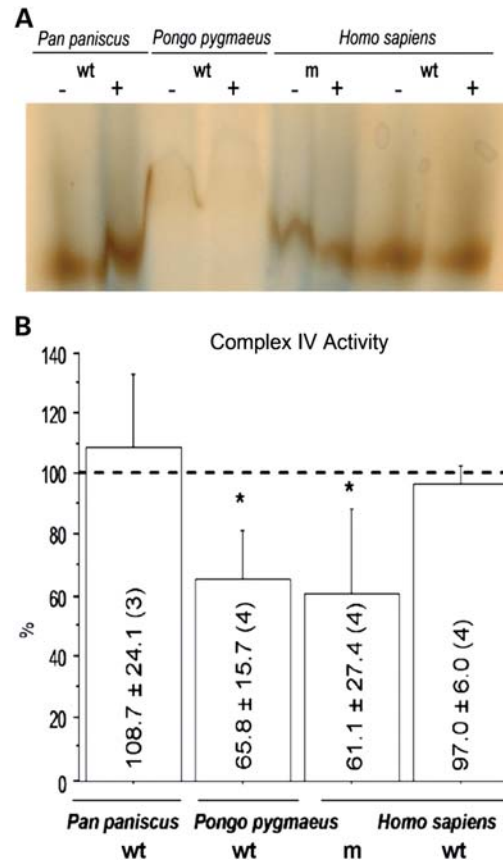


Figure 4. Effect of the aminoglycoside paromomycin on respiratory CIV activity. Cells were exposed to paromomycin (2 mg/ml) for 3 days. Wt and m represent wild-type and mutant alleles, respectively. (A) *In gel* CIV activity. – and + code for the absence and presence of the antibiotic. (B) CIV-specific activity. The specific activity of each cell line without antibiotic has been set to 100%. * $P \leq 0.021$, significantly different from the cell line without antibiotic.

quantities. The aminoglycoside effect was dependent on the doses. Thus, 4 mg/ml of paromomycin provoked a larger decrease both in CIV activity (47%) and quantity (17%) (data not shown). Streptomycin (100 ng/ml) also produced a decrease in CIV activity (34%) and quantity (19%) in orangutan cells (data not shown). This meant that the inhibitory effect was not specific for paromomycin.

The first step in the CIV assembly pathway is the insertion of the p.MT-CO1 polypeptide into the inner mitochondrial membrane (45). Therefore, to check whether the lower CIV amount was due to lower p.MT-CO1 levels, we measured the quantity of this polypeptide by western blot. The results shown in Figure 5C indicated that paromomycin (2 mg/ml) lowered the amount of this subunit in orangutan cells. Similar to the effect on CIV activity and quantity, an increase in paromomycin concentration (4 mg/ml) produced a larger decrease in the amount of this subunit in wild-type orangutan and human mutant cells (Supplementary Material, Fig. S5). Because p.MT-CO1 is only one of the 13 mtDNA-encoded polypeptides, to confirm that this aminoglycoside could alter the levels of other mtDNA-encoded polypeptides, we performed a mitochondrial protein synthesis assay and observed that all of them were decreased in human mutant and wild-type

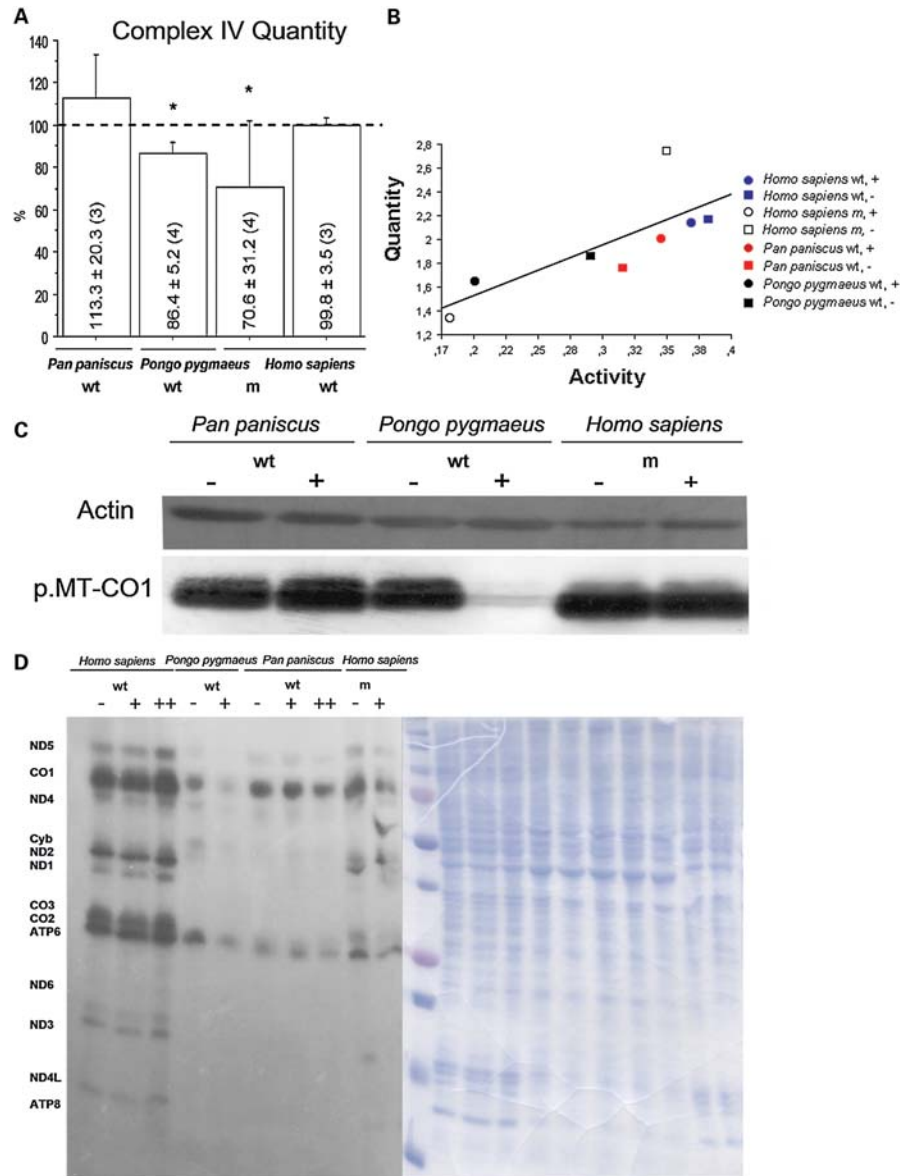


Figure 5. Effect of the aminoglycoside paromomycin on the quantity of respiratory CIV, CIV subunit I and mitochondrial protein synthesis. Wt and m represent wild-type and mutant alleles, respectively. -, + (2 mg/ml) and ++ (4 mg/ml) represent the absence and presence of the antibiotic. (A) CIV quantity. The levels of each cell line without antibiotic have been set to 100%. * $P < 0.021$, significantly different from the cell line without antibiotic. (B) CIV activity and quantity correlation. (C) p.MT-CO1 levels. (D) Mitochondrial protein synthesis. Representative gel of three experiments showing the electrophoretic pattern of mitochondrial translation products (left) and the loading control (right).

orangutan cells (Fig. 5D). Therefore, aminoglycosides negatively affect OXPHOS function in orangutan cells.

DISCUSSION

A recent founder effect, the inefficiency of natural selection or the presence of compensatory mutations do not appear to explain the fixation of the human m.1555A>G pathological mutation in the orangutan mtDNA. Moreover, results obtained from human cybrids, with the same nuclear background than those here used, showed that the mutation *per se* was not sufficient to cause an OXPHOS dysfunction in human cybrids (35). However, the exposition to aminoglycosides provokes

a decrease in the OXPHOS function of orangutan cells. Because other primates less phylogenetically close to humans, such as *Erythrocebus patas*, are susceptible to aminoglycosides (46), pharmacokinetic factors can probably be ruled out as responsible for the fixation of the m.1555G mutation in orangutan. Therefore, it is possible that incomplete penetrance of this mutation along with the absence in the orangutan habitat of xenobiotics that interact with this mt-rRNA position are the reason for the fixation of this human pathological mutation in orangutan. Interestingly, gorillas, chimps and humans have shared the same environment because they are African hominids but orangutan's environment is different. They live in South East Asia.

More importantly, m.1555G nucleotide is also the wild-type allele in other 8 out of 316 examined mammal species: a rodent (*Thryonomys swinderianus*), a ruminant (*Budorcas taxicolor*) and six bears (*Arctodus simus*, *Melursus ursinus*, *Ursus arctos*, *Ursus maritimus*, *Ursus thibetanus* and *Ursus thibetanus ussuricus*). Because aminoglycosides are commonly used in veterinary medicine (47), these mammals might be at risk of suffering a mitochondrial disorder if treated with aminoglycosides, although this possibility should be confirmed.

On the other hand, these results can be important for human health. Ancient and highly prevalent mtDNA mutations are usually ruled out as pathological mutations. However, as seen in orangutans, this kind of mutations could have phenotypic effects, depending on environmental conditions. Therefore, it is possible that similar mutations, such as some human haplogroup-defining mt-rRNA single nucleotide polymorphisms, are deleterious in association with particular xenobiotics. In this sense, ribosomal antibiotics started to be used in the 1940s to fight bacteria. Because the protein synthesis apparatuses of mitochondria and bacteria are very alike, these compounds might provoke side effects on individuals with particular mtDNA genotypes (48,49). For example, platelet CIV activities and quantities from patients that survived 6 months to sepsis were significantly higher than those of non-survival patients (50) and mtDNA haplogroups were found to modify the chance of sepsis survival at 180 days (51). As antibiotics are frequently used in sepsis patients, it would be possible that the interaction between mt-rRNA genetic variants and particular ribosomal antibiotics behave as a risk factor for sepsis survival.

MATERIALS AND METHODS

Bioinformatics studies

Sequence alignments were performed using the multiple sequence alignment program ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). CIs were estimated by alignment of all 316 mammal *MT-RNR1* sequences pulled from completely sequenced mtDNAs published in Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) through the end of 2010. We also used the ConSurf tool (<http://consurf.tau.ac.il>) to calculate the CI while taking into account the topology of the phylogenetic tree. Molecular models were obtained with the RasMol2.6 program (PDB 2WDG and 1QYR).

Growth conditions, molecular and statistics analysis

Cells were cultured in the galactose medium. Cell culture, molecular-genetics studies, biochemical analysis and statistics were performed according to protocols previously described (52–54). To test the phenotypic effect of aminoglycosides, cells were grown in the presence or absence of different concentrations of paromomycin, geneticin or streptomycin.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at *HMG* online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Professor Werner Schempp in the Institute of Human Genetics at University of Freiburg (Freiburg, Germany) for his kind gift of orangutan and bonobo primary fibroblasts and Dr Covadonga Gómez-Díaz in the Servicio de Otorrinolaringología at Hospital Miguel Servet (Zaragoza, Spain) for her interpretation of results on orangutan hearing.

Conflict of Interest statement. None declared.

FUNDING

This project was supported by grants from Instituto de Salud Carlos III-FIS (PI08-0264, PI10-00662) and Departamento de Ciencia, Tecnología y Universidad del Gobierno de Aragón y Fondo Social Europeo (Grupos Consolidados B33, PIPAMER10-010 and Fundación ARAID-Programa de Apoyo a la I+D+I para jóvenes investigadores 2010). The CIBERER is an initiative of the ISCIII.

REFERENCES

- Prezant, T.R., Agopian, J.V., Bohlman, M.C., Bu, X., Oztas, S., Qiu, W.Q., Arnos, K.S., Cortopassi, G.A., Jaber, L., Rotter, J.I. *et al.* (1993) Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat. Genet.*, **4**, 289–294.
- Bindu, L.H. and Reddy, P.P. (2008) Genetics of aminoglycoside-induced and prelingual non-syndromic mitochondrial hearing impairment: a review. *Int. J. Audiol.*, **47**, 702–707.
- Guan, M.X., Fischel-Ghodsian, N. and Attardi, G. (2001) Nuclear background determines biochemical phenotype in the deafness-associated mitochondrial 12S rRNA mutation. *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 573–580.
- Horai, S., Hayasaka, K., Kondo, R., Tsugane, K. and Takahata, N. (1995) Recent African origin of modern humans revealed by complete sequences of hominoid mitochondrial DNAs. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **92**, 532–536.
- Xu, X. and Arnason, U. (1996) The mitochondrial DNA molecule of Sumatran orangutan and a molecular proposal for two (Bornean and Sumatran) species of orangutan. *J. Mol. Evol.*, **43**, 431–437.
- de Magalhães, J.P. (2005) Human disease-associated mitochondrial mutations fixed in nonhuman primates. *J. Mol. Evol.*, **61**, 491–497.
- Kraus, N., Smith, D.I., Reed, N.L., Willott, J. and Erwin, J. (1985) Auditory brainstem and middle latency responses in non-human primates. *Hear Res.*, **17**, 219–226.
- Hardus, M.E., Lameira, A.R., Van Schaik, C.P. and Wich, S.A. (2009) Tool use in wild orang-utans modifies sound production: a functionally deceptive innovation? *Proc. Biol. Sci.*, **276**, 3689–3694.
- Wich, S.A., Swartz, K.B., Hardus, M.E., Lameira, A.R., Stromberg, E. and Shumaker, R.W. (2009) A case of spontaneous acquisition of a human sound by an orangutan. *Primates*, **50**, 56–64.
- Soares, P., Achilli, A., Semino, O., Davies, W., Macaulay, V., Bandelt, H.J., Torrioni, A. and Richards, M.B. (2010) The archaeogenetics of Europe. *Curr. Biol.*, **20**, R174–R183.
- Eaton, S.B., Konner, M. and Shostak, M. (1988) Stone agers in the fast lane: chronic degenerative diseases in evolutionary perspective. *Am. J. Med.*, **84**, 739–749.
- Wallace, K.B. (2008) Mitochondrial off targets of drug therapy. *Trends Pharmacol. Sci.*, **29**, 361–366.
- Pereira, C.V., Moreira, A.C., Pereira, S.P., Machado, N.G., Carvalho, F.S., Sardao, V.A. and Oliveira, P.J. (2009) Investigating drug-induced mitochondrial toxicity: a biosensor to increase drug safety? *Curr. Drug Saf.*, **4**, 34–54.
- Degli Esposti, M. (1998) Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview. *Biochim. Biophys. Acta*, **1364**, 222–235.
- Gao, L. and Zhang, J. (2003) Why are some human disease-associated mutations fixed in mice? *Trends Genet.*, **19**, 678–681.

16. Noda, R., Kim, C.G., Takenaka, O., Ferrell, R.E., Tanoue, T., Hayasaka, I., Ueda, S., Ishida, T. and Saitou, N. (2001) Mitochondrial 16S rRNA sequence diversity of hominoids. *J. Hered.*, **92**, 490–496.
17. Locke, D.P., Hillier, L.W., Warren, W.C., Worley, K.C., Nazareth, L.V., Muzny, D.M., Yang, S.P., Wang, Z., Chinwalla, A.T., Minx, P. *et al.* (2011) Comparative and demographic analysis of orang-utan genomes. *Nature*, **469**, 529–533.
18. Jaber, L., Shohat, M., Bu, X., Fischel-Ghodsian, N., Yang, H.Y., Wang, S.J. and Rotter, J.I. (1992) Sensorineural deafness inherited as a tissue specific mitochondrial disorder. *J. Med. Genet.*, **29**, 86–90.
19. Giles, R.E., Blanc, H., Cann, H.M. and Wallace, D.C. (1980) Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **77**, 6715–6719.
20. Frank, S.A. and Hurst, L.D. (1996) Mitochondria and male disease. *Nature*, **383**, 224.
21. Pontzer, H., Raichlen, D.A., Shumaker, R.W., Ocobock, C. and Wich, S.A. (2010) Metabolic adaptation for low energy throughput in orangutans. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **107**, 14048–14052.
22. McFarland, R., Elson, J.L., Taylor, R.W., Howell, N. and Turnbull, D.M. (2004) Assigning pathogenicity to mitochondrial tRNA mutations: when “definitely maybe” is not good enough. *Trends Genet.*, **20**, 591–596.
23. Zhao, H., Li, R., Wang, Q., Yan, Q., Deng, J.H., Han, D., Bai, Y., Young, W.Y. and Guan, M.X. (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.
24. Azevedo, L., Carneiro, J., van Asch, B., Moleirinho, A., Pereira, F. and Amorim, A. (2009) Epistatic interactions modulate the evolution of mammalian mitochondrial respiratory complex components. *BMC Genomics*, **10**, 266.
25. Kern, A.D. and Kondrashov, F.A. (2004) Mechanisms and convergence of compensatory evolution in mammalian mitochondrial tRNAs. *Nat. Genet.*, **36**, 1207–1212.
26. Springer, M.S., Hollar, L.J. and Burk, A. (1995) Compensatory substitutions and the evolution of the mitochondrial 12S rRNA gene in mammals. *Mol. Biol. Evol.*, **12**, 1138–1150.
27. Vila-Sanjurjo, A., Lu, Y., Aragonz, J.L., Starkweather, R.E., Sasikumar, M. and O'Connor, M. (2007) Modulation of 16S rRNA function by ribosomal protein S12. *Biochim. Biophys. Acta*, **1769**, 462–471.
28. GuhaThakurta, D. and Draper, D.E. (1999) Protein-RNA sequence covariation in a ribosomal protein-rRNA complex. *Biochemistry*, **38**, 3633–3640.
29. Smith, T.F., Lee, J.C., Gutell, R.R. and Hartman, H. (2008) The origin and evolution of the ribosome. *Biol. Direct*, **3**, 16.
30. Moreno-Loshuertos, R., Ferrin, G., Acin-Perez, R., Gallardo, M.E., Viscomi, C., Perez-Martos, A., Zeviani, M., Fernandez-Silva, P. and Enriquez, J.A. (2011) Evolution meets disease: penetrance and functional epistasis of mitochondrial tRNA mutations. *PLoS Genetics*, **7**, e1001379.
31. Cotney, J., McKay, S.E. and Shadel, G.S. (2009) Elucidation of separate, but collaborative functions of the rRNA methyltransferase-related human mitochondrial transcription factors B1 and B2 in mitochondrial biogenesis reveals new insight into maternally inherited deafness. *Hum. Mol. Genet.*, **18**, 2670–2682.
32. O'Farrell, H.C., Scarsdale, J.N. and Rife, J.P. (2004) Crystal structure of KsgA, a universally conserved rRNA adenine dimethyltransferase in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **339**, 337–353.
33. Guan, M.X., Yan, Q., Li, X., Bykhovskaya, Y., Gallo-Teran, J., Hajek, P., Umeda, N., Zhao, H., Garrido, G., Mengesha, E. *et al.* (2006) Mutation in TRMU related to transfer RNA modification modulates the phenotypic expression of the deafness-associated mitochondrial 12S ribosomal RNA mutations. *Am. J. Hum. Genet.*, **79**, 291–302.
34. Inoue, K., Takai, D., Soejima, A., Isobe, K., Yamasoba, T., Oka, Y., Goto, Y. and 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.
35. Giordano, C., Pallotti, F., Walker, W.F., Checcharelli, N., Musumeci, O., Santorelli, F., d'Amati, G., Schon, E.A., DiMauro, S., Hirano, M. *et al.* (2002) Pathogenesis of the deafness-associated A1555G mitochondrial DNA mutation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **293**, 521–529.
36. Bayona-Bafaluy, M.P., Muller, S. and Moraes, C.T. (2005) Fast adaptive coevolution of nuclear and mitochondrial subunits of ATP synthetase in orangutan. *Mol. Biol. Evol.*, **22**, 716–724.
37. Barrientos, A., Kenyon, L. and Moraes, C.T. (1998) Human xenomitochondrial cybrids. Cellular models of mitochondrial complex I deficiency. *J. Biol. Chem.*, **273**, 14210–14217.
38. Ruiz-Pesini, E., Lott, M.T., Procaccio, V., Poole, J.C., Brandon, M.C., Mishmar, D., Yi, C., Kreuziger, J., Baldi, P. and Wallace, D.C. (2007) An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny. *Nucleic Acids Res.*, **35**, D823–D828.
39. Hixson, J.E. and Brown, W.M. (1986) A comparison of the small ribosomal RNA genes from the mitochondrial DNA of the great apes and humans: sequence, structure, evolution, and phylogenetic implications. *Mol. Biol. Evol.*, **3**, 1–18.
40. Zsurka, G., Kudina, T., Peeva, V., Hallmann, K., Elger, C.E., Khrapko, K. and Kunz, W.S. (2010) Distinct patterns of mitochondrial genome diversity in bonobos (*Pan paniscus*) and humans. *BMC Evol. Biol.*, **10**, 270.
41. Robinson, B.H., Petrova-Benedict, R., Buncic, J.R. and Wallace, D.C. (1992) Nonviability of cells with oxidative defects in galactose medium: a screening test for affected patient fibroblasts. *Biochem. Med. Metab. Biol.*, **48**, 122–126.
42. Hermann, T. (2007) Aminoglycoside antibiotics: old drugs and new therapeutic approaches. *Cell Mol. Life Sci.*, **64**, 1841–1852.
43. Hainrichson, M., Nudelman, I. and Baasov, T. (2008) Designer aminoglycosides: the race to develop improved antibiotics and compounds for the treatment of human genetic diseases. *Org. Biomol. Chem.*, **6**, 227–239.
44. Zingman, L.V., Park, S., Olson, T.M., Alekseev, A.E. and Terzic, A. (2007) Aminoglycoside-induced translational read-through in disease: overcoming nonsense mutations by pharmacogenetic therapy. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **81**, 99–103.
45. Fernandez-Vizarra, E., Tiranti, V. and Zeviani, M. (2009) Assembly of the oxidative phosphorylation system in humans: what we have learned by studying its defects. *Biochim. Biophys. Acta*, **1793**, 200–211.
46. Hawkins, J.E. Jr, Stebbins, W.C., Johnson, L.G., Moody, D.B. and Muraski, A. (1977) The patas monkey as a model for dihydrostreptomycin ototoxicity. *Acta Otolaryngol.*, **83**, 123–129.
47. Regula, G., Torriani, K., Gassner, B., Stucki, F. and Muntener, C.R. (2009) Prescription patterns of antimicrobials in veterinary practices in Switzerland. *J. Antimicrob. Chemother.*, **63**, 805–811.
48. 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.
49. Pacheu-Grau, D., Gomez-Duran, A., Montoya, J. and Ruiz-Pesini, E. (2010) Influence of mtDNA genetic variation on antibiotic therapy. *Pharmacogenomics*, **11**, 1185–1187.
50. Lorente, L., Martin, M.M., Lopez-Gallardo, E., Iceta, R., Sole-Violan, J., Blanquer, J., Labarta, L., Diaz, C., Jimenez, A., Lafuente, N. *et al.* (2011) Platelet cytochrome c oxidase activity and quantity in septic patients. *Crit. Care Med.*, **39**, 1289–1294.
51. Baudouin, S.V., Saunders, D., Tiangyou, W., Elson, J.L., Poynter, J., Pyle, A., Keers, S., Turnbull, D.M., Howell, N. and Chinnery, P.F. (2005) Mitochondrial DNA and survival after sepsis: a prospective study. *Lancet*, **366**, 2118–2121.
52. Calvaruso, M.A., Smeitink, J. and Nijtmans, L. (2008) Electrophoresis techniques to investigate defects in oxidative phosphorylation. *Methods*, **46**, 281–287.
53. 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.
54. 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.
55. Springer, M.S. and Douzery, E. (1996) Secondary structure and patterns of evolution among mammalian mitochondrial 12S rRNA molecules. *J. Mol. Evol.*, **43**, 357–373.
56. Andrews, R.M., Kubacka, I., Chinnery, P.F., Lightowers, 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.

Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups

Aurora Gómez-Durán¹, David Pacheu-Grau¹, Ester López-Gallardo¹, Carmen Díez-Sánchez¹, Julio Montoya¹, Manuel J. López-Pérez¹ 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

Received April 27, 2010; Revised and Accepted June 9, 2010

Many epidemiologic studies have associated human mitochondrial haplogroups to rare mitochondrial diseases like Leber's hereditary optic neuropathy or to more common age-linked disorders such as Parkinson's disease. However, cellular, biochemical and molecular-genetic evidence that is able to explain these associations is very scarce. The etiology of multifactorial diseases is very difficult to sort out because such diseases are due to a combination of genetic and environmental factors that individually only contribute in small part to the development of the illness. Thus, the haplogroup-defining mutations might behave as susceptibility factors, but they could have only a small effect on oxidative phosphorylation (OXPHOS) function. Moreover, these effects would be highly dependent on the 'context' in which the genetic variant is acting. To homogenize this 'context' for mitochondrial DNA (mtDNA) mutations, a cellular approach is available that involves the use of what is known as 'cybrids'. By using this model, we demonstrate that mtDNA and mtRNA levels, mitochondrial protein synthesis, cytochrome oxidase activity and amount, normalized oxygen consumption, mitochondrial inner membrane potential and growth capacity are different in cybrids from the haplogroup H when compared with those of the haplogroup Uk. Thus, these inherited basal differences in OXPHOS capacity can help to explain why some individuals more quickly reach the bioenergetic threshold below which tissue symptoms appear and progress toward multifactorial disorders. Hence, some population genetic variants in mtDNA contribute to the genetic component of complex disorders. The existence of mtDNA-based OXPHOS differences opens possibilities for the existence of a new field, mitochondrial pharmacogenomics.

New sequence accession nos: HM103354–HM103363.

INTRODUCTION

Mitochondrial DNA (mtDNA) accumulates mutations much faster than nuclear DNA (nDNA) (1). Very severe mtDNA mutations are rapidly removed from the female germline by purifying selection, thereby minimizing their impact on population fitness. Most of the mtDNA mutations that cause disease are moderately deleterious and persist in human populations for a small number of generations (2). On the other hand, the population survival of functionally

neutral mutations is a matter of chance. Mutations that lie elsewhere on the spectrum with mild phenotypic effects will increase their population frequencies depending on a combination of randomness and selective advantage (3). These mutations could be advantageous in some environments but detrimental in other conditions (4). Thus, according to the common disease–common variant hypothesis (5), mutations of the latter category can be part of the genetic basis underlying complex disorders, such as age-linked diseases.

*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: eduruiz@unizar.es

mtDNA encodes very important subunits of the oxidative phosphorylation (OXPHOS) system and the RNAs required for their expression. Through this system, cells obtain most of the ATP necessary to live. The importance of mitochondrial energy makes mtDNA an interesting candidate to study in relation to multifactorial diseases. In fact, many disease phenotypes have been related to groups of phylogenetically related mtDNA genotypes or haplogroups (Supplementary Material, Table S1), and biochemical evidence obtained from individuals with these associations has been provided in epidemiologic studies (6). However, progress in this area has been limited because the phenotypic effects produced by variation in mtDNA are difficult to isolate due to confounding variations of the nuclear genome and to environmental factors. Nevertheless, by using rat or mouse conplastic strains, with identical nuclear genomes but divergent mtDNA genomes, it has been shown that natural mtDNA variation can promote OXPHOS differences that are relevant to the pathogenesis of common diseases (7–10). Obviously, this model cannot be applied in human beings. However, phenotypic differences due to mtDNA variation have also been confirmed by using a different experimental model, mouse trans-mitochondrial cell lines or cybrids (11). These cybrids share the same nuclear genetic background and environmental conditions but differ in their mtDNA.

Thus, before one can seriously consider the role of human mtDNA haplogroups in terms of clinical applications, evidence of cellular, biochemical and molecular-genetic differences between the groups must be obtained. Because the haplogroup Uk has been found to be under-represented in patients with Parkinson's or Alzheimer's diseases, thus behaving as a resistance factor, and the haplogroup H has been found to be over-represented in individuals with neurodegenerative diseases, thus being a potential susceptibility factor (Supplementary Material, Table S2), we used the cybrid model to compare the OXPHOS function of these haplogroups. Our results showed that the mtDNA haplogroup differentially contributes to OXPHOS functionality and can therefore be a risk factor that contributes to the development of some of these age-linked diseases.

RESULTS

Nuclear- and mitochondrially convenient cybrids for analysis of mtDNA population genetic variants

To compare the OXPHOS function between the haplogroups H and Uk, we built cybrids with an osteosarcoma 143B TK– nuclear background. Before we used this cell line in our experiments, we considered several aspects of the model. It is known that this cell line is aneuploid, and it was previously shown that cybrids from this background could have different chromosomal numbers (12). Therefore, to rule out major nuclear influences, we took two approaches. First, to avoid clonal effects, we constructed five cybrid cell lines per haplogroup and confirmed that we had introduced the correct mtDNAs (Supplementary Material, Fig. S1). Second, we karyotyped all our cybrids and observed that the chromosomal number was not significantly different between them [H, 66.3 ± 3.8 (5); Uk, 64.6 ± 2.1 (5)] (Fig. 1A and Supplementary Material, Table S3).

Because we were interested in the functional effects of haplogroup-defining polymorphisms, we sought to discard the existence of non-haplogroup-defining mutations with potential phenotypic effects, so we built our cybrids (9 out of 10) from donors in their 20s or 30s, well-below the age when somatic mtDNA mutations tend to accumulate (13). Moreover, although this cell line is thymidine kinase negative (TK–), cells also contain a mitochondrial TK (TK2). Thus, it could be possible that during the selection of the cybrids with 5-bromo-2'-deoxyuridine, the mtDNA may accumulate mutations (14). Therefore, we sequenced the entire mtDNA from the cybrids after selection instead of directly from the donors. In addition, it was recently shown that cybrids could accumulate mtDNA mutations during culture (15). To have a gross estimation of the culture mutation rate, we compared control region sequences that consisted of the mtDNA region with a higher mutational rate between cybrids and donor blood, and we did not find any sequence differences between them.

These trans-mitochondrial cell lines included haplotypes from two subhaplogroups of Uk (Uk1, 2 cybrids; Uk2, 3 cybrids) and three subhaplogroups of H (H1, H5 and H13 with 3, 1 and 1 cybrids, respectively) (Fig. 1B). To exclude private variants (those occurring at the tips of individual branches within the phylogenetic tree) with a possible phenotypic effect, mtDNA mutations were analyzed in a large mtDNA database that included more than 3000 human sequences (16). We found 43 mutations (16 in the control region, 14 synonymous and 5 non-synonymous in protein genes and 8 in RNA genes), but 42 had already been described. Only one, the m.10428A >G/MT-TR mutation in the cybrid 110K, had not been reported previously. This mutation was a heteroplasmic transition (Supplementary Material, Fig. S2A), a condition frequently associated with pathologic mutations, and it broke a Watson–Crick base pair in the tRNA-Arg anticodon stem (Supplementary Material, Fig. S2B). In this cell line, however, a posterior analysis of mitochondrial protein synthesis and other OXPHOS parameters did not show any significant difference with cybrids from the same haplogroup (Supplementary Material, Fig. S2C).

Therefore, these results allowed us to consider these 10 cybrid cell lines nuclear and mitochondrially convenient for posterior analysis of the functional effect of haplogroup-defining polymorphisms.

mtDNA levels were lower in cybrids from the haplogroup Uk

OXPHOS complex activities are under tight control by mtDNA levels (17). To be sure that these levels had been recovered after the hybridization process, we determined the mtDNA amount by qRT-PCR in different culture passages and observed that at least 20 passages were necessary to get the steady-state levels. Therefore, all the experiments were performed in cybrids with a passage number higher than 20. When we compared the mtDNA levels between cybrids H and Uk, we found that cybrids Uk had 7.3% less mtDNA than those in the haplogroup H and this difference was significant (Fig. 2A). The existence of differences in mtDNA levels was also recently shown for cybrids from

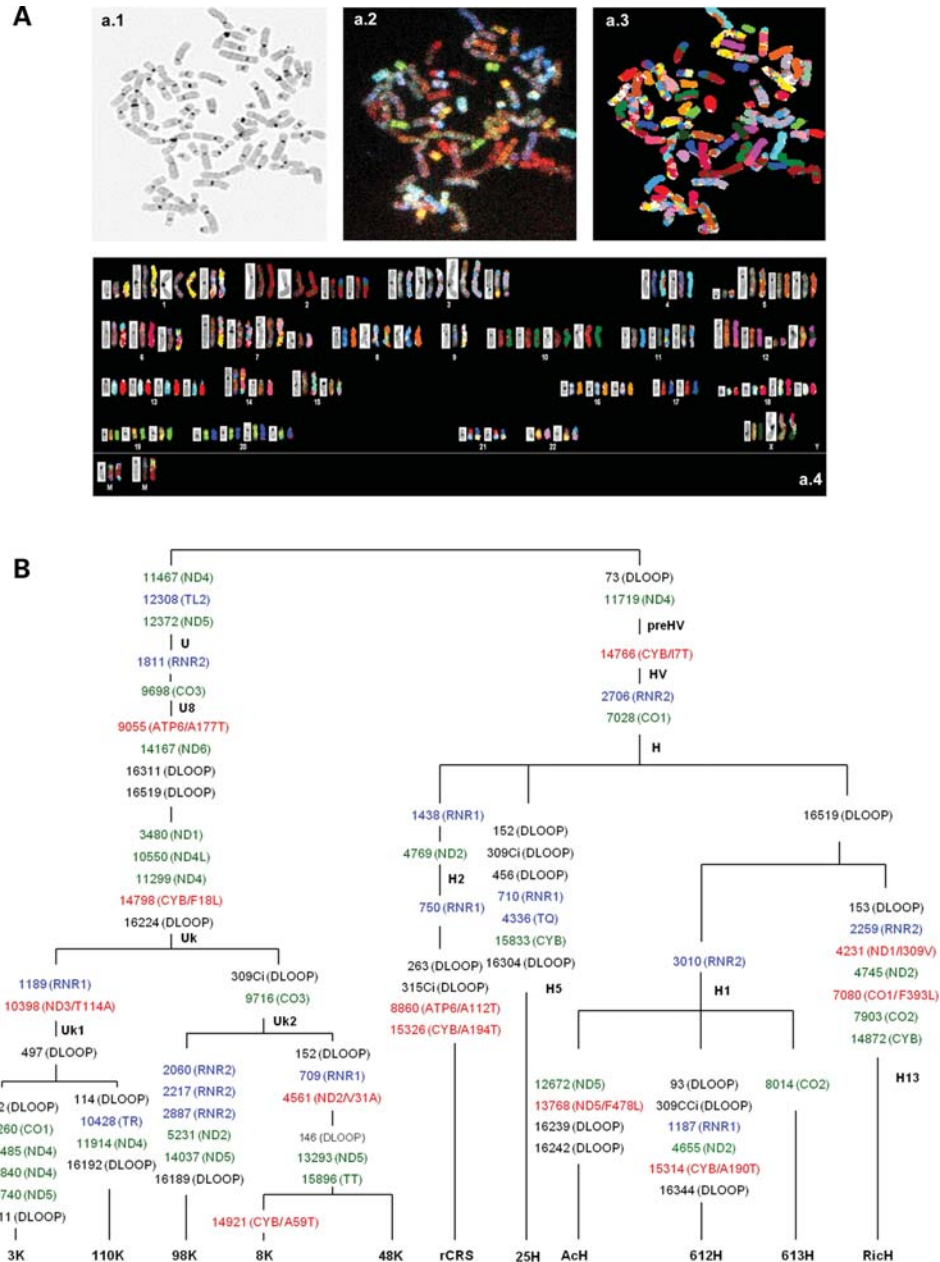


Figure 1. Nuclear and mitochondrial genome analysis in cybrids H and Uk. (A) Spectral karyotyping (SKY) analysis of the cybrids. Metaphase after DAPI stain (a.1), SKY hybridization (a.2) or classified colors (a.3). In this karyotype of one cybrid cell 48K (a.4), structurally rearranged chromosomes are grouped according to the chromosomal type of their major component. Every chromosome from pictures a.1 to a.3 is aligned in this karyotype. (B) Phylogenetic tree of the cybrids' mtDNA. Black, green, red and blue colors define control region, protein synonymous, protein non-synonymous and RNA mutations, respectively. The affected mtDNA gene or sequence is showed in parenthesis. For non-synonymous mutations, amino acid substitution and position in the protein is also indicated. rCRS means revised Cambridge reference sequence (45).

the haplogroups H and J (18). These differences were apparently due to a single-nucleotide polymorphism (SNP) in a sequence of the mtDNA control region that was important for its replication. However, our cybrids did not have SNPs in sequences involved in mtDNA replication (Fig. 1B). Consequently, mtDNA levels had to be explained by another functional difference that is due to mitochondrial genotype. Another explanation could involve the fact that it has been reported that high reactive oxygen species (ROS) levels enhance mtDNA replication (19).

Because high ROS levels due to mtDNA pathologic mutations could affect aconitase activity (20) or trigger antioxidant responses, such as manganese superoxide dismutase (MnSOD) overexpression (21), we measured these parameters but did not find any significant difference between both haplogroups. Moreover, we were not able to find differences in either cellular hydrogen peroxide or mitochondrial superoxide anion levels (Supplementary Material, Fig. S3). This could be because our cybrids did not have pathologic mutations but only had population SNPs.

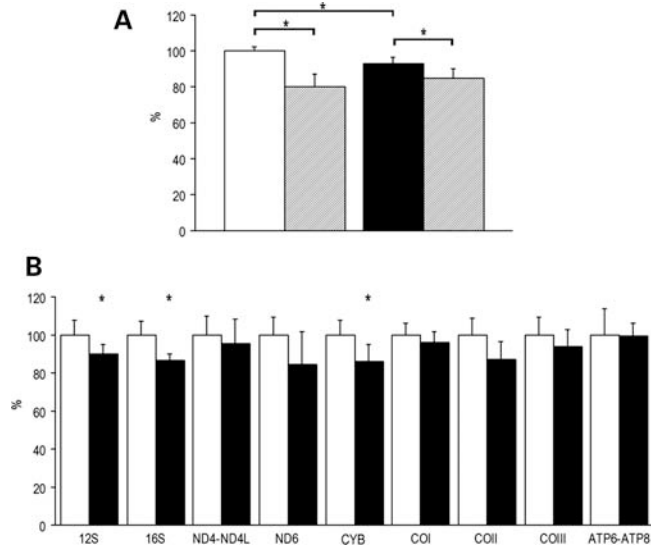


Figure 2. Nucleic acid levels in cybrids H and Uk. White and black bars represent mean values for cybrids H and Uk, respectively. (A) mtDNA levels. The mean value for cybrids H without NAC has been set to 100%. H, $100.0 \pm 2.6\%$ (5); H (NAC), $79.8 \pm 7.0\%$ (5); Uk, $92.7 \pm 3.6\%$ (5); Uk (NAC), $85.0 \pm 5.2\%$ (5). $*P \leq 0.026$. Striped bars represent the mtDNA levels after treatment with 5 mM NAC. (B) mtRNA levels. The mean value for cybrids H has been set to 100%. 12S: H, $100.0 \pm 7.8\%$ (5); Uk, $89.9 \pm 5.0\%$ (5); 16S: H, $100.0 \pm 7.2\%$ (5); Uk, $86.9 \pm 2.9\%$ (5); ND4-ND4L: H, $100.0 \pm 10.2\%$ (5); Uk, $95.5 \pm 12.6\%$ (5); ND6: H, $100.0 \pm 9.4\%$ (5); Uk, $84.3 \pm 17.5\%$ (5); Cytb: H, $100.0 \pm 7.9\%$ (5); Uk, $85.9 \pm 8.9\%$ (5); COI: H, $100.0 \pm 7.9\%$ (5); Uk, $96.0 \pm 5.9\%$ (5); COII: H, $100.0 \pm 9.0\%$ (5); Uk, $87.2 \pm 9.4\%$ (5); COIII: H, $100.0 \pm 9.2\%$ (5); Uk, $94.0 \pm 9.0\%$ (5); ATP6-ATP8: H, $100.0 \pm 13.9\%$ (5); Uk, $99.2 \pm 6.7\%$ (5). $*P \leq 0.041$.

On the other hand, in a recent study, it was shown that mouse cybrids producing more ROS had higher mtDNA levels, which decreased after treatment with the antioxidant *N*-acetyl-cysteine (NAC). However, the mtDNA amount was unaffected in those cybrids producing less ROS (11). Similarly, although both cybrids H and Uk decreased their mtDNA levels after the NAC treatment, the effect was larger for cybrids H (20.2% versus 8.3%). Very interestingly, the mtDNA levels after treatment were not significantly different between both haplogroups (Fig. 2A), as though they reached a basal level.

