



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

VARICION GENETICA DEL mtDNA: DE LA GENETICA POBLACIONAL A LA FARMACOGENOMICA

Autor

Gómez Durán, Aurora

Director/es

Ruiz Pesini, Eduardo

FACULTAD DE VETERINARIA

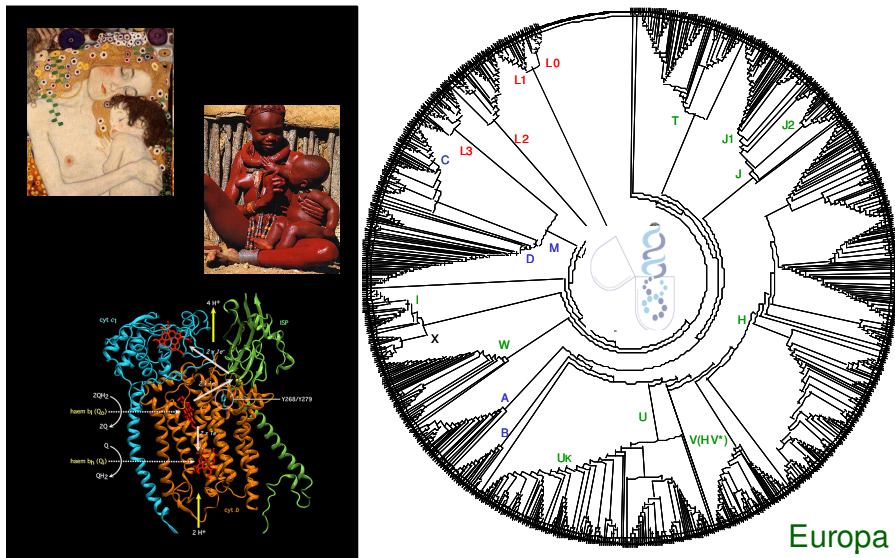
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

2011

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Tesis doctoral

**VARIANTES GENÉTICAS DEL mtDNA: DE LA
GENÉTICA POBLACIONAL A LA
FARMAQGENÓMICA.**



Aurora Gómez Durán

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

**VARIANTES GENÉTICAS DEL mtDNA: DE LA
GENÉTICA POBLACIONAL A LA
FARMAQGENÓMICA.**

Memoria presentada por Aurora Gómez Durán

Licenciada en Farmacia

para optar al título de Doctor

Dirigida por el Dr. Eduardo Ruíz Pesini

Zaragoza, Diciembre 2011



UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y
BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

FACULTAD DE VETERINARIA

Miguel Servet, 177
50013 Zaragoza

Teléfono: 976 76 16 38
Fax: 976 76 16 12

D. EDUARDO RUIZ PESINI, Investigador de ARAID

CERTIFICA:

Que la Tesis doctoral **“Variantes genéticas del mtDNA: de la genética poblacional a la FarmaQgenómica”**, 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 a grado de doctor.

Zaragoza, Diciembre de 2011

Eduardo Ruiz Pesini

Este trabajo ha sido realizado con una beca asociada al proyecto FIS: 050645 del Instituto Carlos III, un contrato del CIBER de Enfermedades Raras y una beca de la AEMPI.

Parte del contenido de la presente Tesis Doctoral ha sido presentado en los siguientes congresos:

1. VII Encuentro de Neurociencias. Zaragoza, Abril 2011.
2. 4ª Reunión Científica Anual del CIBERER. Madrid, Octubre 2010.
3. XXXIII Congreso de la SEBBM. Córdoba, Septiembre 2010.
4. VI Encuentro de Neurociencias. Zaragoza, Diciembre 2009.
5. 3ª Reunión Científica Anual del CIBERER. Madrid, Octubre 2009.
6. V Encuentro de Neurociencias. Zaragoza, Diciembre 2008.
7. French- Spanish Patnership Hubert Curien- Picaso. Le Teich, October 2008.
8. XXXI Congreso de la SEBBM. Bilbao, Septiembre 2008.
9. 1ª Reunión Anual del CIBERER. Barcelona, Noviembre 2007.

Ha obtenido los siguientes premios:

1. Premio Roche a la mejor comunicación en panel. XXXI Congreso de la SEBBM. Bilbao, Septiembre 2008.

Y se ha publicado en:

1. Del Valle, I., **Gómez-Durán, A.**, Holt, W.V., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez J.A. "Soy Lecithin Interferes with Mitochondrial Function in Frozen-thawed Ram Spermatozoa". **Journal of Andrology**. November, 2011. Aceptado
2. Montoya, J., López-Gallardo, E., Herrero-Martin, M. D., Martínez-Romero, I., Pacheu, D., **Gómez-Durán, A.**, Carreras, M., Díez-Sánchez, C., López-Pérez, M. J., Ruiz-Pesini, E. "Diseases of the human mitochondrial DNA" **Mitochondrial Pathophysiology**. Chapter 4, 65-80, 2011
3. Pacheu-Grau D., **Gómez-Durán A.**, López-Gallardo E Pinós T, Andreu AL, López-Pérez MJ, Montoya J, Ruiz-Pesini E. "Progress" Renders Detrimental an Ancient Mitochondrial DNA Genetic Variant". **Hum Mol Genet**. 20(21):4224-31. 2011
4. **Gómez-Durán A.**, Pacheu-Grau D, López-Pérez M.J., Montoya J., Ruíz-Pesini E. "Mitochondrial pharma-Q-genomics: Targeting the OXPHOS cytochrome b". **Drug Discovery Today**. 16,5-6,2011
5. Pacheu-Grau D., **Gómez-Durán A.**, López-Pérez M.J., Montoya J., Ruíz-Pesini E. "Influence of mtDNA genetic variation on antibiotic therapy". **Pharmacogenomics** 11(9) 1185-1187, 2010.
6. **Gómez-Durán, A.**, Pacheu-Grau, D., López-Gallardo, E., Díez-Sánchez, C., Montoya, J., López-Pérez, M. J., Ruiz-Pesini, E. "Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups". **Hum Mol Genet** 19, 3343-3353, 2010.
7. Pacheu-Grau D., **Gómez-Durán A.**, López-Pérez M.J., Montoya J., Ruíz-Pesini E. *Mitochondrial pharmacogenomics; barcode for antibiotic therapy*. **Drug Discovery Today**, 15, 33-39, 2010
8. Rhouda T, Martínez-Redondo D, **Gómez-Durán A**, Elmtili N, Idaomar M, Díez-Sánchez C, Montoya J, López-Pérez MJ, Ruiz-Pesini E. "Moroccan mitochondrial genetic background suggest prehistoric human migrations across the Gibraltar Strait" **Mitochondrion**. 9 (6): 402-407. 2009.
9. Domínguez-Garrido E, Martínez-Redondo D, Martín-Ruiz C, **Gómez-Durán A**, Ruíz-Pesini E, Madero P, Tamparillas M, Montoya J, Von Zglinicki T, Díez-Sánchez C, López-Pérez MJ. "Association of mitochondrial haplogroup J and mtDNA oxidative damage in two different North Spain elderly populations". **Biogerontology**. 10 (4):435-42. 2009.

10. Pello,R., Martin,M.A., Carelli,V., Nijtmans,L.G., Achilli,A., Pala,M., Torroni,A., **Gomez-Duran,A.**, Ruiz-Pesini,E., Martinuzzi,A., Smeitink,J., Arenas,J. and Ugalde,C. "*Mitochondrial DNA background modulates the assembly kinetics of OXPHOS complexes in a cellular model of mitochondrial disease*". **Hum. Mol. Genet.** 17 (24): 4001-4011. 2008.

A mi padre:

“Siempre estarás conmigo”

A mi madre:

“Gracias por no rendirte nunca”

“Bienaventurados los que aun sin ver han creído”

San Juan 20,24-29

“A los que construyen castillos en el aire, porque existen”

Patricia Martín, “La edad del pato”

Agradecimientos

Hoy es 29 noviembre del 2011, día en el que veo la luz de este túnel que ha sido el final de mi tesis doctoral. He pensado muchas veces en como escribiría esta parte, para muchos fundamental, y muchos han sido los cambios de rumbo durante este largo tiempo, nada más y nada menos que casi 6 largos años. Muchas han sido las alegrías y muchas muchas las tristezas, que han propiciado que el tiempo se fuera alargando, aún a pesar de mi sufrimiento y frustración, y evidentemente el de algunas personas más!... Así, en primer lugar me gustaría agradecer a aquellos que han sufrido, y se han enfadado por dentro, porque este día no llegaba, pero que nunca han dejado de estar a mi lado.

En primer lugar me gustaría dar las gracias a mi jefe... Jo JEFE, cuán larga ha sido la espera, y cuán sufrida...Gracias!!! por acogerme, por quererme y odiarme!, por hacer de mí una pre-científica adicta a la estadística, que siempre puede dar más y más!...Nunca olvidaré aquel 4 de Enero de 2006, día en el que casi me matan por decirte que me iba mal la entrevista en ese momento....En realidad, nunca olvidaré casi nada!!... Gracias de corazón!...Espero que seas muy feliz con tus chicas!!...

En segundo lugar a mi familia, gracias MAMÁ por estar ahí aún cuando me has visto caer, gracias por mantenerte al margen y dejarme resurgir a mi sola, como lo has hecho siempre. Gracias por volver a sonreír, por luchar contra viento y marea, y por antepoñernos siempre a ti misma GRACIAS!.Gracias María por ser la mejor hermana que nadie puede tener, aún cuando yo no he podido mirar más que a mi ombligo, gracias por ser la hermana mayor por momentos y la pequeña en otros!, te quiero!, aunque nunca te lo diga....Gracias Titi por callarte, me has dado tanto amor que nadie puede imaginar, pero esta la mejor demostración de tu cariño!, gracias por tu fuerza!... Gracias José, por todo!!!... Gracias Miru, sin tu amor nunca hubiera llegado hasta aquí, gracias por aguantar tantas revoluciones!...me casaría sólo por verte feliz en mi boda!. Gracias Su, porque aunque te vacilemos te queremos con locura!...Gracias Doña Manuela por ese genio que he heredado!!...Gracias Juan por ser mi primo perfecto!, seguro que nos vemos más cuando vivamos a 10000Km de distancia... Gracias tío Alfonso por quererme tanto, y al tío Manuel por ser un ejemplo de renacer. Gracias Aurorita y Sara, por ser las niñas guapas y listas de la casa!..Gracias Andrea, eres muy lista así que portarte bien!!!...Gracias á miña familia da taberna, al Titi, a Meca, a Lourdes, a Pili e Meci, a Xermán, a Pelayo, a Tina e Miguel, a Pili e Lis, a Loli, a Julia e

Larra, a Juan e Malena, e a tod@s aqueles que sentiron e sinten ó meu pai ven dentro!!..Gracias polo voso apoio!. Sen vós non estaríamos en pé!...

En tercer lugar me gustaría darte las gracias Julio, porque sin tu trabajo nada de esto hubiera sido posible. Sé que estoy en deuda, en especial en estos últimos años. Gracias por enseñarnos la importancia de la disciplina. Te deseo todo lo mejor!!...Gracias a ti también Manolo por darme la oportunidad de trabajar aquí, acogerme y cuidarme tanto en los momentos duros!...Un beso grande también a Merche.

Gracias Víctor, por tu amor incondicional y tu gran apoyo este tiempo, aún cuando el camino no ha sido nada fácil y se postra ante ti una *repugnante*. Gracias por vencer tus miedos, tu timidez y luchar contra un ciclón de sentimientos. Muchas Gracias!, te quiero!...

Gracias a mis amigos, tarde o temprano también mi familia!. Mi familia laboratonianal!, que orgullosa estoy de haber compartido todo este tiempo con amigos y profesionales tan grandes!!... Gracias Male, por TODO!, por ser mi amiga, mi crítica, y por comprender que no estoy cuando tengo que estar!..le venceremos!. Muchas gracias también Ruben!!...Gracias David, diré Molotes, esto sí ha sido un camino duro, y nunca te has bajado del tren, sigue siendo tan “majo” como tu dices...Espero que nuestros caminos estén unidos siempre... Gracias Ester por tu ayuda y entereza!, proyecta toda la luz que tienes!, y mucha suerte con tus chicos!. Gracias psicóloga, diré Sonia, por ser tan requete maja!, te deseo todo lo mejor con un toque de egoísmo!...Gracias Eldris, gracias Laura por toda esa luz tan diferente que habéis traído, gracias por vuestros horarios perfectos, por la revolución cubana y esas bellas lágrimas que tanto me gustan...Os deseo mucha suertel!...Gracias Belén por todas esas charlas este largo tiempo e Iñi, por tantas cosas vividas, te deseo lo mejor!!. Gracias también a Carmen Díez por su atención y ayuda, y también a los compañeros que se fueron y con los que tantas cosas he compartido, Taha, Loli, Diana, Ruth, Tania, Carol, Federica, Pía, Chus... etc.

Gracias también a otros compañeros y familia de pasillo!. Gracias Rami, por adoptarme, cuidarme y arroparme tan bien, la verdad es que no te quedaría mal una niña (beijinhos tamén a Mayra)...Gracias Ignacio, por tanto y tan poco compartido!..

Gracias Nuri, estoy segura que tu niño va a ser muy muy feliz, gracias por tu amor tan dulce, os deseo lo mejor a los tres!, un beso también para ti Janne...Gracias Pilar por todos estos años de apoyo, mucha suerte con las niñas!!...os deseo lo mejor a los cuatro!!!...Gracias también a Patricia y a Nieves por vuestro cariño tan familiar, mucha suerte en el futuro!...Gracias a Ricardo (como te he echado de menos!), a Elena por su luz, a Erika por ser tan maja!, a Ester Perales y a Raquel por tantas y tantas cuestiones resueltas!. Gracias también a Ana, a Ester Lapuente, a Patricio, a Acisclo y a Toño. Gracias a nuestros vecinos de puerta con puerta, a Natalia y a Angie, sois maravillosas! y a Jesús Osada y a todos sus chic@s. Gracias también a Noelia la verdulera, a Rosaura, a Adriana, a Víctor y a Carmen Colás, y a todos los demás..., por hacer de estas paredes un sitio más bello y humano donde siempre hay una sonrisa...Y como no, gracias Pepín por tu apoyo estos años, y por traer siempre alegría y a Tere, por estar siempre ahí, gracias por todo!. Por último me gustaría darte las gracias Santi, por tu sensibilidad, por tus vaciles y por tu buen hacer!!!!...muchas gracias...

Sigo con mi familia “maña”!...Gracias Bego por todos estos años de amistad y caos, enfados, juergas y buenas conversaciones!. Gracias Farid por ser mi agarre de la tierra meiga en esta ciudad del viento...No sabes como me alegro de que nuestros caminos se volvieran a cruzar...Gracias Helena por traer tanta luz en los tiempos duros, por esa madre naturaleza latiente!!...téneis tanto amor que Izan va a vivir muy feliz e hiperestimulado!, sed felices!!...Gracias Vio por seguir *together* aún en la distancia, te debo un viaje a Glz!.. Gracias Paula por todo tu cariño y tu comprensión, mereces todo el amor del mundo. Gracias Jose, mi primer compañero de piso en Zaragoza, gracias por tan buenos momentos y tantos cristales... Gracias Floro por tantas y tantas risas y negocios, y Cristian por tus ranas y secretos!!...Muchas gracias a todo el Desafinado por todos los bellos momentos vividos!

Gracias a los maños no maños, mis expoamics...Elizabeth, te quiero, aunque te quiera matar, que le voy a hacer yo!...Patri!, gracias por todos los castillos, torres de marfil y praderas con flores que nos permiten soñar juntas en cada encuentro. Ferry!, gracias por todo el tiempo juntos y por entender mis estar y no estar!. Marina, gracias por todo tu cariño y amor, por tantas charlas...se feliz con tus chicos!!...Edu, gracias por estar en mi vida y traer luz de sorpresa, nos debemos unas copas en el bar Inca!...Gracias a tod@s los que olvido.

Gracias CÍRCULOS CONCÉNTRICOS. Gracias patas que levantáis mi mesa, porque sin vosotros hace tiempo que hubiera caído...Gracias por un sueño de amigos, por cuidarme y criticarme, gritarme y besarme...y todo aquello que esté en nuestra imaginación, que no es poco. Lara, te pongo de primera para que no cuentes, jejeje!!!...gracias por demostrar que hay luz después de las sombras, por tu fidelidad, por tu ayuda, por tu caos y tus gritos...ahora a mantener a la pequeña Cruella lejos. Gracias Almu por todos estos años, por tu cariño, tus vaciles...Nunca dejes de reír y disfrutar, gracias por hacernos la vida fácil...nos debemos 5 días, solas y tranquilas... Gracias C, como dixen un día, a *raíña da calma na impaciencia*, quérote tanto!...Gracias Paquiño, por crecer conmigo, por estar a mi lado y por demostrarnos lo bien y mal que se pueden hacer las cosas, estoy hiperorgullosa de ti!. Gracias p. Pauli por todos estos largos años, ya sabes que eres mi hermana, gracias por tu pasotismo, en realidad te queremos así, jejej!!. Gracias Tere, jo!, aunque no esté porque no estoy, no sabes como te echo de menos!, te deseo toda la felicidad del mundo, porque la mereces!... Gracias Porto, por mil veces que me cuelgues el teléfono, siempre te querré, y eso que me caes mal...:-). Gracias Isa, por tu entereza, tu fuerza y tu valentía, mucha suerte y no olvides que...viva el contoneo!...Gracias Nere, por seguir juntas, eres mucho más fuerte de lo que crees!, Vito por conseguir ser tú misma y luchar segura por lo que quieres, y Lucía y Vane Torres por tantos años de cariño...Gracias Noelon por conseguir librar las ataduras!, Alba por tantos años de charlas y Ade por estar siempre ahí, por tu luz y nuestras dudas eternas. Gracias Aurorilla por ser mi pequeña luciérnaga!... Gracias Lupi por tu amistad, tus sonrisas y eterna alegría, y Alvarito, por tantas cosas vividas y por lo que queda por vivir!...Gracias Magic por nuestra magia y Agui por ese ritmo mallorquín!

Gracias a mi círculo das Rías Baixas. Gracias Trus, gracias por 5 años maravillosos, por acompañarme en el inicio de este camino y darme la confianza para creer en que podía!...te deseo toda la felicidad del mundo con tus dos chicas!!...Me debes un café!...Gracias Sergio, por tantos y tantos años, por estar siempre a mi lado incondicionalmente!, te quiero mucho!!!, y no sabes cuanto agradezco tu ayuda en este tramo final!.. Lola es afortunada por tenerte como padrino!.. Gracias Moncho por todo lo compartido, largo ha sido este tiempo, y muchas cosas han pasado, pero el calor de los rayos del sol nos da energía de nuevo!!...nos lo merecemos amigo!...Gracias Mikael, que iba a hacer yo sin ti!, gracias por ser feliz, por ser fuerte, por demostrar que hay camino, tanto que te corres 20 km, jeje!!!...Te debo una visita sin prisas, gracias por

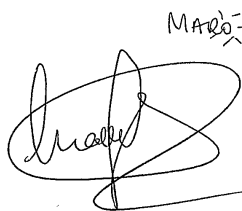
todo el apoyo!. Gracias Rubi por tantas risas, charlas y tabletas de chocolate. Gracias David por aguantarnos y querernos todos estos años, y los que quedan!...insistimos necesitamos una boda o similar!. Gracias Tamara por ese pro-marorismo, por todos estos años de confesiones, os deseo lo mejor a los tres. Gracias también Jonay!. Gracias Osqui por ver que hay camino. Gracias Pablo Tom por tantas conversaciones, cariños y empujones!...Gracias también a todos los que faltan pero están en mi corazón...

Gracias también a todos los voluntarios que han donado muestras. Sin ellos este trabajo nunca hubiera sido posible, y a los enfermeros que sin ánimo de lucro han colaborado con este estudio; Belen y Pablo Pumares, gracias!...

Por último, me gustaría agradecer y dedicar este trabajo a alguien que lloraría desde el comienzo hasta el final de mi exposición, a alguien que me enseñó gran parte de lo que soy, junto con mi madre. A alguien que me falta cada día, pero que me demostró que es posible superar las pérdidas!!..GRACIAS PAPÁ!!!!!! , NO SABES LO QUE TE ECHAMOS DE MENOS!...

Un beso enorme a todas/os. Muchas gracias

María

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'María', with a large, stylized flourish that loops around the name. The name 'María' is written in a cursive style.

Abreviaturas

aa: Aminoácido
AA: Antimicina A
Acetil CoA: Acetil coenzima A
ADP: Adenosín difosfato
AE: Actividad específica
AEBSF: 4-(2-aminoetil) benceno sulfonil fluoruro hidrócloro
APS: Persulfato amónico
ATP: Adenosin trifosfato
ATPasa: ATP sintasa
ATP6: Subunidad 6 de la ATP sintasa
ATP8: Subunidad 8 de la ATP sintasa
bH: Centro b de alto potencial de transferencia de electrones del complejo III
bL: Centro b de bajo potencial de transferencia de electrones del complejo III
bp: Pares de bases
BrEt: Bromuro de etidio
BrdU: Bromo-desoxi-uridina
BSA: Albúmina sérica bovina
cDNA: DNA complementario
Ci: Control isogénico
CI: Complejo I
CII: Complejo II
CIII: Complejo III
CIV: Complejo IV
CO1: Subunidad 1 de la citocromo c oxidasa
CO2: Subunidad 2 de la citocromo c oxidasa
CO3: Subunidad 3 de la citocromo c oxidasa
CoQ: Coenzima Q, ubiquinona
COX: Citocromo c oxidasa
CPEO: Oftalmoplegia externa, crónica y progresiva
Cq: Ciclo de cuantificación
CS: Citrato sintasa
c.s.p.: Cantidad suficiente para
CV: Complejo V
CV: Coeficiente de variación
CYB: Citocromo b
Cyt c: Citocromo c
DAPI: 4',6' -Diamidino-2-fenil indol diclorhidrato
DBH2: Decil-ubiquinol
DCF: Diclorofluoresceína
DCF-DA: 2', 7'- Diclorofluorescina diacetato
DCFH: 2', 7'- Diclorofluorescina

DCPIP: Diclorofenol-indofenol

DGP: Niveles de ATP tras incubación con 2-deoxiglucosa y piruvato

DGPO: Niveles de ATP tras incubación con 2-deoxiglucosa, piruvato y oligomicina

DiOC₆ (3): 3,3'-Dihexiloxacarbocianina ioduro

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO: Dimetil-sulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNP: 2,4-Dinitrofenol

dNTP: Desoxirribonucleósido trifosfato

DO: Densidad óptica

ΔCq: Diferencia de ciclos de cuantificación

Δp: Gradiente de protones

DT: Tiempo de doblaje

DTNB: 5,5'-Ditio-bis-2-nitrobenzoico

DTT: Ditiotreitilol

E: Consumo de oxígeno endógeno

EDTA: Ácido etilendiamotetrácetico

ETC: Cadena de transporte electrónico

FADH₂: Dinucleótido de flavina y adenina reducido

FBS: Suero fetal bovino

FCCP: Carbonil-cianuro-m-clorofenil-hidrazona

Fenol-IAC: Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico

Fe-S: Centro sulfoférico

FMN: Mononucleótido de flavina

FS: *Forward scatter*

G: Niveles de ATP total en glucosa

GAL: Galactosa

GLU: Glucosa

GO: Niveles de ATP total en glucosa y oligomicina

H: Cadena pesada del mtDNA

H₁: Unidad de transcripción 1 del mtDNA

H₂: Unidad de transcripción 2 del mtDNA

HBSS: *Hank's Buffered Salt Solution*

HEPES: Ácido 2-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperacil-(1)] etanosulfónico

HSP: Promotor de la cadena pesada

HSP: Proteínas de choque térmico

IC₅₀: Concentración inhibitoria del 50% del crecimiento celular

IF: Intensidad de fluorescencia

L: Lugar de iniciación de la transcripción de la cadena L del mtDNA

IP: Ioduro de propidio

ISP: Proteína sulfoférica

L: Cadena ligera del mtDNA
LHON: Neuropatía óptica hereditaria de Leber.
LSP: Promotor de la cadena ligera
MELAS: Encefalopatía mitocondrial, acidosis láctica y accidentes cerebro-vasculares
MILS: Enfermedad de Leigh
MIMP: Potencial de membrana interna mitocondrial
MIMS: Superficie de membrana interna mitocondrial
MnSOD: Manganeso superóxido dismutasa
mRNA: RNA mensajero
mtATP: ATP mitocondrial
mtDNA: DNA mitocondrial
MTERF: Factor de terminación de la transcripción mitocondrial
MTFB2: Factor de transcripción mitocondrial B
MT-NDn: Genes para la NADH- deshidrogenasa (ND1-ND6 y ND4L)
mtSSB: Proteína de unión al DNA de hebra única
N: Número de ensayos
NAC: N-acetil-cisteína
NAD+: Dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado
NADH: Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
NAO: Nonil-naranja de acridina
NARP: Neuropatía, Ataxia y Retinitis Pigmentosa
nDNA: DNA nuclear
ND1: Subunidad 1 de la NADH deshidrogenasa
ND2: Subunidad 2 de la NADH deshidrogenasa
ND3: Subunidad 3 de la NADH deshidrogenasa
ND4: Subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa
ND4L: Subunidad 4L de la NADH deshidrogenasa
ND5: Subunidad 5 de la NADH deshidrogenasa
ND6: Subunidad 6 de la NADH deshidrogenasa
NR: Neutral Red
nt: Nucleótido
OAA: Ácido oxalacético
O_H: origen de Replicación de la cadena pesada
O_L: origen de replicación de la cadena ligera
OXPHOS: sistema de fosforilación oxidativa
PBS: Solución salina tamponada con fosfato
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PD: Enfermedad de Parkinson
PEG: Polietilenglicol
PFKL: Fosfofructoquinasa isoenzima de hígado
Pi: Fosfato inorgánico

POLG: DNA polimerasa gamma
POLRMT: Polimerasa específica de organelo
PVDF: Fluoruro de polivinilideno
QH₂: Ubiquinol
QH: Semiubiquinona
Qi: *Q inner*, Q interno, centro de reducción de la ubiquinona
Qo: *Q outer*, Q externo, centro de oxidación del ubiquinol
RFLP: Polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción
Rho⁰: Células carentes de mtDNA
RNA: Ácido ribonucleico
ROS: Especies reactivas de oxígeno
rRNA: RNA ribosómico
rpm.: revoluciones por minuto
RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa
SDH: Succinato deshidrogenasa
SDS: Dodecilsulfato sódico
SMR: Tasa metabólica basal
SNP: Polimorfismo de nucleótido único
SS: *Side scatter*
TAS: Secuencia asociada a la terminación
TAE: Tris, ácido acético glacial y Na₂ EDTA
TBE: Tris, ácido bórico y EDTA
TCA: Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
TE: Tris y EDTA
TEMED: N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina
TFAM: factor de transcripción mitocondrial A
Tm: Temperatura melting
tRNA : RNA transferente
UI: Unidades internacionales
UV: Ultravioleta

Índice

INDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	OBJETIVOS	5
III.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
III.I	MITOCONDRIA Y OXPHOS	11
I.1	Origen y estructura mitocondrial.....	11
I.2	Sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS).....	13
I.3	Concepto de acoplamiento OXPHOS.....	16
III.II	SISTEMA GENÉTICO MITOCONDRIAL	18
II.1	Sistema genético mitocondrial.....	20
A.	Replicación del mtDNA.....	21
B.	Transcripción del mtDNA.	23
C.	Traducción de los mRNAs mitocondriales.....	25
II.2	Genética del mtDNA	27
III.III	VARIANTES GENÉTICAS DEL mtDNA	30
III.1	Polimorfismos antiguos – Haplogrupos.....	30
III.2	Filogenias caucásicas.....	32
III.IV	PATOLOGÍA MITOCONDRIAL	33
IV.1	Mutaciones somáticas del mtDNA.....	33
IV.2	Mutaciones asociadas a patologías. Patología mitocondrial.....	35
A.	Neuropatía Óptica Hereditaria de Leber.	36
B.	Enfermedad de Parkinson y mitocondria.....	38
III.V.	CITOCROMO B: DIANA TERAPEÚTICA	42
V.1	Citocromo b como diana terapéutica en tratamientos antifúngicos y antiparasitarios.....	42
V.2	Variación genética humana en los sitios de unión del coenzima Q del citocromo b.....	45
V.3	Modificación de la eficiencia de acoplamiento OXPHOS	48
III.VI.	LÍNEAS CÍBRIDAS TRANSMITOCONDRIALES	50
VI.1	Modelo de cíbridos para estudio del Parkinson	51
VI.2	Modelo de cíbridos para el estudio de variantes genéticas poblacionales del mtDNA.....	53

VI.3	Líneas híbridas como modelo de estudio de farmacogenómica y de toxicogenómica.....	55
------	--	----

IV. RESULTADOS.....59

IV.I DESARROLLO DE HERRAMIENTAS PREVIAS.....61

I.1 Análisis poblacional.....61

A. Clasificación de los haplogrupos.....61

B. Secuenciación de la región de control del mtDNA.....62

I.2 Cultivos y estado de la línea celular rho⁰.....62

A. Cultivos celulares.....62

A.1 Estudio del suero fetal bovino.63

A.2 Composición del medio de cultivo64

B. Estudio líneas rho⁰66

B.1 Estudios de ácidos nucleicos.....66

B.1.1 Amplificación de fragmentos de mtDNA.....66

B.1.2 Determinación de niveles de mtDNA.....67

B.1.3 Determinación de niveles de mtRNAs.....67

B.2 Estudios de funcionalidad del sistema OXPHOS.....68

B.2.1 Estudios de crecimiento celular.....68

B.2.2 Estudios de actividad de la ETC.....69

B.2.3 Estudios de consumo de oxígeno en células intactas.....70

I.3 Modelo de estudio para la caracterización de líneas híbridas transmitocondriales portadoras de variantes genéticas poblacionales del mtDNA.....71

A. Determinación de la contaminación por *Mycoplasma sp.*.....72

B. Secuenciación completa del mtDNA.....72

C. Niveles de mtDNA.....72

D. Medios de cultivo sin antibiótico.....73

E. Nivel de confluencia celular.....73

F. Control mutacional de los cultivos.....74

I.4 Estudio evolutivo del p.MT-CYB.....74

IV. II. ESTUDIO FENOTÍPICO DEL HAPLOGRUPO Uk75

II.1 Modelo celular para el análisis fenotípico de los haplogrupos H y Uk.....75

A. Selección de la muestra.....75

B. Estudio de los SNPs m.7028C y m.14798T.....76

C.	Cariotipado de líneas celulares.....	77
D.	Caracterización genética.....	78
II.2	El análisis de los ácidos nucleicos revela diferencias fenotípicas entre ambos haplogrupos.....	81
A.	Determinación de niveles del mtDNA.....	83
B.	Niveles de expresión de genes relacionados con la replicación del mtDNA.....	85
C.	Determinación de los niveles de mtRNA.....	84
D.	Niveles de expresión de genes relacionados con la transcripción mitocondrial.....	87
II.3	La síntesis mitocondrial de proteínas es menor en las líneas Uk.....	88
II.4	Estudio de la fracción celular ocupada por mitocondria.....	90
II.5	La actividad y cantidad del CIV está disminuido en las líneas celulares del haplogrupo Uk.....	91
II.6	El consumo de O ₂ por unidad de cadena, el MIMP y la cantidad de ATP son diferentes entre las líneas híbridas de los haplogrupos H y Uk.....	94
A.	Consumo de O ₂ por unidad de cadena.....	94
B.	Las líneas celulares del haplogrupo H presentan un MIMP mayor.....	97
C.	La cantidad de ATP es diferente entre las líneas híbridas de los haplogrupos H y Uk.....	97
II.7	Marcadores de daño oxidativo.....	99
II.8	Existen diferencias en el crecimiento celular entre el haplogrupo H y Uk, pero no en la viabilidad celular.....	101
A.	Viabilidad celular.....	101
B.	Las líneas del haplogrupo H presentan ventajas de crecimiento.....	103

IV.III. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LÍNEAS HÍBRIDAS

PERTENECIENTES AL HAPLOGRUPO J.....	105	
III.1	Elección de una población celular representativa del haplogrupo J.....	105
A.	Selección de la muestra.....	105
B.	Análisis por PCR-RFLP del SNP m.7028C.....	106
C.	Caracterización genética.....	106
III.2	Los niveles de mtDNA y mtRNA están reducidos en las líneas híbridas pertenecientes al haplogrupo J.....	108
A.	La dosis genómica mitocondrial es menor en las líneas híbridas del haplogrupo J.....	108

B.	Niveles de expresión de algunos de los genes para proteínas que participan en la replicación son iguales en ambas filogenias.....	109
C.	Los niveles de mtRNA están disminuidos en las líneas celulares de la filogenia J.....	110
D.	Niveles de mRNA de algunas de las proteínas que participan en la transcripción del mtDNA.....	113
III.3	La síntesis de proteínas mitocondriales está disminuida en las líneas celulares del haplogrupo J.....	114
III.4	Estudio de la fracción celular ocupada por mitocondrias.....	117
III.5	No hay diferencias en actividad y cantidad de CIV entre los fondos genéticos mitocondriales H y J.....	119
III.6	La cantidad de ATP, el MIMP y la tasa de respiración celular son diferentes entre las líneas híbridas de los haplogrupos H y J.....	121
A.	El consumo de oxígeno es menor en las líneas del haplogrupo J.....	121
B.	El MIMP es menor en las líneas del haplogrupo J.....	123
C.	La cantidad de ATP es diferente entre las líneas celulares pertenecientes al haplogrupo H y J.....	124
III.7	Marcadores de daño oxidativo.....	126
III.8	Las variantes genéticas de los haplogrupos H y J no tienen efecto sobre la viabilidad celular.....	127

IV.IV ESTUDIO FENOTÍPICO DE LOS SUBHAPLOGRUPOS DE LA

FILOGENIA J (I): SUBHAPLOGRUPO J1C.....	129	
IV.1	Población de líneas híbridas.....	130
A.	La muestra celular era representativa del haplogrupo J1c.....	130
B.	Análisis de los SNPs m.7028C y m.14798T.....	130
IV.2	Los niveles de mtDNA y mtRNA están reducidos en las líneas híbridas del haplogrupo J1c.....	131
A.	Los niveles de mtDNA y de TFAM son menores en las líneas híbridas transmitocondriales del haplogrupo J1c.....	131
B.	No existen diferencias en la cantidad de mRNA de los genes implicados en la replicación del mtDNA.....	133
C.	¿Los niveles de mtRNA están reducidos en las líneas celulares del sublinaje J1c.....	134
D.	Niveles de expresión de genes involucrados en la transcripción del mtDNA.....	137

IV.3	La síntesis mitocondrial de proteínas está reducida en las líneas del haplogrupo J1c.....	138
IV.4	Fracción celular ocupada por mitocondria.....	141
IV.5	La actividad COX es menor en las líneas celulares del haplogrupo J1c.....	142
IV.6	El consumo de oxígeno, el MIMP y la cantidad de ATP son diferentes entre las líneas híbridas de los haplogrupos H y J1c.....	144
	A. El consumo de O ₂ es menor en las líneas del haplogrupo J1c.....	144
	B. Las líneas celulares del haplogrupo H son más acopladas que las del J1c.....	145
	C. El contenido en ATP es menor en las líneas híbridas del haplogrupo J1c.....	146
IV.7	Marcadores de daño oxidativo.....	148
IV.8	No hay diferencias en la viabilidad entre los haplogrupos mitocondriales.....	150

IV. V ESTUDIO FENOTÍPICO DE LOS SUBHAPLOGRUPOS DE

LAFILOGENIA J (II): SUBHAPLOGRUPO J2.....	151	
V.1	Las líneas celulares son adecuadas para nuestro estudio.....	151
V.2	Los niveles de mtDNA y del mtRNA están reducidos en las líneas híbridas pertenecientes al haplogrupo J2.....	152
	A. La dosis genómica mitocondrial es menor en las líneas híbridas del haplogrupo J2.....	152
	B. La cantidad de mRNA de genes asociados con la replicación del mtDNA no difiere entre ambos haplogrupos.....	152
	C. Los niveles del mtRNA están disminuídos en las líneas celulares de la filogenia J2.....	153
	D. Niveles de expresión de genes relacionados con la transcripción mitocondrial.....	155
V.3	La síntesis mitocondrial de proteínas está disminuida en las líneas celulares del haplogrupo J2.....	155
V.4	Estudio de la fracción celular ocupada por mitocondria.....	160
V.5	La actividad y cantidad COX son similares en ambos haplogrupos.....	161
V.6	El consumo de oxígeno, el MIMP y la cantidad de ATP fueron diferentes en las líneas híbridas de los haplogrupos H y J2.....	164
	A. El consumo de O ₂ fue menor en las líneas del haplogrupo J2.....	164
	B. El MIMP fue menor en las líneas del haplogrupo J2.....	165

C.	La cantidad de ATP era diferente entre las líneas celulares del haplogrupo H y J2.....	165
V.7	Marcadores de daño oxidativo.....	168
V.8	Las variantes genéticas de los haplogrupos H y J2 no tienen efecto sobre la viabilidad celular.....	169
IV.VI.	ESTUDIO FARMAQGENÓMICO.....	171
VI.1	Fase 1: Titulación y elección de la dosis de trabajo.....	171
A.	Estudio de la IC50.....	171
B.	Estudio de la actividad sobre el sistema OXPHOS.....	173
C.	Estudios de competición con antimicina A.....	177
D.	Estudios estructura-actividad.....	178
VI.2	Fase 2: Estudio farmacogenómico.....	181
A.	La capacidad desacoplante del fármaco ASM-07-03 varía entre los distintos haplogrupos.....	181
B.	La posición F18L influye en la unión del fármaco ASM-07-02.....	182
VI.3	Fase 3: Tratamiento de la patología de Leigh con desacoplantes Q-selectivos.....	185
A.	Los compuestos ASM-07-02 disminuyen la producción de ROS.....	187
B.	Los compuestos ASM-07-01 y ASM-07-02 producen una caída del MIMP.....	187
V.	DISCUSIÓN.....	189
VI.	CONCLUSIONES.....	211
VII.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	215
VII.I.	MATERIAL.....	217
I.1	Reactivos generales.....	217
I.2	Oligonucleótidos y sondas para PCR.....	217
I.3	Sondas de citometría de flujo.....	217
I.4	Kits comerciales.....	218
I.5	Autorradiografías y membranas.....	218
I.6	Aparatos.....	219
I.7	Material biológico y líneas celulares.....	223
I.7.1	Muestras biológicas.....	223
I.7.2	Líneas celulares.....	224
I.8	Anticuerpos.....	225

VII.II. MÉTODOS.....	226
II.1 Extracción, manipulación y análisis de ácidos nucleicos.....	226
II.1.1 Extracción de DNA.....	226
A. Células epiteliales presentes en la orina.....	227
B. Células sanguíneas.....	227
C. Cultivos celulares.....	227
II.1.2 Extracción de RNA total a partir de células en cultivo.....	228
II.1.3 Cuantificación de ácidos nucleicos.....	228
II.1.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	229
A. Obtención del cDNA monocatenario.....	229
B. PCR usando el DNA genómico como molde.....	229
B.1 Amplificación de fragmentos cortos.....	230
B.2 Amplificación de fragmentos largos.....	231
B.2.1 Amplificación de la secuencia completa del mtDNA.....	231
C. Purificación de productos de PCR.....	232
C.1 Purificación en columna.....	232
C.2 Purificación con Exosap.....	232
II.1.5 Electroforesis de ácidos nucleicos.....	232
II.1.6 Análisis de mutaciones y polimorfismos en el mtDNA por RFLP	
Haplogrupado de muestras.....	233
A. Estrategia de haplogrupaje.....	234
A.1 Estrategia de haplogrupaje.....	234
A.2 Secuenciación de la región hipervariable I y II del mtDNA.....	235
B. Haplogrupado de muestras mediante PCR-RFLP.....	235
II.1.7 Secuenciación automática de DNA.....	235
II.1.8 Real time PCR.....	236
A. Cuantificación del número de copias de mtDNA.....	237
B. Cuantificación de niveles de un transcrito.....	238
II.2 Cultivos celulares.....	240
II.2.1 Componentes y medios.....	240
II.2.2 Cultivo y siembra celular.....	240
II.2.3 Congelación y descongelación de líneas celulares.....	241
II.2.4 Recuento celular.....	242
II.2.5 Análisis y tratamiento de contaminación por <i>Mycoplasma spp.</i>	242
II.2.6 Generación de cíbridos transmitocondriales.....	243

A.	Extracción y conservación de plaquetas.....	243
A.1	Extracción de plaquetas.....	243
A.2	Congelación y descongelación de plaquetas.....	244
B.	Fusión de plaquetas con líneas rho ⁰	244
II.2.7	Cariotipado de líneas celulares.....	245
II.2.8	Estudios de viabilidad celular.....	247
A.	Determinación de viabilidad celular con IP.....	247
B.	Determinación de viabilidad celular por espectroscopía.....	248
II.3	Preparación de extractos celulares totales	250
II.3.1	Para ensayos espectrofotométricos.....	250
II.3.2	Para actividad aconitasa.....	250
II.3.3	Geles desnaturalizantes.....	250
II.4	Estudio de la funcionalidad del sistema de fosforilación oxidativa.....	251
II.4.1	Estudio de la velocidad de crecimiento celular.....	251
II.4.2	Estudios de competición celular.....	252
II.4.3	Estudio de las actividades enzimáticas de los complejos.....	253
A.	Actividad del la succinato deshidrogenasa (CII).....	253
B.	Actividad de la citocromo c oxidasa (CIV).....	254
C.	Actividad y cantidad del complejo IV.....	255
II.4.5	Electrodo de oxígeno.....	256
A.	Consumo de oxígeno en células intactas.....	257
B.	Titulación de fármacos con consumo de oxígeno utilizando la bomba TIP-2K.....	258
II.4.6	Medida del ATP total.....	259
II.4.7	Medida del potencial de membrana.....	260
A.	Medida del potencial de membrana con DiOC ₆ (3).....	261
B.	Medida del potencial de membrana en placa con Mito-ID®.....	262
II.5	Estudios de contenido mitocondrial.....	263
II.5.1	Medida de la actividad de la Citrato Sintasa (CS).....	263
II.5.2	Medida de la superficie de membrana interna mitocondrial.....	264
II.6	Manipulación y análisis de proteínas.....	265
II.6.1	Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	265
A.	Placa de 96 pocillos.....	266
B.	Medida en cubeta.....	266

II.6.2	Síntesis “in vivo” de proteínas mitocondriales marcadas con ³⁵ S-Metionina.....	267
II.6.3	Electroforesis de proteínas.....	268
A.	Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	268
A.1	SDS-Glicina en gel pequeño.....	268
A.2	SDS-Tricina en gel grande.....	271
B.	Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes en gradiente de poliacrilamida.....	272
II.6.4	Tinción de geles con azul de Coomasie.....	274
II.6.5	Secado de geles.....	275
II.6.6	Transferencia a membranas PVDF.....	275
II.6.7	Inmunodetección de proteínas mediante “Western-Blot”.....	276
A.	Incubación con anticuerpos primario y secundario.....	276
B.	Detección de proteínas.....	277
C.	Reutilización de membranas.....	277
II.7	Estudio de estrés oxidativo en cultivos celulares.....	277
II.7.1	Medida de la actividad aconitasa.....	277
II.7.2	Estudio de la expresión de la manganeso superóxido dismutasa.....	278
II.7.3	Medida de la producción de H ₂ O ₂ in vivo mediante citometría de flujo.....	279
II.7.4	Medida de la producción de H ₂ O ₂ in vivo mediante fluorescencia.....	281
II.7.5	Medida de la producción de O ₂ ⁻ mediante citometría de flujo.....	282
II.8	Estudios bioinformáticas.....	283
II.8.1	Análisis de secuencias del DNA.....	283
II.8.2	Estudios del índice de conservación.....	283
II.9	Estudios de citotoxicidad de fármacos.....	284
II.10	Tratamientos estadísticos.....	285
VIII.	BIBLIOGRAFIA.....	287
IX.	ANEXOS.....	307
X.	PUBLICACIONES.....	333

I. Introducción

I. Introducción

INTRODUCCIÓN

El sistema de fosforilación oxidativa es la principal fuente celular de energía en forma de ATP y también de radicales libres de oxígeno. El estrés oxidativo es un factor determinante del envejecimiento y las enfermedades asociadas a la edad. Por ello, esta ruta metabólica parece adecuada para definir dianas farmacológicas aplicables en la terapéutica de estas patologías.

Las enfermedades asociadas a la edad y la enfermedad mitocondrial de LHON son consideradas patologías multifactoriales, con influencias genéticas y ambientales. La genética de poblaciones y los estudios de epidemiología genética han permitido definir variantes genéticas poblacionales en el DNA mitocondrial que parecen estar asociadas a éstas enfermedades. Además, la localización de muchas de estas variantes en los lugares de unión del coenzima Q en el citocromo b, les hacen excelentes candidatas para modular el efecto frente a numerosas endo y exotoxinas, y fármacos, de estructura similar al coenzima Q, integrando así los dos tipos de influencias en una diana metabólica común.

Un conocimiento detallado de los fenotipos celulares intermedios, de los parámetros mitocondriales afectados y de la susceptibilidad a diferentes sustancias permitirá el desarrollo, de acuerdo al genotipo mitocondrial, de fármacos que disminuyan la velocidad de envejecimiento y la susceptibilidad a enfermedades. Para cumplimentar estos objetivos utilizaremos el sistema de líneas híbridas transmitocondriales que se producen por fusión de células sin mtDNA con plaquetas, que contienen mitocondrias y mtDNA pero no núcleo, de individuos con el genotipo mitocondrial de interés.

II. Objetivos

II. OBJETIVOS

De las siguientes cuestiones:

- ¿Existe variación genética en el p.MT-CYB?
- ¿Presenta esta variación efecto fenotípico observable?
- ¿Cuáles son los mecanismos moleculares?
- ¿Son estos mecanismos susceptibles de ser modificados?
- ¿Podría ser utilizada esta variación en medicina personalizada?

Surgen dos grandes objetivos:

A. Caracterización fenotípica de las variantes genéticas poblacionales del p.MT-CYB en Europa

Habiendo comprobado la existencia de variación genética poblacional en el p.MT-CYB, el primer objetivo de esta tesis doctoral constituye el estudio de las características funcionales de estas variantes poblacionales del mtDNA sobre el sistema OXPHOS. Para llevarlo a cabo se realizó la construcción de cíbridos transmitocondriales portadores de variantes genéticas mitocondriales específicas y su análisis. De este modo, el primer objetivo se divide en dos:

1. Construcción de una cibridoteca (colección de líneas cíbridas transmitocondriales) de las variantes genéticas del mtDNA de interés. Para ello generaremos diferentes líneas celulares por haplogrupo mitocondrial. Se representarán los fondos genéticos mitocondriales H, Uk, J, J1c y J2.

2. Análisis de los efectos fenotípicos y los mecanismos moleculares de las variantes poblacionales del citocromo b. Comprenderá la caracterización de los fondos genéticos mitocondriales del p.MT-CYB a nivel europeo. El análisis se realizará con respecto al principal fondo genético mitocondrial en Europa (haplogrupo H), carente de polimorfismos que lo definan en el gen *MT-CYB*.

B. FarmaQgenómica

El segundo objetivo consiste en definir las consecuencias fenotípicas de las interacciones moleculares entre sustancias que actúan en los lugares de unión del CoQ y el citocromo b del complejo respiratorio III, producidas por variantes genéticas naturales humanas.

1. Estudio de las interacciones entre los fármacos que actúan a nivel de los bolsillos de unión del CoQ y el citocromo b. Búsqueda de compuestos con actividad desacoplante a nivel de los bolsillos de unión del CoQ.

2. Estudio de las interacciones entre los fármacos que actúan a nivel de los bolsillos de unión del CoQ y las distintas variantes genéticas mitocondriales. Este objetivo comprende el análisis de la interacción de aquellos compuestos con acción desacoplante a nivel del sistema OXPHOS y los fondos genéticos mitocondriales definidos por variantes en el sitio de unión del CoQ.

3. Control del acoplamiento del sistema OXPHOS como terapia de patologías mitocondriales. Por último, algunas moléculas con actividad desacoplante se testarán en una línea celular portadora de una mutación patológica cuyo fenotipo causa un aumento de daño oxidativo.

III. Revisión bibliográfica

I. MITOCONDRIA Y OXPHOS

Las mitocondrias, del griego *mito* (hilo) y *chondros* (gránulo), son organelas citoplasmáticas de aspecto filiforme, con un diámetro comprendido entre 0,5 y 1 μm y una longitud de 10 μm . Sus funciones van desde el abastecimiento energético a la célula, en forma de ATP, hasta la regulación citoplasmática de los niveles de segundos mensajeros, como el ión Ca^{2+} (Grishanin, Bibikov et al. 1996) y las *especies reactivas de oxígeno* (ROS, del inglés; *Reactive Oxygen Species*) (Boveris and Chance 1973; Weisiger and Fridovich 1973; Bandy and Davison 1990). Además, en su interior se desarrollan rutas bioquímicas de vital importancia como el *ciclo de los ácidos carboxílicos* (TCA, del inglés; *TriCarboxylic Acids Cycle*), la β -oxidación y la biosíntesis de pirimidinas (Attardi and Schatz 1988). Las mitocondrias presentan capacidad de asociación a microtúbulos. Esta propiedad las convierte en orgánulos móviles y plásticos, capaces de desplazarse por el citoplasma y adquirir la morfología y localización celular más adecuada para que el aporte energético celular sea lo más eficiente posible (Bereiter-Hahn 1990). Por otro lado, es el lugar donde convergen diferentes vías de señalización apoptótica (Green and Reed 1998), que gracias a la capacidad de regulación de la permeabilidad de sus membranas controla la liberación al citoplasma de señales capaces de activar cascadas proteicas que conducen a la muerte celular (Green and Kroemer 1998; Petit, Goubern et al. 1998)

I.1 Origen y estructura mitocondrial

Las mitocondrias están presentes en casi todas las células eucariotas. Presentan muchas analogías con las bacterias aerobias actuales como la forma, el tamaño, la presencia de un DNA bicatenario y circular, su reproducción por fisión binaria y su función respiratoria. Estas semejanzas llevaron a Lynn Margulis a proponer la **teoría endosimbionte** (Sagan 1967; de Duve 2007), donde postulaba que las células eucariotas, tal y como las conocemos hoy en día, son el resultado de una serie de asociaciones endosimbióticas entre una α -proteobacteria y una célula proto-nucleada que había desarrollado capacidad de movilidad y endocitosis (Figura III.1.A). Con el paso del tiempo, la mayoría de los genes presentes en la mitocondria fueron transferidos al núcleo, donde residen, se replican y se transcriben. Los mRNAs codificados en el nDNA son traducidos a

proteínas por ribosomas citosólicos e importados selectivamente a la mitocondria, de tal manera que la mitocondria no es viable fuera de la célula huésped y ésta no puede serlo sin las mitocondrias.

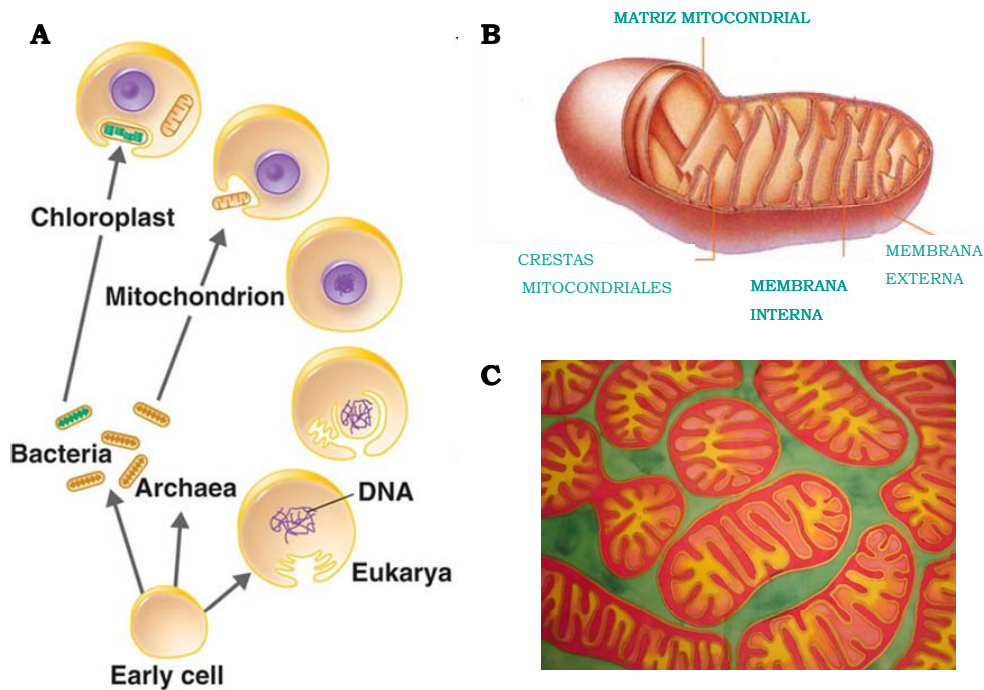


Figura III.1: Mitocondria. A. Origen endosimbiótico. B y C. Estructura y morfología.

Como herencia del proceso simbiótico, las mitocondrias presentan una estructura con dos compartimentos bien definidos, matriz y espacio intermembranal, delimitados por dos membranas, interna y externa, con diferentes características morfológicas (Figura III.1B). La *matriz mitocondrial* (Figura III.1B) contiene el genoma mitocondrial (mtDNA), una característica de este pequeño orgánulo heredado de su antecesor bacteriano. En ella se localizan las enzimas necesarias para llevar a cabo el metabolismo oxidativo, así como diversos sustratos, cofactores nucleotídicos e iones inorgánicos. Del mismo modo, sus membranas ofrecen también diferencias significativas. La *membrana interna* se caracteriza morfológicamente por presentar unas invaginaciones denominadas *crestas mitocondriales*, que aumentan su superficie (Figura III.1B). Además, su número varía en función de la actividad respiratoria de cada tipo celular. Contienen embebidas las enzimas del sistema de fosforilación oxidativa (Saraste 1999; Smeitink, Sengers et al. 2000). La membrana mitocondrial interna es, además, especialmente impermeable a iones, gracias a su alto contenido en el

fosfolípido cardiolipina (Guarnieri, Stechmiller et al. 1971), característica esencial que le permite mantener el gradiente electroquímico necesario para el desempeño de la función energética. Por el contrario, la *membrana externa* es lisa, y permite el paso de sustancias a ambos lados de la misma (hasta 10 kDa) por medio de proteínas transportadoras.

I.2 Sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS)

La mitocondria genera la mayor parte de la energía celular mediante el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS del inglés, *Oxidative Phosphorylation System*), que combina el proceso conocido como respiración con la síntesis de ATP. La respiración consiste en una cadena ordenada de reacciones redox que utiliza los equivalentes reducidos (NADH y FADH₂) procedentes de la degradación de los carbohidratos de la dieta para convertir el oxígeno molecular en agua. Las reacciones redox son llevadas a cabo por cuatro enzimas multiproteicas, los complejos de la cadena de transporte de electrones (ETC, del inglés *Electron Transport Chain*) I, II, III y IV. Estas estructuras se encuentran ancladas en la membrana interna mitocondrial, en estrecho contacto entre sí y con dos pequeñas moléculas “lanzadera”, el coenzima Q y el citocromo c (Saraste 1999; Smeitink, Sengers et al. 2000).

El dispositivo de transporte electrónico a través de la ETC sigue la ruta esquematizada en la figura anexa y brevemente explicada a continuación:

El primer complejo multiproteico, el complejo I o *NADH-ubiquinona oxidoreductasa*, cataliza la oxidación del NADH y la transferencia de dos electrones a la ubiquinona, también denominada coenzima Q₁₀ (UQ, Q, CoQ o CoQ₁₀), para dar ubiquinol (QH₂) (Figura III.2). Paralelamente, el succinato procedente del ciclo de los ácidos tricarboxílicos cede electrones a la ubiquinona a través del complejo II o *succinato-ubiquinona oxidoreductasa*, una enzima que no contribuye al gradiente de protones.

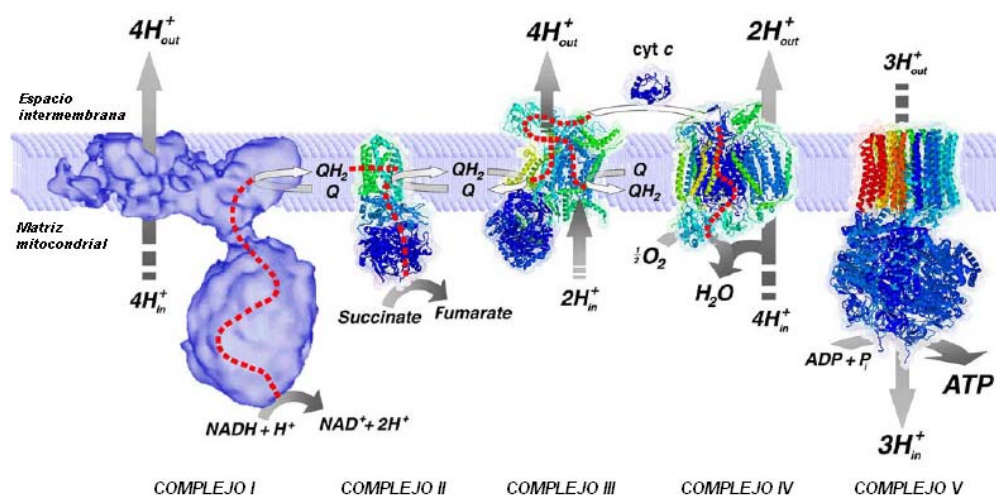


Figura III.2: Representación esquemática del sistema de fosforilación oxidativa. En la imagen se observan los complejos de la cadena de transporte de electrones I, II, III y IV y la ATP sintasa o CV. Las flechas perpendiculares señalan la dirección de salida de los protones al espacio intermembranoso, las líneas rojas discontinuas marcan el paso de electrones a través de los complejos. Q: Ubiquinona, QH₂: Ubiquinol, cyt c: Citocromo c.

El ubiquinol resultante (QH₂ en las figuras III.2 y III.3) transfiere los electrones al complejo III o *Ubiquinol- citocromo c reductasa* que cataliza la oxidación de una molécula de ubiquinol y la reducción de dos moléculas de citocromo c, una proteína hemo libremente asociada con la membrana interna de la mitocondria. A diferencia de la ubiquinona, que transporta dos electrones, el citocromo c transporta solo uno. De este modo, como sólo uno de los electrones puede ser transferido desde el donante QH₂ al aceptor citocromo c, el mecanismo de reacción del complejo III es más complejo y se denomina **ciclo Q de Mitchell** (Mitchell 1975). El ciclo Q presenta dos puntos catalíticos localizados en lados opuestos de la membrana, unidos por un dispositivo de transporte de electrones: el Q_o (el sitio externo) donde se produce la oxidación del ubiquinol y el centro Q_i (en la zona interna), donde tiene lugar la reducción de la ubiquinona a ubiquinol (Yu, Xia et al. 1998; Iwata, Paddock et al. 2009) (Figura III.3).

Así, en primer lugar, el ubiquinol procedente de los complejos I y II se oxida en el centro Q_o. Esta reacción constituye el paso limitante del ciclo. La oxidación del quinol da lugar a una reacción bifurcada. Uno de los electrones pasa a los grupos hemo del citocromo b. En primer lugar, el electrón pasa al de bajo potencial (b_L o b_{Low}, del inglés bajo), cercano al Q_o. De ahí, se transfiere a través de la membrana al centro de alto potencial (b_H o b_{High}, del inglés alto). Éste

es el encargado de ceder el electrón a la ubiquinona para dar semiubiquinona (QH \cdot), en el centro Q $_i$ (ver figura III.3). En este centro catalítico, la ubiquinona es reducida a ubiquinol. Sin embargo, esta reacción precisa de 2 electrones. Para ello, paralelamente, en el centro Q $_o$ se oxida otro ubiquinol. Este proceso libera un total de 4 H $^+$ al espacio intermembranal, 2 por cada QH $_2$ oxidado. De ahí, los dos electrones resultantes se bifurcan de nuevo, uno con sentido hacia el Q $_i$, para completar la reducción de la semiubiquinona inestable a ubiquinol estable, y el otro se transfiere a la proteína de Rieske. De este modo, los otros dos electrones procedentes de la oxidación de las dos moléculas de ubiquinol en el Q $_o$ se transfieren a la proteína de Rieske de ahí al citocromo c1 y, de éste, al portador móvil de electrones, citocromo c. El citocromo c es el encargado de ceder los electrones al complejo IV o *citocromo c oxidasa* donde son transferidos al oxígeno molecular para ser reducido a agua, completando así todo el dispositivo de transporte electrónico (Saraste 1999; Crofts 2004).

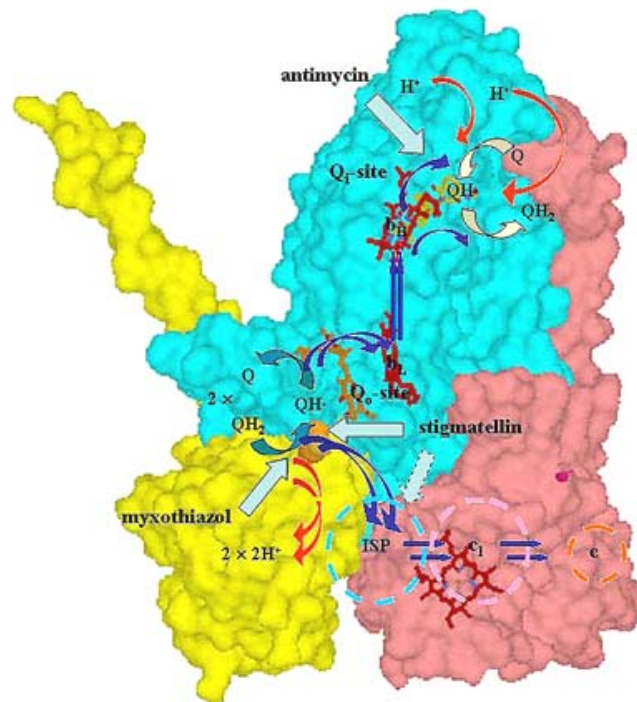


Figura III.3: Representación esquemática del mecanismo del ciclo Q. El modelo muestra centros redox del complejo (los hemos bH y bL en el citocromo b, el grupo hemo c1 en el citocromo c1 y el grupo 2Fe-2S en la proteína ISP). Las vías de transferencia de electrones se muestran en color azul, la síntesis de ubiquinol (QH $_2$) y ubiquinona (Q) en flechas gordas azul clarito en el centro Q $_o$ y beige en el centro Q $_i$. Las flechas naranja-rojizas muestran la liberación y captación de protones. La subunidad ISP está representada por un círculo de color azul pálido, la subunidad citocromo c1 por un círculo de trazos de color rosa y el citocromo c soluble por un círculo de puntos naranjas. Los sitios Q $_o$ y Q $_i$ están indicados por los radicales semiubiquinona (QH \cdot). El punto donde actúa cada inhibidor se representa con el nombre y flechas de colores. Modificado de (Crofts 2004).

La energía liberada en este proceso se utiliza para bombear protones (H^+) a través de los complejos I (4 H^+), III (4 H^+) y IV (2 H^+), fuera de la membrana mitocondrial interna. Se crea así un *gradiente electroquímico* (Δp), que es positivo y ácido en el exterior, y negativo y alcalino en la matriz mitocondrial. Este gradiente provoca el transporte de protones hacia el interior de la matriz a través del *complejo V o ATP sintasa*. Este complejo actúa como un canal de protones que "devuelve" los protones a la matriz mitocondrial, en un proceso que proporciona la energía necesaria para condensar el adenosin difosfato (ADP) y fosfato inorgánico (Pi) para dar ATP, catalizada por el componente F1 del complejo F0-F1 ATP sintasa (Kucharczyk, Zick et al. 2009). El dispositivo se conoce como ***acoplamiento quimiosmótico***, y fue postulada por el premio Nobel de química Peter D. Mitchell (Mitchell 1961). De esta forma, el consumo de oxígeno de la ETC está acoplado a la fosforilación de ADP por la ATP sintasa aprovechando el gradiente electroquímico generado (Wallace, Brown et al. 1999; Wallace and Fan 2010).

I.3 Concepto de acoplamiento OXPHOS

El sistema de fosforilación oxidativa no es totalmente eficiente. La cadena de transporte electrónico pierde el 1-2% de los electrones en forma de anión superóxido (O_2^-), formado en los complejos I y III, origen del 90% de las especies reactivas de oxígeno generadas en la mayoría de los tipos celulares (Boveris and Chance 1973; Navarro, Sanchez Del Pino et al. 2002). Los responsables de esta pérdida son los radicales semiubiquinona ($QH\cdot$), intermediarios en los ciclos motrices de protones de la ubiquinona en estos complejos (Boveris, Cadenas et al. 1976; Skulachev 2004). Su producción es dependiente de la fuerza motriz protónica. Así, a altas fuerzas protón motrices, la velocidad de respiración cae y los electrones tienden a acumularse en la ubiquinona en lugar de pasar a través de la ETC al oxígeno. Este hecho provoca el aumento de concentración de $QH\cdot$, y por tanto un aumento en la producción de ROS (Skulachev 1996; Brand, Affourtit et al. 2004).

A nivel molecular, la producción de los intermediarios semiubiquinona está condicionada por la transferencia de electrones únicos. Tiene lugar en dos puntos, el complejo I y el III. El mecanismo exacto de producción de anión

superóxido en el complejo I no se conoce, aunque trabajos recientes han postulado que se lleva a cabo en el sitio de unión del coenzima Q en este complejo (Efremov and Sazanov). En el complejo III, tanto la estructura como la maquinaria del ciclo Q se conoce bien (Trumpower 1990; Trumpower 2002). En este complejo, la formación de intermediarios de la ubiquinona tiene lugar en dos puntos, en el sitio Q_o durante la transferencia del primer electrón procedente del ubiquinol, dando lugar a una semiubiquinona, y en el centro Q_i, en la formación de la semiubiquinona inestable por la captura de dicho electrón (ver figura III.3). En esos el QH[•] formado reaccionará con el oxígeno para dar lugar a O₂⁻ (Brand, Affourtit et al. 2004; Navarro and Boveris 2007).

Alternativamente, algunos protones pueden volver a la matriz a través de vías de escape independientes al canal protónico de la ATP sintasa, causando un leve desacoplamiento y con ello una reducción en la eficiencia del sistema OXPHOS, reflejado en una menor síntesis de ATP. Esta fuga de protones mitocondriales es fisiológicamente importante. Ha sido caracterizado en mitocondrias aisladas (Rolfe and Brand 1996; Liu 1997), en células intactas (Nobes, Hay et al. 1990) y en órganos perfundidos (Rolfe and Brand 1996). Se ha estimado que la pérdida de acoplamiento energético puede llegar a representar un 20-25% de la tasa metabólica basal (SMR, del inglés, *Standard Metabolic Rate*) en un organismo como las ratas (Rolfe and Brand 1996; Brand, Brindle et al. 1999).

La pérdida de eficiencia de acoplamiento OXPHOS tiene varias funciones. Las más importantes y reconocidas son la termogénesis (Brand 2000) y el control de la producción de radicales libres (Skulachev 1996; Brand, Affourtit et al. 2004). Sin embargo, se le ha atribuido también un papel importante en el control del metabolismo energético celular, la seguridad ante una posible ruptura dieléctrica de la membrana en caso de gradiente electroquímico excesivo y otras como la regulación de la masa corporal (Brand 2000).

La eficiencia con la que el gradiente electroquímico generado da lugar a la síntesis de ATP se conoce como **eficiencia de acoplamiento**. Se dice que un sistema está muy acoplado o es muy eficiente energéticamente cuando sus mitocondrias acoplan eficientemente el flujo de electrones al bombeo de protones y el retorno de protones a la matriz con la síntesis de ATP, generando mucha

energía, pero poco calor, y por tanto más ROS. Los sistemas energéticos mitocondriales menos eficientes serán aquellos con más pérdidas en forma de calor, menos ATP final sintetizado y menos ROS producido (Skulachev 1996; Brand, Affourtit et al. 2004). La representación de ambos sistemas está recogida en la siguiente figura.

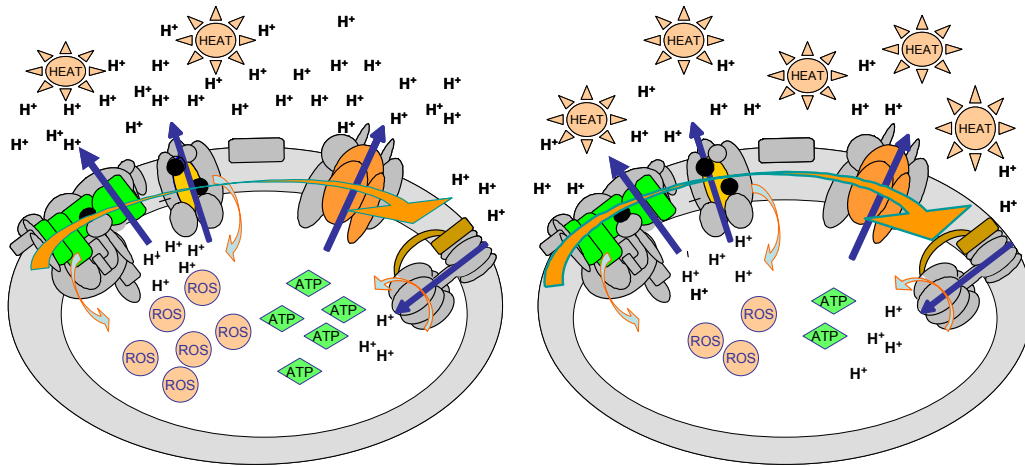


Figura III.4: Eficiencia de acoplamiento OXPHOS. A la izquierda un sistema OXPHOS muy acoplado, a la derecha un sistema OXPHOS desacoplado.

II. SISTEMA GENÉTICO MITOCONDRIAL

Una de las principales características de las mitocondrias es la de poseer un sistema genético propio. Fue descubierto a principios de los años 60 (Nass and Nass 1963) y la secuencia completa humana se conoce desde 1981 (Anderson, Bankier et al. 1981).

El mtDNA humano es una molécula circular, de doble cadena. Tiene una longitud de aproximadamente 16,6 kb. Codifica para 13 subunidades proteicas del sistema OXPHOS, 22 tRNAs y 2 rRNAs necesarios para la expresión de estas proteínas (Taanman 1999). De las 13 subunidades, 7 pertenecen al complejo I, las subunidades ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 y ND6; 1, el citocromo b (CYB); al complejo III, 3 pertenecen al complejo IV, las subunidades CO1, CO2 y CO3; y 2 al complejo V, ATP6 y ATP8. En la figura III.5 se muestra la posición de cada gen en el mtDNA.

El mtDNA se compone de dos cadenas, la pesada (H) y la ligera (L) que se separan en función de su composición de bases G+T, que les confiere distinta densidad. Los 2 rRNAs, 14 tRNAs y 12 polipéptidos están codificados en la cadena pesada, mientras que 8 tRNAs y un polipéptido (ND6) lo están en la cadena ligera (Montoya, Christianson et al. 1982) (Figura III.5).

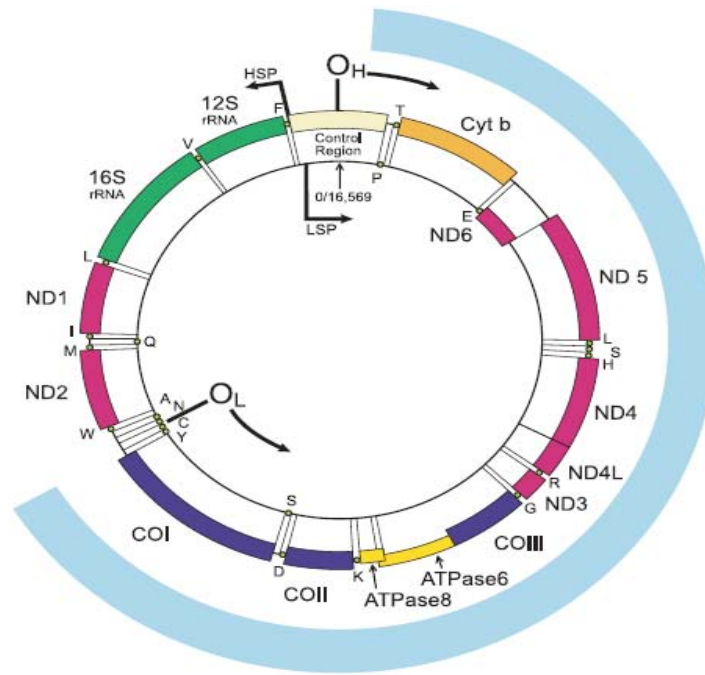


Figura III.5: Genoma mitocondrial. Se muestra la localización de los siguientes genes: Subunidades de la NADH-ubiquinona oxidoreductasa (Complejo I) en color rosa; ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 y ND6. El citocromo b (CYB), en color naranja, es una subunidad de la Ubiquinol-citocromo C-reductasa (Complejo III). Las subunidades de la Citocromo c-oxidasa se representan en violeta; COI, COII Y COIII. Las subunidades de la ATP sintasa (Complejo V) ATP6 y ATP8 están representadas en amarillo. Los genes para los tRNAs se designan con código de una letra y están representados con un círculo. Los rRNAs 16S y 12S están representados en color verde. Las flechas indican los promotores de la transcripción de la cadena pesada (HSP) y la cadena ligera (LSP) del mtDNA y los orígenes de replicación OH y OL para la cadena pesada y la cadena ligera respectivamente.

El mtDNA tiene, además, una región no codificante de 1,1 kb conocida como *región de control*, que contiene los orígenes de transcripción de las cadenas pesada y ligera (HSP y LSP respectivamente), el origen de replicación de la cadena pesada (OH) y elementos reguladores de la expresión del mtDNA, como los lugares de unión del *factor de transcripción mitocondrial* o *TFAM* (*TFAM*, del inglés, *Transcription Factor A Mitochondrial*) y la *secuencia asociada a la*

terminación (TAS, en inglés, *Termination Associated Sequence*) (Figura III.5). El origen de replicación de la cadena ligera (O_L) está localizado más adelante (Figura III.5). Los tRNAs se encuentran distribuidos entre los otros genes, tal y como se puede observar en la figura anterior (Montoya, Ojala et al. 1981; Ruiz-Pesini, Lopez-Gallardo et al. 2006).

I.1 Sistema genético mitocondrial

A. Replicación del mtDNA

La replicación del mtDNA tiene lugar en la matriz mitocondrial independientemente de la fase del ciclo celular y de la replicación del nDNA (Clayton 1982). Hasta el momento, dos modelos diferentes han intentado explicar como se produce la replicación del mtDNA: El modelo de Clayton y el de Holt-Jacobs (Clayton 1982; Holt, Lorimer et al. 2000)

El modelo de replicación bidireccional-simétrica de Holt-Jacobs sugiere que las dos cadenas se replican en paralelo al mismo tiempo, en un proceso similar al de la replicación del nDNA (Holt, Lorimer et al. 2000) (Figura III.6.B).

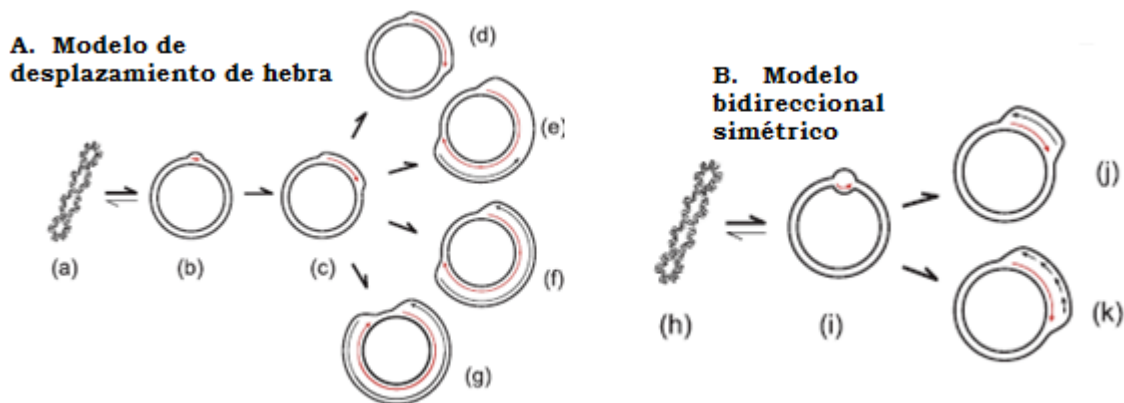


Figura III.6: Replicación del mtDNA. A. Modelo de desplazamiento de hebra de Vinograd-Clayton. a. mtDNA cerrado y superenrollado, b. Comienzo de la síntesis de la cadena pesada en O_H , c. Inicio de la síntesis de la cadena pesada pasado el D-LOOP hacia todo el genoma, d-f. Avance de la cadena pesada hasta el origen de la cadena ligera y comienzo de síntesis de la misma en sentido contrario a las agujas del reloj, g. Avance de cada cadena para dar una molécula hija. **B. Modelo bidireccional simétrico de Holt-Jacobs.** h. Cadena de mtDNA cerrada e hiperenrollada, i. inicio de la replicación en D-LOOP, j-k. comienzo simultáneo de ambas cadenas. Modificado de (Taylor, Barron et al. 2003)

El modelo del desplazamiento de hebra o Vinograd- Clayton propone una replicación asincrónica donde una cadena se inicia en el origen de replicación de la cadena pesada y replica dos tercios de la cadena pesada, y la otra presenta un segundo origen donde comienza la replicación de la hebra ligera (Clayton 1982) (Figura III.6.A). Según el modelo clásico de Vinograd- Clayton, la replicación comienza con la síntesis de un RNA cebador por la *RNA polimerasa* específica de organelo (POLRMT) (Fisher and Clayton 1985; Prieto-Martin, Montoya et al. 2001). Para que esta pueda acceder al DNA molde se requiere un cambio conformacional en la molécula de DNA que consiste en su inclinación y desenrollado inducido por la unión del TFAM al duplex de DNA (Fisher, 1985 #2248. La topoisomerasa de tipo I, específica de organelo, relaja entonces el DNA superenrollado rompiendo temporalmente enlaces en el esqueleto del DNA y la *helicasa mitocondrial (Proteína Twinkle)* desenrolla la doble hebra, rompiendo los enlaces de hidrógeno que mantienen ambas cadenas juntas, para producir moldes de hebra única. Una *proteína de unión al DNA de hebra única (mtSSB del inglés, Mitochondrial Single-Strand Binding protein)* mantiene la integridad de los intermediarios replicativos previniendo su renaturalización y acelera la velocidad de síntesis de DNA (Fernandez-Silva, Enriquez et al. 2003; Montoya, Lopez-Perez et al. 2006)

La transición de RNA a DNA tiene lugar en el origen de replicación de la hebra H (O_H) donde el cebador precursor se escinde por una endonucleasa procesadora del RNA mitocondrial (RNasa MRP). La elongación de la hebra naciente de DNA se lleva a cabo por la *DNA polimerasa gamma (POLG)* que consta de dos subunidades, una catalítica con actividades de polimerización 5'-3' y exonucleolítica 3'-5', y una segunda, la subunidad accesoria pequeña (b), que se une al DNA de doble hebra incrementando la afinidad de la enzima por el DNA y confiriéndole procesividad a la subunidad catalítica, además, está implicada en el reconocimiento del cebador. En la siguiente figura se muestra un ejemplo gráfico del dispositivo de la replicación del mtDNA (Fernandez-Silva, Enriquez et al. 2003; Montoya, Lopez-Perez et al. 2006).

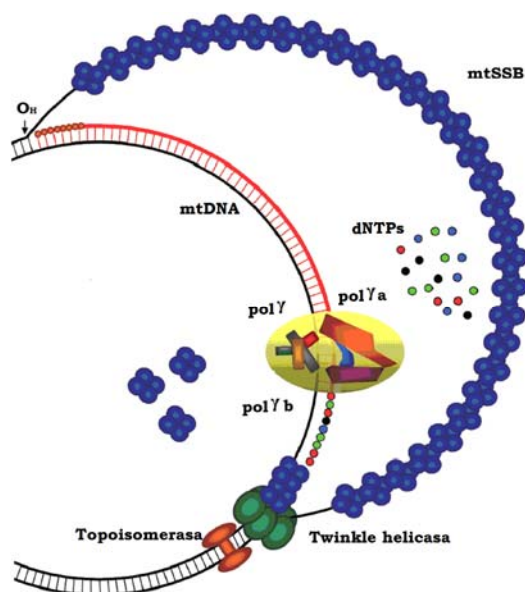


Figura III.7: Representación esquemática de la replicación del mtDNA. dNTPs, nucleotidos; O_H , Origen replicación de la cadena pesada; pol- γ , polimerasa gamma; pol- γ b, subunidad accesoria; pol- γ a, subunidad catalítica; mtSSB: Proteína de unión a hebra única y Twinkle helicasa del mtDNA. Modificado de (Hudson and Chinnery 2006).

Algunas de las proteínas que intervienen en la replicación del mtDNA son fundamentales en el mantenimiento de la dosis genómica del mtDNA. Así, trabajos en líneas rho⁰ han mostrado que la expresión de la DNA *polimerasa gamma* es independiente de los niveles de mtDNA (Davis, Ropp et al. 1996). Sin embargo, en *Drosophila melanogaster*, se ha visto que una sobreexpresión de su subunidad catalítica produce depleción del mtDNA (Graziewicz, Longley et al. 2006). La proteína mtSSB, que estimula la actividad de la DNA polimerasa (Ruiz De Mena, Lefai et al. 2000), también tiene un papel en la regulación de la dosis genómica mitocondrial (Schultz and Wiesner 2000) y, además, se ha visto que la ausencia y sobreexpresión de *Twinkle-Helicasa* da lugar alteraciones en el número de copias del mtDNA (Tynismaa, Sembongi et al. 2004). Mutaciones en esta proteína han sido asociadas a patologías como la oftalmoplegia CPEO y a la aparición de deleciones y depleciones del mtDNA. El *factor de transcripción mitocondrial* (TFAM) es responsable de la iniciación de la replicación y transcripción. Actúa junto con la proteína Twinkle como soporte estructural en los nucleoides (Figura III.7). La sobreexpresión de TFAM en tejidos de ratón conlleva un aumento del número de copias de mtDNA. Células *knockout* de TFAM en cultivo presentan depleción de su mtDNA (Larsson, Wang et al. 1998; Ekstrand, Falkenberg et al. 2004).

B. Transcripción del mtDNA

El modelo de expresión de la información codificada en el mtDNA fue establecido a comienzos de los 80 en el laboratorio del Dr. Giuseppe Attardi y es conocido tradicionalmente como el **modelo de puntuación por tRNAs** (Ojala, Montoya et al. 1981). De acuerdo con este modelo, la transcripción del mtDNA se inicia a partir de tres promotores diferentes, uno para la cadena ligera (L) y dos para la cadena pesada (H1 y H2), que darán lugar a tres moléculas policistrónicas largas. Estas cadenas se procesarán por cortes endonucleolíticos precisos delante y detrás de los tRNAs, que actúan como señales de reconocimiento para las enzimas de procesamiento. Así, tras adquirir los tRNAs la configuración en hoja de trébol en las cadenas nacientes de RNA, se producirán los rRNAs, tRNAs y mRNAs maduros (Montoya, Ojala et al. 1981; Montoya, Christianson et al. 1982; Montoya, Gaines et al. 1983) (Figura III.8).

Tal y como se puede observar en la siguiente figura, la cadena ligera se transcribe mediante una única unidad de transcripción que empieza en el lugar de iniciación L (en la figura III.8 como I_L) cerca del extremo 5' del RNA 7S (poli(A)-RNA 18), dando lugar a 8 tRNAs y un único mRNA, ND6. La cadena pesada se transcribe mediante dos unidades de transcripción solapadas en la región de los rRNAs (Montoya, Gaines et al. 1983). La primera se transcribe muy frecuentemente, comienza en el lugar de iniciación H1 (ver figura III.8; I_{H1}) situado por delante del gen *MT-TF* (tRNA-Fenilalanina) y termina en el extremo 3' del gen para el rRNA16S (*MT-RNR2*) y es responsable de la síntesis de los rRNAs 12S y 16S, del tRNAPhe y del tRNAVal (tRNA-Valina). El segundo proceso de transcripción, mucho menos frecuente que el anterior, comienza en el punto de iniciación H2 (ver figura III.8; I_{H2}) cerca del extremo 5' del gen *MT-RNR1* y se extiende más allá del extremo 3' del gen *MT-RNR2*, dando lugar a un RNA policistrónico que corresponde a casi la totalidad de la cadena pesada. Los mRNAs de los 12 péptidos restantes y los 14 tRNAs se originan por procesamiento de este RNA policistrónico.

El modelo de transcripción descrito muestra como la iniciación juega un papel muy importante en la regulación de la expresión génica y explica el modo de síntesis diferencial de rRNAs y mRNAs (Montoya, Gaines et al. 1983). Como se deduce del modelo, los productos de transcripción del DNA mitocondrial humano

aislados incluyen los 2 rRNAs, su precursor, los tRNAs y 18 RNAs poliadenilados en el extremo 3' (poli(A)-RNAs), la mayoría de los cuales corresponden a los RNA mensajeros (mRNAs). La mayor parte de los RNAs maduros corresponden a un único gen. Sin embargo, las subunidades 6 y 8 de la ATP sintasa y ND4 y 4L del complejo I, comparten mRNAs con dos marcos de lectura solapados. Los tres poli(A)-RNAs mayores (RNAs 1, 2 y 3) y el menor (RNA 18), marcados en rosa en la figura, así como 8 tRNAs, son productos de transcripción de la cadena ligera del mtDNA mientras que el resto lo son de la cadena pesada (marcados en azul en la figura III.8).

Los 13 polipéptidos codificados en el mtDNA tienen un tamaño que varía entre 70 y 610 aminoácidos. Los mRNAs que los codifican contienen exclusivamente la secuencia del patrón de traducción y una cola de unos 55 adenosinas en el extremo 3'. Los mRNAs mitocondriales humanos comienzan directamente por el codon de iniciación AUG, AUA o tienen muy pocos nucleótidos (1 a 3) delante de los mismos. Carecen, por tanto, de uno de los caracteres típicos de los mRNA de otros sistemas; la presencia de un tramo no codificante en el extremo 5' (Montoya, Ojala et al. 1981). Tampoco contienen la capucha en el extremo 5'. Asimismo, el extremo 3' de la mayor parte de los mRNAs no poseen una región no codificante y finalizan con una U o UA, generándose el codón de terminación completo (UAA) por la poliadenilación postranscripcional (Ojala, Montoya et al. 1981).

Para la iniciación de la síntesis del RNA, además de la RNA polimerasa específica de mitocondria, son necesarios dos factores más: el TFAM y el *factor de transcripción mitocondrial B2 (MTFB2*, del inglés *mt-Transcription Factor B*). Como factor de transcripción también se necesita la proteína implicada en la terminación de la unidad de transcripción que da lugar a los rRNAs, el factor de terminación mitocondrial (*MTERF*, del inglés, *mt-Termination Factor* (Kruse, Narasimhan et al. 1989; Fernandez-Silva, Martinez-Azorin et al. 1997). Finalmente, es necesaria la actividad de enzimas endonucleotídicas que cortan el policistrón para generar transcritos maduros en los extremos 5' y 3' de los tRNAs.

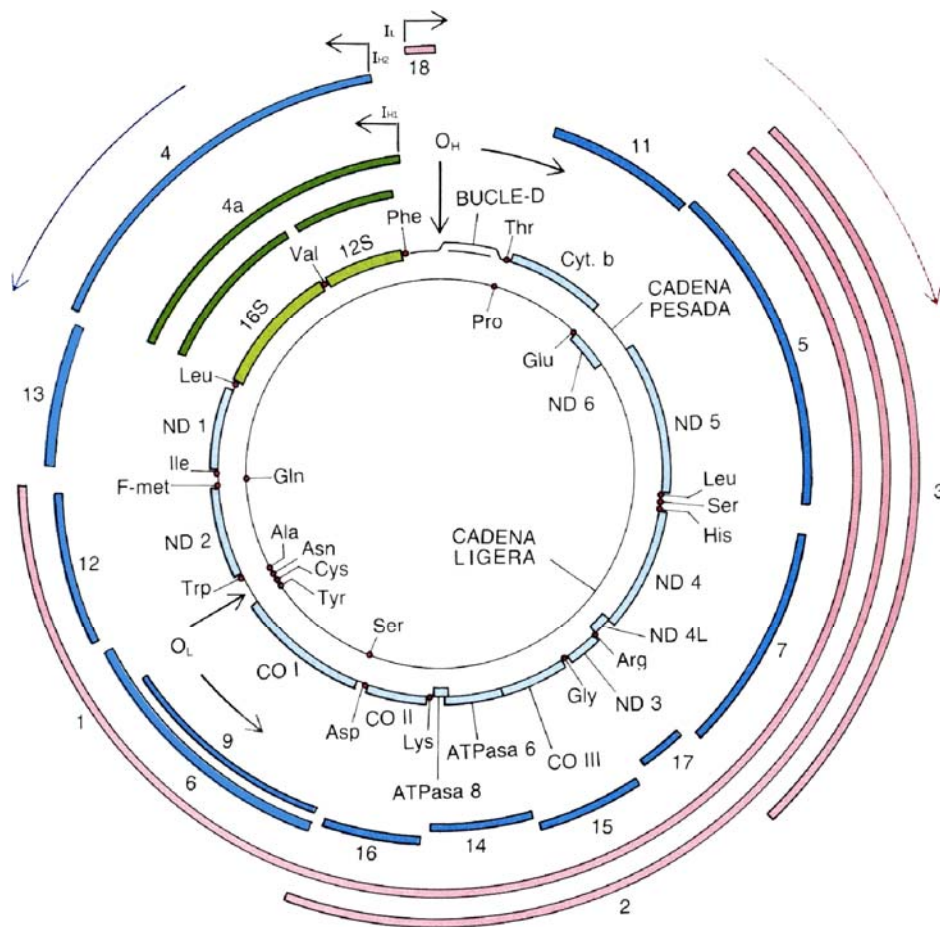


Figura III.8: Mapa de transcripción del mtDNA. Los dos círculos interiores representan las dos cadenas del DNA mitocondrial, en las que se indican los genes que codifican. Los rRNA (rRNA 12S y 16S), los tRNA, mostrados con la abreviatura del aminoácido que les corresponde y secuencias codificadoras de proteínas (ND: subunidades de NADH deshidrogenasa; cyt b: citocromo b; CO: subunidades de la citocromo c oxidasa). Los RNA que se transcriben se representan en los círculos exteriores con barras negras (transcritos de la cadena pesada) y con barras abiertas (transcritos de la cadena ligera). H1, H2 y L indican los lugares de iniciación de la transcripción de la cadena pesada y ligera, respectivamente. OH y OL simbolizan el origen de replicación de la cadena pesada y ligera, de acuerdo con el modelo de desplazamiento de hebra. Las flechas exteriores indican la dirección de la transcripción de la cadena pesada y ligera, respectivamente, y las que están al lado de OH y de OL muestran la dirección de síntesis de la cadena pesada y ligera del DNA.

C. Traducción de los mRNAs mitocondriales

Los mRNA mitocondriales se traducen en el interior de las mitocondrias. Estos orgánulos contienen ribosomas específicos (mitorribosomas), cuyos componentes están codificados tanto en el mtDNA (*MT-RNR1* y *MT-RNR2*), como en el nDNA (84 proteínas). Además, como ocurre en el caso de la traducción citoplasmática, más factores codificados en el nDNA están implicados.

La economía genética del mtDNA también ha propiciado otras características especiales en los sistemas de traducción. Los rRNAs son más pequeños que los citosólicos o procarióticos y se han reclutado nuevas proteínas para sustituir las funciones perdidas con los segmentos de rRNA eliminados. Así, los ribosomas mitocondriales son especialmente ricos en proteínas. Por otra parte, el código genético utilizado por la mitocondria es algo diferente del código universal (Tabla III.1).

CODÓN	CÓDIGO UNIVERSAL	CÓDIGO MITOCONDRIAL
UGA	STOP	Triptófano
AUA	Isoleucina	Metionina- Iniciación
AUU	Isoleucina	Isoleucina (Inicio)
AUC	Isoleucina	Isoleucina (Inicio)
AGG, AGA	Arginina	STOP

Tabla III.1: Diferencias entre el código genético mitocondrial y el universal.

Otra de las características de la traducción del los mRNA mitocondriales, es el uso de un modelo de reconocimiento de codones que permite la traducción de todos los codones con menos de 32 tRNAs. De esta manera, cada una de las 8 familias del código con 4 codones para un aminoácido determinado se leería por un solo tRNA, y no por dos, como en el sistema de reconocimiento del código universal (Barrell, Anderson et al. 1980). Así, bastarían 24 tRNAs para traducir el código genético mitocondrial. Además, la ausencia de los codones AGA y AGG (codones de parada en mitocondrias de los mamíferos) hace que los 22 tRNAs codificados en el mtDNA humano sean suficientes para traducir los 13 polipéptidos.

Una vez sintetizados en la mitocondria, los polipéptidos interaccionan con los componentes del sistema OXPHOS codificados en el nDNA, que fueron sintetizados en ribosomas del citosol e importados posteriormente al interior mitocondrial para ensamblar el sistema OXPHOS. Así, la síntesis y el ensamblaje del sistema OXPHOS es el resultado de la expresión coordinada de los polipéptidos sintetizados en la mitocondria y aquellos codificados en el nDNA. De hecho, es el nDNA, el que más condiciona esta biogénesis. Un ejemplo claro de ello es que células sin mtDNA, denominadas rho⁰ o ρ⁰, son capaces de proliferar si se suministran los factores de los que son dependientes (King and Attardi 1989; King and Attardi 1996).

II.2 Genética del mtDNA

El mtDNA está presente en alto número de copias en humanos. En una célula somática puede haber de cien a mil copias del mtDNA (Robin and Wong 1988). Esta propiedad, junto con la localización extranuclear del mtDNA, facilita su análisis y hace de la molécula de mtDNA la candidata ideal para el análisis de DNAs antiguos y en aplicaciones forenses (Pakendorf and Stoneking 2005).

Paradójicamente, esta característica, a su vez, complica los estudios de genética poblacional, ya que, es posible la existencia de varias formas alélicas del mtDNA en un mismo individuo, pudiendo diferir su proporción relativa en función de tejido (Zhu, Economou et al. 1992). La existencia de más de un tipo de mtDNA en una célula se denomina *heteroplasmia*, frente a la condición de *homoplasmia* que se da cuando todas las moléculas del mtDNA de una célula son idénticas (DiMauro and Hirano 1993). Además, la proporción de heteroplasmia puede variar de madres a hijas. Así se ha visto que en la división celular, las mitocondrias se distribuyen aleatoriamente entre las células hijas por *citoquinesis pasiva* (Jenuth, Peterson et al. 1996). Sumado a esto, durante la transmisión del mtDNA de madres a hijas se produce un *cuello de botella* que da lugar a cambios en la proporción de moléculas “mutantes” entre unas células y otras. En consecuencia, el fenotipo también puede variar. Este fenómeno se conoce como **segregación mitótica**, y puede tener muchas consecuencias, especialmente desde un punto de vista clínico (Dimauro and Davidzon 2005; Taylor and Turnbull 2005). En la siguiente figura se muestra un ejemplo gráfico.

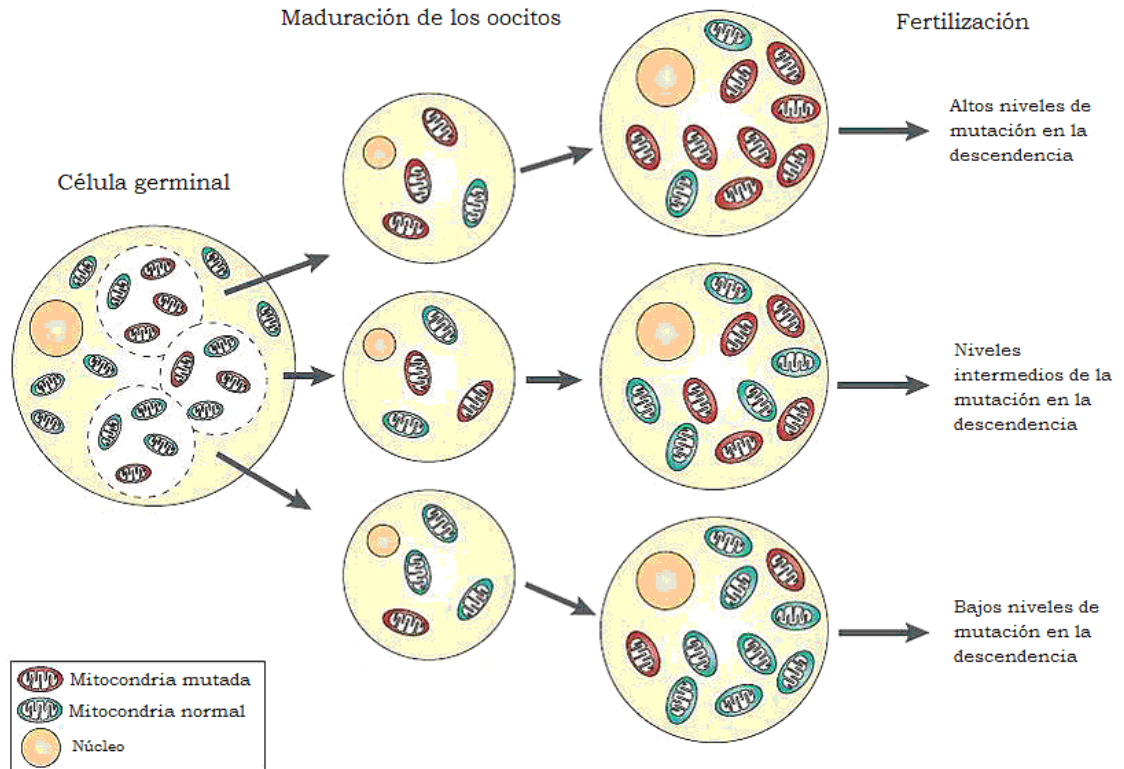


Figura III.9: Cuello de botella. Segregación mitótica. Modificado de (Taylor and Turnbull 2005).

Otra de las características del mtDNA es la de presentar una tasa mutacional elevada, de 5 a 10 veces superior a la del genoma nuclear (Brown 1980). En un principio, se creía que el aumento en la velocidad de mutación era debida a la reducida fidelidad de los sistemas de replicación y/o reparación en el mtDNA, a la alta exposición del genoma a las ROS generadas mayoritariamente en la mitocondria y a la ausencia de histonas protectoras. Sin embargo, se ha visto que las mitocondrias poseen eficientes sistemas de reparación específicos para daño oxidativo (Hudson, Hogue et al. 1998; Croteau, Stierum et al. 1999) y que el mtDNA no se encuentra desnudo y desprotegido, sino que está distribuido en pequeños grupos denominados **nucleoides** (Figura III.10). Cada nucleoide contiene varias moléculas de mtDNA y proteínas que intervienen en la replicación y transcripción del mtDNA como la Twinkle helicasa (Spelbrink, Li et al. 2001; Holt, He et al. 2007), el TFAM {Jacobs, 2000 #3052; Garrido, 2003 #3419}, la proteína de unión al DNA de hebra única (mtSSB), la DNA polimerasa gamma (POLG), el MTERF (Pellegrini, Asin-Cayuela et al. 2009)...etc.

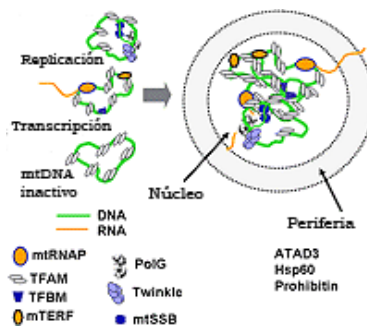


Figura III.10: Estructura de los nucleoides. Modificado de (Bogenhagen, Wang et al. 2003).

El mtDNA presenta herencia exclusivamente materna (Giles, Blanc et al. 1980). Durante años, el patrón no mendeliano de herencia estrictamente materna y ausente de recombinación del mtDNA, se ha considerado un dogma (Stoneking 1994; Stoneking and Soodvall 1996; Wallace, Brown et al. 1999). Sin embargo, varios estudios en los últimos años han tratado sin éxito de demostrar lo contrario (Swartz and Savino 1994; Kraytsberg, Schwartz et al. 2004; Zsurka, Kraytsberg et al. 2005; Zsurka, Hampel et al. 2007).

Esta herencia matrilineal está facilitada, en parte, por la dilución de mtDNA espermático con el mtDNA del oocito tras la fertilización. El oocito contiene 200.000 copias del mtDNA y el espermatozoide contribuye sólo con cientos. Además, se ha visto que existe un mecanismo para eliminar el mtDNA espermático residual (Cummins 1998). En el pez, *Oryzias latipes*, el mtDNA espermático está reducido cinco veces, hasta 10 nucleoides. Tras la fertilización, los nucleoides restantes desaparecen pasada una hora (Wallace, Fan et al. 2010). En mamíferos, la prohibitina, una proteína presente en la membrana externa mitocondrial, es ubiquitinizada durante la espermatogénesis. Esta marca imprime una sentencia de muerte en la mitocondria del espermatozoide, ejecutada por la maquinaria de destrucción del oocito 24h después de la fertilización (Sutovsky, Ramalho-Santos et al. 1999; Sutovsky, Moreno et al. 2000).

Otra teoría importante que ha intentado explicar la herencia matrilineal ha sido la de la anisogamia: La división de papeles entre gametos femeninos y masculinos basados en la función mitocondrial y la replicación. Según esta

teoría, los gametos masculinos requieren una alta motilidad para alcanzar el oocito y dar lugar a la fecundación. Así, precisan grandes cantidades de ATP, que vienen acompañadas de una alta producción de ROS, que daría lugar a mutaciones en el mtDNA del espermatozoide. Por el contrario, los gametos femeninos, no mótiles, reprimen el sistema OXPHOS, y de este modo lo protegen de posibles daños. Este hecho provocaría que, tras la fertilización, el mtDNA materno, menos alterado, fuera favorecido por la selección, frente al paterno (Cummins, Jequier et al. 1994; Allen 1996).

De esta forma, la alta velocidad mutacional en conjunto con la herencia exclusivamente materna, ha resultado en la acumulación de un amplio rango de polimorfismos específicos de población. Estos SNPs (del inglés, *Single Nucleotide Polymorphism*) son heredados de madres a hijas sin sufrir recombinación alguna, lo que produce una acumulación secuencial, a lo largo de la radiación de linajes maternos, de haplotipos filogenéticamente relacionados denominados **haplogrupos** (Wallace, Brown et al. 1999).

III. VARIANTES GENÉTICAS DEL mtDNA

III.1 Polimorfismos antiguos – Haplogrupos

Desde la publicación de la secuencia completa del mtDNA a principios de los años 80 (Anderson, Bankier et al. 1981), una multitud de estudios filogenéticos han tratado de desentrañar la filogenia completa de este pequeño genoma. De los trabajos iniciales, el de Cann fue el de mayor impacto (Cann, Stoneking et al. 1987). Contando con 147 muestras de individuos de Asia, Australia, Nueva Guinea, Europa y Africa, se analizó la presencia de polimorfismos acumulados en los linajes maternos. La idea se basaba en el principio de coalescencia, según el cuál, asumiendo que hubo herencia exclusivamente materna no recombinante, se deduce que toda variación en cualquier segmento del mtDNA de las generaciones presentes debe proceder en última instancia de un único ancestro que existió en generaciones previas. Los resultados sugirieron que la raíz del árbol, la “*Eva Negra*”, *la madre ancestral*, era de origen africano reciente (Cann, Stoneking et al. 1987).

En el mapa presentado a continuación se muestra la distribución de los distintos haplogrupos en el globo, así como una de las teorías más respetadas de las migraciones (Wallace, Brown et al. 1999). Según esta teoría (Figura III.12), desde la raíz africana surgieron cuatro linajes específicos de África subsahariana: L0, L1, L2 y L3. Pasado el tiempo, del haplogrupo africano presente en el noreste de África L3, surgieron dos linajes nuevos, el M y N. Sólo estos dos linajes salieron de África para colonizar el resto del mundo (Figura III.12). En la migración, el linaje N se dirigió a Eurasia, mientras que el M se dirigió a Asia. En Europa, el linaje N dió lugar al R, raíz de todos los haplogrupos europeos H, J, T, U y V (Torrioni, Huoponen et al. 1996).

Hoy en día, la explosión de los estudios de filogenias mitocondriales, junto con la mejoría en las técnicas de secuenciación, ha desembocado en un mayor número de secuencias completas y una clasificación más detallada de los puntos de ramificación más internos (más antiguos) del árbol filogenético frente a los nuevos subhaplogrupos que serán las ramas más externas del mismo (las más recientes). Así, por ejemplo se sabe, que el haplogrupo H, el más común en Europa, está formado por al menos 15 subhaplogrupos (Achilli, Rengo et al. 2004) y el haplogrupo N, muy común en Asia, está formado por 38 haplogrupos (Palanichamy, Sun et al. 2004; Barnabas, Shouche et al. 2006). Este es a su vez, el ancestro de todos los haplogrupos europeos.

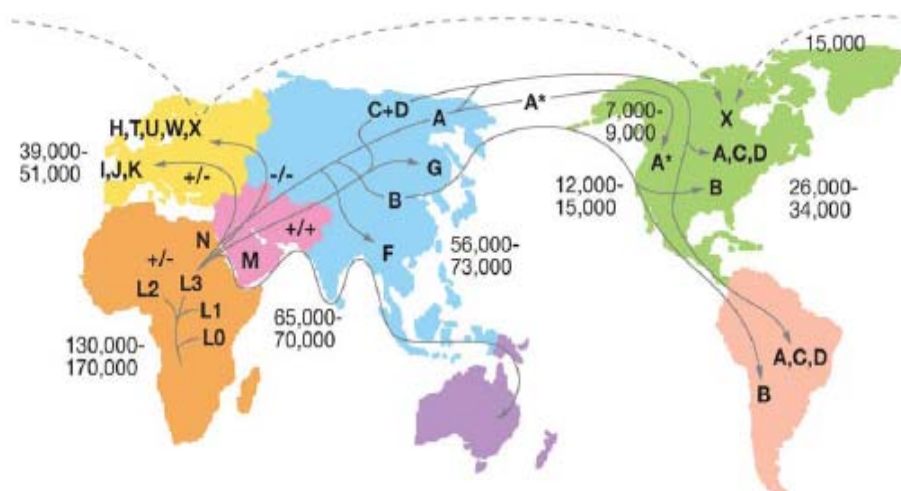


Figura III.12: Representación de las migraciones humanas a través del mtDNA y los haplogrupos mitocondriales. (adaptado de(Wallace 2005)).

III.2 Filogenias caucásicas

El conjunto de todos los mtDNAs derivados por descenso directo de un ancestro materno puede ser distinguido por un nombre. Así, los haplogrupos relacionados pueden ser agrupados en clados. Los clados son agrupaciones monofiléticas. Los clados del mtDNA son denotados con letras mayúsculas. Los clados mitocondriales más importantes en Europa son el HV, U y JT y constituyen más del 90% de la población (Macaulay, Richards et al. 1999; Torroni, Richards et al. 2000).

El clado mayoritario de la población europea, con más de 50% de la población, es el clado HV. Engloba los haplogrupos H y V, así como el denominado HV* (Saillard, Magalhaes et al. 2000). De ellos, el más numeroso es el haplogrupo H, que representa aproximadamente el 45% de la población en Europa, decreciendo su frecuencia en el sudeste europeo, con un ~20% en la zona de Turquía y el Cáucaso y un ~ 10% en los países del golfo (Roostalu, Kutuev et al. 2007). Está dividido en distintos sub-haplogrupos (Achilli, Rengo et al. 2004). De ellos, el sub-haplogrupo mayoritario en Europa es H1 con dos picos de población en la península Escandinava y la península Ibérica (Pereira, Richards et al. 2005). En la población española representa un 20% (Dahmani, Marcuello et al. 2008). El segundo subhaplogrupo mayoritario es el H3, mayoritario en el sur de Europa, en particular en Francia y España. El resto de los sub-haplogrupos, como por ejemplo H2 y H6, son más comunes en el Cáucaso y el este de Europa (Pereira, Richards et al. 2005). Frente al H, la filogenia V está presente en un 4% de la población. Es un haplogrupo principalmente europeo, aunque también está presente en el norte de África (Rhouda, Martínez-Redondo et al. 2009).

Los otros dos clados mayoritarios son el JT y el U, que en conjunto englobarían un 40% de la población europea. El haplogrupo U, en particular, comprende aproximadamente el 20% de la población en Europa. Está distribuido desde India hasta Portugal y desde el norte del continente europeo hasta el norte de África (Achilli, Rengo et al. 2005). El haplogrupo U está dividido en distintos subhaplogrupos (Montiel-Sosa, Ruiz-Pesini et al. 2006). Entre sus sub-haplogrupos mayoritarios en Europa están el U5 y el Uk, que engloban aproximadamente el 9% de la población (Achilli, Rengo et al. 2005; Montiel-Sosa, Ruiz-Pesini et al. 2006).

El clado JT engloba a los haplogrupos hermanos J y T (Ruiz-Pesini, Mishmar et al. 2004). El haplogrupo T conforma el 8% de la población. Está dividido en varios subhaplogrupos (SanGiovanni, Arking et al. 2009). El haplogrupo J representa aproximadamente el 9 % de la población europea. Se escinde en 2 sub-haplogrupos: J1 y J2, ambos definidos por cambios en el citocromo b (Carelli, Achilli et al. 2006).

IV PATOLOGÍA MITOCONDRIAL

La elevada tasa mutacional del mtDNA ha dado lugar a un gran número de mutaciones. Comúnmente se dividen en tres tipos: antiguos polimorfismos que se han ido acumulando con el paso del tiempo dando lugar a las filogenias mitocondriales, mutaciones recientes normalmente asociadas a patologías y mutaciones somáticas acumuladas en tejidos con la edad. En este apartado realizaremos un repaso de las mutaciones somáticas y de las patológicas.

IV.1 Mutaciones somáticas del mtDNA

Las mutaciones somáticas son aquellas que se acumulan en los tejidos con la edad. Son más frecuentes en post-mitóticos dependientes como el cerebro y el músculo, los más afectados durante el envejecimiento (Coskun, Wyrembak et al. 2011 ; Coskun, Beal et al. 2004). De hecho, se ha hipotetizado, que la acumulación de mutaciones somáticas en el mtDNA está relacionada con la disminución de la función mitocondrial con la edad, dando lugar a enfermedades degenerativas (Wallace 2005). Una representación gráfica de esta teoría se puede observar en la siguiente figura.

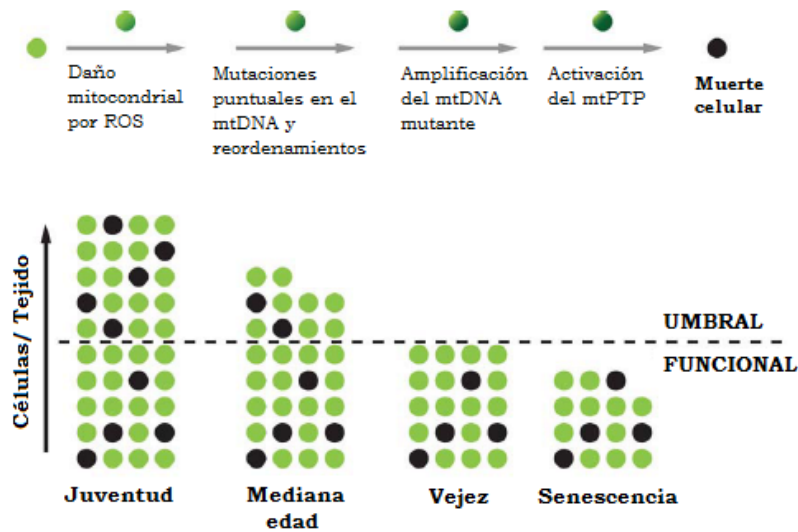


Figura III.12: Teoría mitocondrial del envejecimiento celular. La línea superior del diagrama muestra el papel mitocondrial en la vida energética y la muerte celular. El diagrama inferior representa la pérdida de células en un determinado tejido durante la vida de un individuo a través de la muerte mediada por mitocondria (puntos negros). El umbral necesario está marcado en la línea discontinua. Modificado de (Wallace 2005).

Un ejemplo es la mutación somática en la región de control m.414T>G, localizada en la zona de unión del TFAM en el lugar de inicio de la transcripción de la cadena ligera (Figura III.5). Esta mutación se ha encontrado acumulada en los fibroblastos de centenarios, llegando a niveles superiores al 60% (Michikawa, Mazzucchelli et al. 1999; Coskun, Beal et al. 2004). Además, estudios realizados en cerebros de pacientes con AD observaron que el 65% de las muestras contenía la mutación mientras que ninguno de los controles la albergaba. Por otro lado, en ese mismo estudio, la secuenciación de la región de control reveló que las muestras de pacientes con AD presentaban un aumento global del 73% de mutaciones en la región de control, localizadas preferentemente en las regiones reguladoras del D-loop. Este hecho provocaba una caída del 50% en la dosis genómica mitocondrial y una disminución del 50% en la transcripción de la hebra ligera de las muestras analizadas (Coskun, Beal et al. 2004).

Estudios de tumores incluyendo el de próstata, mama, colon, vejiga, tumores de cabeza y cuello han revelado también la presencia de mutaciones somáticas del mtDNA (Bayona-Bafaluy, Lopez-Gallardo et al., 2011).

IV.2 Mutaciones asociadas a patologías. Patología mitocondrial

La alta tasa de mutación del mtDNA provoca también que surjan continuamente nuevas mutaciones que afectan a funciones mitocondriales que son esenciales para la vida y resultan ser nocivos dando lugar a síntomas clínicos y enfermedades. La disciplina que las estudia es la denominada patología *mitocondrial*. El término abarca un amplio espectro de trastornos, sin embargo, tradicionalmente se ha utilizado para designar aquellas enfermedades causadas por defectos en el sistema OXPHOS (DiMauro, 2003; Ruiz-Pesini, 2006).

Los primeros estudios publicados de patología del mtDNA datan de finales de los años 80, cuando en el laboratorio del Dr. Wallace se asoció por primera vez una mutación puntual con un fenotipo, el cambio m.11778A>G y la *Neuropatía Óptica Hereditaria de Leber (LHON)*, del inglés, *Leber's Hereditary Optic Neuropathy*) (Wallace, Singh et al. 1988) y la mutación m.8344A>G asociada al fenotipo de epilepsia mioclónica y fibras rojo rasgadas (MERRF, del inglés, *Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers*) (Wallace, Zheng et al. 1988). Ese mismo año en el laboratorio de Dr. Harding se identificaron deleciones en el mtDNA en pacientes con miopatías mitocondriales (Holt, Harding et al. 1988). Desde entonces, el número de mutaciones en el mtDNA descritas ha crecido enormemente y también se han descubierto mutaciones en el nDNA en componentes OXPHOS u otros implicados en su biogénesis. Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de información cosechada, los mecanismos fisiopatológicos son todavía poco conocidos (DiMauro and Schon 2003; Ruiz-Pesini, Lopez-Gallardo et al. 2006).

La característica más común de estas enfermedades es su naturaleza multisistémica, es decir, afectan prácticamente a casi cualquier órgano o tejido, pero fundamentalmente a aquellos más energético-dependientes como el sistema nervioso y el músculo (Park and Larsson 2011). Sin embargo, algunas mitocondriopatías se caracterizan justo por lo contrario, por la afectación de un tejido único, como las células ganglionares de la retina en la enfermedad de LHON o las células cocleares en la sordera mitocondrial (Pacheu-Grau, Gomez-Duran et al. 2010; Ruiz-Pesini, Lopez-Gallardo et al. 2006).

Otra de las características de las mutaciones del mtDNA que dan lugar a procesos patológicos es que no todas actúan con la misma gravedad, ni dan lugar a un proceso similar. Así, existen mutaciones, como las responsables de la enfermedad de Leigh y algunas en los tRNAs, cuyo efecto es muy severo y constituyen el agente causal de la enfermedad. Otras, como las de la enfermedad de LHON, presentan *penetrancia incompleta*, es decir, necesitan factores adicionales para que se desarrolle la patología (DiMauro and Schon 2003; Ruiz-Pesini, Lopez-Gallardo et al. 2006).

A. Neuropatía Óptica Hereditaria de Leber.

La neuropatía hereditaria óptica de Leber (LHON, OMIM 535000) es la enfermedad mitocondrial más frecuente. Está caracterizada por una degeneración selectiva de las células ganglionares de la retina que desemboca en atrofia óptica y pérdida de la visión central (Carelli, Ross-Cisneros et al. 2004). Más del 90% de los pacientes de LHON presentan una de las tres mutaciones primarias homoplásmicas en genes del complejo I: m.3460G>A/p.MT-ND1:A52T, m.11778G>A/p.MT-ND4:R340H y m.14484T>C/p.MT-ND6:M64V que provocan un defecto en la actividad de la *NADH deshidrogenasa* (Brown, Allen et al. 2001), una disminución de la síntesis de ATP y una generación creciente de ROS. Posteriormente, la falta de energía y el estrés oxidativo parece ser la causa del aumento de la degeneración de las células ganglionares de la retina (Yu-Wai-Man, Griffiths et al. 2011; Carelli, La Morgia et al. 2009)

Sin embargo, aunque el factor etiológico primario de la enfermedad de LHON es una mutación en el mtDNA, la presencia de estas mutaciones no siempre desemboca en la pérdida de visión (Yu-Wai-Man, Griffiths et al. 2011). Así, mientras los patomecanismos de las mutaciones primarias comienzan a ser desentrañados (Yu-Wai-Man, Griffiths et al. 2011; Carelli, La Morgia et al. 2009), la patogénesis de la enfermedad de LHON constituye una incógnita. Entre los enigmas encontramos la prevalencia masculina (Man, Turnbull et al. 2002), la influencia de factores ambientales (Tsao, Aitken et al. 1999), el papel de determinadas variantes del fondo genético mitocondrial (Brown, Sun et al. 1997; Hofmann, Bezold et al. 1997; Lamminen, Huoponen et al. 1997; Torroni, Petrozzi et al. 1997; Reynier, Penisson-Besnier et al. 1999; Brown, Starikovskaya et al.

2002; Sudoyo, Suryadi et al. 2002; Carelli, Achilli et al. 2006; Shafa Shariat Panahi, Houshmand et al. 2006; Tharaphan, Chuenkongkaew et al. 2006; Hudson, Carelli et al. 2007; Ji, Zhang et al. 2008), y la variación en la penetrancia de mutaciones homoplásmicas en individuos portadores de un mismo pedigrí materno (Sadun, La Morgia et al., 2011 ; Howell, Ghosh et al. 2000; Sadun, Carelli et al. 2002).

Una de las características más llamativas de la enfermedad de LHON es la afectación por sexos, con una mayor incidencia masculina. Sólo el 10% de las mujeres portadoras de mutaciones de LHON sufren la patología, frente al 50% de los hombres (Seedorff 1985; Nikoskelainen, Savontaus et al. 1994; Wallace 1994). Esta prevalencia masculina ha sido relacionada con una implicación del cromosoma X (Chalmers, Davis et al. 1996). La hipótesis de los *dos-loci* sugiere la existencia de una combinación sinérgica entre mutaciones recesivas en el gen del cromosoma X y la mutación mitocondrial causal de la patología (Bu and Rotter 1991). De hecho, recientemente se han encontrado dos *loci* en un cromosoma X, sin embargo, los genes responsables no han sido identificados (Hudson, Carelli et al. 2007; Shankar, Fingert et al. 2008). Así, los hombres que hereden ambas mutaciones, es decir, la mutación en el cromosoma X y la de LHON, estarían afectados. Sin embargo, en el caso de las mujeres, aún presentando la mutación de LHON deberían ser homocigotas para el locus de susceptibilidad, o heterocigotas con inactivación de un cromosoma X (Man, Turnbull et al. 2002). Otros autores, sin embargo, han centrado su interés en las diferencias en el metabolismo hormonal entre hombres y mujeres y el papel de los estrógenos como factor de modificación de la severidad del defecto mitocondrial (Giordano, Montopoli et al. 2010).

Entre los factores genéticos mitocondriales que afectan a la penetrancia de la enfermedad, un hecho irrefutable es la influencia del fondo genético mitocondrial J en la penetrancia de las mutaciones m.11778A>G y m.14484T>C (Brown, Sun et al. 1997; Carelli, Ghelli et al. 1997; Torroni, Petrozzi et al. 1997). Sin embargo, desde los primeros trabajos, el conocimiento de la influencia de los fondos genéticos mitocondriales ha ido en aumento, gracias al incremento del número de muestras y a la extensión del número de ramas filogenéticas por clado mitocondrial (Carelli, Achilli et al. 2006). Se ha visto que el haplogrupo Uk, definido por la transición m.14798T>C/p.MT-CYB:F18L, está sobrerrepresentado

en pacientes de LHON portadores de la mutación m.3460G>A/p.MT-ND1:A52T (Hudson, Carelli et al. 2007). Por otro lado, el haplogrupo H se ha asociado con un efecto protector en pacientes con la mutación m.11778G>A/p.MT-ND4:R340H (Hudson, Carelli et al. 2007). Para esa misma mutación, los subhaplogrupos del clado J; J1c m.14798T>C/p.MT-CYB:F18L y J2b (m.15257A>G/p.MT-CYB:D171N) se han relacionado con un aumento de la penetrancia de la misma (Carrelli, 2006). Paralelamente, el haplogrupo J1, definido por la transición en el *MT-RNR2* m.3010G>A, ha sido definido como un factor de susceptibilidad al LHON en enfermos con la transición m.14484T>C/p.MT-ND6:M64V (Carrelli, 2006; Hudson, 2007), frente al H que se ha considerado como un factor de protección (Howell, Herrnstadt et al. 2003).

Además, otros factores ambientales como el consumo abusivo de alcohol, de tabaco (Sadun 1998; Kirkman, Yu-Wai-Man et al. 2009), la exposición a pesticidas utilizados en agricultura, el humo y los vapores tóxicos de solventes industriales han sido relacionados con un aumento de la penetrancia de la enfermedad de LHON (Carelli, Franceschini et al. 2007; Kirkman, Yu-Wai-Man et al. 2009).

Sin embargo, aunque el conocimiento acerca de los factores de riesgo ha ido en aumento, ninguno ha resuelto el porqué de una penetrancia incompleta en familiares de un mismo pedigrí (Howell 1998; Sadun, 2002 #42), o el mecanismo molecular que determina la influencia de los fondos genéticos mitocondriales.

B. Enfermedad de Parkinson y mitocondria

La *enfermedad de Parkinson (PD)*, del inglés, *Parkinson Disease*) o “*Parálisis agitante*” (OMIM 168600) fue descrita por primera vez en 1817 (*Essay on the Shaking Palsy*) por el Dr. James Parkinson. Es consecuencia de la destrucción difusa de una parte de la *substancia nigra*, la parte compacta. La enfermedad se caracteriza por rigidez de la mayor parte del cuerpo, temblor no intencionado y una gran dificultad para iniciar el movimiento, llamada acinesia. A nivel histopatológico y molecular, se caracteriza por una pérdida de neuronas dopaminérgicas en la *substancia nigra* del cerebro acompañada por inclusiones intracelulares de agregados proteicos enriquecidos de la proteína α -sinucleína

(llamados cuerpos de Lewy), además de una deficiencia generalizada en la actividad enzimática del complejo I mitocondrial (Nakagawa-Hattori, Yoshino et al. 1992; Yoshino, Nakagawa-Hattori et al. 1992; Trimmer, Borland et al. 2004).

Los estudios de espectroscopía de resonancia magnética han encontrado niveles de ATP disminuidos y niveles de lactato incrementados en los cerebros de pacientes con PD (Bowen, Block et al. 1995; Barbiroli, Martinelli et al. 1999; Rango, Bonifati et al. 2006; Rango, Canesi et al. 2006; Henchcliffe, Shungu et al. 2008). Esta disfunción del sistema OXPHOS ha sido observada a nivel bioquímico. Además, se ha documentado la existencia de una caída en la actividad del complejo I en la *substantia nigra* (Schapira, Cooper et al. 1990; Schapira, Holt et al. 1990; Janetzky, Hauck et al. 1994) y en el cortex frotal (Parker 1991; Parker, Parks et al. 2008; Navarro, Boveris et al. 2009) de pacientes de PD. Esta deficiencia respiratoria resulta ser sistémica, ya que se ha evidenciado una deficiencia del complejo I en músculo (Shoffner, Watts et al. 1991; Nakagawa-Hattori, Yoshino et al. 1992; Cardellach, Marti et al. 1993), plaquetas (Parker, 1989; Krige, 1992; Yoshino, 1992; Benecke, 1993; Swerdlow, 1996), linfocitos (Yoshino, Nakagawa-Hattori et al. 1992) y leucocitos (Muftuoglu, Elibol et al. 2004) de pacientes con PD. Por otra parte, la actividad de otras enzimas respiratorias, mayoritariamente el complejo IV, también han sido encontradas disminuidas en varios tejidos de pacientes con PD (Bindoff, Birch-Machin et al. 1991; Benecke, Strumper et al. 1993; Cardellach, Marti et al. 1993; Blin, Desnuelle et al. 1994; Haas, Nasirian et al. 1995; Muftuoglu, Elibol et al. 2004; Shinde and Pasupathy 2006). Y sumado a la deficiencia en actividad del CI, varias subunidades del complejo I están disminuídas en las mitocondrias del cortex frontal y tejido estriado en pacientes con PD (Keeney, Xie et al. 2006). Paralelamente, se ha encontrado una caída significativa en los niveles de complejo IV en muestras de cerebro, y otra población de pacientes ha mostrado caída significativa de los complejos respiratorios en biopsias de cortex cerebral (Lopez-Gallardo, Iceta et al. 2011). En algunos casos, también se han hallado disminuidos los niveles de ATP sintasa en la *substancia nigra* (Ferrer, Perez et al. 2007).

Los defectos en el sistema OXPHOS no son una regla general en todos los pacientes. Sin embargo, las asociaciones descritas anteriormente, en tejidos sin afectación en la patología, confirman la existencia de una alteración OXPHOS

sistémica patogénica en muchos casos de la enfermedad (Lopez-Gallardo, Iceta et al. 2011). De esta forma, mientras los defectos en el sistema OXPHOS parecen ser una de las características de la patología, su etiología es desconocida. Solamente un 15-20% de los pacientes con PD tienen una clara historia familiar de esta enfermedad. La mayoría de los pacientes presentan una etiología compleja, donde confluyen factores genéticos y ambientales (Lopez-Gallardo, Iceta et al. 2011, 2011 ; Swerdlow 2009)

Por otro lado, la enfermedad de Parkinson se ha asociado con un gran número de tóxicos ambientales y existen fuertes evidencias de que estos xenobióticos interactúan con el sistema OXPHOS (Lopez-Gallardo, Iceta et al. 2011). Un ejemplo, la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), causa síntomas similares al PD en los humanos. El MPTP se metaboliza a su forma tóxica, el ión 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP+), que específicamente inhibe la oxidación de sustratos ligados al NAD⁺ y bloquea la transferencia de electrones a través del CI de la ETC en algún punto en la proximidad de su bolsillo de unión de la quinona. Aunque el MPTP se utiliza comúnmente como modelo de PD, no se encuentra generalmente como un tóxico ambiental (Schapira, Cooper et al. 1989). A diferencia, la anonacina, un compuesto que se encuentra en la piña o *Ananas*, inhibe el complejo I y su consumo abusivo ha sido asociado a la aparición del denominado Parkinson de Guadalupe.

Otros herbicidas como el Paraquat (PQ), uno de los herbicidas más utilizados en el mundo, también se ha asociado con un aumento de riesgo de PD. Datos recientes sugieren que actúa aumentando la producción de ROS a nivel del CIII (Drechsel and Patel 2008). Otros dos pesticidas, la dieldrina y el maneb, han mostrado inhibición del CIII. La dieldrina es uno de los fungicidas en desuso más tóxico para los humanos, pero presenta una vida media de 25 años. Actúa a nivel del citocromo b, en el complejo III, inhibiendo el paso de electrones (Bergen 1971) y produciendo un aumento de la producción de ROS (Kitazawa, Anantharam et al. 2001). Estudios *post-mortem* de cerebros de pacientes con PD han mostrado mayores niveles de dieldrina que en pacientes muertos por otras patologías (Fleming, Mann et al. 1994). Además, se ha encontrado un aumento de los niveles de dieldrina en el núcleo caudado de pacientes con PD frente a controles. El Maneb es un fungicida orgánico que pertenece a la familia de los ditiocarbamatos y es utilizado principalmente en el control de patógenos de las

cosechas. La exposición ocupacional crónica a este fungicida produce Parkinsonismo permanente (Zhang, Fitsanakis et al. 2003).

Otros inhibidores de la cadena de transporte electrónico como el cianuro potásico, inhibidor del complejo IV, también causan parkinsonismo (Sarıkaya, Apaydin et al. 2006). Así, muchos xenobióticos, que inhiben el sistema OXPHOS, parecen estar entre las causas de la enfermedad de Parkinson (Lopez-Gallardo, Iceta et al. 2011).

Asimismo, la patología de Parkinson presenta un componente genético. Se han descrito mutaciones tanto en el genoma nuclear, como en el genoma mitocondrial. En el nDNA se han definido mutaciones en los genes α -sinucleína, Parkina, quinasa 1 inducida por PTEN (PINK1, del inglés, *PTEN-Induced Putative Kinase 1*) y DJ-1. En el mtDNA se han descrito, tanto mutaciones individuales, como deleciones en neuronas de la sustancia *nigra* de pacientes con PD (Coskun, Wyrembak et al. 2010 ; Winklhofer and Haass 2010 ; Coskun, Beal et al. 2004). Además, está ampliamente aceptado que esta patología cursa con una disfunción mitocondrial ligada al aumento de la producción de daño oxidativo, un factor determinante en ésta y otras patologías neurodegenerativas (Lopez-Gallardo, Iceta et al. 2011). Esta disfunción mitocondrial puede ser debida tanto a mutaciones adquiridas, como a mutaciones heredadas en el mtDNA. De hecho, en algunos de los casos estudiados se ha mostrado una preponderancia de herencia materna, consistente con herencia mitocondrial (Swerdlow, Parks et al. 1996). De este modo, un pedigrí de enfermos con signos de parkinsonismo ha sido asociado a la mutación de LHON m.11778G>A (Simon, Pulst et al. 1999). De igual modo, en otro pedigrí portador de la mutación en *MT-RNR1 m.1095C>T*, se observaron signos de parkinsonismo (Thyagarajan, Bressman et al. 2000). Estas mutaciones no son muy frecuentes en la población. Sin embargo, otros polimorfismos con efectos más suaves han sido definidos como factores de susceptibilidad a la PD. Un ejemplo es el polimorfismo del mtDNA en el *MT-TQ* (tRNA-Glutamina), m.4336T>C, que define el subhaplogrupo H5, sobrerrepresentado en enfermos de PD, frente a controles en distintas poblaciones europeas (Egensperger, Kosel et al. 1997; Otaegui, Saenz et al. 2004; Huerta, Castro et al. 2005). De forma similar, en un estudio de población irlandesa, se observó una mayor frecuencia de la transición en *MT-ND1 m.4216T>C* en pacientes de PD (Ross, McCormack et al. 2003). Esta variante

define el clado mitocondrial JT, pero también el subhaplogrupo H10. En población Tatar de Rusia también se ha asociado el haplogrupo H con un incremento de la incidencia del PD, tras estudiar una cohorte de 157 pacientes frente a 183 controles (Khusnutdinova, Gilyazova et al. 2008).

Frente a estos análisis, otros investigadores han encontrado que determinados fondos genéticos mitocondriales ejercen un efecto protector frente a la enfermedad, es decir, disminuyen la incidencia de ésta. Así, un análisis de individuos americanos de origen europeo mostró una subrepresentación de los haplogrupos Uk y J en pacientes de PD (van der Walt, Nicodemus et al. 2003). De modo similar, en otros trabajos realizados en población italiana y rusa se observó un efecto protector del haplogrupo Uk (Ghezzi, Marelli et al. 2005; Khusnutdinova, Gilyazova et al. 2008) y en población polaca masculina fue el haplogrupo J el asociado con una baja incidencia (Gaweda-Walerych, Maruszak et al. 2008). Otros autores han asociado el supercluster UKJT con una menor incidencia de PD en población inglesa (Pyle, Foltynie et al. 2005) y cretense (Latsoudis, Spanaki et al. 2008). Curiosamente, los fondos genéticos mitocondriales Uk y J también han sido asociados con un aumento de la penetrancia de las mutaciones primarias de LHON (apartado anterior).

V. CITOCROMO B: DIANA TERAPEÚTICA

El complejo III es una enzima de membrana que cataliza la transferencia de electrones del ubiquinol al citocromo c. Es una proteína dimérica estable. Cada uno de sus monómeros está formado por 11 subunidades (Crofts, Barquera et al. 1999). Una de ellas, el citocromo b, está codificada en el mtDNA y forma parte del núcleo catalítico del complejo e incluye los centros Qi y Qo (Saraste 1999).

V.1 Citocromo b como diana terapéutica en tratamientos antifúngicos y antiparasitarios

Los dos sitios catalíticos del complejo III son dianas farmacológicas de una amplia gama de inhibidores que son estructuralmente similares a las quinonas y

tienen aplicaciones en medicina y agricultura. Estos inhibidores actúan interrumpiendo el bombeo de protones al espacio intermembranal y bloquean el paso de los electrones a través del complejo (Gomez-Duran, Pacheu-Grau et al. 2011).

Entre los inhibidores clásicos del CIII encontramos, a nivel del centro Qi, el antibiótico natural antimicina A y, a nivel del Qo, la estigmatelina y el mixotiazol (Figura III.3). Todos ellos han sido utilizados en experimentación desde hace décadas (Crofts, Guergova-Kuras et al. 1999; Esser, Quinn et al. 2004). Sin embargo, son muy tóxicos, tanto para humanos como para otros organismos, y no pueden utilizarse con fines terapéuticos (Barton, Fisher et al., 2011). Así, tras años de investigación, se han generado nuevos antagonistas del ciclo Q, menos tóxicos, cuyo uso se ha hecho extensivo en los últimos tiempos. Un ejemplo son las estrobilurinas, inhibidores del centro Qo, ampliamente utilizados en agricultura.

Las estrobilurinas son pesticidas de origen natural producidos por diferentes basidiomicetes. Un ejemplo es la estrobilurina A, producida por el hongo *Strobilurus tenacellus* (Anke, Oberwinkler et al. 1977). Las estrobilurinas actúan bloqueando la respiración de los agentes patogénicos a nivel del Qo. Presentan su acción sobre el parásito pero no sobre el hospedador (Bartlett, Clough et al. 2002). Hoy en día constituyen uno de los mejores pesticidas del mercado. Presentan actividad sobre los tres tipos mayoritarios de hongos patógenos gracias a su acción translaminar y antiesporulante. Por ello, son utilizados en control de plagas en infinidad de cultivos como frutas de árbol, cultivos de vegetales y césped (Fisher, Brown et al. 2004). Su uso extensivo ha dado lugar a la aparición temprana de resistencias. Así, en *Mycena galopada*, la mutación G143A otorga resistencia natural. El cambio de glicina a alanina es el responsable de la pérdida del sitio de unión de la droga y por tanto de su acción inhibitoria (Fernandez-Ortuno, Tores et al. 2008).

En terapéutica humana también se han utilizado inhibidores del ciclo Q. Un ejemplo es la atovacuona, un inhibidor del ciclo Q a nivel de Qo utilizado para el tratamiento de la malaria (Radloff, Philipps et al. 1996), la neumonía causada por *Pneumocystis jirovecii* (Kessl, Hill et al. 2004) y la toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*) (Brun-Pascaud, Rajagopalan-Levasseur et al. 1998; Gormley, Pavesio et

al. 1998). El mecanismo de acción de la atovacuona, igual que en el caso de las estrobilurinas, se basa en las diferencias sutiles que hay entre la secuencia del *MT-CYB* del parásito y el hospedador, en este caso, el humano (Figura III. 13).

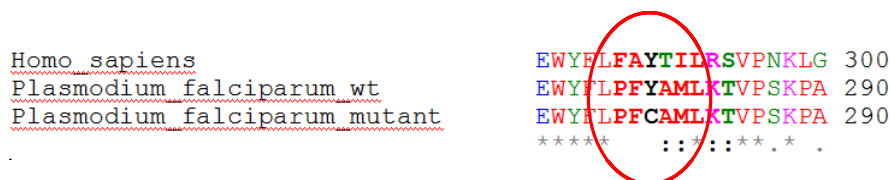


Figura III.13: Secuencias de p.MT-CYB en la diana de unión de la atovacuona. Se muestra la secuencia del humano, del *Plasmodium falciparum* normal (nombrado como wt: del inglés *wild type*) y del *Plasmodium falciparum* mutado (denotado en inglés *mutant*).

En la mayoría de los tratamientos antiinfecciosos, la aparición de mutaciones de resistencia es común. Así, en estudios realizados en pacientes de malaria, que presentaban fallo en el tratamiento con atovacuona, se observó la aparición de una mutación de resistencia en el parásito, el cambio Y268S/p.MT-CYB. Éste provoca la pérdida de un residuo aromático necesario para la estabilización de la unión entre la droga y la diana (Fernandez-Ortuno, Tores et al. 2008). Curiosamente, esta mutación de resistencia, junto con la mutación G143 de *Mycena galopoda* comentada previamente, afecta a sitios importantes de la proteína y da lugar a cambios en la fisiología del organismo (Peters, Chen et al. 2002). De hecho, la mutación de resistencia a la atovacuona en *Plasmodium* Y268S/p.MT-CYB ha sido modelada en levadura. En este organismo, su posición homóloga, el cambio Y279C/p.MT-CYB, da lugar a una alteración en la unión del ubiquinol al sitio Qo y a una caída en la actividad del complejo III de un 50% con respecto al control (Fisher and Meunier 2008). Curiosamente, esa misma mutación ha sido descrita en humanos en un paciente con fallo multisistémico. Se trata del cambio Y278C/p.MT-CYB (Wibrand, Ravn et al. 2001).

De este modo, diferencias intraespecíficas en los sitios Q de parásitos y otros microorganismos tienen un coste energético y fisiológico *per se* y producen cambios en la respuesta a diferentes medicamentos. Es necesario cuestionarse a cerca de la existencia de esta variación en el *MT-CYB* humano. Además, en caso de existir deberíamos conocer si presenta efecto fenotípico. Por otra parte, si esto fuera así, surgirían muchas cuestiones como: ¿Cuáles son los mecanismos moleculares?, ¿son susceptibles de ser modificados?, ¿podría ser utilizada en medicina personalizada?,...etc.

V.2 Variación genética humana en los sitios de unión del CoQ en el *MT-CYB*

El gen que codifica para el citocromo b humano consta de 1141 bp (380 aa), aproximadamente un 7% de todo el genoma mitocondrial. En él, se han descrito muchas mutaciones. De hecho, un análisis de más de 3500 secuencias de mtDNA humano ha revelado que 124 (32,6%) de sus 380 aminoácidos son sitios polimórficos y 52 (28,3%) de los 184 aminoácidos que forman parte de los sitios de unión del coenzima Q [Qi, 15-40 and 190-239 (Gao, Wen et al. 2003); Qo, 120-182 and 250-294 (Gao, Wen et al. 2002)] son también variables. Muchos de esos polimorfismos en los sitios de unión del coenzima Q han sido encontrados en un número pequeño de individuos. Sin embargo, otros definen importantes haplogrupos. Como ejemplo, el cambio A229T define el haplogrupo africano L0a y el asiático M30, el cambio A193T el haplogrupo asiático G1 y en Europa, los cambios H16R, F18L y L236I definen los haplogrupos U5a, Uk y J1c y JT, respectivamente. (Figuras III.14).

Paralelamente, en el sitio catalítico Qo, el cambio A122T caracteriza el haplogrupo africano L2bc, G251S define el asiático G, y en Europa, T158A y D171N marcan los haplogrupos U5a1 and J2, respectivamente. De este modo, si simplemente sumamos las frecuencias de las filogenias europeas definidas por cambios en el citocromo b, podremos comprobar que más del 25% de ellos se encuentra definido por cambios en esta proteína (Montiel-Sosa, Ruiz-Pesini et al. 2006; Richard, Pennarun et al. 2007). Lo que se traduce en que la cuarta parte de la población europea presenta polimorfismos en los sitios de unión del coenzima Q en el citocromo b (Figura III.14) (Gomez-Duran, Pacheu-Grau et al. 2011).

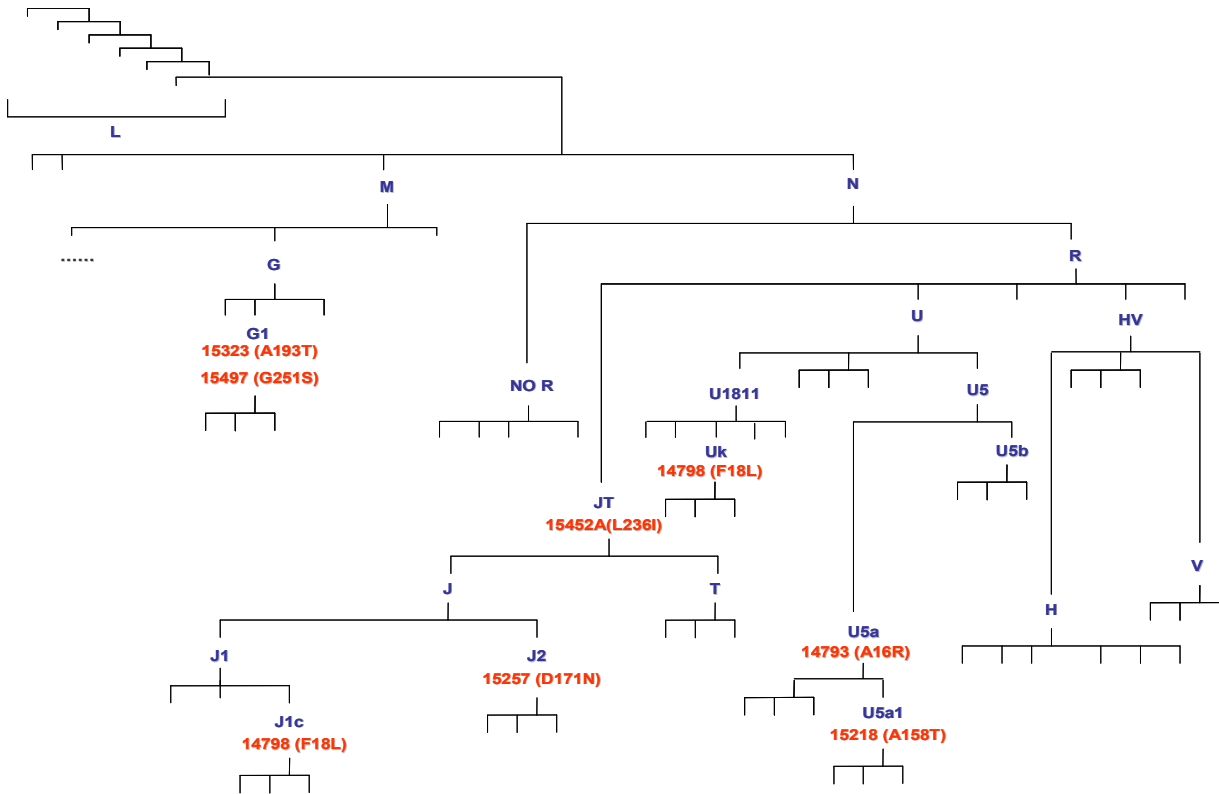


Figura III.14: Árbol filogenético del mtDNA. Filogenias del mtDNA importantes definidas por cambios en sitios de unión del coenzima Q en el citocromo b.

En consecuencia, podemos responder a la primera cuestión afirmativamente, sí existe variación en el *MT-CYB* humano y además, esa variación parece tener importancia. Por ende, el siguiente paso será observar si esa variación presenta efecto fenotípico.

Tras el estudio y análisis del árbol filogenético construido a partir de más de 3500 secuencias de mtDNA y del alineamiento de 276 secuencias de citocromo b de especies de mamíferos, se ha observado que el citocromo b presenta menos variación en los sitios de unión del coenzima Q que en el resto de la proteína. Además, las posiciones en esos lugares de la proteína están más conservados que los que se encuentran fuera de ellos (Gomez-Duran, Pacheu-Grau et al. 2011). Este dato podría indicar un aumento de la selección negativa en estas zonas proteicas. Teniendo en cuenta que selección implica efecto a nivel fenotípico, es posible que mutaciones en los sitios de unión del CoQ en el citocromo b tengan efectos fenotípicos en humanos. Además, la importancia de los centros catalíticos del ciclo Q se pone de manifiesto tras la observación de las mutaciones patológicas descritas en este gen, donde siete de las nueve

mutaciones se encuentran localizadas en sitios Q (Qi- G34S, S35P; Qo- S151P, G166E, G251D, Y278C, G290D) (Wong, 2007), y afectan posiciones altamente conservadas. Sin embargo, esas mutaciones muy patológicas son eliminadas rápidamente de la población, y su frecuencia por tanto es muy baja.

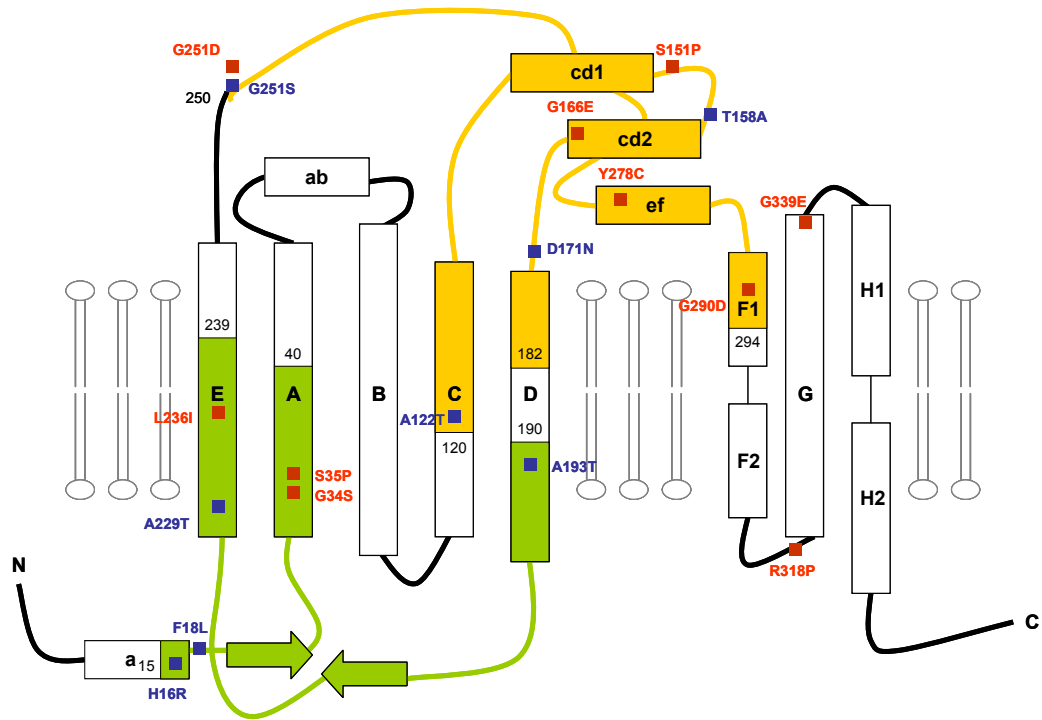


Figura III.15: Estructura y variación genética en el citocromo b. Los sitios de unión del CoQ, el Qi en color verde, el Qo en mostaza. Las mutaciones patológicas descritas se muestran en rojo, y los polimorfismos poblacionales en azul.