Mt-rRNA levels were lower in cybrids from the haplogroup Uk

To check whether the mtRNA levels were related to mtDNA amount, we studied mtDNA gene expression by qRT-PCR and found that, despite the lower mtDNA levels in cybrids Uk compared with cybrids H, there were no significant differences in the RNA levels of mtDNA-encoded complex I (CI), IV (CIV) and V (CV) subunits (Fig. 2B). Because most of the mt-mRNAs (except that for p.MT-ND6) are part of the same polycistronic transcript, the lower levels of cytochrome *b* mRNA found (Fig. 2B) could be related to differences in the molecule's half-life or in the hybridization process due to the presence of particular MT-CYB SNPs in the mtDNA Uk (Fig. 1B). On the other hand, the

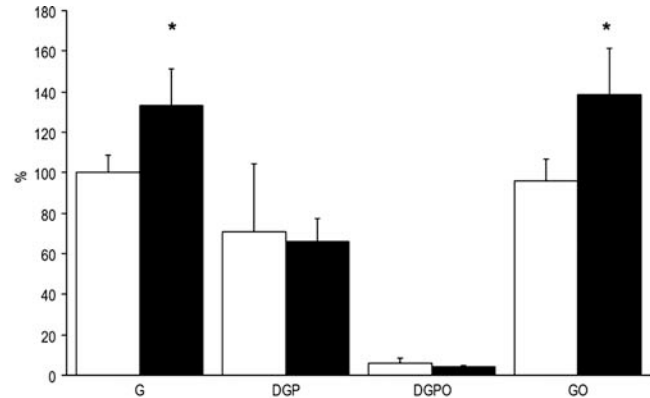


Figure 3. ATP levels in cybrids H and Uk. G, DGP, DGPO and GO are abbreviations for glucose, 2-deoxy-glucose plus 1 mM pyruvate, 2-deoxy-glucose plus 1 mM pyruvate and 2.5 μ g/ml oligomycin and glucose plus 2.5 μ g/ml oligomycin, respectively. The mean value for cybrids H in glucose has been set to 100%. G: H, $100.0 \pm 8.3\%$ (5); Uk, $132.9 \pm 18.3\%$ (5); DGP: H, $71.1 \pm 33.2\%$ (5); Uk, $66.2 \pm 10.9\%$ (5); DGPO: H, $5.9 \pm 2.6\%$ (5); Uk, $4.3 \pm 0.6\%$ (5); GO: H, $96.2 \pm 10.7\%$ (5); Uk, $138.3 \pm 22.8\%$ (5). $*P = 0.009$. White and black bars represent the mean values for cybrids H and Uk, respectively.

levels of the rRNAs were significantly lower in the cybrids Uk (Fig. 2B). Given that there were not genetic differences between the mtDNA sequences of both haplogroups that related to the control of the transcription process (Fig. 1B), these lower rRNA levels are likely due to other mtDNA-related factors, one of which might be the mitochondrial ATP amount.

Human mtRNA synthesis starts at three different locations, one for the L-strand (L) and two for the H-strand (H1 and H2). Mt-rRNAs are mainly synthesized when transcription starts at H1, whereas most of the mRNAs are produced when H2 transcription begins (22). It was shown that the pattern of mtRNA synthesis changes dramatically depending upon the level of ATP available. mRNA synthesis was stimulated at low ATP levels, whereas at high intra-mitochondrial ATP levels, rRNA synthesis and L-strand transcription were strongly stimulated (23). Because the decrease in the amount of mtRNA from cybrids Uk was larger for L and H1 than for H2 transcripts (14.1%, 11.6% and 7.0% for L, H1 and H2, respectively), and because it was recently reported that ATP levels were higher in CD4⁺ cells from haplogroup H versus non-H patients suffering from Huntington disease (24), we measured the levels of ATP in our cybrids. We found that these levels were significantly higher in cybrids Uk growing in glucose (Fig. 3). If ATP levels mirror cell energy requirements, then cybrids Uk had higher ATP necessities. By growing the cells with 2-deoxy-glucose, a glycolytic inhibitor, and pyruvate, a respiratory substrate, we observed that cybrids H and Uk produced the same ATP amount, although this level was around 30% lower than that obtained by growth in glucose (Fig. 3). This is probably because these are very glycolytic cells and by inhibiting the OXPHOS function with oligomycin, we found that the difference previously described was due to ATP produced by glycolysis (Fig. 3). Therefore, because it was not the intra-mitochondrial ATP, another mtDNA-related functional parameter likely accounts for the difference in the rRNA levels.

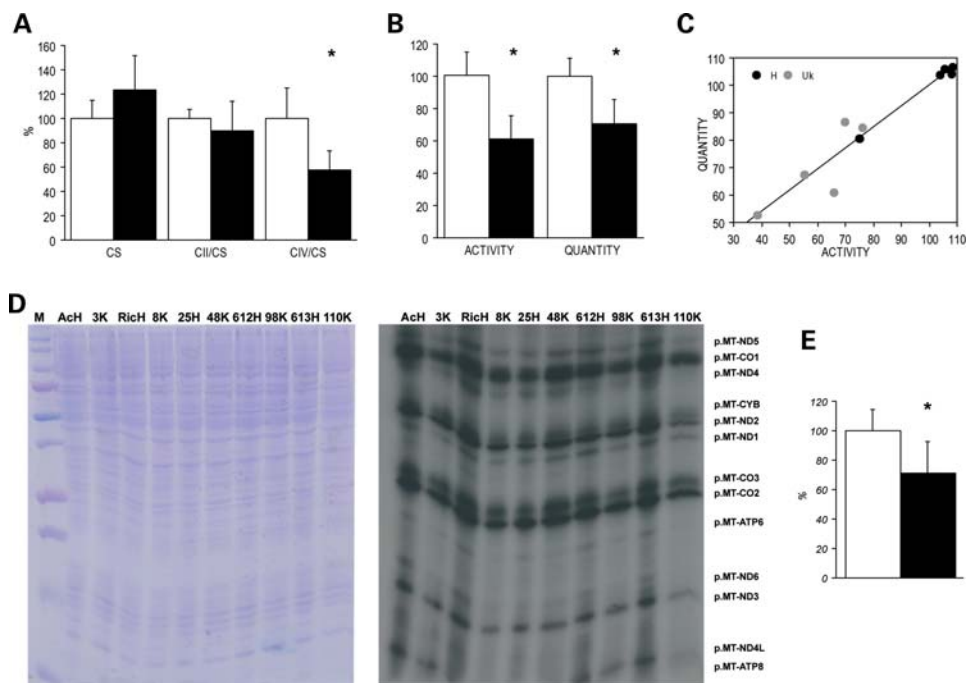


Figure 4. Mitochondrial enzyme and protein synthesis analysis. White and black bars represent the mean values for cybrids H and Uk, respectively. The mean value for cybrids H has been set to 100% in **A**, **B**, **C** and **E**. (A) Enzyme activities. CS: H, $100.0 \pm 12.6\%$ (5); Uk, $123.5 \pm 27.3\%$ (5); CII/CS: H, $100.0 \pm 7.8\%$ (5); Uk, $90.2 \pm 23.7\%$ (5); CIV/CS: H, $100.0 \pm 24.6\%$ (5); Uk, $57.2 \pm 15.9\%$ (5); $*P = 0.001$. (B) CIV study. CIV specific activities: H, $100.0 \pm 14.4\%$ (5); Uk, $61.1 \pm 14.7\%$ (5); CIV levels: H, $100.0 \pm 10.9\%$ (5); Uk, $70.6 \pm 14.8\%$ (5). $*P \leq 0.007$. (C) % Activity/% amount relationship. $y = 1.68 + 0.141x$. $R^2 = 0.96$, $P = 0.0001$. (D) Mitochondrial translation products. Gels showing the loading control and electrophoretic patterns of mitochondrial translation products from the hybrid cell lines. M, molecular weight marker. (E) Quantification of mitochondrial protein synthesis. H: $100.0 \pm 14.5\%$ (5) and Uk: $71.0 \pm 21.4\%$ (5); $*P = 0.037$.

Mitochondrial protein synthesis and respiratory complex IV levels and activities were lower in cybrids from the haplogroup Uk

To test whether different mtRNA levels could affect OXPHOS function, we determined the enzymatic activities of CII (nDNA-encoded) and CIV (nDNA&mtDNA-encoded) as electron transport chain (ETC) markers and normalized these values for citrate synthase (CS) enzymatic activity, a matrix enzyme (nDNA-encoded) that reflects the mitochondrial number or volume. The results showed that there were no significant differences for CS and CII/CS. However, the CIV/CS ratio was significantly lower in the Uk cybrids (Fig. 4A). Except for the synonymous polymorphism m.7028C>T, there were no other SNPs in mitochondrial CIV genes that differed between these haplogroups (Fig. 1B). To explain this lesser activity, we determined the CIV levels and found that they were significantly lower in cybrids Uk (Fig. 4B). Moreover, there was a statistically significant correlation between CIV activities and levels (Fig. 4C). Therefore, the reduction in CIV activity was due to a lower CIV quantity.

The decline in the CIV amount could be due to decreased synthesis efficiency because of lesser rRNA levels or SNPs in mtDNA protein synthesis genes. There were two polymorphisms in the MT-RNR2 (m.1811A>G and m.2706A>G) gene and one in the MT-TL2 (m.12308A>G) gene that could be responsible for these differences (Fig. 1B). Very interestingly, the analysis of mitochondrial translation products showed a decrease in mitochondrial protein synthesis in cybrids Uk (Fig. 4D and E).

The 29.4% decline in CIV levels in cybrids Uk was accompanied by a 29.0% reduction in mitochondrial protein synthesis.

Oxygen consumption and mitochondrial inner membrane potential were different in cybrids from haplogroups H and Uk

Subsequently, we measured oxygen consumption by using high-resolution respirometry and we did not find significant differences in the endogenous, leaking or uncoupled respiration between cybrids H and Uk when expressed as fmole/min/cell (data not shown). However, oxygen consumption rate, when expressed relative to cell number, tends to decrease with increasing cell density due to a decrease in the size of the cells (25) and, probably, in the number of mitochondria. To avoid this problem, we measured oxygen consumption again and related it to the CIV/CS ratio in the cybrid cell lines, as a surrogate of the oxygen consumption per ETC unit (26). We showed that endogenous, leaking and uncoupled respiration was significantly higher in cybrids Uk (Fig. 5A).

Oxygen consumption rate is inversely related to the mitochondrial inner membrane potential (MIMP) (27). Thus, our results on oxygen consumption suggested that cybrids Uk had lower MIMP than cybrids H. The determination of MIMP showed that this potential was significantly lower in the cybrids Uk (Fig. 5B). To rule out the differences in the mitochondrial inner membrane surface (MIMS), we used a

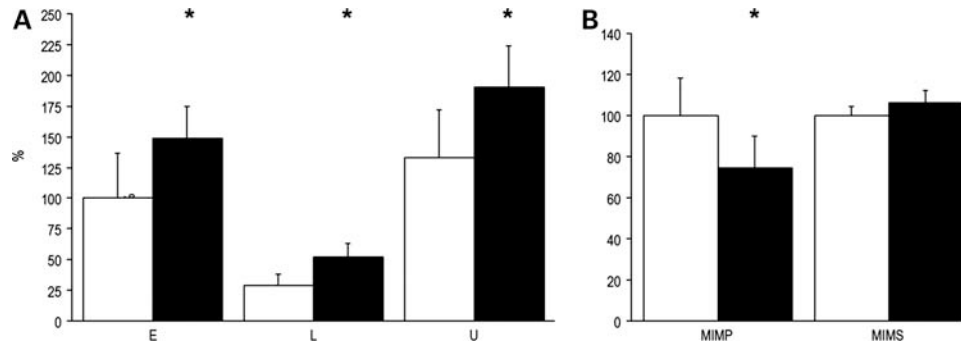


Figure 5. Oxygen consumption and mitochondrial inner membrane potential (MIMP) and surface (MIMS) in cybrids H and Uk. White and black bars represent the mean values for cybrids H and Uk, respectively. (A) Corrected oxygen consumption (oxygen consumption per ETC unit). E, L and U code for endogenous, leaking and uncoupled respiration, respectively. The mean value for E respiration in cybrids H has been set to 100%. E: H, $100.0 \pm 36.9\%$ (5); Uk, $148.3 \pm 26.5\%$ (5); L: H, $28.7 \pm 9.3\%$ (5); Uk, $51.7 \pm 11.9\%$ (5); U: H, $132.5 \pm 39.1\%$ (5); Uk, $190.2 \pm 34.1\%$ (5); * $P \leq 0.045$. (B) MIMP and MIMS. The mean value for cybrids H has been set to 100%. MIMP: H, $100.0 \pm 18.6\%$ (5); Uk, $74.4 \pm 15.5\%$ (5); * $P = 0.046$. MIMS: H, $100.0 \pm 4.4\%$ (5); Uk, $106.0 \pm 6.4\%$ (5).

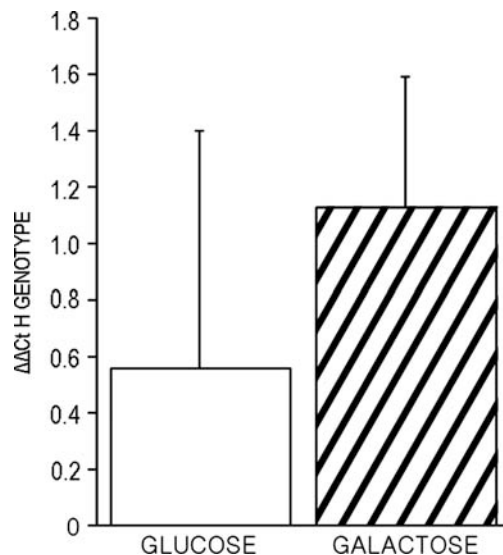


Figure 6. Growth capacity of cybrids H and Uk. White and striped bars represent the genotype H shift, compared with its initial situation, when growing in glucose and galactose, respectively. Glucose and galactose indicate glucose minus initial and galactose minus initial genotype H percentage, respectively. $\Delta\Delta C_t$ codes for threshold cycle differences. Glucose: 0.56 ± 0.85 (16); galactose: 1.13 ± 0.47 (16). * $P = 0.023$.

probe with high affinity for cardiolipin, and we found no differences in MIMS (Fig. 5B).

The cybrids Uk grew more slowly than the cybrids H

To analyze how these OXPHOS differences finally affect cell performance, we analyzed cybrid viability and growth capability. Cell viability was not different between cybrids (Supplementary Material, Fig. S4A). Growth capability was measured in two ways. First, we analyzed the cell doubling times (DTs) in glucose or galactose medium, and we observed that the growth capability in glucose was the same for cybrids of both haplogroups but that the growth in galactose was slower for cybrids Uk, though not significantly (Supplementary Material, Fig. S4B). Secondly, we used competitive mix experiments to estimate cell growth and found that there were signifi-

cant deviations in the percentage of each genotype H and Uk. After 10 days, the percentage of the genotype H was significantly higher than that at the initial mix, in both glucose and galactose medium. Moreover, there was a significant difference in the percentage of genotype H of cells growing in galactose versus those growing in glucose (Fig. 6), thus suggesting a growth advantage for this haplogroup.

DISCUSSION

A specific combination of diverse genetic (including nuclear and mitochondrial genetic variants) and environmental factors may be involved in a multifactorial disorder, but most of the factors involved are often still unknown. Different combinations of these factors can hamper the analysis of the contribution of any particular factor. mtDNA haplogroups have been epidemiologically associated with different diseases. To analyze the phenotypic effects of human variation in mtDNA and to remove confounding nuclear and environmental influences, a cybrid approach is necessary. Because individuals from the haplogroup T had been found to be over-represented in moderate asthenozoospermia and other phenotypes, whereas those from the haplogroup H were over-represented in the normal sperm motility group (6), cybrids were used to investigate mitochondrial function in mtDNA haplogroups H and T (28). Researchers did not find differences between cybrids H and T in terms of the percentage of basal, leaking and uncoupled respiration (28). We also did not find differences in endogenous, leaking and uncoupled respiration between cybrids H and Uk when expressed as fmole/min/cell. However, we observed that cybrids Uk had lower mtDNA and mt-rRNA levels. These levels were accompanied by a decrease in mitochondrial protein synthesis and CIV activities and levels. Therefore, lower CIV levels per cell or per mitochondrion means that the same level of cell oxygen consumption was carried out by a lower amount of ETC. Thus, each ETC unit consumed more oxygen. Because normalized oxygen consumption was significantly different between uncoupled cybrids from both haplogroups, meaning that the proton gradient was not affecting this rate, the electron transport rate through the ETC should be higher in the cybrids

Uk. Moreover, by using oligomycin to measure leaking respiration, ATP synthase is inhibited, the proton gradient increases and the oxygen consumption decreases. Under these conditions, the higher leaking respiration rate might indicate a lower MIMP, as was shown for cybrids Uk, due to proton leakage or inefficiency in the proton pumping of cybrids Uk. The faster electron flow and lower MIMP in cybrids Uk probably means that electron slipping was happening (i.e. non-coupled or decoupling respiration in which electrons are transported without formation of a potential) (29).

Because only two non-synonymous SNPs (m.14766C>T and m.14798T>C) were present in OXPHOS subunits that are involved in electron flow and proton pumping (Fig. 1B), only these could be responsible for the differences in oxygen consumption and inner membrane potential. The first (p.MT-CYB:Thr7Ile) defines the cluster HV, and the Thr7 is only conserved in 4 of 276 mammalian species (conservation index, CI = 1.4%), but it has been hypothesized that this substitution has an impact on the efficiency of the CIII Q cycle (30). The second one (p.MT-CYB:Phe18Leu) was found twice at internal branches of an mtDNA phylogenetic tree built with more than 3000 complete mtDNA sequences (16) and defines genetic backgrounds J1c and Uk. Interestingly, both haplogroups were found to be over-represented in centenarians and LHON patients and under-represented in patients with Parkinson's disease. Phe18 is conserved in 220 of 276 mammal species (CI = 79.7%), thus hinting at its functional importance. This position was located <3.5 Å from the inner ubiquinone binding (Qi) site (31), and it was shown that a similar change alters the susceptibility to diuron in yeast, an ETC inhibitor (32). Moreover, this position was situated in a helical region parallel to the plane of the membrane and might participate in relaying conformational information between the cytochrome *b* monomers (33).

ETC is a metabolic pathway involved in many cell functions. The proton gradient that originates from electrons passing through the ETC complexes is used for many different purposes such as protein and substrate import toward the mitochondria, thermogenesis, apoptosis, maintenance of the cytosolic calcium levels and production of ROS and ATP. Moreover, OXPHOS is important for adaptation to the environment. In fact, external signals, in the form of nutrients and oxygen, interact at the OXPHOS level and trigger intracellular retrograde responses mediated by second messengers such as cell redox state or levels of ATP, ROS and Ca²⁺. We did not find differences between cybrids H and Uk in ROS production. In fact, our results were similar to those obtained with the mtDNA mutator mice that accumulated mtDNA mutations and suffered premature aging phenotypes. In these mice, the amount of ROS was normal and the aconitase activity or expression levels of antioxidant enzymes indicated no oxidative stress in their tissues (34). However, we observed that the antioxidant NAC decreased mtDNA levels. Thus, it is possible either that we experienced methodological problems from the fluorescent dyes being unable to distinguish small differences in ROS levels (35) or that NAC affected another process that is quantitatively different in cybrids H and Uk (36). In any case, if differences are not a result of ROS, another difference in cybrids H and Uk due to distinct OXPHOS capacities must be responsible for the mitochondrial phenotypes that we

observed. Considering this, it has been shown that mitochondrial matrix pH and intracellular calcium dynamics were different in cybrids from mtDNA macrohaplogroups N and non-N (37). ROS, calcium or other second messengers can modify the expression of many nuclear and mitochondrial genes. HSP60 mRNA and protein levels have also been found to be different in cybrids H (38). These nuclear compensations might hide true differences in OXPHOS function (28), as has recently been shown in mouse cybrids (11). Thus, the significant surplus of glycolytic ATP observed in cybrids Uk might be an attempt to perform nuclear compensation for their lower MIMP. Curiously, it had been previously shown that osteosarcoma 143B.TK- cells treated with dinitrophenol for 3 days did not change in oxidative capacity but increased their glycolytic metabolism. It was suggested that glycolytic ATP in these cells supplied energy for maintaining mitochondrial membrane potential (39,40).

Thus, along with time and with the cumulative effects of mtDNA somatic mutations and other nuclear and environmental factors, the mtDNA inherited basal differences in OXPHOS capacity reported here can help to explain why some individuals take longer to reach a certain threshold below which tissue symptoms appear and progress toward multifactorial disorders (41). This finding could aid in understanding the overrepresentation of haplogroup Uk in individuals who become centenarians and the underrepresentation in individuals with age-related neurodegenerative disorders such as Parkinson's and Alzheimer's diseases. Moreover, slight modifications of the hybrid model can contribute to an unraveling of the particular combination of nuclear, mitochondrial and environmental factors that cause a particular multifactorial disease.

MATERIALS AND METHODS

Biological samples

After winning the approval of the Ethical Committee of the Government of Aragon (Acta n°17/2008) and securing signed informed consent, blood from 165 healthy volunteers was obtained. To homogenize nuclear and environmental factors, we used trans-mitochondrial cell lines or cybrids with the osteosarcoma 143B rho0 nuclear background (42). Ten cybrids (five from mtDNA haplogroup H and five from Uk) were built by fusing platelets from selected individuals with this rho0 cell line (43).

Growth conditions, DTs and cell mix experiments

Most of the experiments were performed with cell lines grown in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) containing glucose (4.5 g/l), pyruvate (0.11 g/l) and fetal bovine serum (FBS) (5%). When cells were grown with an antioxidant, 5 mM of NAC was used in the culture medium (11). To avoid undesired phenotypic effects, we grew our cybrid cell lines without any antibiotics. DTs of 10 cybrid cell lines growing in DMEM as previously reported or DMEM with galactose (0.9 g/l), pyruvate (0.11 g/l) and FBS (5%) were determined by using the Z2 Beckman Coulter. Initially, 1.5×10^5 cells were plated. Three to six growth curves were performed for every cell line, and each time point (0, 24,

48, 72 and 96 h) was counted in triplicate. Only those curves with $R^2 \geq 0.9$ were considered.

To perform the competitive mix experiments, we combined each cybrid cell line from the mitochondrial haplogroup H with each cybrid cell line from the mitochondrial haplogroup Uk. We grew them in galactose or glucose medium for 10 days, and then we estimated the percentage of every genotype (H and Uk) by qRT-PCR at the final and initial (just after the mix) time points.

Genetics analysis

Samples from the volunteers were genetically characterized by performing PCR-RFLP for mitochondrial haplogroup-defining SNPs in the coding region and sequencing the hypervariable regions I and II (HVRI and HVRII) (6,44).

For molecular cytogenetic analysis of cybrids, cells were exposed to colchicines (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 4 h at 37°C and harvested routinely. Metaphases were prepared from the cybrids following a conventional cytogenetic protocol for methanol-acetic acid (3:1)-fixed cells. Slides were prepared from the fixed material and hybridized using the SKY method according to the manufacturer's protocol (Applied Spectral Imaging, Migdal Ha'Emek, Israel). Images were acquired with an SD300 Spectra Cube (Applied Spectral Imaging) mounted on a Zeiss Axioplan microscope using a custom-designed optical filter, SKY-1 (Chroma Technology, Brattleboro, VT, USA). Around 20 metaphase cells were captured and analyzed for each cell line.

The mtDNA sequence was obtained by using the BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, MD, USA) and an ABI Prism 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). To locate mutations, the human revised Cambridge reference sequence was used (GenBank NC_012920) (45). The mtDNA content was measured by the qRT-PCR method using an Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Thermal Cycling Block (Applied Biosystems), as described elsewhere (46). The mtDNA levels were determined in triplicate in three to five independent experiments.

The genotype shifting quantification in the mix experiments was performed by qRT-PCR, using TaqMan reagents. It includes two specific primers around the m.7028 position and two probes: one labeled with the fluorophore VIC that is specific for m.7028C; and another labeled with the fluorophore FAM that is specific for m.7028T. DNA was amplified in a final volume of 25 μl , using 12.5 μl of TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems), a final concentration of 0.9 μM of each primer, a final concentration of 0.2 μM of each probe and 10 ng of total DNA. The amplification was performed under universal conditions.

To assess the mtRNA levels, total RNA was isolated from exponentially growing cells using a RNA isolation kit (NucleoSpin® RNA II) from Macherey-Nagel according to the manufacturer's protocol; 2.5 μg of total RNA was reversed-transcribed into cDNA with the High capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems), using the manufacturer's conditions. The levels of MnSOD mRNA and mtRNAs were determined in triplicate in two independent experiments by qRT-PCR using the One-Step Real-Time

system (Applied Biosystems). The expression levels were normalized using the 18S rRNA. The comparative C_t method was used for relative quantification of gene expression as described by the real-time PCR machine manual. Differences in the C_t values (dC_t) of the transcript of interest and the reference gene were used to determine the relative expression of the gene in each sample. The dC_t method was used to calculate fold expression. StepOne software version 2.0 (Applied Biosystems) was used for data analysis.

Measurement of ROS production

The production of the mitochondrial superoxide anion was measured in triplicate with a Cytomics FC 500 flow cytometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) by using MitoSOX Red® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) as described previously (47), with slight modifications. The production of cell hydrogen peroxide was measured in triplicate in 4–5 independent experiments with the same flow cytometer by using 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (2,7-DCFH₂-DA) (Invitrogen) as described previously (48), with slight modifications. Aconitase activity was measured in triplicate in 3–5 independent experiments as described previously (49,50), with slight modifications. The values were expressed as mU/mg protein.

Determination of ATP levels

ATP levels were measured four times in three independent experiments as described previously (51), with some modifications, using the CellTiter-Glo® 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 6 h in record solution with either 5 mM glucose, 5 mM glucose plus 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ oligomycin (glycolytic ATP generation), 5 mM 2-deoxy-D-glucose plus 1 mM pyruvate (oxidative ATP production) or 5 mM 2-deoxy-D-glucose plus 1 mM pyruvate plus 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ oligomycin. 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.

Oxygen consumption and respiratory complex activities and levels

Oxygen consumption was analyzed using 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 μM) respiration analyses were performed. To correct for the oxygen consumption that is not due to the ETC, respiration inhibition by KCN was performed. Each cell line was measured three to four times in DMEM glucose. 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 (1 s time intervals) and analysis (52).

The enzymatic activities of OXPPOS CII and CIV and CS were assayed following previously described protocols (53–55) in a Unicam UV 500 spectrometer (Unicam Instruments, Cambridge, UK). 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. A NovoStar MBG Labtech microplate instrument was used for analysis.

Determination of MIMP and MIMS and cell viability

The determination of the MIMP was done in triplicate in three independent experiments using 3,3'-dihexyloxycarbocyanine [DiOC₆(3)] as published previously (56,57). The MIMS was measured, based on the quantity of cardiolipin, four times in three independent experiments by using NAO (nonyl-acridine-orange) (58). The cell viability was measured in triplicate in two independent experiments by using propidium iodide (PI) as described previously (59). A Beckman Coulter Cytomics FC500 cytometer was used for measurements of intracellular fluorescence.

MtDNA-encoded protein synthesis

The mitochondrial protein synthesis was analyzed as described previously (60) with minor modifications. Electrophoresis was performed with a Protean II xi system (BIORAD). 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) (Sigma). 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 (AMERSHAM), dried and used for autoradiography. The band intensities from appropriate exposures of the fluorograms from two independent gels were quantified by densitometric analysis with the Gelpro analyzer v 4.0. Three bands, corresponding to p.MT-ND5 (upper part of the gel), p.MT-ND1 (middle part of the gel) and p.MT-ND3 (lower part of the gel) polypeptides were selected for quantification.

Statistics analysis

The statistical package StatView 6.0 was used to perform all the statistics. Data for mean, standard deviation and sample size [$M \pm SD (N)$] are presented. The normal distribution was checked by the Kolmogorov–Smirnov test. For those normal variables, the unpaired two-tailed *t*-test was used to compare parameters. Those variables that were not normally distributed (ATP in glucose and in glucose plus oligomycin; genotype shifting) were analyzed by the non-parametric Mann–Whitney *U*-test (ATP in glucose and in glucose plus oligomycin) or the Wilcoxon signed-rank test (genotype shifting). *P*-values of <0.05 were considered statistically significant.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at *HMG* online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Belen Revilla, Magdalena Carreras, Santiago Morales and Dolores Herrero-Martín for their help in the laboratory; and Mamen Martín, Francesco Acquadro and Dr Juan Cigudosa from the Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) for the karyotyping analysis.

Conflict of Interest statement. None declared.

FUNDING

This work was supported by grants from Instituto de Salud Carlos III-FIS (PI07-0045 and PI08-0264) and Diputación General de Aragón (Grupos Consolidados B33, PM-083/2008 and PIPAMER0901). The CIBERER is an initiative of the ISCIII.

REFERENCES

- Montoya, J., Lopez-Gallardo, E., Diez-Sanchez, C., Lopez-Perez, M.J. and Ruiz-Pesini, E. (2009) 20 years of human mtDNA pathologic point mutations: carefully reading the pathogenicity criteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**, 476–483.
- Fan, W., Waymire, K.G., Narula, N., Li, P., Rocher, C., Coskun, P.E., Vannan, M.A., Narula, J., Macgregor, G.R. and Wallace, D.C. (2008) A mouse model of mitochondrial disease reveals germline selection against severe mtDNA mutations. *Science*, **319**, 958–962.
- Ruiz-Pesini, E., Mishmar, D., Brandon, M., Procaccio, V. and Wallace, D.C. (2004) Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA. *Science*, **303**, 223–226.
- Neel, J.V. (1962) Diabetes mellitus: a 'thrifty' genotype rendered detrimental by 'progress'? *Am. J. Hum. Genet.*, **14**, 353–362.
- Lander, E.S. (1996) The new genomics: global views of biology. *Science*, **274**, 536–539.
- Ruiz-Pesini, E., Lapena, A.C., Diez-Sanchez, C., Perez-Martos, A., Montoya, J., Alvarez, E., Diaz, M., Urries, A., Montoro, L., Lopez-Perez, M.J. *et al.* (2000) Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *Am. J. Hum. Genet.*, **67**, 682–696.
- Roubertoux, P.L., Sluyter, F., Carlier, M., Marcet, B., Maarouf-Veray, F., Cherif, C., Marican, C., Arrechi, P., Godin, F., Jamon, M. *et al.* (2003) Mitochondrial DNA modifies cognition in interaction with the nuclear genome and age in mice. *Nat. Genet.*, **35**, 65–69.
- Pravenec, M., Hyakukoku, M., Houstek, J., Zidek, V., Landa, V., Mlejnek, P., Miksik, I., Dudova-Mothejzickova, K., Pecina, P., Vrbacky, M. *et al.* (2007) Direct linkage of mitochondrial genome variation to risk factors for type 2 diabetes in conplastic strains. *Genome Res.*, **17**, 1319–1326.
- Yu, X., Gimsa, U., Wester-Rosenlof, L., Kanitz, E., Otten, W., Kunz, M. and Ibrahim, S.M. (2009) Dissecting the effects of mtDNA variations on complex traits using mouse conplastic strains. *Genome Res.*, **19**, 159–165.
- Yu, X., Wester-Rosenlof, L., Gimsa, U., Holzhueter, S.A., Marques, A., Jonas, L., Hagenow, K., Kunz, M., Nizze, H., Tiedge, M. *et al.* (2009) The mtDNA nt7778 G/T polymorphism affects autoimmune diseases and reproductive performance in the mouse. *Hum. Mol. Genet.*, **18**, 4689–4698.
- Moreno-Loshuertos, R., Acin-Perez, R., Fernandez-Silva, P., Movilla, N., Perez-Martos, A., Rodriguez de Cordoba, S., Gallardo, M.E. and Enriquez, J.A. (2006) Differences in reactive oxygen species production explain the phenotypes associated with common mouse mitochondrial DNA variants. *Nat. Genet.*, **38**, 1261–1268.
- Hao, H., Morrison, L.E. and Moraes, C.T. (1999) Suppression of a mitochondrial tRNA gene mutation phenotype associated with changes in the nuclear background. *Hum. Mol. Genet.*, **8**, 1117–1124.
- Michikawa, Y., Mazzucchelli, F., Bresolin, N., Scarlato, G. and Attardi, G. (1999) Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication. *Science*, **286**, 774–779.
- Croizat, B. and Attardi, G. (1975) Selective *in vivo* damage by 'visible' light of BrdU-containing mitochondrial DNA in a thymidine kinase-deficient mouse cell line with persistent mitochondrial enzyme activity. *J. Cell Sci.*, **19**, 69–84.

15. Seibel, P., Di Nunno, C., Kukat, C., Schafer, I., Del Bo, R., Bordoni, A., Comi, G.P., Schon, A., Capuano, F., Latorre, D. *et al.* (2008) Cosegregation of novel mitochondrial 16S rRNA gene mutations with the age-associated T414G variant in human cybrids. *Nucleic Acids Res.*, **36**, 5872–5881.
16. Ruiz-Pesini, E., Lott, M.T., Procaccio, V., Poole, J.C., Brandon, M.C., Mishmar, D., Yi, C., Kreuziger, J., Baldi, P. and Wallace, D.C. (2007) An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny. *Nucleic Acids Res.*, **35**, D823–D828.
17. Rocher, C., Taanman, J.W., Pierron, D., Faustin, B., Benard, G., Rossignol, R., Malgat, M., Pedespan, L. and Letellier, T. (2008) Influence of mitochondrial DNA level on cellular energy metabolism: implications for mitochondrial diseases. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **40**, 59–67.
18. Suissa, S., Wang, Z., Poole, J., Wittkopp, S., Feder, J., Shutt, T.E., Wallace, D.C., Shadel, G.S. and Mishmar, D. (2009) Ancient mtDNA genetic variants modulate mtDNA transcription and replication. *PLoS Genet.*, **5**, e1000474.
19. Achanta, G., Sasaki, R., Feng, L., Carew, J.S., Lu, W., Pelicano, H., Keating, M.J. and Huang, P. (2005) Novel role of p53 in maintaining mitochondrial genetic stability through interaction with DNA Pol gamma. *EMBO J.*, **24**, 3482–3492.
20. Ma, Y.S., Wu, S.B., Lee, W.Y., Cheng, J.S. and Wei, Y.H. (2009) Response to the increase of oxidative stress and mutation of mitochondrial DNA in aging. *Biochim. Biophys. Acta*, **1790**, 1021–1029.
21. Geromel, V., Kadhom, 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.
22. Montoya, J., Gaines, G.L. and Attardi, G. (1983) The pattern of transcription of the human mitochondrial rRNA genes reveals two overlapping transcription units. *Cell*, **34**, 151–159.
23. Gaines, G., Rossi, C. and Attardi, G. (1987) Markedly different ATP requirements for rRNA synthesis and mtDNA light strand transcription versus mRNA synthesis in isolated human mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **262**, 1907–1915.
24. Arning, L., Haghikia, A., Taherzadeh-Fard, E., Saft, C., Andrich, J., Pula, B., Hoxtermann, S., Wiczorek, S., Akkad, D.A., Perrech, M. *et al.* Mitochondrial haplogroup H correlates with ATP levels and age at onset in Huntington disease. *J. Mol. Med.*, **88**, 431–436.
25. Villani, G. and Attardi, G. (2001) *In vivo* measurements of respiration control by cytochrome c oxidase and *in situ* analysis of oxidative phosphorylation. *Methods Cell Biol.*, **65**, 119–131.
26. Renner, K., Amberger, A., Konwalinka, G., Kofler, R. and Gnaiger, E. (2003) Changes of mitochondrial respiration, mitochondrial content and cell size after induction of apoptosis in leukemia cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1642**, 115–123.
27. Brookes, P.S. (2005) Mitochondrial H(+) leak and ROS generation: an odd couple. *Free Radic. Biol. Med.*, **38**, 12–23.
28. Amo, T., Yadava, N., Oh, R., Nicholls, D.G. and Brand, M.D. (2008) Experimental assessment of bioenergetic differences caused by the common European mitochondrial DNA haplogroups H and T. *Gene*, **411**, 69–76.
29. Skulachev, V.P. (1998) Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta*, **1363**, 100–124.
30. Beckstead, W.A., Ebbert, M.T., Rowe, M.J. and McClellan, D.A. (2009) Evolutionary pressure on mitochondrial cytochrome *b* is consistent with a role of Cytb17T affecting longevity during caloric restriction. *PLoS One*, **4**, e5836.
31. Fisher, N. and Rich, P.R. (2000) A motif for quinone binding sites in respiratory and photosynthetic systems. *J. Mol. Biol.*, **296**, 1153–1162.
32. di Rago, J.P., Perea, X. and Colson, A.M. (1986) DNA sequence analysis of diuron-resistant mutations in the mitochondrial cytochrome *b* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, **208**, 208–210.
33. Covian, R. and Trumppower, B.L. (2008) Regulatory interactions in the dimeric cytochrome bc(1) complex: the advantages of being a twin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1777**, 1079–1091.
34. Trifunovic, A., Hansson, A., Wredenberg, A., Rovio, A.T., Dufour, E., Khvorostov, I., Spelbrink, J.N., Wibom, R., Jacobs, H.T. and Larsson, N.G. (2005) Somatic mtDNA mutations cause aging phenotypes without affecting reactive oxygen species production. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **102**, 17993–17998.
35. Zielonka, J. and Kalyanaraman, B. (2008) ‘ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis’—a critical commentary. *Free Radic. Biol. Med.*, **45**, 1217–1219.
36. Yang, J., Su, Y. and Richmond, A. (2007) Antioxidants tiron and *N*-acetyl-L-cysteine differentially mediate apoptosis in melanoma cells via a reactive oxygen species-independent NF-kappaB pathway. *Free Radic. Biol. Med.*, **42**, 1369–1380.
37. Kazuno, A.A., Munakata, K., Nagai, T., Shimozone, S., Tanaka, M., Yoneda, M., Kato, N., Miyawaki, A. and Kato, T. (2006) Identification of mitochondrial DNA polymorphisms that alter mitochondrial matrix pH and intracellular calcium dynamics. *PLoS Genet.*, **2**, e128.
38. Bellizzi, D., Taverna, D., D’Aquila, P., De Blasi, S. and De Benedictis, G. (2009) Mitochondrial DNA variability modulates mRNA and intra-mitochondrial protein levels of HSP60 and HSP75: experimental evidence from cybrid lines. *Cell Stress Chaperones*, **14**, 265–271.
39. Desquiret, V., Loiseau, D., Jacques, C., Douay, O., Malthiery, Y., Ritz, P. and Roussel, D. (2006) Dinitrophenol-induced mitochondrial uncoupling *in vivo* triggers respiratory adaptation in HepG2 cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 21–30.
40. Campanella, M., Parker, N., Tan, C.H., Hall, A.M. and Duchon, M.R. (2009) IF(1): setting the pace of the F(1)F(o)-ATP synthase. *Trends Biochem. Sci.*, **34**, 343–350.
41. Wallace, D.C. (1995) 1994 William Allan Award Address. Mitochondrial DNA variation in human evolution, degenerative disease, and aging. *Am. J. Hum. Genet.*, **57**, 201–223.
42. King, M.P. and Attardi, G. (1989) Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science*, **246**, 500–503.
43. 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.
44. Brown, M.D., Voljavec, A.S., Lott, M.T., MacDonald, I. and Wallace, D.C. (1992) Leber’s hereditary optic neuropathy: a model for mitochondrial neurodegenerative diseases. *FASEB J.*, **6**, 2791–2799.
45. 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.
46. 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.*, **99**, 1372–1377.
47. Mukhopadhyay, P., Rajesh, M., Hasko, G., Hawkins, B.J., Madesh, M. and Pacher, P. (2007) Simultaneous detection of apoptosis and mitochondrial superoxide production in live cells by flow cytometry and confocal microscopy. *Nat. Protoc.*, **2**, 2295–2301.
48. 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.
49. Gardner, P.R. (2002) Aconitase: sensitive target and measure of superoxide. *Methods Enzymol.*, **349**, 9–23.
50. Vergani, L., Floreani, M., Russell, A., Cecon, M., Napoli, E., Cabrelle, A., Valente, L., Bragantini, F., Leger, B. and Dabbeni-Sala, F. (2004) Antioxidant defences and homeostasis of reactive oxygen species in different human mitochondrial DNA-depleted cell lines. *Eur. J. Biochem.*, **271**, 3646–3656.
51. McKenzie, M., Liolitsa, D., Akinshina, N., Campanella, M., Sisodiya, S., Hargreaves, I., Nirmalanathan, N., Sweeney, M.G., Abou-Sleiman, P.M., Wood, N.W. *et al.* (2007) Mitochondrial ND5 gene variation associated with encephalomyopathy and mitochondrial ATP consumption. *J. Biol. Chem.*, **282**, 36845–36852.
52. Gnaiger, E., Steinlechner-Maran, R., Mendez, G., Eberl, T. and Margreiter, R. (1995) Control of mitochondrial and cellular respiration by oxygen. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **27**, 583–596.
53. King, T.E. (1966) Reconstitution of the respiratory chain. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **28**, 155–236.
54. 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.