Frente a las mutaciones patológicas, el análisis poblacional del citocromo b ha revelado que mutaciones en esta proteína parecen estar asociadas a las temperaturas en las distintas partes del globo (Mishmar, Ruiz-Pesini et al. 2003), y se ha postulado el papel de la selección positiva en esta variación (Ruiz-Pesini, Mishmar et al. 2004; Montiel-Sosa, Ruiz-Pesini et al. 2006). Por tanto, diferentes condiciones medioambientales, como el clima, pudieron dar paso a la selección de determinados genotipos. Así, haplogrupos definidos por cambios en el citocromo b, como el que define el haplogrupo U5a, son más comunes en el norte de Europa (Achilli, Rengo et al. 2005; Montiel-Sosa, Ruiz-Pesini et al. 2006). Por lo tanto, aquellos haplogrupos que se han adaptado a diferentes condiciones climáticas deberían tener diferentes capacidades OXPHOS y por tanto variable susceptibilidad a diversos fenotipos. Tal y como se ha visto anteriormente, numerosos estudios epidemiológicos han mostrado la susceptibilidad de los

haplogrupos J y Uk a la enfermedad de LHON (Brown, Sun et al. 1997; Hofmann, Bezold et al. 1997; Lamminen, Huoponen et al. 1997; Torroni, Petrozzi et al. 1997; Reynier, Penisson-Besnier et al. 1999; Brown, Starikovskaya et al. 2002; Sudoyo, Suryadi et al. 2002; Carelli, Achilli et al. 2006; Shafa Shariat Panahi, Houshmand et al. 2006; Tharaphan, Chuenkongkaew et al. 2006; Hudson, Carelli et al. 2007; Ji, Zhang et al. 2008), la protección de estos haplogrupos frente al PD (van der Walt, Nicodemus et al. 2003; Ghezzi, Marelli et al. 2005; Khusnutdinova, Gilyazova et al. 2008; Gaweda-Walerych, Safranow et al. 2010) y su sobrerrepresentación en ancianos (De Benedictis, Rose et al. 1999; Rose, Passarino et al. 2001; Niemi, Hervonen et al. 2003). Además, la mutación G251S que define el haplogrupo G1 ha sido asociada con obesidad en población japonesa (Okura, Koda et al. 2003).

Los estudios expuestos hasta el momento parecen indicar que la variación en el citocromo b humano da lugar a efectos fenotípicos. Por tanto, comprobar el mecanismo molecular y definir las variables responsables es fundamental. Además, otro punto importante sería ver si la variación es susceptible de ser modificada y si podría utilizarse para medicina individualizada.

V.3 Modificación de la eficiencia de acoplamiento OXPHOS

Como se ha comentado previamente, el citocromo b contribuye a generar el gradiente electroquímico, utilizado para muchas funciones además de la síntesis de ATP. Muchas de ellas determinadas por la eficiencia de acoplamiento. Por tanto, es posible que las mutaciones en el citocromo b afecten al bombeo de protones y con ello a la eficiencia de acoplamiento, ya sea disminuyendo el bombeo de protones por electrón transportado o favoreciendo el paso de protones a la matriz por vías diferentes al complejo V (Skulachev 2004). En cualquiera de estos casos se observaría una disminución del gradiente electroquímico y, por tanto, una caída en la síntesis de ATP, un aumento en la producción de calor y un descenso en la producción de ROS. Así, individuos con mutaciones “desacoplantes” en el citocromo b serían más susceptibles a sufrir patologías como LHON. Además, el hecho de liberar más calor facilitaría la supervivencia de estos en climas fríos y una menor producción de especies reactivas de oxígeno los protegería frente a enfermedades muy dependientes del estrés oxidativo

como las enfermedades asociadas a la edad (Coskun, Wyrembak et al. 2011 ; Lopez-Gallardo, Iceta et al. 2011 ; Montiel-Sosa, Ruiz-Pesini et al. 2006).

De esta forma, una modificación de la eficiencia de acoplamiento parece buena vía farmacológica para el tratamiento de enfermedades asociadas al daño oxidativo, como las enfermedades debidas a mutaciones en el mtDNA o las asociadas a la edad.

Hasta el momento, el único desacoplante que ha sido utilizado en clínica humana ha sido el 2,4-p-dinitrofenol (DNP). El DNP es un ácido hidrofóbico débil con carga negativa deslocalizada. En la mitocondria, el DNP en forma aniónica es protonado en el espacio intermembranoso, de ahí pasa a la matriz donde es desprotonado, generando el DNP en forma aniónica, que pasa de nuevo al espacio intermembranal. En este ciclo el DNP rompe el gradiente de protones, aumenta la velocidad de transporte electrónico y el consumo de sustratos, y disminuye la producción de daño oxidativo.

El efecto del DNP sobre la producción de ROS puede ser beneficioso en el tratamiento de patologías que cursen con daño oxidativo. Así, el uso de DNP disminuye el daño oxidativo y aumenta la esperanza de vida en *Saccharomyces cerevisiae* (Barros, Bandy et al. 2004). La adición de DNP a la mezcla alimentaria de larvas de *Drosophila melanogaster* aumenta la esperanza de vida de las moscas (Padalko 2005). En ratón, el tratamiento con DNP disminuye los niveles de ROS y aumenta la longevidad (Gomez-Duran, Pacheu-Grau et al. 2011).

A principios de los años 30, el DNP fue ampliamente utilizado para la disminución de peso en humanos (Harper, Green et al. 2008). Su efectividad fue muy alta, sin embargo su índice terapéutico es muy pequeño y dio lugar a daños irreversibles (Colman 2007).

La observación previa de los beneficios de modificar la eficacia de acoplamiento, puede tener consecuencias terapéuticas importantes. Sin embargo el DNP no es un candidato idóneo por su alta toxicidad. La búsqueda de nuevos fármacos más seguros y más selectivos podría constituir una importante herramienta como tratamiento de muchas patologías. Sin embargo, si se pretende conseguir una modificación genético-selectiva en humanos, el uso de

animales es un factor limitante, debido a las diferencias genéticas. Así, una técnica muy utilizada y valiosa son las líneas cíbridas transmitocondriales.

VI. LÍNEAS CÍBRIDAS TRANSMITOCONDRIALES

La generación de modelos celulares para el estudio de un determinado mtDNA en mamíferos está frenada por la imposibilidad de transformar sus mitocondrias y, por tanto, de realizar mutagénesis dirigida. En levaduras, como *Saccharomyces cerevisiae*, sí se han introducido mutaciones en el mtDNA (Bayona-Bafaluy, Fernandez-Silva et al. 2002). Sin embargo, en humanos, hasta el momento, sólo una técnica ha permitido el estudio de un determinado mtDNA, las líneas celulares cíbridas citoplasmáticas, también denominados líneas cíbridas transmitocondriales, cíbridos o híbridos citoplasmáticos (King and Attardi 1989; Chomyn, Lai et al. 1994).

Los cíbridos brindan la oportunidad de estudiar un determinado mtDNA frente a un nDNA fijo. Para su construcción, se necesita una línea carente de mtDNA, denominadas rho⁰ (King and Attardi 1989; Hayashi, Ohta et al. 1991; Bodnar, Cooper et al. 1993; King and Attardi 1996; Miller, Trimmer et al. 1996), que se fusiona bien con citoplastos enucleados (King and Attardi 1989) o bien con plaquetas potadoras de los mtDNA de estudio (Chomyn, Lai et al. 1994) (Figura III.17). De este modo, utilizando la misma línea rho⁰ y diferentes diferentes donantes de mtDNA, se obtienen líneas celulares que comparten el mismo fondo genético nuclear y las mismas condiciones ambientales de crecimiento y entre ellos, la única diferencia entre ellos será el mtDNA. Así, las diferencias fenotípicas serán debidas necesariamente a los mtDNAs que contienen.

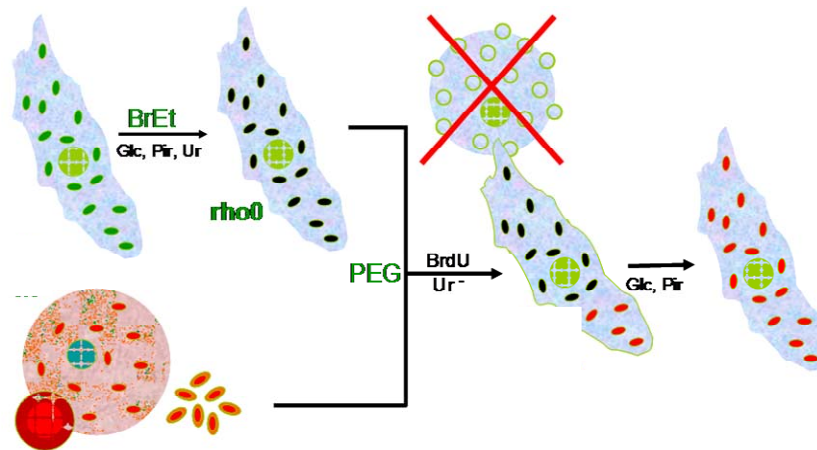


Figura III.17: Construcción de líneas celulares híbridas. Después de eliminar el mtDNA de la célula se obtienen las células rho⁰. Las líneas celulares rho⁰, en este caso 143B, se fusionan con citoplastos enucleados o plaquetas tras incubación en PEG. Tras un período de selección de 21 días se obtienen líneas celulares híbridas con el mtDNA objeto de estudio.

Esta metodología ha sido utilizada con distintos fines desde entre los que se incluyen: El estudio fenotípico de mutaciones en el mtDNA (Hayashi, Ohta et al. 1991; Trounce, Neill et al. 1994; Vergani, Martinuzzi et al. 1995; Brown, Allen et al. 2001; D'Aurelio, Pallotti et al. 2001) y la compatibilidad mtDNA-nDNA entre especies (Bayona-Bafaluy, Muller et al. 2005). Sin embargo, aunque su uso ha proporcionado gran cantidad de información, muchas son sus limitaciones como la heterogeneidad de sus cromosomas, su aneuploidía, los métodos utilizados para su selección con agentes mutagénicos, o la extrapolación al organismo de la relación entre el genotipo-fenotipo del mtDNA a nivel celular (Swerdlow 2007).

V.1 Modelo de híbridos para estudio de Parkinson

La transferencia del mtDNA de pacientes de patologías neurodegenerativas, que cursan con disfunción mitocondrial, a células rho⁰ ha brindado grandes avances en el conocimiento de estas enfermedades. Por ejemplo, la transferencia de mtDNAs de pacientes de PD a líneas rho⁰ demostró que la caída en la actividad del CI tenía un origen mitocondrial (Swerdlow, Parks et al. 1996; Swerdlow, Parks et al. 2001; Esteves, Domingues et al. 2008).

El uso de líneas híbridas transmitocondriales ha permitido evidenciar, entre otros, la existencia de una potencial herencia matrilineal del riesgo a padecer la enfermedad (Swerdlow, Parks et al. 1998). En la siguiente tabla se

muestra una recopilación de las evidencias fenotípicas obtenidas mediante el uso de líneas híbridas transmitocondriales que sustentan la participación del mtDNA en la enfermedad de Parkinson (Lopez-Gallardo, Iceta et al. 2011 ; Swerdlow 2007).

PATOLOGIA	FENOTIPO	FONDO NUCLEAR	REFERENCIA	
PD	Disminución de la actividad del CI	SH-SY5Y	(Swerdlow, Parks et al. 1996; Gu, Cooper et al. 1998; Swerdlow, Parks et al. 1998)	
		A549	Shults, 1998	
		NT2	(Esteves, Domingues et al. 2008)	
	Herencia matrilineal	SH-SY5Y	(Swerdlow, Parks et al. 1998)	
	Disminución del ATP	SH-SY5Y	(Esteves, Domingues et al. 2008)	
	Disminución del MIMP		(Trimmer, Swerdlow et al. 2000)	
	Aumento de ROS		(Cassarino, Fall et al. 1997; Swerdlow, Parks et al. 1998; Esteves, Arduino et al. 2009)	
	Aumento de expresión de enzimas antioxidantes		(Cassarino, Fall et al. 1997)	
	Niveles reducidos de glutatión		(Onyango, Tuttle et al. 2005)	
	Aumento de expresión de genes antiapoptóticos Bcl2 y Bcl-XL		(Veech, Dennis et al. 2000)	
	Alteraciones en metabolismo del calcio		(Sheehan, Swerdlow et al. 1997)	
	Aumento de susceptibilidad al MPP+		(Swerdlow, Parks et al. 1996)	
	Alteraciones de la estructura mitocondrial		(Trimmer, Swerdlow et al. 2000)	
			(Trimmer, Borland et al. 2004)	
	Aparición de agregados de α -sinucleína		NT2	(Esteves, Arduino et al. 2009)
	Aumento de la respiración filtrante y disminución de la desacoplada			(Esteves, Arduino et al. 2010)
	Proteína β -amiloide elevada			

Tabla III.5 Recopilación de trabajos realizados en líneas híbridas transmitocondriales en PD. Las siglas NT2, SH-SY5Y y A549 designan los fondos genéticos nucleares utilizados, que corresponden a; teratocarcinoma, neuroblastoma y carcinoma de pulmón, respectivamente.

V.2 Modelo de cíbridos para el estudio de variantes genéticas poblacionales del mtDNA

El modelo de cíbridos transmitocondriales fue desarrollado para el estudio de mutaciones claramente patológicas en el mtDNA (Hayashi, Ohta et al. 1991). Sin embargo, su uso en análisis de caracterización fenotípica de fondos genéticos mitocondriales utilizando mtDNAs de individuos sanos son limitados.

La primera aproximación al estudio de fondos genéticos mitocondriales normales data de 2002. Carelli *et. al* construyeron líneas celulares portadoras de mtDNAs de individuos sanos pertenecientes a los haplogrupos H, J, T y X. Contando con una única línea por haplogrupo mitocondrial, y sin atender a la existencia de cualquier mutación individual con posible efecto fenotípico en el mtDNA de los mismos, determinaron varios parámetros mitocondriales. El análisis del tiempo de doblaje, el consumo de oxígeno y la actividad de la citocromo c oxidasa no reveló diferencias entre los fondos genéticos mitocondriales (Carelli, Vergani et al. 2002).

Años más tarde, otro grupo trató de evidenciar a nivel celular y molecular la postulada selección de las variantes del mtDNA por factores climáticos (Mishmar, Ruiz-Pesini et al. 2003; Ruiz-Pesini, Mishmar et al. 2004). Sin tener en cuenta los genes más afectados en dicha selección, ni las posibles variantes responsables, llevaron a cabo la construcción de 3 líneas celulares “árticas”, de los haplogrupos A, C y D y 3 líneas celulares pertenecientes a fondos genéticos “tropicales”, representados por los haplogrupos L1, L2 y L3, siguiendo así un criterio estrictamente climático-geográfico. Determinaron varios parámetros OXPHOS como el consumo de oxígeno por célula y el potencial de membrana mitocondrial. No encontraron diferencias entre ambos grupos (Amo and Brand 2007). Ese mismo grupo, un año más tarde, realizó una caracterización de los haplogrupos H y T. Estos haplogrupos habían mostrado diferencias en la funcionalidad OXPHOS en el modelo de espermatozoides humano (Ruiz-Pesini, Lapena et al. 2000; Montiel-Sosa, Ruiz-Pesini et al. 2006). Para la caracterización de las filogenias utilizaron 3 líneas celulares por haplogrupo, construidas con el fondo genético nuclear de carcinoma de pulmón A549. Tras la determinación del consumo de oxígeno y el potencial de membrana mitocondrial. No obtuvieron

diferencias significativas entre las filogenias analizadas en ninguno de los parámetros estudiados (Amo, Yadava et al. 2008).

Frente a estos trabajos, un grupo japonés sí demostró el efecto de los polimorfismos que definen los macrohaplogrupos N y M. Para ello, llevaron a cabo la caracterización de un total de 35 líneas celulares en el fondo nuclear de osteosarcoma 143B. Tras la secuenciación completa de la molécula del mtDNA de cada una de las líneas celulares, analizaron la influencia de los polimorfismos que definen los macrohaplogrupos N y M (los cambios m.10398A>G y m.8701G>A, respectivamente) sobre varios parámetros mitocondriales. Pudieron concluir, que aquellas líneas celulares con la combinación de polimorfismos 8701A/10398A, presentaban menor pH en la matriz y mayores niveles de calcio citosólicos, que aquellos cuyo mtDNA venía definido por las posiciones 8701G/10398G (Kazuno, Munakata et al. 2006). Además, curiosamente cuando trataban con valproato esas líneas celulares observaban un efecto diferencial entre ambos haplogrupos. Así, las líneas celulares definidas por la combinación 8701A/10398A, que originariamente presentaban menor pH en la matriz y mayores niveles de calcio, veían reducidos en mayor medida sus niveles de calcio que aquellos cuyos niveles de calcio citosólicos originales eran menores (Kazuno, Munakata et al. 2007).

Otros estudios en líneas híbridas de osteosarcoma 143B han confirmado una diferencia en la expresión de las proteínas de choque térmico (HSP, del inglés, *Heat shock proteins*) 60 y 75 en líneas celulares del haplogrupo H (Bellizzi, Taverna et al. 2009). Ese mismo grupo observó diferencias en los niveles de mRNA de citoquinas entre líneas híbridas pertenecientes al haplogrupo H y J (Bellizzi, Cavalcante et al. 2006).

El grupo del Dr. Wallace utilizando el fondo nuclear Wal-2A encontró que las líneas híbridas del haplogrupo J presentaban mayores niveles de mtDNA. Según Suissa *et. al* tal diferencia venía determinada por la mutación en la región de control m.295C>T, que define el haplogrupo J. Ese cambio da lugar a un aumento en la unión del TFAM, y un aumento en los niveles de mtDNA, pero no de los niveles de transcritos de los genes mitocondriales en las líneas celulares del haplogrupo J con respecto a las pertenecientes al haplogrupo H, que utilizaron como control (Suissa, Wang et al. 2009).

Sumado a éstos, análisis de fondos genéticos mitocondriales en líneas híbridas portadoras de mutaciones patológicas en el mtDNA han evidenciado los efectos fenotípicos de algunos haplogrupos mitocondriales. Sin embargo, no han identificado las variantes responsables. Así, un análisis realizado por la Dra. Ugalde puso de manifiesto que líneas híbridas transmitocondriales de osteosarcoma pertenecientes al haplogrupo J presentan menor velocidad de ensamblaje de los complejos respiratorios (Pello, 2008). De modo similar, se ha visto en líneas híbridas de osteosarcoma portadoras de la mutación m.8993T>G que el fondo genético mitocondrial puede influir en la penetrancia de la mutación, y por tanto en la gravedad del fenotipo (De Aurelio, 2010).

VII.3 Líneas híbridas como modelo de estudio de farmacogenómica y de toxicogenómica

Actualmente no existe ninguna terapia efectiva para la mayoría de las enfermedades mitocondriales, independientemente de su origen. Se ha descrito una serie de indicaciones farmacológicas que permiten paliar la sintomatología, a pero no existe consenso acerca de la eficiencia de éstos. Los tratamientos más comunes incluyen el uso de antioxidantes, de aceptores de electrones y de estimuladores de la biogénesis mitocondrial. Con todo, estas terapias han funcionado sólo en algunos casos (DiMauro, 2011).

Un factor limitante en el estudio de nuevos fármacos para el tratamiento de mitocondriopatías producidas por mutaciones en el mtDNA es la dificultad de extrapolar los resultados de otra especie al humano. Así, una válida para el estudio de este tipo de patologías son las líneas híbridas transmitocondriales.

El uso de esta metodología para el testado de fármacos ha ido en aumento. En los últimos años, el número de trabajos que han utilizado los híbridos transmitocondriales como modelo farmacológico se ha incrementado. Algunos ejemplos se encuentran recogidos en la siguiente tabla.

PATOLOGIA MUTACIÓN	FENOTIPO	REF	TERAPIA	EFEECTO	REF
NARP/LEIGH m.8993T>G	Aumento de ROS Caída síntesis de ATP	(Baracca, Sgarbi et al. 2007)	Selenio	Disminución ROS Aumento ATP	(Wojewoda, Duszynski et al. 2010)
	Caída enzimas antioxidantes	(Matiazzi, 2004)		Aumento enzimas antioxidantes	
	Caída en el contenido de ATP y viabilidad	(Carrozzo, Rizza et al. 2004)	α-cetoglutarato/Aspartato	Mejora cantidad de ATP y viabilidad	(Sgarbi, Casalena et al. 2009)
LHON	Aumento de apoptosis	(Danielson, Wong et al. 2002; Ghelli, Zanna et al. 2003; Zanna, Ghelli et al. 2003)	Glutati3n	Protecci3n frente a apoptosis inducida	(Ghelli, Porcelli et al. 2008)
	Caída de defensas antioxidantes	(Floreani, Napoli et al. 2005)	Estr3genos	Reducci3n de apopt3sis Reduce niveles de ROS y aumenta actividad MnSOD	(Giordano, Montopoli et al. 2010)
LHON m.3460G>A	Aumento ROS Caída glutamato	(Beretta, Mattavelli et al. 2004)	Trolox dUb	Normalizado del transporte de glutamato	(Sala, Trombin et al. 2008)
MELAS m.3243A>G	Niveles de lactato extracelular aumentados	(Pallotti, Baracca et al. 2004)	Idebenona	Disminuci3n niveles de lactato	(Haefeli, Erb et al. 2011)
	Deficiencia en CoQ Autofagia Caída en la actividad I+III	(Cotan, Cordero et al. 2011)	CoQ	Recuperaci3n de niveles normales de actividad I+III y de CoQ	(Cotan, Cordero et al. 2011)
	Caída en la síntesis de proteínas mitocondriales	(Yasukawa, Suzuki et al. 2000)	Bezafibrato	Aumento de la síntesis de mt-proteínas	(Wenz 2009)
MERFF m.8344A>G	(Masucci, Davidson et al. 1995)				

Tabla III.6: Estudios que han utilizado las líneas híbridas mitocondriales como modelo de estudio de nuevas terapias en patologías mitocondriales.

Paralelamente, se ha descrito la importancia del ambiente en este tipo de patologías. Como se ha visto en el desarrollo de esta revisión bibliográfica muchas patologías mitocondriales son modificadas por la interacci3n con endo y exotoxinas (Gomez-Duran, Pacheu-Grau et al. 2011; Lopez-Gallardo, Iceta et al. 2011 ; Pacheu-Grau, Gomez-Duran et al. 2010a ; Pacheu-Grau, Gomez-Duran et al. 2010b). Así, conocer los mecanismos de éstos compuesto y su implicaci3n en las distintas patologías es fundamental.

En concordancia, estudios de las líneas híbridas mitocondriales portadoras de variantes patológicas han demostrado ser una valiosa herramienta para conocer interacciones específicas entre genoma y ambiente (Pacheu-Grau, Gomez-Duran et al. 2011; 2010a; Pacheu-Grau, Gomez-Duran et al. 2010b). Un ejemplo es el trabajo realizado por Ghelli *et al* en líneas híbridas mitocondriales portadoras de mutaciones de LHON m.11778A>G y m.14484T>C, donde se observó que aquellas líneas celulares pertenecientes al haplogrupo J, son más susceptibles de la toxicidad del metabolito del n-hexano, un solvente orgánico (Ghelli, Porcelli et al. 2009). Este resultado confirmaba los resultados de un estudio epidemiológico realizado por el mismo grupo de investigación (Carelli, Franceschini et al. 2007).

IV. Resultados

I. DESARROLLO DE HERRAMIENTAS PREVIAS

Para que un trabajo se pueda realizar correctamente es fundamental partir de una base sólida y contar con las herramientas adecuadas. En consecuencia, el primer bloque de resultados, o más bien de pre-resultados de esta tesis doctoral, conforma una breve explicación de las medidas previas que adoptamos para la construcción y análisis de nuestras líneas híbridas mitocondriales.

Uno de los objetivos fundamentales de este trabajo es encontrar diferencias fenotípicas entre las variantes poblacionales del mtDNA, es decir, diferencias entre “personas sanas”. Una gran parte de las técnicas utilizadas en el desarrollo de este trabajo fueron validadas estadísticamente con el fin de trabajar dentro de unos límites de calidad establecidos. Los resultados de dichos ensayos y el estudio de las condiciones óptimas de cultivo se encuentran escuetamente explicados en los siguientes apartados y en el capítulo de material y métodos.

I.1 Análisis poblacional

Para la caracterización fenotípica de las variantes genéticas del mtDNA restringidas a la zona europea, como primer paso, realizamos la clasificación genética de una muestra de población española. Se utilizaron dos métodos distintos y complementarios: Una clasificación estandarizada mediante PCR-RFLP ((Ruiz-Pesini, Lapena et al. 2000) y la secuenciación de la región de control (Macaulay, Richards et al. 1999).

A. Clasificación por haplogrupos

Se llevó a cabo la extracción de 145 muestras de DNA. De ellas, 125 fueron haplogrupadas y subhaplogrupadas. Algunas de ellas han sido publicadas como muestras control (Rhouda, Martínez-Redondo et al. 2009). Los resultados obtenidos se encuentran recogidos en la tabla A.1 de los anexos y en la tabla IV.1 expuesta a continuación;

	Nuestro estudio (125)	Población española (686)
H	56,3	47,1
J	7,6	8,9
T	4,2	6,9
U	18,5	22,6
O	13,4	14,5

Tabla IV.1: Distribución de haplogrupos en la población española y nuestro estudio. Los datos están expresados en % de población. El término O engloba a todos aquellos haplogrupos con baja frecuencia en la población o aquellos que no se han podido incluir en ninguno de los otros grupos.

No existieron diferencias ($\chi^2=3,9$, grados de libertad=4, $p= NS$) entre la distribución de haplogrupos de la población de estudio y la población utilizada como control (Dahmany, 2006). Es decir, nuestra muestra representativa de la población española.

B. Secuenciación de la región de control:

La secuenciación de la región de control se llevó a cabo con varios fines: Obtener información para su clasificación por filogenias o haplogrupos, conocer posibles cambios en esta región dignos de estudios posteriores, y control de posibles mutaciones nuevas que surgieran en nuestras líneas celulares durante el proceso de hibridación (Seibel, Di Nunno et al. 2008).

Los resultados obtenidos se encuentran recogidos en la tabla A.1 de los anexos.

I.2 Cultivos celulares y estado de la línea celular rho⁰

A. Cultivos celulares

Las líneas celulares empleadas en esta tesis doctoral fueron generadas a partir de la línea de osteosarcoma libre de mtDNA rho⁰ -143B-TK-. Como trabajo previo a la construcción de nuestra colección de líneas celulares híbridadas o

“cibridoteca”, varios aspectos fueron tenidos en cuenta con el fin de obtener un protocolo estandarizado para el cultivo de estas líneas celulares.

A.1 Estudio del suero fetal bovino. Activación-inactivación

La inactivación del suero a 56°C durante 30 minutos es una práctica muy utilizada en los laboratorios de cultivo celular. Su fin es inactivar los posibles inhibidores del crecimiento celular en cultivo e inhibir las posibles reacciones del sistema del complemento.

Llevamos a cabo un análisis del crecimiento de una línea celular cíbrida con suero activado e inactivado para observar la influencia de la activación-inactivación del FBS sobre el crecimiento de los cultivos celulares. Paralelamente, realizamos el análisis de la influencia de la diálisis y la cantidad del FBS en el medio de cultivo sobre el crecimiento celular.

Se sembraron 10.000 células por triplicado en ocho combinaciones diferentes de medio;

- FBS dializado:

- al 5% inactivado y sin inactivar
- al 10% inactivado y sin inactivar

- FBS sin dializar:

- al 5% activado y sin inactivar
- al 10% activado y sin inactivar

Pasados cinco días se procedió al recuento celular de cada condición estudiada. No existían diferencias significativas entre ninguna de las condiciones ensayadas, tal como se puede apreciar en la figura IV.1. Por lo tanto, decidimos utilizar el medio al 5% de FBS sin dializar y sin inactivar como medio de cultivo estandarizado.

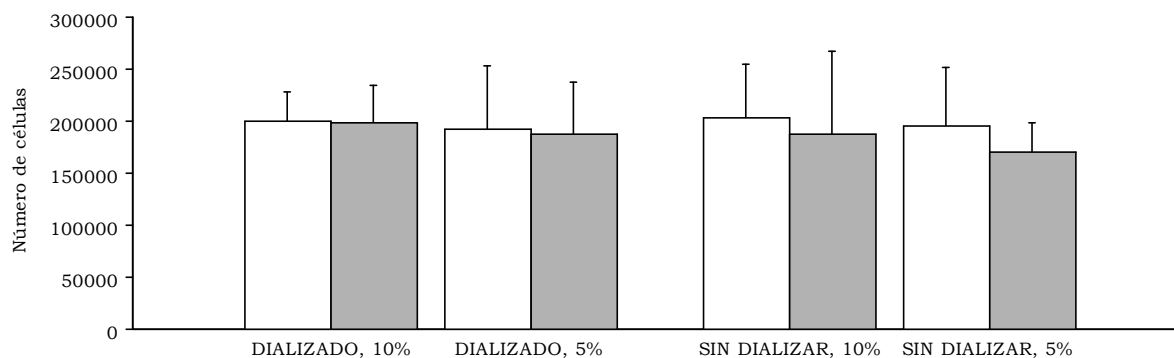


Figura IV.1: Recuento celular tras 5 días de cultivo para estudio del efecto de la activación e inactivación del FBS. Las barras en blanco representan el FBS inactivado, las barras en gris el FBS sin inactivar. Inactivado: 10%-Dializado: $2,0 \times 10^5 \pm 28284,3$ (2); 10%- Sin dializar: $2,0 \times 10^5 \pm 51074,4$ (2), 5%-Dializado: $1,9 \times 10^5 \pm 60104,1$ (2), 5%- Sin dializar: $1,9 \times 10^5 \pm 56789,0$ (3). Normal: 10%- Dializado: $2,0 \times 10^5 \pm 37170,9$ (3), 10%- Sin dializar: $1,9 \times 10^5 \pm 80039,6$ (3), 5%- Dializado: $1,9 \times 10^5 \pm 49898,2$ (2), 5%- Sin dializar: $1,7 \times 10^5 \pm 27771,5$ (3). Los datos se muestran como $x \pm SD$ (n° de ensayos).

A.2 Composición del medio de cultivo

La composición del medio de cultivo de las líneas celulares derivadas de la línea rho⁰-143B varía mucho en la literatura. Por ejemplo, la concentración de la glucosa va de 25 mM (Hao and Moraes 1997; Floreani, Napoli et al. 2005) a 5 mM (D'Aurelio, Pallotti et al. 2001; Danielson, Carelli et al. 2005; Vives-Bauza, Gonzalo et al. 2006). Otro ejemplo es la concentración de piruvato, que varía de 1 mM (Danielson, Wong et al. 2002; Danielson, Carelli et al. 2005; Li, Zhang et al. 2005; McKenzie, Liolitsa et al. 2007; Pello, Martin et al. 2008) a 5 mM (Ghelli, Zanna et al. 2003; Zanna, Ghelli et al. 2005).

El fin de nuestro estudio es evaluar los pequeños efectos de las variantes genéticas del mtDNA, por lo tanto, la composición del medio de cultivo óptima para este fin será aquella que mejor evidencie los fenotipos más dependientes del sistema OXPHOS. De este modo, la concentración de la fuente de azúcar seleccionada para nuestro medio de cultivo fue la de 5 mM, tanto en glucosa, como en galactosa. Sin embargo, en el caso del piruvato llevamos a cabo una determinación de la influencia de la concentración de éste sobre el crecimiento celular.

Para el análisis, se determinó el tiempo de doblaje (DT) en cuatro líneas celulares distintas durante 5 días consecutivos de crecimiento. Se realizaron

ensayos tanto en glucosa, como en galactosa, en medio de cultivo suplementado con las dos concentraciones de piruvato más utilizadas en la bibliografía: 1 mM y 5 mM.

Los cultivos celulares cuya fuente de azúcar era la glucosa, es decir, con el sistema OXPHOS “no limitado”, no presentaron una ventaja replicativa significativamente diferente entre ambas concentraciones de piruvato ($DT_{GLU-1mM} = 19,7$ vs. $DT_{GLU-5mM} = 22,3$, $p = NS$). Sin embargo, en los medios de cultivo cuya fuente de azúcar era la galactosa, un azúcar que se metaboliza más lentamente, se observó que una mayor concentración de piruvato parecía conferirles una ventaja replicativa, reflejada en un menor DT ($DT_{GAL-1mM} = 31,0$ vs. $DT_{GAL-5mM} = 27,7$, $p = NS$) (figura IV.2). La concentración de piruvato menor, a su vez, aumentaba la diferencia entre ambas fuentes de azúcar, de forma estadísticamente significativa ($DT_{GLU-1mM} = 19,7$ vs. $DT_{GAL-1mM} = 31,0$, $p = 0,0007$).

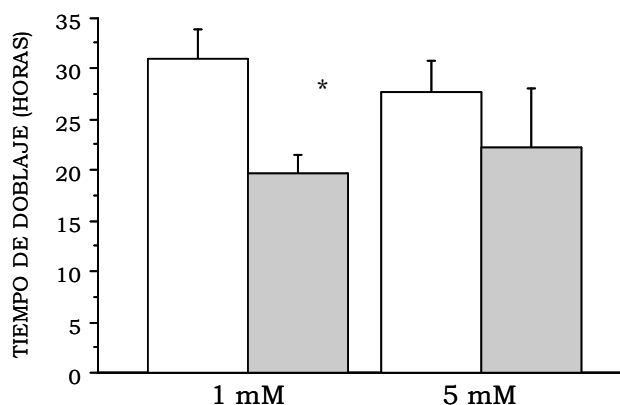


Figura IV.2: Estudio de la concentración de piruvato en el medio de cultivo sobre el tiempo de doblaje. Las barras de color gris representan el medio suplementado con glucosa y el de galactosa está representado en blanco. Tiempo de doblaje (DT) en horas. Glucosa-1mM: $19,75 \pm 1,94$ (4), Galactosa-1mM; $31,04 \pm 2,96$ (4), DT-glucosa vs DT galactosa (1mM) $p = 0,0007$. Glucosa-5mM; $22,26 \pm 5,8$ (4); Galactosa-5mM; $27,65 \pm 3,15$ (4), DT-glucosa vs DT galactosa (5 mM) $p = NS$. Los datos se muestran como $x \pm SD$ (n° de ensayos).

El piruvato es uno de los puntos de entrada al ciclo de Krebs y a la producción aerobia de energía dentro de la mitocondria. Así, una menor cantidad de piruvato haría más dependiente del sistema OXPHOS a las células y por tanto, reflejaría mejor los defectos del mismo. Como nuestro afán es que nuestras líneas celulares crezcan en condiciones OXPHOS-dependientes, la concentración de elección de piruvato fue 1mM.

Así, el medio de cultivo general utilizado en nuestras líneas celulares fue DMEM suplementado con FBS al 5%, 5 mM de glucosa y/o galactosa, en función del parámetro a medir, y 1 mM de piruvato.

B. Estudios de líneas rho⁰

Las células rho⁰ son células carentes de mtDNA que se utilizan como célula huésped del mtDNA objeto de estudio (King and Attardi 1989; Hayashi, Ohta et al. 1991). En consecuencia, la confirmación del estado rho⁰ es muy importante. Para ello, como paso previo a la construcción de nuestra cibridoteca llevamos a cabo la confirmación del estado rho⁰ de nuestra línea aceptora rho⁰-143B a distintos niveles.

B.1 Estudios de ácidos nucleicos

B.1.1 Amplificación de fragmentos de mtDNA

Las células rho⁰ carecen de mtDNA (King and Attardi 1996). Una de las pruebas más utilizadas para verificar su estado rho⁰ por su sencillez y rapidez, es la amplificación de segmentos del mtDNA (Bodnar, Cooper et al. 1993). Así, fragmentos de distintos tamaños fueron amplificados utilizando una línea rho⁺ como control. En ningún caso el DNA de nuestra línea rho⁰ dio lugar a amplificación, como se puede observar en la figura IV.3, donde se muestran dos ejemplos.

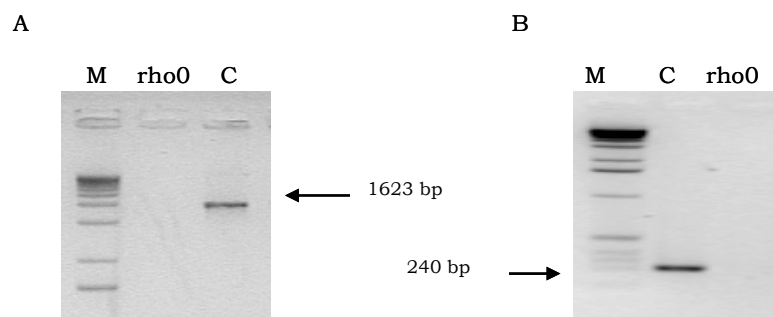


Figura IV.3: Amplificación de fragmentos de mtDNA a partir de DNA de rho⁰.
A. Fragmento grande: 1623 bp. B. Fragmento pequeño: 240 bp. M: marcador de pesos moleculares y C: control.

B.1.2 Determinación de niveles de mtDNA

La determinación de los niveles de mtDNA es otra de las pruebas más utilizadas para constatar la ausencia de éste en las líneas rho⁰ (Bodnar, Cooper et al. 1993). Para ello, realizamos la determinación de la dosis genómica mitocondrial mediante RT-PCR (Marcuello, Gonzalez-Alonso et al. 2005). Todas las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado, en tres experimentos independientes. Los resultados se expresan con diferencia de Cq (ΔCq) entre la amplificación relativa del gen mitocondrial y el nuclear. Se consideró la amplificación del mtDNA control, es decir, el de una línea celular rho⁺, como 100%.

Tal como se puede observar en la siguiente figura, el análisis de la diferencia del gen mitocondrial y el nuclear dió lugar a % negativos en los DNA de las células rho⁰, por la ausencia de amplificación del primero. Esta diferencia fue significativa $p < 0.00001$, pudiendo concluir la ausencia de mtDNA.

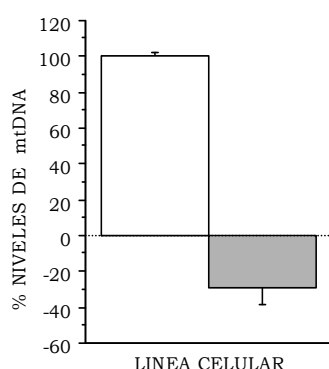


Figura IV.4: Niveles de mtDNA en células rho⁰. El valor de la línea control se ha fijado como 100%. Control (blanco): $100 \pm 2,5\%$ (3), rho⁰: $-28,9 \pm 9,1\%$ (3), $p < 0.0001$.

B.1.3 Determinación de niveles de mtRNAs

Los niveles de los transcritos de los diferentes mtRNA se cuantificaron mediante RT-PCR cuantitativa. Se analizó la cantidad de mRNA de los siguientes genes mitocondriales codificados en el mtDNA: 12S, 16S, ND4-ND4L, ND6, COI, COII, COIII, CYB y ATP6-8. Se utilizó el gen nuclear 18S como gen de referencia.

Los niveles de mtRNAs obtenidos presentaban un valor <1 %, cuando los comparamos con un control rho+ fijado como el 100 %. En la siguiente tabla se muestran los valores para cada gen estudiado.

mtRNA	CONTROL	RHO 0
12S	100,0 ± 3,2 (3)	0,1 ± 0,0 (3)
16S	100,0 ± 2,0(3)	0,8 ± 0,1 (3)
ND4-ND4L	100,0 ± 6,0 (3)	0,2 ± 0,0 (3)
ND6	100,0 ± 4,4 (3)	0,0 ± 0,0 (3)
COI	100,0 ± 21,4 (3)	0,1 ± 0,0 (3)
COII	100,0 ± 3,9 (3)	0,0 ± 0,0 (3)
COIII	100,0 ± 4,2 (3)	0,1 ± 0,0 (3)
CYB	100,0 ± 2,5 (3)	0,0 ± 0,0 (3)
ATP6-8	100,0 ± 1,4 (3)	0,0 ± 0,0 (3)

Tabla IV.2: Niveles de expresión de los mtRNAs. Valores en porcentaje con respecto al cíbrido control. Los datos se expresan en porcentaje ± SD (n° de ensayos).

Como se puede observar en la tabla expuesta anteriormente, ninguno de los transcritos de los genes codificados en el mtDNA dio lugar a amplificación. Este dato indicaba la ausencia de los mismos.

B.2 Estudios de funcionalidad del sistema OXPHOS:

B.2.1 Estudios de crecimiento celular

Las células rho⁰ son auxótrofas para pirimidinas y piruvato, es decir no tienen capacidad de sobrevivir en ausencia de éstos (King and Attardi 1996). Al carecer de mtDNA, no presentan sistema OXPHOS eficiente y obtienen su energía mediante la glicólisis, que requiere grandes cantidades de azúcar. Además, en estas células, la galactosa se metaboliza muy lentamente, por lo que no pueden crecer en medios que sólo contienen este azúcar como sustrato (Robinson, Petrova-Benedict et al. 1992). De esta forma, un estudio metabólico comparativo entre ambos medios constituye una buena forma de caracterizarlas.

Se sembraron 50.000 células por triplicado y pasados 5 días se procedió a su recuento. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes. Se analizó por un lado la capacidad de rho⁰ para sobrevivir en medio con galactosa como fuente

de energía, utilizando el medio en glucosa como control, y por otro la dependencia de pirimidinas, mediante la adición y ausencia de uridina en el medio.

El recuento celular final de cada condición reveló, en primer lugar, que nuestra línea rho⁰ era incapaz de crecer en medio con galactosa como fuente de azúcar, tanto en medio sin uridina, como en medio con uridina, tal y como se puede observar en la siguiente figura. En segundo lugar, el crecimiento en glucosa mostró que era, en efecto, auxótrofa de las pirimidinas. De hecho, únicamente las células cuyo medio estaba suplementado con uridina presentaron capacidad de crecer y multiplicarse (Figura IV.5).

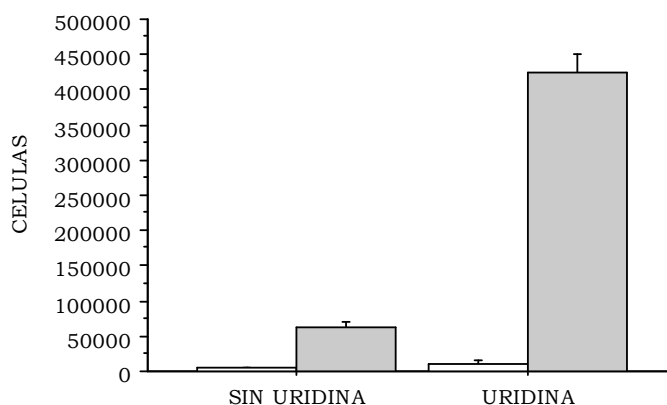


Figura IV.5: Estudio metabólico de las células rho⁰ 143B. Se representa en las barras color gris el crecimiento celular en medio con glucosa, en color blanco el crecimiento celular en medio de galactosa. Glucosa con uridina: 424.000 ± 25238 (3), glucosa sin uridina: 63488 ± 7384 (3), galactosa con uridina: 10639 ± 5273 (3), galatosa sin uridina: 4533,0± 1662 (3). Los datos se muestran como x ± SD (n° de ensayos).

B.2.2 Estudios de actividad de la ETC

Las células rho⁰ carecen de los complejos del sistema OXPHOS cuyas subunidades están codificadas en el mtDNA. De tal forma, una prueba funcional de la carencia de OXPHOS es la determinación de la actividad y la cantidad de alguno de sus complejos (Miller, Trimmer et al. 1996). Se determinó la actividad y la cantidad del complejo IV o citocromo c oxidasa en homogenados totales procedentes de células rho⁰ y de células control rho⁺. Los valores medios de la determinación en las células rho⁺ fueron considerados como 100%. La determinación se llevó a cabo por triplicado.

Tanto la actividad, como la cantidad del complejo IV fueron prácticamente nulas en la línea carente de mtDNA. La cuantificación de éstas mostró que las células rho⁰ casi no tenían actividad, o de cantidad (Figura IV.6). Este valor residual podría ser atribuible a la variación de la técnica.

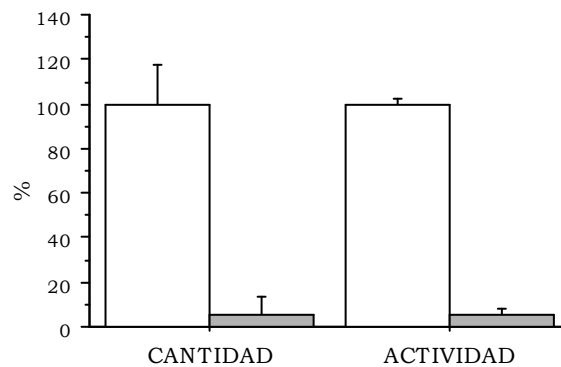


Figura IV.6: Estudio de la cantidad y actividad de la citocromo c-oxidasa.

Las líneas rho⁰ en color gris y la línea celular rho⁺ control en color blanco. El valor de la línea control se ha considerado el 100%. Se muestran los datos relativos a ese 100% en %. Cantidad; C: 100,0 ± 17,9% (3), rho⁰: 5,0 ± 8,7% (3)*. Actividad: 100,00 ± 2,5% (4), rho⁰: 5,72 ± 2,1% (4)*. *p<0,00001. Los datos se muestran como x ± SD (n° de ensayos).

B.2.3 Estudios de consumo de oxígeno en células intactas

El último paso de la cadena de transporte respiratorio es la reducción del oxígeno a agua por parte del complejo IV. Como las líneas rho⁰ no presentan CIV ensamblado, tal y como hemos visto en el apartado anterior, no tienen capacidad de consumir oxígeno de forma dependiente de la ETC (Miller, Trimmer et al. 1996). Otra prueba funcional para comprobación del estado rho⁰, es el estudio de este parámetro.

Se llevó a cabo la determinación del consumo de oxígeno de la línea rho⁰ frente a una línea control (considerada como 100%). Se estudió la respiración endógena, la respiración desacoplada y la respiración no dependiente de la ETC. Tanto la respiración endógena, como la respiración desacoplada, fueron prácticamente nulas en el caso de las líneas rho⁰ (Figura I.7). Sin embargo, el consumo de oxígeno no dependiente de ETC, es decir, no inhibido con cianuro (KCN), fue significativamente mayor (p<0,0001) en las líneas rho⁰ que en la línea

control. El KCN es un inhibidor del complejo IV. Así, al carecer del complejo no se ven afectadas por el tratamiento con su inhibidor.

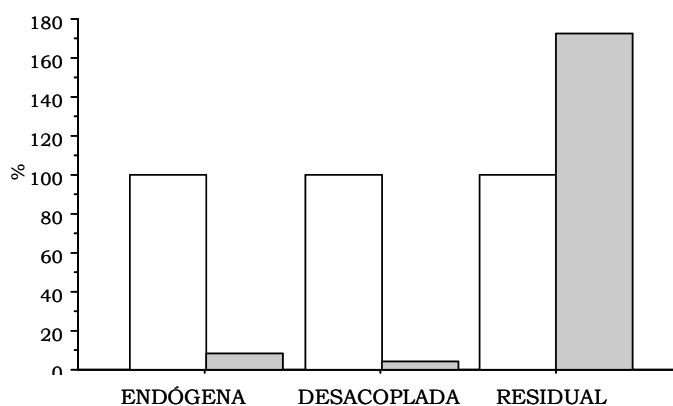


Figura IV.7: Consumo de oxígeno. La línea rho+ control en color blanco y las líneas rho⁰ se muestran en gris. La respiración endógena de la línea celular control se ha considerado el 100%, se muestran los datos relativos en % con respecto al control. Respiración endógena (control: 100 %, rho⁰; 8,57 %), desacoplada (control; 100%, rho⁰: 4,18 %) e inhibida con cianuro (control; 100%, rho⁰; 172,85%).

De esta forma, se constató que nuestras líneasceptoras eran en efecto rho⁰ y se procedió a la construcción y caracterización de la colección de líneas híbridas portadoras de variantes genéticas del mtDNA.

I.3 Modelo de estudio para la caracterización de líneas híbridas mitocondriales portadoras de variantes genéticas poblacionales del mtDNA

El modelo de híbridos mitocondriales fue desarrollado para el estudio de mutaciones en el mtDNA claramente patológicas (Hayashi, Ohta et al. 1991). No obstante, su uso puede no ser óptimo para analizar los efectos fenotípicos de las variantes genéticas de la población, ya que cuestiones técnicas podrían enmascarar las pequeñas diferencias. Para evitar esta problemática varios aspectos han sido tenidos en cuenta.

A. Determinación de la contaminación por *Mycoplasma spp.*

La contaminación por *Mycoplasma spp.* es un problema frecuente en el estudio de cultivos celulares. Las consecuencias de esta contaminación son múltiples y variables. A nivel del sistema OXPHOS se han descrito efectos como la disminución de la tasa de consumo de oxígeno (Gabridge 1975; Darin, Kadhom et al. 2003), respiración resistente a KCN (Koch and Biaglow 1983), el aumento de daño oxidativo (Sun, Xu et al. 2008), etc. Por ello en nuestras líneas celulares se realizó la detección de *Mycoplasma* periódicamente.

B. Secuenciación completa del mtDNA

Los mtDNAs pueden albergar otras mutaciones con efecto fenotípico que no definen los haplogrupos (Gallardo, Moreno-Loshuertos et al. 2006). Estas mutaciones pueden alterar la determinación del efecto funcional de los polimorfismos que definen los haplogrupos. Por lo tanto, a la hora de analizar las variantes genéticas poblacionales del mtDNA, todo el genoma mitocondrial ha de ser secuenciado para descartar la existencia de esas mutaciones (Montoya, Lopez-Gallardo et al. 2009). Las secuencias completas de todas las líneas híbridas se encuentran en las figuras IV.11 y IV.38, y las secuencias de acceso a GenBank en la tabla VII.4.

C. Niveles de mtDNA

Las actividades de los complejos respiratorios del sistema OXPHOS se encuentran bajo un estricto control de los niveles de mtDNA (Rocher, Taanman et al. 2008). Para asegurar que la dosis genómica había llegado a un nivel basal tras el proceso de hibridización, se determinó la cantidad de mtDNA en varios pases de cultivo consecutivos (Figura IV.8). Se observó que, al menos, 25-30 pases eran necesarios para conseguir niveles de estado estacionario. Por ello, todos los experimentos se realizaron una vez las líneas celulares hubieran llegado a su nivel basal.

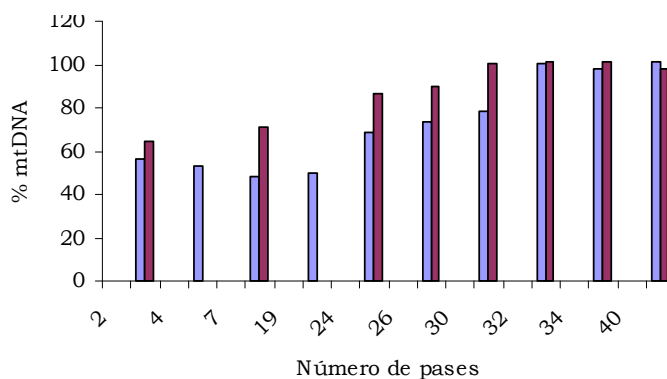


Figura IV.8: Estudio de restablecimiento de los niveles basales de mtDNA en líneas híbridas con los pases de cultivo. Representación en % de los niveles de mtDNA con respecto a la media. Se muestran dos líneas celulares M1 y M2.

D. Medios de cultivo sin antibiótico

La abundancia de grupos amino cargados positivamente en condiciones fisiológicas predestina a los aminoglucósidos a unirse con la carga negativa de los ácidos nucleicos. Así, pueden unirse a la RNasa P e inhibir el procesamiento del RNA; tRNA, rRNA y mRNA, y , en consecuencia inhibir y la síntesis de proteínas (Hermann 2007). Otros antibióticos de uso común en el cultivo celular, como por ejemplo la penicilina, pueden causar una inhibición irreversible del transportador mitocondrial carnitina/acil-carnitina después de un tiempo prolongado de incubación (Pochini, Galluccio et al. 2008). Por lo tanto, para evitar efectos fenotípicos no deseados decidimos crecer nuestras líneas celulares híbridas sin ningún tipo de antibiótico.

E. Nivel de confluencia celular

Algunos parámetros relacionados con las mitocondrias se alteran durante el progreso logarítmico de crecimiento celular (Borghetti, Piedimonte et al. 1980; Prasad, Shopsis et al. 1981; Bird, Yan et al. 2005). Uno de estos parámetros es el consumo de oxígeno que disminuye linealmente a medida que aumenta la densidad celular (Tokuda, Crane et al. 2000). Por lo tanto, es muy importante llevar a cabo los experimentos a un mismo nivel de confluencia. Nosotros elegimos el 80% de confluencia para la realización de nuestros experimentos.

F. Control mutacional de los cultivos

Se ha demostrado recientemente que las líneas híbridas acumulan mutaciones en el mtDNA en los cultivos (Seibel, Steinherz et al. 2008). Para tener una estimación bruta de la tasa de mutación de nuestros cultivos, realizamos una comparación de la región de control del mtDNA de las líneas híbridas y el DNA procedente de la sangre de los donantes. No se encontró ninguna diferencia entre ellas. Además, todas las líneas mitocondriales, excepto una, se han construido utilizando plaquetas de donante con edad comprendida entre los 20 y los 30 años con el fin de evitar posibles mutaciones somáticas que tienden a acumularse con la edad (Michikawa, Mazzucchelli et al. 1999).

I.4 Estudio evolutivo del p.MT-CYB

La idea subyacente, comúnmente aceptada, es que las posiciones conservadas reflejan aminoácidos funcionalmente importantes. Así pues, el índice de conservación (CI, del inglés *Conservation Index*) de una determinada posición en una proteína se calcula como el porcentaje de especies que presentan el aminoácido tipo salvaje (wt, del inglés *Wild Type*) en humanos.

Se llevó a cabo el estudio evolutivo todas las posiciones del p.MT-CYB humano en 276 especies de mamíferos, el valor del CI de cada una de ellas se encuentra en la tabla A.2 de los anexos.

II. ESTUDIO FENOTÍPICO DEL HAPLOGRUPO Uk

El haplogrupo Uk se ha encontrado subrepresentado en pacientes con enfermedad de Parkinson (Ghezzi, Marelli et al. 2005; Maruszak, Gaweda-Walerych et al. 2006; Gaweda-Walerych, Maruszak et al. 2008; Khusnutdinova, Gilyazova et al. 2008) y Alzheimer (Fesahat, Houshmand et al. 2007), comportándose como un factor de resistencia. Al contrario, el haplogrupo H, que representa un 40% de la población europea (Roostalu, Kutuev et al. 2007), está sobre-representado en personas con enfermedades neurodegenerativas, actuando como un factor de susceptibilidad potencial (Huerta, Castro et al. 2005; Khusnutdinova, Gilyazova et al. 2008). Apoyándonos en estas asociaciones, el primer estudio de esta tesis doctoral comprende la caracterización fenotípica de estas dos filogenias europeas.

Para llevar a cabo este estudio, construimos varias líneas híbridas pertenecientes a cada haplogrupo. Teniendo en cuenta que el análisis fenotípico de polimorfismos poblacionales requiere un trabajo muy meticuloso, varias medidas han sido tenidas en cuenta, sumadas a las comentadas en el capítulo anterior.

II.1 Modelo para la caracterización fenotípica de los haplogrupos H y Uk

A. Selección de la muestra

En primer lugar, para evitar efectos clonales, se construyeron 5 líneas celulares por clado. A su vez, dentro de estas filogenias, distintos subhaplogrupos fueron representados, tal y como ocurre en la población general. En el caso del Uk se llevó a cabo la construcción de 2 líneas del subhaplogrupo Uk1 y 3 pertenecientes al Uk2. En el caso del haplogrupo H se construyeron 3 líneas del H1, una del H5 y una del H13.

B. Estudio de los SNPs m.7028C y m.14798T

En segundo lugar comprobamos mediante PCR-RFLP que nuestras líneas híbridas portaban el genotipo mitocondrial de interés. Se eligieron dos SNPs, uno para cada filogenia, y se determinó su presencia y/o ausencia en los DNAs extraídos procedentes de todas las líneas celulares. Las posiciones seleccionadas fueron m.7028C y m.14798T que definen al haplogrupo H y Uk, respectivamente (Torrioni, Petrozzi et al. 1997).

Tal y como se puede ver en la figura a continuación, todas las líneas celulares pertenecientes al haplogrupo H presentaban la posición m.7028C, frente a las del haplogrupo Uk que presentaban la m.7028T. En el caso del cambio m.14798C>T todas aquellas pertenecientes al haplogrupo Uk presentaron la posición m.14798T, al contrario que las pertenecientes al H que presentaron la posición m.14798C.

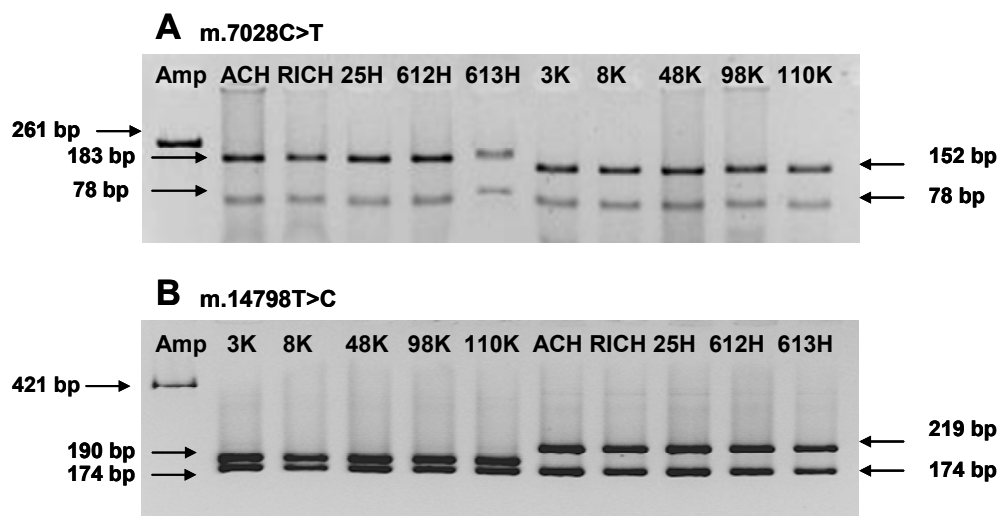


Figura IV.9: Análisis mediante PCR-RFLP del genotipo del mtDNA en las posiciones 7028 y 14798. A) Patrón de bandas de electroforesis para el cambio m.7028C>T. El cambio de C a T crea un nuevo sitio de restricción para la enzima AluI. Se amplificó un fragmento de 261bp que se digirió con la enzima AluI dando lugar a tres fragmentos en las muestras que pertenecen al haplogrupo Uk; 152, 78 y 31 pb, y dos fragmentos en los pertenecientes al haplogrupo H; 183 y 78 pb. El fragmento de 31 pb no se observa en el gel. B) Patrón de bandas de electroforesis para el cambio m.14798T>C. La combinación de un mal emparejamiento en la posición m.14802T>G sumada a la mutación m.14798T>C, que define el haplogrupo Uk, crea un nuevo sitio de restricción para la endonucleasa DdeI. Se amplificó un fragmento de 421 bp que se cortó con la enzima DdeI. Los productos de digestión dieron lugar a cuatro (190, 174, 29 y 28 pb) y tres (219, 174 y 28 pb) bandas, para el haplogrupo Uk y H, respectivamente. Los fragmentos de 29 y 28 pb no se observan en el gel. Amp es la abreviatura de amplicón.

C. Cariotipado de las líneas celulares

La línea celular de osteosarcoma 143B es una línea celular inmortal aneuploide (Hao and Moraes 1997). Por otra parte, las líneas celulares en cultivo a largo plazo pueden cambiar el cariotipo debido no sólo a sus peculiaridades genéticas, sino también a las condiciones de cultivo (Anke, Oberwinkler et al. 1977). De este modo, con el fin de descartar las posibles variaciones en el número de cromosomas que pudieran enmascarar los efectos de las variantes genéticas mitocondriales, se llevó a cabo el cariotipado de todas nuestras líneas híbridas.

Tal y como se había descrito anteriormente, nuestras líneas celulares fueron aneuploides, presentando un número medio de $65,4 \pm 1,2$ (10) cromosomas. Este número se mantuvo constante en todas ellas, reflejando la estabilidad de nuestras condiciones de cultivo. Además resultó ser menor al publicado en una línea celular perteneciente al haplogrupo L0 que portaba la mutación homoplásmica m.5703G>A, construida con el mismo fondo nuclear. Esta línea presentaba un número significativamente mayor ($87,3 \pm 4,6$ (1)) (Hao, Morrison et al. 1999).

En la siguiente figura se ilustra el cariotipo de la línea celular 48K a modo de ejemplo. En los anexos se encuentran los cariotipos restantes (Figuras A.1-9).

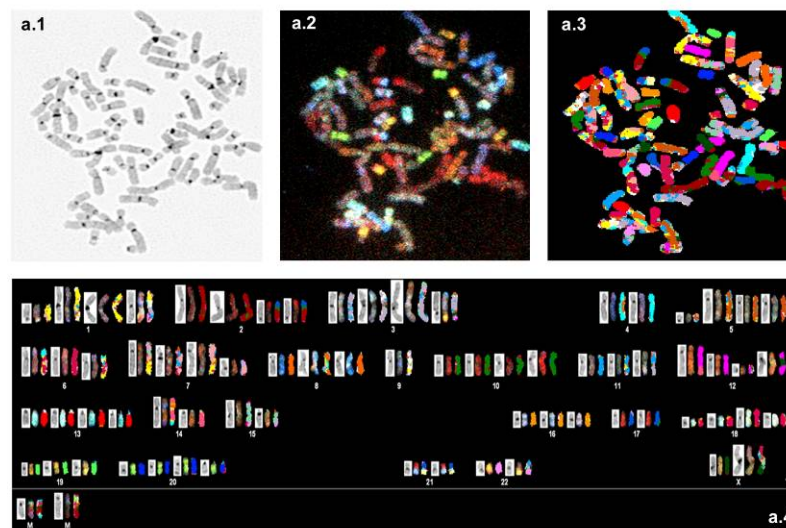


Figura IV.10: Análisis del cariotipo de las líneas híbridas H y Uk. Cariotipo de la línea celular 48K. a.1) Cariotipo espectral (SKY); a.2) Metafase después de la tinción DAPI e hibridación SKY; a.3) Clasificación por colores a.4) Los cromosomas estructuralmente reordenados son agrupados según el tipo de cromosoma de su componente principal.

A continuación estudiamos las diferencias entre el número de cromosomas de las líneas celulares pertenecientes al haplogrupo H y las del haplogrupo Uk. No observamos diferencias significativas entre ambos clados [H, $66,3 \pm 3,8$ (5); Uk $64,6 \pm 2,1$ (5)]. Los datos de cada una de las líneas celulares en particular, y las medias de cada haplogrupo se encuentran recogidos en la tabla IV.3.

HAPLOGRUPO	LINEA CELULAR	RANGO	X \pm SD (N)	X (HAPLOGRUPO)
H	AcH	62-71	67,5 \pm 2,7 (20)	
H	RicH	41-72	62,6 \pm 8,2 (23)	
H	25H	44-93	63,2 \pm 15,0 (18)	
H	612H	43-83	66,1 \pm 8,8 (21)	
H	613H	62-86	72,1 \pm 6,1 (20)	66,3 \pm 3,8 (5)
Uk	3K	45-99	64,7 \pm 8,4 (23)	
Uk	8K	42-119	65,7 \pm 18,1 (20)	
Uk	48K	42-77	67,4 \pm 8,4 (21)	
Uk	98K	39-86	62,1 \pm 11,2 (19)	
Uk	110K	47-76	63,3 \pm 8,0 (22)	64,6 \pm 2,1 (5)

Tabla IV.3: Estadística del cariotipado de las líneas híbridas H y Uk

D. Caracterización genética

Los estudios de efectos fenotípicos de polimorfismos poblacionales han de ser meticulosamente diseñados, tal y como se ha explicado en el capítulo anterior. Un punto fundamental es la secuenciación completa del mtDNA de todas las líneas celulares para excluir posibles variantes privadas (las que ocurren en las puntas de las ramas individuales del árbol filogenético) que puedan tener efecto fenotípico (Montoya, Lopez-Gallardo et al. 2009). Por ello realizamos la secuenciación completa de los mtDNAs de todas nuestras líneas celulares, y construimos el árbol filogenético con todas las posiciones encontradas, tal y como se muestra en la siguiente figura.

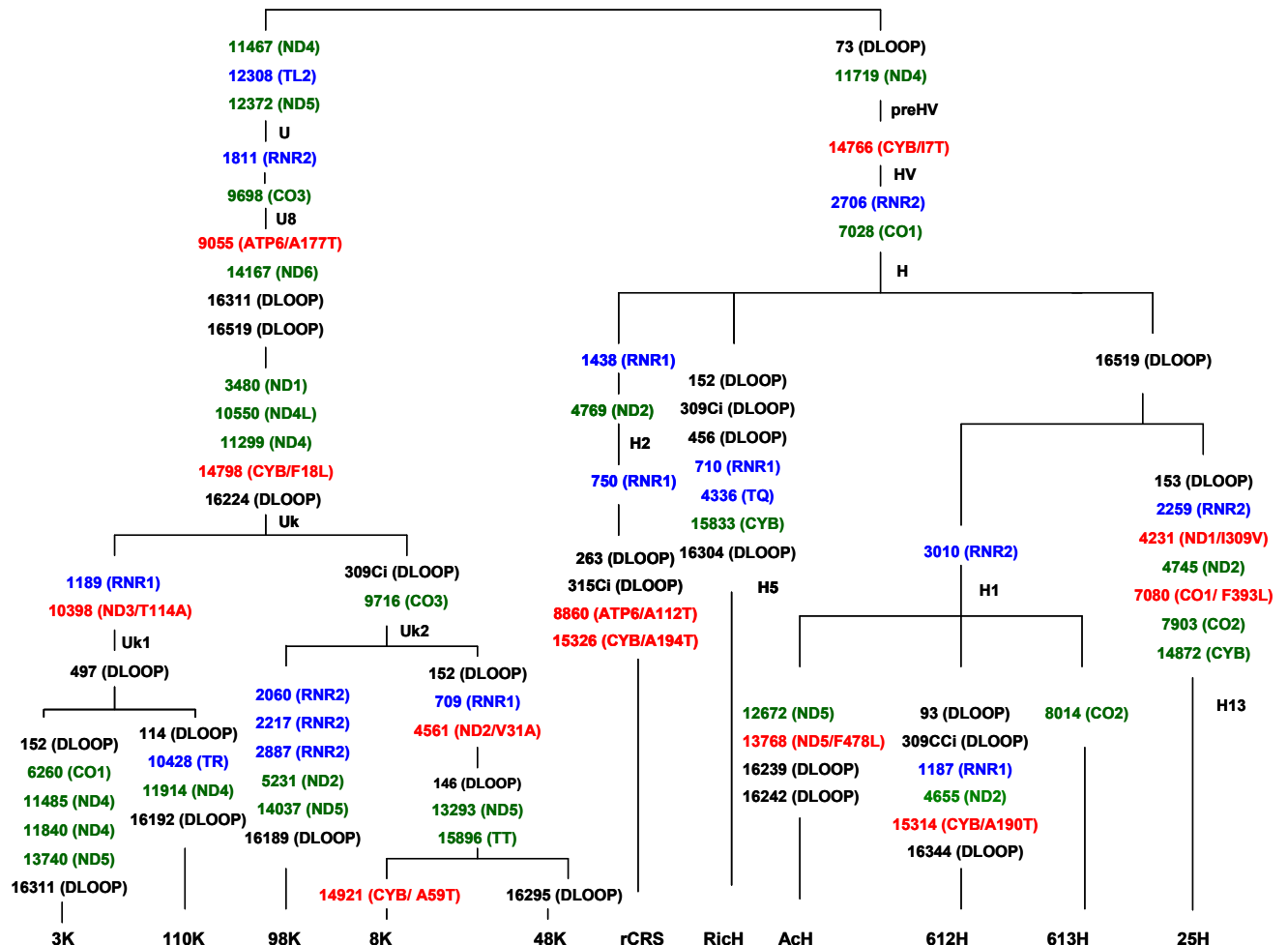


Figura IV.11: Árbol filogenético del mtDNA de las líneas híbridas. Los colores negro, verde, rojo y azul definen polimorfismos en la región de control, cambios sinónimos y no sinónimos en las proteínas, y cambios en los RNA, respectivamente. El gen afectado o la secuencia de mtDNA se muestran entre paréntesis. Para las mutaciones no sinónimas, el aminoácido original, el que lo sustituye y la posición en la proteína también se indica. rCRS significa secuencia de referencia Cambridge revisada (Andrews, Kubacka et al. 1999).

Las mutaciones encontradas se analizaron en una base de datos de mtDNA que incluye más de 3.000 secuencias de humanos (Ruiz-Pesini, Lott et al. 2007). Se encontraron 43 mutaciones individuales (16 en la región de control, 14 sinónimas y 5 no sinónimas en genes que codifican para proteínas y 8 en los genes del RNA). De ellas, 42 habían sido descritas. Sólo una, la posición m.10428A>G que provoca un cambio en el gen para el tRNA-Arginina en la línea

cíbrida 110K, no había sido descrito anteriormente. Esta mutación produce una transición heteroplásmica (Figura IV.12.A), una característica frecuentemente asociada con mutaciones patológicas (DiMauro and Hirano 1993; Montoya, Lopez-Gallardo et al. 2009), que da lugar a la ruptura de un par de bases Watson-Crick en el tallo del anticodón del tRNA (Figura IV.12.B). En esta línea celular, sin embargo, un análisis posterior de la síntesis de proteínas mitocondrial y de varios parámetros del sistema OXPHOS no mostró ninguna diferencia significativa frente a otras líneas cíbridas del mismo haplogrupo (Figura IV.12.C).

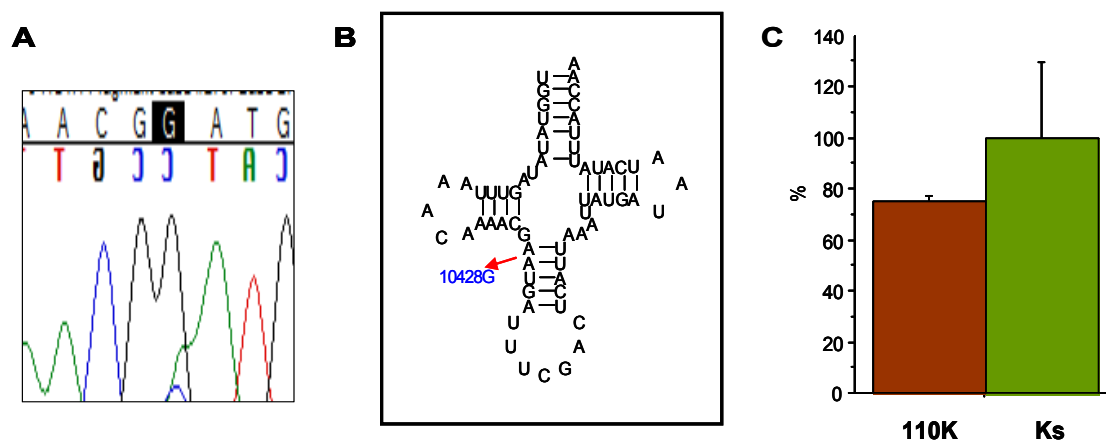


Figura IV.12: Mutación no descrita m.10428A>G en la línea 110K. A) Electroferograma. B) Estructura secundaria del tRNA-Arginina. C) Estudio de la síntesis mitocondrial de proteínas en la línea celular 110K (marrón) con respecto al resto de las líneas Uk (verde). El valor medio de cíbridos Uk, excepto la línea 110K se ha establecido en 100%.

Los resultados obtenidos en el cariotipado y la secuenciación completa, sumados a las medidas tenidas en cuenta para el trabajo con líneas cíbridas expuesto en el primer bloque de pre-resultados de esta tesis doctoral, nos confirmaban que nuestro modelo parecía adecuado para el estudio de las variantes genéticas de las filogenias mitocondriales H y Uk. Por ello, comenzamos los estudios fenotípicos a nivel molecular y celular.