55. Faloona, G.R. and Srere, P.A. (1969) *Escherichia coli* citrate synthase. Purification and the effect of potassium on some properties. *Biochemistry*, **8**, 4497–4503.
56. Zamzami, N., Metivier, D. and Kroemer, G. (2000) Quantitation of mitochondrial transmembrane potential in cells and in isolated mitochondria. *Methods Enzymol.*, **322**, 208–213.
57. von Kleist-Retzow, J.C., Hornig-Do, H.T., Schauen, M., Eckertz, S., Dinh, T.A., Stassen, F., Lottmann, N., Bust, M., Galunska, B., Wielckens, K. *et al.* (2007) Impaired mitochondrial Ca²⁺ homeostasis in respiratory chain-deficient cells but efficient compensation of energetic disadvantage by enhanced anaerobic glycolysis due to low ATP steady state levels. *Exp. Cell Res.*, **313**, 3076–3089.
58. 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.
59. Riccardi, C. and Nicoletti, I. (2006) Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat. Protoc.*, **1**, 1458–1461.
60. Chomyn, A. (1996) *In vivo* labeling and analysis of human mitochondrial translation products. *Methods Enzymol.*, **264**, 197–211.



Mitochondrial pharmacogenomics: barcode for antibiotic therapy

David Pacheu-Grau¹, Aurora Gómez-Durán¹, Manuel J. López-Pérez¹, Julio Montoya¹ and Eduardo Ruiz-Pesini^{1,2}

¹ Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular, Centro de Investigaciones Biomédicas En Red de Enfermedades Raras, Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud, Universidad de Zaragoza, 50013 Zaragoza, Spain

² Fundación Aragón I+D, Universidad de Zaragoza, 50013 Zaragoza, Spain

Ribosomal RNA (rRNA)-targeting drugs inhibit protein synthesis and represent effective antibiotics for the treatment of infectious diseases. Given the bacterial origins of mitochondria, the molecular and structural components of the protein expression system are much alike. Moreover, the mutational rate of mitochondrial rRNAs is higher than that of nuclear rRNAs, and some of these mutations might simulate the microorganism's rRNA structure. Consequently, individuals become more susceptible to antibiotics, the mitochondrial function is affected and toxic effects appear. Systems are available to analyze the interaction between antibiotics and mitochondrial DNA genetic variants, thus making a pharmacogenomic approach to antibiotic therapy possible.

Antibiotics and ribosomal RNAs

Antibiotics represent an impressive chemical arsenal for therapeutic intervention against pathogens. Only those compounds altering fundamental cell processes, with important negative consequences for pathogen survival, and with no side-effects in humans will be considered as potentially useful antibiotics. Approximately 40% of antibiotics interfere with bacterial protein biosynthesis [1] and target functionally important sites on the ribosome. The ribosomes are ribozymes because the most important functions are carried out by the ribosomal RNA (rRNA). Thus, the decoding site, the peptidyl transferase center (PTC) and the protein exit tunnel are formed by rRNAs, and most ribosomal antibiotics interact primarily with these rRNAs [2–4].

Protein synthesis is a key and universal process, and the high evolutionary conservation of functional sites within rRNAs, targeted by ribosomal drugs, implies limitations with respect to selectivity and toxicity [5]. Still, comparisons of rRNA sequences from bacteria and eukaryotes have shown subtle differences in these locations, despite their conservation, and these minute differences might lead to drug selectivity [3]. Thus, a single nucleotide can determine the selectivity of drugs affecting protein syn-

thesis [5]. However, a multitude of different nucleotides located within the rRNA participate in the binding of a drug to its target region; correspondingly, several different nucleotide substitutions can be associated with selectivity and toxicity of the drug [5]. As a result, the same antibiotic might bind in different modes to slightly different ribosomal pockets, and this can be influenced not only by the often-conserved nucleotides of a functional site targeted by an antibiotic but also by the less-conserved peripheral rRNA residues [4].

Some mutations in the rRNAs of microorganisms modify the antibiotic-binding site and yield acquired drug resistance. Although the acquisition of a resistance mutation often imposes a toll on the fitness of the resistant microorganism, compensatory mechanisms can alleviate this and block the reversion to the sensitive phenotype [6]. Some resistance mutations in bacteria are present in human wild-type rRNA and can account for the antibiotic selectivity [7]. Therefore, the development of new antibiotics to deal with these resistant microorganisms will be hampered because they could increase their mitochondrial toxicity. Moreover, if bacterial rRNA mutations can induce resistance to an antibiotic, human rRNA mutations that mimic bacterial wild-type rRNA nucleotide could increase toxicity and be responsible for side-effects after the antibiotic therapy. Thus, knowledge of the

Corresponding author: Ruiz-Pesini, E. (eduruiz@unizar.es)

interaction of particular antibiotics with the different human rRNAs is crucial to avoid antibiotic toxicity.

Human cells contain cytosolic and mitochondrial ribosomes. The mitochondrial genome originated from an eubacterial ancestor, and the mitochondrial DNA (mtDNA)-encoded rRNAs (mt-rRNAs 12S and 16S) are much more similar to the prokaryotic ones (16S and 23S rRNAs) than to the nuclear-encoded ones (18S and 28S rRNAs) [8]. Because eubacteria cause most infectious diseases and antibiotic therapy has been developed to fight them, mt-rRNA sequence variation should be taken into account to avoid antibiotic toxicity.

OXPPOS, mtDNA, mitoribosomes and mitochondrial rRNAs

Mitochondria are intracellular organelles that contain several compartments: outer membrane, intermembrane space, inner membrane and matrix. In the inner membrane is located the oxidative phosphorylation (OXPHOS) system, which includes the electron transport chain (ETC) and the ATP synthase (complex V) (Fig. 1a) and which is the key for the survival of the cell and for accommodating the environment conditions. In fact, external signals, in the form of nutrients and oxygen, interact at the OXPPOS level and trigger intracellular responses mediated by second messengers, such as the red-ox state or the ATP, Ca^{2+} and reactive oxygen species (ROS) levels, and can modify the expression of many nuclear and mitochondrial genes.

In the mitochondrial matrix, there are several molecules of supercoiled, closed, circular DNA known as mtDNA. This DNA encodes for 13 fundamental OXPPOS subunits (Fig. 1b) found

from bacteria to humans. As an example, the seven mtDNA-encoded complex I subunits are the only components of the membrane arm of bacterial complex I, and the three mtDNA-encoded complex IV subunits are the only ones present in bacterial complex IV [9]. The rest of the mitochondrial proteins are encoded in the nucleus, synthesized in the cytosol and imported into the mitochondria. During evolution, the DNA from the endosymbiont decreased its size because redundant genes were lost, many other genes of the primitive bacteria were transferred to the nuclear DNA and the remaining ones were reduced in size [10]. Thus, the mitochondrial ribosomes (mitoribosomes) lack the 5S rRNA, their proteins are now nuclear encoded, and the size of the mitochondrial 12S (954 nucleotides) and 16S (1558 nucleotides) rRNA genes (MT-RNR1 and MT-RNR2) is approximately half as large as the bacterial rRNA genes [11]. However, both rRNAs are mitochondrially encoded in all the sequenced mtDNAs and encode for the most important rRNA domains, such as the decoding site or the PTC.

Human 55S mitoribosomes contain two subunits of 28S and 39S. The small one comprises 12S rRNA and 28 proteins, and the large contains the 16S rRNA and 48 proteins. Surprisingly, the rRNA:protein ratio in mitoribosomes is different (1:2) to that in cytosolic and bacterial ribosomes (2:1). Mitoribosomes contain higher protein content and lack several of the major rRNA structures of bacterial ribosomes. Despite being encoded in the nuclear chromosomes, the mitoribosome proteins evolve faster than those of cytosolic ribosomes [11]. It is possible that the faster evolution by oxidative mutagenesis of the mtDNA enables the mt-rRNAs to compensate for new changes in the mitochondrial ribosome proteins [12].

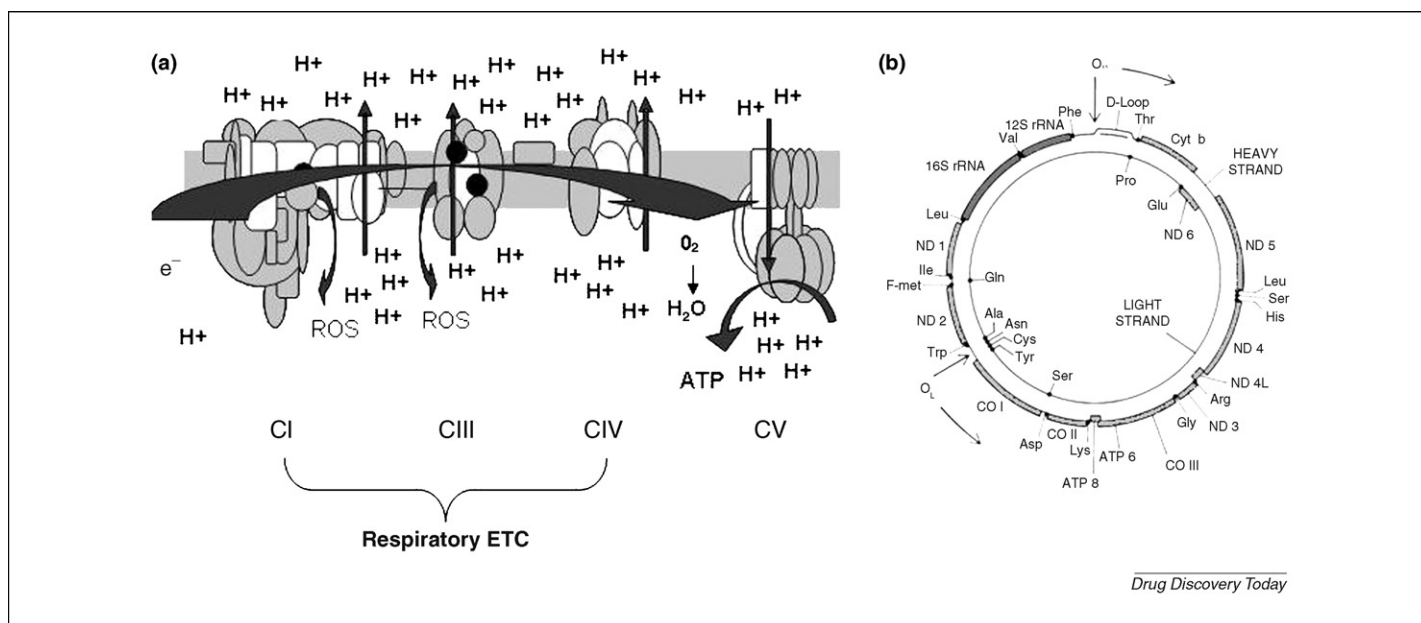


FIGURE 1

Scheme of the oxidative phosphorylation system and mitochondrial genome. **(a)** Oxidative phosphorylation system. The respiratory complexes (CI, NADH: ubiquinone oxidoreductase; CIII, Ubiquinol: cytochrome c oxidoreductase and CIV, cytochrome c oxidase), plus ubiquinone and cytochrome c (components of the ETC), transfer electrons to finally reduce oxygen to water. These complexes pump protons to the intermembrane space, creating an electrochemical gradient. When protons come back to the mitochondrial matrix through CV, ATP is synthesized. Occasionally, electrons can be donated to oxygen in CI and CIII, thus producing reactive oxygen species (ROS). Moreover, this gradient can be used for other purposes, such as thermogenesis, apoptosis, protein or substrate import and maintenance of cellular calcium levels. **(b)** Genetic map of human mitochondrial DNA (mtDNA). MtDNA encodes seven (ND 1–6 and ND 4L) of the 46 subunits of complex I, 1 (Cyt b) of the 11 subunits of complex III, 3 (CO I–III) of the 13 proteins that compose complex IV and 2 (ATP 6 and 8) of the 16 subunits of complex V, plus 22 transfer RNAs (tRNAs), defined by the three-letter code, and two rRNAs (12S and 16S rRNAs) required for the expression of the mtDNA-encoded OXPPOS subunits.

Antibiotics, side-effects and mitochondrial protein synthesis

Antibiotic therapy is based on selective toxicity, meaning that the microorganism but not the host should be affected. However, because of the bacterial origin of mitochondria, some antibiotics could also act on mitochondrial protein synthesis and, therefore, have side-effects for human beings. Thus, chloramphenicol and oxazolidinones, acting on the PTC, produce myelosuppression [13,14] and cause lactic acidosis and optic and peripheral neuropathy, phenotypes frequently found in mitochondrialopathies [15,16]. By using human tissues or cells, after treatment with these antibiotics, cell growth, mitochondrial mass, respiratory complex activities, levels of mtDNA-encoded p.MT-CO1 and CO2 subunits, and mitochondrial protein synthesis are decreased, and these parameters tend to return to normal when the antibiotic is removed [17–19]. Cell growth inhibition does not happen in rho0 cells, which are not dependent on OXPHOS energy [14]. Another inhibitor of the large-subunit rRNA, erythromycin, also impairs cell growth in galactose medium and mitochondrial protein synthesis and might have accelerated a bioenergetics crisis in a patient with Leber's hereditary optic neuropathy disease [20]. Moreover, resistance to this antibiotic is sometimes cytoplasmically inherited [21].

Tetracyclines and aminoglycosides, acting on the small-subunit rRNA, can provoke side-effects in humans. Tetracycline treatment has been shown to produce immunosuppressive effects and to affect cytochrome oxidase activity in concanavalin-A-simulated thymocytes [22] and -HepG2 cells [23]. Aminoglycosides are both nephrotoxic and ototoxic. Although renal impairment is, in general, mild and reversible, ototoxicity is irreversible [24,25].

Among other factors, tissue-specific side-effects of an antibiotic might also be because of the physiological particularities of a given

tissue. For example, OXPHOS provides most of the cell ATP, but energy demands differ from one tissue to another. The nervous system is very dependent on mitochondrial energy, and optic neuropathy and sensorineural hearing loss are very common manifestations of mitochondrial syndromes owing to mtDNA mutations [26]. Curiously, toxic optic neuropathy and ototoxicity are sometimes found after the administration of different antibiotics, such as macrolides [27] or chloramphenicol [28].

Antibiotics and rare mt-rRNA genetic variants

The mutational rate of the mtDNA is much higher than that of nuclear DNA, and mt-rRNAs are probably the Achilles heel of ribosomal antibiotics [29]. Therefore, the population variation in the mt-rRNAs, simulating the prokaryote rRNA, might introduce variability in the toxicity of these drugs. How is it possible, then, that toxicity produced by antibiotics often remains undetected until a large number of patients have been exposed? If toxicity depends on particular genetic variants, the frequency of these variants will determine the prevalence of adverse events, and it might not be revealed by even a large Phase III trial. As an example, mtDNA is maternally inherited and evolves along human lineages, accumulating new mutations. Thus, the latest mutations originated in mtDNA will be very recent and rare in the population and will affect only one individual or pedigree. The m.3096T>C/MT-RNR2 transition has been observed once in the analysis of 2959 mtDNA sequences (0.034%) [30]. If an antibiotic produced an adverse event in 0.034% of the patients, it would be necessary to expose more than 30,000 patients before the probability of the event became evident [31]. This transition (Fig. 2) is equivalent to Ec.2609T>C in *Escherichia coli*. This position, located less than 4.4 Å away from the 11-OH and 12-OH groups of the

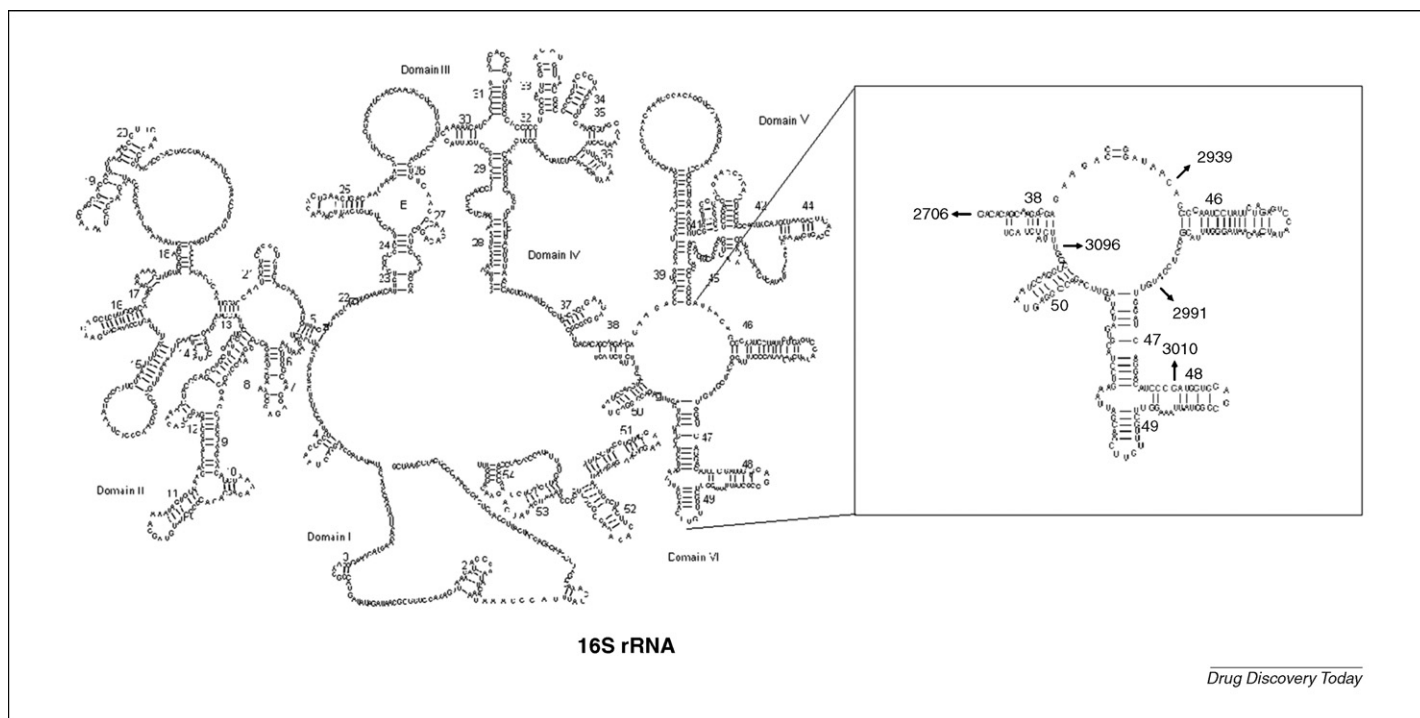
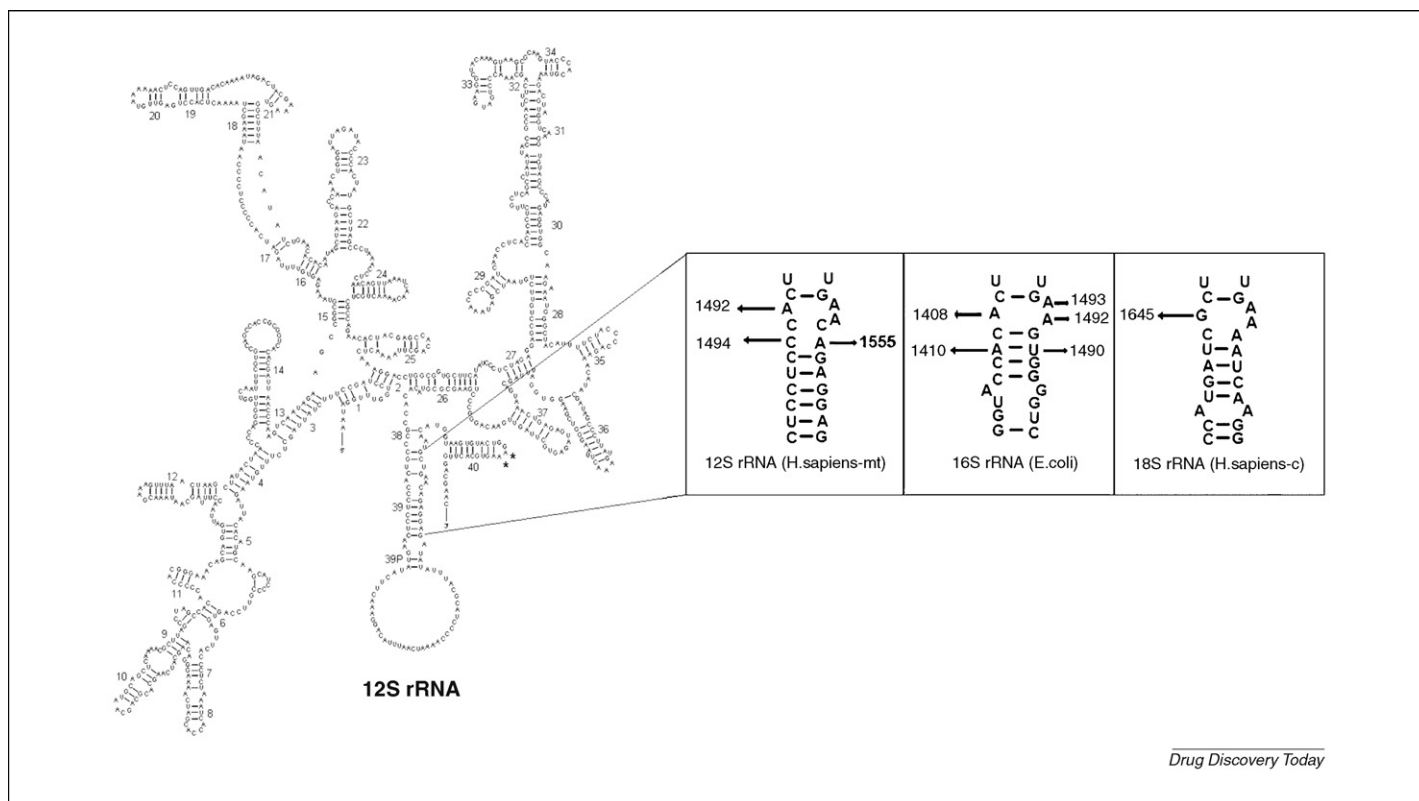


FIGURE 2

Mitoribosome large-subunit rRNA. The secondary structure of the 16S rRNA is represented, highlighting the peptidyl transferase center (PTC) and the nucleotide positions discussed in the text.

**FIGURE 3**

Mitoribosome small-subunit rRNA. The secondary structure of the 12S rRNA is represented, highlighting the decoding site. A comparison of this site in bacterial, cyto- and mitoribosomes is shown. Nucleotide positions discussed in the text are indicated. Asterisks in loop 40 denote methylated positions.

lactone ring from the macrolides [2], facilitates the shift of the antibiotic to the high-affinity site [32], decreases the minimal inhibitory concentration, and increases affinity to erythromycin and azithromycin. This slightly increases sensitivity to these antibiotics [33].

Another example is familial susceptibility to aminoglycosides. During decoding, a minihelix is formed between the messenger RNA (mRNA) codon and the cognate aminoacyl-transfer RNA (tRNA) anticodon. The two conserved adenines (Ec.1492A and Ec.1493A) of the A-site, folded back within the helix ('off' state), are flipped out and interact with the cognate codon–anticodon minihelix ('on' state). This conformational change determines the continuation of translation. The aminoglycosides stabilize the 'on' state even in the absence of the cognate tRNA–mRNA complex, the affinity of this site for a non-cognate tRNA increases, efficient discrimination is prevented and proteins with wrong sequences are produced [34,35]. The aminoglycoside selectivity is largely because of a single nucleotide position within the rRNA. The cytoribosomes are insensitive to the aminoglycosides because of the presence of a c.1645G [36] (Fig. 3). The sensitivity of the prokaryote ribosomes is due to the presence of an Ec.1408A in *E. coli*'s 16S rRNA, and the bacteria can become resistant to aminoglycosides by mutating this position to the eukaryotic nucleotide (Ec.1408A>G) [29]. Human mitochondrial 12S rRNA has an A in the equivalent position, m.1492A, and is sensitive to aminoglycosides. Moreover, two mt-rRNA mutations have been associated with familial aminoglycoside-related hearing loss (m.1494C>T and m.1555A>G) [37,38]. The equivalent positions in the bacterial 16S rRNA, which form a Watson–Crick base pair

(WCbp), are important for aminoglycoside binding. Wild-type mitochondria lack the WCbp, but the pathologic mutations rebuild it and increase its similarity to its eubacterial homologue, enabling aminoglycoside binding [39–41]. If these mutations were deleterious when associated with aminoglycosides, they would have been phenotypically neutral until the beginning of the antibiotics era. As an example, deafness associated with m.1555A>G is very common in Spain owing to the acquisition of the mutation from a common maternal ancestor. Because pedigrees with this mutation were not related in the four previous generations, the female ancestor in whom the mutation appeared cannot be very recent, the selection against this mutation must be low and it could be transmitted for many generations [42]. Something similar happened for the m.1494C>T mutation. The transition was found in a normal individual from a population study and defines a small cluster in mtDNA haplogroup A [43]. Therefore, it cannot be very pathologic and antibiotics, or other factors, are probably necessary to trigger the hearing loss phenotype.

Despite the low frequency of each of the mutations that potentially increase antibiotic susceptibility, together they might be an important health problem. In fact, an analysis of 2460 mtDNA sequences and Mitomap (<http://www.mitomap.org>) has shown that 315 of the 2512 mt-rRNA positions (12.5%) are polymorphic [44], although most of them will not affect the interaction with antibiotics.

Antibiotics and common mt-rRNA genetic variants

Measurable signs of hearing loss are found in 20% of patients receiving aminoglycosides [24], although the frequency of the

previously mentioned m.1494C>T and m.1555A>G mutations is low. Therefore, other mt-rRNA variants with higher population frequencies could behave as susceptibility factors. Many mitochondrial genetic variants are ancient mutations that survived and expanded in populations. These polymorphisms define mitochondrial haplogroups (clusters of phylogenetically related mitochondrial genotypes) and are relatively frequent in human populations. Thus, m.827A>G and m.1095T>C mutations are found in different aminoglycoside-related hearing loss pedigrees [45,46], but these mutations define important mtDNA haplogroups [30,44].

Which mt-rRNA population polymorphisms will affect the interaction with antibiotics? As we have seen, antibiotics bind in functionally important positions. Frequently, in the absence of the antibiotic, the bacterial biological efficiency is decreased in the resistant genotype, meaning that this genotype has a phenotypical effect. In fact, this approach has been proposed for the finding of new rRNA targets [47]. Therefore, the association of a human phenotype with mt-rRNA variants could be a way to look for genetic variants that might affect the interaction with antibiotics. For example, the position m.2706A defines several small clusters of haplogroups L0, D4, U1811 and J1c and the whole haplogroup H. Although the last one is not the oldest of the Western Eurasian haplogroups, it is paradoxically the most frequent (approximately 45%). Moreover, this haplogroup has been associated with increased survival after sepsis and it has been suggested that this nucleotide position could have a subtle effect on mitochondrial protein synthesis, which is unmasked during sepsis [48]. The m.2706A>G transition has been proposed as predisposing individuals to linezolid-associated lactic acidosis [49]. Interestingly, this nucleotide is located at helix 38 of the mitochondrial 16S rRNA, very close to the PTC (Fig. 2). A potential mitochondrial resistance, originated by this nucleotide, to antibiotics used in intensive care units might be responsible for the increased survival of patients

with this haplogroup because recovery after sepsis is directly related to physiological reserve, and this is crucially dependent on mitochondrial function [48]. Another 16S rRNA mutation that might influence susceptibility to antibiotics is the m.3010G>A variant. This mutation defines several clusters in the haplogroups L2a, L3, C, R* and U3 and major mitochondrial subhaplogroups, such as H1, J1 and D4. The last two of these have been shown to be over-represented in centenarians [50]. This variant rebuilds a base pair in a short stem (helix 48), which is part of the ribosomal A-site (Fig. 2). Mutations in this stem confer resistance to avilamycin and evernimicin [51]. Moreover, this m.3010G>A transition has been found in one individual that developed lactic acidosis after treatment with linezolid [49].

Because the side-effects are not very frequent, although antibiotics are widely used and mitochondrial haplogroups show high frequencies in the populations, other factors must be involved in generating toxic effects.

Mitochondrial susceptibility to antibiotics is probably a multifactorial phenotype

Streptomycin affects mitochondrial translation in cells with the HeLa cervical carcinoma nuclear background and the mtDNA m.1555G>A mutation [52], but it does not have this effect on cells with the 143B osteosarcoma nuclear background and the same mtDNA mutation [53]. Therefore, the nuclear genetic background will probably influence the toxicity produced by antibiotics. As an example, TFB1M is a mitochondrial transcription factor and it is closely related to rRNA methyltransferases. It has been shown that TFB1M expression in *E. coli* lacking the Ksg rRNA methyltransferase restores dimethylation of two adjacent adenine residues in a stem-loop structure of the bacterial 16S rRNA and reverses resistance to the antibiotic kasugamycin [54]. These residues, 28 nucleotides downstream from the pathogenic m.1555G>A mutation, are evolutionarily conserved in the mitochondrial 12S rRNA [55] (Fig. 3).

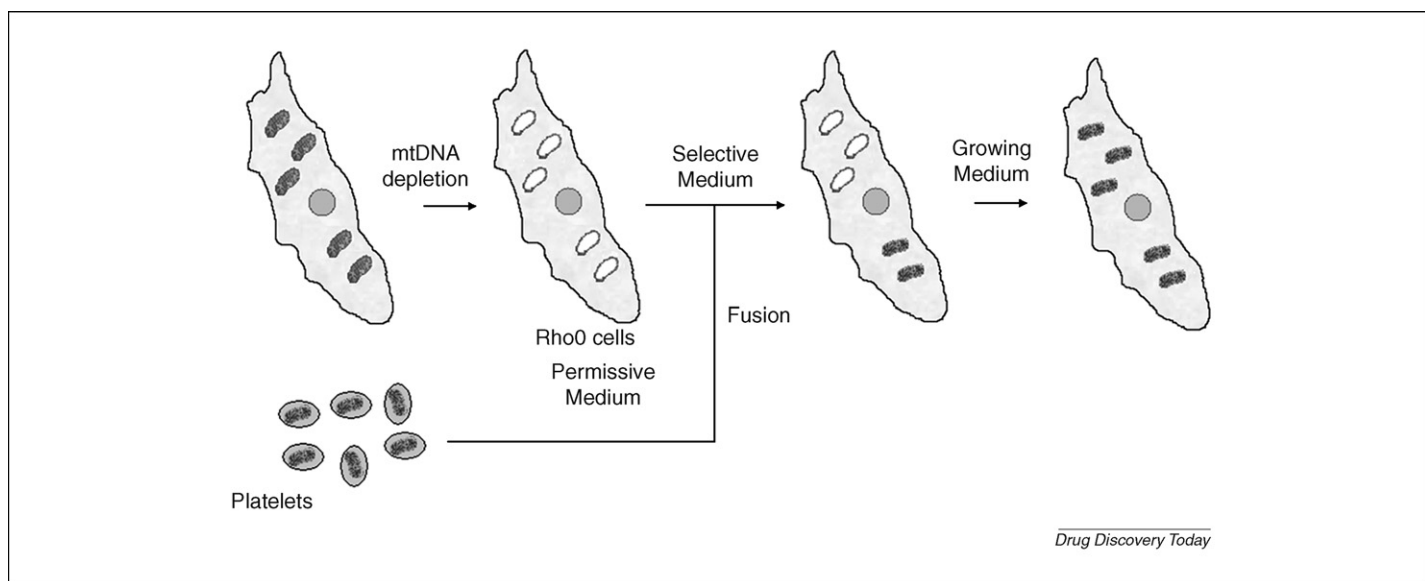


FIGURE 4

Transmitochondrial cell line construction. After removing the mtDNA from the cell by using drugs or mitochondrially targeted restriction endonucleases, the rho0 cells (containing mitochondria but no mtDNA) are fused with platelets and grown in selective medium. In these conditions, only cells repopulated with external mitochondria will be able to survive.

Interestingly, there is evidence that the nuclear genetic background influences the phenotypic expression of this mutation [56]. A polymorphism on chromosome 6 near the TFB1M gene but located outside of the coding region was implicated as a nuclear modifying locus of this mutation in several pedigrees of mitochondrial deafness [57]. Several clues suggest that altered TFB1M expression affects the penetrance of the m.1555G>A mutation by modifying the rRNA methylation. Therefore, nuclear genes involved in the modification or interaction with the mt-rRNAs should be considered when analyzing the phenotypic effects of particular ribosomal antibiotics on the mitochondrial translation.

Transmitochondrial cell lines for studying the effects of antibiotics

Ideally, to analyze the phenotypic effect of a particular mt-rRNA Single Nucleotide Polymorphism (SNP), we should use a system in which the rest of the variables remain homogeneous. Despite some limitations, such a system actually exists: the transmitochondrial cell lines. In this system, the mtDNA of a parental cell line is removed and the final product, the rho0 cell, is fused with cytoplasts (enucleated cells) or platelets (cell fragments without nucleus), originating cell lines known as 'cytoplasmic hybrids', or 'cybrids' (Fig. 4). By using the same rho0 cell line and different mitochondria sources, we will obtain cell lines sharing the same nuclear background and growing in the same environmental conditions. Thus, the only difference between them will be the mtDNA genotype, and their phenotypic differences will necessarily be due to the particular mtDNAs that they contain.

In fact, this cybrid system was used to demonstrate the mitochondrial inheritance of human chloramphenicol resistance. This resistance was due to the m.2939C>A/MT-RNR2 and m.2991T>C/MT-RNR2 mutations [58,59]. It has been shown that one of the oxygens of the p-NO₂ group of chloramphenicol seems to form hydrogen bonds with N4 of Ec.2452C (m.2939C), a nucleotide involved in tRNA-binding site P. The other p-NO₂ oxygen interacts with O4 of Ec.2504U (m.2991U) through an Mg ion. Both nucleotides are involved in chloramphenicol resistance in bacteria [2]. Furthermore, this system has been shown to be very useful for studying susceptibility to ribosomal antibiotics, such as erythromycin [20,21] and aminoglycosides [52,53,56,60].

An important disadvantage of the cybrid cell lines derives from their origin. The parental cell lines are highly proliferative tumor cells and they generate almost all ATP via glycolysis, despite abundant oxygen and functional mitochondria. These cells can be resistant to xenobiotics that impair mitochondrial function,

such as ribosomal antibiotics. However, there is a way to solve this problem. The metabolism of galactose is very slow in these cells and sometimes is not sufficient to synthesize the ATP requirements by glycolysis when OXPHOS is impaired [61]. Then, to increase the detection of the mitochondrial effects induced by drugs, cells can be forced to rely on OXPHOS rather than glycolysis by substituting galactose for glucose in the growth media [62]. Thus, the susceptibility to mitochondrial ribosomal antibiotics would increase.

Because mtDNA only encodes for 13 polypeptides, it is not difficult to analyze the mtDNA-encoded protein levels by using gel electrophoresis [63]. To perform these studies, radioactive methionine and cysteine and an inhibitor of the cytosolic protein synthesis, such as cycloheximide or emetine, are added to the cell culture, meaning only the mtDNA-encoded polypeptides will be marked and the thousands of nuclear-encoded mitochondrial proteins will not appear in the gel. By comparing cybrids harboring particular mtDNA genotypes and growing in the presence of different antibiotics, we can analyze the relationship between an mtDNA genetic background and its susceptibility to an antibiotic.

Nowadays, many other OXPHOS-related functions – such as growth curves in galactose, oxygen consumption, mitochondrial inner membrane potential, ROS production, respiratory complex activities and levels, calcium levels and ATP production – can be analyzed on a large scale, facilitating the screening of many antibiotics and mtDNA genetic backgrounds.

Concluding remarks

There are now thousands of published human mt-rRNA sequences. The sequence of many cytoplasmic eukaryotic, archaeobacteria and eubacteria rRNAs showing resistance or susceptibility to different antibiotics is known, and the crystal structure of some ribosomes is also known. We also have laboratory models to analyze specific mtDNA variants. Therefore, it would be useful to correlate different human mt-rRNA polymorphisms and the sensitivity or resistance of mitochondrial protein synthesis to inhibitors of bacterial translation. Such a pharmacogenomic approach might help to optimize antibiotic regimens on the basis of the patient's genetic background [4] and to increase the number of available antibiotics.

Acknowledgements

We thank Magdalena Carreras and Santiago Morales for their help in the laboratory. Our projects are supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III-FIS-PI08-0264 and the Diputación General de Aragón DGA-PM-083/2008.