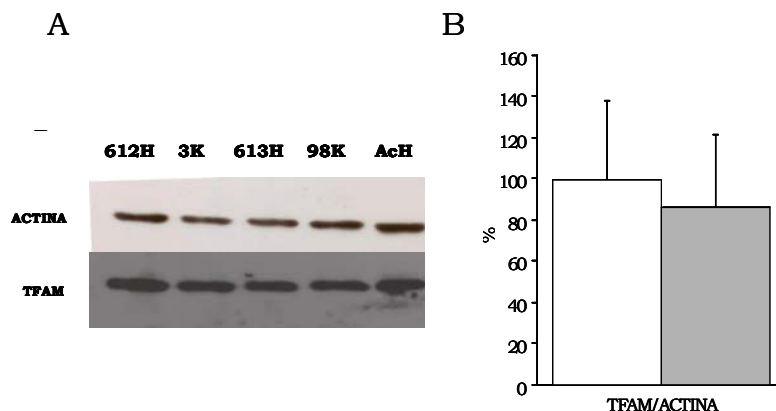
II.2 El análisis de los ácidos nucleicos revela diferencias fenotípicas entre ambos haplogrupos

A. Determinación de niveles del mtDNA

Estudios en líneas cíbridas transmitocondriales han evidenciado el estrecho control que mantienen los niveles de mtDNA sobre el funcionamiento del sistema OXPHOS (Rocher, Taanman et al. 2008). Este pequeño genoma se encuentra en la matriz mitocondrial en pequeñas estructuras denominados nucleoides, que contienen de 2 a 10 copias de mtDNA y varias proteínas. Entre esas proteínas podemos encontrar el factor de transcripción mitocondrial A o TFAM (Alam, Kanki et al. 2003), uno de los reguladores del número de copias de mtDNA en mamíferos (Ekstrand, Falkenberg et al. 2004). Por ende, un estudio indirecto del contenido genómico mitocondrial es la determinación de la cantidad de TFAM.

Para la cuantificación de los niveles de TFAM se realizó un SDS-PAGE seguido de transferencia a membrana y posterior *Western-Blot*. Se realizaron al menos dos detecciones de la señal de TFAM en cada línea celular, seguido de la subunidad α -actina como proteína control. Ambas proteínas se detectaron siempre en la misma membrana (Figura IV.13.A), en dos incubaciones independientes. La señal obtenida se cuantificó mediante densitometría. Los datos se expresaron como cociente TFAM/ α -actina.

Como se puede observar en la siguiente imagen (Figura IV.13.B), no parece haber grandes diferencias en los niveles de TFAM de las líneas celulares cíbridas de ambas filogenias. El análisis estadístico del cociente TFAM/ α -actina reveló una caída del 14% en las líneas pertenecientes al haplogrupo Uk, sin embargo, esta disminución no era significativa (Figura IV.13.B).



A continuación, se determinaron los niveles de mtDNA mediante RT-PCR. El análisis estadístico mostró una reducción significativa ($P= 0,0064$) de un 7,3% en los niveles mtDNA de las líneas celulares del haplogrupo Uk, tal como se puede observar en la figura IV.14. Este resultado constituía la primera evidencia de un fenotipo diferencial entre las filogenias estudiadas.

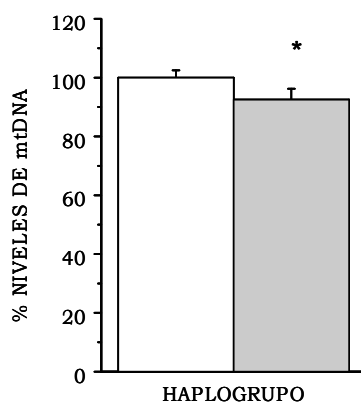


Figura IV.14: Niveles del mtDNA de las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y Uk. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares pertenecientes a los haplogrupos H y Uk, respectivamente. El valor medio del total de las líneas del haplogrupo H se consideró 100%. Las líneas finas verticales marcan la desviación estándar. H, 100,0 \pm 2,6% (5); Uk, 92,7 \pm 3,6% (5), $P= 0,0064$.

B. Niveles de expresión de genes relacionados con la replicación del mtDNA

La dosis genómica mitocondrial está controlada por varios factores, entre ellos, los niveles de expresión de algunos genes que participan en la replicación del mtDNA (Bruni, Polosa et al. 2010). Determinamos los niveles de mRNA para la POLG, la proteína Twinkle, la RNA polimerasa mitocondrial o POLRMT y la mtSSB.

Como se puede observar en la siguiente figura, no encontramos diferencias en los niveles de mRNA de ninguna de las proteínas estudiadas entre las líneas híbridas transmitocondriales pertenecientes a los haplogrupos H y Uk. En consecuencia, otro mecanismo es el responsable de las diferencias encontradas en la dosis genómica.

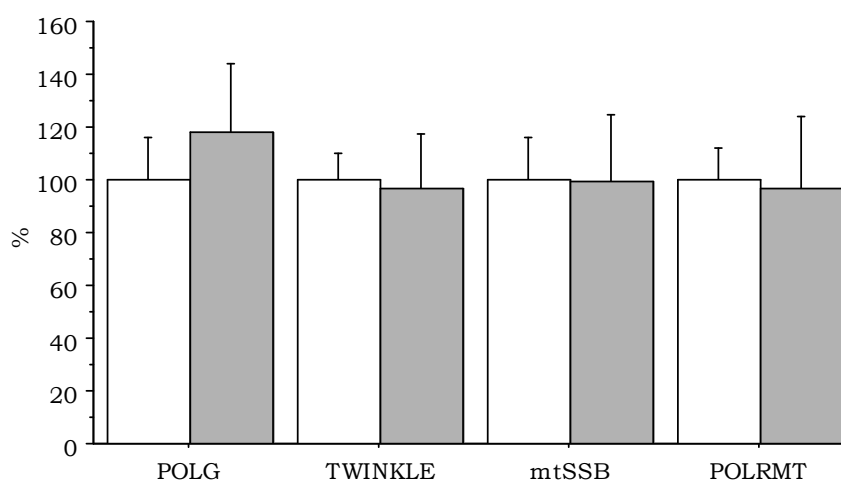


Figura IV.15: Niveles de mRNA de genes implicados en la replicación del mtDNA de las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y Uk. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y Uk, respectivamente. El valor medio del total de las líneas celulares del haplogrupo H se fijó en 100%. Las líneas finas verticales marcan la desviación estándar. POLG: H, 100,0 ± 15,9% (5); Uk, 118,2 ± 26,0% (5). mtSSB: H, 100,0 ± 16,2% (5); Uk, 96,6 ± 20,7% (5). TWINKLE: 100,0 ± 10,1% (5); Uk, 99,3 ± 25,7% (5). POLRMT: H, 100,0 ± 12,2% (5); Uk, 96,7 ± 27,3% (5).

C. Determinación de los niveles de mtRNA

La relación existente entre los niveles de mtDNA y los de mtRNA ha sido evidenciada en varios tejidos y líneas celulares (Welle, Bhatt et al. 2003; Coskun, Beal et al. 2004; Cotney, Wang et al. 2007; Karamanlidis, Nascimben et al. 2010). Para comprobar si en nuestras líneas híbridas existía dicha relación se estudió la expresión génica mitocondrial mediante RT-PCR. Se cuantificó el mRNA de genes para proteínas de todos los complejos codificados en el mtDNA, así como los de los rRNA.

En la figura expuesta a continuación, se puede observar una caída en los niveles de mRNA de todos los genes estudiados en las líneas celulares pertenecientes al haplogrupo Uk, respecto del haplogrupo H (Figura IV.16). Sin embargo, el análisis no mostró diferencias significativas entre ambos haplogrupos en los genes que codifican proteínas OXPHOS, con excepción del mRNA del citocromo b (*MT-CYB*), que sí presentaba una disminución significativa en los niveles de expresión (Figura IV.16). El CYB forma parte del mismo transcrito policistrónico que los genes de los complejos I, IV y V, con excepción de ND6. Teniendo en cuenta que no se encontraron diferencias en los niveles de los transcritos para subunidades del CI, IV y V la diferencia en el CYB pudo ser debida a una vida media diferente o a un SNP que pudiera influir en la afinidad de la unión de la sonda al mRNA.

El análisis estadístico de los niveles de expresión de los rRNA reveló que las líneas celulares pertenecientes al clado Uk presentan una disminución significativa en los niveles de RNA tanto del rRNA12S ($P=0,04$), como en el del rRNA16S ($P=0,005$), con respecto a las pertenecientes al haplogrupo H, tal y como se muestra en la figura anexa.

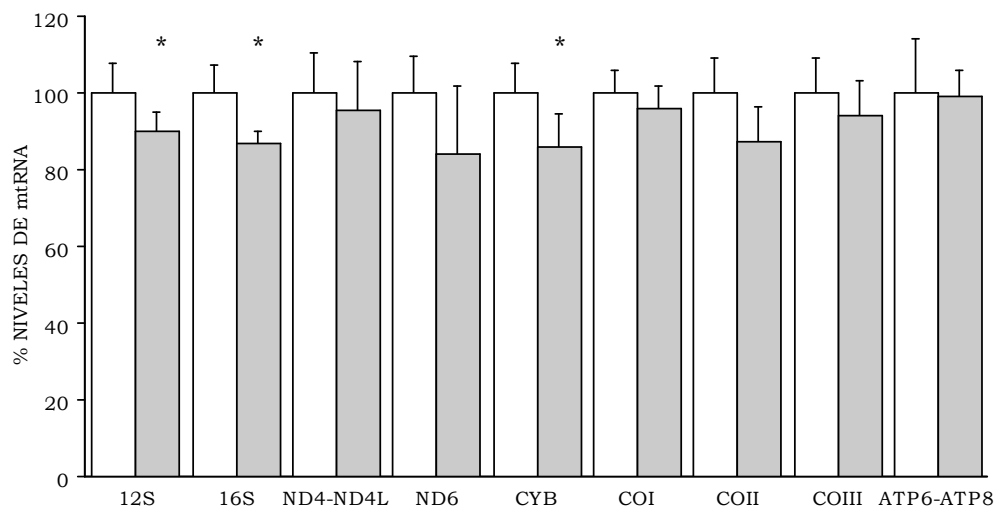


Figura IV.16: Niveles del mtRNA en las líneas cíbridas pertenecientes a los haplogrupos H y Uk. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y Uk, respectivamente. El valor medio del total de las líneas del haplogrupo H se consideró 100%. Las líneas finas verticales marcan la desviación estándar. 12S: H, 100,0 ± 7,8% (5); Uk, 89,9 ± 5,0% (5)*. 16S: H, 100,0 ± 7,2% (5); Uk, 86,9 ± 2,9% (5)*. ND4-ND4L: H, 100,0 ± 10,2% (5); Uk, 95,5 ± 12,6% (5). ND6: H, 100,0 ± 9,4% (5); Uk, 84,3 ± 17,5% (5). CYB: H, 100,0 ± 7,9% (5); Uk, 85,9 ± 8,9% (5)*. COI: H, 100,0 ± 7,9% (5); Uk, 96,0 ± 5,9% (5). COII: H, 100,0 ± 9,0% (5); U, 87,2 ± 9,4% (5). COIII: H, 100,0 ± 9,2% (5); Uk, 94,0 ± 9,0% (5). ATP6-ATP8: H, 100,0 ± 13,9% (5); Uk, 99,2 ± 6,7% (5). *P ≤ 0,04.

La transcripción del genoma mitocondrial se lleva a cabo a partir de tres promotores diferentes: Uno para la cadena ligera (L) y dos para la cadena pesada (H1 y H2). La cuantificación de los niveles de los productos de transcripción del mtDNA reveló una disminución de la expresión de todas las unidades de transcripción en las líneas celulares pertenecientes al haplogrupo Uk, con respecto a las del haplogrupo H (Figura IV.17). Sin embargo, únicamente la hebra de transcripción que engloba los dos rRNAs (H1) mostró diferencias significativas ($p=0,0115$) entre ambos haplogrupos (Figura IV.17). Este resultado parece reflejar la existencia de una regulación independiente de cada una de las unidades de transcripción, tal como habían observado otros autores (Montoya, Gaines et al. 1983; Enriquez, Fernandez-Silva et al. 1996).

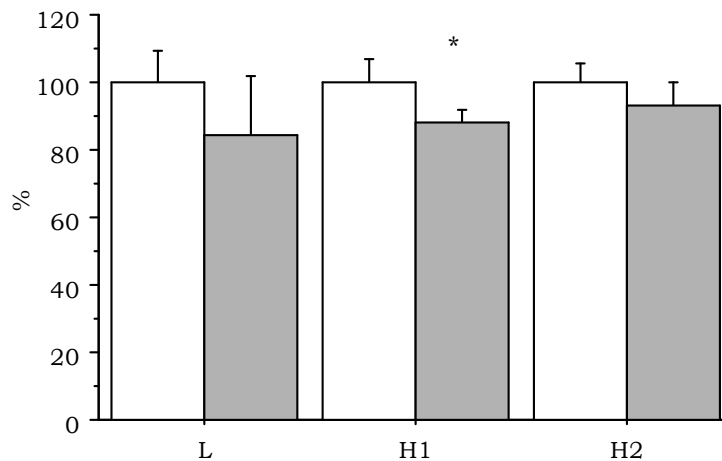


Figura IV.17: Productos de transcripción mitocondrial de las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y Uk. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y Uk, respectivamente. El valor medio del total de las líneas del haplogrupo H se consideró 100%. Las líneas finas verticales marcan la desviación estándar. L: H, 100,0 ± 9,4% (5); Uk, 84,3 ± 17,5% (5). H1: H, 100,0 ± 7,0% (5); Uk, 88,4 ± 3,8% (5)*. H2: H, 100,0 ± 5,8% (5); Uk, 92,0 ± 7,0% (5). *P=0,0115.

Por último, se cuantificaron los niveles de mtRNA total, que incluyen todas las unidades de transcripción. Tras el análisis estadístico, se observó que las líneas celulares del haplogrupo Uk presentan una disminución significativa ($p=0,04$) de un 9% en los niveles de mtRNA total, con respecto a las pertenecientes al haplogrupo H, de forma similar a como ocurría en el caso de los niveles de mtDNA (figura IV.18).

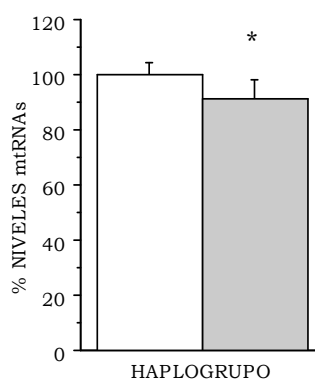


Figura IV.18: Niveles del mtRNA de las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y Uk. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y Uk, respectivamente. El valor medio del total de las líneas del haplogrupo H se consideró 100%. Las líneas finas verticales marcan la desviación estándar. H, 100,0 ± 4,3% (5); Uk, 91,0 ± 7,12% (5); P= 0,042.

D. Niveles de expresión de genes relacionados con la transcripción mitocondrial

A continuación, determinamos los niveles de expresión de algunas de las proteínas que intervienen en la transcripción del mtDNA, para observar si diferencian en los niveles de mRNA de alguna de estas proteínas era responsable de la disminución en los niveles de mtRNA. Se cuantificaron los niveles de mRNA de la POLRMT, el MTFB2 y el MTERF (Bruni, Polosa et al. 2010).

Como se puede observar en la figura a continuación, no se encontraron diferencias en los niveles de mRNA de los genes estudiados entre las líneas celulares pertenecientes al haplogrupo H y Uk. Así, el mecanismo que condiciona la caída en los niveles de mtRNA es otro.

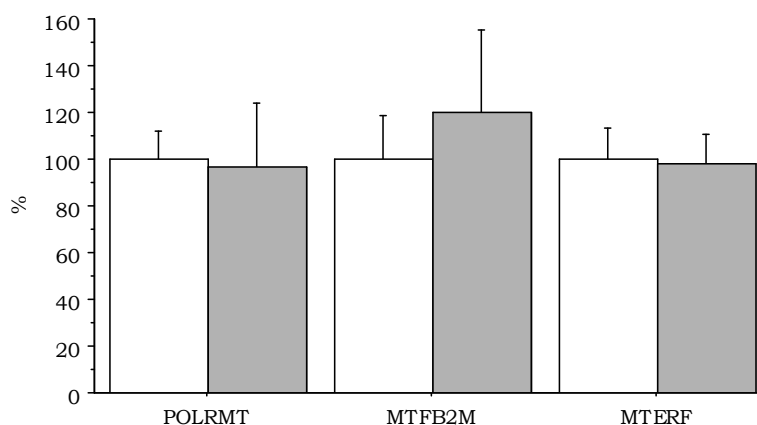


Figura IV.19: Niveles de mRNA de genes implicados en la transcripción del mtDNA de las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y Uk. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y Uk, respectivamente. El valor medio del total de las líneas del haplogrupo H se consideró 100%. Las líneas finas verticales marcan la desviación estándar. POLRMT: H, 100,0 ± 12,2% (5); Uk, 118,2 ± 26,0% (5). TFB2M: H, 100,0 ± 18,5% (5); Uk, 120,0 ± 35,3% (5). MTERF: H, 100,0 ± 13,0% (5); Uk, 97,71 ± 12,6% (5).

II.3 La síntesis mitocondrial de proteínas es menor en las líneas celulares pertenecientes al clado Uk

Algunos autores han encontrado que diferencias en los niveles mtDNA y mtRNA pueden condicionar la cantidad de proteína mitocondrial sintetizada (Zhao, Young et al. 2005; Cotney and Shadel 2006). Por ende, el siguiente paso, fue cuantificar los productos de traducción mitocondrial en líneas celulares pertenecientes a los haplogrupos H y Uk. Se realizaron, al menos, dos cuatificaciones por línea celular. Además, para comprobar que las posibles diferencias no se debían a una desproporción en la cantidad de proteína cargada se llevó a cabo la tinción del gel con Azul de Coomassie. En ningún caso se observaron diferencias en la carga proteica, como se puede observar a simple vista (Figura IV.20). Paralelamente, para su análisis se llevó a cabo el densitometrado de tres bandas distintas (pertenecientes a las subunidades p.MT-ND1, p.MT-ND3 y p.MT-ND5). La elección de las mismas se basó en su situación física en el gel. Una en la parte superior, otra en la media y otra inferior. En la siguiente figura se expone un ejemplo de una detección y de un control de carga, la otra determinación se encuentra en el anexo (Figura A.10).

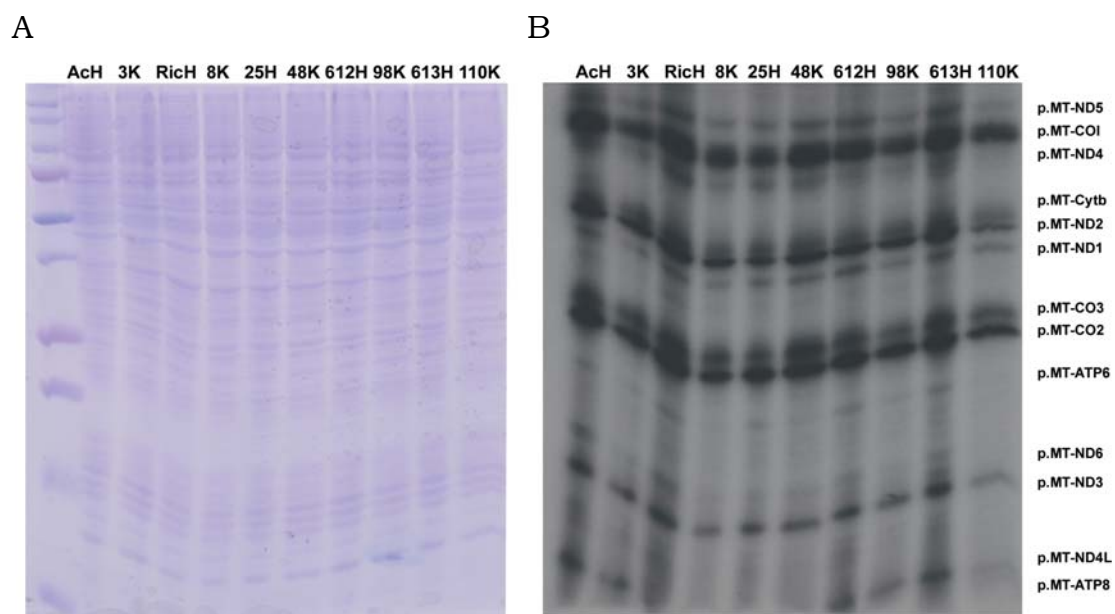


Figura IV.20: Síntesis de proteínas mitocondriales de las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y Uk. A. Control de carga por tinción con Azul de Coomassie B. Patrón de electroforesis de los productos de traducción mitocondrial de las líneas celulares híbridas. M, marcador de peso molecular.

Como se puede observar en la figura anterior, líneas celulares pertenecientes al haplogrupo H parecen producir mayor cantidad de proteínas sintetizadas en la mitocondria que las pertenecientes al haplogrupo Uk. El análisis estadístico evidenció, que efectivamente, existía una disminución significativa ($P = 0,037$) de un 29,0% en los productos de traducción mitocondrial de las líneas celulares pertenecientes al haplogrupo Uk, con respecto a las del haplogrupo H (Figura IV.21).

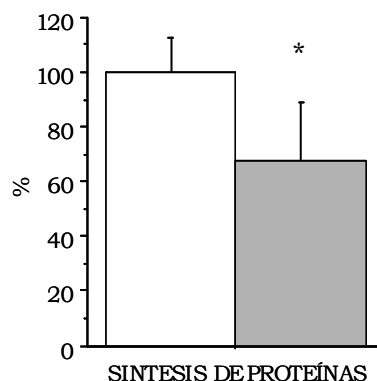


Figura IV.21: Cuantificación de la síntesis mitocondrial de proteínas de las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y Uk. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y Uk, respectivamente. El valor medio del total de las líneas del haplogrupo H se consideró 100%. Las líneas finas verticales marcan la desviación estándar. H, $100,0 \pm 14,5\%$ (5); Uk, $71,0 \pm 21,4\%$ (5) $P = 0,037$.

II.4 Estudio de la fracción celular ocupada por mitocondria

El siguiente paso fue estudiar si todos los cambios descritos hasta el momento eran debidos a diferencias en el número de mitocondrias, por lo que decidimos analizar la fracción celular ocupada por mitocondria a distintos niveles.

En primer lugar, determinamos la actividad enzimática de la citrato sintasa (CS), una enzima de la matriz mitocondrial (codificada en el nDNA) que refleja el número o el volumen mitocondrial (Krahenbuhl, Schafer et al. 1996). Observamos que no había diferencias significativas en la actividad específica de la CS entre ambos haplogrupos (Figura IV.22.A).

En segundo lugar, teniendo en cuenta que el sistema OXPHOS se encuentra anclado en la membrana interna mitocondrial se determinó la actividad enzimática y la cantidad de proteína de la succinato deshidrogenasa o CII, como marcador de la superficie de la membrana interna mitocondrial. El CII es el único de los complejos de la ETC codificado exclusivamente por el nDNA. No observamos diferencias entre ambos haplogrupos, ni en actividad (Figura IV.22.A), ni en cantidad del cociente CII/ α -Actina (Figura IV.22).

Por último estudiamos la superficie de la membrana mitocondrial interna (MIMS), como el contenido en cardiolipina utilizando una sonda fluorescente, la nonil naranja de acridina (NAO, del inglés *Nonyl Acridine Orange*) (Petit, Huet et al. 1994) que detectamos mediante citometría de flujo. En este caso, tampoco encontramos diferencias significativas entre ambos clados.

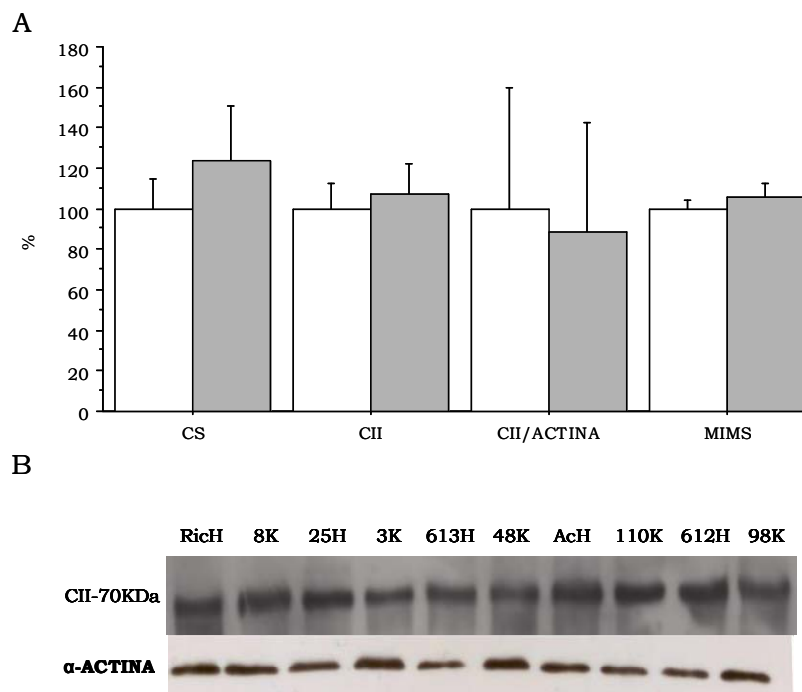


Figura IV.22: Fracción celular ocupada por mitocondria. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y Uk, respectivamente. El valor medio del total de las líneas del haplogrupo H se consideró 100%. Las líneas finas verticales marcan la desviación estándar. CS: H, 100,0 ± 12,6% (5); Uk, 123,5 ± 27,3% (5). CII: H, 100,0 ± 12,2% (5); Uk, 107,3 ± 15,2% (5). Estudio densitométrico del cociente CII/ Actina: H, 100,0 ± 24,3% (5); Uk, 91,0 ± 27,1% (5). MIMS: H, 100,0 ± 4,4% (5); Uk, 106,0 ± 6,4% (5). B. Ejemplo representativo de un *Western-Blot*.

Los resultados obtenidos parecen indicar que las diferencias observadas en cantidad de proteínas, mtRNA y mtDNA entre las líneas híbridas mitocondriales pertenecientes a los distintos haplogrupos no son debidas a la fracción celular ocupada por mitocondria.

II.5 La actividad y cantidad del CIV están disminuidas en las líneas celulares pertenecientes al haplogrupo Uk

Estudios en tejidos de mamíferos han mostrado una relación entre los niveles de mtDNA y la actividad de la citocromo c oxidasa (Fernandez-Vizarra, Enriquez et al. 2011; Rocher, Taanman et al. 2008). Además, una de las formas más utilizadas para analizar la funcionalidad del sistema OXPHOS es la determinación de la actividad de la citocromo c oxidasa o CIV.

En primer lugar, realizamos una medida espectrofotométrica de la actividad del CIV, con análisis paralelo de la actividad de la CS. Encontramos una caída significativa ($P=0,0001$) en el cociente actividad citocromo c oxidasa por citrato sintasa (Figura IV.23.A) en las líneas híbridas pertenecientes al haplogrupo Uk, con respecto de las del haplogrupo H.

En segundo lugar, utilizamos un kit comercial que permitía realizar una medida secuencial de la actividad específica y los niveles del complejo en el mismo pocillo. En concordancia, pudimos observar una disminución significativa ($P=0,007$) en la actividad específica en las líneas híbridas pertenecientes al haplogrupo Uk. Como se puede observar la Figura IV.23.B. Paralelamente, la medida de los niveles de complejo mostró un descenso significativo ($P= 0,001$) de un 30%, en los híbridos pertenecientes al clado Uk.

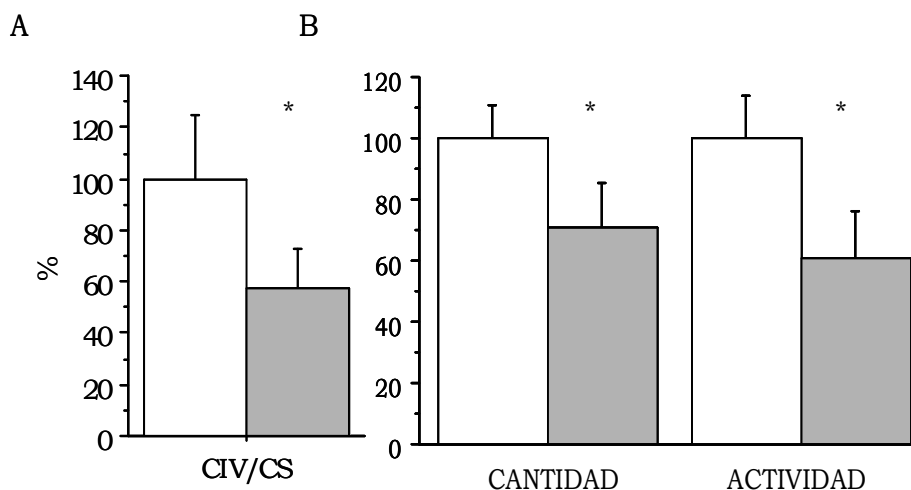


Figura IV.23: Niveles de actividad y cantidad de CIV en las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y Uk. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y Uk, respectivamente. El valor medio del total de las líneas del haplogrupo H se consideró 100%. Las líneas finas verticales marcan la desviación estándar. A. CIV/CS: H, $100,0 \pm 24,6\%$ (5); Uk, $57,2 \pm 15,9\%$ (5). B. Niveles de CIV: H, $100,0 \pm 10,9\%$ (5); Uk, $70,6 \pm 14,8\%$ (5). Actividad específica: H, $100,0 \pm 14,4\%$ (5); Uk, $61,1 \pm 14,7\%$ (5). * $P \leq 0,001$.

Paralelamente, observamos una correlación significativa ($R^2 = 0.96$, $P = 0.0001$) entre la actividad y los niveles de complejo de las líneas celulares de ambos haplogrupos. Por lo tanto, la caída observada en la actividad del CIV era debida a la disminución en la cantidad. La representación gráfica de la correlación se muestra en la siguiente figura.

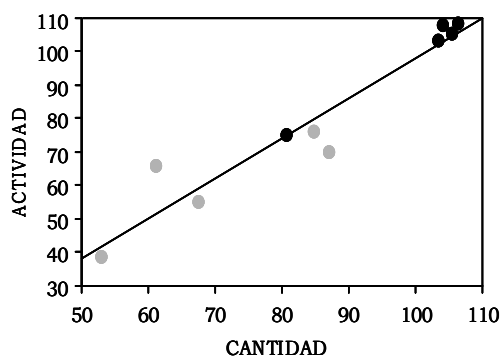


Figura IV.24: Correlación niveles- actividad de complejo IV en las líneas celulares pertenecientes a los haplogrupos H y Uk. Los puntos de color negro representan la media de los valores de cada una de las líneas celulares del haplogrupo H y los de color gris de las pertenecientes al haplogrupo Uk. La recta obtenida tras la representación gráfica presenta la siguiente ecuación: $y = 1,68 + 0,141x$. $R^2 = 0,96$, $P = 0.0001$.

Paralelamente, decidimos analizar si esta caída en los niveles de complejo IV correlacionaba a su vez con la reducción encontrada en los productos de traducción mitocondrial. Encontramos que también había una correlación significativa entre ambos parámetros ($R^2=0,6$, $P=0,0132$), tal y como se muestra en la figura a continuación.

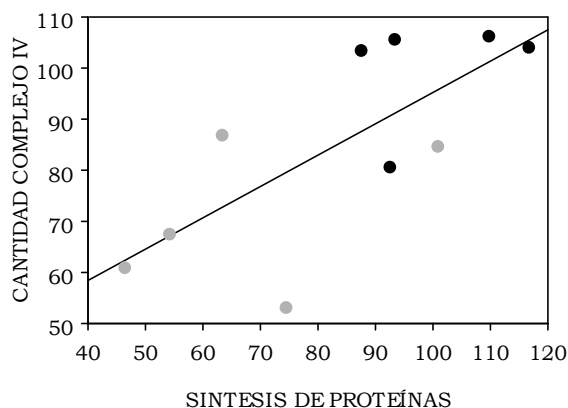


Figura IV.25: Correlación de la síntesis mitocondrial de proteínas y los niveles de complejo IV en las líneas celulares pertenecientes a los haplogrupos H y Uk. Los puntos de color negro representan la media de cada una de las líneas celulares del haplogrupo H, y los de color gris las pertenecientes al haplogrupo Uk. La recta obtenida tras la representación gráfica presenta la siguiente ecuación: $y = 33,86 + 0,613x$. $R^2 = 0,6$, $P = 0,0132$.

El complejo IV, a su vez, es el encargado de reducir oxígeno como último paso de la ETC. Así, el siguiente paso de nuestros estudios sobre la funcionalidad del sistema OXPHOS fue determinar el consumo de oxígeno en nuestras líneas celulares.

II.6 El consumo de O_2 por unidad de cadena, el MIMP y la cantidad de ATP son diferentes entre las líneas híbridas de los haplogrupos H y Uk

Un estudio funcional del sistema OXPHOS incluye determinaciones a distintos niveles: Cantidad de oxígeno consumido por la cesión de los electrones procedentes de la ETC; estudio del gradiente electroquímico, como potencial de membrana interna mitocondrial o MIMP y determinación de la cantidad de ATP sintetizado.

A. Consumo de O₂ en líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y Uk.

El estudio de la capacidad respiratoria de nuestras líneas híbridas se llevó a cabo en dos medios diferentes, uno con glucosa y otro sin ella. Se efectuaron al menos cuatro medidas por línea. Los datos se expresaron como fmoles/min/célula.

Los análisis de consumo de oxígeno en medio sin glucosa no mostraron diferencias en la tasa de respiración de las líneas híbridas pertenecientes a las filogenias de estudio, en consumo endógeno, filtrante, ni tampoco en desacoplado con FCCP, tal y como se muestra en la figura IV.26.

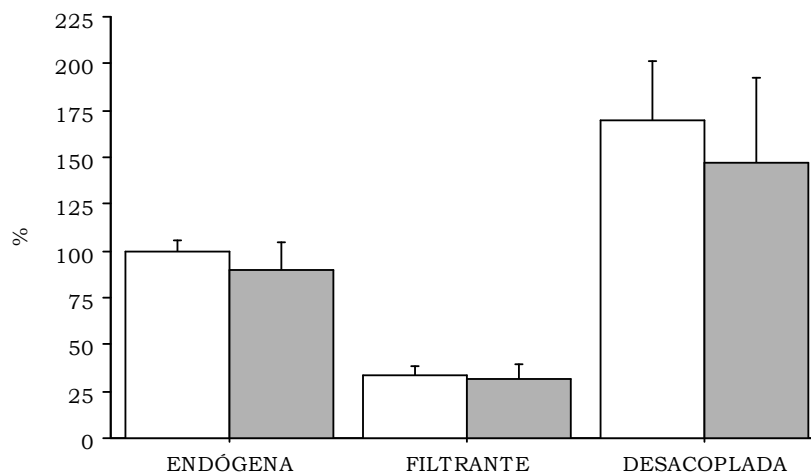


Figura IV.26: Consumo de oxígeno en DMEM libre de glucosa en líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y Uk. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y Uk, respectivamente. El valor medio de los valores de la respiración endógena de las líneas del haplogrupo H se fijó en 100%. Las líneas finas verticales marcan la desviación estándar. Consumo de oxígeno endógeno: H, 100,0 ± 5,6% (5); Uk, 89,9 ± 15,0% (4). Respiración filtrante: H, 33,5 ± 4,7% (5); Uk, 31,3 ± 7,8% (4). Respiración desacoplada: H, 169,6 ± 31,8% (5); Uk, 146,8 ± 45,5% (4).

Posteriormente determinamos la tasa de respiración en un medio con glucosa como sustrato. Se observó que de forma similar a como ocurría cuando utilizábamos un medio sin glucosa, no existían diferencias en la velocidad de consumo de oxígeno entre ambos haplogrupos (Figura IV.27).

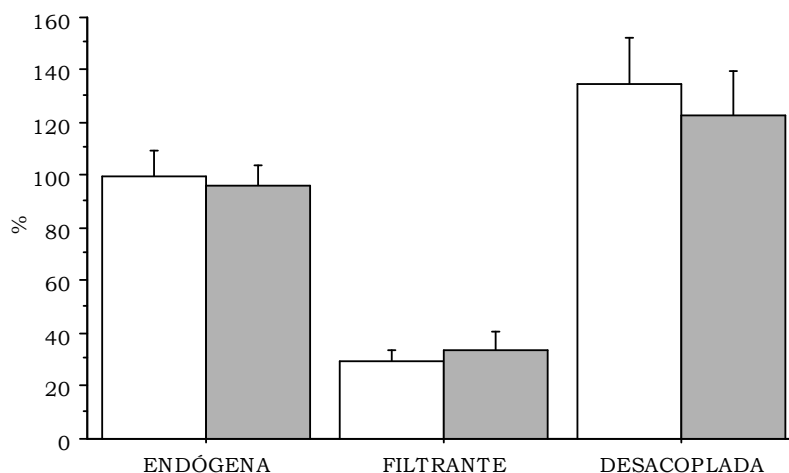


Figura IV.27: Consumo de oxígeno en DMEM en líneas híbridas pertenecientes los haplogrupos H y Uk. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y Uk, respectivamente. El valor medio de los valores de la respiración endógena de las líneas del haplogrupo H se fijó en 100%. Las líneas finas verticales marcan la desviación estándar. Consumo de oxígeno endógeno: H, 100,0 ± 9,7% (5); Uk, 95,9 ± 7,8% (5). Respiración filtrante: H, 29,8 ± 3,8% (5); Uk, 33,5 ± 7,3% (5). Respiración desacoplada: H, 134,8 ± 17,7% (5); Uk, 134,8 ± 15,5% (5).

Paralelamente, realizamos un estudio de la influencia de la composición del medio sobre la tasa de respiración. No existieron diferencias entre ambos medios, tal como se puede observar en la figura expuesta a continuación.

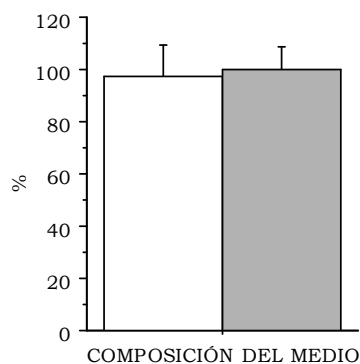


Figura IV.28: Examen de la influencia de la fuente de azúcar el medio de cultivo. Las barras blancas y grises representan la media de las líneas medio E-FREE Y E-G, respectivamente. Las siglas E-G y E-FREE son abreviaturas de respiración endógena en medio con glucosa y en medio sin glucosa, respectivamente. La respiración media en E-G ha sido fijada como 100%. Las líneas finas verticales marcan la desviación estándar. E-G: 100,0 ± 8,76% (10), E-FREE: H, 97,5 ± 8,8% (9).

Una comparación similar había sido realizada por el grupo del Prof. Attardi a finales de los 90. En este trabajo habían comparado el medio de respiración TD frente al DMEM sin glucosa, popularmente utilizado. No

encontraron diferencias entre ambos medios, tal y como ocurre en nuestro caso (Villani and Attardi 1997). El mismo grupo observó años más tarde, en líneas de osteosarcoma 143B, que la tasa de consumo de oxígeno por célula tiende a caer con el aumento de la densidad celular debido a una disminución del tamaño de las células y, probablemente, del número de mitocondrias (Villani and Attardi 2001). Este problema se puede corregir cuando el consumo de oxígeno se expresa por unidad de ETC, es decir por cociente de CIV/CS (Renner, Amberger et al. 2003). Así, referimos los datos obtenidos en los ensayos en medio con glucosa al cociente de actividad CIV/CS, estudiando de este modo la tasa de respiración por unidad de cadena.

Sorprendentemente, con esta corrección se observó que existía un aumento estadísticamente significativo en la tasa de respiración por unidad de cadena en las líneas celulares del haplogrupo Uk tanto en el consumo endógeno, como en el filtrante y en el desacoplado, tal y como podemos observar en la figura que se ilustra a continuación.

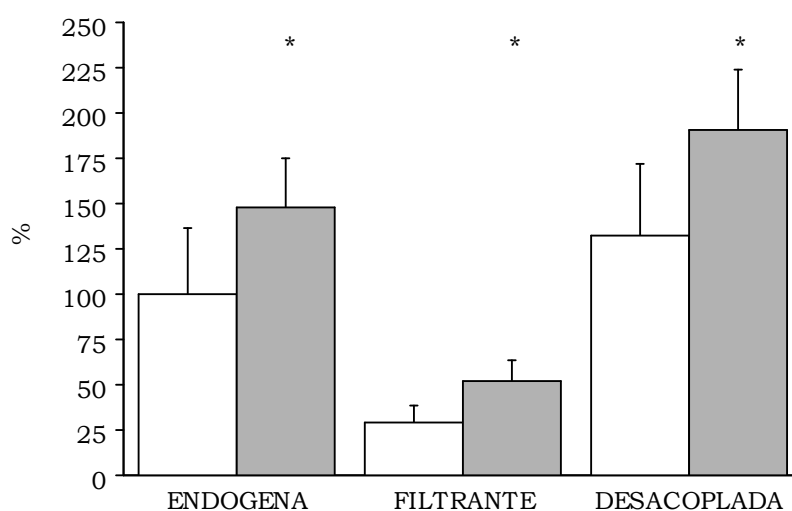


Figura IV.29: Consumo de oxígeno en DMEM glucosa referido a CIV/CS de las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y Uk. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y Uk, respectivamente. El valor medio de los valores del cociente respiración endógena/CIV/CS de las líneas del haplogrupo H se fijó en 100%. Las líneas finas verticales marcan la desviación estándar. Endógena: H, 100,0 ± 36,9% (5); Uk, 148,3 ± 26,5% (5); Filtrante: H, 28,7 ± 9,3% (5); Uk, 51,7 ± 11,9% (5); Desacoplada: H, 132,5 ± 39,1% (5); Uk, 190,2 ± 34,1% (5). *P ≤ 0,045.

B. Las líneas celulares del haplogrupo H presentan mayor MIMP

La tasa de consumo de oxígeno es inversamente proporcional al potencial de membrana interna mitocondrial (MIMP) (Brookes 2005). Nuestros resultados en el consumo de oxígeno sugerían que los híbridos Uk deberían tener una menor MIMP que las líneas híbridas pertenecientes al haplogrupo H.

Tras el análisis estadístico, observamos una caída significativa ($P = 0,046$) de un 25% en el MIMP de las líneas celulares pertenecientes al haplogrupo Uk, respecto a las pertenecientes al haplogrupo H. Tal y como se puede observar en la figura expuesta a continuación.

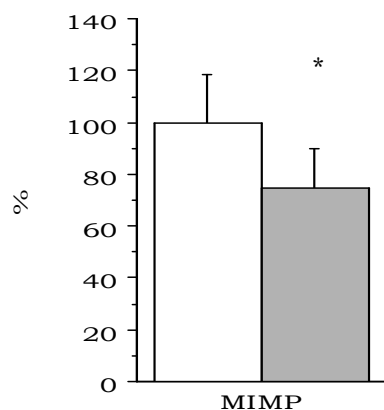


Figura IV.30: Estudio del MIMP en líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos y Uk. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y Uk, respectivamente. El valor medio del total de las líneas del haplogrupo H se consideró 100%. Las líneas finas verticales marcan la desviación estándar. MIMP: H, $100,0 \pm 18,6\%$ (5); Uk, $74,4 \pm 15,5\%$ (5). $P = 0,046$.

C. La cantidad de ATP es diferente en las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y Uk

Una función muy importante del sistema OXPHOS es la producción de energía en forma de ATP. Estudios en mitocondrias aisladas demostraron el modelo de síntesis del mtRNA varía dependiendo de los niveles de ATP intramitocondrial. Así, la síntesis de mRNA es estimulada a bajos niveles de ATP, mientras que niveles de ATP intramitocondrial altos estimulan la síntesis de

rRNA y la transcripción de la hebra L (Gaines, Rossi et al. 1987). Hemos observado que las líneas celulares del haplogrupo Uk presentan menores niveles de mtRNA, quizás esa caída venga condicionada por menores niveles. Además, la síntesis de ATP es dependiente del MIMP (Brand 2000).

Se realizó el estudio de los niveles de ATP en distintas condiciones. Todas las determinaciones se llevaron a cabo por cuadruplicado, en al menos tres experimentos independientes. Los datos se muestran como niveles de ATP/mg de proteína.

La determinación de los niveles de ATP en medio de glucosa, representado en la Figura IV.31 como G, mostró que las líneas celulares pertenecientes al haplogrupo Uk presentaban un aumento significativo ($P= 0,009$) de los niveles de ATP total con respecto a las pertenecientes al haplogrupo H.

Sin embargo, el tratamiento celular con 2-deoxi-glucosa (un inhibidor de la glicólisis), y piruvato (un sustrato de la respiración) mostró que no existían diferencias significativas entre ambos grupos poblacionales en los niveles de ATP mitocondrial (Figura IV.31, DGP). Seguidamente, se determinaron los niveles ATP residual en medio con DGP suplementado con oligomicina, un inhibidor de la ATPsintasa o complejo V, representado como DGPO en la siguiente figura, y no se encontraron diferencias entre ambos haplogrupos.

Por último, analizamos el ATP glicolítico, en medio de glucosa suplementado con oligomicina (GO) (McKenzie, Liolitsa et al. 2007). Las líneas celulares pertenecientes haplogrupo Uk mostraron un aumento estadísticamente significativo de los niveles de ATP de origen glicolítico con respecto a las del haplogrupo H. Curiosamente, este dato evidenciaba que la mayoría del ATP presente en nuestras líneas híbridas era de origen glicolítico, ya que no existían diferencias entre los valores de medio de glucosa y el suplementado con oligomicina ($H_G: 100,0\%$ vs. $H_{GO}: 96,20\%$, y $Uk_G: 132,90\%$ vs. $Uk_{GO}: 138,30\%$).

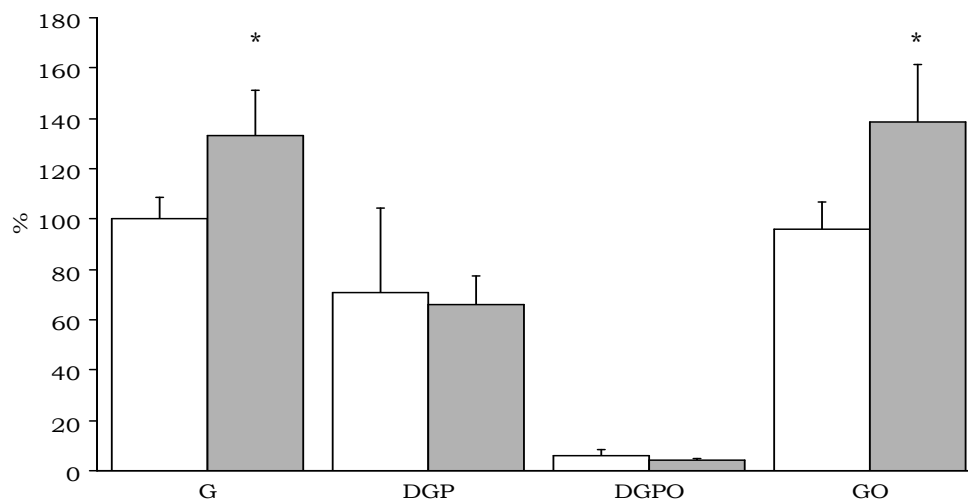


Figura IV.31: Niveles de ATP en cíbridos pertenecientes a los haplogrupos H y Uk. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y Uk, respectivamente. El valor medio del total de las líneas del haplogrupo H en glucosa se fijó en 100%. Las líneas finas verticales marcan la desviación estándar. G, DGP, DGPO, GO son abreviaturas de glucosa; 2-deoxi-glucosa y 1 mM de piruvato; 2-deoxi-glucosa, 1 mM piruvato y 2,5 mg/ml y oligomicina; glucosa y 2,5 mg/ml de oligomicina, respectivamente. G: H, 100,0 ± 8,3% (5); Uk, 132,9 ± 18,3% (5). DGP: H, 71,1 ± 33,2% (5); Uk, 66,2 ± 10,9% (5). DGPO: H, 5,9 ± 2,6% (5); Uk, 4,3 ± 0,6% (5); GO: H, 96,2 ± 10,7% (5); Uk, 138,3 ± 22,8% (5). *P = 0,009.

En concordancia con nuestros resultados, la naturaleza glicolítica de las líneas cíbridas construidas con el fondo nuclear de osteosarcoma 143B había sido publicada anteriormente (Desquiret, Loiseau et al. 2006).

II.7 Marcadores de daño oxidativo

Las mitocondrias son la mayor fuente celular de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Skulachev 2004). Las ROS actúan como segundo mensajero a bajas concentraciones. Sin embargo, altas cantidades han sido asociadas con muchas patologías (Indo, Davidson et al. 2007). La principal ROS producida en la mitocondria es el anión superóxido (Bandy, Moon et al. 1990) que se produce por la reacción temprana de los electrones de los intermediarios semiubiquinona de la cadena con el oxígeno (Boveris and Chance 1973). El anión superóxido se convierte a H₂O₂ por dismutación espontánea o por la acción de la superóxido dismutasa mitocondrial o superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD) (Weisiger and Fridovich 1973).

El estudio de la producción de ROS se realizó a distintos niveles. En primer lugar, se determinaron los niveles *in vivo* de los principales ROS, es decir, O_2^- y de H_2O_2 . No encontramos diferencias en ninguno de ellos entre ambos haplogrupos (Figura IV.32).

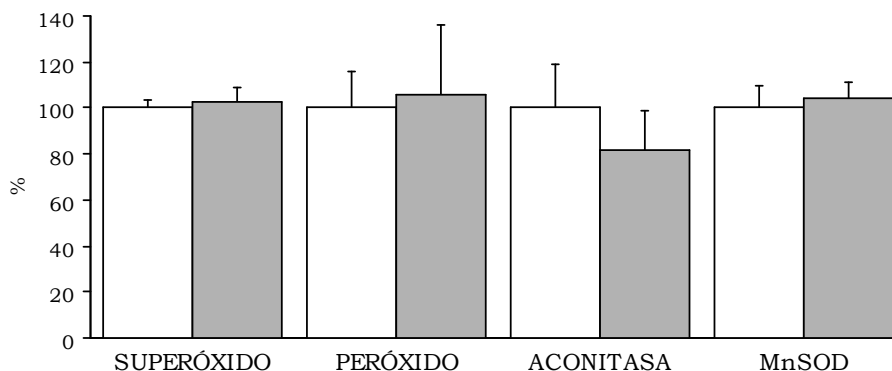


Figura IV.32: Marcadores de producción de ROS en líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y Uk. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y Uk, respectivamente. El valor medio del total de las líneas del haplogrupo H se consideró 100%. Las líneas finas verticales marcan la desviación estándar. Producción mitocondrial de anión superóxido: H, $100,0 \pm 3,1\%$ (5); Uk, $103,0 \pm 6,3\%$ (5). Peróxido de hidrógeno celular: H, $100,0 \pm 15,7\%$ (5); Uk, $105,9 \pm 30,5\%$ (5). Actividad aconitasa; H, $100,0 \pm 19,2\%$ (5); Uk, $81,4 \pm 17,5\%$ (5) y Niveles de mRNA de MnSOD: H, $100,0 \pm 9,8\%$ (5); Uk, $104,2 \pm 6,8\%$ (5).

En segundo lugar, se realizó la estimación indirecta del daño oxidativo a los centros Fe-S, mediante el estudio enzimático de la enzima del ciclo de Krebs aconitasa (Gardner, Nguyen et al. 1994), cuya actividad se ve altamente dañada por la acción del anión superóxido (Gardner 2002). No hubo diferencias significativas en la actividad aconitasa entre las líneas celulares del haplogrupo H y del Uk (Figura IV.33.C).

Como medida indirecta determinamos mediante RT-PCR los niveles de expresión de la MnSOD, enzima encargada de transformar el O_2^- en H_2O_2 . No se encontraron diferencias significativas entre ambos haplogrupos en los niveles de mRNA.

Estudios en ratón (Moreno-Loshuertos, Acin-Perez et al. 2006) evidenciaron que aquellas variantes genéticas poblacionales más productoras de ROS provocaban mayores niveles de mtDNA y que tras el tratamiento con el antioxidante N-acetil-Cisteína (NAC), únicamente aquellas variantes cuya

producción de ROS era mayor veían reducidos sus niveles de mtDNA frente aquellas menos “oxidativas”, donde la cantidad de mtDNA no se veía afectada tras el tratamiento.

Así, por último, realizamos el estudio de la dosis genómica mitocondrial de nuestras líneas celulares tras el tratamiento con NAC. Aunque en ambas filogenias disminuyeron los niveles de mtDNA después del tratamiento con NAC (Figura IV.33), el efecto fue mayor en las líneas híbridas pertenecientes al haplogrupo H. Curiosamente, tras el tratamiento con el antioxidante se perdió la diferencia entre ambos haplogrupos (Figura IV.33).

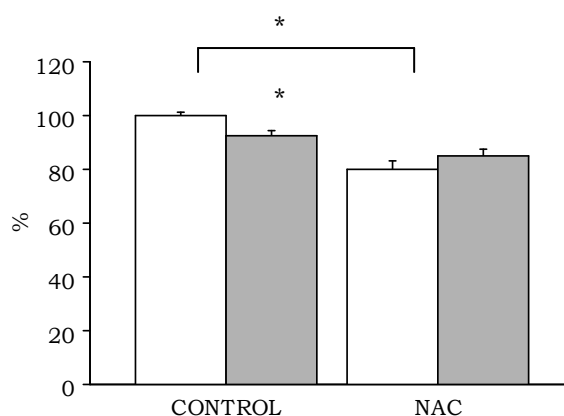


Figura IV.33: Niveles de mtDNA tras el tratamiento con NAC. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y Uk, respectivamente. El valor medio de los valores de mtDNA de los híbridos H sin N-acetil-cisteína (NAC) se ha establecido en 100%. Las líneas finas verticales marcan la desviación estándar. H, 100,0 ± 2,6% (5); H (NAC), 79,8 ± 7,0% (5); Uk, 92,7 ± 3,6% (5); Uk (NAC), 85,0 ± 5,2% (5). *P ≤ 0,026.

IV.7 Existen diferencias en el crecimiento celular entre el haplogrupo H y Uk, pero no en la viabilidad

A. Viabilidad celular

Se realizaron estudios de viabilidad celular para observar si las diferencias fenotípicas encontradas presentaban efectos en el rendimiento celular. Para ello se realizaron al menos tres experimentos independientes en los que se determinó la viabilidad celular tras crecer en medio de glucosa normal. La viabilidad fue

mayor al 99 % en todos los casos (Figura IV.34), además no se observaron diferencias en la viabilidad entre las dos filogenias.

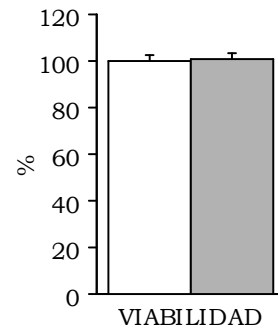


Figura IV.34: Viabilidad de las líneas híbridas mitocondriales pertenecientes a los haplogrupos H y Uk. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y Uk, respectivamente. El valor medio del total de las líneas del haplogrupo H se consideró 100%. Las líneas finas verticales marcan la desviación estándar. H, 100,0 ± 2,6% (5); Uk, 100,6 ± 2,8% (5).

B. Las líneas del haplogrupo H presentan ventajas de crecimiento

Desde los años noventa, los estudios de velocidad de crecimiento celular de líneas con defectos en el sistema OXPHOS han constituido una herramienta muy valiosa (Hayashi, Ohta et al. 1991; Robinson, Petrova-Benedict et al. 1992; Guan, Fischel-Ghodsian et al. 1996). En estos trabajos se observó que al crecer este tipo de células en un medio que contenga galactosa como principal azúcar se les está sometiendo a un estrés metabólico y tienen que recurrir a la respiración celular para producir suficiente cantidad de ATP para sobrevivir. En cambio, en un medio rico en glucosa las células pueden sobrevivir realizando mayoritariamente glucólisis. De este modo, el crecimiento en galactosa requiere una cadena de transporte electrónico muy eficiente para poder sobrevivir. Por ello, una forma de medir la eficiencia de la cadena de transporte electrónico es cultivarlas en ambos medios durante varios días y estudiar su crecimiento.

Los estudios de crecimiento celular desarrollados en esta tesis doctoral se realizaron de dos formas. La tradicional, a través de la determinación del tiempo de doblaje (DT) (Hayashi, Ohta et al. 1991; Robinson, Petrova-Benedict et al. 1992; Guan, Fischel-Ghodsian et al. 1996) y una nueva técnica puesta a punto

en nuestro laboratorio basada en la competición celular (Gomez-Duran, Pacheu-Grau et al. 2010).

La capacidad de crecimiento en glucosa fue la misma en las líneas celulares de ambos haplogrupos (Figura IV.35). Sin embargo, en galactosa, el crecimiento de las líneas celulares del haplogrupo Uk fue más lento que el de las líneas del haplogrupo H, aunque esa diferencia no fue significativa (Figura IV. 35).

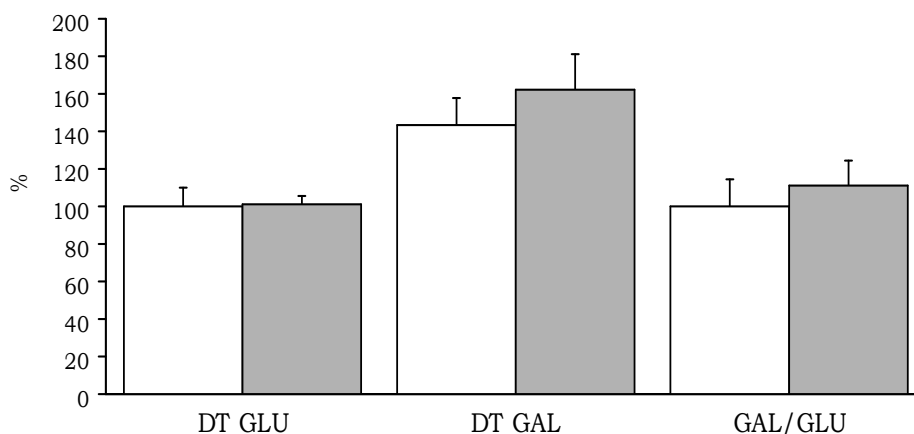


Figura IV.35: Tiempo de doblaje en líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y Uk. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y Uk, respectivamente. El valor medio DT de glucosa se ha fijado en 100%. Las líneas finas verticales marcan la desviación estándar. DTGlu: H, 100,0 ± 9,7% (5); Uk, 100,9 ± 4,6% (5). DTGal: H, 143,8 ± 14,0% (5); Uk, 162,6 ± 19,0% (5). Cociente Gal / Glu: H, 100,0 ± 13,9% (5); Uk, 110,6 ± 13,6% (5).

En segundo lugar, utilizamos experimentos de mezcla para estimar el crecimiento celular. Para ello cada línea celular se mezcló con cada una del haplogrupo contrario y se crecieron en medio de glucosa y galactosa hasta que llegaron a semiconfluencia, unos 10 días aproximadamente. Pasado ese tiempo se observó mediante RT-PCR cuál era el genotipo predominante, referido a la mezcla de partida.

El porcentaje del genotipo H fue significativamente más alto que en la mezcla inicial, tanto en medio de glucosa como en el de galactosa. Paralelamente, el porcentaje de genotipo H en la galactosa fue mayor al de glucosa (Figura IV.36), mostrando una ventaja replicativa de este genotipo frente al Uk.

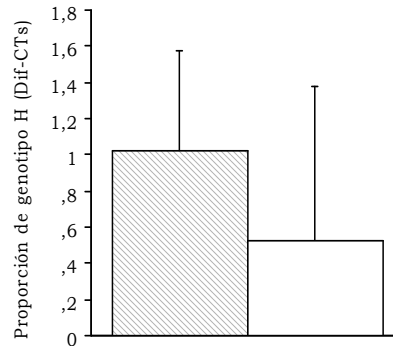


Figura IV.36: Capacidad de crecimiento en líneas híbridas pertenecientes al haplogrupo H (blanco) y Uk (gris). Los diagramas de barras rayas transversales representan el crecimiento en medio de glucosa, y las blancas en medio de galactosa. Se representa el porcentaje de genotipo H como $\Delta\Delta Ct$ con respecto a la mezcla inicial. Las líneas finas verticales marcan la desviación estándar. Glucosa: $0,6 \pm 0,8$ (16); Galactosa: $1,1 \pm 0,5$ (16). *P = 0,023.

III. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE CÍBRIDOS DEL HAPLOGRUPO J

La filogenia mitocondrial J fué el primer haplogrupo mitocondrial vinculado con una patología, la enfermedad de LHON, a finales de los 90 (Brown, Sun et al. 1997; Hofmann, Jaksch et al. 1997; Lamminen, Huoponen et al. 1997; Torroni, Petrozzi et al. 1997). Paradójicamente, también ha sido relacionado con una disminución de la penetrancia de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de parkinson (van der Walt, Nicodemus et al. 2003) y se encuentra sobrerrepresentado en ancianos de varias poblaciones europeas (De Benedictis, Rose et al. 1999; Ross, McCormack et al. 2001; Niemi, Hervonen et al. 2003). Por lo tanto, se ha relacionado este clado con un efecto “protector” en enfermedades asociadas a la edad en distintas poblaciones europeas, frente al clado H, asociado con “susceptibilidad” a este tipo de patologías (Herrnstadt and Howell 2004).

El segundo estudio realizado en esta tesis doctoral representa la caracterización fenotípica de las variantes que definen el haplogrupo J, utilizando el haplogrupo H como control. De forma previa al análisis varios factores fueron tenidos en cuenta.

III.1 Elección de una población celular representativa del haplogrupo J

A. Selección de la muestra

Se construyeron varias líneas celulares por filogenia para evitar posibles efectos clonales. En total, el número de líneas cíbridas transmitocondriales destinadas al desarrollo de este trabajo fueron 14, de ellas 9 pertenecientes al clado J y 5 al clado H. Dentro de la filogenia J, 4 líneas celulares correspondieron al subhaplogrupo J1c y 4 al J2, ambos representantes de los linajes más importantes del haplogrupo J en Europa (Carelli, Achilli et al. 2006), además, una línea celular, la denominada 5J, pertenece al sub-linaje J1b. Este haplogrupo es más típico de Oriente medio (Quintana-Murci, Chaix et al. 2004;

Houshmand, Sanati et al. 2005). En el caso de las líneas celulares pertenecientes al haplogrupo H, se utilizaron las mismas que en el estudio del haplogrupo Uk.

B. Análisis por PCR-RFLP del SNP m.7028C

En segundo lugar comprobamos que nuestras líneas híbridas portaban el haplogrupo de interés por el cuál habían sido construidas. La ratificación se llevó a cabo mediante PCR-RFLP en los DNAs extraídos de todas las líneas celulares del estudio. Se eligió un SNP, la posición m.7028C, que define al haplogrupo H y se determinó su presencia y/o ausencia (Torrioni, Petrozzi et al. 1997; Ruiz-Pesini, Lapena et al. 2000).

Tal y como se puede ver en la figura a continuación, todas las líneas híbridas pertenecientes al haplogrupo H presentaban la posición m.7028C, frente a las del haplogrupo J que presentaban la m.7028T.

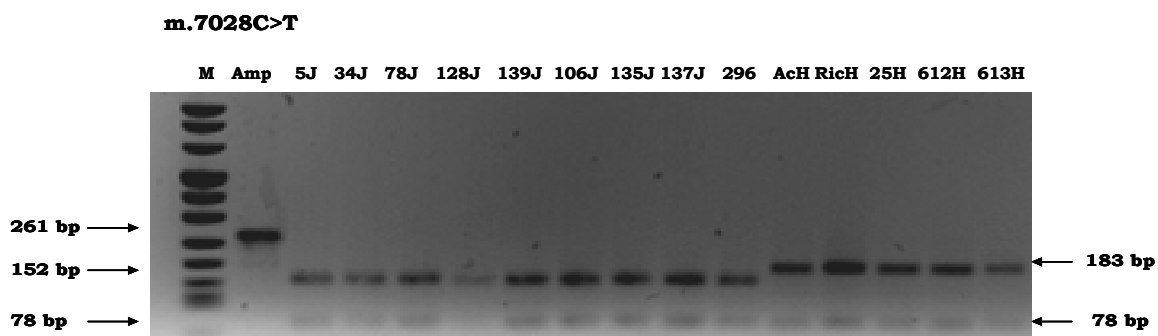


Figura IV.37: Análisis mediante PCR-RFLP del genotipo del mtDNA en la posición 7028. Patrón de bandas de electroforesis para el cambio 7028C>T. El cambio de C a T crea un nuevo sitio de restricción para la enzima AluI. Se amplificó un fragmento de 261bp que se digirió con la enzima AluI dando lugar a tres fragmentos en las muestras que pertenecen al haplogrupo J (152, 78 y 31 pb) y dos fragmentos en los pertenecientes al haplogrupo H (183 y 78 pb). El fragmento de 31 pb no se observa en el gel.

C. Caracterización genética

Los estudios de efectos fenotípicos de polimorfismos poblacionales han de ser minuciosamente planeados. Es fundamental conocer todas las posibles variantes privadas (las que ocurren en las puntas de las ramas individuales del árbol filogenético) que puedan tener efecto fenotípico (Montoya, Lopez-Gallardo

et al. 2009). Con tal fin, se llevó a cabo la secuenciación completa del mtDNA de todas las líneas híbridas y la construcción del árbol filogenético. En la siguiente figura, se puede encontrar la representación del mismo, que incluye únicamente la secuencia del mtDNA de las líneas celulares pertenecientes al haplogrupo J. Las secuencias completas de las líneas híbridas del clado H se encuentran recogidas en el capítulo anterior (Figura IV.11).

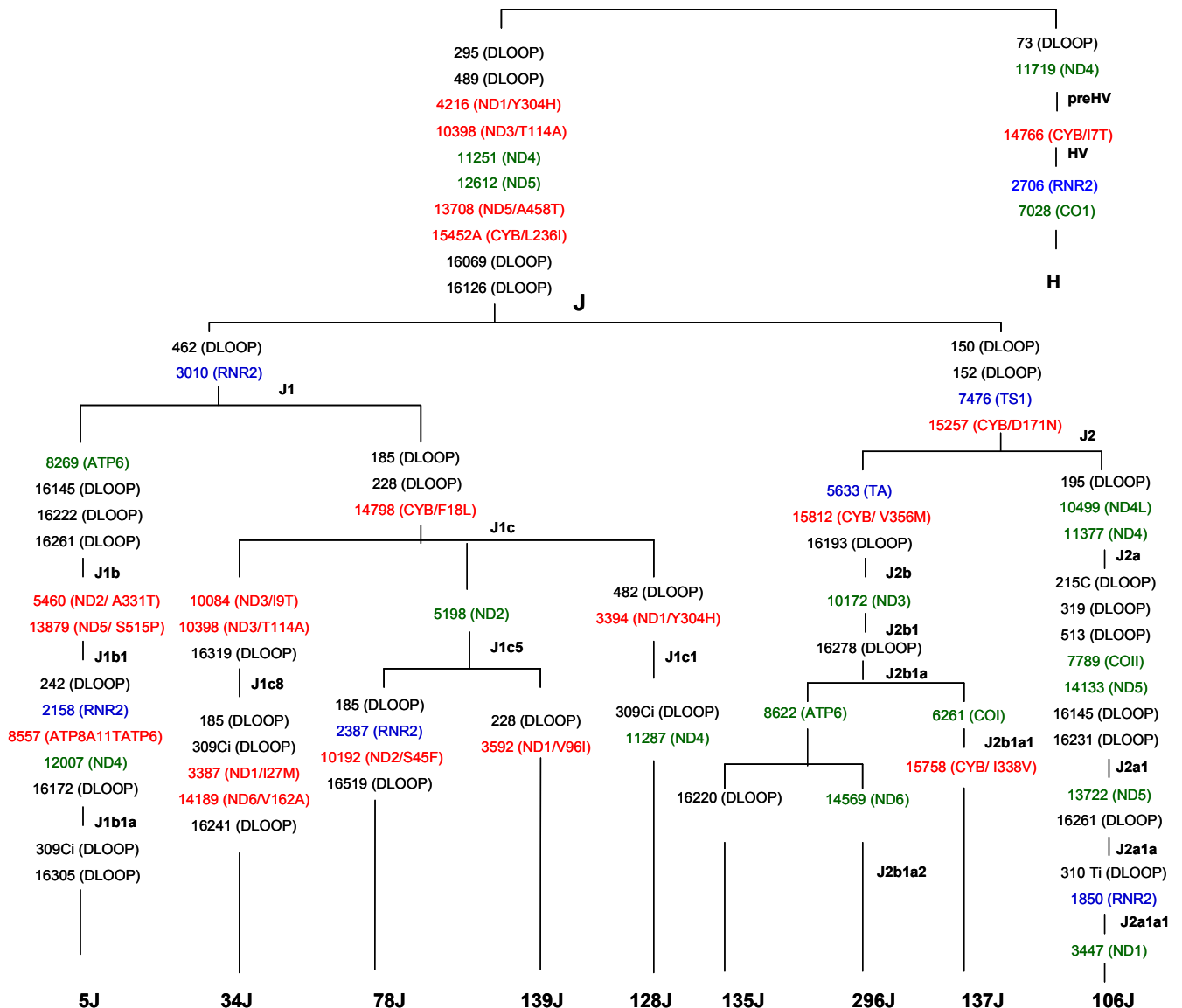


Figura IV.38: Árbol filogenético del mtDNA de las líneas híbridas pertenecientes al haplogrupo J. Los colores negro, verde, rojo y azul definen polimorfismos en la región de control, cambios sinónimos y no sinónimos en las proteínas y cambios en los RNA, respectivamente. El gen afectado o la secuencia de mtDNA se muestran entre paréntesis. Para las mutaciones no sinónimas, el aminoácido original, el que lo sustituye y la posición en la proteína también se indica.

Las mutaciones encontradas se analizaron en una base de datos de mtDNA que comprende más de 3.000 secuencias de humanos (Ruiz-Pesini, Lott et al. 2007). Se hallaron 19 mutaciones individuales (10 en la región de control, 3 sinónimas y 5 no sinónimas en genes que codifican para proteínas y 1 en los genes del RNA). De ellas, 17 habían sido descritas anteriormente. Las dos restantes, estaban localizadas en los mtDNAs de las líneas celulares 139J y 34J y dan lugar a cambios en los genes *MT-ND* del complejo I. Así, en la línea celular 139J la transición en *MT-ND1* m.3592A>G da lugar un cambio de valina a isoleucina en la posición 96. En la línea celular 34J, el cambio en la posición m.14189A>G del gen *MT-ND6* provoca un cambio de aminoácido de valina a isoleucina en la posición 162. Ambas mutaciones se encontraron en forma homoplásmica, y una estimación de su índice patológico (Pereira, Soares et al. 2011) ha dado indicios de su baja patogeneicidad. Por ello, consideramos que todas nuestras líneas celulares eran convenientes para la caracterización de los efectos fenotípicos del haplogrupo J.

III.2 Los niveles de mtDNA y mtRNA están reducidos en las líneas híbridas pertenecientes al haplogrupo J

A. La dosis genómica mitocondrial es menor en las líneas híbridas del haplogrupo J

El mtDNA se encuentra en unidades DNA-proteína denominadas nucleoides. Cada nucleoide contiene varias copias de mtDNA, y cada mitocondria contiene varios de ellos (Alam, Kanki et al. 2003). Estudios en líneas híbridas de osteosarcoma han evidenciado la existencia de una relación directa entre la dosis genómica mitocondrial y la funcionalidad del sistema OXPHOS (Rocher, Taanman et al. 2008).

La determinación de los niveles de mtDNA en nuestras líneas híbridas mostró una caída significativa de un 11,2% de la dosis genómica en las líneas celulares del haplogrupo J frente al haplogrupo H (Figura IV.39).

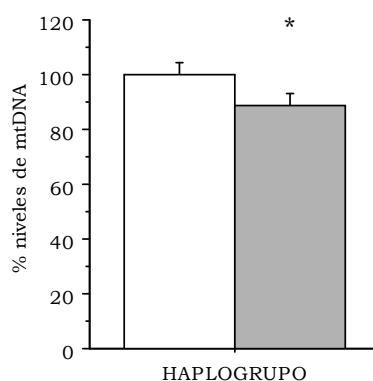


Figura IV.39: Niveles de mtDNA en las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y J, respectivamente. El valor medio del total de las líneas del haplogrupo H se consideró 100%. Las líneas finas verticales marcan la desviación estándar. H, 100,0 ± 4,2% (5); J, 88,8 ± 4,6% (9). P= 0,0007.

B. Los niveles de expresión de algunos de los genes que participan en la replicación son iguales en ambas filogenias

En líneas híbridas del haplogrupo J con un fondo genético nuclear linfoblastoide se ha observado un aumento de la unión del TFAM y un aumento de la dosis genómica mitocondrial comparado con las del haplogrupo H (Suissa, Wang et al. 2009). El TFAM es una de las proteínas responsables de la replicación del mtDNA. Así, cuantificamos los niveles de mRNA de otras proteínas que participan en la replicación (Bruni, Polosa et al. 2010).

El análisis estadístico reveló que no existían diferencias en ninguno de los mRNAs estudiados entre las líneas celulares del haplogrupo H y el haplogrupo J. Este resultado parece indicar que otro factor es el determinante en la disminución de la dosis genómica observada en las líneas celulares del haplogrupo J.

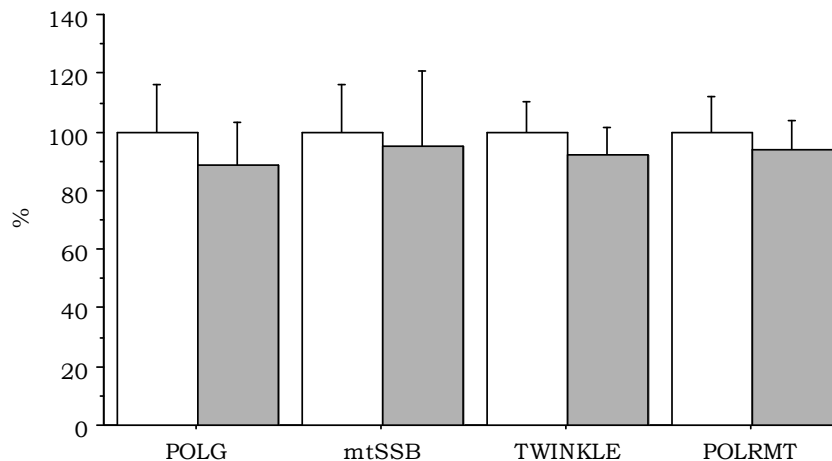


Figura IV.40: Niveles de mRNA de genes implicados en la replicación del mtDNA de las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y J, respectivamente. El valor medio del total de las líneas del haplogrupo H se consideró 100%. Las líneas finas verticales marcan la desviación estándar. POLG: H, $100 \pm 15,9\%$ (5); J, $88,9 \pm 14,56\%$ (9). mtSSB: $100 \pm 16,2\%$ (5); J, $95,1 \pm 9,8\%$ (9). TWINKLE; $100,0 \pm 10,1\%$ (5); J, $92,3 \pm 9,0$ (9). POLRMT: H, $100,0 \pm 12,2\%$ (5); J, $94,0 \pm 9,0\%$ (9).