References

- 1 Bashan, A. *et al.* (2003) Ribosomal crystallography: peptide bond formation and its inhibition. *Biopolymers* 70, 19–41
- 2 Schlunzen, F. *et al.* (2001) Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature* 413, 814–821
- 3 Auerbach, T. *et al.* (2004) Ribosomal antibiotics: structural basis for resistance, synergism and selectivity. *Trends Biotechnol.* 22, 570–576
- 4 Tenson, T. and Mankin, A. (2006) Antibiotics and the ribosome. *Mol. Microbiol.* 59, 1664–1677
- 5 Bottger, E.C. *et al.* (2001) Structural basis for selectivity and toxicity of ribosomal antibiotics. *EMBO Rep.* 2, 318–323
- 6 Andersson, D.I. (2003) Persistence of antibiotic resistant bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 452–456
- 7 Polacek, N. and Mankin, A.S. (2005) The ribosomal peptidyl transferase center: structure, function, evolution, inhibition. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 40, 285–311
- 8 Gray, M.W. *et al.* (2001) The origin and early evolution of mitochondria. *Genome Biol.* 2, 1018.1–1018.5
- 9 Wallace, D.C. (2007) Why do we still have a maternally inherited mitochondrial DNA? Insights from evolutionary medicine. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 781–821
- 10 Schneider, A. and Ebert, D. (2004) Covariation of mitochondrial genome size with gene lengths: evidence for gene length reduction during mitochondrial evolution. *J. Mol. Evol.* 59, 90–96
- 11 O'Brien, T.W. (2003) Properties of human mitochondrial ribosomes. *IUBMB Life* 55, 505–513

- 12 GuhaThakurta, D. and Draper, D.E. (1999) Protein-RNA sequence covariation in a ribosomal protein-rRNA complex. *Biochemistry* 38, 3633–3640
- 13 Yunis, A.A. (1989) Chloramphenicol toxicity: 25 years of research. *Am. J. Med.* 87, 44N–48N
- 14 Nagiec, E.E. *et al.* (2005) Oxazolidinones inhibit cellular proliferation via inhibition of mitochondrial protein synthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 3896–3902
- 15 Carelli, V. *et al.* (2002) Optic nerve degeneration and mitochondrial dysfunction: genetic and acquired optic neuropathies. *Neurochem. Int.* 40, 573–584
- 16 McKee, E.E. *et al.* (2006) Inhibition of mammalian mitochondrial protein synthesis by oxazolidinones. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 2042–2049
- 17 Denslow, N.D. and O'Brien, T.W. (1978) Antibiotic susceptibility of the peptidyl transferase locus of bovine mitochondrial ribosomes. *Eur. J. Biochem.* 91, 441–448
- 18 Soriano, A. *et al.* (2005) Mitochondrial toxicity associated with linezolid. *N. Engl. J. Med.* 353, 2305–2306
- 19 Garrabou, G. *et al.* (2007) Reversible inhibition of mitochondrial protein synthesis during linezolid-related hyperlactatemia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 962–967
- 20 Luca, C.C. *et al.* (2004) Erythromycin as a potential precipitating agent in the onset of Leber's hereditary optic neuropathy. *Mitochondrion* 4, 31–36
- 21 Doersen, C.J. and Stanbridge, E.J. (1979) Cytoplasmic inheritance of erythromycin resistance in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 4549–4553
- 22 Van den Bogert, C. *et al.* (1989) Mitochondrial biogenesis during the activation of lymphocytes by mitogens: the immunosuppressive action of tetracyclines. *J. Leukoc. Biol.* 46, 128–133
- 23 Nadanaciva, S. *et al.* (2009) Lateral-flow immunoassay for detecting drug-induced inhibition of mitochondrial DNA replication and mtDNA-encoded protein synthesis. *J. Immunol. Methods* 343, 1–12
- 24 Forge, A. and Schacht, J. (2000) Aminoglycoside antibiotics. *Audiol. Neurootol.* 5, 3–22
- 25 Talaska, A.E. *et al.* (2006) Molecular and genetic aspects of aminoglycoside-induced hearing loss. *Drug Discov. Today Dis. Mech.* 3, 119–124
- 26 Ruiz-Pesini, E. *et al.* (2006) Diseases of the human mitochondrial oxidative phosphorylation system. *Rev. Neurol.* 43, 416–424
- 27 McGhan, L.J. and Merchant, S.N. (2003) Erythromycin ototoxicity. *Otol. Neurotol.* 24, 701–702
- 28 Thomas, R.J. (1994) Neurotoxicity of antibacterial therapy. *South Med. J.* 87, 869–874
- 29 Bottger, E.C. (2007) Antimicrobial agents targeting the ribosome: the issue of selectivity and toxicity – lessons to be learned. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 791–795
- 30 Ruiz-Pesini, E. *et al.* (2007) An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny. *Nucleic Acids Res.* 35 (Database issue), D823–D828
- 31 Dykens, J.A. and Will, Y. (2007) The significance of mitochondrial toxicity testing in drug development. *Drug Discov. Today* 12, 777–785
- 32 Petropoulos, A.D. *et al.* (2009) Time-resolved binding of azithromycin to *Escherichia coli* ribosomes. *J. Mol. Biol.* 385, 1179–1192
- 33 Garza-Ramos, G. *et al.* (2001) Binding site of macrolide antibiotics on the ribosome: new resistance mutation identifies a specific interaction of ketolides with rRNA. *J. Bacteriol.* 183, 6898–6907
- 34 Carter, A.P. *et al.* (2000) Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* 407, 340–348
- 35 Vicens, Q. and Westhof, E. (2002) Crystal structure of a complex between the aminoglycoside tobramycin and an oligonucleotide containing the ribosomal decoding site. *Chem. Biol.* 9, 747–755
- 36 Fan-Minogue, H. and Bedwell, D.M. (2008) Eukaryotic ribosomal RNA determinants of aminoglycoside resistance and their role in translational fidelity. *RNA* 14, 148–157
- 37 Prezant, T.R. *et al.* (1993) Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat. Genet.* 4, 289–294
- 38 Zhao, H. *et al.* (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
- 39 Fischel-Ghodsian, N. *et al.* (2004) Mitochondrial dysfunction in hearing loss. *Mitochondrion* 4, 675–694
- 40 Hobbie, S.N. *et al.* (2008) Mitochondrial deafness alleles confer misreading of the genetic code. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 3244–3249
- 41 Hobbie, S.N. *et al.* (2008) Genetic analysis of interactions with eukaryotic rRNA identify the mitoribosome as target in aminoglycoside ototoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 20888–20893
- 42 Torroni, A. *et al.* (1999) The A1555G mutation in the 12S rRNA gene of human mtDNA: recurrent origins and founder events in families affected by sensorineural deafness. *Am. J. Hum. Genet.* 65, 1349–1358
- 43 Wang, C.Y. *et al.* (2006) mtDNA mutation C1494T, haplogroup A, and hearing loss in Chinese. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348, 712–715
- 44 Ruiz-Pesini, E. and Wallace, D.C. (2006) Evidence for adaptive selection acting on the tRNA and rRNA genes of human mitochondrial DNA. *Hum. Mutat.* 27, 1072–1081
- 45 Dai, P. *et al.* (2006) Extremely low penetrance of deafness associated with the mitochondrial 12S rRNA T1095C mutation in three Chinese families. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348, 200–205
- 46 Chaig, M.R. *et al.* (2008) A mutation in mitochondrial 12S rRNA, A827G, in Argentinean family with hearing loss after aminoglycoside treatment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 368, 631–636
- 47 Yassin, A. *et al.* (2005) Deleterious mutations in small subunit ribosomal RNA identify functional sites and potential targets for antibiotics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 16620–16625
- 48 Baudouin, S.V. *et al.* (2005) Mitochondrial DNA and survival after sepsis: a prospective study. *Lancet* 366, 2118–2121
- 49 Palenzuela, L. *et al.* (2005) Does linezolid cause lactic acidosis by inhibiting mitochondrial protein synthesis? *Clin. Infect. Dis.* 40, e113–e116
- 50 Rose, G. *et al.* (2001) Paradoxes in longevity: sequence analysis of mtDNA haplogroup J in centenarians. *Eur. J. Hum. Genet.* 9, 701–707
- 51 Kofoed, C.B. and Vester, B. (2002) Interaction of avilamycin with ribosomes and resistance caused by mutations in 23S rRNA. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 3339–3342
- 52 Inoue, K. *et al.* (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
- 53 Giordano, C. *et al.* (2002) Pathogenesis of the deafness-associated A1555G mitochondrial DNA mutation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 521–529
- 54 Cotney, J. *et al.* (2007) Relative abundance of the human mitochondrial transcription system and distinct roles for h-mTFB1 and h-mTFB2 in mitochondrial biogenesis and gene expression. *Nucleic Acids Res.* 35, 4042–4054
- 55 Seidel-Rogol, B.L. *et al.* (2003) Human mitochondrial transcription factor B1 methylates ribosomal RNA at a conserved stem-loop. *Nat. Genet.* 33, 23–24
- 56 Guan, M.X. *et al.* (2001) Nuclear background determines biochemical phenotype in the deafness-associated mitochondrial 12S rRNA mutation. *Hum. Mol. Genet.* 10, 573–580
- 57 Bykhovskaya, Y. *et al.* (2004) Human mitochondrial transcription factor B1 as a modifier gene for hearing loss associated with the mitochondrial A1555G mutation. *Mol. Genet. Metab.* 82, 27–32
- 58 Blanc, H. *et al.* (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
- 59 King, M.P. and Attardi, G. (1988) Injection of mitochondria into human cells leads to a rapid replacement of the endogenous mitochondrial DNA. *Cell* 52, 811–819
- 60 Zhao, H. *et al.* (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
- 61 Robinson, B.H. *et al.* (1992) Nonviability of cells with oxidative defects in galactose medium: a screening test for affected patient fibroblasts. *Biochem. Med. Metab. Biol.* 48, 122–126
- 62 Marroquin, L.D. *et al.* (2007) Circumventing the Crabtree effect: replacing media glucose with galactose increases susceptibility of HepG2 cells to mitochondrial toxicants. *Toxicol. Sci.* 97, 539–547
- 63 Chomyn, A. (1996) Platelet-mediated transformation of human mitochondrial DNA-less cells. *Methods Enzymol.* 264, 334–339



For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com

Influence of mtDNA genetic variation on antibiotic therapy

"...the number of people at risk for developing toxic side effects after therapy with translation-targeted antibiotics may be substantial."

KEYWORDS: antibiotic ■ mtDNA ■ mt-rRNA ■ SNP ■ toxicogenomics

The human mitochondrial genome (mtDNA) encodes 13 polypeptides of the oxidative phosphorylation system, the main pathway for energy production in the cell, and 24 RNAs (2 rRNAs and 22 tRNAs) that are required for their translation in mitochondrial ribosomes. Detailed phylogenetic analysis of small subunit rRNA sequences consistently indicates that mitochondria derive from α -proteobacteria [1,2]. These microorganisms include a wide variety of human pathogens that can be fought with antibiotics. The bacterial ribosome is the target of more than half of all antibiotic classes used in the clinic [3]. Unfortunately, many ribosomal antibiotics can affect the mitochondrial protein synthesis [4]. Recently, it has been shown that fibroblasts from patients with mitochondrial translation defects, which are caused by mutations in the nuclear-encoded components of the mitochondrial translation system, are more vulnerable to the toxic side effects associated with certain translation-targeted antibiotics [5]. Patients with nuclear mutations in genes encoding components of the mitochondrial translation system are rare, but patients with mtDNA pathologic mutations in these types of genes are more frequent. For instance, the prevalence of the m.3243A>G/*MT-TL1* (mt-tRNA^{Leu}) mutation in the white Australian population is 236 in 100,000 individuals (one in 424 individuals harbors this mutation) [6]. Furthermore, more than 250 different pathogenic mtDNA mutations have been identified [7]. Therefore, the number of people at risk for developing toxic side effects after therapy with translation-targeted antibiotics may be substantial. For example, erythromycin may have hastened a bioenergetic crisis in the optic nerve of a patient with the m.11778G>A mutation in a key component (p.MT-ND4) of the oxidative phosphorylation

system, which resulted in bilateral vision loss and optic nerve atrophy. This case underscores the importance of being cautious with the use of drugs that might interfere with the mitochondrial protein synthesis in individuals with an underlying mitochondrial dysfunction [8].

.....
"...it is possible that the individuals harboring these rRNA mutations were more resistant to particular antibiotics and could be treated with these drugs without having any toxic side effects."

A more direct effect of ribosomal antibiotics was found for two other mtDNA mutations, m.1494C>T and m.1555A>G, in the *MT-RNR1* (12S rRNA) gene. These mutations have been associated with familial aminoglycoside-related hearing loss. The equivalent positions in the bacterial rRNA (16S rRNA) form a Watson–Crick base pair that it is important for aminoglycoside binding. Wild-type mitochondrial 12S rRNA lacks this base pair but it can be rebuilt by any one of these mutations. Thus, the mutant mitochondrial rRNA is more similar to the bacterial rRNA and favors aminoglycoside binding, which can produce toxic side effects. The prevalence of the m.1555A>G mutation in an English or Australian white population is 190–210 in 100,000 (approximately one in 500 individuals harbors this mutation) [9,10]. In addition, many hearing loss patients in Spain harboring this mutation belong to haplogroup H (a group of phylogenetically related mtDNA genotypes). This over-representation of mtDNA haplogroup H is probably owing to a founder effect that occurred more than four generations ago [11]. In China, the m.1494C>T mutation is present in one in 241 patients with nonsyndromic hearing loss [12]. Moreover, this transition

David Pacheu-Grau

Departamento 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), Universidad de Zaragoza, 50013-Zaragoza, Spain

Aurora Gómez-Durán

Departamento 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), Universidad de Zaragoza, 50013-Zaragoza, Spain

Julio Montoya

Departamento 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), Universidad de Zaragoza, 50013-Zaragoza, Spain



Eduardo Ruiz-Pesini[†]

[†]Author for correspondence: Departamento 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), Universidad de Zaragoza, 50013-Zaragoza, Spain and Fundación ARAID. Universidad de Zaragoza, 50013-Zaragoza, Spain
 Tel.: +34 976 761 640
 Fax: +34 976 761 612
edurruiz@unizar.es

defines a small cluster in mtDNA haplogroup A [13] and, it has probably been present in the population for thousands of years. Therefore, negative selection against these mutations must be low. If these or similar mutations were particularly detrimental when associated with these drugs, then they would have been phenotypically neutral until the beginning of the antibiotic era. Therefore, they could actually be relatively frequent within a given population. In addition, an analysis of 2460 mtDNA sequences has shown that 315 of the 2512 mt-rRNA positions are polymorphic [14], and it is possible that some of these mt-rRNA polymorphisms can affect the patients reaction to certain antibiotics. Altogether, these mutations might represent an important health problem by increasing patients' susceptibility to particular antibiotics.

“Consequently, we need to look for other ways to increase our resistance to antibiotics.”

A single rRNA nucleotide can have a significant impact on the susceptibility/resistance of a microorganism to an antibiotic. For example, one of the oxygens from the chloramphenicol p-NO₂ group appears to form hydrogen bonds with the N4 of the 23S rRNA *Escherichia coli* (Ec).2452C nucleotide, which is a position involved in P-site tRNA binding. The other p-NO₂ group oxygen interacts with the O4 of the Ec.2504U nucleotide through a magnesium ion [15]. The Ec.2452C>U transition has been involved in chloramphenicol resistance in bacteria [16]. Mitochondrial protein synthesis is susceptible to the inhibitory effect of chloramphenicol, and the mitochondrial 16S rRNA m.2939 (Ec.2452) and m.2991 (Ec.2504) nucleotides have also been involved in the chloramphenicol resistance. Thus, human cell lines with the m.2939C>A or m.2991U>C mutations are chloramphenicol resistant [17,18]. On the other hand, an Ec.2609U>C transition in the bacterial 23S rRNA renders *E. coli* cells resistant to two different types of ketolides, telithromycin and ABT-773, but slightly increases their sensitivity to erythromycin, azithromycin and a cladinose-containing derivative of telithromycin [19]. This transition is equivalent to a m.3096T>C in the mitochondrial 16S rRNA, which has been documented in one person [20]. Therefore, it is possible that the individuals harboring these rRNA mutations were more resistant to particular antibiotics and could

be treated with these drugs without having any toxic side effects. This knowledge would increase the number of available antibiotics.

A single nucleotide can determine the selectivity of drugs affecting protein synthesis [21]. A number of bacterial rRNA mutations modify the antibiotic-binding site and result in acquired drug resistance. Certain resistance mutations in bacteria are present in human wild-type rRNA and can account for the antibiotic selectivity [22]. As a result, the development of new antibiotics to deal with these resistant microorganisms will be hindered because they could have increased mitochondrial toxicity. We cannot change our mtDNA genotype. Consequently, we need to look for other ways to increase our resistance to antibiotics. For example, it has been shown that the sensitivity to kasugamycin in *E. coli* is modulated by dimethylation of two adenine residues in the 3' terminal stem loop of the small rRNA. The mitochondrial mtTFB1 protein is an rRNA methyltransferase that is able to methylate the homologous stem loop in the mitochondrial 12S rRNA. The over expression of human mtTFB1 in HeLa cells results in increased sensitivity to the aminoglycoside antibiotic kasugamycin [23]. Therefore, specific inhibitors of the human mtTFB1 protein could increase an individual's resistance to aminoglycosides.

“We now have the required tools to begin mitochondrial antibiogenomics.”

To optimize antibiotic regimens, a thorough knowledge of the patient's genetic background will be required. This understanding will not only help to prevent the occurrence of toxic-side effects, but it will also increase the number of potential antibiotics. Then, a more rational use of these drugs will reduce the appearance of resistant bacteria. We now have the required tools to begin mitochondrial antibiogenomics [4].

Financial & competing interests disclosure

The authors projects are supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (FIS-PI08-0264) and Diputación General de Aragón (Grupos consolidados B33 and PM-083/2008). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Bibliography

- 1 Emelyanov VV: Rickettsiaceae, rickettsia-like endosymbionts, and the origin of mitochondria. *Biosci. Rep.* 21(1), 1–17 (2001).
- 2 Gray MW, Burger G, Lang BF: Mitochondrial evolution. *Science* 283(5407), 1476–1481 (1999).
- 3 Franceschi F: Back to the future: the ribosome as an antibiotic target. *Future Microbiol.* 2(6), 571–574 (2007).
- 4 Pacheu-Grau D, Gomez-Duran A, Lopez-Perez MJ *et al.*: Mitochondrial pharmacogenomics: barcode for antibiotic therapy. *Drug. Discov. Today.* 15(1–2), 33–39 (2010).
- 5 Jones CN, Miller C, Tenenbaum A *et al.*: Antibiotic effects on mitochondrial translation and in patients with mitochondrial translational defects. *Mitochondrion* 9(6), 429–437 (2009).
- 6 Manwaring N, Jones MM, Wang JJ *et al.*: Population prevalence of the MELAS A3243G mutation. *Mitochondrion* 7(3), 230–233 (2007).
- 7 Tuppen HA, Blakely EL, Turnbull DM *et al.*: Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1797(2), 113–128 (2010).
- 8 Luca CC, Lam BL, Moraes CT: Erythromycin as a potential precipitating agent in the onset of Leber's hereditary optic neuropathy. *Mitochondrion* 4(1), 31–36 (2004).
- 9 Bitner-Glindzicz M, Pembrey M, Duncan A *et al.*: Prevalence of mitochondrial 1555A->G mutation in European children. *N. Engl. J. Med.* 360(6), 640–642 (2009).
- 10 Vandebona H, Mitchell P, Manwaring N *et al.*: Prevalence of mitochondrial 1555A->G mutation in adults of European descent. *N. Engl. J. Med.* 360(6), 642–644 (2009).
- 11 Torroni A, Cruciani F, Rengo C *et al.*: The A1555G mutation in the 12S rRNA gene of human mtDNA: recurrent origins and founder events in families affected by sensorineural deafness. *Am. J. Hum. Genet.* 65(5), 1349–1358 (1999).
- 12 Zhu Y, Li Q, Chen Z *et al.*: Mitochondrial haplotype and phenotype of 13 Chinese families may suggest multi-original evolution of mitochondrial C1494T mutation. *Mitochondrion* 9(6), 418–428 (2009).
- 13 Wang CY, Kong QP, Yao YG *et al.*: mtDNA mutation C1494T, haplogroup A, and hearing loss in Chinese. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348(2), 712–715 (2006).
- 14 Ruiz-Pesini E, Wallace DC: Evidence for adaptive selection acting on the tRNA and rRNA genes of human mitochondrial DNA. *Hum. Mutat.* 27(11), 1072–1081 (2006).
- 15 Schlunzen F, Zarivach R, Harms J *et al.*: Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature* 413(6858), 814–821 (2001).
- 16 Aagaard C, Phan H, Trevisanato S *et al.*: A spontaneous point mutation in the single 23S rRNA gene of the thermophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius* confers multiple drug resistance. *J. Bacteriol.* 176(24), 7744–7747 (1994).
- 17 Blanc H, Adams CW, Wallace DC: Different nucleotide changes in the large rRNA gene of the mitochondrial DNA confer chloramphenicol resistance on two human cell lines. *Nucleic Acids Res.* 9(21), 5785–5795 (1981).
- 18 King MP, Attardi G: Injection of mitochondria into human cells leads to a rapid replacement of the endogenous mitochondrial DNA. *Cell* 52(6), 811–819 (1988).
- 19 Garza-Ramos G, Xiong L, Zhong P *et al.*: Binding site of macrolide antibiotics on the ribosome: new resistance mutation identifies a specific interaction of ketolides with rRNA. *J. Bacteriol.* 183(23), 6898–6907 (2001).
- 20 Ruiz-Pesini E, Lott MT, Procaccio V *et al.*: An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny. *Nucleic Acids Res.* 35, D823–D828 (2007).
- 21 Bottger EC, Springer B, Prammananan T *et al.*: Structural basis for selectivity and toxicity of ribosomal antibiotics. *EMBO Rep.* 2(4), 318–323 (2001).
- 22 Polacek N, Mankin AS: The ribosomal peptidyl transferase center: structure, function, evolution, inhibition. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 40(5), 285–311 (2005).
- 23 Cotney J, Wang Z, Shadel GS: Relative abundance of the human mitochondrial transcription system and distinct roles for h-mtTFB1 and h-mtTFB2 in mitochondrial biogenesis and gene expression. *Nucleic Acids Res.* 35(12), 4042–4054 (2007).



feature

Mitochondrial pharma-Q-genomics: Targeting the OXPHOS cytochrome *b*

Aurora Gómez-Durán¹, David Pacheu-Grau¹, Manuel J. López-Pérez¹, Julio Montoya¹ and Eduardo Ruiz-Pesini^{1,2,*}, eduruiz@unizar.es

Genetic variation in human cytochrome *b* generates structurally different coenzyme Q binding pockets, affects the coupling efficiency of the oxidative phosphorylation system and susceptibility to different medical conditions. As modification of coupling efficiency has already been shown to have therapeutic interest, these structural differences might be used to develop new drugs and allow for personalized medicine, giving rise to a new field: mitochondrial pharmacogenomics.

Human mitochondrial DNA (mtDNA) encodes 24 RNAs (2 rRNAs and 22 tRNAs) and 13 polypeptides of the oxidative phosphorylation (OXPHOS) system. One of these polypeptides, cytochrome *b* of the electron transport chain (ETC) complex III (CIII), is central to OXPHOS function. Cytochrome *b* contains two coenzyme Q binding sites: the outer Q_o and the inner Q_i. At Q_o, two ubiquinols are oxidized to ubiquinones and their electrons are sent to two different pathways. Two electrons are sent downstream where ultimately reduce oxygen to water, two other are directed towards Q_i, where a ubiquinone is reduced to ubiquinol. Concurrently, cytochrome *b* pumps protons to the intermembrane space, which contributes to the electrochemical gradient used for ATP production.

The importance of the Q binding sites is demonstrated by the fact that Q_o inhibitors, such as strobilurins, are widely used as agricultural fungicides [1]. Strobilurins are natural fungicides produced by various basidiomycetes. These organisms developed means to protect their own mitochondrial respiratory chains. In the case of the strobilurin A-producing basi-

diomycete, *Mycena galopoda*, natural resistance is achieved by a G143A mutation of the target site [2]. Thus, differences in Q_o sites between crops and their pathogenic fungi have allowed the development and use of Q_o inhibitors in agriculture. Other Q_o inhibitors exert notable inhibitory action on the respiratory processes of *Plasmodium falciparum*, the parasite that causes severe malaria. Q_o inhibitors such as myxothiazol and stigmatellin have been available for many years but are highly toxic to humans and not suitable for therapeutic use. However, the *P. falciparum* Q_o site has unusual structural features which may help drive drug selectivity [3]. A new compound, atovaquone, is active not only for the malaria parasite, but also for microorganisms that cause pneumonia (*Pneumocystis jirovecii*) and toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*). Again, interspecies differences in the drug target have allowed the development of therapeutic compounds active against the parasites with few adverse effects on humans.

Several mutations resulting in resistance to atovaquone have been reported in *P. falciparum* isolated from patients after treatment failure. For

example, Y268S/C mutations remove an aromatic residue important for stabilizing an interaction between the drug and residues within the Q_o site [4]. Additionally, several mutations that cause resistance to Q_o inhibitors have been described in plant pathogen fungi. The alanine in the cytochrome *b* 143 position of *Blumeria graminis*, *Sphaeroteca fuliginea* or *Plasmopara viticola* inhibits drug binding through simple steric hindrance [1,5,6]. Hence, intraspecies differences in the drug target allow distinct behaviors to a particular drug.

Usually, mutations causing resistance affect sites important for the cytochrome *b* function. Therefore, many of mutations are also associated with loss of fitness [7]. For example, the yeast Y279C mutation (Y268C in *Plasmodium*) affects ubiquinol binding and decreases cytochrome bc₁ activity to 50% of the control [8]. This mutation (Y278C in humans) has also been found in a patient suffering from a multisystem disorder [9]. It is important to realize that fitness costs for mutations causing resistance might vary with environmental conditions and energy demands.

If differences in parasite's Q sites can affect biological fitness and drug response, then important questions arise. Is there genetic variation in the Q sites of human cytochrome *b*? Does this variation have a phenotype? What are the molecular mechanisms? Are these mechanisms susceptible to modification? Can this variation be used for a personalized medicine?

Human mitochondrial DNA genetic variation at coenzyme Q binding sites of cytochrome *b*

Because of its particular location and genetic features, mtDNA accumulates mutations at a high rate [10]. Because nearly all mtDNA sequence is coding DNA, most mutations will affect a gene. When these mutations occur in the germinal line and survive in populations, new mtDNA genetic backgrounds are originated. Because mtDNA is exclusively transmitted by maternal lineage, new genotypes will be directly

related to their progenitors and will be very similar to other descendents of this progenitor mtDNA. Groups of phylogenetically related mtDNA genotypes are known as mtDNA haplogroups.

The cytochrome *b* gene is 1141 base pairs long, approximately 7% of the whole mtDNA, and many mtDNA mutations will hit it. In fact, an analysis of more than 3,500 human mtDNA sequences has shown that 124 (32.6%) of the 380 amino acids of cytochrome *b* are polymorphic and 52 (28.3%) of the 184 amino acids that constitute the Q sites (Qi, 15-40 and 190-239 [11]; Qo, 120-182 and 250-294 [12]) are also variable. Many of these polymorphisms in the Q sites have been found in one or a small number of individuals, but several define very important haplogroups. For example, the A229T mutation in Qi characterizes African L0a and Asian M30 haplogroups, A193T labels Asian haplogroup G1 and H16R, F18L and L236I define European

haplogroups U5a, Uk/J1c and JT, respectively. In the Qo site, A122T characterizes African haplogroup L2bc, G251S defines Asian haplogroup G1 and T158A and D171N label European haplogroups U5a1 and J2, respectively. The overall frequency of JT (including J1c, J2 and T), Uk and U5a (including U5a1) haplogroups in Europe is higher than 25% [13,14], meaning that one fourth of the European population harbors polymorphisms in the Q sites of cytochrome *b* (Fig. 1).

Phenotypic differences due to genetic variation of cytochrome *b* coenzyme Q binding sites

Using a phylogenetic tree that included more than 3,500 human mtDNA sequences and aligning 276 mammal species, we have found that human cytochrome *b* Q sites show less variation than the rest of the protein. Additionally, amino acids in these sites are more highly

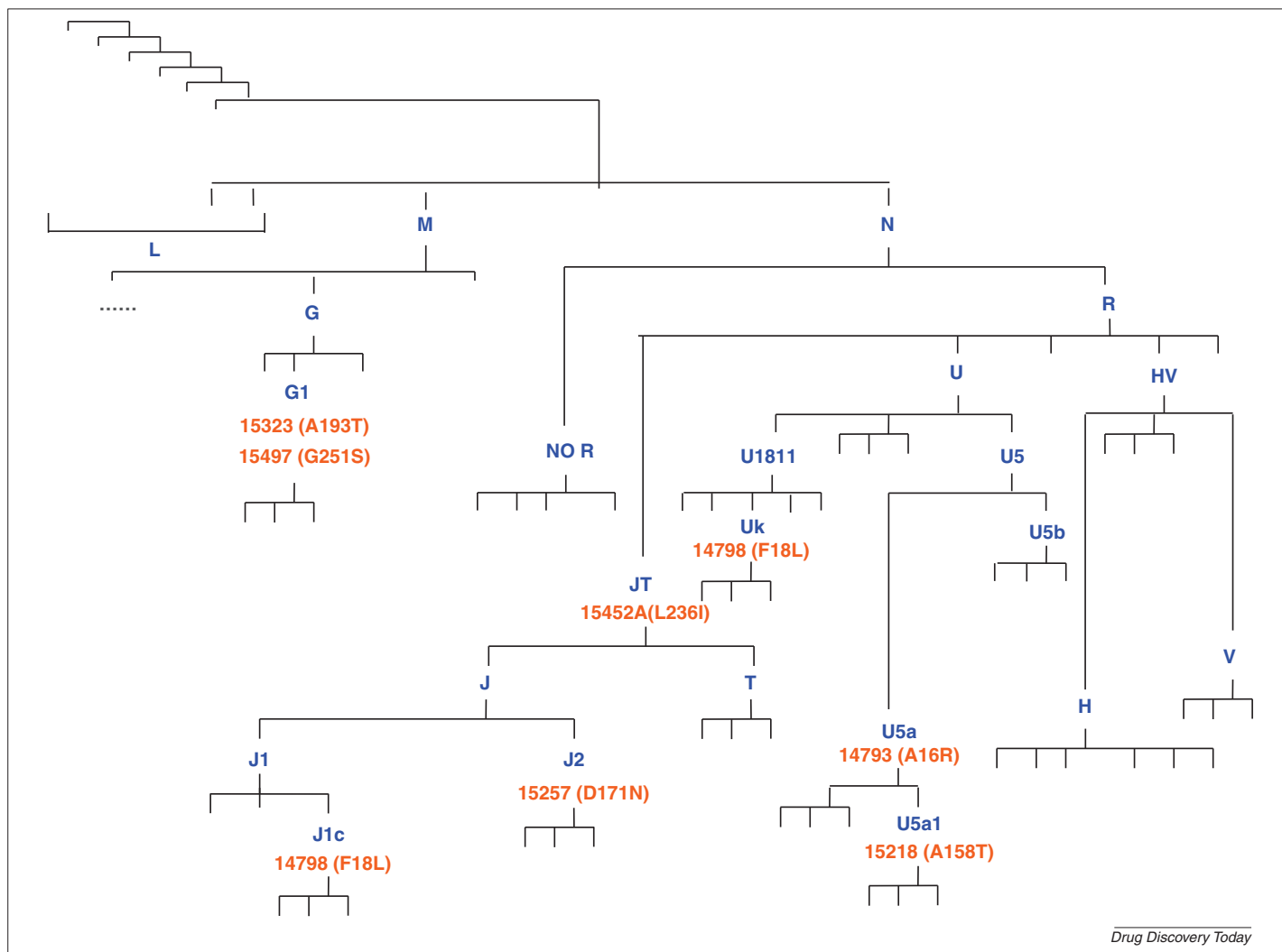


FIGURE 1

mtDNA phylogenetic tree. Important mtDNA haplogroups defined by cytochrome *b* Q site mutations are represented.

conserved than those found outside of them. This suggests that negative selection is stronger at these sites. Because selection implies phenotypic differences, it is possible that Q site mutations have an effect on human phenotypes. The importance of Q sites is evident after the observation that seven out of the nine pathologic missense mutations in cytochrome *b* are located in these sites (Qi – G34S, S35P; Qo – S151P, G166E, G251D, Y278C and G290D) [15] (Fig. 2). However, these mutations are very pathologic and will be quickly removed, causing their population frequencies to be very low.

Alternatively, population analysis has shown that cytochrome *b* and its Q sites are particularly variable in temperate zones of the world [16,17] (Fig. 2) and that positive selection may have played a role in shaping this variation [13,18]. Thus, distinct environmental conditions, such as climate, could differentially affect the biological fitness and select for particular mtDNA genotypes. In this sense, it has been shown that

mtDNA lineages with cytochrome *b* mutations, like U5a, were substantially enriched in northern Europe [13]. MtDNA haplogroups adapted to different environmental conditions would show distinct OXPHOS capacity and dissimilar susceptibility to particular phenotypes. Supporting this suggestion, epidemiologic studies have shown that mtDNA haplogroups J and Uk are susceptibility factors for Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) and resistance factors against aging and Parkinson's disease. Additionally, J and U5a haplogroups were elevated among HIV-1 infected people who display accelerated progression to AIDS and death and the Uk haplogroup is correlated with a significant increase in the risk of developing breast cancer [19]. Moreover, the G251S mutation, defining mtDNA haplogroup G1, has been associated with obesity in Japanese population [20].

Unfortunately, complete linkage disequilibrium in the mtDNA prevents assignment of a

particular phenotype to a specific polymorphism. However, molecular analyses allow refinement of these associations. Thus, it has been shown that biochemical and molecular-genetic differences between mtDNA haplogroups H and Uk are probably due to the F18L substitution in the cytochrome *b* Qi site [19]. By contrast, site-directed mutagenesis of the aspartic acid at position 187 to asparagine in *Rhodobacter sphaeroides* (D171N in humans) alters the photosynthetic apparatus and influences cellular physiology [21].

OXPHOS coupling efficiency

As we have previously commented, cytochrome *b* contributes to generation of an electrochemical gradient. In addition to ATP production, this gradient is used for many other purposes, such as importing proteins and substrates into the mitochondria, apoptosis, thermogenesis, maintenance of cytosolic calcium levels and production of reactive oxygen species (ROS).

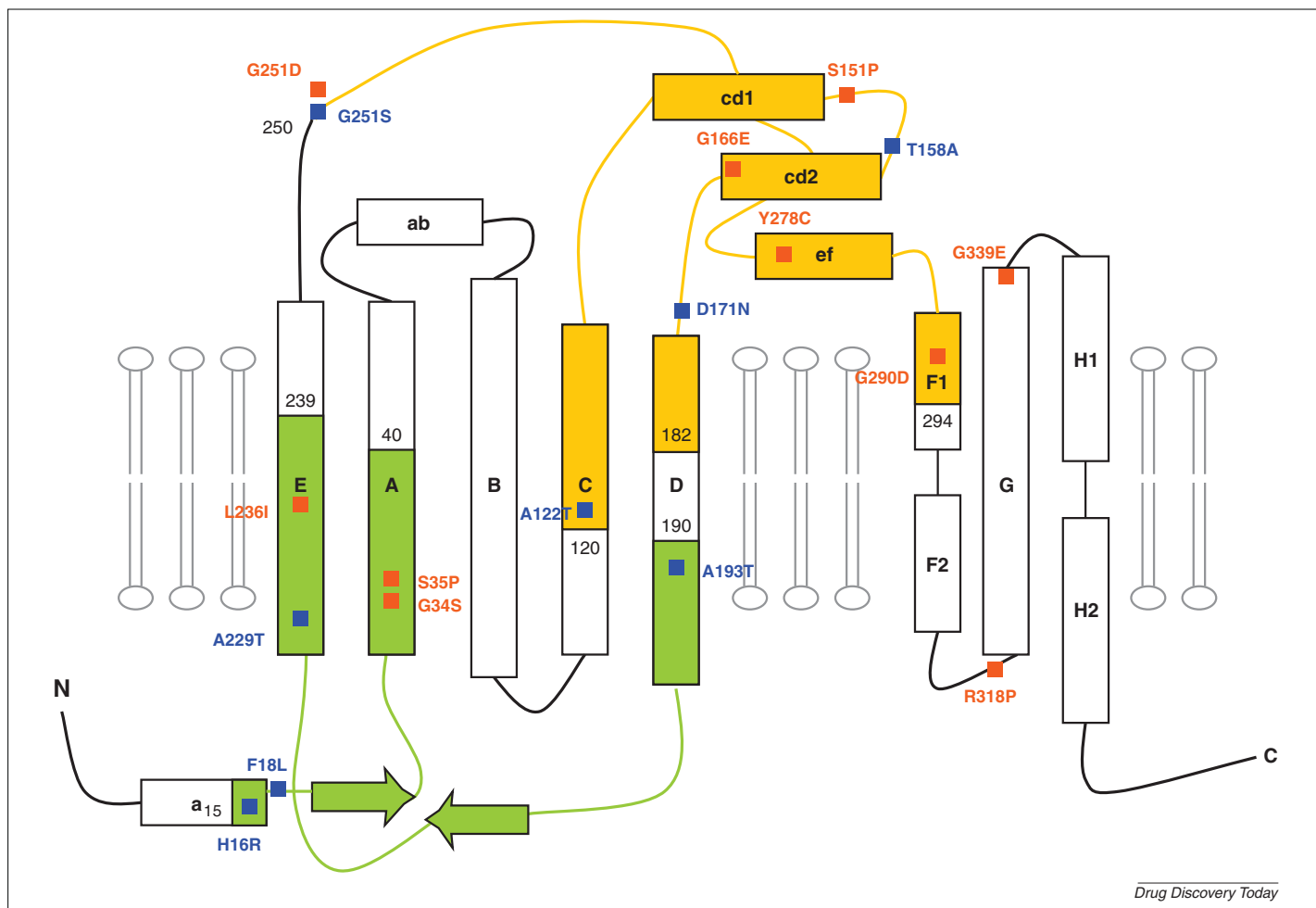


FIGURE 2

Genetic variation of cytochrome *b* Q sites. Pathologic mutations (red) and population polymorphisms (blue) affecting cytochrome *b* Q sites are indicated. Qi and Qo are represented in green and yellow colors, respectively.

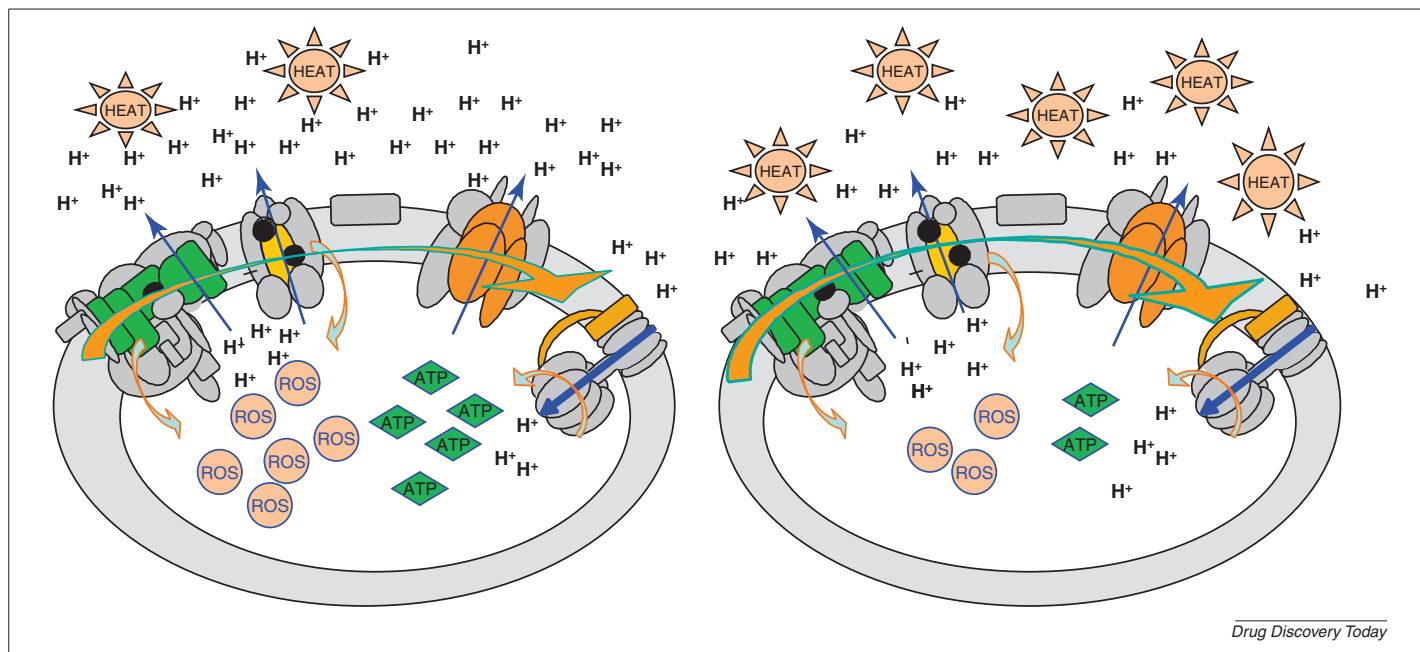


FIGURE 3

OXPHOS coupling efficiency. Highly coupled (left) and uncoupled (right) OXPHOS systems.

These compounds (ATP, calcium and ROS), can act as second messengers and trigger intracellular retrograde responses that affect cell homeostasis. There is a balance between all of these functions and, thus, a tight coupling between transported electrons and pumped protons in CIII with returned protons to the matrix through ATP synthase (CV) will produce ATP efficiently, and, therefore, less substrate will be consumed (Fig. 3).

However, it is possible that cytochrome *b* mutations affect coupling efficiency, either by decreasing the number of protons pumped per transported electron (electron slipping, decoupling) or by favoring the return of intermembrane protons to the matrix independent of the CV proton channel (proton leak, uncoupling) [22]. In such cases, the proton gradient would be diminished, and these mitochondria would generate less ATP per calorie consumed and require higher substrate consumption. At the same time, a lower electrochemical gradient would facilitate electron flow and heat production, ETC intermediates would be less reduced and fewer ROS would be produced (Fig. 3). Hence, individuals harboring cytochrome *b* uncoupling mutations would be more prone to clinical problems resulting from energy insufficiency, such as LHON. However, they would also produce more heat, making them better adapted to living in cold climates. Moreover, their ETC would generate fewer ROS and they would be protected against disorders that are

dependent on oxidative stress, such as aging and age-linked disorders [13,18,23]. Similarly, it has also been shown that the Qo site is necessary to increase cytosolic ROS in hypoxic conditions, which are required to stabilize hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α). These mitochondrial ROS could serve as therapeutic targets for many HIF-dependent pathological processes, including cancer [24].