C. Los niveles de mtRNA están disminuidos en las líneas celulares de la filogenia J

En varios tejidos y líneas celulares se ha descrito una proporcionalidad entre los niveles de mtDNA y los de mtRNA (Welle, Bhatt et al. 2003; Coskun, Beal et al. 2004; Cotney, Wang et al. 2007; Karamanlidis, Nascimben et al. 2010). Así, se estudió la expresión génica mitocondrial mediante RT-PCR cuantitativa en las líneas celulares de los haplogrupos H y J. Se cuantificaron los mRNA de genes de cada uno de los complejos de la ETC codificados en el mtDNA.

El análisis reveló la existencia de una disminución en los niveles de todos los mtRNAs estudiados en las líneas híbridas pertenecientes al clado J. Este descenso era significativo en todos los genes estudiados, con excepción del *MT-RNR1*, y los mtRNAs del *MT-CYB* y *MT-COII* del complejo IV (Figura IV.41).

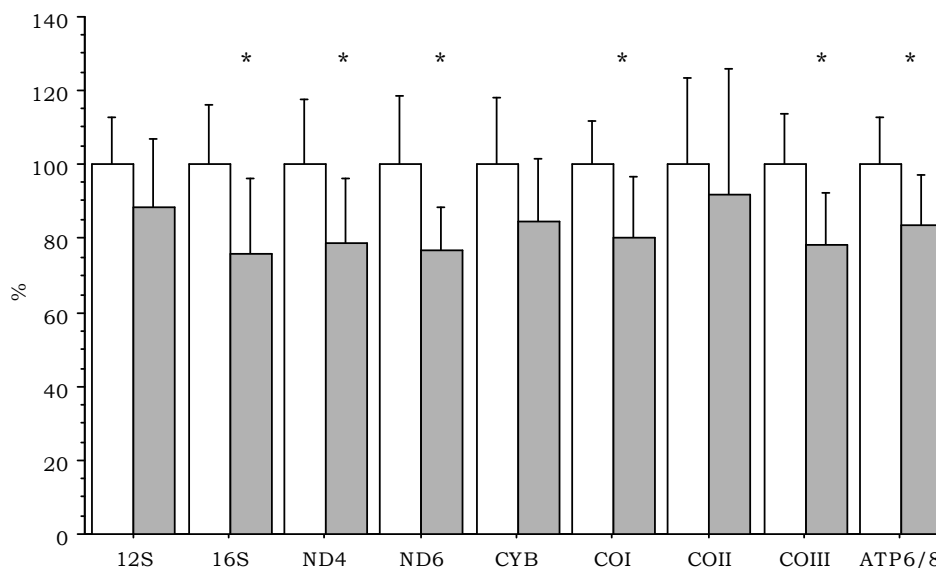


Figura IV.41: Niveles de mRNA en las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y J, respectivamente. El valor medio del total de las líneas del haplogrupo H se consideró 100%. Las líneas finas verticales marcan la desviación estándar. 12S: H, 100,0 ± 12,7 % (5); J, 88,3 ± 18,6% (9). 16S: H, 100,0 ± 16,3% (5); J, 75,7 ± 17,3% (9)*. ND4-ND4L: H, 100,0 ± 17,4% (5); J, 78,9 ± 17,3% (9)*. ND6: H, 100,0 ± 18,7% (5); J, 76,8 ± 11,9 % (9)*. CYB: H, 100,0 ± 18,2% (5); J, 84,8 ± 16,2% (9). COI: H, 100,0 ± 11,7% (5); J, 80,0 ± 16,9% (9)*. COII: H, 100,0 ± 23,1% (5); J, 91,7 ± 34,4% (9). COIII: H, 100,0 ± 13,9% (5); J, 78,0 ± 14,2% (9). ATP6-ATP8: H, 100,0 ± 12,9% (5); J, 83,6 ± 17,7% (9)*. *P<0,05.

El mtDNA se transcribe en tres unidades independientes, 1 para la cadena ligera (L) y 2 para la pesada (H1 y H2) (Montoya, Christianson et al. 1982; Fernandez-Silva, Enriquez et al. 2003). La cadena L, incluye únicamente el gen *MT-ND6* y 8 tRNAs. En la pesada, la hebra H1 incluye los rRNAs, *MT-RNR1* y *MT-RNR2* y 2 tRNAs, y la hebra H2, que se transcribe con menor frecuencia engloba, el resto de los genes codificantes del mtDNA y los rRNAs. De este modo, realizamos una cuantificación de cada una de las hebras de transcripción.

Los estudios de los productos de transcripción mitocondrial en nuestras líneas híbridas transmitocondriales mostraron una caída en todas las unidades de transcripción de las líneas celulares pertenecientes al haplogrupo J, siendo esa caída significativa únicamente en las unidades L y H1 (Figura IV.42). Este resultado podría reflejar la existencia de una regulación independiente de cada una de las unidades de transcripción, tal como se había observado anteriormente (Montoya, Gaines et al. 1983).

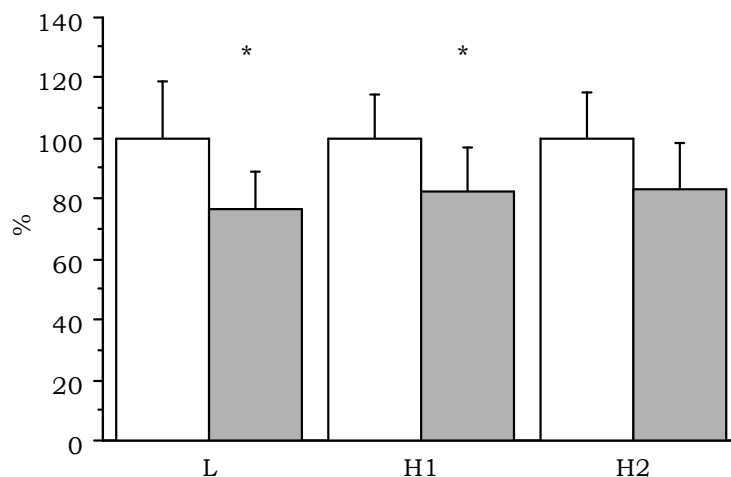


Figura IV.42: Productos de transcripción mitocondrial de las líneas cibradas pertenecientes a los haplogrupos H y J. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y J, respectivamente. El valor medio del total de las líneas del haplogrupo H se consideró 100%. Las líneas finas verticales marcan la desviación estándar. L: H, 100,0 ± 9,4% (5); J, 76,9 ± 18,5% (9)*. H1: H, 100,0 ± 14,3% (5); J, 82,1 ± 14,6% (9)*. H2, H, 100,0 ± 15,3% (5); J, 82,8 ± 15,9% (9). *P=0,046.

Además, en concordancia con Coskun *et al.* 2004, la caída observada en los niveles de *MT-ND6*, es decir de cadena L, correlacionaba de manera significativa (P=0,03) con los niveles de mtDNA (Figura IV.43.A). Paralelamente, también se observó una correlación entre los niveles de transcripción de los rRNAs (H1) y la dosis genómica mitocondrial (P=0,01).

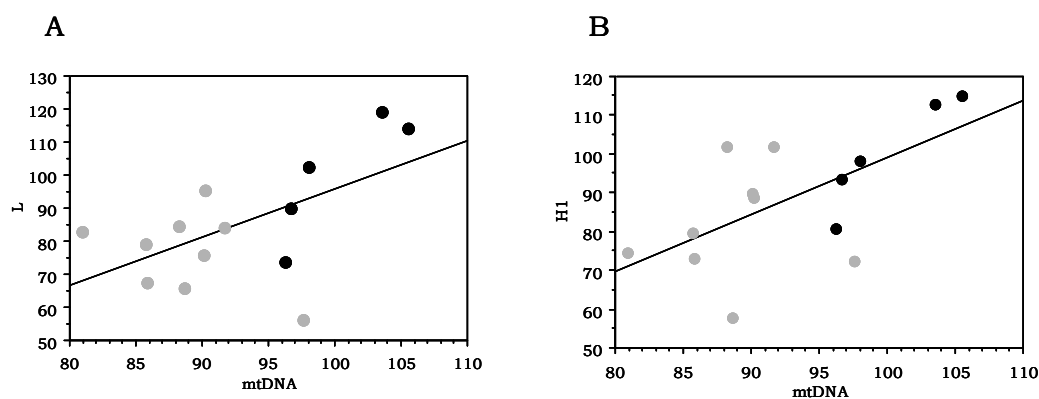


Figura IV.43: Correlación de los productos de transcripción mitocondrial y los niveles de mtDNA en las líneas cibradas pertenecientes a los haplogrupos H y J. Los puntos de color negro representan la media de cada una de las líneas celulares del haplogrupo H y los de color gris las pertenecientes al haplogrupo J. A. Correlación niveles de transcrito ND6/niveles de mtDNA. La recta obtenida tras la representación gráfica presenta la siguiente ecuación: $y = -50,3 + 1,5x$. $R^2 = 0,8$, $P = 0,03$. B Correlación cadena H1/niveles de mtDNA. La recta obtenida tras la representación gráfica presenta la siguiente ecuación: $y = -48,2 + 1,5x$. $R^2 = 0,7$, $P = 0,01$.

Por último, analizamos los niveles de mtRNA total para cada haplogrupo. Pudimos observar que existía una disminución significativa del 18,2% en los mtRNAs de las líneas híbridas pertenecientes al haplogrupo J, de forma similar a como ocurría en el caso de los niveles de mtDNA.

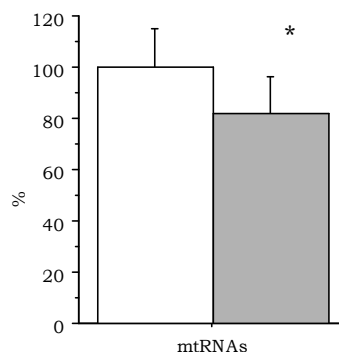


Figura IV.44: Niveles de mtRNA en las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y J, respectivamente. El valor medio del total de las líneas del haplogrupo H se consideró 100%. Las líneas finas verticales marcan la desviación estándar H, 100,0 ± 14,7% (5); J, 82,0 ± 4,7% (9). P= 0,043.

E. Niveles de mRNA de algunas de las proteínas que participan en la transcripción del mtDNA

Los niveles de mRNA de los genes codificados en el mtDNA están condicionados, entre otros, por las proteínas que participan en la transcripción del mtDNA (Bruni, Polosa et al., 2010). Se llevó a cabo la cuantificación de los mRNA de los genes de la POLRMT, el MTFB2 y el MTERF en las líneas híbridas de los haplogrupos H y J.

En la siguiente figura se muestra la cuantificación de los niveles de expresión de los genes estudiados. Como se puede observar, no encontramos diferencias significativas en ninguno de los genes estudiados entre las líneas celulares pertenecientes al haplogrupo J y el H. Así, el mecanismo que condiciona la caída de los mRNAs ha de ser otro.

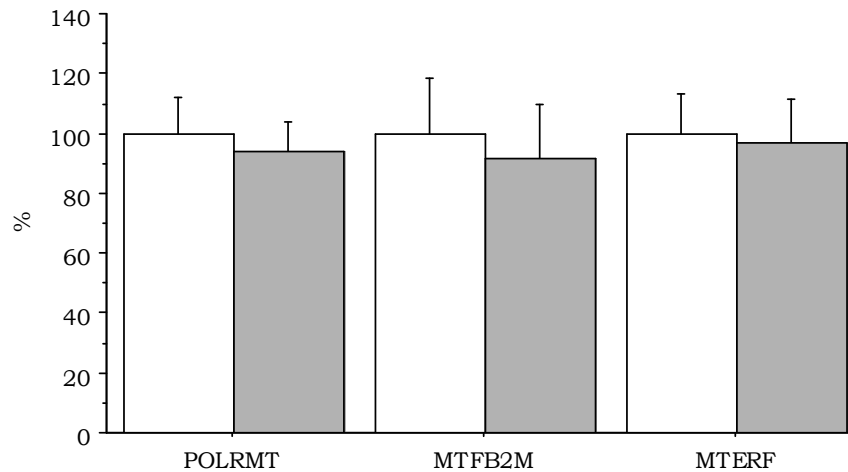


Figura IV.45: Niveles de mRNA de genes implicados en la replicación del mtDNA de las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y J, respectivamente. El valor medio del total de las líneas del haplogrupo H se consideró 100%. Las líneas finas verticales marcan la desviación estándar. POLRMT: H, 100,0 ± 12,2% (5); J, 94,0 ± 35,3% (9). TFB2M: H, 100,0 ± 18,5% (5); J, 91,8 ± 18,0% (9). MTERF: H, 100,0 ± 13,0% (5); J, 96,7 ± 14,6% (9).

III.3 La síntesis mitocondrial de proteínas está disminuida en las líneas celulares del haplogrupo J

La diferencia observada en los niveles de mtDNA y mtRNA total entre ambas filogenias nos llevó a examinar su posible influencia sobre la síntesis mitocondrial de proteínas en nuestras líneas híbridas. Para su análisis, se densitometraron tres bandas: p.MT-CO1, p.MT-ND2 y p.MT-ND3. La elección de las mismas se basó en su situación física en el gel. Una en la parte superior, otra en la media y otra inferior. Se realizaron llevaron a cabo, al menos, dos detecciones por línea celular. En la siguiente figura se muestra un ejemplo, el resto se encuentra en la figura IV.71 y en el anexo (Figuras A.11 y 12).

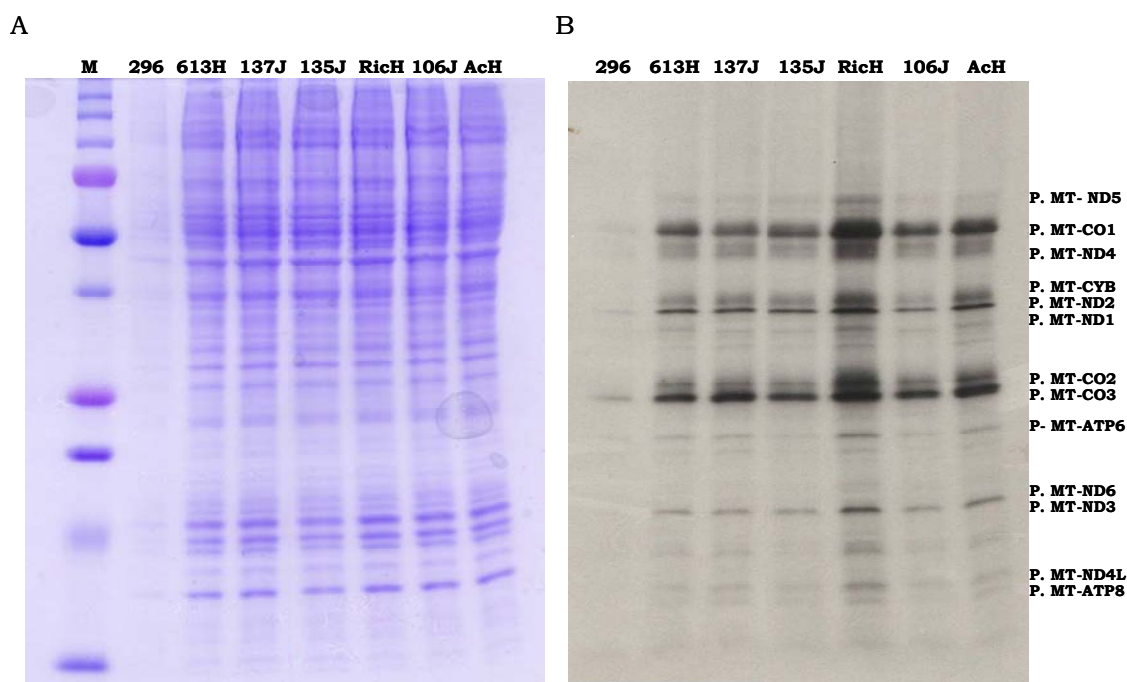


Figura IV.46: Síntesis de proteínas mitocondriales de las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J. A. Control de carga, B. Patrón de electroforesis de los productos de traducción mitocondrial de las líneas celulares híbridas. M, marcador de peso molecular.

Como se puede observar en la figura anterior, a simple vista, las líneas celulares pertenecientes al haplogrupo J parecían presentar menores niveles de productos de traducción mitocondrial que las del haplogrupo H, para una misma cantidad de proteína cargada (Figura IV.46.A). El análisis estadístico reveló, en efecto, que aquellas pertenecientes al haplogrupo J presentaban una disminución significativa de un 29,6% en los productos de traducción con respecto a las del haplogrupo H (Figura IV.47).

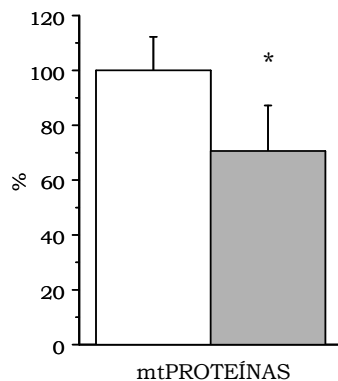


Figura IV.47: Síntesis mitocondrial de proteínas de las líneas cíbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y J, respectivamente. El valor medio del total de las líneas del haplogrupo H se consideró 100%. Las líneas finas verticales marcan la desviación estándar. H, $100,0 \pm 12,1\%$ (5); J, $70,4 \pm 16,6\%$ (9). $P = 0,0046$.

Curiosamente, el descenso en los niveles de proteínas mitocondriales correlacionaba de forma significativa ($P=0,0016$) con la caída de los niveles de mtDNA.

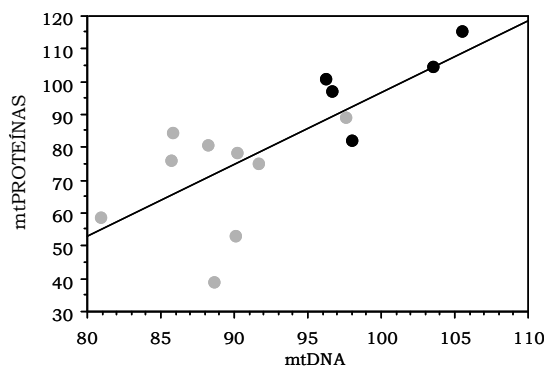


Figura IV.48: Correlación de los niveles de proteínas mitocondriales y los niveles de mtDNA en las líneas cíbridas pertenecientes haplogrupo H y J. Los puntos de color negro representan la media de las líneas celulares del haplogrupo H y los de color gris las pertenecientes al haplogrupo J. La recta obtenida tras la representación gráfica tiene la siguiente ecuación: $y = -121,22,23x$. $R^2 = 0,75$, $P = 0,002$.

Paralelamente, observamos que, igual que ocurría en el caso del haplogrupo Uk, hay una correlación significativa entre la síntesis de proteínas mitocondrial y los niveles de transcritos de la hebra H1, que incluye los dos rRNA, tal como se puede observar en la siguiente figura.

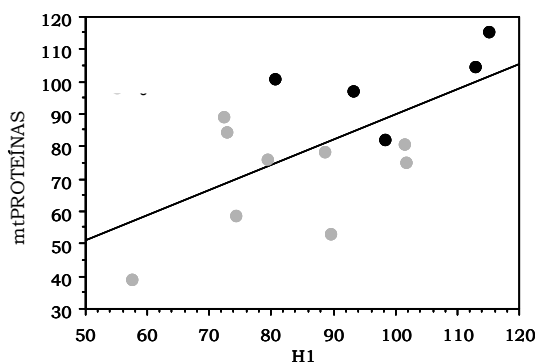


Figura IV.49: Correlación de los niveles de transcrito H1 y los niveles de los productos de traducción mitocondrial en las líneas híbridas pertenecientes al haplogrupo H y J. Los puntos de color negro representan la media de cada una de las líneas celulares del haplogrupo H y los de color gris las pertenecientes al haplogrupo J. La recta obtenida tras la representación gráfica tiene la siguiente ecuación: $y = -12,1 + 0,8x$, $R^2 = 0,4$, $P = 0,04$.

III.4 Estudio de la fracción celular ocupada por mitocondrias

Seguidamente, analizamos la fracción celular ocupada por mitocondria a distintos niveles, para analizar si todos los cambios descritos hasta el momento eran debidos a diferencias en el número de mitocondrias.

En primer lugar determinamos la actividad enzimática de la citrato sintasa (CS), como reflejo del número o el volumen mitocondrial (Krahenbuhl, Schafer et al. 1996). Observamos que no había diferencias significativas en la actividad específica de la CS entre ambos haplogrupos (Figura IV.50.A).

En segundo lugar, se determinó la actividad enzimática y la cantidad del CII como marcador de la superficie de la membrana interna mitocondrial. No observamos diferencias entre ambos haplogrupos, ni en actividad (Figura IV.50.A), ni en cantidad del cociente CII/ α -Actina (Figura IV.50.A y B).

En tercer lugar, estudiamos la superficie de la membrana mitocondrial interna (MIMS), como el contenido en cardiolipina, que detectamos mediante citometría de flujo (Petit, Huet et al. 1994). En este caso, tampoco encontramos diferencias significativas entre ambos fondos genéticos (Figura IV.50).

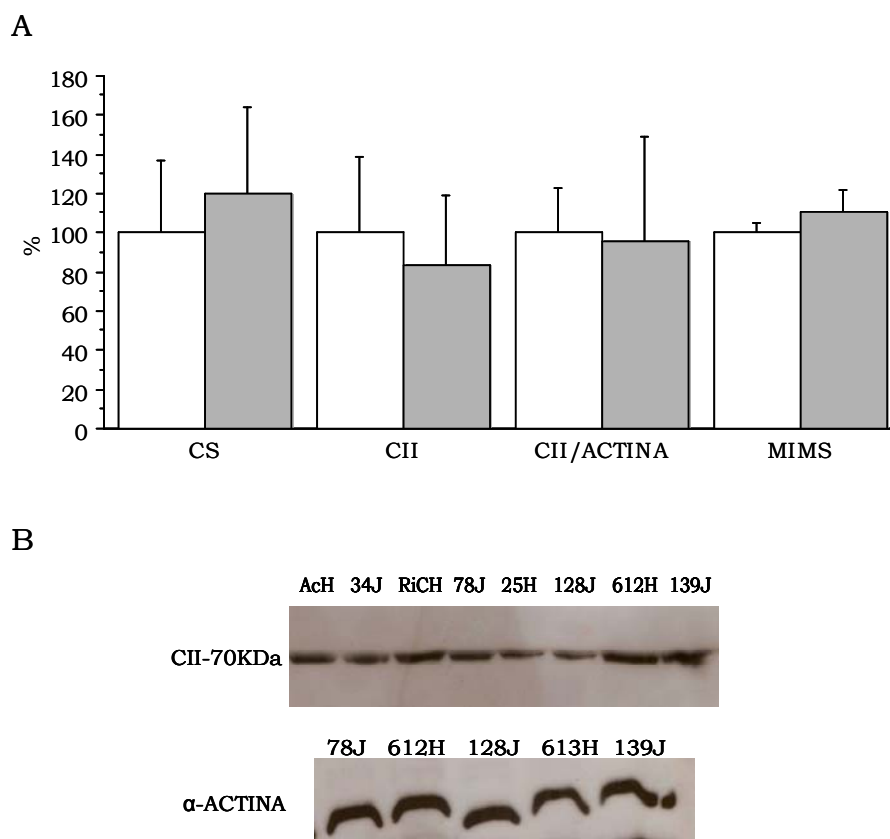


Figura IV.50: Fracción celular ocupada por mitocondria mitocondriales de las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y J, respectivamente. El valor medio del total de las líneas del haplogrupo H se consideró 100%. Las líneas finas verticales marcan la desviación estándar. CS: H, 100,0 ± 37,3% (5); J, 119,9 ± 44,0% (9). CII: H, 100,0 ± 38,9% (5); J, 83,3 ± 35,4% (9). Estudio del cociente CII/ Actina: H, 100,0 ± 22,5% (5); J, 95,3 ± 53,6% (8) y MIMS: H, 100,0 ± 5,0% (5); J, 110,9 ± 11,0% (9). B. Ejemplo representativo de *Western-Blot* para la detección de las proteínas subunidad de 70KDa del complejo II y subunidad α de la actina. CII-70KDa representa la subunidad de 70KDa del CII.

Los resultados obtenidos en los distintos marcadores indicaban que las diferencias observadas en cantidad de proteínas mitocondriales, mtRNA y mtDNA no vienen determinadas por diferencias en el volumen y/o número de mitocodrias y/o superficie de membrana mitocondrial.

III.5 No hay diferencias en actividad, ni en cantidad de CIV entre los fondos genéticos mitocondriales H y J

Se ha descrito que los niveles de mtDNA condicionan la función OXPHOS (Rocher, Taanman et al. 2008). Uno de los métodos más utilizados para analizar la funcionalidad del sistema OXPHOS es la determinación de la actividad de la citocromo c oxidasa o CIV. Para su estudio realizamos dos determinaciones independientes tanto de su actividad, como de la cantidad de proteína.

La determinación la actividad enzimática se llevó a cabo con una medida espectrofotométrica, con análisis paralelo de la actividad de la CS (en la misma muestra), y paralelamente utilizando un *kit* comercial que permitía realizar una medida secuencial de la actividad específica y los niveles del complejo en el mismo pocillo. Todas las medidas se llevaron a cabo por triplicado en al menos tres experimentos independientes.

No encontramos diferencias entre ambos haplogrupos, ni en actividad del CIV por mitocondria, descrita en la siguiente figura como el cociente CIV/CS, ni en actividad específica, descrita como ACTIVIDAD CIV.

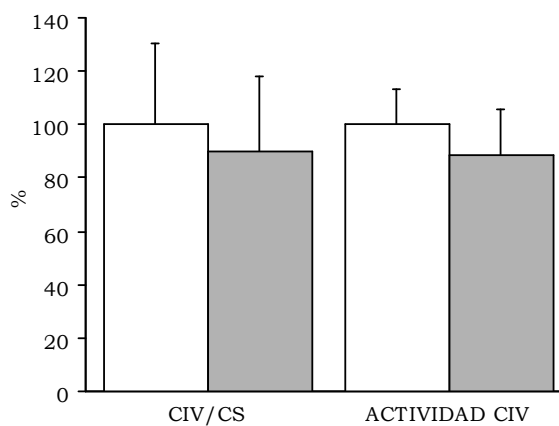


Figura IV.51: Actividad del complejo CIV mitocondrial de las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y J, respectivamente. El valor medio del total de las líneas del haplogrupo H se consideró 100%. Las líneas finas verticales marcan la desviación estándar. CIV/CS: H, 100,0 ± 30,4 % (5); J, 89,9 ± 28,3 % (9). Actividad específica: H, 100,0 ± 13,5 % (5); J, 88,6 ± 17,1 % (9).

La cuantificación de los niveles de complejo se realizó mediante dos métodos paralelos. Utilizando el kit comercial, tal como se ha explicado anteriormente, y mediante *Western-Blot*. Para el estudio por *Western-Blot* se cuantificó la cantidad de la subunidad p.MT-CO1, esta subunidad de la citocromo c oxidasa está codificada en el mtDNA y es una de las primeras en insertarse en la membrana durante el ensamblaje de complejo proteico (Fernandez-Vizarra, Tiranti et al. 2009). Para su normalización se utilizó la señal de la subunidad de 70KDa del CII como proteína control.

Tampoco se encontraron diferencias en los niveles de complejo IV. Ni utilizando el kit comercial, representado en la siguiente figura como CANTIDAD CIV, ni en el cociente p.MT-CO1/CII, tal como se puede observar en la siguiente figura.

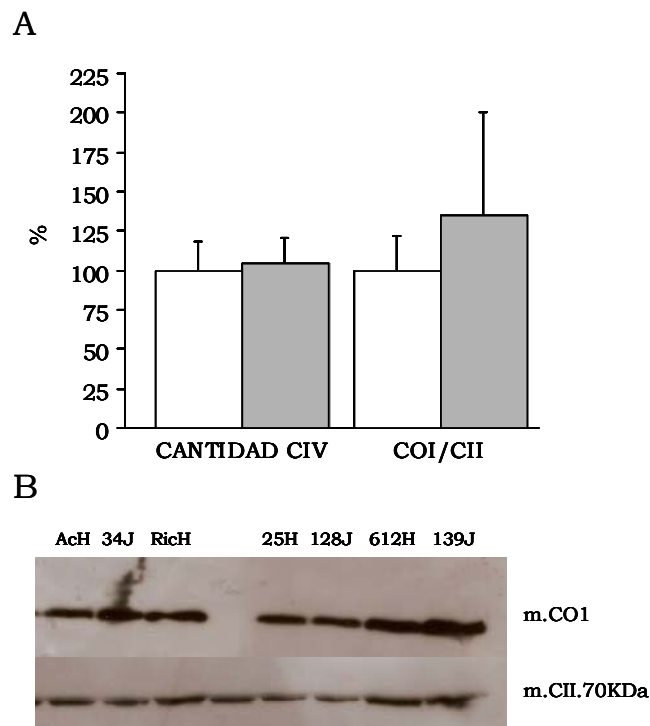


Figura IV.52: Niveles de CIV en las líneas celulares pertenecientes a los haplogrupos mitocondriales H y J. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y J, respectivamente. El valor medio de cada parámetro de las líneas pertenecientes al haplogrupo H se fijó como 100%. Las líneas finas verticales representan la variación estándar. CANTIDAD CIV: H, 100,0 ± 18,1% (5); J, 104,2 ± 16,6% (9). Estudio densitométrico del cociente COI/CII: 100,0 ± 21,8% (5); J, 134,3 ± 65,8% (7). B. Ejemplo representativo de detección de *Western-Blot*. m.CO1 es la abreviatura de p.MT-CO1.

Interesantemente, se observó que existía una correlación significativa entre los niveles de CIV y la actividad del complejo, determinados utilizando el kit comercial. Los datos de dicha correlación se muestran en la siguiente figura.

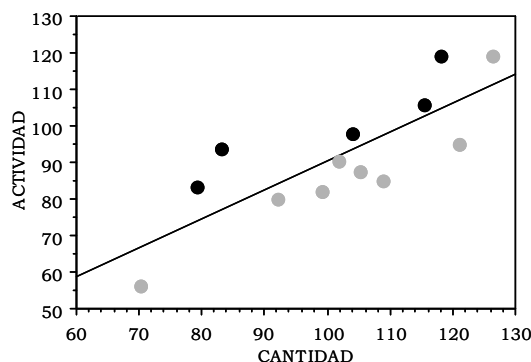


Figura IV. 53: Correlación de la cantidad y la actividad de CIV en las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J. Los puntos de color negro representan la media de cada una de las líneas celulares del haplogrupo H y los de color gris las pertenecientes al haplogrupo J. La recta obtenida tras la representación gráfica tiene la siguiente ecuación: $y = 11,06 + 0,794x$, $R^2 = 0,80$, $P = 0,0005$.

III.6 La cantidad de ATP, el MIMP y la tasa de respiración celular son diferentes entre las líneas híbridas de los haplogrupos H y J

A. El consumo de O_2 es menor en las líneas del haplogrupo J

El consumo de oxígeno es uno de los parámetros más utilizados a la hora de realizar un estudio exhaustivo de la capacidad de la cadena de transporte electrónico. Se realizaron al menos tres determinaciones por línea, utilizando un sistema de alta resolución (Oroboros®).

La determinación de consumo de oxígeno endógeno mostró que las líneas pertenecientes al clado J presentaban una disminución significativa de un 30,8%, como se puede observar en la Figura IV.54. Éste correlacionaba significativamente ($P=0,009$) con la actividad específica de complejo IV (Figura IV.55). La respiración filtrante, es decir, aquella inhibida con oligomicina también presentaba una caída significativa en las líneas pertenecientes al haplogrupo J ($P=0,01$). Sin embargo, en la respiración desacoplada con FCCP no se encontraron

diferencias significativas entre ambos haplogrupos, tal y como se puede observar en la siguiente figura.

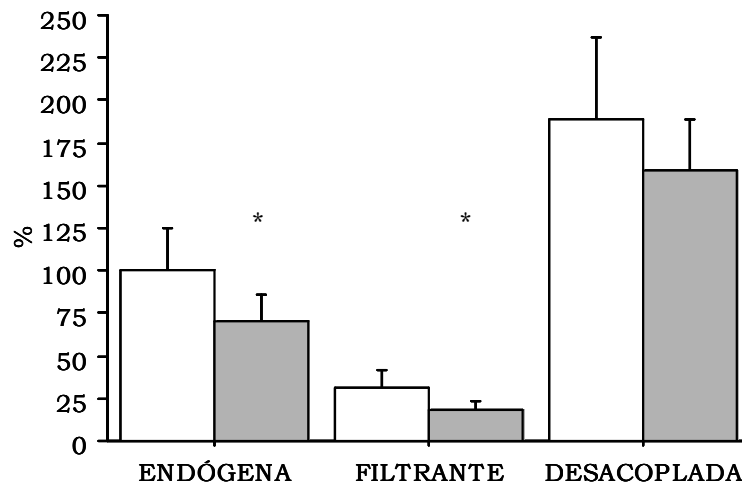


Figura IV.54: Consumo de oxígeno en las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J. La media de los valores de consumo de oxígeno de las líneas celulares del haplogrupo H se muestra en blanco y la de las del haplogrupo J en gris. La respiración endógena media de las líneas celulares pertenecientes al haplogrupo H ha sido fijada en 100%. Las líneas finas verticales marcan la desviación estándar. Consumo de oxígeno endógeno; H, 100 ± 24,5% (5); J, 70,2 ± 15,6% (9). Filtrante; H, 30,9 ± 11,2% (9). J, 18,0 ± 5,0% (9). Desacoplada; H, 189,2 ± 47,3% (5); J, 159,3 ± 29,5% (9). * P=0,02.

Algunos autores han encontrado una correlación entre el consumo de oxígeno celular y la VO_{2max} con los niveles de mtDNA (Bentlage, 1996; Laderman, 1996). De forma similar, encontramos que, aunque los niveles de CIV de las líneas del haplogrupo J no presentaban diferencias con respecto a los del H, la caída en el consumo de oxígeno correlacionaba significativamente con la actividad del complejo IV. En la siguiente figura se muestra la representación gráfica.

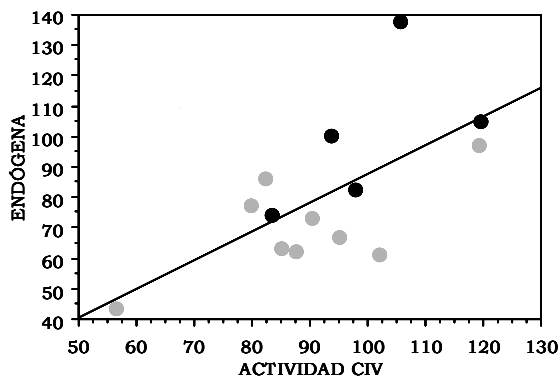


Figura IV. 55: Correlación de la actividad del CIV y la tasa de respiración endógena en las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J. Los puntos de color negro representan la media de cada una de las líneas celulares del haplogrupo H y los de color gris las pertenecientes al haplogrupo J. La recta obtenida tras la representación gráfica presenta la siguiente ecuación $y = -6,48 + 0,94x$, $R^2 = 0,5$, $P = 0,0094$

B. El MIMP es menor en las líneas del haplogrupo J

A altas fuerzas proton-motrices la respiración cae (Brand 2000). La disminución significativa en el consumo de oxígeno en los híbridos del haplogrupo J sugiere un aumento del MIMP en estas líneas celulares con respecto a las del haplogrupo H. Sin embargo se ha visto en líneas híbridas de osteosarcoma 143B que la inhibición del CI, bien con rotenona (Barrientos and Moraes 1999), bien por la presencia de mutaciones en el mismo (McKenzie, Liolitsa et al. 2007) da lugar a una inhibición de la respiración celular y con ello a una disminución del potencial de membrana mitocondrial interna, secundario a un menor bombeo de protones, por la existencia de un flujo de electrones inferior a través de los complejos de la ETC.

En concordancia con estos datos, la determinación de MIMP mostró una disminución significativa en las líneas pertenecientes al clado J, tal y como se puede observar en la figura expuesta a continuación. Este resultado sugería un flujo de electrones más lento a través de la cadena por parte de las líneas pertenecientes al haplogrupo J.

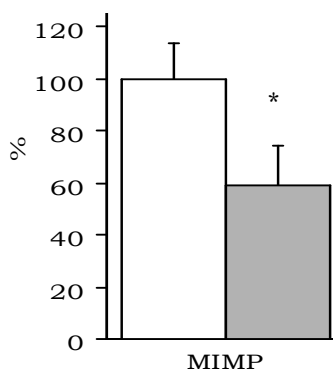


Figura IV.56: Potencial de membrana de membrana interna mitocondrial en las líneas celulares pertenecientes a los haplogrupos mitocondriales H y J. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y J, respectivamente. El valor medio de cada parámetro de las líneas pertenecientes al haplogrupo H se fijó como 100%. Las líneas finas verticales representan la variación estándar. MIMP: H, 100,0 ± 13,5% (5); J, 58,9 ± 15,7% (9). P = 0,006.

C. La cantidad de ATP es diferente entre las líneas celulares pertenecientes al haplogrupo H y J

Como la síntesis de ATP es dependiente del MIMP, decidimos medir los niveles de ATP en nuestras líneas celulares en distintas condiciones. Se realizaron al menos tres experimentos independientes. Los datos se expresan como cantidad de ATP/ proteínas totales.

Los análisis estadísticos mostraron que los niveles de ATP total (en glucosa) estaban reducidos de manera significativa en las líneas celulares pertenecientes al haplogrupo J (Figura IV.57, como G). Esta caída correlacionaba de forma significativa con la caída encontrada en el MIMP (Figura IV.58). Sin embargo, no encontramos diferencias en los niveles de ATP cuando las células se incubaron con 2-deoxi-glucosa, un inhibidor de la glicólisis (Figura IV.57, como DGP). Además, tras la incubación con glucosa y oligomicina, un inhibidor de la ATPsintasa (Figura IV.57, como GO), existía una caída significativa en las líneas celulares del haplogrupo J. Este resultado confirmaba que el contenido de ATP era de origen mayoritariamente glicolítico.

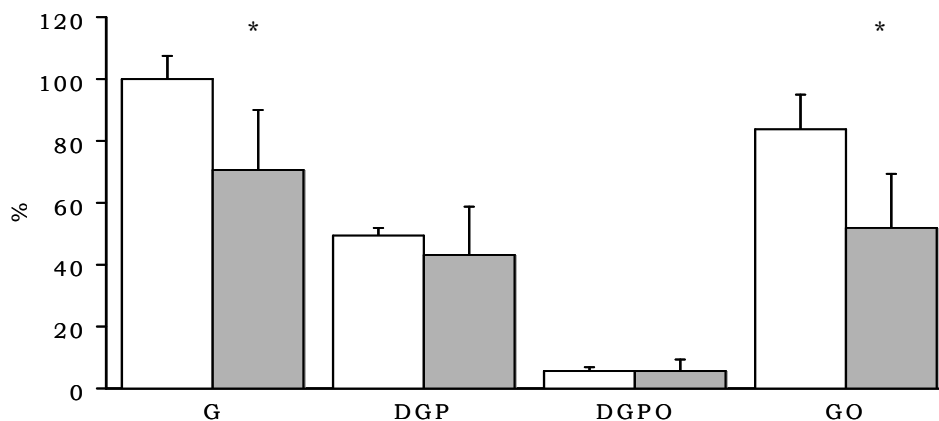


Figura IV.57 Niveles de ATP en las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J. Estudio de los niveles de ATP en híbridos H (blanco) y el J (gris). G, DGP, DGPO, GO son abreviaturas de la glucosa, 2-deoxi-glucosa y 1 mM de piruvato, 2-deoxi-glucosa más 1 mM piruvato y 2,5 mg/ml de oligomicina, glucosa más 2.5 mg/ml de oligomicina, respectivamente. El valor medio de las líneas híbridas pertenecientes al haplogrupo H en glucosa se ha establecido en 100%. G: H, 100,0 ± 7,8% (5); J, 70,3 ± 19,4% (9)*. DGP: H, 49,3 ± 2,2% (5); J, de 43,3 ± 15,3% (9). DGPO: H, 5,6 ± 1,6% (5); J, 5,8 ± 3,2% (9). GO: H, 84,0 ± 10,9% (5); J, 51,6 ± 17,8% (9)*. $P \leq 0,004$.

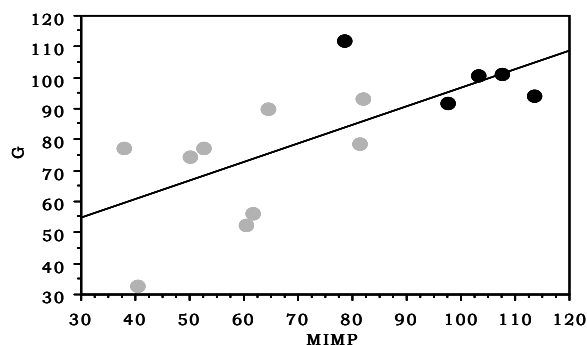


Figura IV.58: Correlación del MIMP con la cantidad de ATP total (G) en las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J. Los puntos de color negro representan la media de cada una de las líneas celulares del haplogrupo H y los de color gris las pertenecientes al haplogrupo J. G: Contenido en ATP en medio de glucosa, MIMP: Potencial de membrana interna mitocondrial. La recta obtenida tras la representación gráfica presenta la siguiente ecuación: $y = 37,1 + 0,6x$, $R^2 = 0,51$, $P = 0,005$.

La fosfofructoquinasa (PFKL) es la enzima principal que controla la glicólisis. En líneas celulares de cáncer se ha observado que una sobreexpresión de la PFKL ha sido relacionada con menores niveles de ATP (Zancan, Sola-Penna et al. 2010) y con un menor consumo de oxígeno (Ma, Bai et al. 2010). Determinamos los niveles de mRNA de la PFLK en nuestras líneas celulares de los haplogrupos H y J creciendo en medio con glucosa. El análisis reveló, que las líneas híbridas del haplogrupo J presentan un aumento significativo del 22% en

los niveles de expresión de la PFKL (Figura IV.59). Este resultado parecía indicar que las diferencias observadas en el contenido de ATP podrían ser debidas a un mayor consumo de ATP en glucosa por parte de las líneas híbridas pertenecientes a la filogenia J, quizás necesario para mantener la caída en el potencial de membrana, tal como han sugerido algunos autores (Desquiret, Loiseau et al. 2006).

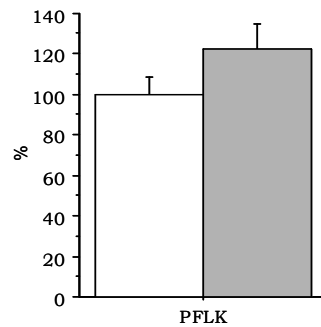


Figura IV.59: Niveles del mRNA de la PFKL en las líneas celulares pertenecientes a los haplogrupos mitocondriales H y J. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y J, respectivamente. El valor medio de la PFLK de las líneas pertenecientes al haplogrupo H se fijó como 100%. Las líneas finas verticales representan la desviación estándar. H, 100,0 ± 8,3% (5); J, 122,3 ± 12,7% (9). P=0,006.

III.7 Marcadores de daño oxidativo

Se ha observado que niveles altos de ROS vienen acompañados de un aumento en los niveles de mtDNA (Achanta, Sasaki et al. 2005) y que el antioxidante N-acetil-cisteína (NAC) puede disminuir la dosis genómica mitocondrial en líneas híbridas de ratón (Moreno-Loshuertos, Acin-Perez et al. 2006). Nuestras líneas híbridas pertenecientes al haplogrupo H vieron reducida su dosis genómica mitocondrial de forma significativa tras el tratamiento con NAC, al contrario que las líneas híbridas del haplogrupo J, que no se vieron afectadas tras el tratamiento con el mismo. El resultado final era la pérdida de la diferencia entre los niveles de mtDNA de ambos haplogrupos (Figura IV.60).

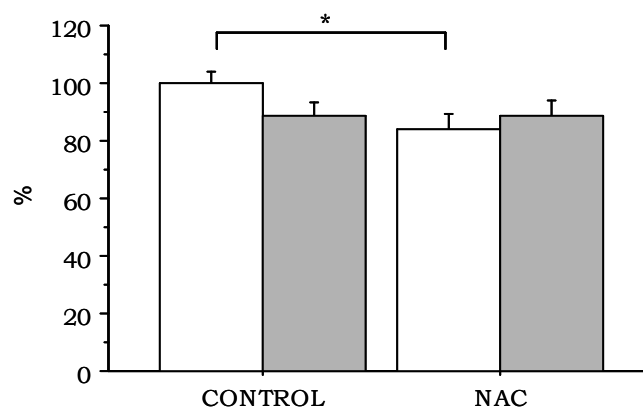


Figura IV.60: Niveles de mtDNA tras el tratamiento con NAC de las líneas celulares pertenecientes al haplogrupo H y J. Haplogrupo H (blanco) vs. J (gris). El valor medio de híbridos H sin N-acetil-cisteína (NAC) se ha establecido en 100%. Las líneas verticales representan la desviación estándar de los valores. H, $100,0 \pm 4,2\%$ (5); H (NAC), $84,1 \pm 5,1\%$ (5); J, $88,8 \pm 4,5\%$ (9); J (NAC), $88,6 \pm 5,1\%$ (9). * $P \leq 0,009$.

Paralelamente, se determinaron los niveles de expresión de la MnSOD, como marcador de sobreproducción de ROS. La cuantificación de los niveles de mRNA no mostró diferencias entre ambos haplogrupos, tal y como se puede observar en la siguiente figura.

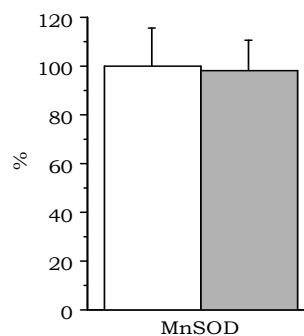


Figura IV.61: Niveles de mRNA de la MnSOD en las líneas celulares pertenecientes a los haplogrupos mitocondriales H y J. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y J, respectivamente. El valor medio de la MnSOD de las líneas pertenecientes al haplogrupo H se fijó como 100%. Las líneas finas verticales representan la desviación estándar. H, $100,0 \pm 15,6\%$ (5); J, $98,2 \pm 12,5\%$ (9).

III.8 Las variantes genéticas de los haplogrupos H y J no tienen efecto sobre la viabilidad celular

Se realizaron estudios de viabilidad celular para observar si las características fenotípicas de cada haplogrupo tenían efectos sobre la viabilidad celular. Se realizaron al menos tres experimentos diferentes en los que se determinó la viabilidad celular de células creciendo en medio de glucosa normal.

La viabilidad fue mayor al 98 % en todos los casos, y no se observaron diferencias entre los diferentes haplogrupos (Figura IV.62).

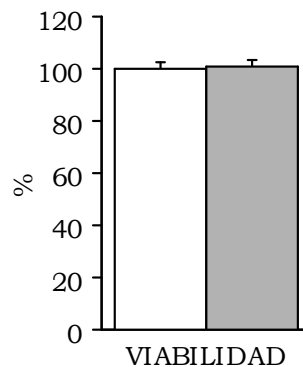


Figura IV.62: Viabilidad celular en las líneas celulares pertenecientes a los haplogrupos mitocondriales H y J. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y J, respectivamente. El valor medio del % de viabilidad de las líneas pertenecientes al haplogrupo H se fijó como 100%. Las líneas finas verticales representan la desviación estándar. H, $100,0 \pm 2,6\%$ (5); J, $101,72 \pm 2,2\%$ (9).

IV. ESTUDIO FENOTÍPICO DE LOS SUBHAPLOGRUPOS DE LA FILOGENIA J (I): SUBHAPLOGRUPO J1c

El análisis genético, molecular y celular de las líneas híbridas mitocondriales pertenecientes al haplogrupo J y Uk ha mostrado que dichas filogenias del mtDNA presentan menor dosis genómica mitocondrial, y aparentemente, esa caída condiciona su función OXPHOS. Sin embargo, extrapolar las posiciones responsables es complicado.

El haplogrupo J está dividido en 2 subhaplogrupos, el J1 y el J2, que a su vez, se separan en distintos subhaplogrupos con variada disposición geográfica. En Europa, la representación del J está encabezada por sus subhaplogrupos J1c y J2 (Carelli, Achilli et al. 2006). Curiosamente, ambas filogenias están definidas por cambios en el p.MT-CYB de igual forma que el haplogrupo Uk (Ruiz-Pesini, Mishmar et al. 2004). Además, estudios epidemiológicos han mostrado una relación entre estos fondos genéticos mitocondriales y patologías como el LHON (Carelli, Achilli et al. 2006; Hudson, Carelli et al. 2007), o procesos fisiológicos como el envejecimiento (Niemi, Hervonen et al. 2003). Por lo tanto, analizar las variantes genéticas fundadoras de estos efectos es esencial.

No obstante, consideramos necesario llevar a cabo un estudio independiente de cada uno de los subhaplogrupos del J definidos por cambios en el p-MT-CYB. En primer lugar, presentamos el estudio del subclado J1c. Este sublinaje, en particular, ha sido asociado con un aumento de la penetrancia de las mutaciones primarias responsables de la enfermedad de LHON m.14487T>C y m.11778 G>A (Carelli, Achilli et al. 2006; Hudson, Carelli et al. 2007). Interesantemente, está definido por el cambio m.14798T>C que comparte con el haplogrupo Uk en el gen *MT-CYB*. Para su caracterización utilizamos el haplogrupo H como haplogrupo control.

IV.1 Población de líneas híbridas para la caracterización del haplogrupo J1c

A. La muestra celular era representativa del haplogrupo J1c

Se ha observado en trabajos con líneas híbridas mitocondriales, que determinadas variantes genéticas antiguas presentan efecto fenotípico sobre el sistema OXPHOS (Kazuno, Munakata et al. 2006). Así, para evitar posibles efectos clonales de los SNPs que definen los subhaplogrupos de cada filogenia estudiada, varios fondos genéticos fueron representados. En el caso del haplogrupo J1c se construyeron 4 líneas celulares híbridas diferentes; 2 de ellas pertenecientes al subhaplogrupo J1c5, una al J1c1 y otra al J1c8. En el caso del haplogrupo H, se utilizaron 5 líneas celulares distintas, tres de ellas pertenecientes al subhaplogrupo H1, una al H13 y otra al H5. Las secuencias completas de cada línea híbrida se encuentran recogidas en las figuras IV.11 y IV.38.

B. Análisis de los SNPs m.7028C y m.14798T

En segundo lugar comprobamos mediante PCR-RFLP que nuestras líneas híbridas portaban el genotipo mitocondrial de interés. Se eligieron dos SNPs, uno por filogenia, y se determinó su presencia y/o ausencia en los DNAs extraídos de todas las líneas celulares. Las posiciones seleccionadas fueron m.7028C y m.14798T que definen al haplogrupo H y J1c, respectivamente (Ruiz-Pesini, Lapena et al. 2000).

Tal y como se puede ver en la figura a continuación, todas las líneas celulares pertenecientes al haplogrupo J1c presentaron la posición m.14798T. Al contrario, las pertenecientes a las filogenias H y J1b, representada por 5J en la siguiente figura, presentaron la posición m.14798C. El análisis del nucleótido m.7028 se encuentra en la figura IV.37 del capítulo anterior.

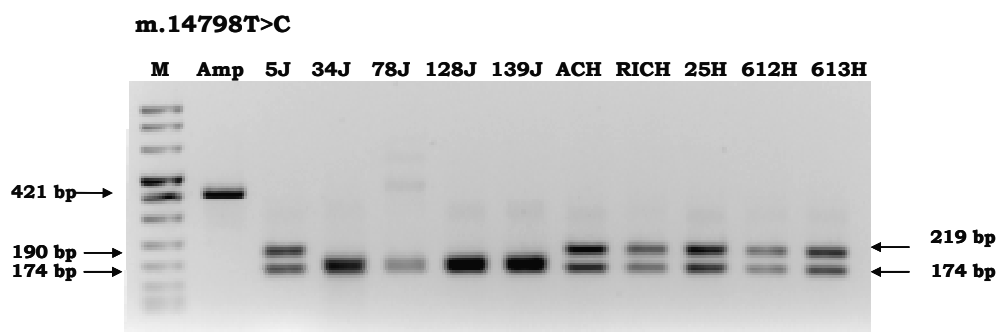


Figura IV.63: Análisis mediante PCR-RFLP del genotipo del mtDNA en la posición 14798. Patrón de bandas de electroforesis para el cambio m.14798T>C. La combinación de un mal emparejamiento en la posición m.14802T>G sumada a la mutación m.14798T>C, que define el haplogrupo J1c, crea un nuevo sitio de restricción para la endonucleasa DdeI. Se amplificó un fragmento de 421 bp que se cortó con la enzima DdeI. Los productos de digestión dieron lugar a cuatro (190, 174, 29 y 28 pb) y tres (219, 174 y 28 pb) bandas, para el haplogrupo J1c y H, respectivamente. Los fragmentos de 29 y 28 pb no se observan en el gel. La línea celular 5J perteneciente al haplogrupo J1b presenta la posición 14798C, por ello el patrón de bandas es igual al de las muestras pertenecientes al haplogrupo H. Amp es la abreviatura de amplicón

IV.2 Los niveles de mtDNA y mtRNA están reducidos en las líneas híbridas del haplogrupo J1c

A. La niveles de mtDNA y de TFAM son menores en las líneas híbridas transmitocondriales del haplogrupo J1c

Las líneas celulares del haplogrupo J mostraban una caída significativa de los niveles mtDNA. Por lo tanto, el primer estudio realizado para la caracterización de las variantes que definen el haplogrupo J1c comprendía la determinación de la dosis genómica mitocondrial en las líneas celulares de ambos haplogrupos. Asimismo, se ha observado que células en cultivo *knock out* de TFAM presentan depleciones del mtDNA (Ekstrand, Falkenberg et al. 2004). Consecuentemente, en paralelo, determinamos los niveles de TFAM en las líneas celulares pertenecientes a los haplogrupos J1c y H.

La detección de los niveles de TFAM se realizó mediante una electroforesis SDS-PAGE seguido de transferencia a membrana y posterior *Western-Blot*, con detección paralela de la subunidad α de la actina como proteína control. Ambas proteínas se detectaron en la misma membrana en una única incubación

conjunta. La señal obtenida se cuantificó mediante densitometría. Los datos se expresaron como cociente TFAM/ α -actina.

El análisis del cociente TFAM/ α -actina reveló una caída del 12% en las líneas pertenecientes al haplogrupo J1c. Sin embargo, ésta diferencia no fue significativa (Figura IV.64.B).

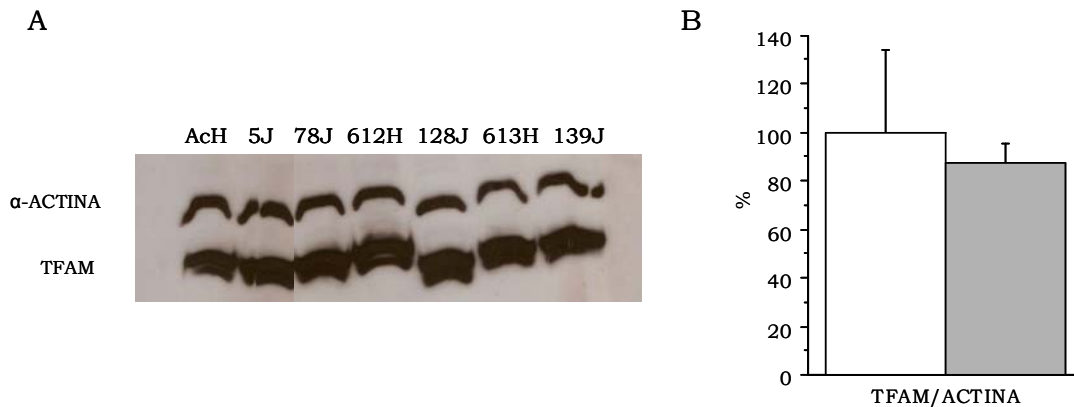


Figura IV.64: Niveles de TFAM en las líneas celulares pertenecientes a los haplogrupos mitocondriales H y J1c. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y J1c, respectivamente. El valor medio del parámetro de las líneas celulares pertenecientes al haplogrupo H se fijó como 100%. Las líneas finas verticales representan la desviación estándar. A. Ejemplo representativo de detección de las dos proteínas estudiadas. B. Estudio densitométrico del cociente TFAM/ α -actina del haplogrupo H (blanco) frente al haplogrupo J1c (gris). H, 100,0 \pm 34,0% (5); J1c, 87,4 \pm 8,0% (4).

A continuación, se analizaron los niveles de mtDNA mediante RT-PCR. Pudimos observar una caída significativa del 9,4% ($P=0,02$) en los niveles de mtDNA de las líneas celulares pertenecientes al haplogrupo con respecto a las del haplogrupo H, tal y como se ilustra en la siguiente figura.

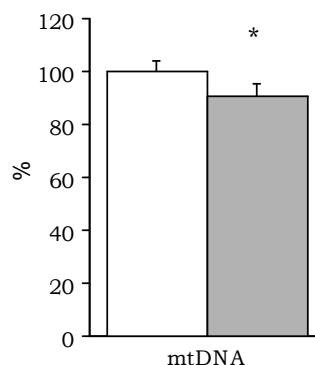


Figura IV.65: Determinación de niveles del mtDNA en las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J1c. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y J1c, respectivamente. El valor medio del parámetro de las líneas celulares pertenecientes al haplogrupo H se fijó como 100%. Las líneas finas verticales representan la desviación estándar. H, $100,0 \pm 4,2\%$ (5); J1c, $90,6 \pm 5,1\%$ (5). $P= 0,02$.

B. No existen diferencias en la cantidad de mRNA de los genes implicados en la replicación del mtDNA

El TFAM forma parte de los nucleoides junto con otras proteínas que participan en la replicación del mtDNA como la DNA polimerasa gamma y la proteína Twinkle helicasa, entre otras (Spelbrink). Así, decidimos determinar los niveles de expresión de algunos de los genes implicados en la replicación del mtDNA para observar si una caída en su expresión era responsable de la disminución de los niveles de mtDNA.

No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los genes estudiados entre ambos haplogrupos, tal y como se puede observar en la figura a continuación. Por tanto, otro mecanismo es el responsable del descenso de la dosis genómica mitocondrial.

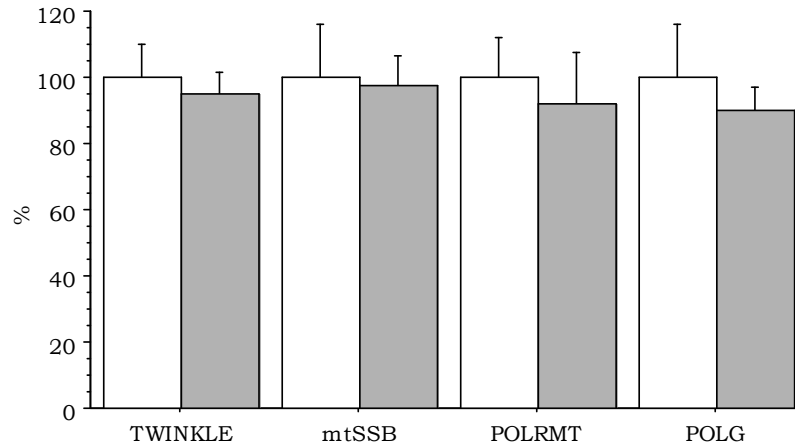


Figura IV.66: Niveles de mRNA de genes implicados en la replicación del mtDNA de las líneas cúbida pertenecientes a los haplogrupos H y J1c. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y J1c, respectivamente. El valor medio del parámetro determinado de las líneas celulares pertenecientes al haplogrupo H se fijó como 100%. Las líneas finas verticales representan la desviación estándar. POLG: H, $100,0 \pm 18,5\%$ (5); J1c, $85,4 \pm 22,7\%$ (4). mtSSB: $100 \pm 16,2\%$ (5); J1c, $96,6 \pm 20,7\%$ (4). TWINKLE: H, $100 \pm 10,1\%$ (5); J1c, $99,3 \pm 25,7\%$ (4) y POLRMT: H, $100 \pm 12,2\%$ (5); J1c, $96,7 \pm 27,32\%$ (4).

C. Los niveles de mtRNA están reducidos en las líneas celulares del sublinaje J1c

El siguiente paso fue observar si la caída en los niveles de mtDNA condicionaba los niveles de mtRNA, como aparentemente ocurría en las líneas celulares del haplogrupo J y Uk. Se cuantificó el mRNA de genes de todos los complejos codificados en el mtDNA, así como los de los rRNA, mediante RT-PCR.

El análisis de los mRNAs de los genes codificados en el mtDNA reveló una disminución de todos los RNAs en las líneas celulares pertenecientes al haplogrupo J1c. Sin embargo, la caída era significativa únicamente en el caso del rRNA16S, tal y como se puede observar en la figura expuesta a continuación.

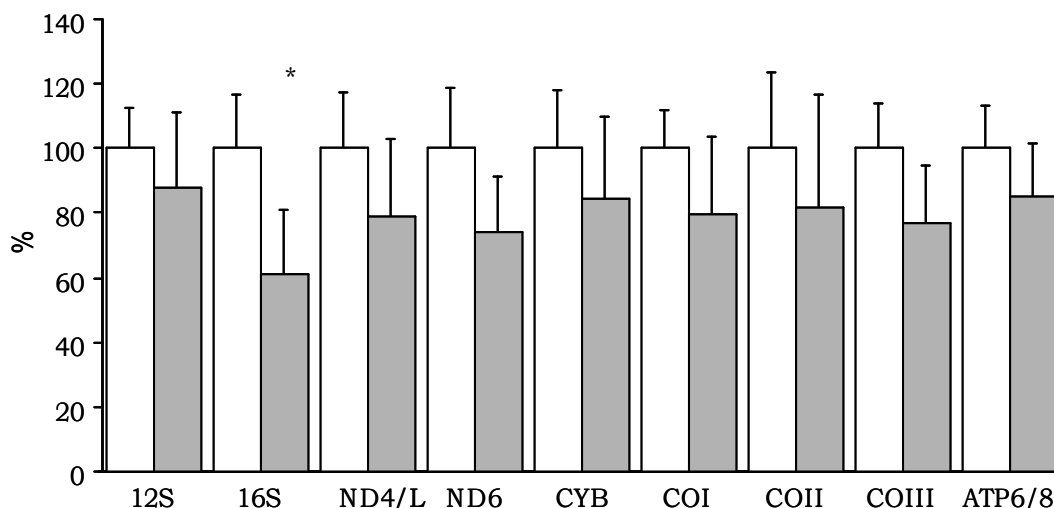


Figura IV.67: Niveles de los mtRNA de las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J1c. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y J1c, respectivamente. El valor medio de las líneas celulares pertenecientes al haplogrupo H se fijó como 100%. Las líneas finas verticales representan la desviación estándar. 12S: H, 100,0 ± 12,7% (5); J1c, 87,0 ± 23,2% (4). 16S: H, 100,0 ± 16,4% (5); J1c, 61,1 ± 20,0% (4)*; ND4-ND4L: H, 100,0 ± 17,4% (5); J1c, 78,7 ± 24,3% (4). ND6: H, 100,0 ± 18,5% (5); J1c, 74,2 ± 17,0% (4). CYB: H, 100,0 ± 18,2% (5); J1c, 84,4 ± 25,2% (4). COI: H, 100,0 ± 11,7% (5); J1c, 79,7 ± 24,1% (4). COII: H, 100,0 ± 25,4% (5); J1c, 81,7 ± 35,0% (4). COIII: H, 100,0 ± 13,9% (5); J1c, 77,1 ± 17,3% (4). ATP6-ATP8: H, 100,0 ± 12,9% (5); J1c, 84,8 ± 16,5% (4). * P ≤ 0,04.

Seguidamente, analizamos las diferencias entre ambos haplogrupos en cada una de las unidades de transcripción mitocondrial. La transcripción del genoma mitocondrial se lleva a cabo a partir de tres promotores diferentes: Uno para la cadena ligera (L) y dos para la cadena pesada (H1 y H2). La cadena ligera incluye únicamente el gen ND6 y varios tRNAs (Aloni and Attardi 1972; Murphy, Attardi et al. 1975). Para la cadena H existen dos lugares de iniciación de la transcripción (Montoya, Christianson et al. 1982). La transcripción más frecuente empieza en H1 e incluye los dos rRNA, la transcripción que comienza en H2 es menos frecuente, y da lugar a moléculas policistrónicas que representan la mayoría de la cadena H (Fernandez-Silva, Enriquez et al. 2003).

El análisis mostró una caída en todas las unidades de transcripción en las líneas celulares pertenecientes al haplogrupo J1c. Siendo el descenso significativo únicamente en la unidad de transcripción H1, es decir, la que incluye los rRNA. Como se puede observar en la siguiente figura.

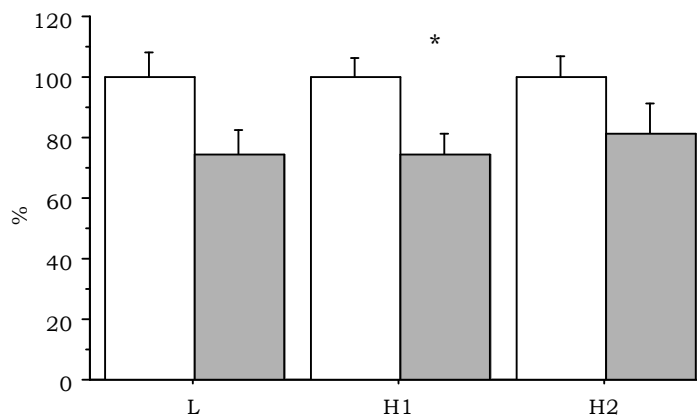


Figura IV.68: Unidades de transcripción mitocondrial de las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J1c. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y J1c, respectivamente. El valor medio de las líneas celulares pertenecientes al haplogrupo H se fijó como 100%. Las líneas finas verticales representan la desviación estándar. L: H, 100,0 ± 18,5% (5); J1c, 74,2 ± 17,0% (4). H1: H, 100,0 ± 14,3% (5); J1c, 74,5 ± 13,1% (4)*. H2: H, 100,0 ± 15,3% (5); J1c, 81,1 ± 20,2% (4). * P=0,03.

Curiosamente, este descenso en los niveles de la unidad de transcripción mitocondrial H1 correlacionaba de forma significativa con la disminución encontrada en la dosis genómica mitocondrial (P=0,01).

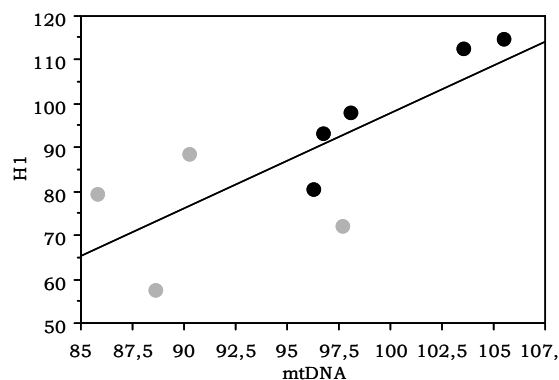


Figura IV.69: Correlación de los productos de transcripción H1 mitocondrial y los niveles de mtDNA en las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J1c. Los puntos de color negro representan la media de cada una de las líneas celulares del haplogrupo H y los de color gris las pertenecientes al haplogrupo J1c. La recta obtenida tras la representación gráfica presenta la siguiente ecuación: $y = -119,0 + 2,2x$, $R^2 = 0,6$, $P = 0,01$.

Por último, cuantificamos los niveles de mtRNA total. Se encontró que los híbridos pertenecientes al sublinaje J1c presentan una reducción del 12% en los niveles de mtRNA, de forma similar a como ocurría en el caso de los niveles de mtDNA (ver Figura IV.65).

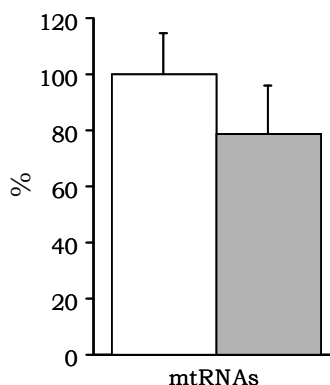


Figura IV.70: Niveles de mtRNA de las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J1c. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y J1c, respectivamente. El valor medio del parámetro determinado de las líneas celulares pertenecientes al haplogrupo H se fijó como 100%. Las líneas finas verticales representan la desviación estándar. H, $100,0 \pm 14,7\%$ (5); J1c, $78,9 \pm 16,9\%$ (4).

D. Niveles de expresión de genes involucrados en la transcripción del mtDNA

A continuación, estudiamos los niveles de expresión de los genes que participan en la transcripción del mtDNA. En la siguiente figura se muestran los genes analizados, como se puede observar, no hay diferencias en ninguno de los genes estudiados. Por lo tanto, la caída en los niveles de mtRNA parece estar condicionada por la disminución de los niveles de mtDNA.

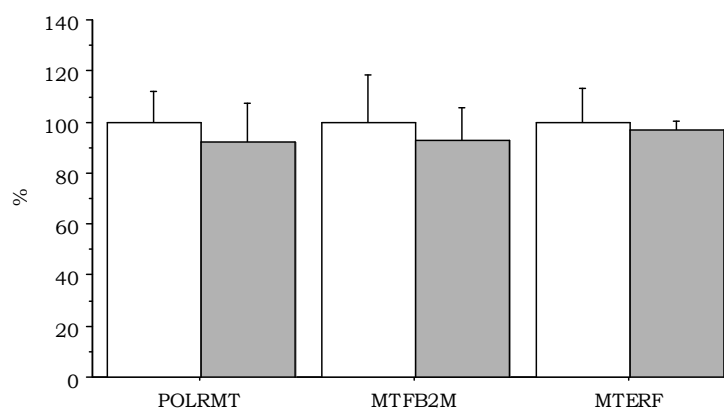


Figura IV.71: Niveles de mRNA de genes implicados en la transcripción del mtDNA de las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J1c. Las barras blancas y grises representan las medias del haplogrupo H y J1c, respectivamente. El valor medio de las líneas del haplogrupo H se fijó en 100%. Las líneas finas verticales marcan la desviación estándar. POLRMT: H, $100 \pm 12,2\%$ (5); J1c, $96,9 \pm 3,4\%$ (4). MTFB2M: H, $100 \pm 18,5\%$ (5); J1c, $92,9 \pm 12,4\%$ (4). MTERF: H, $100 \pm 13,0\%$ (5); J1c, $92,1 \pm 15,2\%$ (4).

IV.3 La síntesis mitocondrial de proteínas está reducida en las líneas celulares del haplogrupo J1c

Se ha visto en la caracterización fenotípica de los haplogrupos J y Uk, y en trabajos de otros autores (Zhao, Young et al. 2005; Cotney and Shadel 2006), que la caída en los niveles de mtDNA y mtRNA puede condicionar la cantidad de proteína mitocondrial sintetizada. Por ende, cuantificamos la síntesis de proteínas mitocondrial en líneas celulares pertenecientes a los haplogrupos H y J1c. Se realizaron, al menos, dos cuatificaciones por línea celular. Además, para comprobar que las posibles diferencias no se debían a una desproporción en la cantidad de proteína cargada, se llevó a cabo la tinción del gel con Azul de Coomassie. En ningún caso se observaron diferencias en la carga proteica, como se puede observar a simple vista (Figura IV.72 y Figura A.12). Paralelamente, se llevó a cabo el densitometrado de tres bandas distintas (p.MT-CO1, p.MT-ND2 y p.MT-ND3) para la cuantificación de los productos de traducción mitocondrial. La elección de las mismas se basó en su situación física en el gel. Una en la parte superior, otra en la media y otra inferior. En la siguiente figura se expone un ejemplo de una detección y de un control de carga.

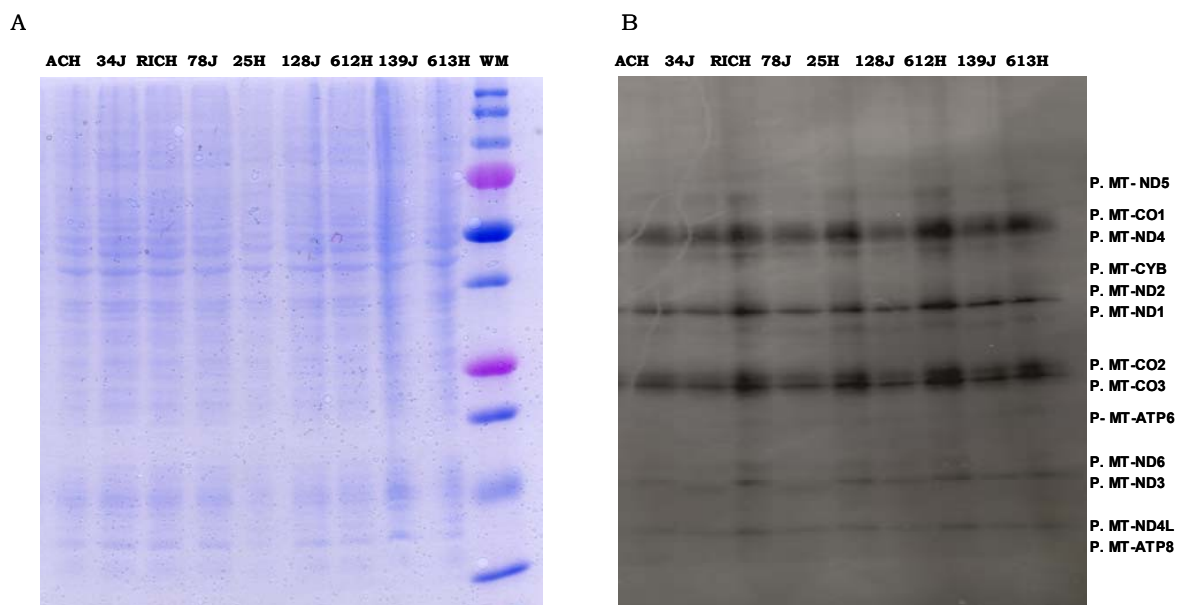


Figura IV.72: Síntesis mitocondrial de proteínas en las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J1c. A. Control de carga, B. Patrón de electroforesis de los productos de traducción mitocondrial de las líneas celulares híbridas. WM, marcador de peso molecular.