Thus, cytochrome *b* Q site mutations may affect OXPHOS coupling efficiency, which has already been the target of therapeutic interventions.

Targeting OXPHOS coupling efficiency

2,4-*p*-Dinitrophenol (DNP) is a hydrophobic weak acid with delocalized negative charge. In mitochondria, the DNP anion is protonated in the intermembrane space, moves into the matrix where it is deprotonated, thus regenerating the DNP anion, and expelled into the intermembrane space. In this way, DNP dissipates the mitochondrial proton gradient and increases the ETC rate and substrate consumption. Thus, more NADH is reoxidized, and NAD⁺ appears to be a neuroprotective agent through various regulatory pathways, such as those involving the histone deacetylase sirtuin 1 (SIRT1) and poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) [25]. Therefore, neurological conditions might benefit from treatment with DNP. Indeed, rats treated with DNP showed significant protection against brain damage caused by striatal injection of the

N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor agonist quinolinic acid, which models the excitotoxic brain injury in neurodegenerative conditions. Additionally, DNP also reduced the infarct volume in a model of focal ischemia-reperfusion injury in rat brains and increased white matter sparing in a rat contused spinal cord model [26].

By increasing the electron flow rate in the ETC, red-ox intermediates would remain less reduced and fewer ROS would be produced. Therefore, treatment with DNP would be beneficial for those phenotypes dependent on oxidative damage. Accordingly, it has been shown that DNP leads to decreased ROS production and an increase in replicative life span of *Saccharomyces cerevisiae* [27]. The addition of DNP to the nutritional mixture of *Drosophila melanogaster* larvae significantly increased the average life span of the flies [28]. Moreover, treatment of mice with DNP decreased ROS levels and oxidative damage, and enhanced longevity [29].

In the early 1930 s, DNP was widely used in humans as a weight-loss drug [30]. Although it was very effective, the therapeutic index was razor thin and many people suffered irreversible harm, such as vision loss or even death [31].

Previous observations indicate that the chemical modification of OXPHOS coupling efficiency may have very important therapeutic consequences. However, as previously noted, the therapeutic index of DNP is very low and safer chemical uncouplers should be sought out. One method of finding these safer compounds

would be through the use of drugs with very specific targets.

Conclusion: coenzyme Q binding sites as pharmacologic targets in human therapy

In *S. cerevisiae*, an isoleucine to phenylalanine mutation at position 17 of cytochrome *b* causes diuron-resistance. Interestingly, mammals appear to be naturally resistant to diuron [32] as 80%, including humans, contain phenylalanine at this position (position 18 in humans). However, individuals from mtDNA haplogroups J1c and Uk have a F18L mutation. Might these individuals be more susceptible to diuron? Is it possible to develop drugs that, acting on these sites, decrease the OXPHOS coupling efficiency and have therapeutic interest? Could variation in Q sites be used for personalized medicine? We have a convenient model to pursue this aim: the transmitochondrial cell lines or cybrids. These lines have identical nuclear genetic background and are grown in the same environmental conditions, with mtDNA genotype being their only difference [33]. Therefore, it is now possible to test large chemical compound libraries on cybrid collections that include mtDNA haplogroups defined by important polymorphisms in cytochrome *b* Q sites.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Instituto de Salud Carlos III-FIS [grant numbers PI07-0045, PI08-0264] and Diputación General de Aragón [grant numbers Grupos Consolidados B33, PM-083/2008 and PIPAMER0901]. The CIBERER is an initiative of the ISCIII.

References

- Fernandez-Ortuno, D. *et al.* (2008) Mechanisms of resistance to Qol fungicides in phytopathogenic fungi. *Int. Microbiol.* 11, 1–9
- Kraiczky, P. *et al.* (1996) The molecular basis for the natural resistance of the cytochrome bc1 complex from strobilurin-producing basidiomycetes to center Qp inhibitors. *Eur. J. Biochem.* 235, 54–63
- Barton, V. *et al.* (2010) Inhibiting plasmodium cytochrome bc(1): a complex issue. *Curr. Opin. Chem. Biol.* [Epub ahead of print]
- Kessler, J.J. *et al.* (2007) Modeling the molecular basis of atovaquone resistance in parasites and pathogenic fungi. *Trends Parasitol.* 23, 494–501
- Gisi, U. *et al.* (2002) Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest. Manag. Sci.* 58, 859–867
- Fisher, N. and Meunier, B. (2008) Molecular basis of resistance to cytochrome bc1 inhibitors. *FEMS Yeast Res.* 8, 183–192
- Peters, J.M. *et al.* (2002) Mutations in cytochrome *b* resulting in atovaquone resistance are associated with loss of fitness in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 2435–2441
- Fisher, N. *et al.* (2004) Human disease-related mutations in cytochrome *b* studied in yeast. *J. Biol. Chem.* 279, 12951–12958
- Wibrand, F. *et al.* (2001) Multisystem disorder associated with a missense mutation in the mitochondrial cytochrome *b* gene. *Ann. Neurol.* 50, 540–543
- Montoya, J. *et al.* (2009) 20 years of human mtDNA pathologic point mutations: carefully reading the pathogenicity criteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1787, 476–483
- Gao, X. *et al.* (2003) Structural basis for the quinone reduction in the bc1 complex: a comparative analysis of crystal structures of mitochondrial cytochrome bc1 with bound substrate and inhibitors at the Qi site. *Biochemistry* 42, 9067–9080
- Gao, X. *et al.* (2002) The crystal structure of mitochondrial cytochrome bc1 in complex with famoxadone: the role of aromatic-aromatic interaction in inhibition. *Biochemistry* 41, 11692–11702
- Montiel-Sosa, F. *et al.* (2006) Differences of sperm motility in mitochondrial DNA haplogroup U sublineages. *Gene* 368, 21–27
- Richard, C. *et al.* (2007) An mtDNA perspective of French genetic variation. *Ann. Hum. Biol.* 34, 68–79
- Wong, L.J. (2007) Pathogenic mitochondrial DNA mutations in protein-coding genes. *Muscle Nerve* 36, 279–293
- Mishmar, D. *et al.* (2003) Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 171–176
- Elson, J.L. *et al.* (2004) Comparative genomics and the evolution of human mitochondrial DNA: assessing the effects of selection. *Am. J. Hum. Genet.* 74, 229–238
- Ruiz-Pesini, E. *et al.* (2004) Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA. *Science* 303, 223–226
- Gomez-Duran, A. *et al.* (2010) Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups. *Hum. Mol. Genet.* [Epub ahead of print]
- Okura, T. *et al.* (2003) Association of the mitochondrial DNA 15497G/A polymorphism with obesity in a middle-aged and elderly Japanese population. *Hum. Genet.* 113, 432–436
- Shinkarev, V.P. *et al.* (2000) Aspartate-187 of cytochrome *b* is not needed for DCCD inhibition of ubiquinol: cytochrome *c* oxidoreductase in *Rhodobacter sphaeroides* chromatophores. *Biochemistry* 39, 14232–14237
- Skulachev, V.P. (1998) Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta* 1363, 100–124
- Wallace, D.C. *et al.* (2003) mtDNA variation, climatic adaptation, degenerative diseases, and longevity. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 68, 479–486
- Bell, E.L. *et al.* (2007) The Qo site of the mitochondrial complex III is required for the transduction of hypoxic signaling via reactive oxygen species production. *J. Cell Biol.* 177, 1029–1036
- Liu, D. *et al.* (2008) Preventing NAD(+) depletion protects neurons against excitotoxicity: bioenergetic effects of mild mitochondrial uncoupling and caloric restriction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1147, 275–282
- De Felice, F.G. and Ferreira, S.T. (2006) Novel neuroprotective, neurotogenic and anti-amyloidogenic properties of 2,4-dinitrophenol: the gentle face of Janus. *IUBMB Life* 58, 185–191
- Barros, M.H. *et al.* (2004) Higher respiratory activity decreases mitochondrial reactive oxygen release and increases life span in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 279, 49883–49888
- Padalko, V.I. (2005) Uncoupler of oxidative phosphorylation prolongs the lifespan of *Drosophila*. *Biochemistry (Mosc.)* 70, 986–989
- Caldeira da Silva, C.C. *et al.* (2008) Mild mitochondrial uncoupling in mice affects energy metabolism, redox balance and longevity. *Aging Cell* 7, 552–560
- Harper, M.E. *et al.* (2008) The efficiency of cellular energy transduction and its implications for obesity. *Annu. Rev. Nutr.* 28, 13–33
- Colman, E. (2007) Dinitrophenol and obesity: an early twentieth-century regulatory dilemma. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 48, 115–117
- di Rago, J.P. *et al.* (1986) DNA sequence analysis of diuron-resistant mutations in the mitochondrial cytochrome *b* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 208, 208–210
- Pacheu-Grau, D. *et al.* (2010) Mitochondrial pharmacogenomics: barcode for antibiotic therapy. *Drug Discov. Today* 15, 33–39

Aurora Gómez-Durán

David Pacheu-Grau

Manuel J. López-Pérez

Julio Montoya

Departamento 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), Spain

Eduardo Ruiz-Pesini

Departamento 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), Spain

Fundación ARAID, Universidad de Zaragoza, 50013 Zaragoza, Spain

GENÉTICA DE LAS ENFERMEDADES DEL ADN MITOCONDRIAL

Julio Montoya^{1,2,3}, Ester López-Gallardo^{1,2,3}, María Dolores Herrero-Martín^{1,2,3}, Magdalena Carreras^{1,2,3},
Iñigo Martínez-Romero^{1,2,3}, Aurora Gómez-Durán^{1,2,3}, David Pacheu^{1,2,3}, Taha Rhouda^{1,2,3},
Manuel J. López-Pérez^{1,2,3}, Eduardo Ruiz-Pesini^{1,2,3,4}.

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Universidad de Zaragoza. Miguel Servet 177. 50013-Zaragoza.

²CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER). ISCIII.

³Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud.

⁴Fundación ARAGÓN I+D.

Summary

Title: Genetics of the mitochondrial DNA diseases

The mitochondrial diseases or diseases of the oxidative phosphorylation system (OXPHOS) consist of a group of disorders originated by a deficient synthesis of ATP. OXPHOS is composed of proteins codified in the two genetic systems of the cell, the nuclear and the mitochondrial genomes and, therefore, the mode of inheritance could be either mendelian or maternal. Due to the central role that mitochondria plays in the cellular physiology, these diseases are, nowadays a social and health problem of great importance, and, although individually they are classified among the rare diseases, all together constitute a large variety of genetic disorders. Beside this, it is considered that the mitochondria are involved, directly or indirectly, in a large percentage of the human diseases. In this review we will be mainly focussed to describe, from a genetic point of view, the diseases caused by mitochondrial DNA damage, to show the special characteristics of the mitochondrial genetic system, the different methods that are necessary to utilize for their correct diagnoses, remarking the difficulties to study these pathologies, and the possible implication of the genetic variability of the genome in the development of these diseases. At the end, a brief mention to the diseases caused by nuclear defects will also be made.

Introducción

El sistema de fosforilación oxidativa (sistema OXPHOS), se encuentra localizado en la membrana interna mitocondrial, está formado por los complejos multienzimáticos de la cadena respiratoria y la ATP sintasa, y constituye la ruta final del metabolismo energético mitocondrial que conduce a la síntesis de ATP. Sin embargo, este sistema es mucho más que la ruta principal productora de energía de la célula. Así, a través de la generación de un gradiente electroquímico, el sistema OXPHOS participa también en la producción de calor, en el transporte de proteínas a la mitocondria, en la regulación de la apoptosis, en el mantenimiento de los niveles de calcio celular y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). ROS, calcio y ATP son compuestos que pueden disparar numerosas rutas bioquímicas y alterar el estado homeostático celular. De este modo, podemos decir que en el sistema OXPHOS acaba integrándose toda la información proveniente del exterior, ya sea en forma de nutrientes o de oxígeno y, finalmente, puede modificar los niveles de ciertos mensajeros celulares y enviar señales al núcleo.

Las células humanas contienen dos genomas bien diferenciados: el nuclear (ADNn) o mayoritario por el número

de proteínas que codifica, y el mitocondrial (ADNmt) que, por estar en un orgánulo subcelular, presenta una serie de caracteres que lo diferencian claramente del anterior. La inmensa mayoría de proteínas que forman parte de la célula están codificadas en el ADNn. Solamente el sistema OXPHOS y el ribosoma mitocondrial dependen de la expresión coordinada de ambos genomas, constituyendo un caso único en la célula. Este sistema está constituido por alrededor de 100 proteínas estructurales; 13 de ellas están codificadas en el ADNmt y el resto en el ADNn. Además, son necesarias muchas más proteínas y ARNs para mantener y expresar el ADNmt, expresar e importar las proteínas mitocondriales que están codificadas en el núcleo, ensamblar los complejos OXPHOS en la membrana interna mitocondrial, etc. Así pues, la biosíntesis del sistema OXPHOS está bajo el control de los dos sistemas genéticos de la célula y las enfermedades que se puedan originar por un mal funcionamiento del mismo, pueden estar causadas por mutaciones en ambos ADNn y, por tanto, mostrar patrones de herencia diferentes, materno o mendeliano.

El término **patología mitocondrial** abarca, teóricamente a cualquier trastorno que tiene su origen en una de las muchas rutas metabólicas que tienen lugar en la mitocondria, pero tradicionalmente, y debido a que las prime-

ras mutaciones se descubrieron en el ADNmt, se ha utilizado para significar aquellas enfermedades causadas por defectos en el sistema OXPHOS, única ruta metabólica en la que participan polipéptidos codificados en el ADNmt. Las primeras mutaciones asociadas al mal funcionamiento de este sistema y que generaban enfermedades, se descubrieron en el ADNmt en 1988¹⁻⁴. Desde entonces, el número de mutaciones descritas en este genoma ha crecido enormemente si bien algunas de ellas sólo se han presentado en un único paciente. Asimismo, se han descubierto muchas mutaciones en genes mitocondriales codificados en el ADNn que participan en el mantenimiento y expresión del ADNmt y en la composición y formación del sistema OXPHOS⁵. Sin embargo, dada la complejidad de procesos en los que este sistema participa, los mecanismos fisiopatogénicos son prácticamente desconocidos, lo que impide el desarrollo de terapias racionales y, hoy en día, prácticamente no hay tratamiento efectivo para ninguna enfermedad OXPHOS.

Debido al papel central que juega la mitocondria en la fisiología celular, las enfermedades mitocondriales son un problema social y sanitario de primera magnitud y, aunque son individualmente raras, en su conjunto agrupan una amplia variedad de trastornos genéticos. Además, hoy en día se considera que la mitocondria, sea en forma primaria o secundaria, está implicada en más de la mitad de las enfermedades humanas⁶.

Las enfermedades mitocondriales responden a una gran variabilidad fenotípica, con manifestaciones clínicas que afectan a distintos órganos y tejidos por lo que su estudio requiere la participación de especialistas de muy diverso origen que aporten datos clínicos, morfológicos, bioquímicos y genéticos que permitan un diagnóstico correcto. Las características genéticas del ADNmt, su modo de herencia materna, el elevado número de copias presentes en las células y la segregación mitótica, confieren a estas enfermedades propiedades muy particulares.

Con este trabajo se pretende resumir los conocimientos más actuales que se tienen sobre las enfermedades debidas a alteraciones en el ADNmt y los diversos aspectos de su diagnóstico, así como algunos detalles de mutaciones nucleares que afectan al sistema OXPHOS, dentro de lo que se podría llamar medicina mitocondrial.

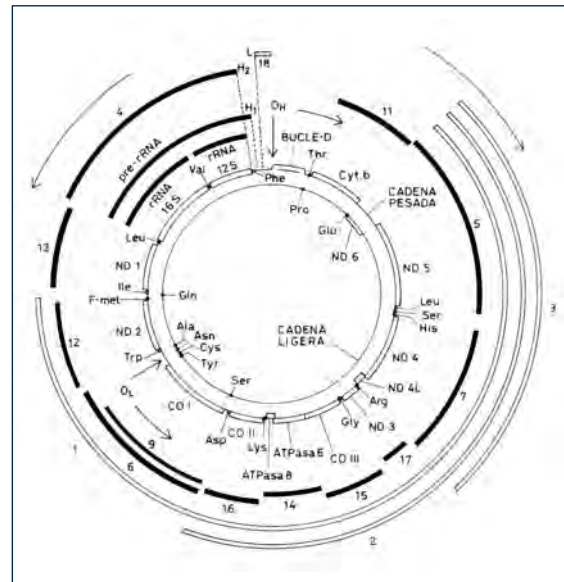
El ADN mitocondrial humano

La existencia del ADNmt se describió por primera vez en los años 60. Sin embargo, no fue hasta los 80 cuando se descubrieron los caracteres moleculares básicos del sistema genético mitocondrial humano⁷⁻¹⁵. Desde entonces, aunque se han ido descubriendo proteínas que participan en los pro-

cesos de mantenimiento y expresión del ADNmt, realmente no se ha avanzado mucho en el conocimiento de su regulación e intercomunicación con el núcleo. El ADNmt humano es circular, consta de 16.569 pares de bases y contiene información para 37 genes: 24 que participan en la maquinaria de síntesis de las proteínas codificadas en el propio genoma (dos ARNr (12S y 16S) y 22 ARNt), y 13 polipéptidos que forman parte de cuatro de los cinco complejos multienzimáticos del sistema OXPHOS:

- Siete polipéptidos (ND 1, 2, 3, 4, 4L, 5, 6) son componentes del complejo I o NADH: ubiquinona oxido-reductasa;
- Uno (cyt b) pertenece al complejo III o ubiquinol: citocromo c oxido-reductasa;
- Tres (CO I, II, III) pertenecen al complejo IV o citocromo c oxidasa;
- Dos pertenecen a la ATP sintasa (complejo V) (Figura 1).

FIGURA 1. Mapa genético y de transcripción del ADNmt humano.



Los círculos internos muestran el mapa del ADNmt con los genes que codifican: ARNr (ARNr 12S y 16S), ARNt, mostrados con la abreviatura del aminoácido que les corresponde, y secuencias codificadoras de proteínas (ND: subunidades del complejo I; cyt b: subunidad del complejo III; CO: subunidades del complejo IV; ATPasa 6 y 8: complejo V). Los círculos exteriores muestran los ARNs transcritos de la cadena pesada, derivados de las unidades de transcripción H1 y H2, respectivamente (barras negras), y de la ligera (barras abiertas). OH y OL representan el origen de replicación de la cadena pesada y ligera, según indican las flechas que están a su lado, de acuerdo con el modelo clásico de replicación. H1, H2 y L indican los sitios de iniciación de las tres unidades de transcripción. Las flechas exteriores indican la dirección de la transcripción de la cadena pesada y ligera, respectivamente.

El resto de los polipéptidos componentes del sistema OXPHOS, así como todo el complejo II, están codificados en el ADN nuclear. Por ello, la biogénesis de este sistema constituye un caso único en la célula, ya que para su síntesis se requiere la expresión coordinada de los dos sistemas genéticos celulares.

Una de las características más llamativas del ADNmt es que los genes que codifica se encuentran unos a continuación de los otros sin nucleótidos intermedios ni intrones, y que los genes de los ARNt se encuentran esparcidos entre los genes de los ARNr y los codificantes de proteínas, una disposición que tendrá consecuencias muy importantes para el procesamiento o maduración de los precursores de los ARNs como se mostrará más adelante. Asimismo, y curiosamente, los genes codificados en el ADNmt están distribuidos entre ambas hebras del ADN. La mayor parte (2 ARNr, 14 ARNt y 12 polipéptidos) están codificados en una de ellas (cadena H), mientras que los 9 restantes (un polipéptido y 8 ARNt) lo están en la cadena complementaria (cadena L). En el ADNmt solamente existe una pequeña zona que no codifica ningún gen, región denominada bucle D, donde se encuentran localizados el origen de replicación de la cadena H, los promotores de la transcripción y los elementos reguladores de la expresión del ADN.

Desde finales de los años 1970, se consideraba que la replicación del ADNmt se verificaba de un modo especial, unidireccional y asimétrico, utilizando para ello dos orígenes de replicación diferentes (O_H y O_L). De acuerdo con este modelo, la síntesis del ADN se inicia en O_H por acción de la ADN polimerasa gamma, específica de la mitocondria, que alarga un ARN iniciador originado por procesamiento de un transcrito primario que se sintetiza a partir del promotor L. La replicación continúa unidireccionalmente hasta alcanzar el segundo origen de replicación (O_L), momento en el cual comienza la síntesis de la segunda cadena alargando también un pequeño cebador de ARN sintetizado por una primasa¹⁶⁻¹⁸. Sin embargo, en los últimos años, se ha cuestionado mucho este modelo de replicación y se ha propuesto que el ADNmt se replica de un modo bidireccional y simétrico desde un único origen de replicación, a semejanza con el ADN bacteriano^{19,20}. Hoy en día todavía no se ha dirimido la cuestión, pero los modelos parece que convergen en cierta manera²¹.

Otra de las características peculiares del ADNmt es que las dos cadenas se transcriben completamente, mediante tres unidades de transcripción, a partir de tres puntos de iniciación, H_1 y H_2 para la cadena pesada y L para la cadena ligera, que originan tres moléculas policistrónicas. Posteriormente, estas moléculas precursoras, que se cortan en los extremos 5' y 3' de las secuencias de los ARNt, dando lugar (Figura 1) a los ARNr, ARNt y ARNm maduros (modelo de

puntuación por el ARNt)^{9-12,22}. Los ARNt situados entre los genes de ARNr y codificantes de proteínas, como se ha indicado anteriormente, actúan como señales de reconocimiento para los enzimas que participan en el procesamiento de las moléculas de ARN policistrónicas precursoras. Es importante destacar, por la importancia que tendrá en la regulación de los distintos tipos de ARN que se van a sintetizar, que las dos unidades de transcripción de la cadena H se solapan en la región de los ARNt. La primera de las unidades, se transcribe muy frecuentemente, comienza en H_1 , delante del gen para el ARNt^{Phe}, termina en el extremo 3' de la región codificante de los ARNr, y es responsable de la síntesis de los ARNr 12S y 16S, del ARNt^{Phe} y del ARNt^{Val}. La terminación de esta unidad de transcripción está provocada por un factor de terminación (mTERF), que se une a una secuencia situada en el gen del ARNt^{Leu}^{23,24}. La segunda unidad se inicia en H_2 , cerca del extremo 5' del gen del ARNr 12S, y transcribe, con una frecuencia mucho menor que la anterior, prácticamente la totalidad de la cadena pesada. El ARN policistrónico que se origina se procesa dando lugar a los ARNm de 12 péptidos y a los 14 ARNt codificados en esta cadena. Como se puede deducir de lo anteriormente expuesto, el punto de iniciación juega un papel muy importante en la regulación de la expresión génica y explica el modo de síntesis diferencial de ARNr y ARNm¹². En el caso de la cadena ligera, la transcripción comienza en el sitio L, cercano al extremo 5' del ARN 18 y da lugar al ARN iniciador de la replicación del ADN, a 8 ARNt, y a un ARNm. Para llevar a cabo este proceso de transcripción se necesita una ARN polimerasa específica (h-mtRPOL)^{25,26}, tres factores de transcripción implicados en la iniciación (mtTFA y mtTFB1 y mtTFB2)²⁷⁻²⁹, y uno de terminación (mTERF)^{23,24,30}, todos ellos codificados en el ADNn. Muy posiblemente, la fosforilación o desfosforilación del factor de terminación puede ser una indicación de parada o continuación de la transcripción al final de la zona de los ARNr³¹.

Como ya se ha indicado, el ADNmt codifica 13 proteínas cuya síntesis se verifica en ribosomas específicos de la mitocondria, cuyos componentes están codificados tanto en el ADNmt (ARNr 12S y 16S), como en el genoma nuclear (~78 proteínas ribosómicas)³². Para la síntesis de estas proteínas, la mitocondria utiliza un código genético que difiere en algún detalle del código genético universal. Así, el codón UGA codifica triptófano en vez de ser un codón de terminación, los codones AUA y AUU se utilizan también como codones de iniciación, y AGA y AGG son codones de terminación en lugar de codificar para arginina. Asimismo, en el ADNmt están codificados solamente 22 ARNt, sin embargo, parece que son suficientes para leer los codones de los ARNm mitocondriales utilizando para ello un sistema de apareamiento codón-anticodón más sencillo que

el del código genético universal. Todos los polipéptidos codificados y sintetizados en la mitocondria interaccionan con los componentes del sistema OXPHOS que están codificados en el ADNn, sintetizados en el citosol y que se importan a la mitocondria. Así, la biogénesis del sistema OXPHOS depende de la expresión coordinada de los genomas mitocondrial y nuclear.

Características de la genética mitocondrial

La localización del ADNmt en un orgánulo citoplasmático implica que la herencia de este genoma difiera de la del ADNn. Así, el núcleo y el ADN celular se duplican originando una copia idéntica antes de cada división celular de forma que las células hijas reciban una misma dotación genética. Sin embargo, esto no ocurre exactamente así con la mitocondria y su ADN; además, la organización genética tan compacta, sin nucleótidos intermedios ni intrones, el alto número de copias de ADNmt que contiene cada célula, y su alta vulnerabilidad, proporcionan unos caracteres genéticos que los diferencian claramente de los del ADN nuclear, como se indica a continuación.

1. - *Modo de herencia:* El ADNmt se hereda exclusivamente por vía materna. La madre trasmite el genoma mitocondrial a todos sus hijos, hombres o mujeres, pero sólo éstas lo transmiten de nuevo a la siguiente generación. Esto se debe al elevado número de copias de ADNmt que contienen los óvulos y a que las mitocondrias del espermatozoide se eliminan por un proceso activo en los primeros estadios de división celular³³.

2. - *Poliplasmia:* El número de moléculas de ADNmt varía mucho de unos tejidos a otros. Así, podemos encontrar desde un número muy bajo en las plaquetas, hasta unas 100.000 copias en el oocito. En cualquier caso, la mayor parte de los tejidos contienen entre 1.000 y 10.000 copias por célula, y cada mitocondria entre 2 y 10 moléculas de ADN, organizadas en nucleoides. En un principio todas las moléculas de ADNmt de un individuo son iguales (homoplasmia). Sin embargo, la aparición de una mutación puede llevar a la existencia de dos poblaciones de ADNmt, normal y mutada (heteroplasmia).

3. - *Segregación mitótica:* Cuando existe una heteroplasmia, las moléculas de ADNmt segregarán al azar entre las células hijas durante la división celular pudiendo dar lugar a tres posibles genotipos: homoplásmicos normal y mutante y heteroplásmico, con porcentajes variables de ADNmt mutado. En consecuencia, el fenotipo de una célula con heteroplasmia dependerá del porcentaje y naturaleza del ADN mutado que contenga. Como estas células son el origen de los tejidos y órganos desarrollados, una de las caractéristi-

cas de las enfermedades mitocondriales es que suelen ser multisistémicas.

4. - *Expresión umbral:* Mientras un tejido tenga un porcentaje de copias de ADNmt normal, éste podrá funcionar perfectamente al producir la cantidad necesaria de ATP para su funcionamiento. Sin embargo, cuando los niveles de ADNmt mutado sobrepasen un nivel determinado, diferente para cada tejido, la producción de ATP estará por debajo de los mínimos necesarios, la producción de ATP se verá afectada, y, por debajo de un nivel umbral, podrán aparecer las manifestaciones de la enfermedad.

No todos los tejidos tienen las mismas necesidades energéticas, por lo que no todos se afectarán al pasar los niveles umbrales de producción de ATP. Los que se ven afectados preferentemente son el sistema nervioso y el muscular, aunque se puede afirmar que cualquier tejido puede verse afectado. Además, pueden tener niveles de heteroplasmia distintos, a menudo mayores en tejidos postmitóticos como el cerebro o el músculo (ambos de difícil acceso), y menores en tejidos mitóticos, como la sangre, que no son fiables para el diagnóstico de muchas patologías mitocondriales.

5. - *Alta tasa de mutación:* El ADNmt es muy vulnerable, presentando una tasa de mutación espontánea que es unas 10-20 veces superior a la del ADN nuclear. Una de las posibles explicaciones a este hecho es la acumulación de radicales libres de oxígeno, que se producen constantemente en la mitocondria, y que dañan a un ADN con información genética muy compacta, que no está protegido por histonas, y con mecanismos de reparación menos eficaces. Por tanto, en cualquier individuo se podría estar produciendo continuamente a lo largo de la vida, una pequeña heterogeneidad en el ADNmt como consecuencia de las mutaciones que se están originando en sus células somáticas. Este daño mitocondrial pudiera ser la causa de la disminución en la capacidad respiratoria de los tejidos que tiene lugar en el envejecimiento. En el año 1999, el grupo de Attardi encontró evidencias que apoyan esta teoría al demostrar que las mitocondrias acumulan determinadas mutaciones con la edad³⁴.

Diagnóstico de las enfermedades del ADNmt

Como se ha mencionado anteriormente, el ADNmt codifica solamente proteínas que forman parte exclusiva del sistema OXPHOS, por tanto, las enfermedades mitocondriales causadas por mutaciones en el ADNmt constituyen un grupo de patologías que tienen como característica común el estar producidas por una deficiencia en la síntesis de ATP. De este modo, dentro de las enfermedades debidas a de-

fectos en el metabolismo mitocondrial, son enfermedades originadas concretamente por defectos que afectan a los componentes de los complejos multienzimáticos I, III, IV y/o V. Desde 1998, cuando las primeras mutaciones en el ADNmt se asociaron a enfermedades humanas, el número de mutaciones y el espectro de enfermedades asociadas ha crecido de modo espectacular. Conviene volver a recordar que el sistema OXPHOS está compuesto también por otras muchas proteínas que están codificadas en el genoma nuclear y que, después de ser sintetizadas por los ribosomas citoplásmicos y de importarse al interior de la mitocondria, se ensamblan con las proteínas codificadas y sintetizadas en el interior del orgánulo. Aunque fundamentalmente, nos centraremos en el diagnóstico y enfermedades causadas por daños en el ADNmt, muchas de las aseveraciones que se hagan servirán también para las patologías originadas por daños en el ADNn codificante de proteínas mitocondriales.

Como se ha podido deducir de lo anteriormente dicho, las manifestaciones clínicas de las enfermedades del sistema OXPHOS varían mucho y pueden afectar a una gran diversidad de órganos y tejidos, ya que la síntesis de ATP se produce en todos ellos y a cualquier edad. De este modo se puede encontrar un amplio espectro de síntomas clínicos, con una gran variedad de presentaciones clínicas diferentes. Esto hace que sea muy complicado poder hacer una clasificación muy clara de las mismas, si bien, algunas de ellas presentan una serie de aspectos clínicos, morfológicos, bioquímicos y genéticos muy determinados que permite encuadrarlas en síndromes bien definidos. Sin embargo, en la mayor parte de los casos, principalmente en la infancia, los síntomas son muy poco informativos por no haberse desarrollado completamente, y solamente la presencia de alguna alteración neurológica, acompañada en ocasiones de aumento de ácido láctico y de otros síntomas secundarios que afectan a diversos órganos, nos orientan sobre la naturaleza mitocondrial de estas enfermedades. Su principal característica es el incremento progresivo de tejidos afectados durante el curso de la enfermedad, estando el sistema nervioso central casi siempre involucrado en los estadios avanzados. La confirmación de una enfermedad mitocondrial exige, además de la presencia de los síntomas clínicos característicos, un estudio muy profundo que implica necesariamente a expertos de muy diversas áreas.

1.- Manifestaciones clínicas

Como ya se ha mencionado, las enfermedades del ADNmt son multisistémicas, pudiendo afectar prácticamente a ca-

si cualquier órgano y tejido, pero fundamentalmente a aquellos que más dependen de la energía mitocondrial (como los sistemas nervioso y muscular), dando lugar a síndromes muy heterogéneos. Se podría generalizar diciendo que pueden originar cualquier síntoma, en cualquier órgano o tejido y a cualquier edad (Tabla 1). Sin embargo, también se encuentran fenotipos en los que sólo un tejido está afectado, como ocurre en LHON (Neuropatía Óptica Hereditaria de Leber) y en la sordera mitocondrial (células cocleares). La posibilidad de encontrarnos frente a una enfermedad mitocondrial se debe considerar cuando un paciente presenta una asociación de síntomas bastante inexplicable, con un curso de la enfermedad rápido y progresivo, e implicando órganos no relacionados. Las manifestaciones clínicas más comunes se resumen en la Tabla 1. En algunos casos es posible asignar una serie de síntomas a síndromes concretos pero, en general, es muy complicado delimitarlos con precisión, porque el solapamiento de síntomas es muy frecuente y el curso y gravedad de los mismos varía en los diferentes individuos. Una buena lista de perfiles clínicos desde neonatos hasta adultos, puede encontrarse en magníficas revisiones de DiMauro y Munnich^{35,36}.

2.- Análisis de laboratorio

La manifestación bioquímica más común de las enfermedades mitocondriales, aunque no general ni específica, es la aparición de acidemia láctica. Esta, junto a piruvato y su relación molar, se deben de determinar en plasma y a ser posible en líquido cerebro-espinal. La elevación de lactato puede o no ir acompañada de otras alteraciones bioquímicas como hiperamonemia, elevación de la concentración plasmática de algunos aminoácidos (alanina, prolina), elevación de los cuerpos cetónicos, ácidos orgánicos (metabolitos del ciclo de Krebs, 3-metil-glutaconato), cetoácidos, ácidos grasos libres, con disminución de la carnitina total y libre, folato, coenzima Q10, etc., También es muy importante realizar estudios nutricionales y pruebas hematológicas. Es muy importante evaluar todos los datos bioquímicos en conjunto, ya que la elevación del lactato en sangre es muy frecuente en pediatría por causas diferentes a una alteración mitocondrial, o bien secundaria a ciertos fármacos. Por ello, el estudio del resto de metabolitos reafirma la posible existencia de una acidemia láctica primaria, aumentando la especificidad de las pruebas bioquímicas. Por otro lado, algunos pacientes con enfermedad mitocondrial cursan con lactatos en sangre normales, pero pueden presentar alguno de los otros metabolitos alterados, lo que aumenta la sensibilidad de estas pruebas. En la orina también se deben realizar análisis bioquímicos automatizados, ami-

TABLA 1

**ALGUNOS CRITERIOS PARA EL DIAGNÓSTICO
DE ENFERMEADES CAUSADAS POR MUTACIONES
EN EL ADNmt**

ÓRGANO/TEJIDO	MANIFESTACIONES CLÍNICAS/ CARACTERES
Sistema Nervioso	Encefalopatía Accidentes cerebro vasculares Epilepsia Ataxia cerebelar Convulsiones Mioclonías Retraso mental y/o psicomotor Migraña Ceguera cortical Neuropatía periférica
Músculo	Miopatía progresiva Intolerancia al ejercicio Debilidad Oftalmoplegia Ptosis Mioglobinuria
Sangre	Anemia sideroblástica
Ojo	Atrofia óptica Retinitis pigmentaria Cataratas
Oído	Sordera
Corazón	Cardiomiopatía Defectos en conducción cardiaca
Sistema endocrino	Diabetes mellitus Diabetes insipidus Hipoparatiroidismo Hipotiroidismo Baja estatura
Intestino	Pseudo obstrucción intestinal Vómitos
Páncreas	Disfunción pancreática exocrina
Hígado	Fallo hepático
Riñón	Síndrome de Fanconi Fallo renal
Morfología muscular	Fibras rojo-rasgadas en biopsias musculares Inclusiones paracristalinas en mitocondria
Histoquímica	Fibras COX negativas
Bioquímica	Disminución de actividad de complejos respiratorios y/o de enzimas respiratorias en biopsias musculares, fibroblastos, etc. Defecto de ensamblaje de los complejos del sistema OXPHOS. Disminución de niveles de ATP
Laboratorio	Acidosis láctica en sangre y/o líquido cerebroespinal Hipoglucemia
Genética	Herencia materna o esporádico
Modelos celulares (cibridos)	Defectos bioquímicos producidos por la mutación en el ADNmt

noácidos y ácidos orgánicos. Para casos de deficiencia de coenzima Q10, es muy importante su determinación en biopsias musculares y en fibroblastos.

Es igualmente posible que estas anomalías bioquímicas no se presenten en el paciente no descompensado si se halla en condiciones basales, por lo que la selección de pacientes con sospecha clínica de enfermedad mitocondrial requiere, a veces, la realización de pruebas dinámicas que pongan de manifiesto la alteración del metabolismo energético. Dichas pruebas deben de estar estandarizadas y se deben seguir exactamente los protocolos para su realización, de forma que la interpretación de los resultados sea correcta³⁷. La recogida de muestras biológicas en descompensación es fundamental, ya que puede evitar la realización de pruebas dinámicas, las cuales no están exentas de riesgo, son difíciles de realizar correctamente y son costosas.

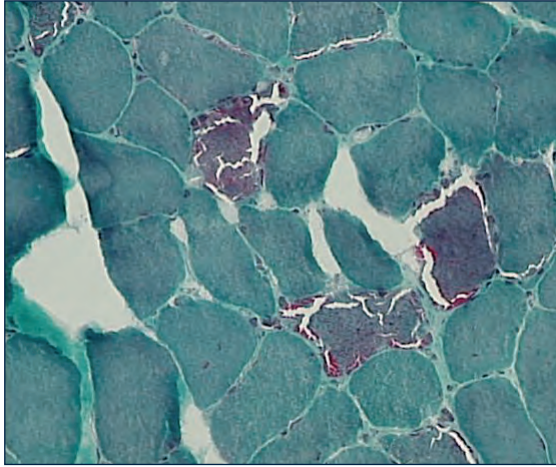
Dependiendo de las señales de enfermedad que se vayan encontrando, se tiene que considerar la realización de estudios oftalmológicos, de neuroimagen, pruebas neurofisiológicas, audiometría, endoscopia, ensayos de función renal, agudeza visual, electrocardiogramas, ecocardiogramas, y espectroscopia de resonancia magnética para determinar el metabolismo energético de cerebro y músculo *in vivo*, etc.

3.- Estudios morfológicos e histoquímicos

Lógicamente, el tejido mas afectado es el ideal para realizar cualquier estudio histoquímico, bioquímico y genético, ya que el porcentaje de heteroplasmia suele ser más elevado y poseen signos más claros que indican el padecimiento de enfermedad mitocondrial. Aunque el músculo es uno de los tejidos más frecuentemente afectados en la patología mitocondrial, en el diagnóstico genético pueden usarse biopsias de otros tejidos, como sangre, raíces de pelos, semen, células de la mucosa bucal y las células epiteliales presentes en la orina, en orden decreciente de invasividad.

El estudio histoquímico de biopsias musculares es de gran importancia para la detección de alteraciones mitocondriales. Una de las características morfológicas mas típicas de las enfermedades mitocondriales es la presencia de fibras rojo-rasgadas (RRF), en biopsias musculares teñidas con tricromo de Gomori modificado, o con la reacción para succinato deshidrogenasa (SDH). La forma tan característica que tienen se deben a una acumulación de mitocondrias anómalas en la zona subsarcolémica y entre fibras musculares (Figura 2), que posiblemente se origina para intentar compensar el déficit energético.

FIGURA 2. Ejemplo de fibras rojo-rasgada obtenida mediante la tinción tricromo de Gomori modificada, a partir de una biopsia muscular de un caso de síndrome de Kearns-Sayre.



También es muy frecuente realizar análisis de marcadores histoquímicos para enzimas oxidativas, en particular se trata de detectar la presencia de fibras no reactivas a la tinción histoquímica de la citocromo c oxidasa (COX negativas) que indica la gravedad de la deficiencia enzimática. Los resultados, a veces, son contradictorios. Aunque un modelo con mayoría de fibras rojo-rasgadas deficientes en COX es altamente sugerente de enfermedad por mutación heteroplásmica en el ADNmt, se encuentran muchos pacientes con biopsias musculares normales o fibras musculares con proliferación mitocondrial pero actividad COX normal.

La microscopía electrónica puede revelar la presencia de inclusiones paracristalinas o de mitocondrias con forma y tamaño alterados, aunque no es de mucho valor en el diagnóstico mitocondrial³⁸.

4.- Estudios bioquímicos

Una de las pruebas más concluyentes de padecimiento de una enfermedad del sistema OXPHOS se obtiene mediante la determinación de la actividad enzimática de los complejos respiratorios mitocondriales. Estas pueden realizarse midiendo el consumo de oxígeno, mediante estudios polarográficos, o por análisis espectrofotométricos que miden las actividades de los enzimas respiratorios por separado.

En el primer caso, el consumo de oxígeno se debe de determinar en fracciones enriquecidas en mitocondrias, obtenidas de biopsias musculares, utilizando un electrodo de oxígeno (electrodo de Clark). Estos estudios pueden realizarse también en linfocitos, o en células en cultivo (fibroblastos) permeabilizadas. El principal problema que presentan, es que estas pruebas se deben de realizar en material fresco, recién recogido, sin haber pasado un periodo de congelación y con controles recogidos en las mismas condiciones.

Los análisis espectrofotométricos, más habituales y fáciles de realizar, se realizan en homogenizados de tejidos. Por consiguiente, requiere menor cantidad de material de partida y puede haberse mantenido congelado hasta su estudio. Los pacientes con mutaciones en el ADNmt muestran un rango muy variable de actividades enzimáticas como normales, defectos aislados en un complejo, o defectos múltiples. Los últimos, dan una orientación casi definitiva sobre el siguiente paso del diagnóstico mitocondrial, el estudio genético. En el caso de afectación de un único complejo respiratorio se entiende que hay un defecto en alguna de las subunidades proteicas de dicho complejo. Si son varios los complejos respiratorios que presentan una deficiencia en actividad enzimática, es muy probable que nos encontremos con defectos en genes codificantes de ARNt, ARNr, deleciones o depleción del ADNmt. Sin embargo, se han descrito casos con mutaciones en genes ARNt en los que sólo un complejo respiratorio está afectado³⁹ o, por el contrario, una mutación en un gen codificante de proteínas puede afectar a la actividad de más de un complejo⁴⁰. En general, el tejido que debe ser analizado es aquel en el que se expresa la enfermedad y, si no es posible, al menos se deben realizar biopsias de piel para estudios en células en cultivo.

5.- Estudios de ensamblaje de complejos OXPHOS

Desde hace unos años, se viene aplicando una técnica que permite analizar los complejos OXPHOS sin disociarlos en sus constituyentes polipeptídicos (*blue native polyacrylamide gel electrophoresis*)⁴¹. Además, estos complejos permanecen en su forma activa en el gel. Esta técnica ha sido aprovechada para cuantificar los niveles de los complejos OXPHOS perfectamente ensamblados en relación con diversas mutaciones que provocan enfermedades mitocondriales⁴². Aunque esta técnica no se puede aplicar directamente para diagnóstico, sí que merece la pena citarla porque puede aportar indicios claros del tipo de daño que padecen los complejos, fundamentalmente para el ensamblaje de las muchas subunidades proteicas que los componen.

6.- Caracteres genéticos y análisis genético-moleculares.

Las enfermedades del ADNmt suelen presentar una herencia materna. Sin embargo, pueden aparecer de forma esporádica, somáticas, etc. Además, y como ya se ha mencionado, las enfermedades del sistema OXPHOS, pueden presentarse tanto con un tipo de herencia mendeliana como materna, debido al doble origen genético de este sistema. Sin duda, y como en todas las enfermedades genéticas, el estudio familiar puede orientarnos, ya que las enfermedades debidas a defectos en el ADNmt, objeto de esta revisión, presentan fundamentalmente una herencia materna cuando están producidas por mutaciones puntuales. Por tanto, la historia familiar y el análisis del pedigrí puede ser fundamental para un diagnóstico de estas patologías. El médico, ante un posible caso de enfermedad del ADNmt, debe preguntar si hay miembros en la familia que presenten síntomas, aunque sean secundarios, característicos de estas enfermedades. En el caso de que la mutación esté presente en otros miembros de la familia, pero en un porcentaje muy bajo, puede hacer que no expresen toda la sintomatología y que sólo, al aumentar el porcentaje de la mutación en generaciones posteriores, aparezca el síndrome completo. Este seguimiento, como se puede deducir, es muy importante en niños con sospecha de enfermedad mitocondrial.

En el caso de deleciones, duplicaciones y depleciones, a pesar de que existe un daño sobre el ADNmt, la causa del mismo puede deberse a defectos en proteínas codificadas en el ADNn implicadas en el mantenimiento del sistema genético mitocondrial. En estos casos, al igual que con las proteínas del sistema OXPHOS que están codificadas en el ADNn y las que participan en su ensamblaje, pueden presentar un modo de herencia: autosómico recesivo, autosómico dominante o incluso ligada a sexo. No se debe de olvidar, en cualquier caso, que también se han descrito deleciones con herencia materna.

La heterogeneidad de manifestaciones clínicas, morfológicas y bioquímicas de estas enfermedades hace necesario un análisis genético-molecular para la confirmación y mejor clasificación de los síndromes. Para ello, es muy importante que los resultados de las investigaciones previas guíen los estudios genéticos que se deben de realizar.

Las enfermedades del genoma mitocondrial pueden deberse a tres tipos de daño en el ADNmt: 1) Mutaciones puntuales en genes de ARNt, de ARNr y codificantes de proteínas; 2) deleciones; y 3) depleción o disminución del número de copias del ADNmt. En el primer caso, la determinación de mutaciones asociadas a síndromes clínicos bien definidos o a otros más difusos, como sucede principalmente en

la edad pediátrica, se puede realizar de una manera sencilla utilizando ADN extraído de células sanguíneas. No obstante, el tejido de elección debe de ser siempre el más afectado ya que pueden darse mutaciones somáticas. Sin embargo, recientemente se están utilizando otros tejidos accesibles de forma poco invasiva (células epiteliales obtenidas de la orina, de la saliva, mucosa bucal, raíz de pelo fundamentalmente de cejas, etc.), que presentan la mutación en porcentajes incluso superiores a la sangre, y que están dando muy buenos resultados. Todo esto ha supuesto un gran avance dada la dificultad de realización de biopsias, la negativa de muchos padres a que se lleven a cabo en los niños pequeños, y, sobre todo, para estudios familiares.

Hasta ahora se han descrito más de 150 mutaciones puntuales pero sólo un número pequeño de ellas (Tabla 2) se encuentran con frecuencia en las distintas patologías. El resto solamente se han descrito en algunos casos y, la mayoría, una sola vez. ¿Que mutaciones hay que estudiar fundamentalmente? Si los pacientes han sido evaluados con precisión, el análisis puede restringirse a unas pocas mutaciones que representan la mayor parte de los casos. Solamente, ante la presencia de defectos concretos en la actividad de la cadena respiratoria, se debe de iniciar un estudio de otras mutaciones. Hoy en día, con el avance de las técnicas y dado el tamaño del ADNmt, es factible su secuenciación completa y el descubrimiento de nuevas mutaciones.

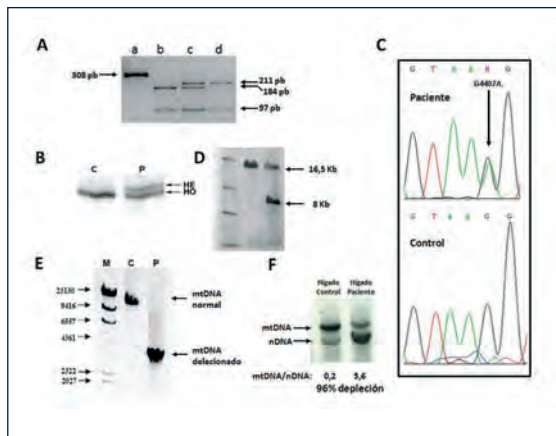
El método más común para la determinación de las mutaciones puntuales es el de amplificación del DNA por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posterior digestión con enzimas de restricción para determinar los polimorfismos en la longitud de los fragmentos producidos por estos enzimas (RFLP). La tinción con bromuro de etidio o la autorradiografía, en el caso de haberse marcado el ADN, indicará la presencia de la mutación y el porcentaje de heteroplasmia (Figura 3A). Este es el caso de mutaciones patogénicas que producen los síndromes de LHON, NARP (Neuropatía, Ataxia, Retinitis Pigmentosa), Leigh, MELAS (Miopatía Mitocondrial, Encefalopatía y Acidosis Láctica), MERRF (Epilepsia Mioclónica con Fibras Rojo- Rasgadas), y alguna otra. En el caso de fenotipos no muy claros y que nunca se han asociado a una mutación en concreto, es muy conveniente analizar genes completos. Esto se puede realizar mediante técnicas de cribaje como CSGE (Figura 3B), etc., que permiten una exploración rápida y simultánea de varios genes, o por secuenciación directa como se ha indicado anteriormente (Figura 3C). En cualquier caso, y como ya se ha comentado, se debe utilizar el tejido más afectado ya que no se puede descartar la existencia de mutaciones somáticas.

En el caso de patologías producidas por deleciones del ADNmt, es fundamental que el estudio de las mismas se realice en el tejido más afectado, en la mayor parte de los

casos se utilizan biopsias musculares. Raramente se encuentran deleciones en células sanguíneas, pero este hecho no excluye su presencia en otros tejidos. Según la experiencia de nuestro laboratorio, en un mismo tipo de síndrome, hemos encontrado deleciones sólo en músculo, en músculo y sangre pero en muy baja proporción, y en ambos tejidos en proporción equivalente y alta.

El método mejor y más fiable para detectar deleciones en el ADNmt es el de la hibridación Southern (ver Cuadro 1).

FIGURA 3. Análisis genético-molecular de la presencia de mutaciones puntuales, deleciones y depleciones en el DNA mitocondrial.



Panel A.- Detección de la mutación puntual T9176C causante del síndrome de Leigh. Electroforesis en geles de agarosa mostrando: a) fragmento de ADNmt amplificado de 308 pb. Al digerir el amplificado con el enzima de restricción Sbf I produce fragmentos de restricción de b) 184, 97 y 27 pb en presencia de la mutación (homoplasmia para el DNA mutado) (el más pequeño no se ve por salir del gel); c) de 211, 184, 97 y 27 pb (heteroplasmia, coexistencia de moléculas normales y mutadas); d) de 211 y 97 pb (homoplásmico normal). Panel B.- Análisis por la técnica de CSGE (*conformation sensitive gel electrophoresis*) de la presencia de mutaciones. La doble banda (heteroduplexes) indica la existencia de una mutación en el fragmento analizado. (C, control; P, paciente; HE, heteroduplexes; HO, homoduplexes). Panel C.- Electroferograma obtenido por secuenciación automática del fragmento del panel B que contiene una mutación. El doble pico del panel superior (paciente) indica la presencia de la mutación G4407A en heteroplasmia. Panel D.- Detección de deleciones por la técnica de hibridación Southern. El DNA total, digerido por el enzima de restricción Pvu II, se sometió a electroforesis, se transfirió a una membrana de nylon y se hibridó con una sonda de ADNmt. Las bandas de 16,5 kb y de 8 kb representan una molécula de ADNmt normal y delecionada en 8,5 Kpb, respectivamente. Panel E.- Detección de deleciones por la técnica de PCR largo. M, marcador de pesos moleculares; C, control (mostrando una banda de ADNmt normal); P, paciente (con una banda de ADNmt delecionado) Panel F.- Análisis de depleción de ADNmt por la técnica de hibridación Southern. La técnica se realiza igual que en el panel E pero hibridando simultáneamente con dos sondas, una de ADNmt y otra específica del gen nuclear del rARN 18S. Las dos sondas hibridan con dos bandas distintas señaladas como ADNmt y ADNn, respectivamente. El porcentaje de depleción se determina calculando la relación ADNmt/ADNn en control y paciente.

El análisis genético-molecular del ADNmt debería llevarse a cabo después de que los ensayos clínicos, morfológicos, bioquímicos, etc., indiquen la presencia de una enfermedad mitocondrial. Sin embargo, hoy en día, dada la rapidez con que se pueden realizar los análisis moleculares, es bastante frecuente que éstos se hagan después de que una exploración clínica indique indicios de una enfermedad mitocondrial, y antes de que se hayan podido estudiar otros parámetros, sobre todo en la infancia. Esta práctica, aunque muy común, sobre todo cuando se piensa en la presencia de mutaciones comunes, lleva a numerosos resultados negativos y a posteriores reorientaciones en la búsqueda de mutaciones a medida que la sintomatología se va haciendo más determinada.

Se podría concluir que la complejidad del diagnóstico diferencial de estas enfermedades se debe esencialmente a que ni la presentación clínica, ni las alteraciones bioquímicas detectadas por el análisis de metabolitos en fluidos biológicos, son orientativas del origen del defecto metabólico, dada la gran heterogeneidad y superposición de ambas. La existencia de deficiencias enzimáticas parciales y/o múltiples contribuye a dificultar el diagnóstico y la especificidad tisular de la expresión bioquímica añade un problema más, ya que los resultados normales en un tejido no implican la normalidad en otros. Esto hace que el diagnóstico bioquímico y la localización del defecto genético sólo se consiga en muchos casos tras una larga serie de estudios bioquímicos y moleculares en diferentes tejidos, especialmente los más afectados clínicamente. En cualquier caso, el correcto diagnóstico de las enfermedades mitocondriales requiere la utilización de servicios hospitalarios muy diversos y de personas altamente especializadas.

Cuadro 1

Método de hibridación Southern para la detección de deleciones y depleciones:

El ADN total se digiere con un enzima de restricción (Pvu II o Bam HI) que corta el ADNmt en un único punto linealizando-lo. A continuación separan los fragmentos obtenidos por electroforesis en geles de agarosa y se transfieren a una membrana de nylon o nitrocelulosa. La detección del ADNmt se realiza mediante hibridación con una sonda de ADNmt marcada con radiactividad o con moléculas no radiactivas (digoxigenina) y finalmente se visualiza por impresión fotográfica directa o previa inmunodetección de las moléculas. La imagen obtenida mostrará una banda de tamaño igual al del ADN normal (16.569 pares de bases) y, en el caso de presencia de deleciones, otras bandas de menor tamaño (Figura 3D). La densitometría del autorradiograma permite determinar el nivel de heteroplasmia. Las deleciones siempre se encuentran en forma heteroplásmica ya que su presencia implica la eliminación de genes completos del ADNmt que hacen inviable al individuo. El problema fundamental de esta técnica es que requiere cantidades elevadas de ADN que no siempre son

TABLA 2

FENOTIPOS MITOCONDRIALES MAS FRECUENTES Y MUTACIONES EN EL ADNmt ASOCIADAS A LAS MISMAS

ENFERMEDAD (SÍNDROME). CARACTERES CLÍNICOS	MUTACIÓN	GEN
LHON - Neuropatía óptica hereditaria de Leber. Pérdida de visión aguda o subaguda por atrofia óptica severa bilateral. - Neuropatía retinobulbar. - Fondo de ojo con edema del disco óptico y tortuosidad de los vasos retinianos. Además, pueden presentarse: síndrome piramidal y/o cerebeloso, neuropatía periférica, alteración de la conducción cardíaca.	G3460A	ND1 ^{43, 44}
	G11778A	ND4 ¹
	T14484C	ND6 ⁴⁵
NARP - Neuropatía, ataxia y retinopatía pigmentaria. Más combinación variable de: Retraso desarrollo psicomotor, demencia, epilepsia, debilidad muscular proximal, retraso mental.	T8993G	ATP6 ⁴⁶
	T8993C	ATP6 ⁴⁷
Leigh (MILS) - Enfermedad neurodegenerativa muy severa, que aparece en el primer año de vida, debida a un fallo grave en la producción de energía en el cerebro en desarrollo. Caracterizada por: brotes con regresión de adquisiciones psicomotoras, alteraciones respiratorias (hiperpneas, apneas) y de tronco cerebral; TAC/RMN cerebral con alteraciones simétricas de los núcleos de la base, tálamo, tronco cerebral y astas posteriores de la médula espinal. Además, puede presentar: vómitos y rechazo alimentos, parálisis oculomotoras, nistagmus, atrofia óptica, alteraciones de la deglución y/o movimientos involuntarios y/o síndrome extrapiramidal, parálisis facial, síndrome piramidal a veces con ROT's abolidos, hiperproteinorraquia con disminución de velocidad de conducción nerviosa, leucodistrofia, lesiones espongioformas con desmielinización, proliferación vascular y astrocitosis.	T8993G	ATP6 ^{48, 49}
	T8993C	ATP6 ⁴⁷
	T9176C	ATP6 ⁵⁰
	T9176G	ATP6 ⁵¹
MELAS - Encefalopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios "stroke-like". Pueden coexistir con FRR. Además, dos de los siguientes: crisis epilépticas focales o generalizadas, demencia, cefaleas tipo migrañas, vómitos. De forma variable aparece: sordera neurosensorial, baja estatura, proteínas aumentadas en LCR, calcificaciones de los ganglios basales, polineuropatía, demencia.	A3243G	ARN ^{tLeu(UUR)} 52
	Hot spot	ARN ^{tLeu(UUR)} 5
MERRF - Epilepsia mioclónica y miopatía con FRR. Además, puede ir acompañada de demencia, sordera neurosensorial, neuropatía sensitiva, atrofia óptica, baja estatura, lipomas múltiples en cuello y tronco, y proteínas aumentadas en LCR.	A8344G	ARN ^{tLys} 53
	G8363A	ARN ^{tLys} 54
	Hot spot	ARN ^{tLys} 5
	A3243G	ARN ^{tLeu(UUR)} 55
Diabetes y Sordera	A1555G	ARNr 12S ⁵⁶
Sordera inducida por aminoglucósidos	C1494T	ARNr 12S
Sordera neurosensorial	Hot spot	ARN ^{tSer(UCN)} 57
Lipomatosis múltiple simétrica	Hot spot	ARN ^{tLys} 58
Intolerancia al ejercicio - Intolerancia progresiva al ejercicio, debilidad de miembros proximales, a veces acompañados de ataques de mioglobinuria. Presencia de FRR. Suelen ser casos esporádicos, sin historia familiar y las mutaciones sólo afectan al músculo. Estas mutaciones parece, por tanto, que son somáticas.	G12334A	ARN ^{tLeu(CUN)} 59
	Hot spot	Citocromo b ⁶⁰
Necrosis Bilateral del estriado	T14487C	ND6 ⁶¹
Distonía	G14459A	ND6 ⁶²
Pearson - Anemia macrocítica refractaria asociada o no a neutropenia y trombocitopenia (vacuolización de precursores eritroides y mieloides, hemosiderosis y sideroblastos en anillo en médula). Disfunción pancreática exocrina, acidosis láctica, talla baja, mayor o menor grado de hidrops fetalís.	Delección única	Falta de varios genes ⁶³
CPEO - Oftalmoplejia externa crónica progresiva: oftalmoplejia, ptosis bilateral de los párpados y miopatía. Además, suele ir acompañada de intolerancia al ejercicio y debilidad de las extremidades. FRR en biopsias musculares COX negativas. Benigna.	Delección única	Falta de varios genes ^{64, 65}
	Delecciones múltiples	Falta de varios genes ⁶⁶⁻⁶⁹
	A3243G	ARN ^{tLeu(UUR)} 70
Kearns-Sayre - Inicio antes de los 20 años. Caracterizada por CPEO, retinitis pigmentaria atípica y bloqueo de la conducción cardíaca. Suele ir acompañado de síndrome cerebeloso, ataxia, miopatía mitocondrial, niveles de proteína LCR (> 100mg/L), sordera, demencia, fallos endocrinos y renales. La biopsia muscular muestra FRR COX negativas.	Delección única	Falta de varios genes ^{4, 71, 72}
MNGIE - Encefalomiopatía mitocondrial neurogastroin-testinal. Diarreas intermitentes, miopatía mitocondrial, neuropatía periférica, encefalopatía.	Delecciones múltiples	Falta de varios genes ⁷³⁻⁷⁶
DIDMOAD (si es de inicio precoz, S. de Wolfram)- Diabetes Mellitus, diabetes insípida, atrofia óptica, sordera neurosensorial.	Delecciones múltiples	Falta de varios genes ⁷⁷⁻⁷⁹
Toni-Debré-Fanconi - Nefritis tubulo-intersticial que conduce a un fallo renal. Encefalomiopatía con leucodistrofia. Episodios de diarrea líquida, raquitismo, hiperpigmentación cutánea de áreas expuestas a luz.	Delección	Falta de varios genes ^{80, 81}
Depleción del ADNmt - Disminución considerable de los niveles de ADNmt. Espectro clínico muy variado. Se están identificando diversas formas: miopática, hepato-cerebral, etc.	Depleción de ADNmt	Genes nucleares implicados en metabolismo de nucleótidos ⁸²⁻⁸⁷
Alpers - Polidistrofia rápidamente progresiva con pérdida neuronal, astrocitosis y espongiosis. Regresión psicomotora y crisis mioclónicas. Microcefalia adquirida. Asimismo, puede estar asociado a: Insuficiencia hepatocelular, tubulopatía tipo Fanconi, Miopatía.	Depleción de ADNmt	DNA polimerasa gamma ^{88, 89}

Se puede encontrar una lista actualizada de mutaciones asociadas a distintos fenotipos en MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database, 2005 <http://www.mitomap.org>. Muchas mutaciones, no citadas en esta tabla, solamente han sido descritas una vez.

posible de obtener de las muestras de que se parte. Para superar este problema se utiliza con frecuencia la técnica de PCR largo. Esta técnica consiste en la amplificación del ADNmt completo, utilizando una ADN polimerasa especial que permite la amplificación de fragmentos grandes de ADN y utilizando cebadores situados en la misma región pero en dirección opuesta. El resultado es la síntesis de una o varias moléculas lineales según las deleciones que estén presentes (Figura 3 panel E). Este método es también muy útil para mapear la zona donde se encuentra la deleción y definir los límites de la misma. El análisis de depleción de ADNmt puede realizarse tanto por la técnica de hibridación Southern descrita anteriormente utilizando sondas específicas para ADNmt y para el ADNn, o, actualmente, por la técnica de PCR cuantitativo a tiempo real, un método mucho más rápido y que exige mucha menor cantidad de ADN. En el primer caso, la relación de las bandas de ADNmt con respecto a las de ARNr nuclear indicará la posible presencia de la depleción (Figura 3F). El estudio de depleción por PCR-cuantitativo en tiempo real se realiza con una sonda de ADNmt para una región conservada del genoma que nunca se ha encontrado delecionada, y otra sonda nuclear que normaliza el número de células presentes en la muestra. De esta forma se pueden relacionar copias mitocondriales/copias nucleares. Este tipo de análisis es muy delicado y los valores obtenidos dependen de muchos factores, como sexo, edad, tejido, etc. por lo que se debe de realizar siempre con controles de las mismas características que la muestra del paciente.

7.- Nuevas mutaciones puntuales en el ADNmt y criterios de patogenidad

Como ya se ha indicado, el número de mutaciones puntuales que se han descrito en el ADNmt asociadas a distintos fenotipos es muy grande y, la mayor parte sólo se han descrito una vez relacionadas con algún fenotipo muy concreto o común. Esto hace materialmente imposible estudiar cada una de las mutaciones de forma individual. Además, existe una alta probabilidad de que existan fenotipos en los que todavía no se ha logrado encontrar la mutación que los causa. Por todo ello, es bastante común que se proceda a una secuenciación directa del ADNmt; bien de genes concretos, si se conoce la deficiencia de un complejo determinado, o de la totalidad del ADN, ya que su pequeño tamaño permite hacerlo de forma relativamente rápida y los costes son asequibles. En cualquier caso, y como ya se ha dicho, no hay que olvidar que al tratarse del ADNmt, se debe secuenciar el ADN del tejido más afectado.

En todo caso, el descubrimiento de una nueva mutación en el ADNmt necesita cumplir una serie de criterios para que pueda ser considerada como patogénica, lo que no es una tarea fácil. Desde el principio se establecieron una serie de

criterios, inicialmente muy sencillos (no aparecer en individuos control, segregación con el fenotipo, etc.), que luego se han ido ampliando. En el Cuadro 2, se hace una descripción de los mismos, si bien hay que dejar muy claro que no siempre una mutación patológica llega a cumplir todos ellos y, sin embargo, no puede descartarse su patogenidad.

Enfermedades causadas por mutaciones en el ADNmt

Como ya se ha indicado anteriormente, las manifestaciones clínicas de estas enfermedades son muy variadas. En algunos casos pueden encuadrarse en síndromes bien definidos, otras veces presentan solapamiento de síntomas y, hay que estar preparados para encontrar fenotipos muy diversos que estén producidos por mutaciones en el ADNmt. El número de trastornos que podemos encontrarnos es muy grande, por eso, en esta revisión, mostraremos, de forma esquemática, sólo los más frecuentes indicando las mutaciones comúnmente asociadas a los mismos o genes "hot spot" donde se han encontrado, aunque sea con baja frecuencia, mutaciones relacionadas con dichas patologías (Tabla 2).

Además, en las enfermedades mitocondriales encontramos cosas muy curiosas, como que un mismo fenotipo puede estar causado por distintas mutaciones, o que una misma mutación puede originar distintos fenotipos. Así, la mutación A3243G en el gen ARN^{tLeu(UUR)}, se ha encontrado (Tabla 2) en MELAS, sordera y diabetes, diabetes aislada, neuropatía periférica, fallo cardíaco congestivo, estatura corta y ataques, esquizofrenia, enfermedad renal, lipomas y oftalmoplegia progresiva externa crónica (CPEO), poli-microgiria, dismotilidad gástrica, nefropatía progresiva y miopatía aislada. La mutación A3243G se encuentra habitualmente en forma heteroplásmica y es muy probable que el porcentaje de heteroplasmia y la segregación replicativa puedan ser la razón para la multitud de fenotipos en los que se ha observado. Lo mismo ocurre con la mutación T8993G, que en baja heteroplasmia (80-90%) se asocia a NARP mientras que a niveles superiores se encuentra relacionada con el síndrome de Leigh. Asimismo, también hay fenotipos concretos que están producidos por mutaciones localizadas en genes muy diferentes.

El espectro de fenotipos relacionados con mutaciones en el ADNmt es seguramente mucho mayor y aumentará en el futuro. Del mismo modo, se está estudiando el papel que puede jugar el daño en el ADNmt en enfermedades neurodegenerativas como Parkinson y Alzheimer, e incluso en cáncer, entre otras patologías.

Cuadro 2**Criterios que deben cumplirse para que una mutación pueda considerarse patológica.**

1. La mutación debe de estar presente en pacientes y ausente en individuos control. Sin embargo, hay muchas mutaciones que claramente son patológicas pero que presentan una penetrancia incompleta, por lo que pueden encontrarse en miembros sanos del mismo pedigrí. Lo contrario también podría ser cierto, mutaciones que se han definido en estudios poblacionales podrían ser potencialmente patológicas.

2. La mutación debe de encontrarse en haplogrupos mitocondriales (variantes genéticas) diferentes, indicando, de esta forma, una asociación independiente con el fenotipo. Este criterio es imposible de cumplir para nuevas mutaciones.

Existencia de correlación entre el porcentaje de la mutación y el fenotipo. Como se ha indicado, el número de moléculas de ADNmt es muy elevado y la aparición de una mutación lleva a la existencia de dos poblaciones de ADNmt, normal y mutada (heteroplasmia), que segregarán al azar entre las células hijas durante la división celular (segregación mitótica). En consecuencia, el fenotipo de una célula heteroplásmica dependerá de la naturaleza de la mutación y del porcentaje de ADNmt mutado que tenga. Cuando el número de copias de ADN mutado sobrepasa un umbral, la función OXPHOS estará comprometida, disminuirá la síntesis de ATP y se desarrollará la enfermedad. Heteroplasmia no es necesariamente sinónimo de patogenicidad. Cualquier variante homoplásmica en el ADNmt ha atravesado un estado heteroplásmico antes de fijarse en la población como tal. Este criterio no es aplicable, lógicamente, a mutaciones homoplásmicas.

La mutación debe afectar a nucleótidos muy conservados evolutivamente. Cuanta mayor importancia funcional tenga una posición nucleotídica determinada, ésta tendrá una alta conservación evolutiva. Sin embargo, también nos podemos encontrar mutaciones patológicas que, aunque no estén muy conservadas evolutivamente, presenten mutaciones compensatorias.

3. La mutación debe afectar a dominios funcionales importantes. Este es un punto de mucha importancia, sin embargo, todavía no se conocen la estructura y función de algunas subunidades OXPHOS, ni los dominios funcionales en los ARNr o ARNt. Antes de calificar como patológica a una mutación determinada, es recomendable hacer una consideración muy rigurosa de todas las mutaciones que se encuentren en el ADNmt de un paciente. De alguna manera, estamos incidiendo en la importancia de la secuenciación completa del genoma mitocondrial. A veces, encontramos una mutación y, si más o menos cumple los criterios antes mencionados, la damos como patológica. Sin embargo, la posterior secuenciación de la molécula de ADNmt completa ha llevado al descubrimiento de otras mutaciones que pueden ser mejores candidatas. Además, aunque durante mucho tiempo se ha considerado que era imposible la coexistencia de más de una mutación patológica en el mismo ADNmt, ya se han descrito pacientes con dos mutaciones patológicas⁹⁰.

4. Es bastante habitual que se descarten como patológicas las mutaciones que se localizan en la región de control del ADNmt. En esta región se encuentran zonas del ADNmt que juegan un papel importantísimo en la regulación de la replicación y de la transcripción aunque su función sea prácticamente desconocida. Sin embargo, no deja de ser llamativo el hecho de que un genoma que presenta una gran economía de espacio (no tiene secuencias intrónicas, sin apenas nucleótidos no codificantes entre los genes, con genes solapantes, con codones de terminación no codificados en el ADNmt, con ARNr y ARNt más pequeños que los citosólicos o procarióticos), mantengan segmentos en la región de control sin función aparente. Asimismo, mutaciones sinónimas en los genes codificantes de proteínas, que no producen cambio de aminoácido, podrían alterar potenciales elementos de respuesta a las hormonas y afectar la regulación de la expresión del genoma. Finalmente, es muy posible que alguno de los nucleótidos no codificantes de las regiones codificantes puedan afectar el procesamiento de los ARNs policistrónicos que se originan a partir de las tres unidades de transcripción. Por todo ello, es muy aconsejable la secuenciación del genoma mitocondrial entero para una determinación exacta de la patogenicidad.

5. Cíbridos transmitocondriales: Con todos los inconvenientes descritos anteriormente, es fácil comprender que son necesarias pruebas funcionales directas para el establecimiento seguro del carácter patológico de una mutación. Sin embargo, esta demostración no es una tarea fácil, ya que los fondos genéticos mitocondriales o nucleares, así como el ambiente, pueden actuar como factores modificadores y la capacidad para detectar los efectos funcionalmente relevantes de las mutaciones pueden ser altamente dependientes del contexto del sistema experimental utilizado. Así, con el fin de poder establecer si una mutación en el ADNmt interfiere a nivel molecular con la fisiología celular, se han desarrollado modelos celulares formados por células carentes de ADNmt (células rho⁰), a las que se les han introducido mitocondrias de pacientes con mutaciones en el ADNmt^{91,92}. Estos cíbridos transmitocondriales resultantes de la fusión de las células rho⁰ con plaquetas del paciente, que carecen de ADN nuclear, contendrán mitocondrias con ADNmt mutado en un medio núcleo-citoplásmico "teóricamente" normal y permitirán caracterizar, tanto a nivel bioquímico como molecular, los mecanismos moleculares dañados que son responsables de la patogenicidad. Asimismo, y con el objetivo de tener modelos animales con enfermedades mitocondriales, se ha empezado a preparar ratones *knock-out* de genes nucleares que pueden afectar al mantenimiento del ADNmt. Por el momento existen muy pocos modelos animales con mutaciones en el ADNmt. Entre ellos, uno es un ratón con una mutación en el ARNr 16S⁹³, otro porta una delección en el ADNmt⁹⁴, y otro tiene una mutación en la subunidad I de la citocromo oxidasa^{95,96}. Una explicación bastante probable para esta escasez de modelos de ratón, es que las mutaciones del ADNmt más severas parece que se eliminan de la línea germinal femenina⁹⁷. En todo caso, se debe mencionar que, por el momento, no existe ningún modelo animal con mitocondrias que posean mutaciones humanas.

Influencia de haplogrupos mitocondriales y ambientales sobre la enfermedad

Como consecuencia de la actividad de la cadena respiratoria, la mitocondria es la principal fuente de producción de especies reactivas de oxígeno. Al estar el ADNmt localizado muy próximo a la membrana interna mitocondrial su tasa de mutación es mucho más elevada que la del ADN nuclear. Muchas de estas mutaciones serán causa de enfermedad como ya se ha mencionado y, algunas podrían ser tan dañinas que hacen inviables a los individuos que las poseen. Sin embargo, muchas mutaciones pueden ser más inocuas y fijarse en la población. Cada nueva mutación que se introduce producirá un genotipo mitocondrial o haplotipo ligeramente diferente del original, dando lugar a una nueva línea mitocondrial. El conjunto de haplotipos mitocondriales estrechamente relacionados se conoce como haplogrupo.

Las variantes genéticas que definen los haplogrupos afectan a todos los tipos de genes y podrían ser factores de susceptibilidad para el desarrollo de determinados fenotipos. Así, tras el descubrimiento de las mutaciones G11778A y T14484C, se hizo evidente que un porcentaje elevado de los pacientes con LHON pertenecía al haplogrupo mitocondrial J y se piensa que esta variante genética incrementa la penetrancia de estas dos mutaciones causantes de LHON⁹⁸. Así, variantes desacoplantes más mutaciones patológicas provocarían una menor capacidad productora de energía⁹⁹. Este mismo haplogrupo se ha encontrado sobre-representado en individuos centenarios¹⁰⁰, y subrepresentado entre pacientes con enfermedad de Parkinson¹⁰¹. Del mismo modo, el haplogrupo T predomina en pacientes con astenozoospermia moderada, mientras que el H es más frecuente en individuos con buena motilidad espermática¹⁰². En los últimos años ha habido una explosión de resultados ligando la variación en el ADNmt al cáncer¹⁰³, envejecimiento y enfermedades relacionadas con la edad^{104, 105}, etc. Sin embargo, no siempre se puede asociar un haplogrupo determinado a un fenotipo concreto¹⁰⁶.

La explicación del hecho de que un mismo haplogrupo mitocondrial pueda ser unas veces fuente de susceptibilidad para determinadas enfermedades y, a la vez, de resistencia contra otras, puede venir dada por el papel dual y antagonístico del sistema OXPHOS: generación de energía por un lado y de calor por otro. De este modo, las variantes desacoplantes producirían menos energía, menos especies reactivas de oxígeno, pero una mayor generación de calor. La disminución en la eficacia productora de energía aumentaría la penetrancia de las mutaciones patológicas⁹⁹. Por otra parte, una cadena respiratoria desacoplada mantendría en un estado más oxidado a los intermediarios portadores de electrones, reduciendo la producción de especies reactivas

de oxígeno y comportándose como un factor de resistencia frente a los fenotipos dependientes del daño oxidativo como el envejecimiento y las enfermedades asociadas a la edad¹⁰⁷.

A menudo, la sordera mitocondrial se produce por el tratamiento de pacientes con aminoglucósidos (Tabla 2). Así, se han descrito dos mutaciones asociadas con este tipo de sordera. La primera, y más común, es la mutación A1555G en el ARNr 12S y la segunda en la posición C1494T del mismo gen, que forma un apareamiento no canónico con la anterior⁵⁷. Cualquiera de estas dos mutaciones establece un nuevo par Watson-Crick que facilita la unión de los aminoglucósidos a esta región del ARNr 12S, importante para la decodificación, dañando la síntesis de proteínas mitocondriales. Así, factores ambientales pueden interactuar con genotipos determinados y modificar la expresión de mutaciones patológicas.

Asesoramiento genético y diagnóstico prenatal

El asesoramiento genético y diagnóstico prenatal de enfermedades del ADNmt de herencia materna, es muy complejo y arriesgado debido a las características de la genética mitocondrial (segregación mitótica, niveles de heteroplasmia, efecto umbral e influencia de factores genéticos y ambientales como modificadores fenotípicos), por lo que es desaconsejable con el estado actual de nuestros conocimientos. Cuando una madre posee un ADNmt en heteroplasmia, es imposible predecir qué porcentaje de las moléculas mutadas heredarán sus hijos y en qué porcentaje estarán presentes en cada uno de los tejidos. Nunca se puede descartar que una mutación que está ausente en biopsias coriónicas o en amniocitos, utilizadas para el diagnóstico prenatal, no pueda estar presente en otros tejidos del feto y causar una enfermedad.

Enfermedades del sistema OXPHOS causadas por defectos en genes nucleares de proteínas mitocondriales: regreso a la genética mendeliana

Como se ha mencionado en la introducción, de las más de 100 proteínas que forman el sistema OXPHOS, sólo trece están codificadas en el ADNmt. El resto de subunidades proteicas, que incluyen todos los factores implicados en su transporte a la mitocondria, procesamiento, modificación y ensamblaje en los complejos, así como todos los enzimas y factores necesarios para el mantenimiento y ex-

presión del genoma mitocondrial, están codificados en el ADNn. Por ello, cabría esperar que la mayoría de enfermedades causadas por la deficiencia de este sistema sean debidas a mutaciones en el ADNn y se transmitan con un modo de herencia mendeliano¹⁰⁸. En general, las mutaciones en genes nucleares producirían mitocondriopatías más graves y de aparición más temprana.

Los genes nucleares candidatos más obvios para producir enfermedades mitocondriales son los que codifican componentes del sistema OXPHOS. Así, se han descrito mutaciones en diferentes genes estructurales del complejo I⁵, aunque con menor frecuencia de lo esperado, y una mutación en el complejo II¹⁰⁹. Sin embargo, no se han descrito mutaciones en genes nucleares estructurales del complejo III y IV. La ausencia de mutaciones en estos genes puede ser debida a su naturaleza potencialmente letal, como se ha sugerido por los fenotipos extremadamente graves que presentaban los pacientes³⁹.

Otros genes que pueden causar estas enfermedades son los que codifican proteínas implicadas en el ensamblaje de estos complejos⁵, en el transporte de proteínas a la mitocondria¹¹⁰⁻¹¹² y, por último, mutaciones en todos los genes nucleares codificantes de proteínas implicadas en la replicación, y transcripción del ADNmt, en el procesamiento de ARN y en la traducción del mensaje genético. Así, se ha visto una gran implicación de la ADN polimerasa gamma en distintas enfermedades⁸⁷, y de otros genes relacionados con la producción del síndrome de depleción del ADNmt⁸⁶.

La posibilidad de que la mayoría de las mutaciones causantes de enfermedades mitocondriales estuvieran localizadas en genes nucleares, hizo que se abandonase un poco la búsqueda de mutaciones en el ADNmt. Sin embargo, los avances en secuenciación del ADN han revitalizado el campo, permitiendo el descubrimiento de nuevas mutaciones, de nuevos fenotipos para mutaciones conocidas y la posible participación de la variación genética del ADNmt en las enfermedades multifactoriales.

Como vemos, las dificultades con las que nos encontramos en el campo de las enfermedades mitocondriales, son muchísimas, lo que hace que no se tenga todavía un gran conocimiento de los mecanismos patogénicos y que no exista prácticamente ninguna estrategia terapéutica.

Agradecimientos

Parte de los trabajos aquí descritos han sido subvencionados por el Instituto de Salud Carlos III (FIS:PI04-0009, PI070045; CIBERER-CB06/07/0043), Diputación General de Aragón (Grupo Consolidado B33). El CIBER de Enfermedades Raras es una iniciativa del ISCIII.