Como se puede observar en la figura anterior, las líneas celulares pertenecientes al haplogrupo J1c parecían tener menores niveles de los productos de traducción mitocondrial que aquellas pertenecientes al haplogrupo H. El análisis por filogenia mostró una disminución significativa ($P = 0,04$) de un 29,4% en los productos de traducción de las líneas celulares del haplogrupo J1c con respecto a las del haplogrupo H (Figura IV.73).

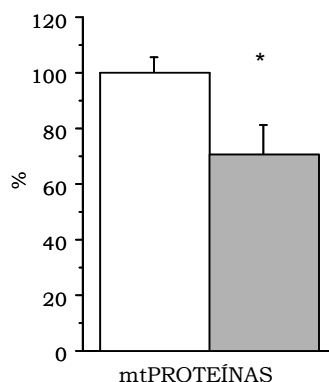


Figura IV.73: Síntesis mitocondrial de proteínas de las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J1c. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y J1c, respectivamente. El valor medio del parámetro determinado de las líneas celulares pertenecientes al haplogrupo H se fijó como 100%. Las líneas finas verticales representan la desviación estándar H, $100,0 \pm 12,1\%$ (5); J1c, $70,6 \pm 21,9\%$ (4) $P = 0,04$.

Curiosamente, esta disminución en la síntesis de proteínas mitocondrial, correlacionaba de forma significativa ($P=0,0016$) con la caída de los niveles de mtDNA.

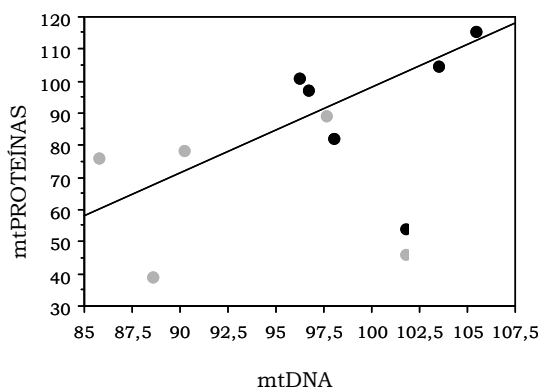


Figura IV.74: Correlación de la síntesis de proteínas mitocondriales y los niveles de mtDNA en las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J1c. Los puntos de color negro representan la media de cada una de las líneas celulares del haplogrupo H y los de color gris las pertenecientes al haplogrupo J1c. La recta obtenida tras la representación gráfica tenía la siguiente ecuación: $y = -168,7 + 2,7x$, $R^2=0,72$, $P=0,009$.

Interesantemente, también existía una concomitancia significativa entre los productos de traducción mitocondrial y los niveles de los transcritos de la unidad de transcripción H1 en las líneas del haplogrupo J1c y H, tal como ocurría en las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos Uk y J.

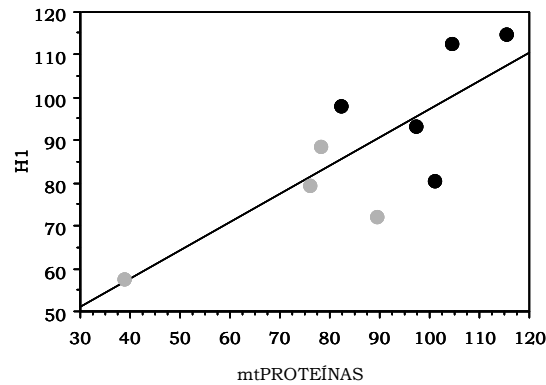


Figura IV.75: Correlación de la síntesis de proteínas mitocondriales y los niveles de transcritos H1 en las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J1c. Los puntos de color negro representan la media de cada una de las líneas celulares del haplogrupo H y los de color gris las pertenecientes al haplogrupo J1c. La recta obtenida tras la representación gráfica tenía la siguiente ecuación: $y = 31,1 + 0,7x$. $R^2 = 0,5$, $P = 0,009$.

IV.4 Fracción celular ocupada por mitocondria

A continuación, estudiamos la fracción celular ocupada por mitocondria para evaluar una posible influencia del número de mitocondrias y/o volumen mitocondrial sobre la caída observada en los productos de transcripción mitocondria, entre otros. Realizamos un abordaje a distintos niveles.

En primer lugar, determinamos la actividad enzimática de la citrato sintasa (CS), una enzima de la matriz mitocondrial que refleja el número o el volumen mitocondrial (Krahenbuhl, Schafer et al. 1996). No había diferencias significativas en la actividad específica de la CS entre ambos haplogrupos (Figura IV.76).

A continuación, teniendo en cuenta que el sistema OXPHOS se encuentra anclado en la membrana interna mitocondrial, se determinó como marcador de la superficie de la membrana interna mitocondrial la cantidad de succinato deshidrogenasa o CII. El CII es el único de los complejos de la ETC codificado

exclusivamente por el nDNA. No observamos diferencias, entre ambos haplogrupos, en cantidad del cociente CII/ α -Actina. (La detección del Western-Blot de ambos anticuerpos se encuentra en la figura IV.50B).

Posteriormente, estudiamos la superficie de la membrana mitocondrial interna (MIMS). Para ello determinamos el contenido en cardiolipina (Petit, Huet et al. 1994), el fosfolípido más abundante en la membrana interna mitocondrial (Guarnieri, Stechmiller et al. 1971). No existían diferencias significativas entre ambos clados.

En conclusión, los datos presentados indican que las diferencias observadas en cantidad de proteínas, mtRNA y mtDNA no parecen estar determinadas por diferencias en el volumen y/o número de mitocodrias y/o superficie de membrana mitocondrial.

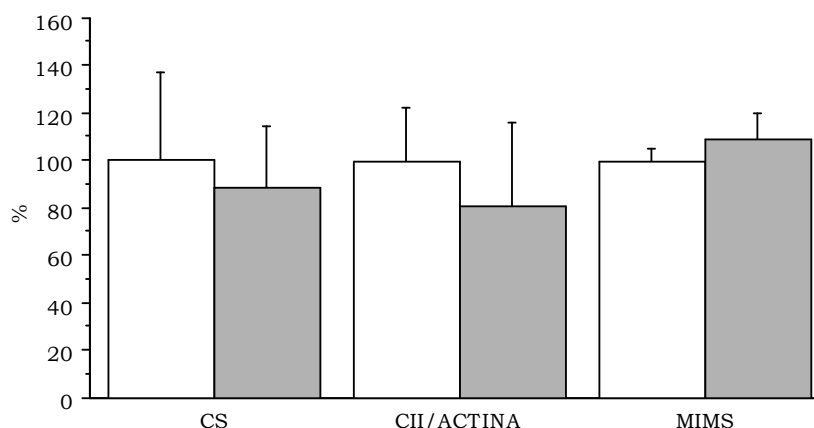


Figura IV.76: Fracción celular ocupada por mitocondria de las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J1c. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y J1c, respectivamente. El valor medio de los valores de las líneas pertenecientes al haplogrupo H se fijó como 100%. Las líneas finas verticales representan la desviación estándar CS: H, 100,0 ± 37,3% (5); J1c, 88,7 ± 29,1% (4). Estudio densitométrico del cociente CII/ Actina: H, 100,0 ± 22,5 (5); J1c, 80,5 ± 34,8% (4). MIMS: H, 100,0 ± 5,0% (5); J1c, 109,0 ± 11,4% (4).

IV.5 La actividad COX es menor en las líneas celulares del haplogrupo J1c

Estudios en tejidos de mamíferos han mostrado una correlación entre los niveles de mtDNA y la actividad de la citocromo c oxidasa (Fernandez-Vizarra,

Enriquez et al. 2011; Rocher, Taanman et al. 2008). Medimos la actividad del complejo IV por mg de proteína total utilizando un kit comercial. En concordancia con Fernandez-Vizarra *et al.* 2011, se encontró una caída significativa en la actividad específica de la citocromo c oxidasa en las líneas celulares pertenecientes al haplogrupo J1c (Figura I.77).

Además, el mismo kit comercial permitía realizar una medida de los niveles del complejo de forma paralela (en el mismo pocillo). La cuantificación de los niveles de proteína no mostró diferencias entre ambas filogenias, tal y como se puede observar en la siguiente figura.

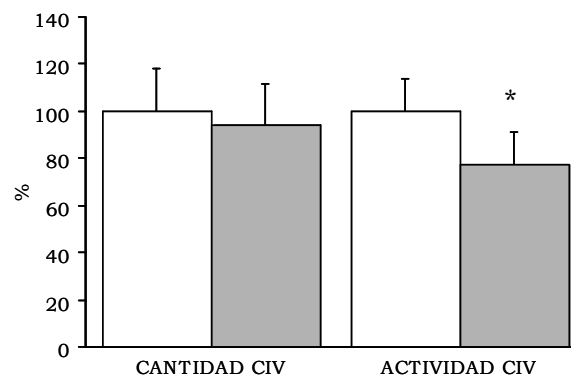


Figura IV.77 Actividad y cantidad del complejo CIV de las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J1c. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y J1c, respectivamente. El valor medio para cada parámetro de los valores de las líneas pertenecientes al haplogrupo H se fijó como 100%. Las líneas finas verticales representan la desviación estándar. Niveles de CIV: H, 100,0 ± 18,1% (5); J1c, 94,1 ± 17,5% (4). Actividad específica: H, 100,0 ± 13,5% (5); J1c, 77,1 ± 14,3% (4). $P \leq 0,04$.

Interesantemente, observamos una correlación significativa ($P=0,0002$) entre los niveles y la actividad de citocromo c oxidasa.

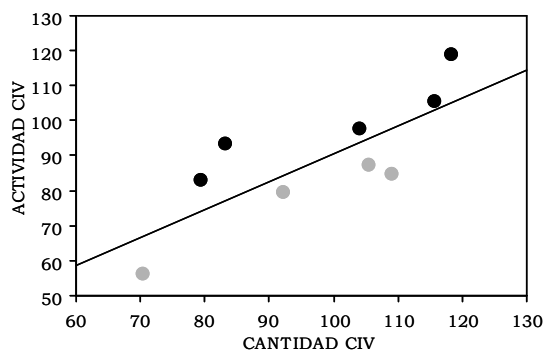


Figura IV.78: Correlación niveles- actividad de complejo IV en las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J1c. Los puntos de color negro representan la media de cada una de las líneas celulares del haplogrupo H y los de color gris las pertenecientes al haplogrupo J1c. La recta obtenida tras la representación gráfica tenía la siguiente ecuación: $y = 10,8 + 0,8 x$, $R^2 = 0,51$, $P = 0,0002$

IV.6 El consumo de oxígeno, el MIMP y la cantidad de ATP son diferentes entre las líneas híbridas de los haplogrupos H y J1c

A. El consumo de O_2 es menor en las líneas del haplogrupo J1c

El consumo de oxígeno celular y la VO_{2max} correlacionan de forma significativa con los niveles de mtDNA (Bentlage and Attardi 1996; Laderman, Penny et al. 1996). Además, en las líneas celulares pertenecientes al haplogrupo J hemos encontrado una correspondencia entre la actividad del complejo IV y la respiración endógena. Así, se determinará el consumo de oxígeno en cada una de las líneas celulares de los haplogrupos J1c y H. Los datos se expresaron como fmoles/min/célula.

Se pudo comprobar que el consumo de O_2 de las líneas celulares pertenecientes al haplogrupo J1c era significativamente menor que en aquellas pertenecientes al haplogrupo H, tanto en la respiración endógena ($P=0,03$), como en la filtrante ($P=0,03$). Sin embargo aunque la tasa de respiración desacoplada con FCCP era menor en estas líneas celulares, no encontramos diferencias significativas entre ambos haplogrupos, tal y como se puede observar en la figura expuesta a continuación.

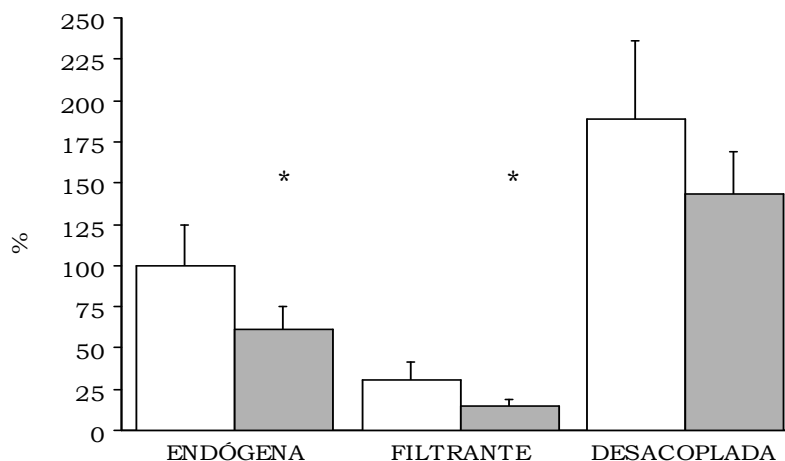


Figura IV.79: Consumo de oxígeno de las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J1c. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y J1c, respectivamente. El valor medio de los valores de las líneas pertenecientes al haplogrupo H se fijó como 100%. Las líneas finas verticales representan la desviación estándar. Endógena: H, 100,0 ± 24,5% (5); J1c, 61,7 ± 13,8% (4)*. Respiración filtrante: H, 30,8 ± 11,1% (5); J1c, 14,5 ± 4,1% (4)*. Respiración desacoplada: H, 189,2 ± 47,3% (5); J1c, 143,5 ± 25,0% (4). * P≤0,03.

Además, la tasa de respiración endógena correlacionaba de forma significativa ($P=0,007$) con la actividad de complejo IV, al igual que ocurría en el caso del haplogrupo J. La representación gráfica de dicha correspondencia se encuentra en la figura ilustrada a continuación.

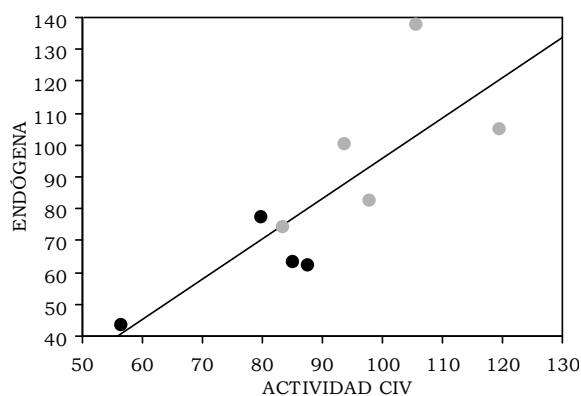


Figura IV. 80: Correlación de la actividad del CIV y la tasa de respiración endógena en las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J1c. Los puntos de color negro representan la media de cada una de las líneas celulares del haplogrupo H y los de color gris las pertenecientes al haplogrupo J1c. La recta obtenida tras la representación gráfica tenía la siguiente ecuación $y = -30,4 + 1,3x$, $R^2 = 0,48$, $P = 0,007$.

B. Las líneas celulares del haplogrupo H son más acopladas que las del J1c

Se ha visto en cíbridos transmitocondriales de osteosarcoma 143B que la inhibición del CI, bien con rotenona (Barrientos et al, 1999), bien por la presencia de mutaciones en el mismo (McKenzie, Liolitsa et al. 2007) da lugar a una inhibición de la respiración celular y con ello a una disminución del potencial de membrana mitocondrial interna, secundario a un menor bombeo de protones, por la existencia de un flujo de electrones inferior a través de los complejos de la ETC.

En concordancia con estos datos, la determinación de MIMP mostró una disminución significativa en las líneas pertenecientes al clado J1c, tal y como se puede observar en la figura IV.81 expuesta a continuación. Este resultado sugería un flujo de electrones más lento a través de la cadena por parte de las líneas pertenecientes al haplogrupo J1c.

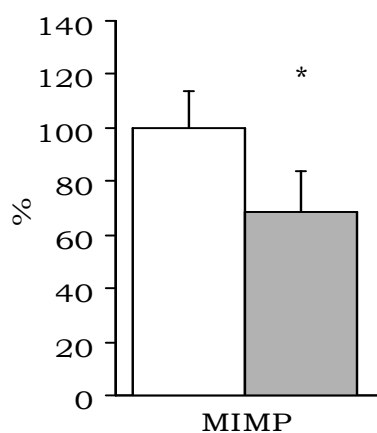


Figura IV.81: Potencial de membrana interna mitocondrial de las líneas cíbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J1c. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y J1c, respectivamente. El valor medio para cada parámetro de los valores de las líneas pertenecientes al haplogrupo H se fijó como 100%. Las líneas finas verticales representan la desviación estándar. MIMP: H, 100,0 ± 13,5 % (5); J1c, 68,3 ± 15,8% (4). P = 0,014.

C. El contenido en ATP es menor en las líneas cíbridas del haplogrupo J1c

La síntesis de ATP es una función dependiente del MIMP. La medida de los niveles de ATP total en glucosa, mostrado en la figura IV.82 como G, reveló que las líneas pertenecientes al haplogrupo J1c presentaban una disminución significativa de los niveles de ATP. Curiosamente este valor correlacionaba significativamente con el del MIMP ($P=0,01$). En la siguiente figura se muestra una representación gráfica de dicha correspondencia.

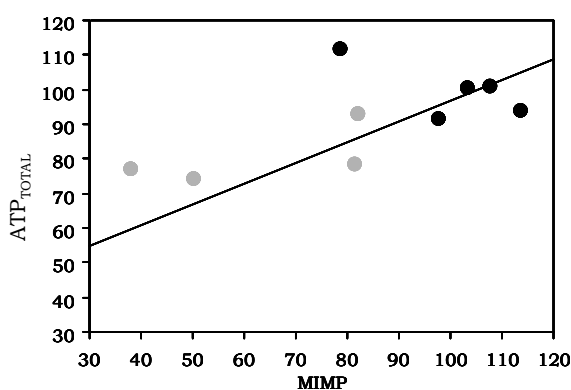


Figura IV.82: Correlación del MIMP con los niveles de ATP_{TOTAL} en las líneas cíbrida pertenecientes a los haplogrupos H y J1c. Los puntos de color negro representan la media de cada una de las líneas celulares del haplogrupo H y los de color gris las pertenecientes al haplogrupo J1c. ATP_{TOTAL}: Contenido en ATP en medio de glucosa y MIMP: Potencial de membrana interna mitocondrial. La recta obtenida tras la representación gráfica presenta la siguiente ecuación porcentaje $y = 37,1 + 0,6x$, $R^2 = 0,62$, $P = 0,005$.

Sin embargo, cuando medimos la cantidad del ATP mitocondrial utilizando para ello el inhibidor de la glicólisis, 2-deoxi-glucosa, pudimos comprobar que no existían diferencias entre las líneas cíbridas de ambos haplogrupos (Figura IV.83 como DGP). Posteriormente, las medidas en 2-deoxi-glucosa con oligomicina, un inhibidor de la ATPsintasa (en la figura como DGPO), no mostraron diferencias entre el haplogrupo J1c y el H. Además, la cuantificación de los niveles de ATP en medio de glucosa con oligomicina, mostrado en la figura como GO, parecía evidenciar que el origen de las diferencias en el contenido de ATP era mayoritariamente glicolítico (Figura IV.83).

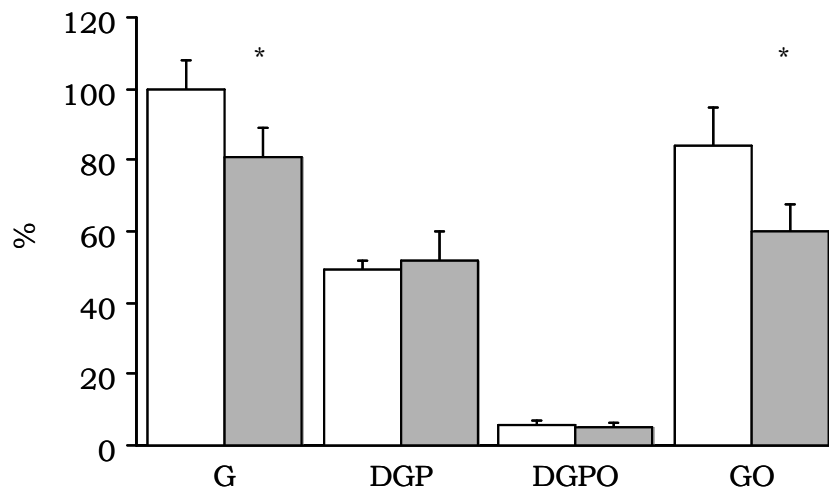


Figura IV.83: Niveles de ATP en las líneas cíbrida pertenecientes a los haplogrupos H y J1c. Estudio de los niveles de ATP en cíbridos H (blanco) y el J1c (gris). G, DGP, DGPO, GO son abreviaturas de la glucosa, 2-deoxi-glucosa y 1 mM de piruvato, 2-deoxi-glucosa más 1 mM piruvato y 2,5 mg / ml y oligomicina, glucosa más 2.5 mg / ml de oligomicina, respectivamente. El valor medio de las líneas cíbridas pertenecientes al haplogrupo H en glucosa se ha establecido en 100%. G: H, 100,0 ± 7,8% (5); J1c, 80,9 ± 8,4% (4)*. DGP: H, 49,3 ± 2,2% (5); J1c, 52,1 ± 7,6% (4). DGPO: H, 5,6 ± 1,6% (5); J1c, 4,8 ± 1,6% (4). GO: H, 84,0 ± 10,9% (5); J1c, 60,0 ± 7,2% (4)*. * P≤0,01.

De acuerdo con los resultados obtenidos, es posible que las líneas celulares del haplogrupo J1c tengan un defecto en su sistema glicolítico. En consecuencia, determinamos los niveles de mRNA de la PFKL en las líneas celulares de ambas filogenias. Se eligió la PFKL porque es la principal enzima reguladora de la glicólisis. La determinación de los niveles de PFKL en líneas celulares creciendo en medio con glucosa reveló que las líneas cíbridas del haplogrupo J1c presentan un aumento significativo del 18% en los niveles de expresión de la PFKL tal y como se puede observar en la siguiente figura.

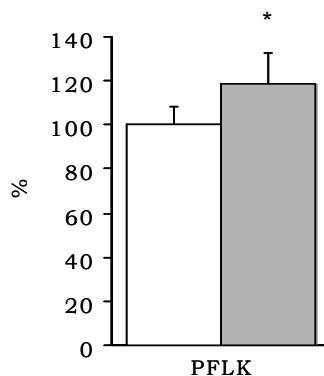


Figura IV.84: Niveles del mRNA de la PFKL de las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J1c. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y J1c, respectivamente. El valor medio para cada parámetro de las líneas pertenecientes al haplogrupo H se fijó como 100%. Las líneas finas verticales representan la desviación estándar. H, $100,0 \pm 8,3\%$ (5); J1c, $118,6 \pm 13,9\%$ (4). $P=0,04$.

En concordancia con estos resultados, en líneas celulares de cáncer una sobreexpresión de la PFKL ha sido relacionada con niveles menores de ATP (Hudson, Hogue et al. 1998) y con un descenso en el consumo de oxígeno (Mishmar, Ruiz-Pesini et al. 2003).

IV.7 Marcadores de daño oxidativo

Los intermediarios de la ubiquinona en los complejos I y III de la cadena de transporte electrónico son la mayor fuente de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) de la célula (Brand, Affourtit et al. 2004). Para dar lugar a ROS, éstos reaccionan con el O_2 produciendo anión superóxido que, a su vez, es metabolizado por la MnSOD para dar H_2O_2 (Weisiger, 1973).

Realizamos un estudio de la producción de daño oxidativo a distintos niveles. En primer lugar, determinamos los niveles de anión superóxido (O_2^-) *in vivo* mediante citometría de flujo. El análisis no mostró diferencias entre ambos haplogrupos (Figura IV.85).

En segundo lugar, cuantificamos los niveles de expresión de la MnSOD mediante RT-PCR. Un aumento de los niveles de mRNA de esta enzima ha sido relacionado con un aumento del daño oxidativo (Strehlow, Rotter et al. 2003). No

se encontraron diferencias significativas entre ambos haplogrupos en los niveles de mRNA, tal y como se puede observar en la siguiente figura.

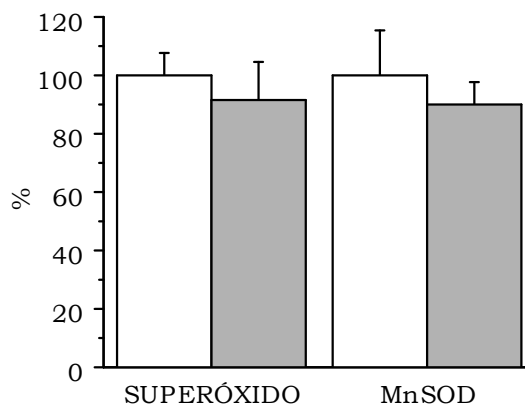


Figura IV.85: Marcadores de daño oxidativo de las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J1c. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y J1c, respectivamente. El valor medio para cada parámetro de los valores de las líneas pertenecientes al haplogrupo H se fijó como 100%. Las líneas finas verticales representan la desviación estándar. Producción mitocondrial de anión superóxido: H, 100,0 ± 15,6% (5); J1c, 90,1 ± 7,7% (4). Niveles de mRNA de MnSOD: H, 100,0 ± 8,0% (5); J1c, 91,7 ± 12,8% (4).

Estudios sobre genética de ratón (Moreno-Loshuertos, Acin-Perez et al. 2006) evidenciaron que, aquellas variantes más productoras de ROS presentan mayores niveles de mtDNA. Esta mayor dosis genómica, tras el tratamiento con el antioxidante N-acetil-Cisteína (NAC) disminuía de forma significativa, frente a aquellas variantes menos “oxidativas”, donde la cantidad de mtDNA no se veía afectada tras el tratamiento.

Además, el tratamiento con NAC a las filogenias H, Uk y J había mostrado un efecto diferencial entre los distintos haplogrupos. Para observar si ese efecto se repetía en el subhaplogrupo J1c realizamos el estudio de la dosis genómica mitocondrial tras el tratamiento con NAC, de igual modo que en los haplogrupos citados.

Tal y como habíamos observado en los análisis anteriores, tras tratamiento con NAC (Figura IV. 86), los niveles de mtDNA disminuyeron. Sin embargo, el efecto fue mayor en las líneas híbridas pertenecientes al haplogrupo

H. Además, tras el tratamiento con el antioxidante se perdió la diferencia entre ambos haplogrupos (Figura IV.86).

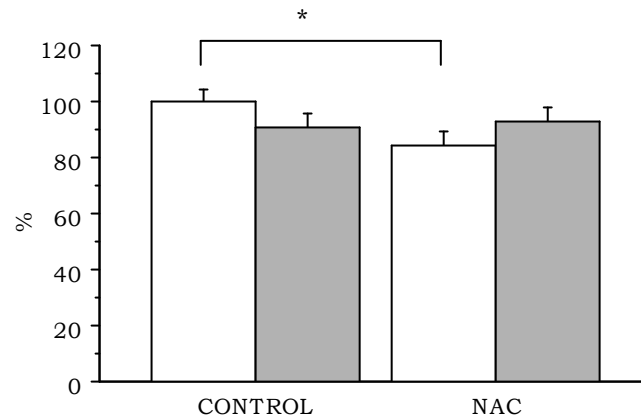


Figura IV.86: Niveles de mtDNA tras el tratamiento con NAC en las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J1c. El valor medio de híbridos H sin N-acetil-cisteína (NAC) se ha establecido en 100%. Las líneas finas verticales marcan la desviación estándar. H, 100,0 ± 4,2% (5); H (NAC), 84,1 ± 5,1% (5)*; J1c, 90,6 ± 5,1% (4); J1c (NAC), 93,0 ± 4,5 (4). * P = 0,0007.

IV.8 No hay diferencias en la viabilidad entre los haplogrupos mitocondriales

Se realizaron estudios de viabilidad celular para el estudio de los efectos en el rendimiento celular. Para ello se realizaron al menos tres experimentos diferentes en los que se determinó la viabilidad celular de células creciendo en medio de glucosa normal. La viabilidad celular fue mayor del 90 % en todos los casos, sin embargo, no observamos diferencias entre los diferentes haplogrupos (Figura IV.87).

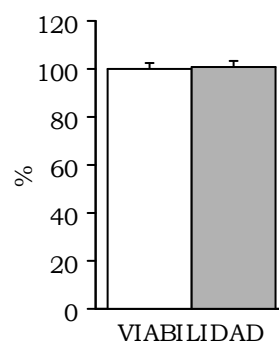


Figura IV.87: Viabilidad celular de las líneas celulares de las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J1c. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y J1c, respectivamente. El valor medio del parámetro determinado de las líneas celulares pertenecientes al haplogrupo H se fijó como 100%. Las líneas finas verticales representan la desviación estándar. H, 100,0 ± 2,6% (5); J1c, 100,5 ± 3,3% (5).

V. ESTUDIO FENOTÍPICO DE LOS SUBHAPLOGRUPOS DE LA FILOGENIA J (II): SUBHAPLOGRUPO J2

Por último, realizamos la caracterización fenotípica del subhaplogrupo del J, J2. El subhaplogrupo J2, de forma similar a su haplogrupo hermano J1c, es uno de los subhaplogrupos mayoritarios del J en Europa (Carelli, Achilli et al. 2006). Estudios poblacionales han relacionado esta filogenia con un aumento de la penetrancia de la mutación de la enfermedad de LHON m.14484A>G (Hudson, Carelli et al. 2007) y con una sobrerrepresentación en ancianos (Niemi, Hervonen et al. 2003; Dominguez-Garrido, Martinez-Redondo et al. 2009) y atletas de élite (Niemi and Majamaa 2005).

Este fondo genético mitocondrial está definido por varios SNPs del mtDNA, entre los que encontramos el cambio m.15257G>A/p.MT-CYB: D171N (Dominguez-Garrido, Martinez-Redondo et al. 2009). Llamativamente, esta posición está localizada en el centro Qo del complejo III y está conservada en un 97,5% de 276 especies de mamíferos (Gomez-Duran, Pacheu-Grau et al. 2011). Así, con el fin de establecer si las variantes genéticas fundadoras de la filogenia J definidas por cambios en el citocromo b tenían efecto fenotípico, llevamos a cabo la caracterización del haplogrupo J2 utilizando el haplogrupo H como control.

V.1 Las líneas celulares son adecuadas para nuestro estudio

De forma similar a los estudios fenotípicos anteriores consideramos la construcción de 4 líneas celulares por filogenia como mínimo. Además, se representaron varios subhaplogrupos de cada una de ellas, tal y como ocurre en la población general. Así, de las 4 líneas celulares pertenecientes al subhaplogrupo J2, tenemos una del haplogrupo J2a1a1, otra del J2b1a*, otra del J2b1a1 y, por último, otra del J2b1a2. En el caso del haplogrupo H, tres de ellas pertenecieron al subhaplogrupo H1, una al H13 y otra al H5. Las secuencias completas de cada línea híbrida se encuentran recogidas en las figuras IV.11 y IV.38.

V.2 Los niveles de mtDNA y del mtRNA están reducidos en las líneas híbridas pertenecientes al haplogrupo J2

En segundo lugar, siguiendo el orden de los análisis de caracterización de los grupos poblacionales anteriores, analizamos la dosis genómica y de mtRNA de las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos J2 y H.

A. La dosis genómica mitocondrial es menor en las líneas híbridas del haplogrupo J2

La determinación de los niveles de mtDNA mostró una caída significativa ($P=0,006$) de un 7% de la dosis genómica de las líneas celulares del haplogrupo J2 frente al haplogrupo H (Figura IV.88).

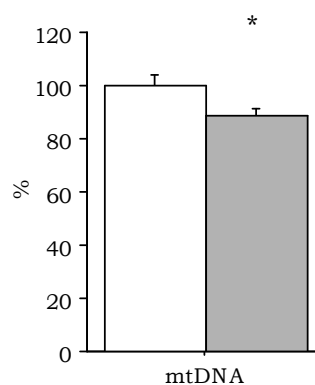


Figura IV.88: Niveles de mtDNA de las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J2. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y J2, respectivamente. El valor medio de las líneas celulares pertenecientes al haplogrupo H se fijó como 100%. Las líneas finas verticales representan la desviación estándar. H, 100,0 ± 2,6% (5); J2, 92,7 ± 3,6% (4). $P=0,0064$.

B. La cantidad de mRNA de genes asociados a la replicación del mtDNA no difiere entre ambos haplogrupos

La dosis genómica mitocondrial está controlada, entre otros, por las proteínas que participan en la replicación del mtDNA (Clay Montier, Deng et al. 2009). Determinamos los niveles de mRNA de la POLG, la proteína TWINKLE, RNA polimerasa mitocondrial o POLRMT y la mtSSB mediante qRT-PCR.

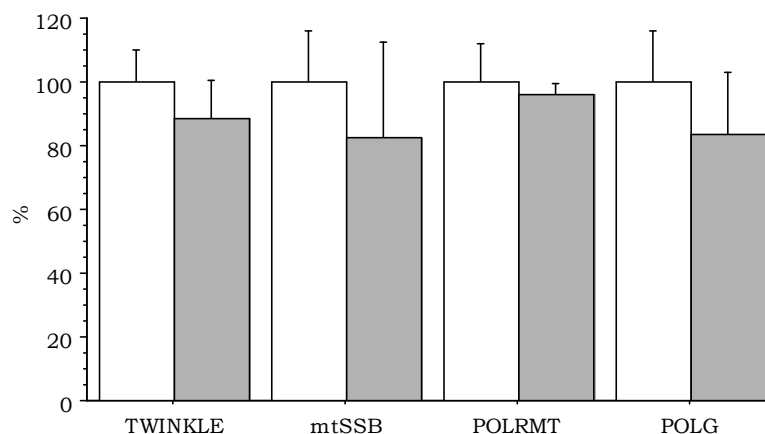


Figura IV.89: Niveles de mRNA de genes de proteínas implicadas en la replicación del mtDNA de las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J2. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y J2, respectivamente. El valor medio del total de las líneas del haplogrupo H se consideró 100%. Las líneas finas verticales marcan la desviación estándar. POLG: H, 100,0 ± 15,9% (5); J2, 83,6 ± 19,5% (4). mtSSB: 100,0 ± 16,2% (5); J2, 82,4 ± 30,1% (4). POLRMT: H, 100,0 ± 12,2% (5); J2, 96,1 ± 3,5% (4). TWINKLE; 100,0 ± 10,1% (5); J2, 88,6 ± 11,9% (4).

Como se puede observar en la figura anterior, no existen diferencias entre los niveles de mRNA de las líneas híbridas mitocondriales de los haplogrupos H y J2. Por lo tanto, el mecanismo responsable de la disminución en la dosis genómica mitocondrial ha de ser otra.

C. Los niveles del mtRNA están disminuídos en las líneas celulares de la filogenia J2

En muestras de cerebro de pacientes con síndrome de Down se ha observado una caída en los niveles de mtDNA que correlaciona con una disminución en los niveles del transcrito mitocondrial ND6 (Coskun, Wyrembak et al. 2010). Similarmente, hemos observado una disminución en los niveles de mtDNA y mtRNA en las filogenias Uk, J y J1c con respecto al haplogrupo H. Así, analizamos los niveles expresión de los genes codificados en el mtDNA mediante qRT-PCR en las líneas híbridas de los haplogrupos H y J2.

La cuantificación de los mRNA de los genes para subunidades de los complejos I, III, IV y V del mtDNA reveló la existencia de una disminución en los

niveles de todos los mRNA estudiados en las líneas híbridas pertenecientes al clado J2. La caída fue significativa únicamente en la subunidad COI del complejo IV. En la figura ilustrada a continuación se muestran los genes estudiados.

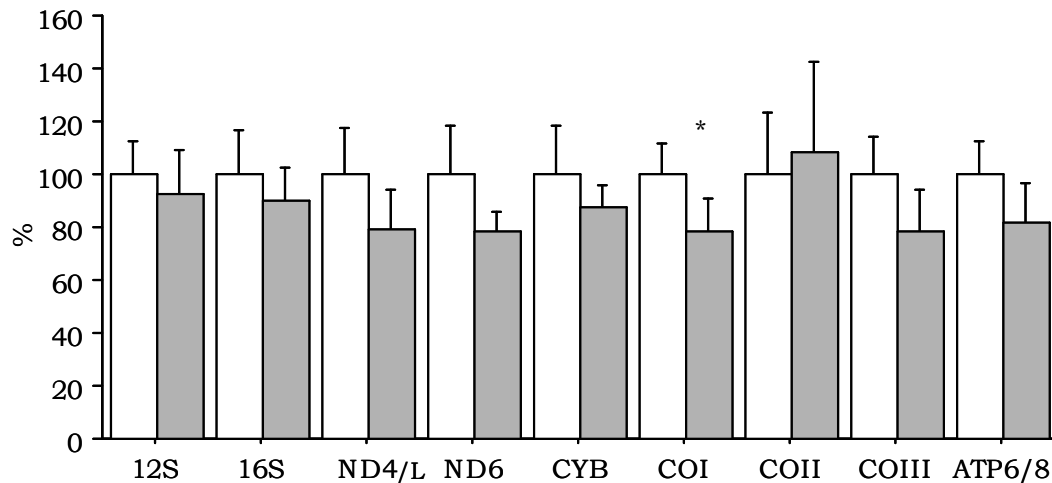


Figura IV.90: Niveles de mtRNA de las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J2 Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y J1c, respectivamente. El valor medio de cada mtmRNA de las líneas pertenecientes al haplogrupo H se fijó como 100%. Las líneas finas verticales representan la desviación estándar, 12S: H, 100,0 ± 12,7% (5); J2, 92,9 ± 16,2% (4). 16S: H, 100,0 ± 16,4% (5); J2, 90,1 ± 12,0% (4). ND4-ND4L: H, 100,0 ± 17,4% (5); J2, 79,5 ± 14,5% (4). ND6: H, 100,0 ± 18,5% (5); J2, 78,1 ± 8,0% (4). CYB: H, 100,0 ± 18,2% (5); J2, 87,5 ± 8,2% (4). COI: H, 100,0 ± 11,7% (5); J2, 78,3 ± 14,2% (4)*; COII: H, 100,0 ± 25,4% (5); J2, 108,4 ± 34,2% (4). COIII: H, 100,0 ± 13,9% (5); J2, 78,5 ± 15,2% (4). ATP6-ATP8: H, 100,0 ± 12,9% (5); J2, 82,0 ± 15,0% (4). * P = 0,03.

Seguidamente, decidimos estudiar que ocurría en cada una de las unidades de transcripción mitocondrial. La transcripción del genoma mitocondrial se lleva a cabo a partir de tres promotores diferentes: Uno para la cadena ligera (L) y dos para la cadena pesada (H1 y H2). Los productos de la cadena L incluyen el transcrito para ND6, los de la cadena pesada con comienzo en H1 incluyen a los dos rRNA, y el mayor transcrito, el que tiene comienzo en H2, contiene la mayoría de los genes que codifican para proteínas en el mtDNA; es decir, todos menos ND6. Así, con el fin de averiguar que ocurría en el subhaplogrupo J2 estudiamos las distintas unidades de transcripción mitocondrial.

El análisis estadístico de cada una de las unidades de transcripción mitocondrial en nuestras líneas híbridas transmitocondriales mostró una caída

en todas las unidades de transcripción de las líneas pertenecientes al haplogrupo J2. Sin embargo, esta caída no fue significativa.

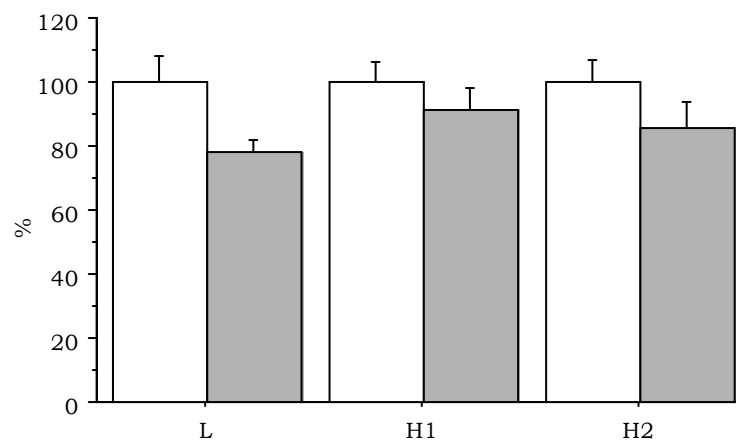
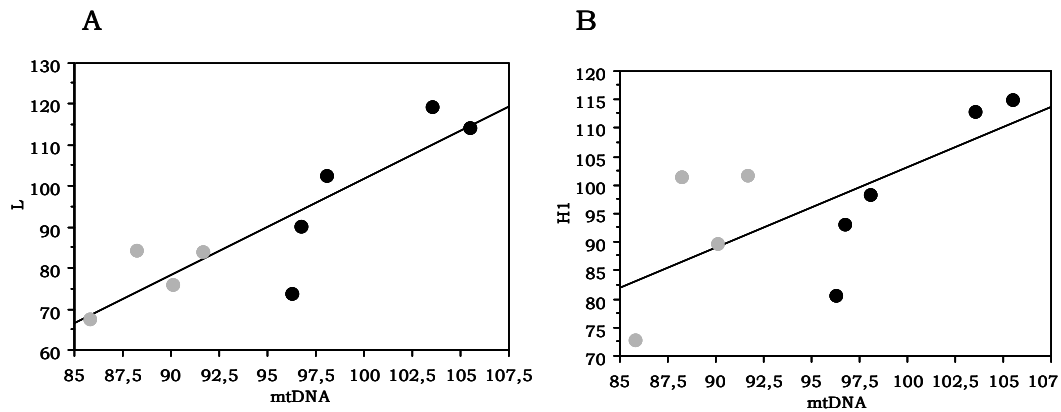
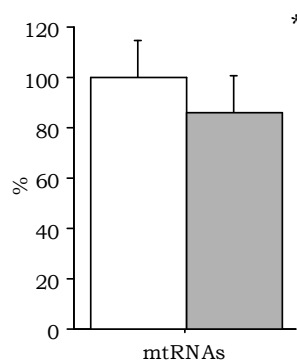


Figura IV.91: Unidades de transcripción mitocondrial de las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J2. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y J2, respectivamente. El valor medio para cada parámetro de los valores de las líneas pertenecientes al haplogrupo H se fijó como 100%. Las líneas finas verticales representan la desviación estándar. L: H, 100,0 ± 9,4 % (5); J2, 78,1 ± 8,0 % (4). H1: H, 100,0 ± 14,3 % (5); J2, 91,5 ± 13,6% (4). H2, H, 100,0 ± 15,3% (5); J2, 85,7 ± 15,6% (4).

En concordancia con los resultados obtenidos en los haplogrupos Uk, J y J1c, se pudo comprobar la existencia de una correlación significativa ($P=0,04$) entre los niveles de mtDNA y los niveles de transcripción de los rRNAs (H1) en las líneas celulares de los haplogrupos H y J2 (Figura IV. 92.B). Además, de forma similar al trabajo de Coskun *et al.*, 2010 los niveles de la cadena L ($P=0,001$), es decir de ND6, también correlacionaban significativamente con la dosis genómica mitocondrial.



Por último, comparamos los niveles mtRNA total entre las 2 filogenias de estudio. Tras el análisis estadístico, comprobamos que existía una disminución significativa ($P=0,043$) del 14% en los niveles de mtRNA de las celulares cíbridas pertenecientes al haplogrupo J2, de forma similar a como ocurría con los niveles de mtDNA.



D. Niveles de expresión de genes relacionados con la transcripción mitocondrial

El siguiente paso, fue analizar si la caída en los niveles de mtRNA venía condicionada por los niveles expresión de algunas de las proteínas implicadas en la transcripción del mtDNA. Determinamos los niveles de mRNA de la POLRMT, el MTFB2 y el MTERF por qRT-PCR (Bruni, Polosa et al. 2010).

Como se puede observar en la siguiente figura, no hay diferencias los niveles de expresión de ninguno de los genes estudiados. Por lo tanto, la caída en los niveles de mtRNA parece estar condicionada por la disminución de los niveles de mtDNA.

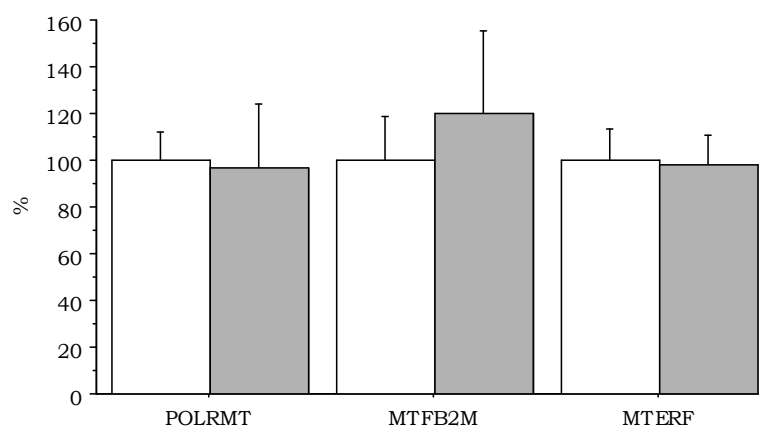


Figura IV.94: Niveles de mRNA de genes implicados en la replicación del mtDNA de las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J2. Las barras blancas y grises representan las medias de los valores de las líneas celulares del haplogrupo H y J2, respectivamente. El valor medio de los valores de las líneas del haplogrupo H se fijó en 100%. Las líneas finas verticales marcan la desviación estándar. POLRMT: H, 100,0 ± 12,2% (5); J2, 96,1 ± 3,5% (4). MTFB2: 100 ± 15,9% (5); J2, 118,2 ± 26,0% (4). MTERF: H, 100,0 ± 13,0% (5); J2, 91,19 ± 19,21% (4).

V.3 La síntesis mitocondrial de proteínas está disminuida en las líneas celulares del haplogrupo J2

En líneas celulares en cultivo se ha observado una correlación entre los productos de traducción mitocondrial y los niveles de mtRNA (Cotney and Shadel 2006). En adición, los análisis de las filogenias Uk y J, y del subhaplogrupo J1c, mostraron una caída significativa en la síntesis de proteínas mitocondriales, que correlacionaba, con los niveles de RNA de los rRNA.

Se realizaron al menos dos electroforesis por línea celular de las proteínas marcadas con S³⁵. Paralelamente, para comprobar que las posibles diferencias no se debían a una desproporción en la cantidad de proteína cargada se llevó a cabo la tinción del gel con Azul de Coomassie. No se observaron diferencias en la carga proteica (Figura IV.95). Para el análisis de los productos de traducción de cuantificaron varios proteínas mitocondriales por densitometría. En particular, en el gel expuesto en la siguiente figura se escogieron p.MT-CO1, p.MT-ND2 y p.MT-ND3. La elección de las mismas se basó en su situación física en el gel. Una en la parte superior, otra en la media y otra inferior.

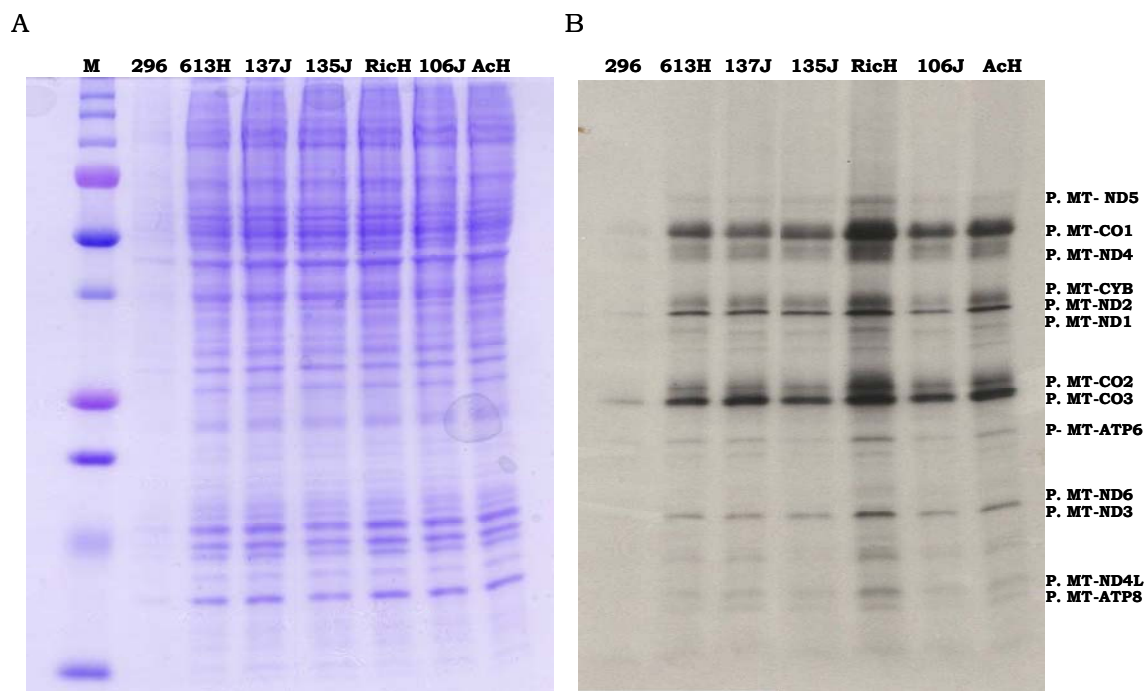


Figura IV.95: Síntesis de proteínas mitocondriales en las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J2. A. Control de carga, B. Patrón de electroforesis de los productos de traducción mitocondrial de las líneas celulares híbridas. M, marcador de peso molecular.

Tal y como se puede observar en la figura anterior, las líneas celulares pertenecientes al haplogrupo J2 producían menor cantidad de proteínas mitocondriales que aquellas pertenecientes al haplogrupo H. El análisis por clado reveló que, efectivamente, existía una disminución significativa ($P = 0,02$) de un 27% en los productos de traducción de las líneas celulares del haplogrupo J2 con respecto a las del haplogrupo H (Figura IV.96).

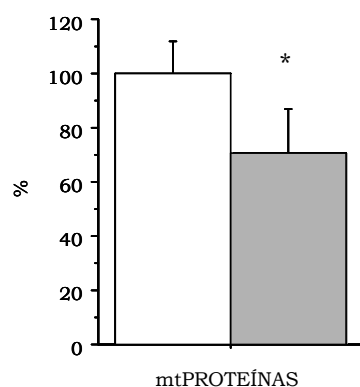


Figura IV.96: Síntesis de proteínas mitocondriales en las líneas celulares pertenecientes a los haplogrupos H y J2. Las barras blancas y grises representan las medias del haplogrupo H y J2 respectivamente. La media de los valores de las líneas cibradas pertenecientes al haplogrupo H se fijó como 100%. Las líneas finas verticales marcan la desviación estándar. H, $100,0 \pm 12,1\%$ (5); J2, $73,2 \pm 14,1\%$ (4). $P = 0,02$.

Además, análogamente a Cotney *et al.* 2006 encontramos una concordancia significativa ($P=0,02$) entre la síntesis de proteínas mitocondriales y los niveles de mtDNA de ambos haplogrupos.

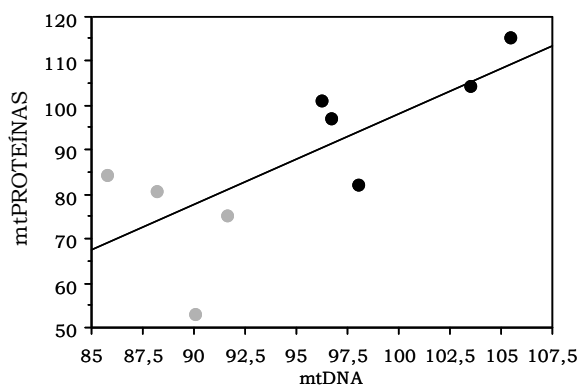


Figura IV.97: Correlación de la síntesis de proteínas mitocondriales y los niveles de mtDNA en las líneas cibradas pertenecientes a los haplogrupos H y J2. Los puntos de color negro representan la media de cada una de las líneas celulares del haplogrupo H y los de color gris las pertenecientes al haplogrupo J. La recta obtenida tras la representación gráfica tenía la siguiente ecuación: $y = -105,9 + 2,0x$. $R^2 = 0,5$, $P = 0,02$.

V.4 Estudio de la fracción celular ocupada por mitocondria

El siguiente paso fue estudiar si todos los cambios descritos hasta el momento eran debidos a diferencias en el número de mitocondrias, por lo que decidimos analizar la fracción celular ocupada por mitocondria a distintos niveles.

En primer lugar, determinamos la actividad enzimática de la citrato sintasa (CS), una enzima que refleja el número o el volumen mitocondrial (Krahenbuhl, Schafer et al. 1996). Observamos que en el caso del haplogrupo J2 había un aumento significativo de la actividad de la enzima CS (Figura IV.98.A).

En segundo lugar, se determinó la actividad enzimática y la cantidad de proteína de la succinato deshidrogenasa o CII. No observamos diferencias entre ambos haplogrupos, ni en actividad (Figura IV.98.A), ni en cantidad determinada mediante SDS-PAGE seguido de transferencia a membrana y *Western-Blot* (Figura IV.98.A y B).

Por último estudiamos la superficie de la membrana mitocondrial interna (MIMS). Curiosamente, al igual que pasaba con la actividad de la CS, la MIMS estaba aumentada de forma significativa ($P=0,04$) en las líneas celulares pertenecientes al haplogrupo J2, quizás como forma de compensación mitocondrial a la caída observada en los niveles de mtDNA, mtRNA y proteínas mitocondriales.

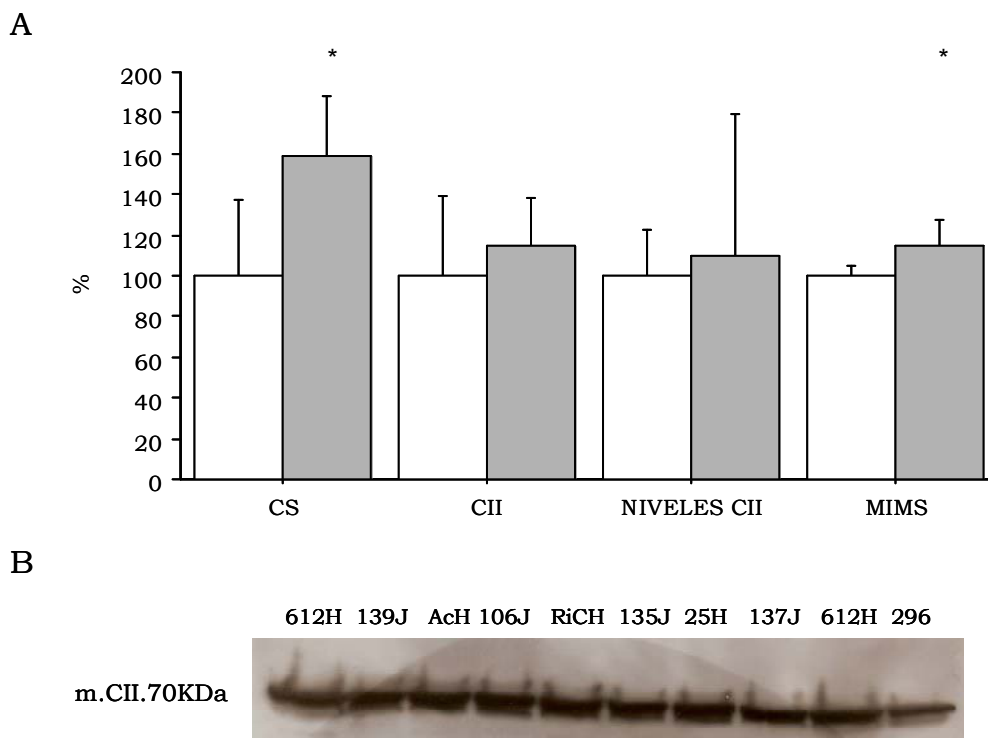


Figura IV.98: Fracción celular ocupada por mitocondria en las líneas celulares pertenecientes a los haplogrupos H y J2. Las barras blancas y grises representan las medias del haplogrupo H y J2, respectivamente. La media de los valores de las líneas pertenecientes al haplogrupo H se fijó como 100%. Las líneas finas verticales marcan la desviación estándar. CS: H, 100,0 ± 32,3 (5); J2, 158,9 ± 30,0% (4)*. CII: H, 100,0 ± 38,9% (5); J2, 115,0 ± 22,8% (4). Estudio densitométrico del CII: H, 100,0 ± 22,5% (5); J2, 110,2 ± 69,5% (4) y MIMS: H, 100,0 ± 5,0% (5); J2, 110,9 ± 11,0% (9)*. B. Ejemplo representativo de *Western-Blot* para la detección de la subunidad de 70KDa del complejo II. * P=0,04.

V.5 La actividad y cantidad COX son similares en ambos haplogrupos

La estimación de la funcionalidad del sistema OXPHOS mediante el estudio de la actividad de la citocromo c oxidasa o CIV es muy común (Wong-Riley 1989; Gallardo, Moreno-Loshuertos et al. 2006). Se efectuaron estudios tanto de la actividad, como de la cantidad del complejo.

Para el análisis de la actividad enzimática realizamos dos determinaciones independientes. En primer lugar, se llevó a cabo una medida espectrofotométrica referida a la actividad de la CS. Paralelamente, se empleó un kit comercial que permitía cuantificar en el mismo pocillo tanto la actividad, como la cantidad de complejo por mg de proteína.

No encontramos diferencias entre ambos haplogrupos, ni en actividad del CIV, descrita en la siguiente figura como el cociente CIV/CS, ni en actividad específica, descrita como ACTIVIDAD CIV.

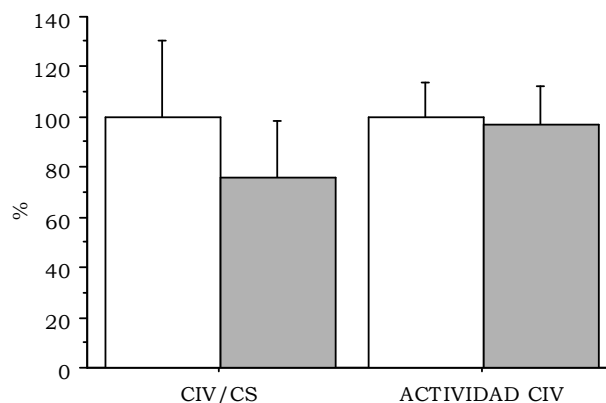


Figura IV.97: Actividad del complejo CIV en las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J2. El valor medio de cada parámetro de las líneas pertenecientes al haplogrupo H se fijó como 100%. Las líneas finas verticales representan la variación estándar. CIV/CS: H, 100,0 ± 30,4% (5); J2, 75,6 ± 23,0 % (4). Actividad específica: H, 100,0 ± 13,5% (5); J, 96,7 ± 15,9% (4).

El primer paso en el ensamblaje del complejo IV es la inserción del polipéptido p.MT-CO1 en la membrana mitocondrial interna (Fernandez-Vizarra, Enriquez et al. 2008). Así, para determinar los niveles de complejo IV medimos la cantidad de esta proteína por *Western-Blot*, utilizando la señal de la subunidad de 70KDa del CII como control. Sumado a esto, se cuantificaron los niveles de complejo mediante un ensayo Elisa con el kit comercial citado anteriormente.

No se encontraron diferencias en los niveles de complejo IV entre los haplogrupos estudiados por ninguno de los métodos utilizados.

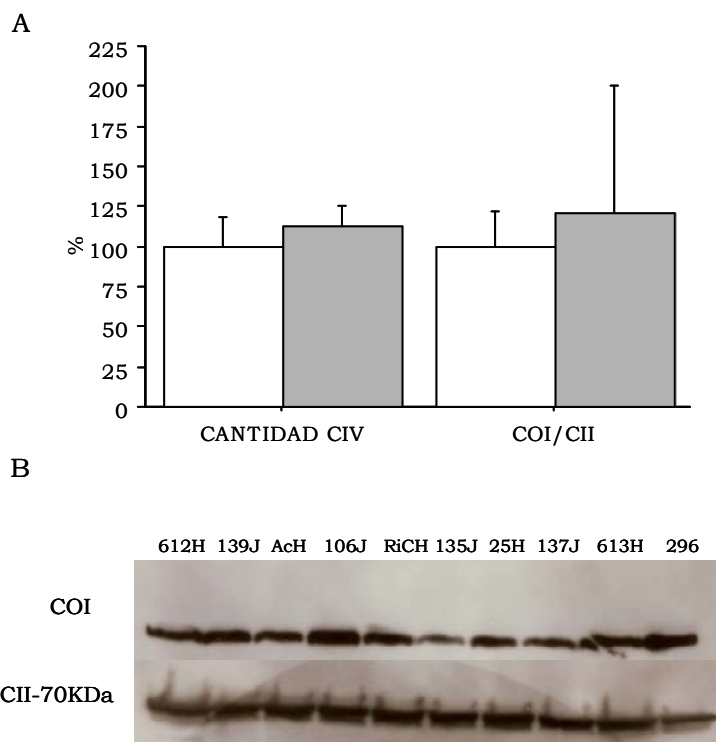


Figura IV.99: Niveles de CIV en las líneas celulares en las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J2 El valor medio de cada parámetro de las líneas pertenecientes al haplogrupo H se fijó como 100%. Las líneas finas verticales representan la variación estándar. CANTIDAD CIV: H, $100,0 \pm 18,0\%$ (5); J2, $112,1 \pm 13,6\%$ (4). p.MT-COI/CII: H, $100,0 \pm 21,8\%$ (5); J2, $121,2 \pm 79,0\%$ (4). B. Ejemplo representativo de detección de *Western-Blot*. La muestra rotulada como 139J pertenece al haplogrupo J1c. COI significa p.MT-CO1.

Además, existía una relación significativa y positiva entre los niveles y la actividad específica del complejo IV, tal y como se muestra en la siguiente figura. Tal y como se había observado en el resto de las filogenias estudiadas

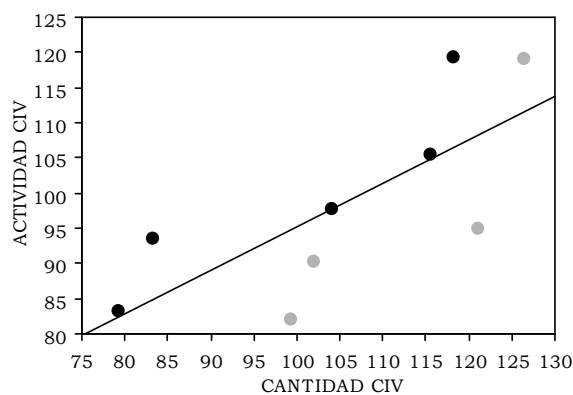


Figura IV.100: Correlación de la cantidad y la actividad de CIV en las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J2. Los puntos de color negro representan la media de cada una de las líneas celulares del haplogrupo H y los de color gris las pertenecientes al haplogrupo J2. La recta obtenida tras la representación gráfica presenta la siguiente ecuación: $y = 33,3 + 0,6x$, $R^2 = 0,62$, $P = 0,02$.

V.6 El consumo de oxígeno, el MIMP y la cantidad de ATP fueron diferentes entre las líneas híbridas de los haplogrupos H y J2

A. El consumo de O₂ fue menor en las líneas del haplogrupo J2

En las líneas celulares pertenecientes al haplogrupo J se ha observado una correspondencia entre la actividad del complejo IV y la respiración endógena. Así, se determinó el consumo de oxígeno en cada una de las líneas celulares de los haplogrupos J2 y H. Los datos se expresaron como fmoles/min/célula.

La determinación de consumo de oxígeno endógeno mostró que las líneas pertenecientes al subclado J2 presentaban una caída de un 20% en la tasa de respiración. Sin embargo esta no era significativa, tal y como se puede observar en la Figura IV.101. La respiración filtrante, es decir, aquella inhibida con oligomicina, y la desacoplada con FCCP mostró también una caída en las líneas pertenecientes al haplogrupo J2. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre ambos haplogrupos, tal y como se puede observar en la figura IV.101.

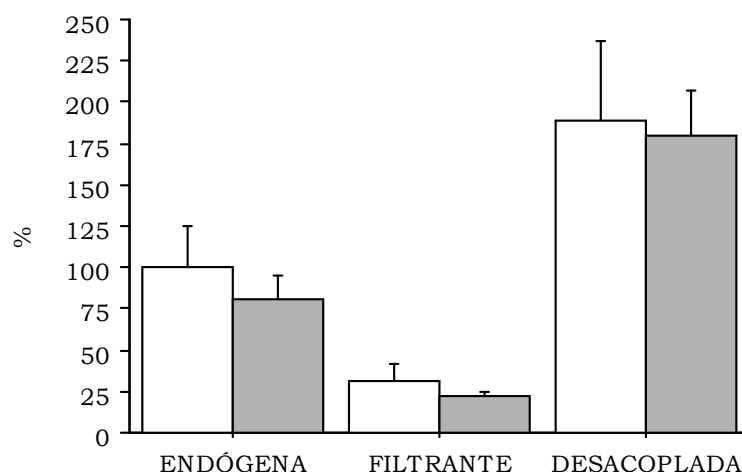


Figura IV.101: Consumo de oxígeno en las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J2. A. Estudio del consumo de oxígeno entre el haplogrupo H (blanco) y el haplogrupo J2 (gris). La respiración endógena de los H ha sido fijada en 100%. Las líneas finas verticales marcan la desviación estándar. Consumo de oxígeno endógeno; H, $100 \pm 24,5\%$ (5); J2, $81,0 \pm 13,4\%$ (4). Respiración filtrante; H, $30,9 \pm 11,2\%$ (9). J2, $22,1 \pm 3,0\%$ (4). Respiración desacoplada; H, $189,2 \pm 47,3\%$ (5); J2, $179,2 \pm 27,3\%$ (4).

B. El MIMP fue menor en las líneas del haplogrupo J2

La tasa de consumo de oxígeno es inversamente proporcional al potencial de membrana mitocondrial interna (MIMP) (Brookes 2005). Por lo tanto, nuestros resultados en el consumo de oxígeno sugerían que los cíbridos J2 deberían tener una mayor MIMP que las líneas cíbridas del haplogrupo H.

La determinación de MIMP mostró una disminución significativa en las líneas pertenecientes al clado J2, tal y como se puede observar en la figura IV.102 expuesta a continuación. Este resultado sugería un flujo de electrones más lento a través de la cadena por parte de las líneas pertenecientes al haplogrupo J.

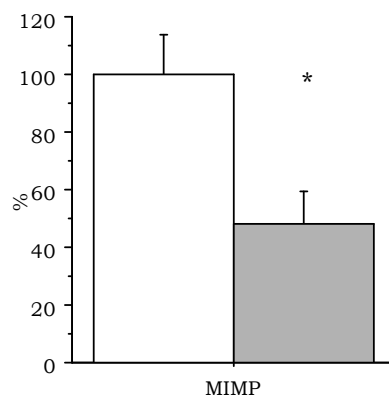


Figura IV.102: Potencial de membrana interna mitocondrial en líneas celulares del haplogrupo H y J2. El valor medio de cíbridos H se ha establecido en 100%. Las líneas finas verticales representan la desviación estándar de nuestras medidas. MIMP: H, 100,0 ± 13,5% (5); J2, 48,1 ± 11,1% (4). P = 0,0004.

C. La cantidad de ATP era diferente entre las líneas celulares del haplogrupo H y J2

Una de las funciones más importantes del sistema OXPHOS es la producción de energía en forma de ATP. Se realizó el estudio de los niveles de ATP en distintas condiciones. Todas las determinaciones se llevaron a cabo por cuadruplicado, en al menos tres experimentos independientes, los datos expresados como cantidad de ATP/ proteínas totales.

La medida de los niveles de ATP total en glucosa, mostrado en la figura IV.104 como G, reveló que las líneas J2 presentaban una disminución significativa en la cantidad de ATP, que correlacionaba significativamente ($P=0,007$) con la caída observada en el MIMP, tal y como podemos observar en la figura expuesta a continuación.

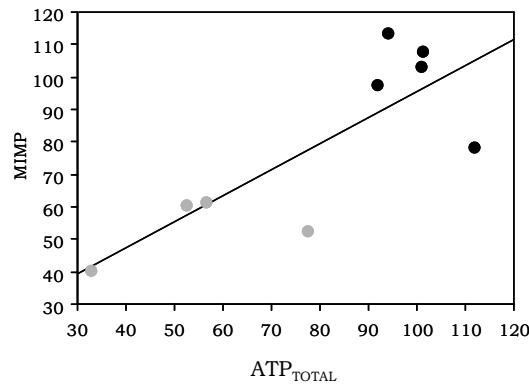


Figura IV.103: Correlación del MIMP y los niveles de ATP_{TOTAL} en las líneas cíbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J2. Los puntos de color negro representan la media de cada una de las líneas celulares del haplogrupo H y los de color gris las pertenecientes al haplogrupo J2. ATP_{TOTAL}: Contenido en ATP en medio de glucosa, MIMP: Potencial de membrana interna mitocondrial. La recta obtenida tras la representación gráfica presenta la siguiente ecuación porcentaje $y = 15,6 + 0,8x$, $R^2 = 0,58$, $P = 0,007$.

Sin embargo, la cantidad del ATP mitocondrial determinada empleando el inhibidor de la glicólisis 2-deoxi-glucosa y el sustrato de la respiración piruvato mostró que las líneas cíbridas de ambos haplogrupos presentaban niveles comparables de ATP (Figura IV.104). No obstante, existía una disminución no significativa del 17% en las líneas celulares pertenecientes al haplogrupo J2 con respecto a las del haplogrupo H. Además, la incubación con 2-deoxi-glucosa y oligomicina, un inhibidor de la ATPsintasa, mostraba una caída en la cantidad de ATP en las líneas celulares pertenecientes al haplogrupo H mayor que la observada en los del J2 (Figura IV.104). Este dato reflejaba que las líneas celulares del haplogrupo J2 parecían presentar menores niveles de ATP de origen mitocondrial.

Por último, se determinó el ATP de origen glicolítico. Para ello, se incubaron las células en medio de glucosa suplementado con oligomicina. El análisis reveló la existencia de diferencias significativas entre ambos clados,

confirmando el origen glicolítico de la deficiencia observada en medio con glucosa.

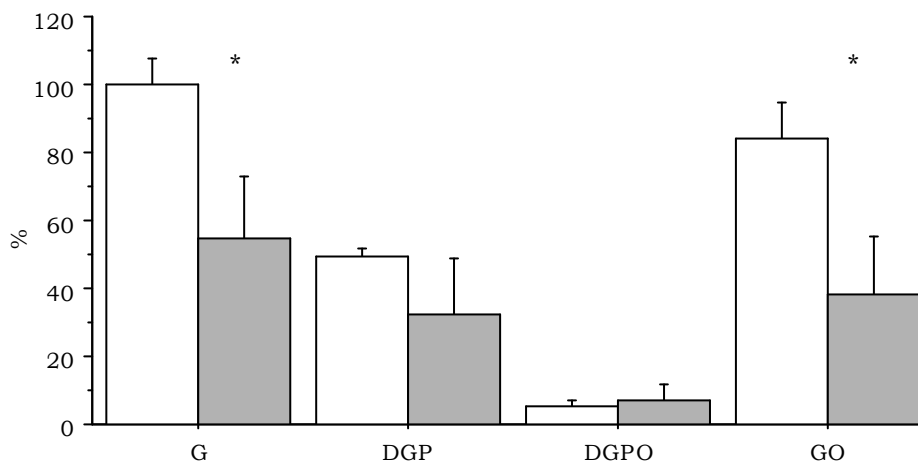


Figura IV.104: Niveles de ATP en las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J2. Estudio de los niveles de ATP en híbridos H (blanco) y el J (gris). G, DGP, DGPO, GO son abreviaturas de la glucosa, 2-deoxi-glucosa y 1 mM de piruvato, 2-deoxi-glucosa más 1 mM piruvato y 2,5 mg / ml y oligomicina, glucosa más 2.5 mg / ml de oligomicina, respectivamente. El valor medio de las líneas híbridas pertenecientes al haplogrupo H en glucosa se ha establecido en 100%. G: H, 100,0 ± 7,8% (5); J2, 54,9 ± 18,3% (4)*. DGP: H, 49,3 ± 2,2% (5); J2, 32,5 ± 16,6% (4). DGPO: H, 5,6 ± 1,6% (5); J2, 7,2 ± 4,5% (4). GO: H, 84,0 ± 10,9% (5); J2, 38,2 ± 17,1% (4)*. *P ≤ 0,002.

En relación a los resultados obtenidos, es posible que las líneas celulares del haplogrupo J2 presenten un defecto en su sistema glicolítico. Por ende, determinamos los niveles de mRNA de la PFKL en las líneas celulares de ambas filogenias. Se eligió la PFKL porque es la principal enzima reguladora de la glicólisis. La determinación de los niveles de PFKL en líneas celulares creciendo en medio con glucosa reveló que las líneas híbridas del haplogrupo J2 presentan un aumento significativo del 28% en los niveles de expresión de la PFKL con respecto a las del H, tal y como se puede observar en la figura IV.105.