Referencias

- Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AMS, II LJE, Nikoskelainen EK. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science*. 1988; 242: 1427-1430.
- Wallace DC, Zheng X, Lott MT, Shoffner JM, Hodge JA, Kelley RI, Epstein CM, Hopkins LC. Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF): Genetic, Pathophysiological, and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease. *Cell*. 1988; 55: 601-610.
- Zeviani M, Moraes CT, DiMauro S, Nakase H, Bonilla E, Schon E, Rowland LP. Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology*. 1988; 38: 1339-1346.
- Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature*. 1988; 331: 717-719.
- Ruiz-Pesini E, Lopez-Gallardo E, Dahmani Y, Herrero MD, Solano A, Diez-Sanchez C, Lopez-Perez M, Montoya J. Diseases of the human mitochondrial oxidative phosphorylation system. *Rev Neurol*. 2006; 43: 416-424.
- Wallace DC, Ruiz-Pesini E, Mishmar D. mtDNA variation, climatic adaptation, degenerative diseases, and longevity. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2003; 68: 479-486.
- Ojala D, Montoya J, Attardi G. The Putative mRNA per Subunit II of Human Cytochrome c Starts Directly at the translation initiation codon. *Nature*. 1980; 287: 79-82.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de-Brujin MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier HP, Smith AJH, Stader R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981; 290: 427-465.
- Montoya J, Ojala D, Attardi G. Distinctive features of the 5'-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs. *Nature*. 1981; 290: 465-470.
- Ojala D, Merkel C, Gelfand R, Attardi G. The tRNA genes punctuate the reading of genetic information in human mitochondrial DNA. *Cell*. 1980; 22: 393-403.
- Montoya J, Christianson T, Levens D, Rabinowitz M, Attardi G. Identification of Initiation Sites for Heavy Strand and Light Strand Transcription in Human Mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1982; 79: 7195-7199.
- Montoya J, Gaines GL, Attardi G. The Pattern of Transcription of the Human Mitochondrial rRNA Genes Reveals Two Overlapping Transcription Units. *Cell*. 1983; 34: 151-159.
- Chomyn A, Mariottini P, Cleeter MWJ, Ragan CI, Doolittle RF, Matsuno-Yagi A, Hatefi Y, Attardi G. Functional assignment of the products of the unidentified reading frames of human mitochondrial DNA. In: Quagliariello E, Slater EC, Plamieri F, Saccone C, Kron AM, eds. *Achievements and Perspectives of Mitochondrial Research*. Vol. II. Biogénesis. Amsterdam: Elsevier Sciences, 1985: 259-275.
- Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet*. 1999; 23: 147.
- Montoya J, Lopez-Perez MJ, Ruiz-Pesini E. Mitochondrial DNA transcription and diseases: Past, present and future. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1757: 1179-1189.
- Kasamatsu H, Vinograd J. Replication of circular DNA in eukaryotic cells. *Ann Rev Biochem*. 1974; 43: 695-719.

17. Kasamatsu H, Robberson DL, Vinograd J. A novel closed-Circular mitochondrial DNA with properties of a replicating intermediate. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1971; 68: 2252-2257.
18. Clayton DA. Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell*. 1982; 28: 693-705
19. Bowmaker M, Yang MY, Yasukawa T, Reyes A, Jacobs HT, Huberman JA, Holt IJ. Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone. *J Biol Chem*. 2003; 278: 50961-50969.
20. Yasukawa T, Yang MY, Jacobs HT, Holt IJ. A bidirectional origin of replication maps to the major noncoding region of human mitochondrial DNA. *Mol Cell*. 2005; 18: 651-662.
21. Brown TA, Clayton DA. Genesis and Wanderings: Origins and Migrations in Asymmetrically Replicating Mitochondrial DNA. *Cell Cycle*. 2006; 5: 917-921.
22. Martin M, Cho J, Cesare AJ, Griffith JD, Attardi G. Termination Factor-Mediated DNA Loop between Termination and Initiation Sites Drives Mitochondrial rRNA Synthesis. *Cell*. 2005; 123: 1227-1240.
23. Kruse B, Narasimhan N, Attardi G. Termination of transcription in human mitochondria: identification and purification of a DNA binding protein factor that promotes termination. *Cell*. 1989; 58: 391-397.
24. Fernández-Silva P, Martínez-Azorin F, Micol V, Attardi G. The human mitochondrial transcription termination factor (mTERF) is a multizipper protein but binds to DNA as a monomer, with evidence pointing to intramolecular leucine zipper interactions. *EMBO J*. 1997; 16: 1066-1079.
25. Tiranti V, Savoia A, Forti F, D'Apollito MF, Centra M, Racchi M, Zeviani M. Identification of the gene encoding the human mitochondrial RNA polymerase (h-mtRPOL) by cyberscreening of the expressed sequence tags database. *Hum Mol Genet*. 1997; 6: 615-625.
26. Prieto-Martín A, Montoya J, Martínez-Azorín F. A study on the human mitochondrial RNA polymerase activity points to existence of a transcription factor B-like protein. *FEBS Lett*. 2001; 503: 51-55.
27. Fisher RP, Clayton DA. A transcription factor required for promoter recognition by human mitochondrial RNA polymerase. *J Biol Chem*. 1985; 260: 11330-11338.
28. Falkenberg M, Gaspari M, Rantanen A, Trifunovic A, Larsson NG, Gustafsson CM. Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nat Genet*. 2002; 31: 289-294.
29. McCulloch V, Seidel-Rogol BL, Shadel GS. A human mitochondrial transcription factor is related to ARN adenine methyltransferases and binds S-adenosylmethionine. *Mol Cell Biol*. 2002; 22: 1116-1125.
30. Daga A, Micol V, Hess D, Aebersold R, Attardi G. Molecular Characterization of the Transcription Termination Factor from Human Mitochondria. *J Biol Chem*. 1993; 268: 8123-8130.
31. Prieto-Martín A, Montoya J, Martínez-Azorín F. Phosphorylation of rat mitochondrial transcription termination factor (mTERF) is required for transcription termination but not for binding to DNA. *Nucleic Acids Res*. 2004; 32: 2059-2068.
32. O'Brien TW. Properties of human mitochondrial ribosomes. *IUBMB Life*. 2003; 55: 505-513.
33. Sutovsky P, Neuber E, Schatten G. Ubiquitin-dependent sperm quality control mechanism recognizes spermatozoa with DNA defects as revealed by dual ubiquitin-TUNEL assay. *Mol Reprod Dev*. 2002; 61: 406-413.
34. Michikawa Y, Mazzucchelli F, Bresolin N, Scarlato G, Attardi G. Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication. *Science*. 1999; 286: 774-779.
35. Munnich A, Rotig A, Chretien D, Cormier V, Bourgeron T, Bonnefont JP, Saudubray JM, Rustin P. Clinical presentation of mitochondrial disorders in childhood. *J Inherited Metab Dis*. 1996; 19: 521-527.
36. DiMauro S, Bonilla E. Mitochondrial Encephalomyopathies. In: Rosenberg RN, Prusiner SB, DiMauro S, Barchi RL, eds. *The Molecular and Genetic Basis of neurological diseases*. Boston: Butterworth-Heinemann, 1998: 201-235.
37. Artuch R, Vilaseca MA, Farre C, Ramon F. Determination of lactate, pyruvate, beta-hydroxybutyrate and acetoacetate with a centrifugal analyser. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. 1995; 33: 529-533.
38. Taylor RW, Schaefer AM, Barron MJ, McFarland R, Turnbull DM. The diagnosis of mitochondrial muscle disease. *Neuromuscul Disord*. 2004; 14: 237-245.
39. Loeffen JLCM, Smeitink JAM, Trijbels JMF, Janssen AJM, Triepels RH, Sengers RCA, vandenHeuvel LP. Isolated complex I deficiency in children: Clinical, biochemical and genetic aspects. *Hum Mutat*. 2000; 15: 123-134.
40. Budde SMS, vandenHeuvel LPWJ, Janssen AJ, Smeets RJP, Buskens CAF, DeMeirleir L, VanCoster R, Baethmann M, Voit T, Trijbels JMF, Smeitink JAM. Combined enzymatic complex I and III deficiency associated with mutations in the nuclear encoded NDUFS4 gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 275: 63-68.
41. Schagger H, von Jagow G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem*. 1991; 199: 223-231.
42. Schagger H, Bentlage H, Ruitenbeek W, Pfeiffer K, Rotter S, Rother C, Bottcherpurkl A, Lodemann E. Electrophoretic separation of multiprotein complexes from blood platelets and cell lines: Technique for the analysis of diseases with defects in oxidative phosphorylation. *Electrophoresis*. 1996; 17: 709-714.
43. Howell N, Bindoff LA, McCullough DA, Kubacka I, Poulton J, Mackey D, Turnbull DM. Leber hereditary optic neuropathy: Identification of the same mitochondrial NDI mutation in six pedigrees. *Am J Hum Genet* 1991; 49: 939-950.
44. Houponen K, Vilkki J, Aula P, Nikoskelainen EK, Savontaus ML. A new mitochondrial DNA mutation associated with Leber hereditary optic neuropathy. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 1147-1153.
45. Johns DR, Neufeld MJ, Park RD. An ND-6 mitochondrial DNA mutation associated with Leber hereditary optic neuropathy. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992; 187: 1551-1557.
46. Holt IJ, Harding AE, Petty RKH, Morgan-Hughes JA. A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am J Hum Genet*. 1990; 46: 428-433.
47. Devries DD, Vanengelen BGM, Gabreels FJM, Ruitenbeek W, Vanoost BA. A Second Missense Mutation in the Mitochondrial ATPase-6 Gene in Leigh's Syndrome. *Ann Neurol*. 1993; 34: 410-412.
48. Santorelli FM, Shanske S, Macaya A, Devivo DC, DiMauro S. The Mutation at Nt 8993 of Mitochondrial DNA Is a Common Cause of Leigh's Syndrome. *Ann Neurol*. 1993; 34: 827-834.
49. Tatuch Y, Robinson BH. The Mitochondrial DNA Mutation at 8993 Associated with NARP Slows the Rate of ATP Synthesis in Isolated Lymphoblast Mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993; 192: 124-128.
50. Thyagarajan D, Shanske S, Vazquezmemije M, Devivo D, Dimauoro S. A novel mitochondrial ATPase 6 point mutation in familial bilateral striatal necrosis. *Ann Neurol*. 1995; 38: 468-472.
51. Carrozzo R, Tessa A, VazquezMemije ME, Piemonte F, Patrono C, Malandrini A, DionisiVici C, Vilarinho L, Villanova M, Schagger H,

- Federico A, Bertini E, Santorelli F. The T9176G mtDNA mutation severely affects ATP production and results in Leigh syndrome. *Neurology*. 2001; 56: 687-690.
52. Goto Y-i, Nonaka I, Horai S. A mutation in the tRNA^{Leu(UUR)} gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial phallomyopathies, *Nature*. 1990; 348: 651-653.
 53. Shoffner JM, Lott MT, Lezza AMS, Seibel P, Ballinger SW, Wallace DC. Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA^{Lys} mutation. *Cell*. 1990; 61: 931-937.
 54. Ozawa M, Nishino I, Horai S, Nonaka I, Goto Y. Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers: A G-to-A mutation at nucleotide pair 8363 in mitochondrial tARN(Lys) in two families. *Muscle & Nerve*. 1997; 20: 271-278.
 55. vandenOuweland JMW, Lemkes HHPJ, Gerbitz KD, Maassen JA. Maternally inherited diabetes and deafness (MIDD): A distinct subtype of diabetes associated with mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} gene point mutation. *Muscle & Nerve*. 1995; 18: S124-S130.
 56. Prezant TR, Agopian JV, Bohlan MC, Bu XD, Oztas S, Qiu WQ, Arnos KS, Cortopassi GA, Jaber L, Rotter JI, Shohat M, Fischelghodshian N. Mitochondrial Ribosomal RNAMutation Associated with Both Antibiotic-Induced and Non-Syndromic Deafness. *Nat Genet*. 1993; 4: 289-294.
 57. Zhao H, Li R, Wang Q, Yan Q, Deng JH, Han D, Bai Y, Young WY, Guan MX. 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: 139-152.
 58. Gamez J, Playán A, Andreu AL, Bruno C, Navarro C, Cervera C, Arbós MA, Schwartz S, Enriquez JA, Montoya J. Familial multiple symmetric lipomatosis associated with the A8344G mutation of mitochondrial DNA. *Neurology*. 1998; 51: 258-260.
 59. Vives-Bauza C, Gamez J, Roig M, Briones P, Cervera C, Solano A, Montoya J, Andreu AL. Exercise intolerance resulting from a muscle-restricted mutation in the mitochondrial tRNA(Leu(CUN)) gene. *Ann Med*. 2001; 33: 493-496.
 60. Andreu AL, Hanna MG, Reichmann H, Bruno C, Penn AS, Tanji K, Pallotti F, Iwata S, Bonilla E, Lach B, MorganHughes J, DiMauro S. Exercise intolerance due to mutations in the cytochrome b gene of mitochondrial DNA. *N Engl J Med*. 1999; 341: 1037-1044.
 61. Solano A, Roig M, Vives-Bauza C, Henández-Pena J, Garcia-Aruri E, Playan A, Lopez-Perez MJ, Andreu AL, Montoya J. Bilateral striatal necrosis associated with a novel mutation in the mitochondrial ND6 gene. *Ann Neurol*. 2003; 54: 527-530.
 62. Jun AS, Brown MD, Wallace DC. A mitochondrial DNA mutation at nucleotide pair 14459 of the NADH dehydrogenase subunit 6 gene associated with maternally inherited Leber hereditary optic neuropathy and dystonia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91: 6206-6210.
 63. Rotig A, Colonna M, Bonnefont JP, Blanche S, Fischer A, Saudubray JM, Munnich A. Mitochondria DNA deletion in Pearson's marrow/pancreas syndrome. *Lancet*. 1989; 1: 902-903.
 64. Moraes CT, DiMauro S, Zeviani M, Lombes A, Shanske S, Miranda AF. Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *New Engl J Med*. 1989; 320: 1293-1299.
 65. Carod-Artal FJ, Lopez-Gallardo E, Solano A, Dahmani Y, Ruiz-Pesini E, Montoya J. Deletions of the mitochondrial DNA associated to chronic progressive external ophthalmoplegia with ragged-red fibers in 2 Brazilian patients. *Med Clin (Barc)*. 2006; 126: 457-460.
 66. Zeviani M, Servidei S, Gellera C, Bertini E, DiMauro S, DiDonato S. An autosomal dominant disorder with multiple deletions of mitochondrial DNA starting at the D-loop region. *Nature*. 1989; 339: 309-311.
 67. Zeviani M, Bresolin N, Gellera C, Bordoni A, Pannacci M, Amati P, Moggio M, Servidei S, Scarlato G, DiDonato S. Nucleus-driven multiple large-scale deletions of the human mitochondrial genome: A new autosomal dominant disease. *Am J Hum Genet*. 1990; 47: 904-914.
 68. Suomalainen A, Majander A, Haltia M, Somer H, Lonnqvist J, Savontaus ML, Peltonen L. Multiple deletions of mitochondrial DNA in several tissues of a patient with severe retarded depression and familial progressive external ophthalmoplegia. *J Clin Invest*. 1992; 90: 61-66.
 69. Bohlega S, Tanji K, Santorelli FM, Hirano M, Aljishi A, DiMauro S. Multiple mitochondrial DNA deletions associated with autosomal recessive ophthalmoplegia and severe cardiomyopathy. *Neurology*. 1996; 46: 1329-1334.
 70. Hammans SR, Sweeney MG, Hanna MG, Brockington M, Morganhughes JA, Harding AE. The mitochondrial DNA transfer RNA(Leu(UUR)) A->G(3243) mutation - A clinical and genetic study. *Brain*. 1995; 118: 721-734.
 71. Zeviani M, Moraes CT, DiMauro S, Nakase H, Bonilla E, Schon EA, Rowland LP. Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology*. 1998; 51: 1525.
 72. Carod-Artal F, Lopez Gallardo E, Solano A, Dahmani Y, Herrero M, Montoya J. Mitochondrial DNA deletions in Kearns-Sayre syndrome. *Neurologia*. 2006; 21: 357-364.
 73. Nishino I, Spinazzola A, Hirano M. Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science*. 1999; 283: 689-692.
 74. Nishino I, Spinazzola A, Hirano M. MNGIE: from nuclear DNA to mitochondrial DNA. *Neuromuscular Disord*. 2001; 11: 7-10.
 75. Vissing J, Ravn K, Danielsen ER, Duno M, Wibrand F, Wevers RA, Schwartz M. Multiple mtDNA deletions with features of MNGIE. *Neurology*. 2002; 59: 926-929.
 76. Papadimitriou A, Comi GP, Hadjigeorgiou GM, Bordoni A, Sciacco M, Napoli L, Prella A, Moggio M, Fagioli G, Bresolin N, Salani S, Anastasopoulos I, Giassakis G, Divari R, Scarlato G. Partial depletion and multiple deletions of muscle mtDNA in familial MNGIE syndrome. *Neurology*. 1998; 51: 1086-1092.
 77. Barrientos A, Volpini V, Casademont J, Genis D, Manzanares JM, Ferrer I, Corral J, Cardellach F, Urbanomarquez A, Estivill X, Nunes V. A nuclear defect in the 4p16 region predisposes to multiple mitochondrial DNA deletions in families with Wolfram syndrome. *J Clin Invest*. 1996; 97: 1570-1576.
 78. Seyrantep V, Topaloglu H, Simsek E, Ozguc M, Yordam N. Mitochondrial DNA studies in Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *Lancet*. 1996; 347: 695-696.
 79. Hofmann S, Bezold R, Jaksch M, Kaufhold P, ObermaierKusser B, Gerbitz KD. Analysis of the mitochondrial DNA from patients with Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *Mol Cell Biochem*. 1997; 174: 209-213.
 80. Naudet P, Heidet L, Munnich A, Schmitz J, Bouissou F, Gubler MC, Rotig A. Deletion of the mitochondrial DNA in a case of de Toni-Debre-Fanconi syndrome and Pearson syndrome. *Pediatr Nephrol*. 1994; 8: 164-168.
 81. Solano A, Russo G, Playan A, Parisi M, DiPietro M, Scuderi A, Palumbo M, Renis M, Lopez-Perez MJ, Andreu AL, Montoya J. De Toni-Debre-Fanconi syndrome due to a palindrome-flanked deletion in mitochondrial DNA. *Pediatr Nephrol*. 2004; 19: 790-793.

82. Moraes CT, Shanske S, Tritschler HJ, Aprile JR, Andreetta F, Bonilla E, Schon EA, DiMauro S. mtDNA depletion with variable tissue expression: genetic abnormality in mitochondrial diseases. *Am J Hum Genet.* 1991; 48: 492-501.
83. Saada A, Shaag A, Mandel H, Nevo Y, Eriksson S, Elpeleg O. Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy. *Nat Genet.* 2001; 29: 342-344.
84. Mandel H, Szargel R, Labay V, Elpeleg O, Saada A, Shalata A, Anbinder Y, Berkowitz D, Hartman C, Barak M, Eriksson S, Cohen N. The deoxyguanosine kinase gene is mutated in individuals with depleted hepatocerebral mitochondrial DNA. *Nat Genet.* 2001; 29: 337-341.
85. Spinazzola A, Viscomi C, Fernández-Vizarrá E, Carrara F, D'Adamo P, Calvo S, Marsano RM, Donnini C, Weiher H, Strisciunglio P, Parini R, Sarzi E, Chan A, Dimauro S, Rotig A, Gasparini P, Ferrero I, Mothá VK, Tiranti V, Zeviani M. MPV17 encodes an inner mitochondrial membrane protein and is mutated in infantile hepatic mitochondrial DNA depletion. *Nat Genet.* 2006; 38: 570-575.
86. Alberio S, Minerí R, Tiranti V, Zeviani M. Depletion of mtDNA: syndromes and genes. *Mitochondrion.* 2007; 7: 6-12.
87. Copeland WC. Inherited mitochondrial diseases of DNA replication. *Annu Rev Med.* 2008; 59: 131-146.
88. Naviaux RK, Nyhan WL, Barshop BA, Poulton J, Markusic D, Karpinski NC, Haas RH. Mitochondrial DNA polymerase gamma deficiency and mtDNA depletion in a child with Alpers' syndrome. *Ann Neurol.* 1999;45:54-58.
89. Naviaux RK, Nguyen KV. POLG mutations associated with Alpers' syndrome and mitochondrial DNA depletion. *Ann Neurol.* 2004; 55: 706-712.
90. Brown MD, Allen JC, Van Stavern GP, Newman NJ, Wallace DC. Clinical, genetic, and biochemical characterization of a Leber hereditary optic neuropathy family containing both the 11778 and 14484 primary mutations. *Am J Med Genet.* 2001; 104: 331-338.
91. King MP, Attardi G. Injection of mitochondria in human cells leads to a rapid replacement of the endogenous mitochondrial DNA. *Cell.* 1988; 52: 811-819.
92. King MP, Attardi G. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science.* 1989; 246: 500-503.
93. Sligh JE, Levy SE, Waymire KG, Allard P, Dillehay DL, Nusinowitz S, Heckenlively JR, MacGregor GR, Wallace DC. Maternal germline transmission of mutant mtDNA from embryonic stem cell-derived chimeric mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97: 14461-14466.
94. Inoue K, Nakada K, Ogura A, Isobe K, Goto Y, Nonaka I, Hayashi JI. Generation of mice with mitochondrial dysfunction by introducing mouse mtDNA carrying a deletion into zygotes. *Nat Genet.* 2000; 26: 176-181.
95. Kasahara A, Ishikawa K, Yamaoka M, Ito M, Watanabe N, Akimoto M, Sato A, Nakada K, Endo H, Suda Y, Aizawa S, Hayashi JI. Generation of trans-mitochondrial mice carrying homoplasmic mtDNA with a missense mutation in a structural gene using ES cells. *Hum Mol Genet.* 2006; 15: 871-881.
96. Kasahara T, Kubota M, Miyauchi T, Noda Y, Mouri A, Nabeshima T, Kato T. Genetically modified mice harboring mitochondrial DNA defects show aberrant cyclic change in wheel-running activity, which is improved by lithium. *Mol Psychiatry.* 2006; 11: 523.
97. Fan W, Waymire KG, Narula N, Li P, Rocher C, Coskun PE, Vannan MA, Narula J, Macgregor GR, Wallace DC. A mouse model of mitochondrial disease reveals germline selection against severe mtDNA mutations. *Science.* 2008; 319: 958-962.
98. Brown MD, Sun FZ, 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: 381-387.
99. 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: 223-226.
100. DeBenedictis G, Rose G, Carrieri G, DeLuca M, Falcone E, Passarino G, Bonafe M, Monti D, Baggio G, Bertolini S, Mari D, Mattace R, Franceschi C. Mitochondrial DNA inherited variants are associated with successful aging and longevity in humans. *Faseb J.* 1999; 13: 1532-1536.
101. vanderWalt JM, Nicodemus KK, Martin ER, Scott WK, Nance MA, Watts RL, Hubble JP, Haines JL, Koller WC, Lyons K, Pahwa R, Stern MB, Colcher A, Hiner BC, Jankovic J, Ondo WG, Allen FH, Goetz CG, Small GW, Mastaglia F, Stajich JM, McLaurin AC, Middleton LT, Scott BL, Schmechel DE, PericakVance MA, Vance JM. Mitochondrial polymorphisms significantly reduce the risk of Parkinson disease. *Am J Hum Genet.* 2003; 72: 804-811.
102. Ruiz-Pesini E, Lapeña AC, Diez-Sanchez C, Perez-Martos A, Montoya J, Alvarez E, Diaz M, Urries A, Montoro L, Lopez-Perez MJ, Enriquez JA. Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *Am J Hum Genet.* 2000; 67: 682-696.
103. Wallace DC. Mitochondria and cancer: Warburg addressed. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2005; 70: 363-374.
104. Wallace DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: A dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet.* 2005; 39: 359-407.
105. Wallace DC. Why Do We Have a Maternally Inherited Mitochondrial DNA? Insights from Evolutionary Medicine. *Annu Rev Biochem.* 2006; 76: 781-821.
106. Torroni A, Campos Y, Rengo C, Sellitto D, Achilli A, Magri C, Semino O, Garcia A, Jara P, Arenas J, Scozzari R. Mitochondrial DNA haplogroups do not play a role in the variable phenotypic presentation of the A3243G mutation. *Am J Hum Genet.* 2003; 72: 1005-1012.
107. Coskun PE, Ruiz-Pesini E, Wallace DC. Control region mtDNA variants: Longevity, climatic adaptation, and a forensic conundrum. *PNAS.* 2003; 100: 2174-2176.
108. Dimauro S, Schon EA. Mitochondrial Disorders in the Nervous System. *Annu Rev Neurosci.* 2008; 31: 91-123.
109. Bourgerom T, Rustin P, Chretien D, Birch-Machin M, Bourgeois M, Viegas-Pequignot E, Munnich A, Rotig A. Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nat Genet.* 1995; 11: 144-149.
110. Tranebjaerg L, Schwartz C, Eriksen H, Andreasson S, Ponjavic V, Dahl A, Stevenson RE, May M, Arena F, Barker D, et al. A new X-linked recessive deafness syndrome with blindness, dystonia, fractures, and mental deficiency is linked to Xq22. *J Med Genet.* 1995; 32: 257-263.
111. Tranebjaerg L, Jensen PK, van Ghelue M. X-linked recessive deafness-dystonia syndrome (Mohr-Tranebjaerg syndrome). *Adv Otorhinolaryngol.* 2000;56:176-180
112. Blesa JR, Solano A, Briones P, Prieto-Ruiz JA, Hernández-Yago J, Coria F. Molecular Genetics of a Patient with Mohr-Tranebjaerg Syndrome due to a New Mutation in the DDP1 Gene. *Neuromolecular Med.* 2007; 9: 285-291.

Chapter 5

Diseases of the Human Mitochondrial Oxidative Phosphorylation System

Julio Montoya, Ester López-Gallardo, María Dolores Herrero-Martín, Íñigo Martínez-Romero, Aurora Gómez-Durán, David Pacheu, Magdalena Carreras, Carmen Díez-Sánchez, Manuel J. López-Pérez, and Eduardo Ruiz-Pesini

Abstract Mitochondrial diseases, or diseases of the oxidative phosphorylation system, consist of a group of disorders originated by a deficient synthesis of ATP. This system is composed of proteins codified in the two genetic systems of the cell, the nuclear and the mitochondrial genomes, and, therefore, the mode of inheritance could be either mendelian or maternal. The diseases can also appear sporadically. Due to the central role that mitochondria play in cellular physiology, these diseases are a social and health problem of great importance. They are considered rare diseases; however, together they constitute a large variety of genetic disorders.

It is also believed that mitochondria are involved, directly or indirectly, in many other human diseases, mainly in age-related diseases. This review will focus mainly on describing the special characteristics of the mitochondrial genetic system and the diseases caused by mitochondrial DNA mutations. We will also note the difficulties in studying these pathologies, and the possible involvement of the genetic variability of the mitochondrial genome in the development of these diseases.

Keywords: Mitochondrial diseases · Oxidative phosphorylation system · Mitochondrial DNA · Mitochondrial genetics · Nuclear DNA

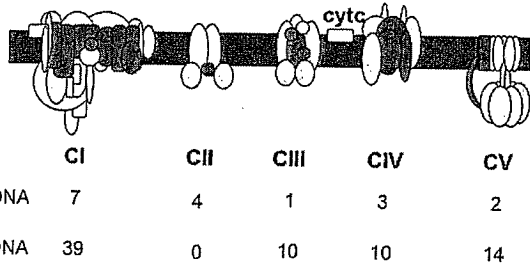
5.1 Introduction

The OXidative PHOSphorylation (OXPHOS) system, localized in the mitochondrial inner membrane, consists of the electron transport chain (ETC) and the ATP synthase. ETC is made up of the multienzymatic respiratory complexes I to IV. The reducing equivalents originating in β -oxidation and in the Krebs cycle pass along the respiratory complexes, and the energy generated is used to pump protons from the mitochondrial matrix to the intermembrane space. The electrochemical

J. Montoya (✉)

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza, Miguel Servet, 177 50013, Zaragoza, Spain
e-mail: jmontoya@unizar.es

Fig. 5.1 Scheme of the oxidative phosphorylation system. *Green:* mtDNA-encoded subunits; *Yellow:* nDNA-encoded subunits; *Red dots:* Coenzyme Q. CI to V: OXPHOS Complexes I to V



proton gradient thus originated is utilized by complex V to produce ATP (Fig. 5.1). However, this system is also involved in the production of heat, in the process of protein import to mitochondria, in the regulation of apoptosis, in the maintenance of cellular calcium levels, and in the generation of reactive oxygen species (ROS). ROS, calcium, and ATP can trigger different biochemical pathways and alter the cellular metabolic status. All the information coming from outside (nutrients and oxygen) is integrated in OXPHOS, and it can modify the level of some cellular messengers and send signals to the nucleus.

Human cells contain two genetic systems: nuclear (nDNA) that encodes for the great majority of the cell proteins, and the mitochondrial (mtDNA) that presents characteristics very different from nDNA, probably due to its location in a subcellular organelle. OXPHOS and the mitochondrial ribosomes are unique since their biogenesis depends on the coordinated expression of both genomes. OXPHOS consists of around 100 structural proteins and only 13 of these are encoded into the mitochondrial genome; the others, together with those needed to assemble the complexes and to maintain and express the mitochondrial genome, are encoded in the nucleus.

Mitochondrial diseases, or diseases of the oxidative phosphorylation system, consist of a group of disorders originating in deficient synthesis of ATP. These diseases can be caused by mutations in mtDNA (maternally inherited) or in nDNA (Mendelian inherited). The first mutations in mtDNA were discovered in 1988 [22, 58, 61]. Since then, the number of described mutations in this genome has increased enormously, although many of them have only been described in one patient. Later on, mutations in mitochondrial protein genes encoded in nDNA were also discovered [47]. Also, due to the central role that mitochondria play in cellular physiology, these diseases have become a social and health problem of great importance. It is also considered that mitochondria are involved, directly or indirectly, in many other human diseases, mainly in aging, age-related diseases, diabetes, and cancer, etc. [57].

Mitochondrial diseases show large phenotypic variability with symptoms that affect different organs and tissues, and the participation of specialists from different areas – clinicians, anatomopathologists, biochemists and geneticists – is required for correct diagnoses. The special characteristics of mitochondrial genome, the maternal inheritance, the high number of copies present in a cell and the mitotic

segregation confer to these diseases very particular properties. These disorders collectively affect approximately 1/5000 births [49]. In this review, the main characteristics of the diseases caused by mtDNA damage and some aspects of the nDNA mutations that affect OXPHOS will be summarized.

5.2 Mitochondrial Genetic System

Human mtDNA is a super-coiled double-strand closed circular molecule of approximately 16,569 base pairs [1, 2]. There are several copies per mitochondrion and many mitochondria per cell. This molecule encodes 37 genes: 2 rRNAs (12S and 16S rRNAs), 22 tRNAs and 13 polypeptide components of four of the five OXPHOS complexes; seven (ND1–ND6 and ND4L) of the 46 complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) subunits; one (apocytochrome b) of the 11 complex III (ubiquinol:cytochrome c oxidoreductase) subunits; three (COI–COIII) of the 13 complex IV (cytochrome c oxidase) polypeptides, and two (ATP6 and ATP8) of the 16 complex V (ATP synthase) subunits (Fig. 5.2).

The basic features of the mitochondrial genetic system, the mode of replication and transcription, and the proteins that encode were described in the 1980s [1, 9, 12, 36, 37, 39, 40, 42, 43, 46]. The genetic organization of mtDNA is extremely compact: there are some overlapping genes, the 3'-end CCA of the tRNAs and some termination codons not encoded in the mtDNA; there are no intronic sequences and almost no non-coding nucleotides between genes. A non-coding region (control region) of approximately 1.1 kb, located between the tRNA^{Phe} and tRNA^{Pro}, contains the origin of replication for the heavy strand (O_H), the transcription promoters (LSP and HSP, light and heavy strand promoters, respectively) and the regulatory elements for mtDNA expression (Fig. 5.2).

MtDNA replication starts at O_H, which is located downstream from the LSP in the D-loop region, and proceeds along the parental L-strand to produce a daughter H-strand circle. When H-strand replication reaches O_L, the parental H-strand is displaced, the initiation site for L-strand synthesis is exposed, and its replication starts and proceeds in the opposite direction, producing a daughter L-strand (Fig. 5.2) [12, 23]. This asymmetric replication of both strands allows the synthesis to be continuous. However, recently, a second mechanism of mtDNA replication has been described. According to this description, mtDNA replication occurs in a bidirectional and symmetric way, similar to replication of bacterial DNA [6, 60].

RNA is synthesized in human mitochondria by means of three transcription units that start at three different initiation points, one for the L-strand (L) and two for the H-strand (H₁ and H₂); these transcribe three polycistronic molecules [31, 36, 37] (Fig. 5.2). The H₁ transcription unit starts immediately upstream from the tRNA^{Phe} gene and ends at the 3'-end of the 16S rRNA. This transcription unit is responsible for the synthesis of the two rRNAs, tRNA^{Phe} and tRNA^{Val}. The second transcription unit starts at the initiation site H₂, 2 nt upstream from the 5'-end of the 12S rRNA gene [31, 37], and gives rise to a polycistronic molecule covering almost the whole

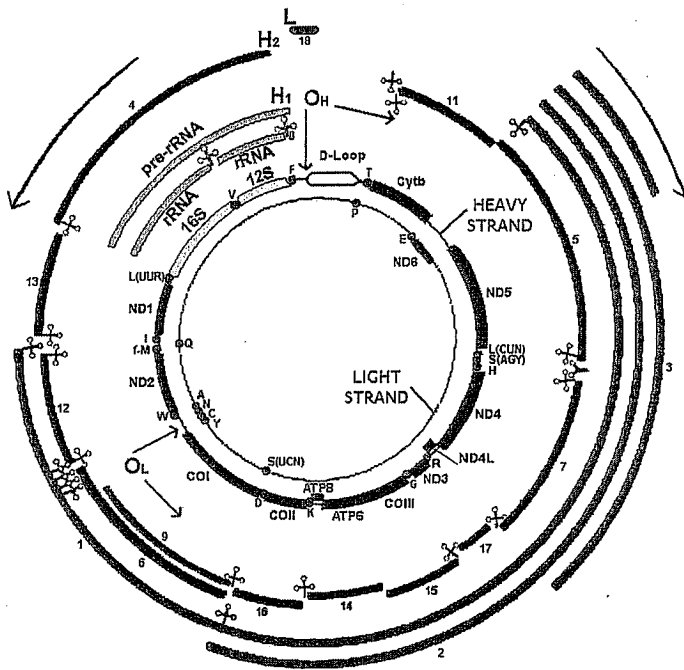


Fig. 5.2 Genetic and transcription map of human mtDNA. The two inner circles represent both mtDNA strands with the encoded genes: rRNAs (yellow), tRNAs (red dots) and protein coding genes (blue). External circles represent the RNAs transcribed from the heavy strand: (orange or blue for the RNAs derived from the H₁ or H₂ transcription units) and light strand (pink). ND1 to ND6 are subunits 1–6 of NADH dehydrogenase (complex I); cyt b, cytochrome b subunit of complex III; CO I, CO II and CO III, are subunits of cytochrome c oxidase (complex IV) and ATP6 and ATP8, subunits of ATP synthase (complex V). O_H and O_L represent replication origins for the H- and L-strand, respectively, according to the classical model of replication. H₁, H₂ and L indicate initiation points for the three transcription units of the H- and L-strand, respectively. Arrows at the O_H and O_L, and in the outside part of the figure, indicate the direction of replication and transcription of the two strands. tRNA genes are indicated by the one letter code of the corresponding amino acid (from Montoya et al. BBA-Bioenergetics 1757, 9–10, 2006)

H-strand. The mRNAs for 12 polypeptides and 14 tRNAs derive from the processing of this polycistron. The L-strand gives rise to a single polycistron starting at the 5'-end of the RNA 18, from which eight tRNAs, the ND6 mRNA and an RNA primer for initiation of replication are derived.

The polycistronic primary transcripts synthesized from the three initiation sites are processed, according to the "tRNA punctuation" model, to yield the mature rRNAs, mRNAs and tRNAs after the precise endonucleolytic cleavage on both sides of the tRNA molecules [37, 44]). Processing of the polycistronic molecules requires endonucleolytic cleavages at the 5'- and 3'-end of the tRNAs, the addition of the CCA to the 3'-end of the tRNAs, polyadenylation activity for mRNAs and rRNAs, and, finally, post-transcriptional modification of a subset of tRNA and rRNA nucleotides [39].

MtDNA transcription requires a mitochondrial RNA polymerase (mtRPOL or POLRMT) [54] and at least three transcription factors: TFAM (or mtTFA) and either TFB1M or TFB2M for initiation and mTERF for termination of the transcription unit starting at H₁ (Fig. 5.2) [39]. All of these are encoded by nDNA.

5.3 Mitochondrial Genetics

The location of mtDNA in a cytoplasmic organelle has conferred genetic features that differentiate it from nDNA. The main genetic features of the mitochondrial genome are:

5.3.1 Maternal Inheritance

mtDNA is maternally inherited. The mother will pass her mtDNA to all her children but only the daughters will transmit it to all members of the next generation. This is due to the high copy number of mtDNA within the oocyte and to the fact that mitochondria from the spermatozoon are eliminated in the first cellular divisions [51].

5.3.2 Polyplasmmy

The mtDNA copy number varies within the different tissues: from a very low number of molecules in platelets to more than 100,000 copies in the oocyte. The number of molecules in most tissues varies between 1000 and 10,000 per cell and each mitochondrion has between 2 and 10 copies organized in nucleoids. In normal tissues, all mtDNA molecules are identical (homoplasmy). However, the appearance of a mutation can give rise to the existence of two different types of molecules, normal and mutated (heteroplasmy).

5.3.3 Mitotic Segregation

In the case of heteroplasmy, mtDNA distributes randomly at cell division, giving rise to three possible genotypes: homoplasmic for normal mtDNA, homoplasmic for mutated mtDNA, and heteroplasmic with diverse percentages of the mutated molecule. As a consequence of this, the phenotype of a cell will depend on the percentage of mutated mtDNA that it contains. One of the main features of the mitochondrial diseases is that they are, in general, multisystemic.

5.3.4 Threshold Effect

In the case of heteroplasmy, there is a threshold level of the pathogenic mutation that is critical for the clinical expression of the disease. The percentage of mtDNA required to cause the dysfunction of an organ or tissue varies depending on their

ATP needs. The minimum critical number of mutated mtDNA is usually very high but there are cases in which a lower percentage will give rise to a clinical pathologic state. In many cases, the mutation is found in low levels in blood cells but very likely this percentage will be higher in the most affected tissues. For this reason, it is always advisable to use the appropriate tissue to carry out the test. If this is not possible, nowadays it is advisable to use cells collected from urine that have a higher percentage of the mutation than blood cells.

In the case of homoplasmic pathogenic mutations, they are transmitted in homoplasmy to all maternal children but in many cases not all the offspring will develop the disease. This is very frequently found in the Leber hereditary optic neuropathy (LHON). It is quite possible that nuclear or environmental factors may be important in the expression of the disorder. All this makes it very difficult to give genetic counselling.

5.3.5 High Mutational Rate

mtDNA is very vulnerable and its mutational rate is 10–20 times higher than that of nDNA genes with related function. There are several explanations for this fact. One of them is the accumulation of reactive oxygen species (ROS), produced as a consequence of respiratory transport chain activity, in the same compartment. ROS can damage the highly compact gene organization of mtDNA and affect different genes. Also, although there are mtDNA repair systems, these may not be efficient, resulting in high mutational rate.

It is generally thought that a normal individual is born with an initial homoplasmic mtDNA and an energy capacity that is higher than the bioenergetic threshold. Therefore, all the organs function normally. However, with age mtDNA mutations accumulate in different tissues and reduce the bioenergetic capacity to below the threshold levels and symptoms of a disease may appear. If the individual in question harbors a pathogenic mutation or mutations that give rise to a lower initial bioenergetic capacity, the organs and tissues may fail at an earlier age. In 1990, some evidence was found to support this theory, when it was shown that some mutations accumulated with age [34].

5.4 Diseases Caused by Mutations in mtDNA

Since all proteins encoded in the mitochondrial genome are components of OXPHOS, all the genes encoded in mtDNA (mRNA, tRNA and rRNA genes) participate in their synthesis and, therefore, the diseases caused by mutations in this genome present the common characteristic of having a deficient synthesis of ATP. As mitochondria are vital components of all types of nucleated cells, it is not surprising that these diseases are in general multisystemic, and that the clinical features are very variable (Table 5.1). Sometimes it is possible to define specific syndromes,

Table 5.1 Some of the common clinical characteristics for the diagnoses of mtDNA-associated disorders

Organ/tissue	Clinical features
Nervous system	Encephalopathy Stroke Epilepsy Cerebellar ataxia Seizures Myoclonus Mental and psychomotor retardation Migraine Cortical blindness Peripheral neuropathy Dementia Speech disturbances Sensorineural deafness Dystonia
Muscle	Myopathy Exercise intolerance Weakness Ophthalmoplegia Ptosis Myoglobinuria
Blood	Sydeoblastic anaemia
Eye	Optic atrophy Pigmentary retinopathy Cataracts
Ear	Deafness
Heart	Cardiomyopathy Conduction blocks
Endocrine system	Diabetes mellitus Diabetes insipidus Hypoparathyroidism Short stature
Intestine	Intestinal pseudo-obstruction Vomiting
Pancreas	Exocrine pancreatic dysfunction
Liver	Liver failure
Kidney	Fanconi syndrome Kidney failure
Muscle morphology	Ragged-red fibers Paracrystalline inclusions in mitochondria
Histochemistry	COX negative fibers
Biochemistry	Decreased activity of the respiratory complexes in muscle biopsy, fibroblasts, etc. OXPHOS complex assembly defects Decreased ATP levels
Laboratory	Lactic acidosis in blood and/or cerebrospinal fluid Hypoglycemia
Genetics	Maternal inheritance Sporadic
Cellular models (cybrids)	Metabolic defects transmitted by the mtDNA mutation

Table 5.2 Diseases caused by mtDNA damage

<i>Diseases associated with mtDNA point mutations in protein-coding genes</i>
Leber hereditary optic neuropathy (LHON)
NARP syndrome (Neuropathy, ataxia and retinitis pigmentosa)
Maternal inherited Leigh syndrome (MILS)
Exercise intolerance
<i>Diseases associated with mtDNA point mutations in tRNA genes</i>
MELAS syndrome (Mitochondrial Encephalopathy, Lactic Acidosis and stroke-like episodes)
MERRF syndrome (Myoclonus Epilepsy and Ragged-Red Fibers)
Diabetes and deafness
Neurosensorial deafness
<i>Diseases associated with mtDNA point mutations in rRNA genes</i>
Aminoglycoside-induced hearing loss
<i>Diseases associated with mtDNA deletions</i>
Chronic progressive external ophthalmoplegia (CPEO)
Kearns-Sayre syndrome (KS)
Pearson syndrome
<i>Diseases associated with mtDNA depletion</i>

but in general we find overlapping symptoms and a large variety of phenotypes. At other times, and mainly in children, the symptoms are not so specific and it is very difficult to define the disorder. In many cases diagnosis depends on the results of several types of analysis (clinical, laboratory, histochemical, biochemical and genetic). However, some of the mtDNA diseases affect just a single tissue, such as the optical nerve in LHON (Leber Hereditary Optic Neuropathy) and the coclear cells in mitochondrial deafness.

The number of mtDNA mutations found up to now is very large (more than 100 point mutations, although some of them have been described only once; and there are many deletions). For this reason, in this chapter we will only mention the main disorders known up to now (Table 5.2), with the main characteristics, the most common mutations and the hot-spot genes that cause the diseases [13, 15] (Table 5.3).

Besides the mutations mentioned above, there might be other ones in mtDNA sequences involved in DNA and RNA metabolism that might also cause diseases. In this sense, a high proportion of the somatic T414G transversion is found in the fibroblast mtDNA molecules of the aged but it is absent in younger individuals [34]. This mutation is located in the middle of the promoter for the L-strand transcription, at a position adjacent to a segment with high affinity for TFAM transcription factor. But these mtDNA elements related to the initiation of transcription are not the only ones to be associated with particular phenotypes. Thus, tRNA^{Leu(UUR)} is a mutational hot spot and several mutations have been described in the region where the termination factor mTERF binds [27]. This suggests that other functions, besides those related to normal tRNA, might be affected by these mutations. Thus, the A3243G transition located in mTERF binding site for the H₁ transcription

Table 5.3 Mitochondrial phenotypes associated with mtDNA damage

Disease (syndrome). Clinical and genetic features	Mutation	Gene
<i>LHON (Leber hereditary optic neuropathy)</i> . Acute or subacute loss of vision due to severe bilateral optic atrophy. Onset between 20 and 30 years. Telangiectatic microangiopathy, pseudoedema of the optic disc. Sometimes accompanied by cerebellar ataxia, peripheral neuropathy, or cardiac conduction abnormalities. Maternal inheritance, hetero- or homoplasmic	G3460A	ND1
	G11778A	ND4
	T14484C	ND6
<i>NARP (Neuropathy, Ataxia Retinitis Pigmentosa)</i> . Usually accompanied by developmental delay, dementia, muscle weakness, optic atrophy. Maternal inheritance, heteroplasmic	T8993G	ATP6
	T8993C	ATP6
<i>Leigh (MILS)</i> . Maternally inherited Leigh syndrome. Severe encephalomyopathy with onset during the first months of life, with signs of progressive brain stem dysfunction with abnormal respiration (hyperapnea), nistagmus, developmental delay, psychomotor regression, hypotonia, seizures, ophthalmoparesis, lactic acidosis. Maternal inheritance, heteroplasmic	T8993G	ATP6
	T8993C	ATP6
	T9176C	ATP6
	T9176G	ATP6
<i>Striatum bilateral necrosis</i>	T14487C	ND6
<i>Dystonia</i>	G14459A	ND6
<i>Exercise intolerance</i> . Fatigue, muscle weakness, myalgia with or without myoglobinuria, ragged-red fibers. Sporadic, somatic, heteroplasmic	hot spot	Cytochrome b
<i>MELAS. Mitochondrial Encephalopathy, Lactic Acidosis and stroke-like episodes</i> . Accompanied by focal brain abnormalities, focal or generalized seizures, recurrent headache, vomiting, dementia, limb weakness, short stature, deafness, ragged-red fibers. Maternal inheritance, heteroplasmic	A3243G	tRNA ^{Leu} (UUR)
	Hot spot	tRNA ^{Leu} (UUR)
<i>MERRF. Myoclonus Epilepsy and Ragged-Red Fibers</i> . Myoclonus, seizures, mitochondrial myopathy, cerebellar ataxia. Additional signs may include optic atrophy, deafness, dementia, peripheral neuropathy, pigmentary retinopathy, multiple lipomatosis, dementia. Maternal inheritance, heteroplasmic	A8344G	tRNA ^{Lys}
	G8363A	tRNA ^{Lys}
	Hot spot	tRNA ^{Lys}
<i>Diabetes and deafness</i> . Maternal inheritance, heteroplasmic	A3243G	tRNA ^{Leu} (UUR)
<i>Neurosensorial deafness</i> . Maternal inheritance, hetero- or homoplasmic	hot spot	tRNA ^{Ser} (UCN)
<i>Symmetric multiple lipomatosis</i>	hot spot	tRNA ^{Lys}
<i>Exercise intolerance</i>	G12334A	tRNA ^{Leu} (CUN)
<i>Deafness induced by aminoglycosides</i>	A1555G	rRNA 12S
	C1494T	rRNA 12S

Table 5.3 (continued)

Disease (syndrome). Clinical and genetic features	Mutation	Gene
<i>Pearson syndrome</i> . Refractory sideroblastic anemia, vacuolization of marrow precursors and exocrine pancreatic dysfunction, short stature and lactic acidosis. Affects children, who die in early infancy. Survivors usually generate Kearns-Sayre syndrome. Usually sporadic and heteroplasmic	Large-scale single deletions	Deletion of several genes
<i>CPEO</i> .- <i>Chronic Progressive External Ophthalmoplegia</i> . Benign clinical condition presenting ophthalmoplegia, ptosis, myopathy. Ragged-red and COX-negative fibers. Usually sporadic and heteroplasmic	Large-scale single or multiple deletions	Deletion of several genes
<i>Kearns-Sayre</i> . Invariant triad of onset before 20 years, CPEO and pigmentary retinopathy, plus at least one of the following symptoms: cerebellar syndrome, heart block, CSF protein level above 100 mg/ml. Usually also accompanied by ataxia, deafness, dementia, endocrine failures. Ragged-red and COX-negative fibers. Usually sporadic and heteroplasmic	Large-scale single deletions	Deletion of several genes
<i>MNGIE</i> .- <i>Myoneurogastrointestinal encephalopathy</i> . Progressive external ophthalmoplegia, neuropathy, leukoencephalopathy and intestinal dysmotility with cachexia. Affects young adults. It originates in mutations in the thymidin phosphorylase (TP) gene that produce autosomic recessive disease with multiple deletions in mtDNA	Multiple deletions	Deletion of several genes
<i>DIDMOAD</i> (or Wolfram syndrome if it is of early onset): Diabetes Insipida, Diabetes Mellitus, optic atrophy, neurosensory deafness	Multiple deletions	Deletion of several genes
<i>Toni-Debré-Fanconi</i> . Renal proximal tubulopathy in the presence of normal, or nearly normal, glomerular filtration. Defect in the reabsorption of glucose, amino acids, phosphate and potassium	Large-scale single deletions	Deletion of several genes
<i>Aminoaciuria</i> . Rickets, polyuria, short stature, microcephaly, mental retardation. Skin hyperpigmentation		
<i>MtDNA depletion</i> . Large decrease in mtDNA levels. Variable clinical spectra: myopathic, hepatocerebral forms, etc. Disorder of infancy or childhood. Autosomic recessive	mtDNA depletion	Nuclear genes involved in nucleotide metabolism
<i>Alpers</i> . Progressive sclerosing poliodystrophy, astrocytosis and spongiosis of the cerebral grey matter. Accompanied by developmental delay, progressive mental retardation, hypotonia, spasticity, seizures. Signs of chronic liver dysfunction	mtDNA depletion	DNA polymerase gamma
spongiosis, tubulopathy, myopathy		

A list of mtDNA mutations associated with different phenotypes can be found at MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database, 2005 <http://www.mitomap.org>. Most of the mutations not cited in the table have been found in single cases.

unit substantially decreases binding of this factor [10, 41]), resulting in severe impairment of transcription termination at the end of the 16S rRNA gene [21].

tRNAs are considered processing signals and many tRNA mutations have been shown to affect RNA metabolism. For example, the MELAS A3243G mutation provokes a small but consistent increase in the steady-state levels of new RNA (RNA 19), which contains the sequences of 16S rRNA + tRNA^{Leu(UUR)} + ND1, suggesting a defect in the tRNA^{Leu(UUR)} processing [25]. Other pathologic tRNA^{Leu(UUR)} mutations, such as 3256T, 3271C and 3302G, also increase the levels of RNA 19 [4, 19, 26].

Mutations in other mitochondrial tRNA genes also affect the RNA processing efficiency. Thus, mutations at positions 7510G, 7511G and 7512G in tRNA^{Ser(UCN)} decrease this efficiency [59]. However, mutations at positions 7442 C, 7443C, 7444T and 7445C and 7445G, adjacent to the 3'-end of the tRNA^{Ser(UCN)} gene, have not only quantitative but also qualitative effects on the processing of this tRNA. Thus, processing occurs at a position located one nucleotide downstream from the normal processing site [55, 59]. This qualitative defect was not found in another study of 7445C [18].

RNA stability is also affected by a microdeletion ($\mu\Delta 9205$) removing two residues at the ATP6 termination codon. This was found in a patient with mitochondrial disease. The polyadenylation form of the RNA 14 revealed substantial abnormalities. Most of this mutated RNA terminated with short poly(A) extensions and the steady-state levels of the RNA 14 were markedly decreased. The enhanced turnover of RNA 14 was due to a translation-dependent deadenylation decay mechanism [53].

MtDNA diseases are also unique inasmuch as different mutations in the same or in different genes might give rise to the same phenotype, just as the same mutation can give rise to very different phenotypes. The spectrum of phenotypes related to mtDNA mutations is increasing constantly, and it is also possible that very mild phenotypes may be missed if they do not resemble a true mitochondrial disease [20]. It is also quite likely that we will also see how different damage in mtDNA will play a role in other very important neurodegenerative diseases such as Parkinson, Alzheimer, and other age-related diseases, as well as in cancer, diabetes, etc. Sequencing of the whole mtDNA will be necessary in order to find new mutations associated with well-described and new phenotypes.

5.5 New mtDNA Point Mutations: Pathogenicity Criteria

Since mtDNA presents a high mutational rate it is quite possible that, besides the high number of point mutations that have already been described, we may still find new mutations related to specific syndromes or to new phenotypes. Thus, very recently our group has found a new mutation in the subunit I of cytochrome c oxidase associated with a very mild phenotype characterized by moderate mental retardation, weakness and fatigability [20]. As sequencing of the whole

mitochondrial genome is no longer a problem, the probability of finding new mutations has increased. However, we have to keep in mind that we should sequence the mtDNA from the most appropriate tissue since many disorders may be caused by somatic mutations. Because of the high phenotypic variability, we also have to think that we may be missing some mild phenotypes not viewed as mitochondrial phenotypes. We must bear in mind that the field of mitochondrial pathology is broader than previously thought.

Because of the abundance of different mitochondrial DNA variants that we can find, it is not easy to determine whether a new mutation is pathogenic. To facilitate this task, different criteria have been proposed. However, not every mutation fulfills all the criteria; therefore, we should be extremely careful in their application and maintain an open mind in defining the pathogenicity of a new mutation, in order to make progress in this field [38]. The different criteria are:

5.5.1 The Mutation must Be Present in Patients and Absent in Controls

A pathologic mutation should not be found in normal individuals. However, there are clear pathologic mtDNA mutations that present incomplete penetrance and they can be found in healthy members of the same pedigree (LHON and non-syndromic deafness mutations); they probably require other factors for expression. How many controls should we check? Nowadays, there are more than 3500 published mtDNA coding region sequences and it is very easy to check all of them. Thus, this is a good number of sequences in order to start to rule out the absence of a new mutation in control individuals.

It may also be true that mutations described in population studies could happen to be pathological in a patient because of intra- or intermolecular compensations in the control individual.

5.5.2 The Mutation Must Be Found in Different Mitochondrial Genetic Backgrounds

This criterion excludes the possibility of a new mutation as an ancient polymorphism, meaning that there is an independent association with the phenotype. New mutations cannot fulfill this criterion.

5.5.3 The Percentage of the Mutation Must Correlate with the Phenotype

As previously mentioned, the number of mtDNA molecules is usually very high, and therefore gives rise to the possibility of heteroplasmy and homoplasmy within the cell, and to the existence of correlation between genotype and phenotype. Thus, the phenotype of a heteroplasmic mutation will depend on the nature and percentage

of mutated molecules that are present in a specific tissue. A pathological mutation is usually, although not always, associated with heteroplasmy. However, this does not mean that heteroplasmy is synonymous with pathogenicity, since any mtDNA variant will have passed through a heteroplasmic state before being fixed in the general population. This criterion is not applicable to homoplasmic pathological mutations.

5.5.4 The Mutation Should Be the Best mtDNA Candidate Variant to Be Pathologic

The discovery of a good candidate for pathologic mutation does not preclude the need to resequence the whole mtDNA to rule out the possible existence of a second and more important mutation, thereby demonstrating the importance of whole mitochondrial genome sequencing of individuals suffering an mtDNA disease. Furthermore, there is also the possibility of the co-existence of more than one pathological mutation [7].

5.5.5 The Mutation Must Affect Highly Evolutionarily Conserved Nucleotides

A pathologic mutation usually affects a highly conserved nucleotide. The degree of conservation frequently depends on the functional importance of the nucleotide. However, we can also find pathologic mutations that are not very well evolutionarily conserved, probably because of the existence of compensatory mutations.

5.5.6 The Mutation Must Affect Functionally Important Domains

This is an important issue, although the structure and function of some OXPHOS subunits and the rRNA and tRNA functional domains are still unknown. It is also possible that a mutation may affect important positions involved in the replication, transcription and processing or modification of RNA.

5.5.7 Transfer of the mtDNA with a Mutation to Other Cell Lines Must Be Accompanied By Transfer of the Cellular and Molecular Defect: Transmitochondrial Cybrids as a Model to Confirm the Pathogenicity of a New Mutation.

The previous criteria give some evidence about the pathogenicity of a specific point mutation. However, it is necessary to have functional evidence if we want to confirm the pathogenicity of a new mutation. In this sense, the transmitochondrial cell line

model is nowadays considered to provide the strongest evidence to define a candidate mutation as pathologic. The transfer of a particular phenotype by repopulating human cell lines emptied of their mtDNA (σ^0 -cells) with another nuclear background is very good evidence of the involvement of the particular mutated mtDNA [24]. This technique has been used to determine the pathogenicity of human mtDNA point mutations since 1991 [11]. However, the results are not always straightforward since other mitochondrial, nuclear or environmental factors can act as modifying factors, and the ability to detect relevant effects depends on the parameters searched and experimental conditions used.

Although there are some animal models for mtDNA pathologic mutations, none of them reproduce a described human mtDNA pathologic mutation.

5.6 mtDNA Haplogrupos and Diseases

As mentioned above, the location of the mtDNA in the mitochondrial matrix and close to the inner membrane makes it vulnerable to ROS and, in consequence, to

Table 5.4 Mitochondrial haplogroup-associated phenotypes

mtDNA haplogroups	Phenotype
J	Longevity (R) LHON (S) Parkinson Disease (R) Knee Osteoarthritis (R) Age-related Maculopathy (S)
T	DIDMOAD (S) Astenozoospermia (S) Alzheimer Disease (R) NRTIs-Associated Peripheral Neuropathy (S) Endurance Training
H	Lewy Body Dementia (S)
H1	Ischemic Stroke (R)
H5	Alzheimer Disease (S) Hearing loss and migraine (S)
U	Alzheimer Disease (S)
Uk	Longevity (R) Parkinson Disease (R) Multiple Sclerosis (S) Age Related Hearing Loss (S) LHON (S)
D	Longevity (R) Heart attack (R)
R	Sepsis (R)
N9a	Type 2 Diabetes (R)

S and R denote susceptibility and resistance, respectively. NRTIs: Nucleotide Reverse Transcriptase inhibitors.

generating mutations at a higher rate than the nDNA. Each new mutation in mtDNA gives rise to a new mitochondrial variant or haplotype. Human population can be classified into haplogroups that are defined as a group of phylogenetically related haplotypes. These mitochondrial variants might modulate oxidative phosphorylation and predispose to or protect from common diseases (Alzheimer, Parkinson, diabetes, age-related diseases, etc.) or to the penetrance of specific phenotypes (Table 5.4).

5.7 Oxphos Disorders Without mtDNA Mutations

Besides the 13 polypeptides encoded in mtDNA, most of the protein components of OXPHOS, as well as the enzymes and factors involved in the maintenance, transcription and translation of the mitochondrial genome, as well as the proteins of the import machinery, are encoded by nDNA. Therefore, one can easily think that most of the pathological mutations that cause mitochondrial diseases should affect nuclear genes. In general, most of these mutations produce severe mitochondrialopathies with an early onset of the disease. In contrast to mtDNA, nDNA mutations are Mendelian inherited.

The first reported mutation on a nuclear encoded OXPHOS gene was in a patient with Leigh syndrome and complex II deficiency [5]. However, the most common cause of OXPHOS disease is Complex I deficiency. In fact mutations in this gene are responsible for approximately 30% of very variable phenotypes, although the great majority of them also cause Leigh syndrome. However, the percentage of mutations in this complex is not as high as expected, suggesting that they are incompatible with life. Deficiencies of complexes III, IV and V with mutations in nDNA coding genes are, to date, very rare. Thus, only two mutations in the subunit VII gene of complex III, ubiquinol-cytochrome c reductase (UQCRCQ) [3], and one in the COX6B1 gene of complex IV [32], causing severe infantile phenotypes, have been reported up to now. As mentioned before the lack of mutations in these genes could be due to their lethal nature [30, 47].

OXPHOS complex assembly requires the participation of nuclear encoded proteins, and mutations in these genes have been associated with important OXPHOS diseases. Assembly proteins have been described for Complexes I, III, IV and V, although the majority of diseases related to these genes have been found in complex III (BCS1L) and complex IV (SURF1, SCO1, SCO2, COX10) [14, 16, 47].

Up to now, only a small number of patients with OXPHOS diseases have presented mutations in nuclear genes coding for structural or assembly genes. However, recent advances open new possibilities. Thus, mutations in nuclear-encoded genes involved in maintenance, RNA metabolism and translation of the mitochondrial genome have been described as causing important disorders. Multiple deletions and depletion of mtDNA have been associated with mutations in the genes for mitochondrial DNA polymerase gamma (POLG and POLG2) and Twinkle helicase, and in thymidine phosphorylase (TP), adenosin nucleoside translocator (ANT1), desoxyguanosin kinase (DGUOK), thymidin kinase (TK2), succinyl-CoA synthetase (SUCLA2), cytosolic p53-inducible ribonucleotide reductase (RRM2B), and

MPV17, which controls the nucleotide pool inside the mitochondria. Also, mutations in ribosomal proteins or elongation factors have been found in very severe multiple OXPHOS defects that impair translation of mtDNA-encoded proteins [35, 50, 56]).

As mentioned above, in relation to mtDNA, mutations in nuclear genes involved in RNA metabolism might also cause diseases. Thus, trans-acting elements can also be related to mitochondrial diseases. TFB1M and TFB2M initiation factors are closely related to rRNA methyltransferases [33]. These transcription factors may play other roles in mitochondrial gene expression. In fact, TFB1M expression in *E. coli* lacking the KsgA rRNA methyltransferase restores dimethylation of two adjacent residues in a stem-loop of bacterial 16S rRNA. Moreover, resistance to the antibiotic kasugamycin is reversed by expression of TFB1M. The target adenine residues of this stem-loop are evolutionarily conserved in the mitochondrial 12S rRNA [48]. This mitochondrial stem-loop is close to the 3'-end of the 12S rRNA and 28 nucleotides downstream from a pathogenic mtDNA mutation (A1555G) that predisposes individuals to deafness. Interestingly, there is evidence that nuclear genetic background influences the phenotypic expression of this mutation. A polymorphism on chromosome 6 near the TFB1M gene, but located outside the coding region, was implicated as a nuclear modifying locus of the 1555G mutation in several pedigrees of mitochondrial deafness [8]. Several clues imply that altered TFB1M expression affects the disease at rRNA methylation. Thus, the methylation status of the analogous bacterial 16S stem-loop determines sensitivity to aminoglycosides, the same antibiotics inducing deafness in patients with the mitochondrial mutation. The bacterial stem-loop structure is altered by the dimethylation of the conserved adenines, which suggests that the mitochondrial homologue structure could also be affected [45].

Mitochondrial mutations in tRNA genes have been associated with different pathologic phenotypes. Recently, a candidate gene for prostate cancer susceptibility, ELAC2, was identified. Several variants of this gene are significantly associated with the occurrence of this disease. Surprisingly, the prostate cancer susceptibility gene encodes tRNase Z, the enzyme required for 3'-end processing of the mitochondrial tRNAs [52].

5.8 OXPHOS Defects Due to Environmental Factors

Frequently, mitochondrial deafness appears after aminoglycoside treatment. Two mtDNA mutations have been described as associated with mitochondrial deafness. The first one is an A1555G transition in the 12S rRNA and the second one at C1494T. Both of these two mutations rebuild a new Watson-Crick base pair that facilitates aminoglycoside binding to this region of 12S rRNA, important for decoding. Then, mitochondrial protein synthesis is impaired. Thus, environmental factors can interact with particular genotypes and modify the expression of pathologic mutations.

Other environmental factors may contribute, along with mtDNA variants, to the development of mitochondrial diseases. Thus, MPTP, a by-product of the illegal manufacture of abused drugs, acts as an inhibitor of respiratory complex I, producing a phenotype similar to that of Parkinson disease [28]. Annonacine, another complex I inhibitor, found in tropical plants frequently used as food and with medicinal purposes as well, causes Guadalupe Parkinson [29]. Statines, used to decrease cholesterol levels, have been associated with mitochondrial myopathies. Cholesterol and ubiquinone share the first steps of the biosynthetic pathway [17]. Thus, the inhibition of this biochemical pathway could decrease ubiquinone levels and electron transport between respiratory complexes I and II on the one hand and complex III on the other.

5.9 mtDNA in Multifactorial Disorders

In recent years, many results have associated the mtDNA variation to multifactorial disorders, such as aging and age-linked diseases. These associations support the common variant-common disease hypothesis for multifactorial disorders. According to this hypothesis, the disorder would be due to a rare combination of common genetic variants. Mitochondrial haplogroups are defined by ancient mutations and are therefore relatively well represented in populations. Nonetheless, more recent deleterious variants that could contribute to susceptibility to some pathologies would be rare in populations, lending support to the rare allele hypothesis for multifactorial disorders.

5.10 Conclusions

Oxidative phosphorylation diseases are a group of disorders due to deficient production of ATP. The most surprising clinical feature is that they are multisystemic and affect organs unrelated. For many years, mtDNA has been considered the only agent responsible for these diseases, because mtDNA genes only encode for OXPHOS subunits. However, all the proteins involved in the maintenance and expression of this genetic system, most of the subunits of the OXPHOS system, and many other proteins involved in the assembly are encoded in nuclear genes. Thus, mutations in these genes can also produce mitochondrial disorders. mtDNA mutations are maternally inherited or sporadic. They can also be produced by nuclear mutations in genes that regulate mtDNA biosynthesis and, therefore, Mendelian inheritance.

Acknowledgements This project was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III-FIS (PI07-0045 and PI05-0647) and the Diputación General de Aragón (Grupos Consolidados B33 and PM063-2007). CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER) is an initiative of the ISCIII.

References

1. Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de-Brujin, M. H. L., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, H. P., Smith, A. J. H., Stader, R. and Young, I. G. *Sequence and organization of the human mitochondrial genome*. Nature (1981) 290: 427–465.
2. Andrews, R. M., Kubacka, I., Chinnery, P. F., Lightowlers, R. N., Turnbull, D. M. and Howell, N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. Nat Genet (1999) 23: 147.
3. Barel, O., Shorer, Z., Flusser, H., Ofir, R., Narkis, G., Finer, G., Shalev, H., Nasasra, A., Saada, A. and Birk, O. S. Mitochondrial complex III deficiency associated with a homozygous mutation in UQCRCQ. Am J Hum Genet (2008) 82: 1211–1216.
4. Bindoff, L. A., Howell, N., Poulton, J., McCullough, D. A., Morten, K. J., Lightowlers, R. N., Turnbull, D. M. and Weber, K. Abnormal RNA processing associated with a novel transfer RNA mutation in mitochondrial DNA - a potential disease mechanism. J Biol Chem (1993) 268: 19559–19564.
5. Bourgeron, T., Rustin, P., Chretien, D., Birch-Machin, M., Bourgeois, M., Viegas-Pequignot, E., Munnich, A. and Rotig, A. Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. Nat Genet (1995) 11: 144–149.
6. Bowmaker, M., Yang, M. Y., Yasukawa, T., Reyes, A., Jacobs, H. T., Huberman, J. A. and Holt, I. J. Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone. J Biol Chem (2003) 278: 50961–50969.
7. Brown, M. D., Allen, J. C., Van Stavern, G. P., Newman, N. J. and Wallace, D. C. Clinical, genetic, and biochemical characterization of a Leber hereditary optic neuropathy family containing both the 11778 and 14484 primary mutations. Am J Med Genet (2001) 104: 331–338.
8. Bykhovskaya, Y., Mengesha, E., Wang, D., Yang, H., Estivill, X., Shohat, M. and Fischel-Ghodsian, N. Human mitochondrial transcription factor B1 as a modifier gene for hearing loss associated with the mitochondrial A1555G mutation. Mol Genet Metab (2004) 82: 27–32.
9. Chomyn, A., Mariottini, P., Cleeter, M. W. J., Ragan, C. I., Doolittle, R. F., Matsuno-Yagi, A., Hatefi, Y. and Attardi, G. Functional assignment of the products of the unidentified reading frames of human mitochondrial DNA. In: Achievements and Perspectives of Mitochondrial Research (Quagliariello, E., Slater, E. C., Plamieri, F., Saccone, C. and Kroon, A. M. Amsterdam, eds). Volume II Elsevier Sciences. 1985, 259–275.
10. Chomyn, A., Martinuzzi, A., Yoneda, M., Daga, A., Hurko, O., Johns, D., Lai, S. T., Nonaka, I., Angelini, C. and Attardi, G. MELAS mutation in mtDNA binding site for transcription termination factor causes defects in protein synthesis and in respiration but no change in levels of upstream and downstream mature transcripts. Proc Natl Acad Sci U S A (1992) 89: 4221–4225.
11. Chomyn, A., Meola, G., Bresolin, N., Lai, S. T., Scarlato, G. and Attardi, G. In vitro genetic transfer of protein synthesis and respiration defects to mitochondrial DNA-less cells with myopathy-patient mitochondria. Mol Cell Biol (1991) 11: 2236–2244.
12. Clayton, D. A. Replication of animal mitochondrial DNA. Cell (1982) 28: 693–705.
13. DiMauro, S. and Bonilla, E. Mitochondrial encephalomyopathies. In: The molecular and Genetic Basis of neurological diseases (Rosenberg, R. N., Prusiner, S. B., DiMauro, S. and Barchi, R. L., eds). Boston, Butterworth-Heinemann: 1998, 201–235.
14. DiMauro, S. and Hirano, M. Mitochondrial encephalomyopathies: an update. Neuromuscul Disord (2005) 15: 276–286.
15. DiMauro, S., Hirano, M. and Schon, E. A., Eds.. Mitochondrial Medicine. Abingdon, Informa Health Care: 2006.
16. DiMauro, S. and Schon, E. A. Mitochondrial disorders in the nervous system. Annu Rev Neurosci (2008) 31: 91–123.

17. Evans, M. and Rees, A. Effects of HMG-CoA reductase inhibitors on skeletal muscle: are all statins the same? *Drug Safety* (2002) 25: 649–663.
18. Guan, M. X., Enriquez, J. A., Fischel-Ghodsian, N., Puranam, R. S., Lin, C. P., Maw, M. A. and Attardi, G. The deafness-associated mitochondrial DNA mutation at position 7445, which affects tRNA^{Ser}(UCN) precursor processing, has long-range effects on NADH dehydrogenase subunit ND6 gene expression. *Mol Cell Biol* (1998) 18: 5868–5879.
19. Hao, H. L. and Moraes, C. T. Functional and molecular mitochondrial abnormalities associated with a C->T transition at position 3256 of the human mitochondrial genome – the effects of a pathogenic mitochondrial tRNA point mutation in organelle translation and RNA processing. *J Biol Chem* (1996) 271: 2347–2352.
20. Herrero-Martin, M. D., Pineda, M., Briones, P., Lopez-Gallardo, E., Carreras, M., Benac, M., Angel Idoate, M., Vilaseca, M. A., Artuch, R., Lopez-Perez, M. J., Ruiz-Pesini, E. and Montoya, J. A new pathologic mitochondrial DNA mutation in the cytochrome oxidase subunit I (MT-CO1). *Hum Mutat* (2008) 29: E103–E111.
21. Hess, J. F., Parisi, M. A., Bennett, J. L. and Clayton, D. A. Impairment of mitochondrial transcription termination by a point mutation associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* (1991) 351: 236–239.
22. Holt, I. J., Harding, A. E. and Morgan-Hughes, J. A. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* (1988) 331: 717–719.
23. Kasamatsu, H., Robberson, D. L. and Vinograd, J. A novel closed-circular mitochondrial DNA with properties of a replicating intermediate. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1971) 68: 2252–2257.
24. King, M. P. and Attardi, G. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* (1989) 246: 500–503.
25. King, M. P., Koga, Y., Davidson, M. and Schon, E. A. Defects in mitochondrial protein synthesis and respiratory chain activity segregate with the transfer RNA(Leu)(UUR) mutation associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes. *Mol Cell Biol* (1992) 12: 480–490.
26. Koga, Y., Davidson, M., Schon, E. A. and King, M. P. Fine mapping of mitochondrial RNAs derived from the mtDNA region containing a point mutation associated with MELAS. *Nucleic Acids Res* (1993) 21: 657–662.
27. Kruse, B., Narasimhan, N. and Attardi, G. Termination of transcription in human mitochondria: identification and purification of a DNA binding protein factor that promotes termination. *Cell* (1989) 58: 391–397.
28. Langston, J. W., Ballard, P., Tetrud, J. W. and Irwin, I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* (1983) 219: 979–980.
29. Lannuzel, A., Michel, P. P., Hoglinger, G. U., Champy, P., Jousset, A., Medja, F., Lombes, A., Darios, F., Gleye, C., Laurens, A., Hocquemiller, R., Hirsch, E. C. and Ruberg, M. The mitochondrial complex I inhibitor annonacin is toxic to mesencephalic dopaminergic neurons by impairment of energy metabolism. *Neuroscience* (2003) 121: 287–296.
30. Loeffen, J. L. C. M., Smeitink, J. A. M., Trijbels, J. M. F., Janssen, A. J. M., Triepels, R. H., Sengers, R. C. A. and van den Heuvel, L. P. Isolated complex I deficiency in children: clinical, biochemical and genetic aspects. *Hum Mutat* (2000) 15: 123–134.
31. Martin, M., Cho, J., Cesare, A. J., Griffith, J. D. and Attardi, G. Termination factor-mediated DNA loop between termination and initiation sites drives mitochondrial rRNA synthesis. *Cell* (2005) 123: 1227–1240.
32. Massa, V., Fernandez-Vizarra, E., Alshahwan, S., Bakhsh, E., Goffrini, P., Ferrero, I., Mereghetti, P., D'Adamo, P., Gasparini, P. and Zeviani, M. Severe infantile encephalomyopathy caused by a mutation in COX6B1, a nucleus-encoded subunit of cytochrome C oxidase. *Am J Hum Genet* (2008) 82: 1281–1289.
33. McCulloch, V., Seidel-Rogol, B. L. and Shadel, G. S. A human mitochondrial transcription factor is related to RNA adenine methyltransferases and binds s-adenosylmethionine. *Mol Cell Biol* (2002) 22: 1116–1125.

34. Michikawa, Y., Mazzucchelli, F., Bresolin, N., Scarlato, G. and Attardi, G. Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication. *Science* (1999) 286: 774–779.
35. Miller, C., Saada, A., Shaul, N., Shabtai, N., Ben-Shalom, E., Shaag, A., Hershkovitz, E. and Elpeleg, O. Defective mitochondrial translation caused by a ribosomal protein (MRPS16) mutation. *Ann Neurol* (2004) 56: 734–738.
36. Montoya, J., Christianson, T., Levens, D., Rabinowitz, M. and Attardi, G. Identification of initiation sites for heavy strand and light strand transcription in human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1982) 79: 7195–7199.
37. Montoya, J., Gaines, G. L. and Attardi, G. The pattern of transcription of the human mitochondrial rRNA genes reveals two overlapping transcription units. *Cell* (1983) 34: 151–159.
38. Montoya, J., Lopez-Gallardo, E., Diez-Sanchez, C., Lopez-Perez, M. J. and Ruiz-Pesini, E. 20 years of human mtDNA pathologic point mutations: Carefully reading the pathogenicity criteria. *Bba Bioenergetics* (2009) 1787: 476–483.
39. Montoya, J., Lopez-Perez, M. J. and Ruiz-Pesini, E. Mitochondrial DNA transcription and diseases: past, present and future. *Biochim Biophys Acta* (2006) 1757: 1179–1189.
40. Montoya, J., Ojala, D. and Attardi, G. Distinctive features of the 5'-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs. *Nature* (1981) 290: 465–470.
41. Nam, S. C. and Kang, C. DNA light-strand preferential recognition of human mitochondria transcription termination factor mTERF. *J Biochem Mol Biol* (2005) 38: 690–694.
42. Ojala, D., Merkel, C., Gelfand, R. and Attardi, G. The tRNA genes punctuate the reading of genetic information in human mitochondrial DNA. *Cell* (1980) 22: 393–403.
43. Ojala, D., Montoya, J. and Attardi, G. The putative mRNA per subunit II of human cytochrome c starts directly at the translation initiation codon. *Nature* (1980) 287: 79–82.
44. Ojala, D., Montoya, J. and Attardi, G. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature* (1981) 290: 470–474.
45. Rife, J. P. and Moore, P. B. The structure of a methylated tetraloop in 16S ribosomal RNA. *Structure* (1998) 6: 747–756.
46. Robberson, D. L., Kasamatsu, H. and Vinograd, J. Replication of mitochondrial DNA. Circular replicative intermediates in mouse L cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1972) 69: 713–741.
47. Ruiz-Pesini, E., Lopez-Gallardo, E., Dahmani, Y., Herrero, M. D., Solano, A., Diez-Sanchez, C., Lopez-Perez, M. and Montoya, J. Diseases of the human mitochondrial oxidative phosphorylation system. *Rev Neurol* (2006) 43: 416–424.
48. Seidel-Rogol, B. L., McCulloch, V. and Shadel, G. S. Human mitochondrial transcription factor B1 methylates ribosomal RNA at a conserved stem-loop. *Nat Genet* (2003) 33: 23–24.
49. Skladal, D., Halliday, J. and R., T. D. Minimum birth prevalence of mitochondrial respiratory chain disorders in children. *Brain: J Neurol* (2003) 126: 1905–1912.
50. Smeitink, J. A., Elpeleg, O., Antonicka, H., Diepstra, H., Saada, A., Smits, P., Sasarman, F., Vriend, G., Jacob-Hirsch, J., Shaag, A., Rechavi, G., Welling, B., Horst, J., Rodenburg, R. J., van den Heuvel, B. and Shoubridge, E. A. Distinct clinical phenotypes associated with a mutation in the mitochondrial translation elongation factor EFTs. *Am J Hum Genet* (2006) 79: 869–877.
51. Sutovsky, P., Neuber, E. and Schatten, G. Ubiquitin-dependent sperm quality control mechanism recognizes spermatozoa with DNA defects as revealed by dual ubiquitin-TUNEL assay. *Mol Reprod Dev* (2002) 61: 406–413.
52. Takaku, H., Minagawa, A., Takagi, M. and Nashimoto, M. A candidate prostate cancer susceptibility gene encodes tRNA 3' processing endoribonuclease. *Nucleic Acids Res* (2003) 31: 2272–2278.
53. Temperley, R. J., Seneca, S. H., Tonska, K., Bartnik, E., Bindoff, L. A., Lightowlers, R. N. and Chrzanowska-Lightowlers, Z. M. Investigation of a pathogenic mtDNA microdeletion

- reveals a translation-dependent deadenylation decay pathway in human mitochondria. *Hum Mol Genet* (2003) 12: 2341–2348.
54. Tiranti, V., Savoia, A., Forti, F., D'Apollito, M. F., Centra, M., Racchi, M. and Zeviani, M. Identification of the gene encoding the human mitochondrial RNA polymerase (h-mtRPOL) by cyberscreening of the expressed sequence tags database. *Hum Mol Genet* (1997) 6: 615–625.
 55. Toompuu, M., Levinger, L. L., Nadal, A., Gomez, J. and Jacobs, H. T. The 7472insC mtDNA mutation impairs 5' and 3' processing of tRNA(Ser(UCN)). *Biochem Biophys Res Commun* (2004) 322: 803–813.
 56. Valente, L., Tiranti, V., Marsano, R. M., Malfatti, E., Fernandez-Vizarra, E., Donnini, C., Mereghetti, P., De Gioia, L., Burlina, A., Castellan, C., Comi, G. P., Savasta, S., Ferrero, I. and Zeviani, M. Infantile encephalopathy and defective mitochondrial DNA translation in patients with mutations of mitochondrial elongation factors EFG1 and EFTu. *Am J Hum Genet* (2007) 80: 44–58.
 57. Wallace, D. C., Ruiz-Pesini, E. and Mishmar, D. mtDNA variation, climatic adaptation, degenerative diseases, and longevity. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* (2003) 68: 479–486.
 58. Wallace, D. C., Singh, G., Lott, M. T., Hodge, J. A., Schurr, T. G., Lezza, A. M. S., II, L. J. E. and Nikoskelainen, E. K. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* (1988) 242: 1427–1430.
 59. Yan, H., Zareen, N. and Levinger, L. Naturally occurring mutations in human mitochondrial pre-tRNA^{Ser(UCN)} can affect the tRNase Z cleavage site, processing kinetics and substrate secondary structure. *J Biol Chem* (2006) 281: 3926–3935.
 60. Yasukawa, T., Yang, M. Y., Jacobs, H. T. and Holt, I. J. A bidirectional origin of replication maps to the major noncoding region of human mitochondrial DNA. *Mol Cell* (2005) 18: 651–662.
 61. Zeviani, M., Moraes, C. T., DiMauro, S., Nakase, H., Bonilla, E., Schon, E. and Rowland, L. P. Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology* (1988) 38: 1339–1346.