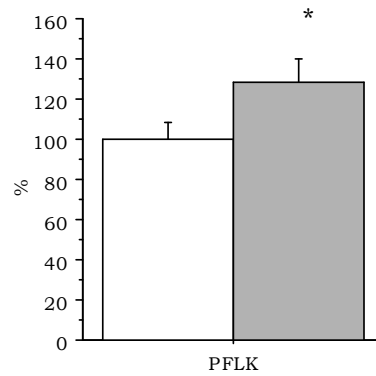


Figura IV.105: Niveles del mRNA de la PFKL en las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J2, en blanco y gris, respectivamente. El valor medio de las líneas híbridas del haplogrupo H se fijó como 100%. Las barras verticales representan la desviación estándar de los valores. H, $100,0 \pm 8,3\%$ (5); J2, $128,5 \pm 11,4\%$ (4). $P=0,006$.

V.7 Marcadores de daño oxidativo

Las mitocondrias son la fuente celular más importante en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS). Por ello en esta tesis doctoral hemos hecho hincapié en el estudio de este factor. En este caso, para el estudio del daño oxidativo aplicamos dos técnicas. Por un lado la estimación de la producción de ROS y su relación con la dosis genómica mitocondrial con y sin NAC, y por otro la estimación del anión superóxido con la determinación de los niveles de expresión de la MnSOD.

Experimentos en líneas híbridas de ratón han demostrado la existencia de una correlación positiva entre los niveles de mtDNA y la producción de ROS. Esta relación se invertía tras el tratamiento con NAC en aquellas variantes más oxidativas. Sin embargo, en aquellas variantes genéticas menos oxidativas, los niveles de mtDNA no se vieron afectados tras el tratamiento con el mismo (Moreno-Loshuertos, Acin-Perez et al. 2006).

Del mismo modo, nuestras líneas híbridas pertenecientes al haplogrupo H vieron reducida su dosis genómica mitocondrial de forma significativa en un 16% tras el tratamiento con NAC ($P=0,009$), frente a líneas híbridas del haplogrupo J2, en las que se produjo una caída significativa del 3% tras el tratamiento con el mismo ($P=0,04$). Perdiendo así la diferencia entre los niveles de mtDNA entre ambos haplogrupos (Figura IV.106).

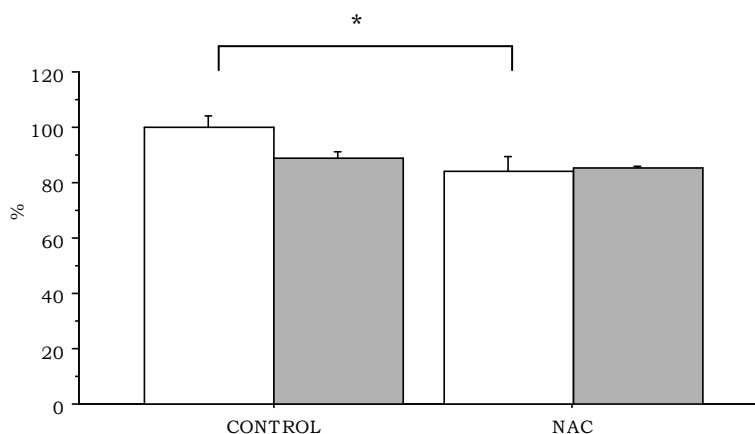


Figura IV.106: Niveles de mtDNA tras el tratamiento con NAC en líneas híbridas pertenecientes al haplogrupo H y J2. Haplogrupo H (blanco) vs. J (gris). El valor medio de híbridos H sin N-acetil-cisteína (NAC) se ha establecido en 100%. Las líneas verticales representan la desviación estándar de los valores. H, $100,0 \pm 4,2\%$ (5); H (NAC), $84,1 \pm 5,1\%$ (5); J2, $88,8 \pm 4,5\%$ (4). 2J (NAC), $85,8 \pm 5,1\%$ (4). *, $P \leq 0,009$. Los datos se muestran como $x \pm SD$ (N).

La MnSOD es la encargada de dismutar el anión superóxido en peróxido de hidrógeno. así la determinación de los niveles de expresión de la MnSOD es una medida indirecta de la producción de ROS en nuestras líneas celulares (Strehlow, Rotter et al. 2003). La determinación de los niveles de MnSOD no mostró diferencias entre ambos haplogrupos, tal y como se puede observar en la siguiente figura.

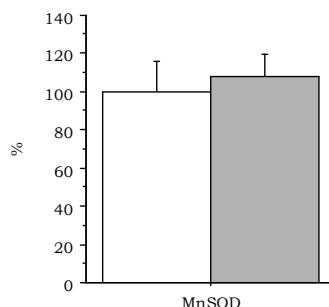


Figura IV.107: Niveles de mRNA de la MnSOD en las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J2. Estudio del haplogrupo H (blanco) vs. J (gris). La media de las líneas celulares del haplogrupo H se ha fijado en 100%. Las líneas verticales representan la desviación estándar. H, $100,0 \pm 15,6\%$ (5); J2, $103,0 \pm 11,3\%$ (4).

V.8 Las variantes genéticas de los haplogrupos H y J2 no tienen efecto sobre la viabilidad celular

Se realizaron estudios de viabilidad celular para observar si las características fenotípicas de cada haplogrupo tenían efectos sobre el rendimiento celular. Se realizaron al menos tres experimentos diferentes en los

que se determinó la viabilidad celular de células creciendo en medio de glucosa normal. La viabilidad fue mayor al 99% en todos los casos y no se observaron diferencias en la viabilidad entre los diferentes haplogrupos (Figura IV.108).

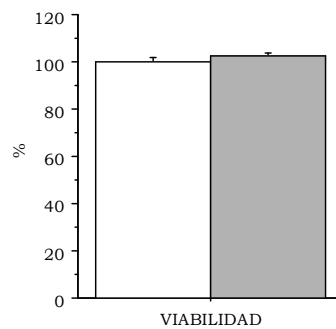


Figura IV.108: Viabilidad celular en las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H (blanco) y J2 (gris). El valor medio de las líneas híbridas pertenecientes al haplogrupo H se ha fijado como 100%. Las líneas finas verticales marcan la desviación estándar H, $100,0 \pm 2,6\%$ (5); J2, $102,4 \pm 1,6\%$ (4).

VI. ESTUDIO FARMAQGENÓMICO

El segundo gran objetivo de esta tesis doctoral consiste en la búsqueda de nuevos fármacos que actúen a nivel del bolsillo de unión del coenzima Q. En particular, fármacos dirigidos selectivamente al complejo III.

Para ello, colaboramos con el profesor Julio Álvarez Builla de la Universidad de Alcalá de Henares, director del grupo encargado de la síntesis de las drogas, y la profesora Beatriz Pascual de la Universidad San Pablo Ceu de Madrid, directora del grupo encargado de los estudios de *docking*.

El estudio se llevó a cabo en varias fases: La primera incluye el *screening*, la titulación y la elección de la dosis de trabajo de los compuestos con actividad desacoplante a nivel OXPHOS. La segunda fase engloba el estudio farmacogenómico, para ello se utilizaron líneas celulares portadoras de fondos genéticos mitocondriales con diferencias en SNPs localizados cerca de los sitios de unión del CoQ, y en tercer lugar, aquellas drogas con mayor actividad desacoplante se testaron en una línea celular portadora de una mutación patológica que causa un aumento de daño oxidativo.

Los 6 compuestos analizados se agrupan en dos series ASM-07 y MAR-2Q. La serie ASM-07 consta de tres moléculas nominadas ASM-07-01, ASM-07-02 y ASM-07-03. La serie MAR-2Q incluye 3 compuestos; MAR-2Q-20, MAR-2Q-21, y MAR-2Q-25.

VI.1 Fase 1: Titulación y elección de la dosis de trabajo

A. Estudio de la IC₅₀

En primer lugar se chequeó la toxicidad de los nuevos compuestos. Se utilizaron células humanas en cultivo. Se determinó la concentración de droga capaz de inhibir un 50% el crecimiento celular (del inglés, *Inhibitory Concentration 50*, IC₅₀). Para ello, se crecieron las células durante 48h con cantidades crecientes de cada una de las moléculas de estudio. Pasado ese

tiempo, se determinó la cantidad de células viables, considerando el control (células sin tratar), el 100%. Además se utilizó un control de vehículo (DMSO).

El rango de concentraciones utilizado para la mayoría de las drogas estuvo comprendido entre 1nM y 1mM. Se encontró una correlación significativa y negativa entre las concentraciones crecientes de la droga y el porcentaje de células vivas, tal y como se puede observar en la figura IV.109 y en la tabla IV.4.

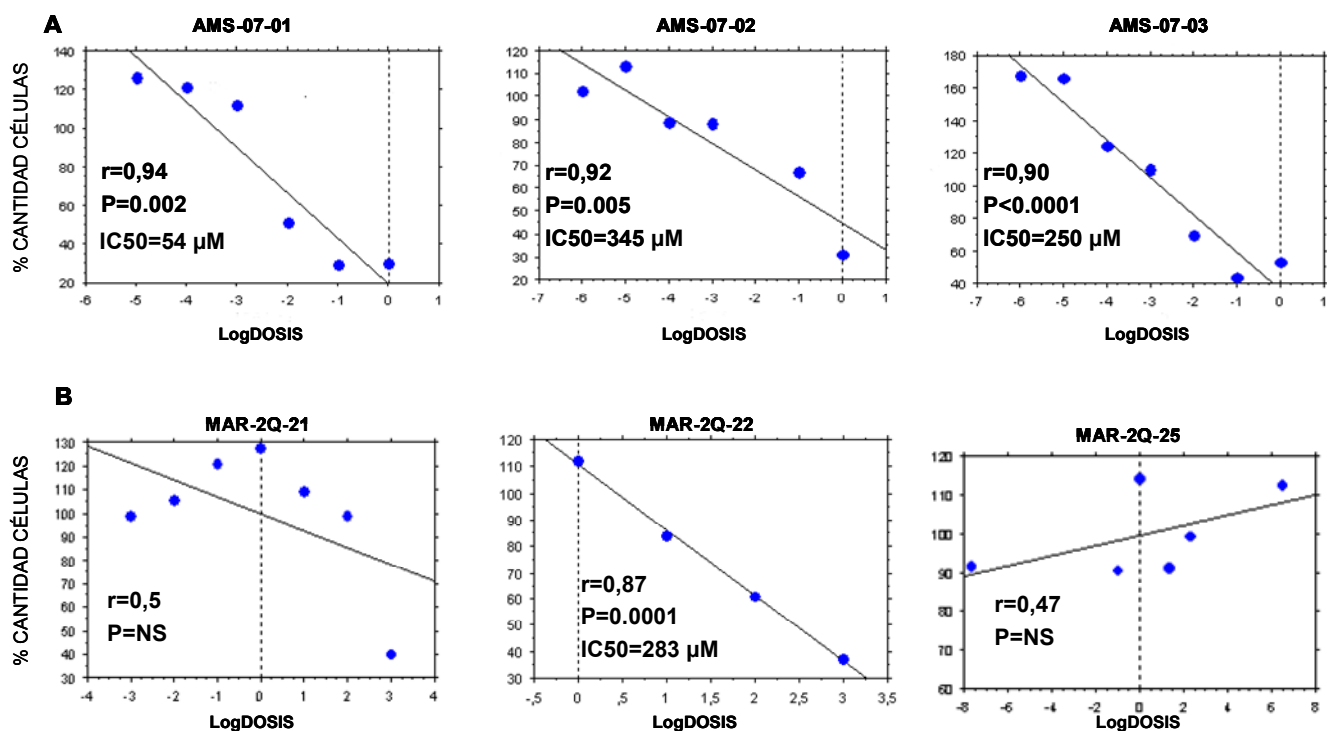


Figura IV.109: Estudio de la IC50. Representación del porcentaje de células vivas frente al log de la dosis. La cantidad de células control (sin droga) se fijó como 100%. A. Serie ASM. B. Serie MAR-2Q. La letra r representa el coeficiente de correlación resultante del Z-test.

Para dos compuestos, MAR-2Q-21 y 25, no se observó una alteración del crecimiento en los rangos de concentraciones utilizados.

Como nuestro objetivo consistía en la búsqueda de compuestos con efecto específico sobre el sistema OXPPOS, refinamos la concentración de cada uno de los compuestos a aquellas con menor efecto sobre el crecimiento. En todos los casos se escogieron concentraciones por debajo de 25 μM, y se estudió el % de crecimiento celular durante 48h. Encontramos un % de crecimiento celular superior al 90% en todas las drogas (Tabla IV.4). En consecuencia, se eligieron concentraciones menores a esta para los análisis posteriores.

COMPUESTO	RANGO DE DOSIS	RANGO DE VIABILIDAD (%)
ASM-07-01	0, 1-20 (μM)	90, 0-93, 2
ASM-07-02	0, 1-20 (μM)	91, 0-94, 8
ASM-07-03	0, 1-20 (μM)	90, 0-94, 3
MAR-2Q-21	0,1 -25 (μM)	90, 0-100, 2
MAR-2Q-22	0,1 -20 (μM)	91, 1-101, 5
MAR-2Q-25	0,1 -20 (μM)	92-91, 3

Tabla IV.4: Estudio de crecimiento celular tras 48h de incubación con los compuestos de estudio. Las células sin droga fueron fijadas como 100 %.

B. Estudio de la actividad sobre el sistema OXPHOS

El siguiente paso fue determinar si las moléculas de estudio presentaban actividad sobre el sistema OXPHOS. Para ello se analizaron dos parámetros: ATP mitocondrial (mtATP) y potencial de membrana interna mitocondrial (MIMP). El mtATP corresponde a la cantidad de ATP total que producen las células tras la incubación con el inhibidor de la glicólisis 2-deoxi-glucosa y piruvato, es decir un sustrato que da lugar a la síntesis de ATP únicamente por vía OXPHOS. Se llevaron a cabo análisis en una línea celular tras 2h de incubación con cada uno de ellos.

Como se puede observar en la tabla IV.5, la concentración de 10 μM de casi cualquiera de los compuestos disminuía de forma significativa el MIMP. Sin embargo, en el caso del compuesto MAR-2Q-21, el efecto fue observado a 20 μM . El compuesto MAR-2Q-25 actuaba aumentando el MIMP. Además, en aquellos compuestos que provocaban una disminución del MIMP, esta caída estaba acompañada de un descenso en los niveles de ATP mitocondrial (mtATP).

DROGA	DOSIS (μM)	mtATP	MIMP
ASM-07-01	2,5	46,5 \pm 6,8 (4)	94,6 \pm 0,7 (4)
	5	35,0 \pm 6,4 (4)	92,7 \pm 2,8 (4)
	10	11,4 \pm 0,4 (4)	48,1 \pm 2,6 (4)
	20	13,1 \pm 3,9 (4)	45,1 \pm 0,8 (4)
ASM-07-02	2,5	36,3 \pm 9,7 (4)	100,4 \pm 5,3 (4)*
	5	43,3 \pm 9,3 (4)	96,4 \pm 2,8 (4)
	10	13,4 \pm 2,1 (4)	45,3 \pm 2,6 (4)
	20	12,0 \pm 2,2 (4)	44,6 \pm 1,9 (4)
ASM-07-03	10	61,9 \pm 3,1 (4)	65,9 \pm 8,1 (4)
	20	53,3 \pm 11,4 (4)	69,3 \pm 4,1 (4)
MAR-2Q-21	10	53,3 \pm 11,4 (4)	119,9 \pm 21,8 (4*)
	20	77,8 \pm 14,6 (4)	72,6 \pm 1,4 (4)
	25	74,7 \pm 7,2 (4)	73,0 \pm 18,3 (4)
	100	60,3 \pm 11,8 (4)	51,0 \pm 0,99 (4)
MAR-2Q-22	10	9,2 \pm 0,8 (4)	48,6 \pm 0,6 (4)
	20	8,7 \pm 2,9 (4)	46,0 \pm 1,8 (4)
MAR-2Q-25	10	123,2 \pm 13,2 (4)*	933,0 \pm 60,9(4)
	20	103,4 \pm 3,9 (4)*	2114,4 \pm 769,2 (4)
	50	83,1 \pm 2,2 (4)	5385,5 \pm 133,6 (4)

Tabla IV.5: Medida del mtATP y el MIMP tras el tratamiento con los compuestos a distintas dosis. Se representa la media para cada determinación con cada uno de los compuestos en referencia a las células sin droga consideradas como 100%, para una única línea celular por cuadruplicado. Con * se marcan aquellas determinaciones que no presentan diferencias significativas frente al blanco. Los datos se muestran como $x \pm SD$ (N).

En este tipo de células tumorales, altamente glicolíticas, los niveles de mtATP representan únicamente una fracción de los niveles de ATP total. Estos resultados sugieren que nuestros compuestos tenían efecto sobre el sistema OXPHOS. Por lo tanto, extendimos nuestro análisis a un mayor número de líneas híbridas mitocondriales diferentes, utilizando 2 concentraciones distintas para cada molécula en el caso de la serie ASM-07 y una concentración en el caso de la serie MAR-2Q, salvo el MAR-2Q-25.

El análisis de los parámetros mitocondriales de las 12 líneas celulares mostraba diferencias con respecto a la determinación en una única línea celular,

tal y como se puede observar en la siguiente tabla. No obstante, las técnicas utilizadas durante el desarrollo de esta tesis doctoral han sido validadas estadísticamente. Así, la variación encontrada puede ser provocada por los fondos genéticos mitocondriales de cada una de las líneas celulares definidas por cambios que quizás estén afectando a la interacción entre las moléculas de estudio y la diana.

DROGA	DOSIS (μM)	mtATP	MIMP
ASM-07-01	5	21,0 \pm 17,5 (12)	49,1 \pm 24,0 (12)
	10	13,1 \pm 14,6 (12)	35,1 \pm 16,5 (12)
ASM-07-02	5	34,2 \pm 19,3 (12)	56,5 \pm 33,2 (12)
	10	21,7 \pm 14,0 (12)	53,1 \pm 33,4 (12)
ASM-07-03	10	71,6 \pm 21,4 (12)	77,5 \pm 31,0 (12)
	20	54,3 \pm 20,4 (12)	73,8 \pm 31,5 (12)
MAR-2Q-21	25	81,42 \pm 13,9 (7)*	35,1 \pm 19,2 (10)
MAR-2Q-22	20	93,6 \pm 63,6 (7)*	51,1 \pm 46,7 (10)

Tabla IV.6: Niveles de mtATP y de potencial de membrana interna mitocondrial en líneas híbridas trasmitocondriales. Se representa la media para cada determinación con cada uno de los compuestos en referencia a las células sin droga consideradas como 100%. Con * se marcan aquellas determinaciones que no presentan diferencias significativas frente al blanco. Los datos se muestran como $x \pm \text{SD}$ (N).

El siguiente paso fue confirmar la selectividad OXPHOS de las moléculas de estudio. Para ello utilizamos células carentes de sistema OXPHOS funcional, es decir, células rho⁰. Se cuantificó la cantidad de ATP mitocondrial (mtATP) y el potencial de membrana (MIMP), considerando como 100% un control rho⁺. Se muestran los datos referentes a la serie ASM-07. Como se puede observar en la tabla a continuación, y en concordancia con otros autores, nuestra línea rho⁰ presentaba tanto un potencial de membrana interna mitocondrial, como unos niveles de mtATP muy bajos (Wojewoda, Duszynski et al. 2010) (McKenzie, Liolitsa et al. 2007).

El tratamiento con los compuestos de estudio mostró un efecto de los mismos tanto sobre el MIMP, como sobre el mtATP. Como se puede observar en la siguiente tabla. Se observaron caídas significativas del MIMP tras el tratamiento con los compuestos (Tabla IV.7). Sin embargo, el mtATP de las células rho⁰ tras el tratamiento con las moléculas ASM-07-01 y 02 no mostraba

caídas significativas con respecto a las células rho⁰ sin tratar (Tabla IV.7). Este resultado parecía confirmar la selectividad OXPHOS de los mismos.

DROGA	DOSIS (μM)	mtATP	MIMP
CONTROL		5,3 ± 0,4 (4)	9,2 ± 1,6 (4)
ASM-07-01	5	9,2 ± 1,3 (4)	6,2 ± 0,5 (4)
	10	2,3 ± 0,1 (4)	5,6 ± 0,1 (3)*
ASM-07-02	5	3,9 ± 0,1 (4)	6,1 ± 0,3 (3)*
	10	4,6 ± 1,4 (4)	6,5 ± 0,3 (3)*
ASM-07-03	10	2,7 ± 0,3 (4)*	6,8 ± 0,3 (3)*
	20	13,3 ± 3,2 (4)*	6,7 ± 0,1 (3)*

Tabla IV.7: Niveles de mtATP y de potencial de membrana interna mitocondrial en líneas rho⁰ tras el tratamiento con los compuestos de la serie ASM-07. Las células rho⁺ se fijaron como 100%. Se muestra la media de las células rho⁰ tras el tratamiento con cada uno de los compuestos frente al 100%. Los datos se representan $x \pm DS (N)$ * $p \leq 0,008$.

C. Estudios de competición con antimicina A

Los datos obtenidos hasta el momento indican que nuestras drogas presentan actividad a nivel del sistema OXPHOS. Sin embargo, el lugar donde se produce esta acción es desconocido. El objetivo era encontrar fármacos que actuaran selectivamente a nivel de los bolsillos de unión del coenzima Q produciendo un leve desacoplamiento. Muchos de los desacoplantes no selectivos existentes son ácidos débiles lipofílicos que trabajan de forma inespecífica. Así, el carbonil cianuro-p trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) o el dinitrofenol (DNP) actúan captando electrones del espacio intermembrana y transportándolos a la matriz mitocondrial a través de la zona lipídica de la membrana interna mitocondrial. Así, disminuyen el MIMP y aumentan la velocidad del transporte de electrones a través de la ETC y el consumo de oxígeno (Jastroch, Divakaruni et al. 2010). El uso de estos compuestos inespecíficos en clínica humana es inviable, debido a su alta toxicidad (Harper, Green et al. 2008). Por tanto, la búsqueda de nuevos fármacos menos tóxicos y más selectivos podría constituir una importante herramienta terapéutica.

En consecuencia, para conocer donde se producía la unión de los compuestos, decidimos realizar un estudio de competición. Para ello, incubamos

las células con las drogas durante 2h y analizamos el consumo de oxígeno tras añadir antimicina A que disminuye el consumo de oxígeno al actuar como un inhibidor de la ETC a nivel del centro Qi del citocromo b (Crofts, Shinkarev et al. 2003; Gnaiger 2003). Paralelamente, se determinó el consumo de oxígeno en células control, es decir, sin tratar (sin droga), y con un desacoplante inespecífico, el FCCP.

Como se puede observar en la siguiente figura, el consumo de oxígeno celular aumentaba de manera significativa tras el tratamiento con el desacoplante inespecífico FCCP y caía tras el tratamiento con AA (Figura IV.110.A). En cambio, las células incubadas con la molécula de estudio ASM-07-03 (Figura IV.110.B, tabla IV.8) mostraban un 20% más de consumo de oxígeno tras la adición de la AA que las células control en las mismas condiciones. Por ende, parece que existe una leve competición entre el compuesto ASM-07-03 y la antimicina A. Así, es posible que el compuesto ASM-07-03 se una específicamente al sitio Qi del citocromo b.

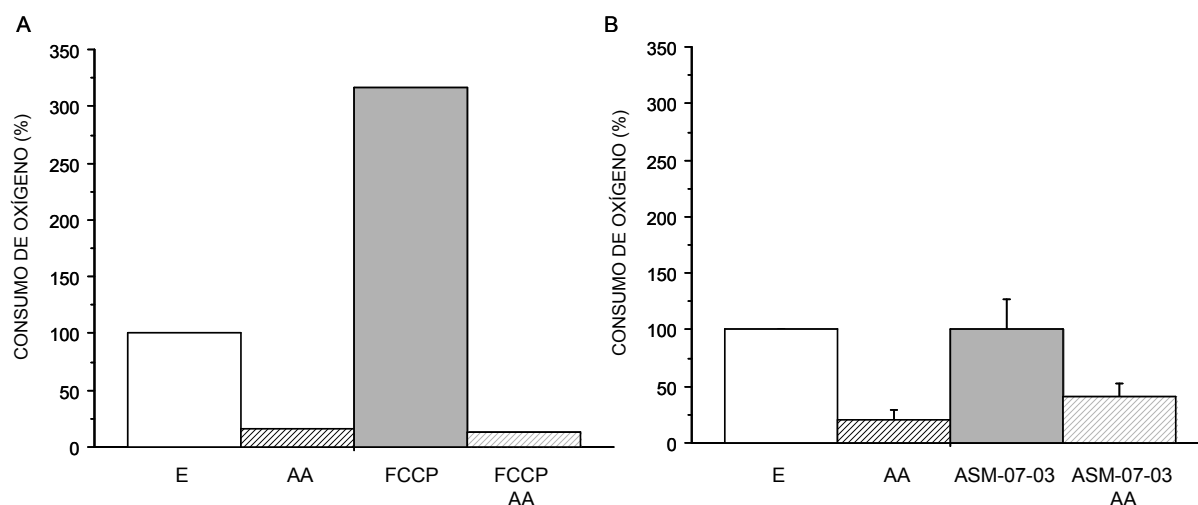


Figura IV.110. Estudios de competición con la AA. Efecto del análisis del FCCP y el compuesto ASM-07-03 sobre la respiración celular. La respiración endógena (E) se fijó como 100%. A) FCCP. AA = 16,3% (1); FCCP = 316% (1); FCCP + AA = 13% (1). B) ASM-07-03. AA = 20,8 ± 7,7% (12); ASM-07-03 = 101,3 ± 24,9% (12); ASM-07-03 + AA = 40,9 ± 11,1% (12).

El análisis del resto de los compuestos reveló que todos ellos competían en mayor o menor medida de forma significativa con la antimicina A. Siendo el compuesto ASM-07-02 el que más afinidad mostraba por el centro Qi del citocromo B (Tabla IV.8)

DROGA	DOSIS (μ M)	% INHIBICIÓN
BLANCO-AA	0	79,2 \pm 7,7 (12)
ASM-07-01	10	52,0 \pm 18,9 (12) *
ASM-07-02	10	50,2 \pm 17,4 (12) *
AMS-07-03	20	59,1 \pm 11,1 (12) *
MAR-2Q-21	25	63,5 \pm 11,8 (4) *
MAR-2Q-22	20	65,1 \pm 16,4 (4) *

Tabla IV.8: Estudio de competición entre los compuestos de estudio y la antimicina A. Determinación del consumo de oxígeno tras incubación de 2h con las drogas de estudio. El valor medio del consumo de oxígeno de las células sin droga se fijó como 100 %. Se muestra el porcentaje de inhibición con respecto a ese 100%, es decir, respiración endógena menos respiración con AA. Cada compuesto se ha comparado con respecto al porcentaje de inhibición del blanco. * $p < 0,05$.

D. Estudios estructura-actividad

Las moléculas ASM-07-01 y 02 y MAR-2Q-21 son derivados benzoquinona y los compuestos ASM-07-03 y MAR-2Q-22 y 25 son derivados naftoquinona. La posición y composición de los sustituyentes del grupo alcoxi del sustituyente fenilamino también varían entre las distintas moléculas.

Para el estudio de estructura-actividad analizamos dos parámetros: El MIMP y el consumo de oxígeno en varias líneas celulares diferentes. La estructura de los fármacos y los distintos sustituyentes se encuentran recogidos en la siguiente tabla. El nombre de cada compuesto se encuentra en el pie de figura.

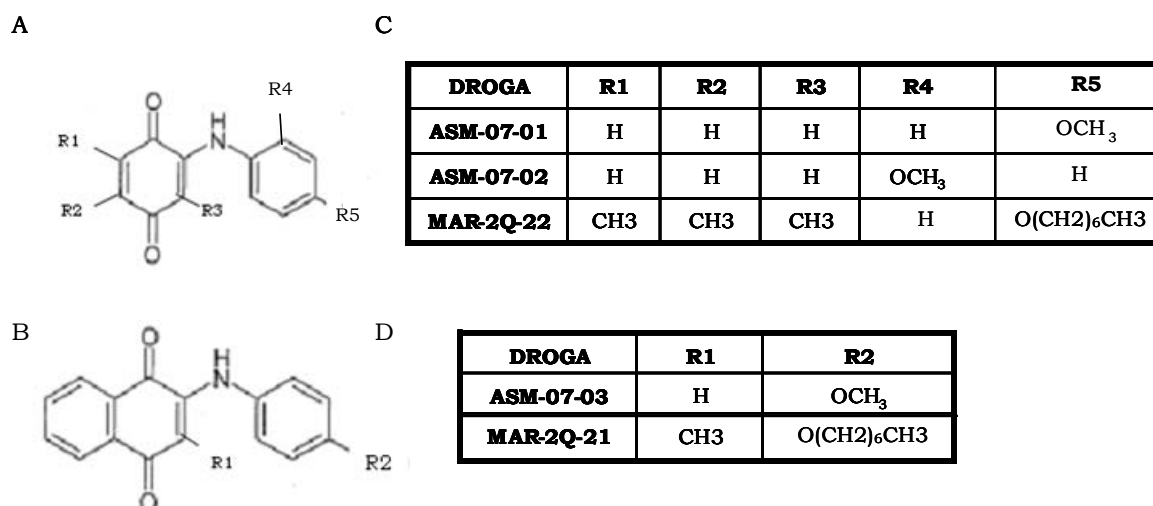


Figura IV.111: Sustituyentes de la familia ASM-07. ASM-07-01: 2-(4-Metoxifenilamino)-1,4-benzoquinona. ASM-07-02: 2-(2-Metoxifenilamino)-1,4-benzoquinona. MAR-2Q-22: 3,5,6-Trimetil-2-(4-Heptiloxifenilamino)-1,4-benzoquinona, ASM-07-03: 2-(4-Metoxifenilamino)-1,4-naftoquinona, MAR-2Q-21: 3-Metil-2-(4-Heptiloxifenilamino)-1,4-naftoquinona.

El fin del estudio era analizar la variación del MIMP y el consumo de oxígeno frente al control y entre las distintas moléculas. Para ello llevamos a cabo un examen de los parámetros tras la incubación durante 2h con los compuestos que habían demostrado actividad desacoplante. Se llevaron a cabo medidas en al menos 4 líneas celulares diferentes. Se consideró el consumo de oxígeno endógeno (sin droga) de cada una de ellas como 100%, y se extrapoló el % de actividad de cada sustancia con respecto a éste, de forma independiente en cada línea celular.

En primer lugar, se observó que los derivados naftoquinona no producen variaciones en la tasa de respiración celular. Como se puede observar en la figura IV.112, los compuestos MAR-2Q-21 y ASM-07-03 no produjeron cambios significativos en el consumo de oxígeno con respecto al blanco. Los derivados benzoquinonas, tampoco dieron lugar a un aumento en el consumo de oxígeno, excepto la molécula ASM-07-02.

Sin embargo, si observamos la figura IV.111 podremos observar que los compuestos ASM-07-01 y ASM-07-02 sólo se diferencian en la posición del grupo metoxi en el sustituyente fenilamino. Así, si el sustituyente está en la posición 4 del fenilamino, como ocurre en el compuesto ASM-07-01, observamos una inhibición significativa del consumo de oxígeno. Sin embargo, cuando el metoxi

se encuentra en la posición 2, como ocurre en el compuesto ASM-07-02, da lugar a un aumento significativo del consumo de oxígeno ($P < 0,006$).

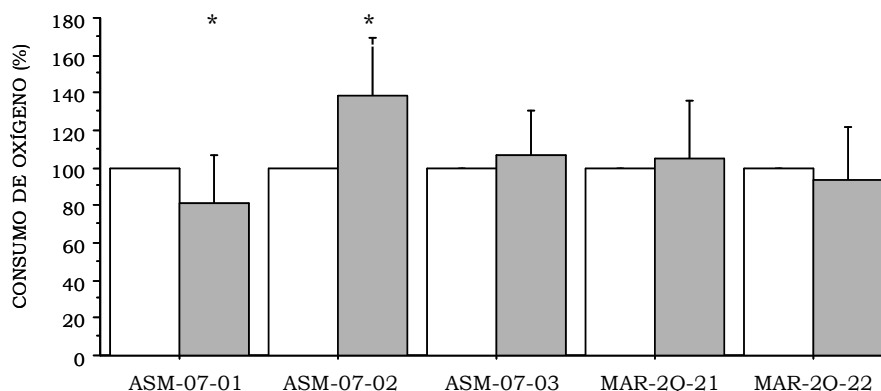


Figura IV.112: Estudio estructura-actividad consumo de oxígeno. En color blanco se representa la media del blanco que ha sido fijado en todas las líneas como 100%. En gris se representa la medida del MIMP tras la incubación con la dosis 2 de cada una de los compuestos. ASM-07-01: $80,8 \pm 26,3\%$ (12); ASM-07-02: $138,1 \pm 31,5\%$ (12); ASM-07-03: $106,6 \pm 23,7\%$ (12); MAR-2Q-21: $105,1 \pm 31,1\%$ (4); MAR-2Q-22: $93,5 \pm 28,1\%$ (4).

Paralelamente, realizamos un estudio similar analizando las variaciones en el MIMP tras la incubación con los compuestos. El consumo de oxígeno es inversamente proporcional al gradiente protónico (Brookes 2005). Observamos que todos los compuestos tenían capacidad de disminuir el MIMP de forma significativa, tal y como se había observado anteriormente (Tabla IV.7).

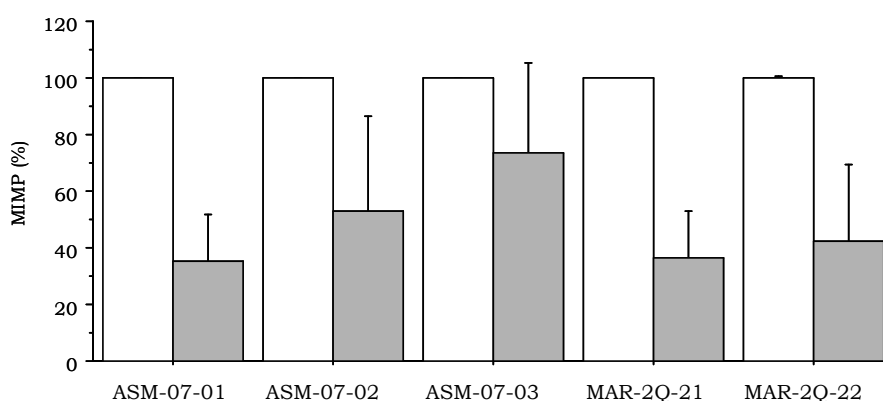


Figura IV.113: Estudio estructura-actividad en MIMP. En color blanco se representa la media del blanco que ha sido fijado en todas las líneas como 100%. En gris se representa la medida del MIMP tras la incubación con la dosis 2 de cada una de los compuestos. ASM-07-01: $35,1 \pm 16,5\%$ (12); ASM-07-02: $53,1 \pm 33,4\%$ (12); ASM-07-03: $73,8 \pm 31,5\%$ (12); MAR-2Q-21: $34,6 \pm 16,6\%$ (10); MAR-2Q-22: $42,2 \pm 27,2\%$ (10).

VI.2 Fase 2: Estudio farmacogenómico

El análisis farmacogenómico se llevó a cabo utilizando 12 líneas celulares: 3 del haplogrupo H, carentes de variantes en el citocromo b; 3 del haplogrupo Uk y 3 del haplogrupo J1c, ambos definidos por cambios muy conservados cercanos al centro Qi del complejo III; y 3 de la filogenia J2, definido por un cambio cercano al centro Qo (Gomez-Duran, Pacheu-Grau et al. 2011).

A. La capacidad desacoplante del fármaco ASM-07-03 varía entre los distintos haplogrupos

El análisis de las variantes genéticas del complejo III ha revelado que aparentemente, todas ellas presentan efecto fenotípico. Por otra parte, parece que hemos encontrado moléculas que actúan selectivamente a nivel de los centros de unión del CoQ, en particular a nivel del centro Qi. Además, una de las cuestiones que se pretenden contestar en el desarrollo de esta tesis doctoral es si los efectos producidos por las variantes genéticas poblacionales del citocromo b son susceptibles de modificación, tal y como se ha observado en la interacción de sustancias con otros organismos, como por ejemplo la atovacuona y el *Plasmodium* (Barton, Fisher et al. 2011; Peters, Chen et al. 2002).

Así, llevamos a cabo un estudio de varios parámetros mitocondriales tras la incubación con dos dosis del compuesto ASM-07-03: 10 y 20 μ M. El análisis estadístico mostró, que tras el tratamiento con la molécula ASM-07-03 a la concentración de 10 μ M el MIMP y los haplogrupos mitocondriales no eran variables independientes ($P=0,03$), es decir, que el compuesto actuaba de forma diferente en las líneas celulares de cada filogenia mitocondrial. De hecho, se observaban diferencias significativas entre los haplogrupos J1c y J2, frente al haplogrupo H (Figura IV.114). Así, como se puede observar en la figura, la droga actuaba en mayor medida en las líneas celulares pertenecientes al haplogrupo H.

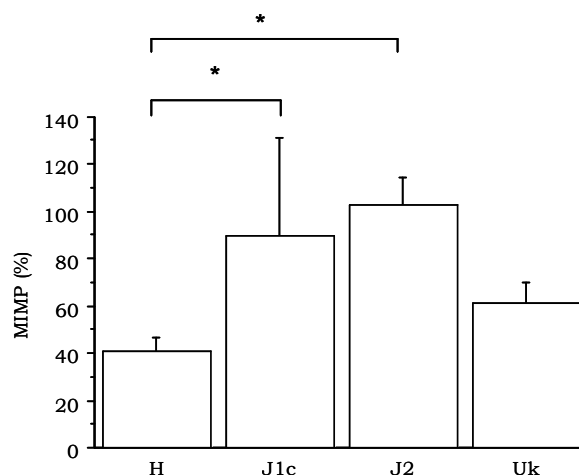


Figura IV.114. MIMP de las líneas celulares híbridas pertenecientes a distintos haplogrupos tras la incubación con 10 μ M de ASM-07-03. H, 41,1 \pm 5,8 (3); Uk, 61,2 \pm 8,9 (3); J1c, 90,0 \pm 41,3 (3); J2, 102,8 \pm 11,9 (3). *P=0,03. Cada línea celular sin droga se fijó como 100%, los datos se muestran referidos al 100%.

B. La posición F18L influye en la unión del compuesto ASM-07-02

El estudio de competición reveló que todos los compuestos competían en mayor o menor medida con la antimicina A, pero el que mayor afinidad mostraba por la diana era el compuesto ASM-07-02 (Tabla IV.8).

El análisis de la competición con AA por fondo genético mitocondrial reveló que la inhibición era diferente entre los distintos haplogrupos. Aunque no se demostró que las variables haplogrupo y porcentaje de inhibición eran variables independientes, sí se observaron diferencias significativas entre los haplogrupos J1c y Uk con el J2. Estos fondos genéticos mitocondriales presentaban menor porcentaje de inhibición, lo que se traduce en mayor afinidad del fármaco a la diana en estos fondos genéticos.

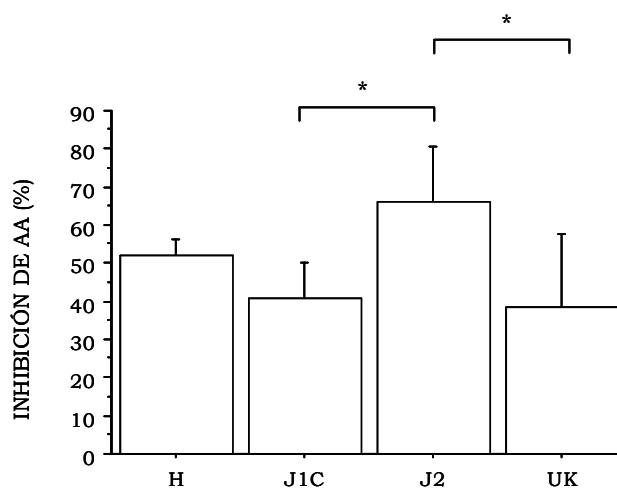


Figura IV.115. Porcentaje de inhibición del consumo de oxígeno con Antimicina A tras la incubación con la droga ASM-07-02 durante 2h. H, 53,1 ± 5,3 (3); Uk, 38,3 ± 21,9 (3); J1c, 41,2 ± 13,1 (3); J2, 66,1 ± 17,9 (3). Cada línea celular sin droga se fijó como 100%, los datos se muestran referidos al 100%.

No obstante, decidimos estudiar distintos parámetros mitocondriales tras la incubación con la dosis de 10 μ M durante 2 horas. Determinamos los cambios en consumo de oxígeno por célula, MIMP y producción de H_2O_2 en las distintas líneas celulares entre los haplogrupos.

Tal como se puede observar en la siguiente figura, en concordancia con los datos anteriores, el compuesto ASM-07-02 daba lugar a aumento en el consumo de oxígeno en las líneas celulares de todas las filogenias estudiadas. Sin embargo, el mayor aumento se producía en las líneas celulares pertenecientes a los haplogrupos J1c y Uk, tal como se puede observar en la figura a continuación.

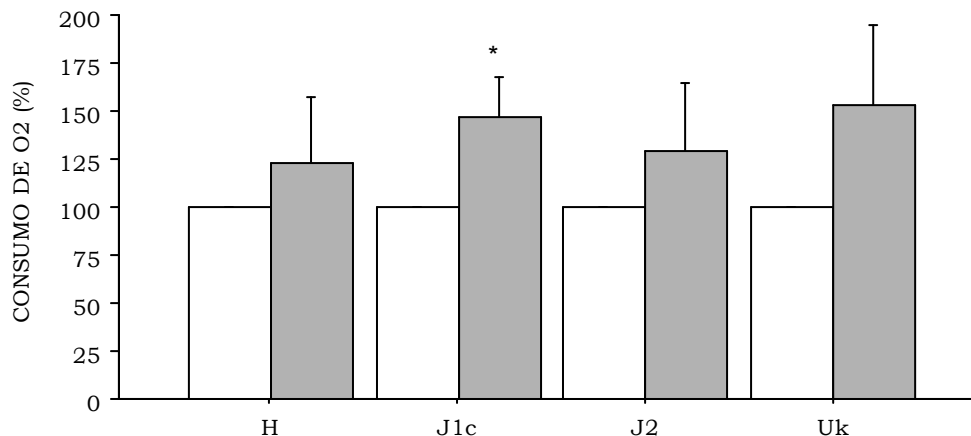


Figura IV.116. Consumo de oxígeno tras la incubación con la molécula ASM-07-02 durante 2h. En color blanco se representa la media del blanco que ha sido fijado en todas las líneas como 100%. En gris se representa la medida del MIMP tras la incubación con la dosis 2 de cada una de los compuestos H, $122,6 \pm 34,3\%$ (3); Uk, $153,1 \pm 41,8\%$ (3); J1c, $147,4 \pm 19,8\%$ (3)*; J2, $129,5 \pm 34,8\%$ (3). *P=0,01.

El consumo de oxígeno y el MIMP son funciones inversamente proporcionales (Brookes 2005). Los resultados del MIMP son similares a los observados en el consumo de oxígeno. Así, únicamente las líneas celulares pertenecientes al haplogrupo J1c mostraban una disminución significativa del MIMP (Figura IV.117).

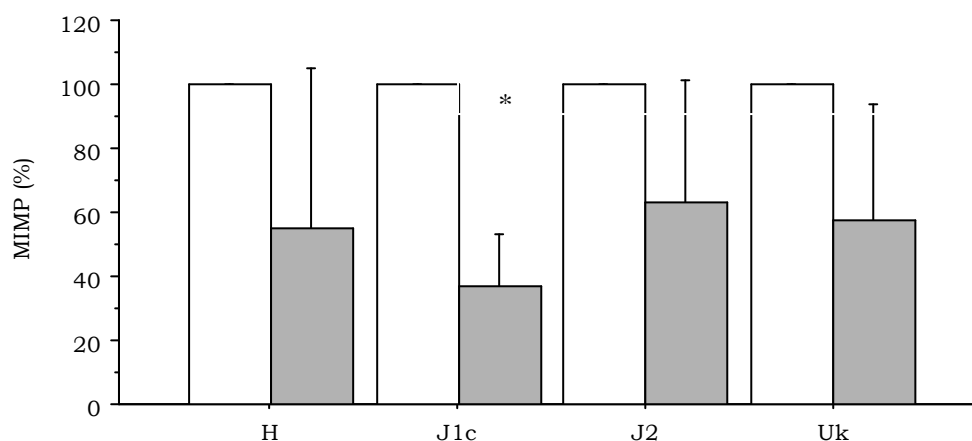


Figura IV.117. MIMP tras la incubación con la molécula ASM-07-02 durante 2h. En color blanco se representa la media del blanco que ha sido fijado en todas las líneas como 100%. En gris se representa la medida del MIMP tras la incubación con la dosis 2 de cada una de los compuestos. H, $55,2 \pm 33,4\%$ (3); Uk, $57,5 \pm 34,4\%$ (3); J1c, $36,7 \pm 16,6\%$ (3)*; J2, $63,1 \pm 36,4\%$ (3). *P=0,003.

Se ha visto que a mayor gradiente de protones la velocidad de la ETC disminuye y el número de intermediarios semiubiquinona aumenta, y con ello la producción de ROS (Skulachev, 2004). Así, el siguiente paso fue determinar la producción de H₂O₂ en nuestras líneas híbridas. La cuantificación del H₂O₂ mostró una caída significativa en todas las líneas celulares tras el tratamiento con el compuesto ASM-07-02, siendo esta disminución significativa en el haplogrupo J1c frente al haplogrupo H.

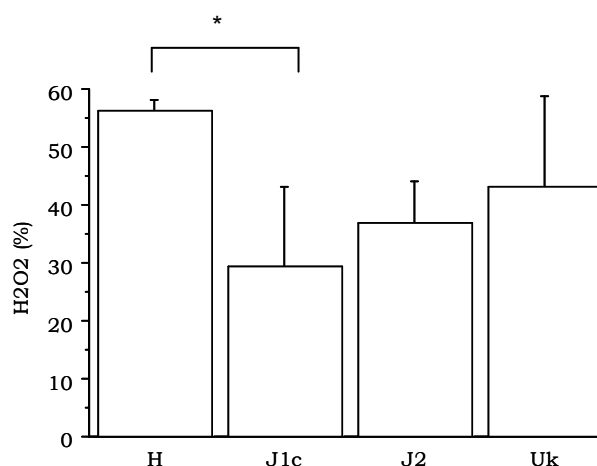


Figura IV.118. Niveles de H₂O₂ tras la incubación con la droga ASM-07-02 durante 2h. H, 56,2 ± 2,0% (3); Uk, 43,2 ± 15,4% (3); J1c, 29,3 ± 13,9% (3); J2, 36,7 ± 7,3% (3). Cada línea celular sin droga se fijó como 100%. Los datos se muestran referidos al 100%.

VI.3 Fase 3: Tratamiento de la patología de Leigh con desacoplantes Q-selectivos.

Muchas mutaciones en el mtDNA se han asociado con un aumento del daño oxidativo (DiMauro and Schon 2003). Así, una vía terapéutica antioxidante podría ser actuar a nivel del acoplamiento del sistema OXPHOS. Algunos de los compuestos analizados anteriormente parecen tener un efecto desacoplante. Por tanto, decidimos probar los compuestos ASM-07-01 y ASM-07-02 con una línea celular que presenta una mutación patológica con un fenotipo dramático. Como es la enfermedad de Leigh.

El síndrome de Leigh o MILS es una enfermedad neurodegenerativa causada por mutaciones en el gen mitocondrial *MT-ATP6* de la ATP sintasa (DiMauro,

2003). De ellas, la mutación con el fenotipo más agresivo es el cambio m.8993T>G/p.MT-ATP6: L156R. En líneas híbridas mitocondriales portadoras de esta mutación se han descrito, entre otros, un aumento de la producción de daño oxidativo (Baracca, Sgarbi et al. 2007) y una disminución en la síntesis de ATP (Sgarbi, Baracca et al. 2006; Baracca, Sgarbi et al. 2007).

En nuestros estudios, se utilizaron dos líneas celulares, una portadora de la mutación m.8993T>G en homoplasmia y su control isogénico (una línea celular con el mismo mtDNA pero sin la mutación). Ambas líneas celulares pertenecían al haplogrupo H1 y fueron construidas con el fondo nuclear de osteosarcoma 143B.

De forma previa al testado de los compuestos, comprobamos que la línea celular mutante presentaba un fenotipo típico de la m.8993T>G. Para ello determinamos los niveles de ATP y la producción de H₂O₂. Tal y como se puede observar en la figura IV.119.A expuesta a continuación, la línea híbrida mitocondrial portadora de la mutación m.8993T>G presentaba una disminución significativa en los niveles de ATP (P=0,016). Paralelamente, se observó un aumento significativo de la producción de H₂O₂ en la línea celular portadora de la mutación, frente a su control isogénico (Figura IV.119.B). Por lo tanto, las líneas celulares utilizadas parecían presentar un fenotipo común de Leigh, tal y como habían observado otros autores (Wojewoda, Duszynski et al. 2010; Sgarbi, Baracca et al. 2006; Baracca, Sgarbi et al. 2007).

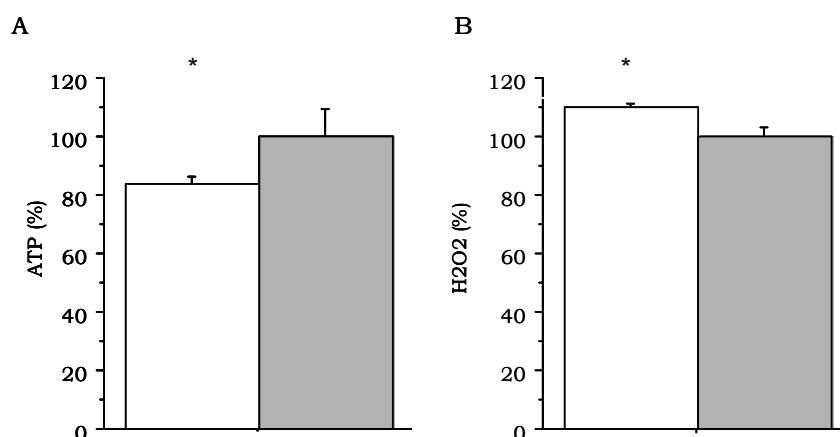


Figura IV.119. Niveles de ATP y de producción de H₂O₂ en la línea celular portadora de la mutación m.8993T>G y su control isogénico. En color blanco se representa la línea celular mutante y en color gris el control isogénico. A. Niveles de mtATP: Ci: 100,0 ± 9,2% (4). 8993: 83,7 ± 2,3% (4)*. B. Niveles de H₂O₂: Ci: 100,0 ± 2,9% (3); 8993: 109,8 ± 1,4% (3)*. *P< 0,017.

A. Los compuestos ASM-07-01 y 02 disminuyen la producción de ROS

El siguiente paso fue determinar la producción de H_2O_2 tras incubar las células 2h con dos dosis diferentes de droga. Se observó que ambas moléculas disminuían la producción de H_2O_2 de manera significativa en las dos líneas celulares. De hecho, tras la adición de los compuestos los niveles de H_2O_2 de la línea celular portadora de la mutación 8993 disminuían en mayor medida que los de la línea celular control

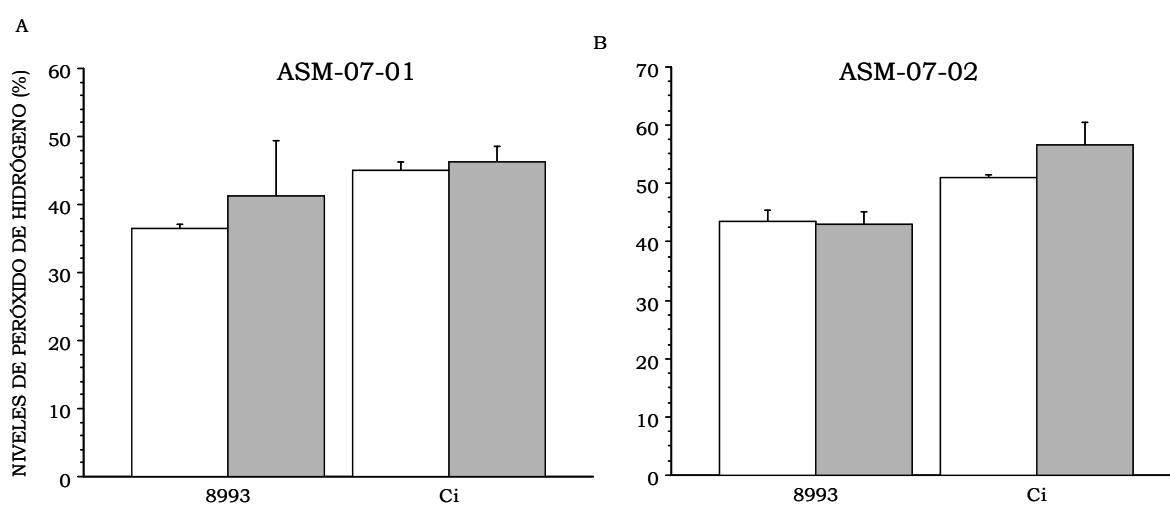


Figura IV.120: Producción de ROS. 8993: línea portadora de la mutación m.8993T>G y Ci: Control isogénico. d1 (10 μ M) en blanco y d2 (20 μ M) en gris representan las dos dosis utilizadas de los compuestos ASM-07-01 y ASM-07-02. El valor del Ci sin droga ha sido fijado como 100%. A. ASM-07-01: 8993: d1: 36,4 \pm 0,6 (4). d2: 41,2 \pm 8,2 (4). Ci: d1: 44,9 \pm 1,3 (4). d2: 46,2 \pm 2,4 (4). ASM-07-02: 8993: d1: 43,5 \pm 1,9 (4). d2: 43,1 \pm 2,1 (4). Ci: d1: 51,1 \pm 0,3 (4). d2: 56,6 \pm 4,0(4).

B. Los compuestos ASM-07-01 y ASM-07-02 producen una caída del MIMP

La producción de ROS y el MIMP están relacionados (Brand 2000). Determinamos los posibles cambios en el MIMP producidos por el tratamiento con los compuestos. Tal y como se esperaba, observamos que ambas moléculas presentaban capacidad para disminuir el potencial de membrana (Figura IV.121).

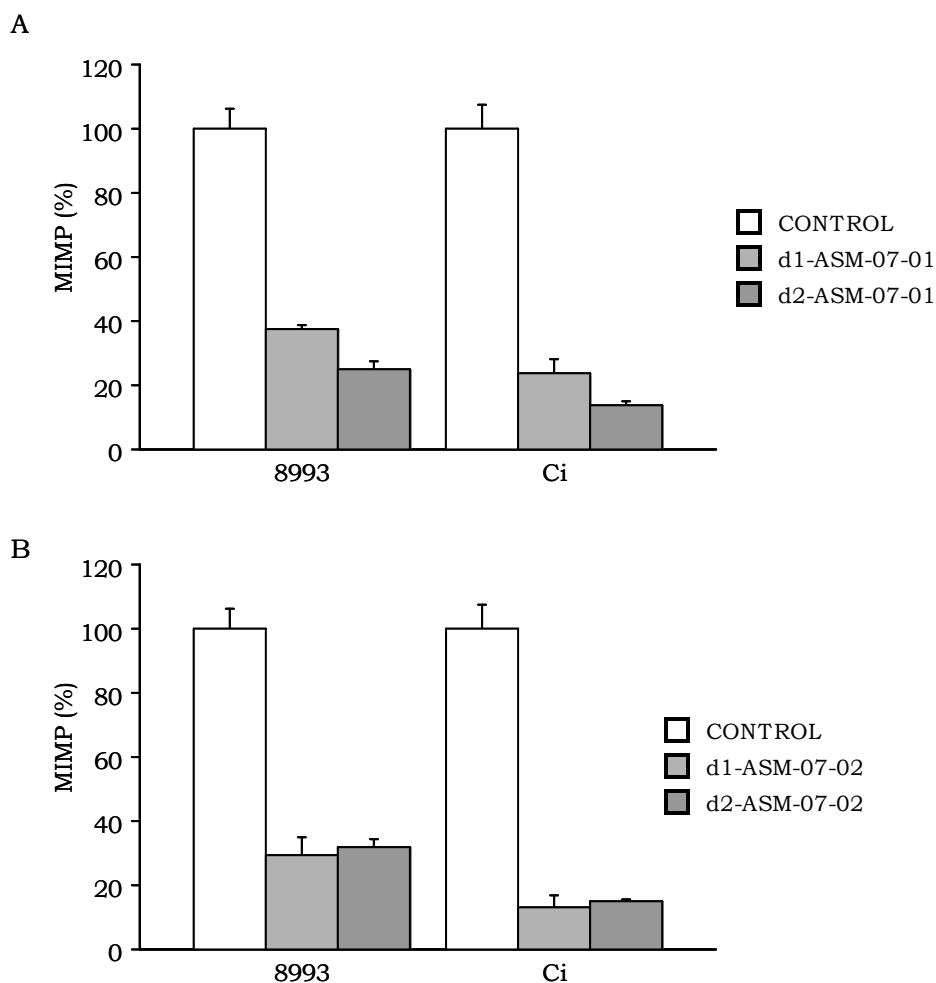


Figura IV.121: Variación del MIMP tras el tratamiento con los fármacos ASM-07. 8993: línea portadora de la mutación m.8993T>G y Ci: Control isognénico. d1 (10 μ M) y d2 (20 μ M) representan las dos dosis utilizadas de los fármacos ASM-07-01 y ASM-07-02. A. 8993; CONTROL: 100,0 \pm 6,3% (4), d1-ASM-07-01: 37,5 \pm 1,4% (4). d2-ASM-07-01: 25,1 \pm 2,2% (4). Ci: CONTROL: 100 \pm 7,7% (4), d1-ASM-07-01: 23,7 \pm 4,3% (4); d2-ASM-07-01: 13,9 \pm 1,4% (4). B. 8993; CONTROL: 100 \pm 6,3% (4), d1-ASM-07-02: 29,4 \pm 5,7% (4); d2-ASM-07-02: 31,7 \pm 2,7% (4). Ci: CONTROL: 100 \pm 7,7% (4), d1-ASM-07-02: 13,2 \pm 3,6% (4); d2-ASM-07-02: 14,9 \pm 0,8% (4)* $P < 0,0001$. Cada línea celular control se considera como 100%.

V. Discusión

I. ANÁLISIS DE LAS VARIANTES GENÉTICAS DEL mtDNA

I.1 Los niveles de mtDNA condicionan la cantidad de proteínas codificadas en el mtDNA en líneas híbridas generadas a partir de individuos sanos

Hay evidencias de desproporciones en los niveles de mtDNA entre el haplogrupo J y el haplogrupo H (Suissa, Wang et al. 2009). Suissa *et al.* Observaban que la variante de la región de control m.295C>T, que define el haplogrupo J, aumenta la unión del TFAM y el número de copias del mtDNA en híbridos de este haplogrupo, comparados con aquellos del haplogrupo H, carente de este polimorfismo.

Nuestros datos, al contrario, han mostrado una disminución en los niveles de mtDNA de los haplogrupos Uk y J, y de sus subhaplogrupos mayoritarios en Europa, J1c y J2 (Carelli, Achilli et al. 2006). Nosotros hemos analizado 19 líneas celulares híbridas (5 del haplogrupo H, 5 del haplogrupo Uk y 9 del haplogrupo J) construidas con el fondo nuclear de osteosarcoma 143B. Suissa *et al.*, en cambio, utilizaron únicamente 7 líneas celulares (5 del fondo genético H y 2 del J) confeccionadas a partir de la línea celular linfoblastoide Wal-2A. Además, cada análisis ha sido llevado a cabo con fondos genéticos mitocondriales distintos. Las líneas híbridas transmitocondriales del estudio previo pertenecen a los haplogrupos J1 (1), J1b2 (1), H1 (1), H6 (2) y H* (2). Estos fondos genéticos son comunes de Oriente próximo y el este de Europa, tanto en el caso del haplogrupo H (Pereira, Richards et al. 2005), como en el del J (Quintana-Murci, Chaix et al. 2004). Nuestra colección de híbridos está formada por J1b1 (1), J1c (4), J2 (4), Uk1 (2), Uk2 (3), H1 (3), H5 (1) y H13 (1) más representativa de la población europea (Achilli, Rengo et al. 2004; Achilli, Rengo et al. 2005; Pereira, Richards et al. 2005; Carelli, Achilli et al. 2006; Montiel-Sosa, Ruiz-Pesini et al. 2006). Así, las discrepancias entre ambos trabajos pueden estar condicionadas por varios factores: la influencia del fondo genético nuclear, como se ha visto en otros trabajos realizados en híbridos portadores de mutaciones patológicas en el mtDNA (Yoneda, Chomyn et al. 1992; Dunbar, Moonie et al. 1995), la influencia del fondo genético mitocondrial, o por las interacciones entre ambos (Bayona-Bafaluy, Fernandez-Silva et al. 2002).

Además, ninguno de los fondos genéticos mitocondriales estudiados presenta cualquier otro SNP en la zona de replicación que pueda tener efecto fenotípico. Por tanto, el mecanismo que condiciona las diferencias en la dosis genómica ha de ser otro.

La dosis genómica mitocondrial está controlada por distintas variables. Como ejemplo, se ha observado que niveles altos de ROS vienen acompañados de un aumento en los niveles de mtDNA (Achantá, Sasaki et al. 2005) y que el antioxidante N-acetil-cisteína (NAC) puede disminuir la dosis genómica mitocondrial en líneas híbridas de ratón (Moreno-Loshuertos, Acín-Pérez et al. 2006). El estudio de marcadores de sobreproducción de ROS, como por ejemplo la expresión de la MnSOD, no mostró diferencias entre los fondos genéticos mitocondriales estudiados (H, 100% vs. J, 98,2% vs. Uk, 104,2%), ni entre los subhaplogrupos de la filogenia J (J1c, 91% y J2, 103,0%). Este resultado sugería que la caída observada en los niveles de mtDNA no era debida a desigualdades en los niveles de ROS. Sin embargo, tras el tratamiento con NAC, las líneas celulares pertenecientes al haplogrupo H veían disminuidos de forma significativa sus niveles de mtDNA, frente a los demás fondos genéticos mitocondriales, en los que no se observaba esta caída.

El mecanismo de acción del NAC es objeto de debate. Algunos autores han postulado que el NAC no es realmente un antioxidante, sino que actúa interfiriendo en la formación de puentes disulfuro en proteínas cuya función está regulada por el estado redox celular (Parasassi, Brunelli et al. 2010). Si esto es así, puede una ruta reguladora sensible al NAC y que controle los niveles de mtDNA fuera diferencialmente afectada en híbridos de los distintos haplogrupos. Además, en trabajos realizados en líneas híbridas de las filogenias H y J se han observado patrones de expresión de proteínas diferentes entre ambos haplogrupos (Bellizzi, Cavalcante et al. 2006; Bellizzi, Taverna et al. 2009) y los niveles de expresión de algunas de esas proteínas se han visto afectados tras el tratamiento con NAC (Shibanuma, Kuroki et al. 1994; Gosset, Wallaert et al. 1999). Como ejemplo, estudiamos la expresión de los genes implicados en la replicación del mtDNA. Medimos los niveles de mRNA de las proteínas POLG, Twinkle helicasa, la POLRMT y el mtSSB (Bruni, Polosa et al. 2010). No encontramos diferencias en la expresión de ninguna de ellas entre los distintos

haplogrupos. Por lo tanto, parece que el NAC, interaccione directamente a nivel de la proteína o los efectos observados implican otras rutas celulares.

Tras los resultados obtenidos en los niveles de mtDNA, decidimos analizar como afectaba esa disminución a los niveles de expresión de las proteínas del sistema OXPHOS. Encontramos una reducción de los niveles de mtRNA en las líneas celulares Uk y J, y también en los subhaplogrupos J1c y J2, con respecto al haplogrupo H. Curiosamente, ninguna de las filogenias estudiadas presenta posiciones en su genoma mitocondrial que puedan afectar a la efectividad de la transcripción, por tanto el mecanismo que condiciona esa disminución debe ser otro. El estudio de los niveles de expresión de las proteínas implicadas en la transcripción no mostró diferencias en los patrones de expresión de la POLRMT, el MTFB2 y el factor de terminación de transcripción mitocondrial (MTERF) entre los distintos haplogrupos. En consecuencia, podría haber un mecanismo general responsable de esa caída.

En algunos órganos y tejidos se ha observado un paralelismo entre los niveles de mtDNA y mtRNA y se ha visto que los niveles de mRNA de las proteínas p.MT-COI y p.MT-ATP6 correlacionan de manera significativa con dosis genómica mitocondrial (Coskun, Beal et al. 2004; Cotney and Shadel 2006; Kaaman, Sparks et al. 2007). Análogamente, encontramos que los niveles de los transcritos de la hebra H1 correlacionaban significativamente con los niveles del mtDNA en nuestras líneas celulares. Este resultado parecía sugerir que el mecanismo responsable de la disminución de los niveles del mtRNA podía ser la caída en los niveles de mtDNA.

Para determinar la influencia de las diferencias en los niveles de mtRNA a nivel organular, estudiamos la síntesis mitocondrial de proteínas. Observamos un descenso significativo en los productos de traducción mitocondrial de aquellos fondos genéticos con menores niveles de mtRNA. Las únicas posiciones presentes en el mtDNA que podrían condicionar este parámetro son el cambio del m.2706A>G/*MT-RNR2* en el haplogrupo H y los polimorfismos m.1811A>G/*MT-RNR2* y m.12308A>G/*MT-TL2* en el haplogrupo Uk. Se ha observado una disminución significativa en la síntesis de proteínas tanto en el haplogrupo Uk, como en el J, así como en sus subhaplogrupos J1c y J2. Por tanto, el único cambio que podría ser responsable de esta caída es el m.2706A>G/*MT-RNR2*.

Este cambio está localizado en la hélice 38 del rRNA 16S, muy cerca del centro peptidil transferasa (PTC, del inglés, *Peptidyl Transferase Center*). Se ha postulado que esta posición presenta efecto fenotípico aumentando la resistencia a determinados antibióticos utilizados en medicina intensiva (Pacheu-Grau, Gomez-Duran et al. 2010; Pacheu-Grau, Gomez-Duran et al. 2010b). Sin embargo, nosotros cultivamos sin antibiótico para evitar posibles efectos sobre la síntesis mitocondrial de proteínas (Robberson and Clayton 1972; Hermann 2007). Además, se ha encontrado una correlación significativa entre los niveles del transcrito H1 y los de la síntesis de proteínas en todas las filogenias, y éstos, a su vez, correlacionan significativamente con los niveles de mtDNA. Por lo tanto, los resultados parecen indicar que la caída en los niveles de mtDNA es la responsable de los menores niveles de proteínas mitocondriales en las filogenias Uk, J, J1c y J2, y no la variante m.2706G>A.

IV.2 La fracción celular ocupada por mitocondria no es la responsable de la caída en proteínas OXPHOS

La biogénesis mitocondrial condiciona el contenido de mtDNA y de proteínas mitocondriales. El déficit en la síntesis mitocondrial de proteínas provocada por mutaciones en los genes *MT-RNR* y en los genes para los tRNAs (Pacheu-Grau, Gomez-Duran et al. 2010 ; Pacheu-Grau, Gomez-Duran et al. 2010b ; King and Attardi 1993; Hao and Moraes 1996; Hao and Moraes 1997) se encuentra compensada, en algunos casos, por un aumento de biogénesis mitocondrial (Moreno-Loshuertos, Ferrin et al. 2011). Para observar si los descensos en los niveles de mtDNA, mtRNA y en la síntesis mitocondrial de proteínas de las líneas celulares no H venían determinados por una menor fracción celular ocupada por mitocondria, estudiamos varios marcadores. Entre los utilizados están la actividad de la enzima CS, indicativa del volumen o número de mitocondrias (Krahenbuhl, Talos et al. 1994), la actividad y cantidad del CII, una enzima de la ETC codificada en el nDNA y el contenido en cardiolipina, el fosfolípido mayoritario en la membrana interna mitocondrial (Guarnieri, Stechmiller et al. 1971), definiendo así la superficie de membrana interna mitocondrial.

No observamos diferencias significativas en ninguno de los parámetros estudiados entre los haplogrupos J y Uk, y el fondo genético mitocondrial H.

El análisis de los subhaplogrupos del J, J1c y J2, reveló un aumento significativo de la actividad CS y del contenido en cardiolipina en la membrana interna mitocondrial en las líneas celulares pertenecientes al fondo genético J2. Curiosamente, este genotipo mitocondrial era el que mayor caída de niveles de mtATP presentaba, un 18%, frente a los niveles de mtATP del haplogrupo H. Este defecto podría dar lugar quizás a un efecto compensatorio, como se había observado en otras mutaciones patológicas (Moreno-Loshuertos, Ferrin et al. 2011).

I.3 La bioenergética OXPHOS está influida por las variantes poblacionales del mtDNA

Para comprobar si la caída en los niveles de síntesis de proteínas observados en las líneas celulares no H acarrea un defecto en el funcionamiento del sistema OXPHOS, determinamos la actividad del complejo IV como marcador de la ETC (Wong-Riley, 1989 #3373).

No encontramos diferencias en la actividad del complejo IV entre las líneas celulares del haplogrupo H y las del haplogrupo J, en concordancia con lo publicado anteriormente (Carelli, Vergani et al. 2002). Sin embargo, los haplogrupos Uk y J1c sí presentaron una caída significativa en la actividad del complejo IV, con respecto a la filogenia H.

Excepto la mutación sinónima m.7028C>T en la subunidad p.MT-CO1, no existen otras mutaciones en los genes mitocondriales del CIV (Figuras IV.11 y IV.38) que puedan ser responsables de esta disminución. Únicamente las líneas celulares pertenecientes a la filogenia Uk presentaban una disminución significativa de la cantidad de complejo IV. Sin embargo, existía una correlación significativa entre la actividad y la cantidad de complejo en todas las filogenias estudiadas.

En líneas híbridas portadoras de mutaciones LHON se ha evidenciado que, tras el tratamiento con el inhibidor de la síntesis mitocondrial de proteínas doxiciclina, aquellas pertenecientes al haplogrupo J presentaban una tendencia general de recuperación de los complejos OXPHOS más rápida y mayores niveles de CIV finales. (Pello, Martin et al. 2008). Este hecho podría explicar porque los niveles de CIV de las líneas celulares del fondo genético J, tanto los J1c como los J2, no muestran caída frente a los H, aún cuando sus niveles de síntesis mitocondrial de proteínas son menores.

El complejo IV constituye el último paso de la ETC. La ETC es la ruta principal de consumo de oxígeno celular. La oxidación de los sustratos genera poder reductor y esos electrones viajan a través de los complejos de la ETC (I-IV), que en última instancia dan lugar a la reducción de oxígeno a agua (Saraste 1999). Así, el siguiente paso fue analizar el consumo de oxígeno en nuestras líneas híbridas.

Varios grupos habían analizado el consumo de oxígeno en controles con distintos fondos genéticos mitocondriales (Carelli, Vergani et al. 2002; Amo and Brand 2007). Carelli *et. al* no encontraron diferencias en consumo de oxígeno endógeno entre un híbrido del haplogrupo J y otro del H. Frente a ellos, nuestro análisis fue llevado a cabo con 5 líneas del haplogrupo H y 9 del J y mostró una caída significativa en la respiración celular endógena en las líneas celulares pertenecientes a la filogenia J, expresado como fmol/min/celula. Este resultado concordaba con un análisis llevado a cabo en nuestro grupo de investigación en una cohorte de población española masculina, donde los individuos pertenecientes al haplogrupo J presentaban menor VO_{2max} que los no J (Marcuello, Martínez-Redondo et al. 2009), particularmente frente a los individuos H (Martínez-Redondo, Marcuello et al. 2010). Además, algunos autores han observado que los niveles de mtDNA correlacionan con la VO_{2max} y con la respiración celular (Bentlage and Attardi 1996; Laderman, Penny et al. 1996; Welle, Bhatt et al. 2003). Sin embargo, aún presentando los híbridos del haplogrupo J y H niveles de actividad de CIV similares, existía una correlación significativa entre la respiración endógena y la actividad del complejo IV en ambos haplogrupos.

El acoplamiento quimiosmótico entre la respiración y la síntesis de ATP (Mitchell 1961) no es totalmente eficiente. Tras el bombeo de protones para generar el gradiente electroquímico necesario para la síntesis de ATP, algunos de ellos vuelven a la matriz por vías alternativas, dando lugar a una pérdida de gradiente electroquímico que se traduce en una caída de la producción de ATP y un aumento en el consumo de oxígeno (Brand 2000). No hubo diferencias en el consumo de oxígeno desacoplado entre ninguna de las filogenias estudiadas. Sin embargo, las líneas celulares del fondo genético mitocondrial J presentaban una caída significativa del consumo de oxígeno “filtrado”, que correlacionaba significativamente con la actividad del complejo IV.

Un examen exhaustivo de los subhaplogrupos del J confirmó la disminución de la respiración en ambas filogenias, siendo esta significativa únicamente entre el subhaplogrupo J1c y H, en la respiración endógena y filtrante.

El fondo genético mitocondrial Uk no mostró diferencias en la tasa de respiración frente al haplogrupo H. El haplogrupo Uk presenta menores niveles de complejo IV por célula o mitocondria. Esto significa que el mismo consumo de oxígeno fue realizado por menor cantidad de ETC. Por tanto, el haplogrupo Uk consume más oxígeno cuando se corrige por unidad de cadena. El análisis de la respiración por cadena confirmó la existencia de diferencias significativas en la respiración endógena. La existencia de aumento significativo de la respiración desacoplada por parte de las líneas celulares del haplogrupo Uk indica que el consumo de oxígeno no está condicionado por el gradiente de protones. Por lo tanto, la velocidad de transporte electrónico en las líneas híbridas del haplogrupo Uk debe ser mayor. Además, tras la adición de oligomicina para medir la respiración filtrante, observamos que las líneas Uk presentaban mayor consumo de oxígeno por cadena, lo que se traduce en menor MIMP, debido a la fuga de protones o a la ineficiencia de las líneas del haplogrupo Uk para bombear protones. De hecho, el aumento en la velocidad de transporte electrones y la caída observada en el MIMP en el haplogrupo Uk sugiere la existencia de un desacoplamiento fisiológico por parte de esta filogenia (Brand 2000; Brand, Affourtit et al. 2004).

Las líneas celulares pertenecientes a la filogenia J, y en particular las de sus 2 subhaplogrupos J1c y J2, también presentaron una caída en el MIMP. De hecho, esta caída era significativamente menor en el subhaplogrupo J2, llegando a un 50% aproximadamente, con respecto al haplogrupo H. Este descenso en las líneas celulares del haplogrupo J, sobre todo en el J2, puede ser debido a una menor velocidad de transporte electrónico a través de los complejos de la ETC, que da lugar a un menor consumo de oxígeno, como hemos observado. Además, apoyando esta hipótesis, se ha visto en células de osteosarcoma 143B que la inhibición del complejo I con rotenona da lugar a una inhibición de la respiración y una caída en el consumo de oxígeno (Barrientos and Moraes 1999). Además, una mutación en el gen *MT-ND5* transferida a la línea rho⁰ 143B resulta en una caída tanto de la respiración, como del MIMP (McKenzie, Liolitsa et al. 2007). El haplogrupo J está definido por tres cambios genéticos en los genes mitocondriales del complejo I (m.4216T>C/p.MT-ND1:Y304H, m.10398A<G/p.MT-ND3:T114A y m.13708G>A/p.MT-ND5:A458T). El cambio Y304H/ p.MT-ND1 ha sido modelado en su posición análoga en *E. Coli*, T316H/ p.MT-ND1, donde produce una caída de la actividad del complejo I (Hinttala, Kervinen et al. 2010). El aminoácido treonina en el residuo 114 de p.MT-ND3 (es decir, como en las líneas H) aumenta la actividad del complejo I en cíbridos (Kulawiec, Owens et al. 2009).

I.4 Variantes genéticas del mtDNA que podrían explicar las diferencias fenotípicas

Las diferencias encontradas pueden estar condicionadas por polimorfismos presentes en el mtDNA. Hay nueve SNPs en la región codificante que diferencian el haplogrupo J del H. De ellos, cuatro son SNPs sinónimos: m.7028A>G, m.11251A>G, m.11719G>A y m.12612A>G, y otros tres son no sinónimos en subunidades del complejo I (m.4216T>C/p.MT-ND1:Y304H, m.10398A<G/p.MT-ND3:T114A y m.13708G>A/p.MT-ND5:A458T). Por último, existen otros dos cambios en el p.MT-CYB; m.14766C>T/p.MT-CYB:T7I y m.15452C>A/p.MT-CYB:L236I. Se ha sugerido que una treonina en la posición 7, como ocurre en el haplogrupo H, da lugar a un aumento de la eficiencia del ciclo Q y de la funcionalidad de la ETC (Beckstead, Ebbert et al. 2009).

Existen cinco SNPs que diferencian el haplogrupo Uk y el J de la filogenia H. Uno de ellos está situado en la región de control, sin embargo no está en ninguna zona funcionalmente importante. De los cuatro restantes, dos son sinónimos y dos dan lugar a los cambios m.2706A>G/*MT-RNR2* y m.14766C>T/p.*MT-CYB*: T7I. No obstante, también es posible que las diferencias OXPHOS observadas estén determinadas por los SNPs que definen los haplogrupos J1c, J2 y Uk. El subhaplogrupo J1c comparte con el Uk la transición no sinónima m.14798C>T/p.*MT-CYB*:F18L (Carelli, Achilli et al. 2006). Esta posición está conservada en 220 de 276 especies (CI= 79,2%), está localizada a 3,5 Å del borsillo de unión de la ubiquinona (Fisher and Rich 2000), en particular en la zona de unión de la cadena alifática de ésta al centro Qi (Gao, Wen et al. 2003). Este cambio podría tener un efecto sobre el paso de electrones a través del complejo III y por tanto en la eficacia de la ETC. Además, se ha visto que su variante homóloga en *Saccharomyces cerevisiae* (di Rago, Perea et al. 1986) provoca resistencia al diuron o [3-(3,4- diclorofenil)-1,1-dimetilurea] un inhibidor de la ETC que bloquea el flujo de electrones a nivel del complejo III. Por otro lado, el subhaplogrupo J2 está definido por un cambio aminoacídico en la misma proteína m.15257G>A/p.*MT-CYB*: D171N (Dominguez-Garrido, Martinez-Redondo et al. 2009).

I.5 Un factor común para explicar la susceptibilidad a LHON

Curiosamente, si los haplogrupos J1c y J2 son los responsables mayoritarios de los efectos fenotípicos del subclado J, no es de extrañar que no se haya encontrado una asociación entre éste y el LHON en Irán (Houshmand, Sharifpanah et al. 2004), donde el haplogrupo mayoritario del J es el J1b (Quintana-Murci, Chaix et al. 2004), paradójicamente el mismo que, comparado con el haplogrupo H presentaba mayores niveles de mtDNA (Suissa, Wang et al. 2009).

Nuestros resultados sugieren que los individuos de los haplogrupos Uk, J1c y J2 son más susceptibles a LHON porque tienen menor capacidad OXPHOS, resultante de una menor dosis genómica mitocondrial. La cantidad de mtDNA además podría explicar porque los hombres son más susceptibles a esta patología. Se ha observado que el tratamiento con estrógenos puede aumentar

los niveles de mtDNA, de mtRNA y de los polipéptidos codificados en el mtDNA, aumentar el consumo de oxígeno y los niveles de mtDNA en medio de glucosa (Giordano, Montopoli et al. 2010). Además, los niveles de mtDNA de los individuos afectados por LHON son más bajos que los de sus familiares con la mutación pero sin fenotipo (Nishioka, Soemantri et al. 2004). Por tanto, una respuesta compensatoria puede tener lugar con un aumento de los niveles de mtDNA. De acuerdo con este modelo, todo aquel individuo portador de una de las mutaciones de LHON incapaz de producir una respuesta compensatoria que de lugar a un aumento de los niveles de mtDNA desarrollaría LHON. Esta correlación, puede explicar la incompleta penetrancia del mismo. Además, se ha observado que factores ambientales precipitan la pérdida de visión y contribuyen a la penetrancia incompleta de esta patología. Así, se ha visto que el riesgo de pérdida de visión de pacientes LHON es más alto en fumadores (Kirkman, Yu-Wai-Man et al. 2009). Paralelamente, se ha visto que los fumadores presentan menor número de copias de mtDNA por genoma nuclear (Bouhours-Nouet, May-Panloup et al. 2005).

Por lo tanto, nuestros resultados contribuyen a la idea de que una disminución en los niveles de mtDNA determinados por el haplogrupo presenta influencias sobre la penetrancia de la enfermedad.

I.6 Las variantes que definen los subhaplogrupos condicionan sus fenotipos

El haplogrupo J se divide en varios subhaplogrupos, de ellos, los más importantes en Europa son el haplogrupo J1c y el J2 (Carelli, Achilli et al. 2006). El haplogrupo J2 está definido, entre otros, por el cambio en la región de control m.150C>T y por la transición m.15257G>A/p.MT-CYB: D171N (Dominguez-Garrido, Martinez-Redondo et al. 2009). Esta posición se encuentra conservada en prácticamente el 100% de mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces (Ruiz-Pesini, Mishmar et al. 2004). Su cambio homólogo en *Rhodobacter sphaeroides* (D187N), produce alteraciones en la coloración y forma de las colonias bacterianas (Shinkarev, Ugulava et al. 2000).

El haplogrupo J2 ha sido relacionado con un aumento de longevidad en varias poblaciones europeas (Niemi, Hervonen et al. 2003; Dominguez-Garrido, Martinez-Redondo et al. 2009) y se ha observado una sobrerrepresentación de éste en enfermos de LHON (Carelli, Achilli et al. 2006; Hudson, Carelli et al. 2007) y velocistas de élite (Niemi and Majamaa 2005). El envejecimiento es un proceso fisiológico ligado al daño oxidativo. Se ha visto que un cierto desacoplamiento OXPHOS da lugar a menor producción de daño oxidativo, acompañado de una síntesis de ATP menos eficiente y un aumento en la producción de calor (Brand 2000). Sumado a esto, nuestro grupo ha observado en ancianos, que aquellos pertenecientes al haplogrupo J2 presentaban menor daño en el mtDNA que aquellos pertenecientes a otros haplogrupos (Dominguez-Garrido, Martinez-Redondo et al. 2009). Además, nuestros datos indicaban que el subhaplogrupo J2 presenta una menor cantidad de ATP total y mitocondrial, acompañada de una caída en el MIMP, que correlacionaban significativamente.

La necesidad energética de un atleta de resistencia es inversa a la de un velocista, mientras uno realiza un metabolismo básicamente anaeróbico, el otro es más dependiente del ATP mitocondrial. Así, la sobrerrepresentación del haplogrupo J2 en velocistas podría venir determinada por una menor capacidad OXPHOS condicionada por una menor dosis genómica, de forma similar a como puede ocurrir con el aumento de la penetrancia por parte de este subhaplogrupo a la mutación m.11778A>G de LHON (Carelli, Achilli et al. 2006; Hudson, Carelli et al. 2007).

El subhaplogrupo J1c está definido por 3 posiciones frente a la secuencia de referencia Cambridge, 2 en la región de control m.185G>A y m.228G>A. Esta última situada en el bloque de secuencias conservadas I. En la región codificante el subhaplogrupo J1c está definido por la transición no sinónima m.14798C>T/p.MT-CYB: F18L (Carelli, Achilli et al. 2006), que también define el haplogrupo Uk (Ruiz-Pesini, 2004). Este cambio podría tener un efecto sobre el paso de electrones a través del complejo III y por tanto en la eficacia de la ETC. Su variante homóloga en *Saccharomyces cerevisiae* provoca resistencia al diuron (di Rago, Perea et al. 1986). Esta filogenia se ha encontrado sobrerrepresentado en pacientes de LHON portadores de la mutación m.11778A>G (Carelli, Achilli et al. 2006; Hudson, Carelli et al. 2007) y en ancianos (De Benedictis, Rose et al. 1999). De igual modo que el haplogrupo J2 y el Uk, presenta menores niveles de

mtDNA que parecen condicionar su función OXPHOS y por tanto su penetrancia en patologías como el LHON o procesos como el envejecimiento.

I.7 Haplogrupos y enfermedades multifactoriales

La cadena de transporte electrónico participa en muchas funciones celulares. El gradiente de protones que se origina a través del paso de electrones por los complejos de la ETC se utiliza para muchas funciones como el importe proteico y de sustratos a la mitocondria, la termogénesis, la apoptosis, el mantenimiento de los niveles de calcio celular y la producción de ROS y ATP. Además, el sistema OXPHOS es importante para la adaptación al medio. De hecho, señales externas en forma de nutrientes y oxígeno interaccionan con el sistema OXPHOS para activar respuestas intracelulares retrógradas mediadas por segundos mensajeros como el estado redox celular o los niveles de ATP, ROS y Ca^{2+} .

Nuestro análisis ha revelado que la dosis genómica mitocondrial es menor en los haplogrupos Uk y J, que en el haplogrupo H. Hemos observado que esa caída en los niveles de mtDNA condiciona la función OXPHOS.

Una caída en el MIMP suele ir acompañada de una disminución en la producción de ROS. Nosotros no encontramos diferencias en la producción de ROS. Sin embargo, nuestros resultados fueron similares a los obtenidos con el ratón “mutador del mtDNA” que acumula mutaciones en el mtDNA y sufre fenotipos de envejecimiento prematuro. Sin embargo, en estos ratones la producción de ROS es normal y la expresión de las enzimas antioxidantes indicaban ausencia de estrés oxidativo en sus tejidos (Trifunovic, Hansson et al. 2005). Por otra parte, nosotros hemos observado efectos diferenciales tras el tratamiento con NAC en los distintos haplogrupos. Por tanto, es posible que las técnicas de detección de ROS *in vivo* no hayan sido las adecuadas para distinguir pequeñas diferencias en la producción de ROS (Zielonka and Kalyanaraman 2008) o que el NAC esté afectando a otros niveles. En cualquier caso si las diferencias observadas no son debidas a los niveles de ROS, otro factor ha de ser el responsable de la diferencia entre los fenotipos de los distintos haplogrupos. De hecho, se han observado diferencias en el pH de la matrix y en el calcio

intracelular entre los macrohaplogrupos N y no N (Kazuno, Munakata et al. 2006). ROS, calcio y otros segundos mensajeros pueden modificar la expresión de muchos factores y las compensaciones nucleares pueden conducir a diferencias en la función OXPHOS (Amo, Yadava et al. 2008). Además, en híbridos de ratón se ha visto que un mayor contenido en mtDNA conlleva un fenotipo más oxidativo (Moreno-Loshuertos, Acin-Perez et al. 2006).

El mtDNA con el tiempo acumula mutaciones somáticas, que están en contacto con otros factores nucleares y ambientales. Estas diferencias OXPHOS debidas a las variantes del mtDNA podrían explicar porque algunos individuos tardan más en llegar al umbral necesario para alcanzar sintomatología en determinados tejidos y, por tanto presentan un progreso más lento en las enfermedades multifactoriales asociados a la edad (Wallace, Shoffner et al. 1995). Esto podría explicar porque se encuentra una sobrerrepresentación de los haplogrupos U_k y J en centenarios y una subrepresentación de éstos en individuos en enfermedades asociadas a la edad como el PD y el AD.

II. FARMAQGENÓMICA DEL p.MT-CYB

Se ha propuesto que los análogos de la ubiquinona que comparten la fracción quinona con distintos sustituyentes comparten su actividad biológica. Nosotros presentamos moléculas de naturaleza benzo y naftoquinónica similares al CoQ. Se ha visto que compuestos similares al CoQ como la idebenona tienen alta capacidad antioxidante en muchos sistemas (Haefeli, Erb et al. 2011; Geromel, Darin et al. 2002). De hecho, tanto la ubiquinona, como sus derivados han sido utilizados en pacientes con un defecto en el sistema OXPHOS consiguiendo un efecto atenuador de la clínica (Geromel, Darin et al. 2002).

En las mitocondrias, la ubiquinona es un compuesto lipídico que se encuentra en exceso, en comparación con otros transportadores de electrones presentes en la membrana interna (Kroger and Klingenberg 1973). Transfiere electrones a partir de los complejos I y II al complejo III de la ETC (Saraste 1999). Su estado redox controla, entre otros, la producción de daño oxidativo celular (Briere, Schlemmer et al. 2004). Por tanto, el uso de análogos de la ubiquinona puede otorgar una potente herramienta como antioxidante.

Frente a los antioxidantes clásicos que actúan reaccionando con las especies reactivas de oxígeno neutralizándolas, nosotros presentamos una vía alternativa, el control del acoplamiento del sistema OXPHOS. Se ha visto que el tratamiento con desacoplantes como el DNP disminuye el daño oxidativo y aumenta la esperanza de vida en *Saccharomyces cerevisiae* (Barros, Bandy et al. 2004)), en *Drosophila melanogaster* (Padalko 2005) y en ratón. Sin embargo, su índice terapéutico es muy pequeño en humanos (Harper, Green et al. 2008).

IV.1 Las drogas utilizadas presentan actividad sobre la función OXPHOS

Los compuestos analizados tienen efecto sobre la función OXPHOS, sin afectar a la viabilidad celular, por tanto quizás puedan ser utilizadas en terapia. Además, de los seis compuestos analizados, 5 disminuyen el potencial de membrana interna mitocondrial y los niveles de mtATP. En este tipo de células tumorales altamente glicolíticas (Desquiret, Loiseau et al. 2006), los niveles de mtATP representan únicamente una fracción de los niveles de ATP total. Estos

resultados sugieren que nuestros compuestos tenían efecto sobre el sistema OXPHOS.

El estudio de estructura-actividad reveló que una adición de sustituyentes partiendo del compuesto 2-(2-Metoxifenilamino)-1,4-benzoquinona puede conducir a la síntesis de una molécula específica para el centro Qi que actúe como desacoplante selectivo. La posición 2 del fenilamino parece conferirle esa capacidad. Además, se ha observado que un aumento de liposolubilidad tanto del sustituyente alcoxi del fenilamino, como el cambio de la benzo a naftoquinona no se traduce en un aumento de la capacidad desacoplante.

Así, el análisis de los distintos parámetros nos indica que nuestros compuestos parecen que actúan como desacoplantes. Aunque sólo uno de ellos, el compuesto ASM-07-02, presentó capacidad de disminuir el potencial de membrana, la producción de ROS y aumentar la velocidad de transporte electrónico de forma significativa.

IV.2 La molécula ASM-07-02 tiene más afinidad por el centro Qi

Los estudios de competición con antimicina A han mostrado que las moléculas de estudio se unen en gran medida al centro Qi del complejo III. El fármaco ASM-07-02, aquel con mayor capacidad antioxidante y desacoplante, presenta mayor afinidad por el centro Qi, reflejada como un 50% de la respiración inhibida por la AA, frente al 80% del blanco.

Además, un análisis de la interacción de este compuesto con los distintos fondos genéticos mitocondriales mostró la existencia de diferencias significativas en la inhibición con antimicina A entre los haplogrupos Uk y J1c frente al J2. Curiosamente, las filogenias J1c y Uk están definidas por la transición no sinónima m.14798C>T/p.MT-CYB: F18L (Carelli, Achilli et al. 2006), localizada a 3,5 Å del centro Qi del bolsillo de unión de la ubiquinona (Fisher and Rich 2000), en particular en la zona de unión de la cadena alifática de ésta al centro Qi (Gao, Wen et al. 2003). Una mayor competición con la AA en estos dos haplogrupos parece indicar que la molécula se une más al centro Qi por la existencia de esta mutación.

En concordancia, el estudio del consumo de oxígeno reflejó que las líneas celulares Uk y J1c eran las únicas en las que el compuesto ASM-07-02 daba lugar a un aumento significativo del consumo de oxígeno, frente al blanco, reflejando la mayor afinidad del fármaco por la diana.

Nuestros resultados parecen confirmar el efecto fenotípico del cambio F18L sobre el paso de electrones a través del complejo III y, por tanto, en la eficacia de la ETC. Además el uso de este fármaco en terapéutica podría ser beneficioso en mayor medida para los individuos portadores de este polimorfismo.

IV.3 La molécula ASM-07-03 tiene diferente capacidad desacoplante en los distintos fondos genéticos mitocondriales

El análisis del MIMP de las líneas celulares pertenecientes a los distintos fondos genéticos mitocondriales mostraba la existencia de una rampa en los valores de MIMP de los distintos haplogrupos. Así, considerando el haplogrupo H el 100% obteníamos una caída secuencial en los valores del MIMP: H<<Uk<J1c<<J2.

En presencia de ASM-07-03 10 μ M, los híbridos H mostraban el MIMP más bajo y la interacción con el fármaco producía una caída significativamente diferente en los distintos haplogrupos. El haplogrupo H carece de cambios tanto en el complejo I, como en el complejo III, este hecho puede condicionar un aumento en la afinidad del fármaco a la diana, aumentando la capacidad desacoplante de éste compuesto.

El estudio de competición de la antimicina A ha mostrado que este compuesto se une selectivamente al centro Qi, sin embargo, sólo existe un 20% de diferencia entre la inhibición de AA con este compuesto (60%) y la inhibición de la antimicina A en el blanco (80% aproximadamente). Además, los resultados obtenidos tras la incubación de células rho⁰ con este compuesto parecen indicar que actúa selectivamente en el sistema OXPHOS. Sin embargo el lugar de interacción se desconoce. Teniendo en cuenta que las diferencias significativas se producen con el haplogrupo J1c y el haplogrupo J2, es posible que otras variantes en el complejo I estén interactuando con él. El haplogrupo J está

definido por tres variantes genéticas codificadas en el complejo I (m.4216T>C/p.MT-ND1:Y304H, m.10398A>G/p.MT-ND3:T114A y m.13708G>A/p.MT-ND5:A458T). El cambio Y304H/p.MT-ND1 ha sido modelado en su posición análoga en *E. Coli*, T316H/p.MT-ND1, donde produce una caída de la actividad del complejo I (Hinttala, Kervinen et al. 2010). El aminoácido treonina en el residuo 114 de p.MT-ND3 (es decir, como en las líneas H) aumenta la actividad del complejo I en cíbridos (Kulawiec, Owens et al. 2009). Además se ha visto recientemente que el bolsillo de unión de la ubiquinona en el complejo I está formado por las subunidades ND1 y ND3, entre otros (Efremov and Sazanov). Si esto es así, puede ser que la molécula ASM-07-03 este interactuando con alguna de esas posiciones.

IV.4 El desacoplamiento selectivo como posible tratamiento en patologías con aumento de daño oxidativo

Las mitocondriopatías cursan generalmente con un aumento del daño oxidativo (DiMauro and Schon 2003). Un ejemplo es el síndrome de Leigh.

El síndrome de Leigh o MILS es la enfermedad neurodegenerativa más común del sistema OXPHOS que afecta a niños. Cursa con disfunciones en el gen mitocondrial *MT-ATP6* de la ATP sintasa (DiMauro and Schon 2003). Entre las mutaciones descritas relacionadas con la patología, las más comunes son, m.8993T>G (L156R), m.8993T>C (L156P) y m.9176T>G (L217R) (Lopez-Gallardo, Solano et al. 2009). Estas mutaciones constituyen el agente causal de la patología de MILS cuando su porcentaje de heteroplasmia es mayor al 85-90%. En un porcentaje menor, estas mutaciones son causantes del síndrome de Neuropatía, Ataxía y Retinitis Pigmentosa (NARP). Estas mutaciones han sido asociadas con una disminución en la síntesis de ATP y un aumento de la producción de ROS, factores clave en el desarrollo de la patología (Vazquez-Memije, Shanske et al. 1998; Carrozzo, Tessa et al. 2001).

La mutación m.8993T>G ha sido asociada con muchos y diversos fenotipos en el modelo de cíbridos transmitocondriales. Así, los resultados obtenidos por distintos grupos varían, tanto en la observación de un aumento (Sgarbi, Baracca et al. 2006; Baracca, Sgarbi et al. 2007), o no (Wojewoda,

Duszynski et al. 2010) en el potencial de membrana, como en la síntesis de ATP (Pallotti, Baracca et al. 2004; Baracca, Sgarbi et al. 2007). Sin embargo, la única evidencia compartida por todos los grupos de investigación es que la mutación m.8993T>G produce un aumento de daño oxidativo, que condiciona la evolución de la patología (Carrozzo, Rizza et al. 2004; Baracca, Sgarbi et al. 2007).

Durante esta tesis doctoral se ha puesto de manifiesto la importancia de los fondos genéticos mitocondriales en la penetrancia de varias patologías. Así, un estudio realizado por D'Aurelio *et al.* 2010 sugiere la posible influencia de los haplogrupos mitocondriales en la enfermedad de Leigh. Tras el análisis de tres líneas híbridas portadoras de la mutación m.8993T>G pudo explicar la inconsistencia de los resultados encontrados en los distintos grupos de investigación, determinados en gran medida por el fondo genético mitocondrial (D'Aurelio, Vives-Bauza et al. 2010).

Para el análisis del efecto de nuestros compuestos tomamos una línea híbrida portadora de la mutación m.8993T>G y su control isogénico. Ambos líneas híbridas pertenecientes al haplogrupo H. En concordancia con los resultados de D'Aurelio, nuestra línea híbrida no presentaba una caída en el consumo de oxígeno endógeno, pero sí presentaba un aumento significativo de la producción de daño oxidativo. Además, no mostraba diferencias en el contenido en ATP con respecto al control isogénico, tal como han mostrado otros autores (Carrozzo, Rizza et al. 2004).

La vía tradicional de tratamiento de patologías mitocondriales es la vía paliativa (Montoya, 2010). En el caso del daño oxidativo es común el tratamiento con antioxidantes. En híbridos portadores de la mutación m.8993T>G se ha visto que el tratamiento con selenio produce una disminución del daño oxidativo y un aumento de los niveles de las enzimas antioxidantes (Wojewoda, Duszynski et al. 2010)). Nosotros presentamos fármacos con actividad antioxidante que controlan el acoplamiento del sistema OXPHOS. El compuesto ASM-07-02 ha mostrado capacidad desacoplante. Es sabido que las mitocondrias menos acopladas, con gradientes electroquímicos menores y mayor facilidad de bombeo de protones, tendrán una mayor velocidad de flujo de electrones y los intermediarios de la cadena respiratoria permanecerán menos tiempo reducidos y, por lo tanto, producirán menos ROS.

El uso de ASM-07-02 ha mostrado capacidad de disminuir la producción de ROS tanto en la línea cíbrida control como en la patológica, hasta disminuir los niveles de la patológica a niveles por debajo del control isogénico. Por tanto, podría pensarse que esta molécula podría ser válida para el tratamiento de patologías que cursen con estrés oxidativo. Durante esta tesis doctoral se ha puesto de manifiesto que el fondo genético mitocondrial condiciona, entre otros, la eficiencia de acoplamiento OXPHOS, por tanto un tratamiento selectivo farmacogenómico a nivel del acoplamiento OXPHOS, parece una buena herramienta en el tratamiento de ésta y otras patologías.

Además, durante todo el desarrollo de esta tesis doctoral se ha visto la importancia de los efectos de las variantes genéticas mitocondriales en distintas patologías. Por lo tanto, la importancia de un tratamiento farmacogenómico individualizado a nivel mitocondrial es una posibilidad creciente.

VI. Conclusiones

I. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS VARIANTES GENÉTICAS DEL mtDNA

1. Las modificaciones incorporadas al modelo de cíbridos transmitocondriales parece ser apropiado para la caracterización de variantes genéticas poblacionales del mtDNA
2. Las haplogrupos europeos definidos por cambios en el p.MT-CYB presentan efecto fenotípico distinto que aquellos que carecen de estas variantes.
3. La disminución en la dosis genómica mitocondrial condiciona la cantidad de proteínas codificadas en el mtDNA en líneas cíbridas pertenecientes a las filogenias J y Uk, con respecto a la filogenia H
4. La fracción celular ocupada por mitocondria no es la responsable de la caída en proteínas OXPHOS en las líneas celulares de las filogenias Uk y J, con respecto a las del haplogrupo H
5. Los subhaplogrupos del clado J, J1c y J2, definidos por cambios en el gen *MT-CYB* parecen ser los responsables de los efectos fenotípicos observados en el haplogrupo J.
6. La bioenergética OXPHOS está influida por las variantes genéticas individuales de cada filogenia estudiada.
7. La caída de los niveles de mtDNA en los fondos genéticos del mtDNA, definidos por cambios en el gen *MT-CYB*, contribuye a explicar el aumento de penetrancia de estos haplogrupos en enfermos de LHON y patologías asociadas a la edad.

II. FARMAQGENÓMICA DEL p.MT-CYB

8. Todos los análogos de la ubiquinona analizados, excepto MAR-2Q-25, tienen actividad sobre el sistema OXPHOS, y capacidad para disminuir el potencial de membrana interna mitocondrial.
9. El compuesto ASM-07-02 presenta mayor afinidad por el centro Qi, que el resto de los compuestos, y esta afinidad aumenta en las líneas celulares que presentan el cambio F18L/p.MT-CYB.
10. El compuesto ASM-07-03 tiene diferente capacidad desacoplante entre las filogenias del mtDNA estudiadas.
11. La bioenergética OXPHOS de las filogenias mitocondriales es susceptible de ser transformada de forma selectiva
12. La modificación de la eficiencia de acoplamiento OXPHOS parece una buena herramienta farmacológica para el tratamiento de enfermedades que cursen con aumento del daño oxidativo.

VII. Material y Métodos

I. MATERIAL

I.1 Reactivos generales

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

Las enzimas de restricción utilizadas proceden de las casas comerciales **New England Biolabs, Fermentas, Roche y Amersham**. Las Taq polimerasas empleadas para la reacción de PCR fueron principalmente *RedTaqTM* de **Sigma-Aldrich** para fragmentos pequeños y la *Taq DNA Polimerase* de la casa comercial **Roche** para fragmentos mayores. Los reactivos para la RT-PCR fueron de la casa comercial **Applied-Biosystems**.

Los medios utilizados en el cultivo celular, así como el suero fetal bovino (FBS, del inglés *Fetal Bovine Serum*) fueron de la casa comercial **Invitrogen**.

I.2 Oligonucleótidos y sondas para PCR

Los oligonucleótidos para reacción en cadena de polimerasa (PCR, del inglés *Polimerase Chain Reaction*) empleados en esta tesis doctoral fueron sintetizados por **Sigma-Genosys** y purificados mediante el método del desalado. Los oligonucleótidos y sondas para PCR cuantitativa fueron sintetizadas por **Applied-Biosystems** y purificadas por HPLC.

I.3 Sondas de citometría de flujo

Las sondas utilizadas en citometría de flujo proceden de la casa comercial **Molecular Probes**. En la siguiente tabla (tabla VII.1) presento una breve explicación del fin para el cuál se utilizó cada una, la concentración de trabajo y el solvente en el que se disolvió cada una de ellas.

SONDA	SOLVENTE	CONCENTRACIÓN	MEDIDA
Di-Cloro-Fluoresceína-Di-Acetato (DCF-DA)	EtOH	20 μ M	ROS (H ₂ O ₂)
MitoSOX™	DMSO	40 nM	ROS (O ₂ ⁻)
Ioduro de Propidio (IP)	H ₂ O	20 mg/L	Viabilidad
3,3'-Dihexiloxacarbocianina Ioduro (DiOC₆ (3))	EtOH	20 nM	Potencial de membrana interna mitocondrial
Nonyl-Acridine-Orange (NAO)	EtOH	1 μ M	Superficie de membrana interna mitocondrial

Tabla VII.1: Sondas para citometría de flujo utilizadas durante el desarrollo de esta tesis.

I.4 Kits comerciales

Todos los kits comerciales empleados durante el desarrollo de esta tesis y la finalidad de los mismos se encuentran recogidos en la tabla VII.2.

I.5 Autorradiografías y membranas

Las membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) empleadas para la fijación de proteínas han sido las Hybond™ -P de la casa comercial **Amersham**.

Las películas autorradiográficas utilizadas en la detección de proteínas mediante *Western blot* has sido las Hyperfilm™ ECL de la casa comercial **Amersham**, y en el caso de marcaje radioactivo de síntesis de proteínas con S³⁵ las Kodak Biomax MR film de la casa comercial **Sigma**.

NOMBRE	UTILIDAD	CASA COMERCIAL
NucleoSpin RNA II	Extracción de RNA	Macherey-Nagel
Spin-Clean™ PCR Purification Kit	Purificación de DNA	Mbiotech
ExoSAP-IT® For PCR	Purificación de productos de PCR	Usb
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Obtención del cDNA	Applied-Biosystems
TaqMan® Gene Expression Master Mix	PCR cuantitativa	Applied-Biosystems
PDARs RNAsa P	PCR cuantitativa	Applied-Biosystems
Lookout™ Mycoplasma Elimination Kit	Eliminación de micoplasma	Sigma
Complex IV Duplexing (Activity + Quantity) Microplate Assay Kit	Determinación de actividad y cantidad de complejo IV	Mitosciences
Cell Titer-Glo Luminiscent Cell Viability Assay	Determinación de ATP total	Promega
ECL Plus Western Blotting Detection System	Detección de proteínas mediante Western Blott	Amersham
Proteo Silver™ Silver Stain kit	Tinción de proteínas con nitrato de plata	Sigma
In Vitro Toxicology Assay Kit, Neutral Red based	Determinación de la viabilidad celular en microplaca	Sigma
Mito-ID® Membrana Potencial Cytotoxic Kit	Determinación del potencial de membrana en microplaca	Enzo® Life Sciences

Tabla VII.2: Kits comerciales utilizados durante el desarrollo de esta tesis doctoral

I.6 Aparatos

Los aparatos utilizados durante este trabajo, agrupados por uso se encuentran recogidos en la siguiente tabla:

FINALIDAD	NOMBRE	MARCA	MODELO	USO
ESTERILIZACIÓN	Estufa	Selecta	P	Material de vidrio a 160°C toda la noche
	Autoclave	Selecta	437-G	Material de plástico y disoluciones a 1 atmósfera, 120°C durante 20min
BALANZA	Granatario	Sartorius	1265MP	Precisión de medida 0,1 gr
	Balanza de precisión	AND	ER120A	Precisión de medida 0,001gr
ALMACENAMIENTO	Arcón congelador	Whirlpool	0001	Temperatura de -20°C Reactivos y disoluciones
	Ultracongelador	Sanyo	CFC Free	Temperatura de -80°C Muestras biológicas y autorradiografías
	Criopreservador	Air Liquid	ESPACE 151-331-661	Preservación de líneas celulares
	Frigorífico/ Congelador	Bosch	A-21	Temperatura de 4°C/ -20°C Reactivos y disoluciones
Lynx		B-35		
MANEJO DE DISOLUCIONES Y LÍQUIDOS	Micropipetas	Gilson	P2, P10, P20, P200 y P1000	Para manejar volúmenes en µl
	Pipetor	Pipetboy	Acupipet	Para manejar volúmenes de hasta 25 ml
pH	pHmetro	Crison	micropH 2000	Determinaciones y ajustes de pH en las disoluciones
PCR	Termociclador	Biometra	T3	Reacciones de PCR, retrotranscripción y de purificación con Exosab
		Eppendorf	Trío Thermoblock	
	Real-time PCR	Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System Thermal Cycling Block	
CENTRÍFUGAS	Microcentrifuga	Eppendorf	5415C	Centrifugado de muestras a Temperatura ambiente
			5415R	Centrifugado de muestras refrigeradas

CENTRÍFUGAS	Centrífugas termostatzadas	Sorvall	RC 5B PLUS (rotores HS4 y SS34)	Extracción de DNA, plaquetas y mitocondrias
		Kontron	H401 (rotores AS4.13 y A8.24)	
	Centrífugas a Temperatura ambiente	Beckman Coulter	Allegra X-22	Extracción de DNA, plaquetas y mitocondrias
	Concentrador a vacío	Eppendorf	5301	Concentración y evaporación de líquidos
CULTIVO CELULAR	Centrífugas basculantes	Centrikon	T124	Obtención de pellet celular
		Beckman Coulter	Allegra X-22	
	Incubadores	Nuaire	DHD Autoflow	Cultivo de líneas celulares a 37°C y 5% de CO ₂ en atmósfera húmeda
			US Autoflow	
	Campanas de flujo laminar	Holten	Lamina ir HB2448	Zona de trabajo estéril
		Sanyo	CFC Free Ecotopoic	
	Microscopios invertido de contraste de fases	Leica	DMIL	Visualización de cultivos celulares
	Baño	Sellecta	Precistern	Atemperado de los medios de cultivo a 37°C
Bomba de vacío	KibLab	Laboport	Para aspirar el medio de las placas de cultivo	
Pipeteador	Pipet boy	Acu pipet	Trabajo con líneas celulares y líquidos	
ELECTROFORESIS	Wide/ Mini-Sub cell GT	Bio-Rad	GT**	Electroforesis de geles horizontales de agarosa de DNA y RNA
			GT*	
	Mini / Protean II		xi Cell	Geles de proteínas BN, síntesis y SDS-PAGE
			3 Cell	Geles de proteínas BN y SDS-PAGE
	Fuentes de alimentación		Power-Pac HC	Electroforesis de geles horizontales de agarosa de DNA y RNA
			Power-Pac 300	
			Universal 500	Geles verticales de proteínas, síntesis y transferencia de proteínas a membrana

ELECTROFORESIS	Bomba peristáltica	Ismatec	Ecoline	Formador de gradientes de poliacrilamida
	Sistema de transferencia	Bio-Rad	Mini Trans-Blot Cell	Transferencia húmeda de geles pequeños a membranas PVDF
			Transfer-Blot SD	Transferencia semi-seca a membranas PVDF
	Escaneado de geles		UV Gel Doc	Escaneado de geles
	Secado de geles	Bio-Rad	Double-Up Gel Dryer Rack	Con bomba Alcatel modelo 1.004 AC
	Exposición autorradiográfica	Amersham	Hypercassette™	Revelado de autorradiografías de proteínas
Kodak		Kodak cassette	Revelado de autorradiografías de síntesis de proteínas marcada con S ³⁵	
CONSUMO DE O₂	Electrodo de O ₂	Oroboros	2k	Medidas de consumo de O ₂ en células
	Bomba		Tip-2k	Titulación de fármacos
ESPECTROFOTÓMETROS/ LUMINÓMETROS/ FLUORÍMETRO	Espectrofotómetro	Unicam	UV500	Medidas de actividad enzimática y Bradford
	Nano-Drop	Thermo-Scientific	ND-1000	Medida de concentración de DNA, RNA y proteínas
	Lector de placas	BMG-Labtech	Novostar	Medida de actividades, fluorimetría, luminometría y cantidad de proteínas
	Lector de placas	TECAN	Spectra-Fluor-plus	Medida de fluorimetría de concentración de proteínas

Tabla VII.3: Aparatos utilizados durante el desarrollo de esta tesis con sus correspondientes finalidades

I.7 Material biológico y líneas celulares

I.7.1 Muestras biológicas

El estudio poblacional del mtDNA se realizó a partir de 150 muestras de sangre y orina procedentes de individuos sanos de la población española. De ellas, 78 fueron de orina, y 72 de sangre. La toma de sangre se realizó en condiciones de clínica habituales, por el personal cualificado a tal efecto, mediante punción venosa.

Todas las muestras fueron acompañadas de una hoja informativa (anexo) y un consentimiento expreso tal y como exige la legislación vigente.

I.7.2 Líneas celulares

Las líneas celulares empleadas y generadas en este trabajo fueron derivadas de la línea celular de osteosarcoma **143B** y construidas a partir de la línea rho⁰ **143B-Gotz**. Ambas, parental y rho⁰, cedidas a nuestro laboratorio por el profesor Attardi del California Institute of Technology en Pasadena (Estados Unidos). En la tabla VII.4 se muestra un compendio de todas las líneas híbridas construidas, así como información de su nomenclatura, haplogrupo mitocondrial y de los números de acceso a las secuencias completas de los mtDNA cada una de ellas en la base de datos electrónica **GenBank**.

Nombre	nDNA	Número Genbank	Haplogrupo	Subhaplogrupo	Observaciones
143B	143B		X	-	Parental Generada en el laboratorio del Profesor Attardi
rho^o	143B		NO mtDNA	-	Línea carente de mtDNA Generada en el laboratorio del Profesor Attardi
5J	LÍNEAS CÍBRIDAS GENERADAS EN NUESTRO LABORATORIO	JN635298	J	J1	
A133J		FJ178380			
34J		JN635299		J1c	
78J		JN635300			
128J		JN635301			
A134J					
A139J		JN635302			
A135J		JN635304			
A106J		JN635303		J2	
296		JN635306			
A124J					
A137J		JN635305			
A3K		HM103359	U	Uk1	
A110K		HM103363		Uk2	
A48K		HM103361			
A8K		HM103360.			
A98K		HM103362.			
A36K				U5a1	
AcH		HM103354	H	H1	
612H		HM103357			
613H	HM103358				
25H	HM103356	H2			
A38H2					
RicH	HM103355	H13			
A1H3		H3			

Tabla VII.4: Cibridoteca utilizada.

I.8 Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados en las inmunodetecciones descritas en los siguientes capítulos se resumen en la siguiente tabla. La dilución del anticuerpo primario se realizó en PBS con 0,1% de Tween y leche en polvo al 1%, y la del secundario en PBS con 0,1% de Tween y leche en polvo al 0,1%, en cualquier caso.

	Ab Primario (dilución)	Proteína	Ab Secundario (dilución)	Origen
TFAM	Anti-25 KDa (1/5000)	TFAM	Anti-conejo (1/2000)	Dr. Weisner
Actina	Anti- Acta1	Actina	Anti-conejo (1/2000)	Sigma
Complejo II	Anti-70 KDa (1/5000)	SDHA	Anti-ratón (1/20000)	Molecular Probes
Complejo IV	Anti-COI (1/10000)	p.MT-CO1	Anti-ratón (1/20000)	Molecular Probes

Tabla VII.5: Anticuerpos utilizados en inmuno detección de membranas por *Western blot*. SDHA: Succinato deshidrogenasa subunidad A.

I. MÉTODOS

I.1 Extracción, manipulación y análisis de ácidos nucleicos

I.1.1 Extracción de DNA

A. Células epiteliales presentes en la orina

Para la extracción de DNA a partir de orina trabajamos con la primera orina del día incluyendo la primera fracción (McDonnell, Schaefer et al. 2004; Botchkina, Kim et al. 2005). El pellet celular resultante se obtuvo tras un centrifugado a 5.000 rpm, durante 10 min a 4°C (Sorvall rotor SS-34, Kotron rotor AS-34). Una vez obtenido el pellet celular se realizó un lavado con suero fisiológico o PBS con el fin de limpiar las sales y las posibles contaminaciones presentes en las muestras de orina. Posteriormente, el pellet celular se recuperó por centrifugación a 5000 rpm, 4°C, durante 10 min (Sorvall rotor SS-34, Kotron rotor AS-34), y decantado del sobrenadante.

El sedimento celular blanquecino obtenido se transfirió a un *ependorf* estéril, y se resuspendió en 0,5 ml TE 20:4 (TRIS 20 mM pH 8, EDTA 5 mM) con 200 µg/ml de Proteinasa K para digerir las proteínas y dodecil sulfato sódico al 0,4% (SDS) para desorganizar las membranas. La mezcla se incubó durante toda la noche a 37°C, o bien a 50°C durante 2 horas.

Posteriormente, los ácidos nucleicos se extrajeron con una mezcla de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (Fenol IAC; 25:25:1). Para ello, se añadió acetato amónico 7,5 M a una concentración final de 1,5-2M para facilitar la formación de la interfase y 1,5 volúmenes de Fenol-IAC para la extracción del DNA. La mezcla obtenida se agitó durante 2 min con ayuda de un *vortex* y se centrifugó a 3000 rpm, durante 5 min a 20°C (Sorvall rotor SS-34, Kotron rotor AS-34). Tras el centrifugado se obtuvo un sistema bifase y se tomó la fase acuosa que contiene el DNA. La extracción fenólica se repitió una segunda vez, y sobre la fase acuosa obtenida se realizó una adicción de 2 volúmenes de alcohol isoamílico: cloroformo (1:24) para eliminar las posibles trazas de fenol remanentes, se agitó la mezcla durante 2 min con ayuda de un *vortex* y se centrifugó a 3000 rpm, durante 5 min a 20°C (Sorvall rotos SS-34, Kotron rotor AS-34).

A continuación, se tomó de nuevo la fase acuosa y se transfirió a un nuevo *eppendorf* estéril. Inmediatamente después se añadieron 2 volúmenes de etanol absoluto a -20°C agitando con sumo cuidado para favorecer la precipitación paulatina del DNA. Además, con el fin de aumentar la cantidad de DNA precipitado se dejó a -20°C durante toda la noche, o bien durante 1 hora a -80°C . Pasado este tiempo, en caso de que en la muestra no hubiera suficiente DNA para que precipitase en forma de ovillo, se centrifugó la disolución a 13000 rpm durante 30 min a 4°C (Eppendorf, modelo 5415R). Una vez obtenido el pellet se decantó el etanol restante, y se evaporó en un concentrador (Eppendorf, modelo 5310).

El DNA obtenido se resuspendió en un volumen adecuado de agua estéril libre de DNAsas mediante agitación en un *thermoblock* a 37°C hasta la completa disolución del mismo.

B. Células sanguíneas

La extracción de DNA a partir de células sanguíneas (Marcuello, Gonzalez-Alonso et al. 2005) se realizó de modo similar a la orina. Sin embargo, la muestra de sangre inicial se incubó durante 15 min a 4°C (hielo machacado) con TE 20:4 como paso previo a la primera centrifugación. Además, para la obtención del pellet celular se realizaron varios lavados con TE para eliminar los restos de eritrocitos. Normalmente, fueron necesarios, al menos, dos lavados para conseguir un pellet blanquecino. Una vez obtenido, éste se resuspendió en 2 ml de TE con 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Proteínasa K y SDS al 0,4% y se incubó durante toda la noche a 37°C , o bien a 50°C durante 2 horas. Al día siguiente, se procedió de igual modo que en el caso de la orina.

C. Cultivos celulares

Para la extracción de DNA a partir de cultivos celulares se recogieron las células mediante tripsinización. Posteriormente, se llevaron a cabo dos lavados con PBS frío mediante resuspensión y posterior centrifugación (3000 rpm, Eppendorf 5415C, 5 min, 4°C), y el pellet celular obtenido se congeló a -80°C

con el fin de homogeneizar las posibles variaciones existentes entre la extracción de DNA de células en fresco y congelado.

Para la extracción del DNA a partir del mismo se procedió igual que en el caso de las células epiteliales obtenidas de la orina. Sin embargo, el pellet se resuspendió en 0,25 ml de TE 10:1, y en la extracción e DNA sólo fué necesaria una extracción fenólica, en lugar de dos.

I.1.2 Extracción de RNA total a partir de células en cultivo

El RNA total a partir de células en cultivo se extrajo utilizando el kit “*NucleoSpin RNA II*” de Macherey-Nagel.

Brevemente, las células en cultivo se recogieron por tripsinización. A continuación se realizaron dos lavados del pellet celular con PBS frío mediante resuspensión y posterior centrifugación (3000 rpm, Eppendorf 5415C, 5 min, 4°C). Una vez obtenido el pellet celular, se congeló a -80°C para evitar diferencias entre muestras frescas o congeladas. En el momento de la extracción se siguieron se las instrucciones del fabricante.

I.1.3 Cuantificación de ácidos nucleicos

La concentración del DNA y del RNA extraídos se determinó mediante espectrofotometría a 260 nm de longitud de onda. A esta longitud de onda, las bases púricas y pirimidínicas absorben intensamente la radiación ultravioleta (UV). De tal forma que a 260nm, cada unidad de absorbancia es equivalente a 50 µg/ml de DNA de doble hebra y de 40 µg/ml de RNA de cadena sencilla. Así, siguiendo la siguiente ecuación derivada de la ley de Lambert-Beer, obtendremos la concentración de DNA.

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

Paralelamente, la relación DO_{260}/DO_{280} nos indica el grado de pureza. Así, una muestra de DNA puro presentará un valor del cociente $DO_{260}/DO_{280}=1,8$ en muestras de RNA y un $DO_{260}/DO_{280} = 2$ en muestras de DNA.

I.1.3 Reacciones en cadena de la polimerasa (PCR)

A. Obtención del cDNA monocatenario:

El cDNA monocatenario se obtuvo utilizando como molde el RNA total extraído a partir de las líneas celulares utilizando el kit “*High Capacity cDNA transcription Kit*” de **Applied**. Se mezclan 2,5 µg de RNA con los reactivos expuestos en la tabla VII.6, en un volumen final de 20 µl:

	VOLUMEN DE REACCIÓN (µl)
10X RT TAMPÓN	2,0
25X dNTPs mix (100mM)	0,8
10X RT Random Primers	2,0
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1,0
RNA 2,5 µg	10 µl
H₂O	c.s.p. 10 µl

Tabla VII.6: Reactivos necesarios para sintetizar cDNA por PCR de transcripción reversa (RT-qPCR).

Una vez obtenida la mezcla de reacción se llevaron a cabo los siguientes ciclos de temperatura a distintos tiempos en un termociclador: 25°C durante 10 min, 37°C durante 120 min, 85°C durante 5 s y 4°C durante 5 min La muestra de cDNA obtenida se cuantificó y se conservó a -20°C hasta su uso.

B. PCR usando el DNA genómico como molde

La reacción de PCR se llevó a cabo a partir de muestras de DNA aislado como se ha explicado anteriormente. Se utilizaron dos Taq polimerasa distintas en función del tamaño del fragmento a amplificar. Así, para fragmentos pequeños de hasta 1000 bp se utilizó la RedTaq de **Sigma** y para fragmentos grandes de hasta 3500 bp, la Taq polimerasa de **Roche**.

No obstante, cada uno de los fragmento del DNA mitocondrial que se deseaba amplificar tenía unas características particulares, lo que obligó a adecuar las condiciones de PCR para cada uno de los casos. La elección de los cebadores y la determinación de la temperatura de hibridación o de *annealing*, se realizó de acuerdo a los siguientes criterios:

- Los cebadores no deben aparearse entre sí
- La proporción de G/C y A/T ha de ser semejante
- Siempre que sea posible, el extremo 5' terminará en G o C
- El extremo 3' del cebador no puede presentar ningún polimorfismo y debe ser una G o C
- Las temperaturas de hibridación o *meelting* (T_m) han de ser parecidas y se calculan de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$$

B.1 Amplificación de fragmentos cortos:

Las reacciones se realizaron, como norma general, en un volumen final de 50µl. Las concentraciones de los distintos componentes de la mezcla se exponen en la tabla VII.7:

	VOLUMEN DE REACCIÓN (µl)	CONCENTRACIÓN FINAL
10X TAMPÓN TAQ	5,0	1X
5X OLIGONUCLEÓTIDOS (2,5 µM)	1,0	0,5 µM
10X dNTPs (20 mM)	2,0	2 mM
5X Taq POLIMERASA	1,0	1 U
DNA		100 ng/µl
H₂O	Hasta. 50 µl	-----

Tabla VII.7: Reactivos necesarios para la reacción de PCR con la RedTaq polimerasa de Sigma.

Las condiciones de amplificación en cualquier caso fueron las siguientes:

- | | | | | |
|-------------------------------|---------|-------|---|-----------|
| 1. Desnaturalización inicial: | 2 min | 95°C | } | 35 ciclos |
| 2. Desnaturalización: | 30 s | 95°C | | |
| 3. Hibridación: | 30 s | T_m | | |
| 4. Extensión: | 1-2 min | 72°C | | |
| 5. Elongación: | 5 min | 72°C | | |

B.2 Amplificación de fragmentos largos.:

Las reacciones se realizaron, como norma general, en un volumen final de 50µl. La cantidad necesaria de cada uno de los componentes de la mezcla se expone en siguiente tabla:

	VOLUMEN DE REACCIÓN (µl)	CONCENTRACIÓN FINAL
10X TAMPÓN TAQ	5,0	1X
5X OLIGONUCLEÓTIDOS (2,5 µM)	0,5	0,25 µM
10X dNTPs (20 mM)	1,0	0,5 mM
20X Taq POLIMERASA	0,25	1 U
DNA		100 ng. / µl
H₂O	Hasta 50 µl	-----

Tabla VII.8: Reactivos necesarios para la realización de una PCR con Taq polimerasa de Roche

Las condiciones de amplificación, en cualquier caso, fueron las siguientes:

- | | | | |
|-------------------------------|------------|------|-------------|
| 1. Desnaturalización inicial: | 1 min 30 s | 95°C | } 35 ciclos |
| 2. Desnaturalización: | 45 s | 95°C | |
| 3. Hibridación: | 45 s | Tm°C | |
| 4. Extensión: | 1-2 min | 72°C | |
| 5. Elongación: | 5 min | 72°C | |

B.2.1 Amplificación de la secuencia completa del mtDNA:

Para la amplificación de la secuencia completa del mtDNA, se utilizaron 8 fragmentos grandes solapantes con los contiguos (Ruiz-Pesini, Lapena et al. 2000). Los oligonucleótidos utilizados se detallan en la tabla VII.9 dispuesta a continuación:

FRAGMENTO	OLIGO L	OLIGO H	AMPLICIÓN (bp)
F1	hmtL 569	hmtH2982	2452
F2	hmtL2797	hmtH5193	2436
F3	hmtL5061	hmtH7497	2476
F4	hmtL7336	hmtH9819	2524
F5	hmtL9611	hmtH12111	2539
F6	hmtL11727	hmtH14559	2851
F7	hmtL14130	hmtH112	2590
F8	hmtL15591	hmtH626	1643

Tabla VII.9: Oligonucleótidos utilizados para la amplificación completa del mtDNA en 8 fragmentos.

Las condiciones de amplificación en cualquier caso fueron las siguientes:

- | | | | |
|-------------------------------|-------|------|-------------|
| 1. Desnaturalización inicial: | 2 min | 94°C | } 35 ciclos |
| 2. Desnaturalización: | 30 s | 94°C | |
| 3. Hibridación: | 30 s | 56°C | |
| 4. Extensión: | 3 min | 72°C | |
| 5. Elongación: | 5 min | 72°C | |

C. Purificación de productos de PCR

C.1 Purificación en columna:

La purificación de los productos de PCR se llevó a cabo utilizando el kit “*Spin-Clean™ PCR Purification Kit*” según las instrucciones del fabricante.

C.2 Purificación con Exosap:

Los productos de PCR que no fueron purificados mediante el método de columna se purificaron utilizando “*ExoSAP-IT® For PCR*” siguiendo las instrucciones del fabricante.

I1.4 Electroforesis de ácidos nucleicos

Las electroforesis de ácidos nucleicos realizadas durante el desarrollo de esta tesis fueron exclusivamente en geles horizontales de agarosa.

Los geles se prepararon disolviendo la agarosa en tampón de electroforesis TAE (Tris 40 mM pH 8, ácido acético glacial 0,11 % y Na₂ EDTA 0,4 mM) o TBE (Tris 50 mM, ácido bórico 50mM y EDTA 1mM) a unos 60°C (en un microondas). La elección del tampón, así como las concentraciones de trabajo, normalmente de 0,5-2,5% de agarosa, dependieron del tamaño del fragmento a observar.

A continuación, a la disolución de la agarosa se le añadió bromuro de etidio (10 mg/ml), se homogeneizó la mezcla y se dejó solidificar a 20°C en el molde del gel. La carga de las muestras se realizó con tampón de carga (Ficoll 400 al 30% y azul de bromofenol al 0,1% (p/v) en tampón de electroforesis).

Generalmente, para la comprobación del tamaño del fragmento del mtDNA amplificado y/o de los productos de una digestión con enzimas de restricción, se utilizó el marcador de pesos moleculares “*1Kb DNA Ladder*” de la casa comercial **Invitrogen**.

La separación electroforética se llevó a cabo a 60 V durante 45 min. Posteriormente, para la visualización del DNA se expuso el gel de electroforesis a una fuente de radiación UV a 302nm, los productos resultantes se fotografiaron con una cámara del sistema **Bio-rad** Gel-Doc 1.000.

IV.1.6 Análisis de mutaciones y polimorfismos en el mtDNA por RFLP. Haplogrupado de muestras

El análisis de mutaciones y polimorfismos del mtDNA se realizó mediante digestión de productos de PCR (RFLP, del inglés, *Restriction Fragment Length Polymorphism*). Las condiciones de amplificación de cada SNP (del inglés, *Single Nucleotide Polymorphism*), las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la PCR, y la enzima de restricción adecuada para cada uno de ellos se encuentran recogidos en la tabla A.3 del anexo.

A. Estrategia de haplogrupaje

A.1 Estrategia de haplogrupaje

La estrategia de haplogrupaje utilizada consiste en una simplificación de una inicial, basada en amplificar el genoma mitocondrial en varios fragmentos y cortar con una batería de enzimas de restricción (Torróni, Huoponen et al. 1996). Nosotros seguimos un protocolo jerarquizado en función del porcentaje de cada filogenia en la población (Ruiz-Pesini, Lapena et al. 2000). En la figura VII.1 se expone dicha estrategia.

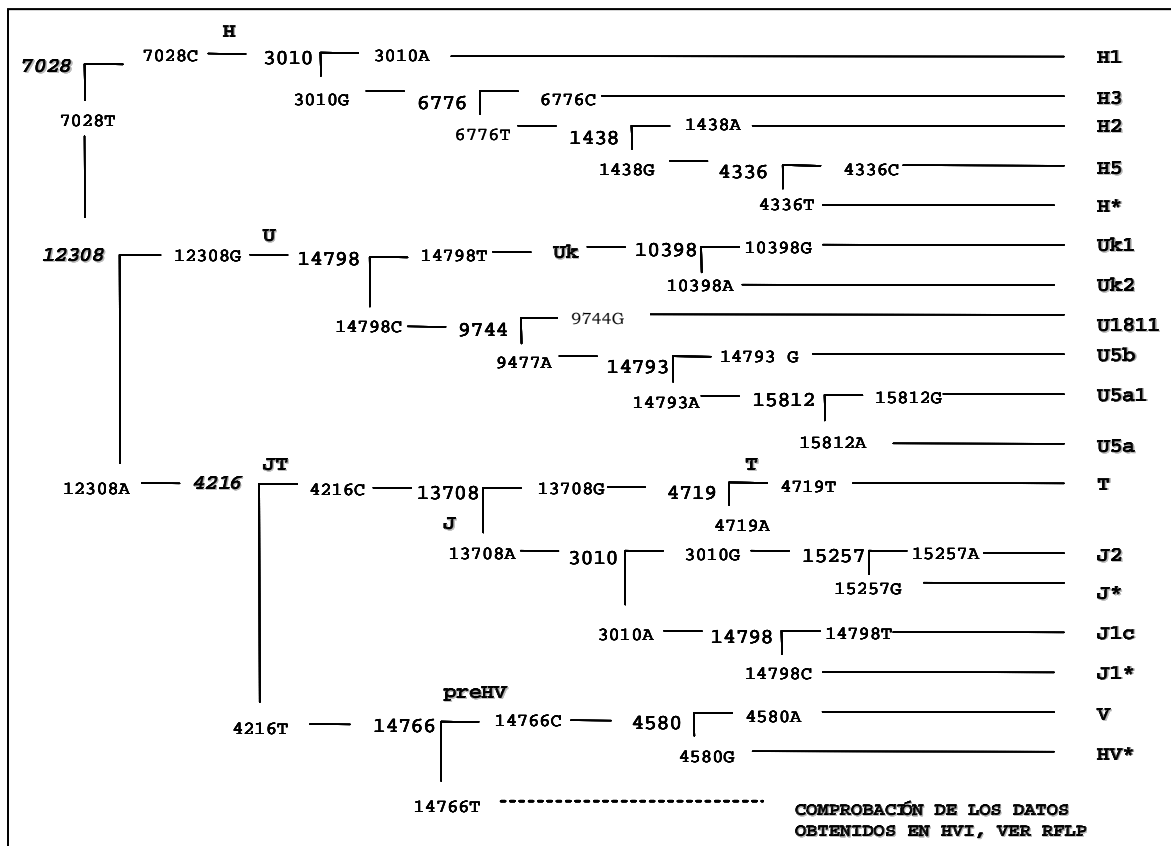


Figura VII.1: Estrategia de haplogrupaje. Los polimorfismos marcados en negrita y con cursiva determinaron a todas las muestras (7028, 12308, 4216). En negrita encontramos los clados principales del mtDNA y los subhaplogrupos clasificados mediante PCR-RFLP. Al resto de muestras, pertenecientes a subhaplogrupos minoritarios se clasificaron por secuenciación de la HVI y posteriormente se comprobó el polimorfismo que los define por PCR-RFLP (ver tabla A.3).

A.2 Secuenciación de la región hipervariable I y II del mtDNA:

Para completar el haplogrupaje de muestras, comprobar los datos obtenidos mediante RFLP y buscar posibles mutaciones en la región de control que nos pudiesen interesar *a posteriori*, realizamos la secuenciación de la región de control del mtDNA que abarca de la posición 16023 a la 577. Para tal fin, se amplificó el fragmento F8 correspondiente de secuenciación completa del mtDNA, para más datos ver apartado (VII.I.1.3.B.2.1).

La zona denominada hipervariable I o HVI, que va desde la posición 16023 a la 16568, se utilizó para completar y comprobar la clasificación genética de nuestras muestras, tal y como había sido descrito anteriormente (Macaulay, Richards et al. 1999).

B. Haplogrupado de muestras mediante PCR-RFLP:

El haplogrupado de muestras mediante PCR-RFLP se realizó según de estrategia de haplogrupaje presentada en la figura VII.1. En la tabla A.3 se exponen todos los PCR-RFLP analizados durante esta tesis doctoral.

I.1.7 Secuenciación automática de DNA

La secuenciación de los 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, se sometió a la reacción de secuenciación utilizando el *Kit "Big-Dye Terminators"* y el oligonucleótido correspondiente en cada caso. 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).

Los oligonucleótidos utilizados para realizar la secuenciación de los fragmentos están recogidos en las tablas A.4 y A.3 del anexo.

I.1.8 *Real time* PCR

El método de *real time* PCR o PCR cuantitativa permite la detección y cuantificación de una sonda fluorescente cuya señal aumenta en proporción directa a la cantidad de producto de PCR durante la reacción. El análisis se realiza mediante el empleo de un termociclador que tiene acoplado un sistema de detección que es capaz de adquirir y cuantificar la señal emitida por la sonda al final de cada ciclo para cada muestra. De forma que se puede obtener gran cantidad de información de manera rápida, específica y muy sensible, es decir, con pequeñas cantidades de muestra.

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral hemos utilizado distintas variantes de esta técnica. Hemos cuantificado genes a partir del DNA o qPCR y a partir de cDNA en la denominada RT-qPCR siguiendo siempre las indicaciones de las guías para trabajo con RT-PCR; MIQE (Mínima Información para Publicación en Experimentos de RT-PCR Cuantitativos, en inglés *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) (Bustin, Benes et al. 2009).

A. Cuantificación del número de copias de mtDNA

El estudio de determinación de niveles de mtDNA lo realizamos mediante la técnica de sondas Taqman (Marcuello, Gonzalez-Alonso et al. 2005), también denominadas sondas de hidrólisis (Bustin, Benes et al. 2009). La técnica se basa en una determinación simultánea del genoma mitocondrial y el nuclear. La sonda mitocondrial está diseñada en una zona muy conservada del mtDNA (el gen *MT-RNR1*) y la sonda nuclear que usamos para normalizar es el gen de la RNAsa P, que se encuentra en monocopia en el genoma haploide. Los resultados se expresan como la relación mitocondrial/ nuclear.

Las secuencias de los oligonucleótidos y las condiciones están expuestas en las tablas a continuación:

OLIGO	SECUENCIA	T _m
MT-L	CCACGGGAAACAGCATGTATT	58,4°C
MT-H	CTATTGACTTGGGTAAATCGTGTGA	58,2°C
Sonda MT-FAM MGB	FAM-TGC CAG CCA CCG CG	69,3°C

Tabla VII.12: Oligonucleótidos y sonda utilizados para la cuantificación del mtDNA

Para marcar el mtDNA utilizamos el fluoróforo FAM. Para cuantificar el gen de RNAP utilizamos el “*kit PDARs RNAsa P*” (Applied Biosystems). Dicho kit utiliza el fluoróforo VIC. La reacción se realiza con el “*TaqMan® Gene Expression Master Mix*” (Applied Biosystems) en un volumen final de 20 µl, añadiendo los siguientes reactivos:

	CONCENTRACIÓN STOCK	VOLUMEN REACCIÓN
MASTER MIX	2X	1X
ROX	10X	0,5 µl
OLIGO F	4,4µM	0,5 µl
OLIGO R	4,7µM	0,5 µl
RNAsaP	20X	0,5 µl
DNA	10 ng/µl	100 ng/µl

Tabla VII.13: Reactivos necesarios para la cuantificación de niveles de mtDNA mediante RT-PCR

La reacción se realizó en un aparato *StepOne™ Real-Time PCR System Thermal Cycling Block* de Applied Biosystems, utilizando placas de 48 pocillos y con las condiciones universales que se indican a continuación:

- | | | | |
|--------------------------------|-------|--------|-------------|
| 1. Calentamiento: | 50°C; | 2 min | |
| 2. Desnaturalización inicial : | 95°C; | 10 min | |
| 3. Desnaturalización: | 95°C | 15 s | } 40 ciclos |
| 4. Elongación: | 60°C | 1 min | |
| 5. Estabilización: | 50°C | 30 s | |

Los resultados se analizaron con el programa “*Sequence Detection System 1.9.1*” (Applied Biosystems). Los resultados se expresaron como ΔC_q entre la sonda mitocondrial y la nuclear. Se realizaron al menos tres determinaciones independientes para cada muestra, cada una por triplicado.

B. Cuantificación de niveles de un transcrito

Para cuantificar los niveles de mRNA de los distintos genes estudiados se utilizó un aparato *StepOne™ Real-Time PCR System Thermal Cycling Block* de **Applied-Biosystems**. La reacción se llevó a cabo utilizando como molde los cDNAs previamente sintetizados (ver apartado VII.1.3.A). La metodología empleada fue la de las sondas hidrolíticas (ver apartado anterior) sintetizadas en la casa comercial **Applied-Biosystems**.

Para cada muestra, además de los genes deseados, se realizó la amplificación de un *Housekeeping* o gen de referencia. Dicho gen de referencia ha de cumplir unas características ideales:

- Debe de expresarse en todas las muestras
- Su expresión ha de ser constante cuantitativamente entre unas y otras muestras a analizar
- Su valor de expresión no debe cambiar en función de las distintas condiciones ambientales
- Debe tener una expresión intensa

Existen diversos genes de referencia. Nosotros utilizamos el ribosómico nuclear 18S.

La cantidad de cDNA para cada reacción fue de 50 ng, y los reactivos necesarios para la amplificación se recogen en la tabla VII.14 expuesta a continuación:

	CONCENTRACIÓN STOCK	VOLUMEN REACCIÓN
MASTER MIX	2X	10 µl
AGUA RNase FREE	-----	8 µl
Gen MIX	20X	1 µl

Tabla VII.14: Reactivos necesarios para la cuantificación de niveles de un transcrito mediante RT-PCR

La reacción se realizó en un aparato *StepOne™ Real-Time PCR System Thermal Cycling Block* de la casa comercial **Applied Biosystems**, utilizando placas de 48 pocillos y con las condiciones universales que se indican a continuación:

1. Calentamiento:	50°C;	2 min	
2. Desnaturalización inicial :	95°C;	10 min	
3. Desnaturalización:	95°C	15 s	} 40 ciclos
4. Elongación:	60°C	1 min	
5. Estabilización:	50°C	30 s	

Los resultados se analizaron con el programa “*Sequence Detection System 1.9.1*” (Applied Biosystems). Los resultados se expresaron como ΔCq entre el transcrito de interés y el de referencia. Se realizaron al menos dos determinaciones independientes para cada muestra, cada una por triplicado.

Los transcritos cuantificados mediante esta técnica fueron:

- **Mitocondriales:** Los RNA ribosómicos mitocondriales; 12S (RNR1), 16S (RNR2), del complejo I las subunidades ND4-ND4L y ND6, del complejo III el citocromo b (CYB), las tres subunidades del complejo IV COI, COII y COIII y las de la ATP sintasa ATP6 y ATP8.
- **Nucleares:** El gen de referencia 18S, la fosfofructoquinasa (PFK) y la superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD) o superóxido dismutasa 2 (ver apartado VII.7.2). La polimerasa gamma B (POLGB), RNA polimerasa mitocondrial (POLRMT), el factor de transcripción mitocondrial 2 (TFB2M), la proteína unión a sitio único (mtSSB), el factor de terminación de transcripción mitocondrial (MTERF), la helicasa mitocondrial (TWINKLE).

II.2 Cultivos celulares

II.2.1 Componentes y medios

Todos los reactivos utilizados provienen de las casas comerciales **Sigma-Aldrich®** e **Invitrogen®**. Tripsina (0,05 w/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 DMEM normal (5 mM de glucosa, 1mM de piruvato) suplementado con un 5% de FBS. En algunos casos, se añadió al medio de cultivo uridina (50 µg/ml), como en el caso del medio rho⁰, o BrdU (100 µg/ml) como por ejemplo en el medio de selección de las líneas cíbridas. En este medio de selección el FBS normal fue sustituido por FBS dializado para evitar la posible fuente de uridina necesaria para la supervivencia de células carentes de mtDNA (Chomyn, Lai et al. 1994).

Además, en ensayos de crecimiento se utilizó DMEM suplementado con galactosa 5mM, piruvato 1mM y FBS al 5%. En ensayos de daño oxidativo relacionados con la dosis genómica del mtDNA el medio se suplementó con N-acetil-cisteína (NAC) a una concentración final de 5 mM.

II.2.2 Cultivo y siembra celular

Las células se sembraron en las placas de cultivo con una densidad de 300.000- 1.000.000 células por placa (en función del tamaño). Se emplearon placas de cultivo de diferentes diámetros; 40, 100, 150 mm, y frascos de distintos tamaños; 25, 75, 150 y 300 ml. La cantidad de medio aproximada fue de 0,2 ml/cm². En el desarrollo de esta tesis se utilizaron mayoritariamente placas de 100 mm de diámetro.

Los cultivos se mantuvieron en una estufa a 37°C con un 5% de CO₂ para su crecimiento. El medio de cultivo se cambió de forma periódica, cada 2-3 días, hasta llegar a confluencia, momento en el cuál se tripsinizaron.

Para la tripsinización, en primer lugar se lavaron con PBS los excesos medio de cultivo, posteriormente las placas se incubaron con tripsina (0,1% de Tripsina y 0,05% de EDTA), ambos procedentes de la casa comercial **Sigma**). Se utilizó una cantidad de tripsina de aproximadamente 0,033 ml /cm². Una vez añadida se incubaron las células durante 2-3 min a 37°C. Pasado ese tiempo, se comprobó con un microscopio invertido que las células se hubieran despegado de la placa, y se recogieron con un volumen de 3-5 veces mayor que el volumen de tripsina utilizado con DMEM o PBS suplementado con un 5% de FBS. Una vez recogidas, se centrifugaron a 1300-1500 rpm, durante 5 min a temperatura ambiente (Beckman Coulter Allegra X-22, rotor SX4250) para obtener el pellet celular, que procesamos según su fin.

II.2.3 Congelación y descongelación de líneas celulares

Para la congelación celular se utilizaron criotubos resistentes al N₂ líquido. Brevemente, una vez obtenido el pellet celular tras la tripsinización, éste se resuspendió en medio de congelación: DMEM suplementado con 20% de FBS y 10% de DMSO, un compuesto que actúa como crioprotector. Para un mejor preservado celular utilizamos un “congelador de células” denominado *Nalgene Mr. Frosty* de **Sigma**. Se trata de un contenedor de policarbonato que contiene alcohol isopropílico, que facilita el descenso gradual de la temperatura, a 1°C/min aproximadamente, promoviendo una buena conservación celular. Desde el momento de la congelación, las células se mantuvieron en el recipiente aproximadamente durante 24 horas en el congelador de -80°C. Pasado ese tiempo, se pasaron a N₂ líquido donde se conservaron hasta su posterior utilización y siembra. La cantidad de células congeladas por vial fue de 3x10⁶-5x10⁶ aproximadamente.

Para el descongelado se tomó el vial de células del tanque de N₂ líquido y se resuspendió en un tubo de centrifuga con medio de cultivo. La suspensión celular resultante se centrifugó a 1300-1500 rpm, durante 5 min, a 20°C (Beckman Coulter Allegra X-22, rotor SX4250), y el sedimento celular obtenido se sembró en una placa de cultivo adecuada.

II.2.4 Recuento celular

El recuento celular se realizó con el contador de células BECKMAN COULTER® modelo Z-2. El aparato realiza un recuento de partículas dependiente de un sensor. Para el recuento celular resuspendimos 100 μ l de la solución celular procedente de la tripisinización que llevamos a 10 ml de isotón (solución isotónica en la que se realiza la medida). Una vez obtenida la cantidad células en esos 100 μ l extrapolamos la cantidad de células total en nuestra solución inicial.



Figura VII.2: Contador de células Beckman Coulter® modelo z-2.

II.2.5 Análisis y tratamiento de contaminación por *Mycoplasma sp.*

El control de contaminación por micoplasma se llevó a cabo periódicamente, a partir del medio de cultivo que había estado en contacto con las células al menos 48h. Para ello, tras la toma de muestra, se incubó una alícuota del medio durante 48 horas a 37°C. Pasado ese tiempo, la muestra se hirvió durante 10 min a 90°C, y de ahí se cogieron 2 μ l para llevar a cabo la PCR en un volumen final de 50 μ l.

Los oligonucleótidos empleados Myc A (5'-GGCGAATGGGTGAGTAACACG) y el Myc B (5'-CGGATAACGCTTGCGACCTATG) son capaces de reconocer las ocho especies más comunes de micoplasma (*M.arginini*, *M. hyorhinitis*, *M. pneumoniae*, *M. fermentans*, *M. orale*, *Acheoplasma laidlawii*, *Spiroplasma mirum*, *M. pirum*).

Las condiciones de la reacción de amplificación son las siguientes:

1. Desnaturalización inicial:	3 min	94°C	} 35 ciclos
2. Desnaturalización:	1 min	94°C	
3. Hibridación:	1 min	60°C	
4. Extensión:	1 min 30 s	72°C	
5. Elongación:	5 min	72°C	

Se utilizó también un control positivo y un control negativo (nuestro medio de trabajo) en cada determinación que fueron sometidos al mismo procesamiento que las muestras. En la figura VII.4 se muestra un ejemplo.

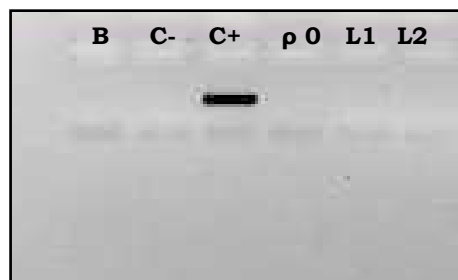


Figura VII.4: Determinación de contaminación por micoplasma. Electroforesis del ampificado. B: Blanco, C-; control negativo, C+; control positivo, L1 y L2 líneas cíbridas.

II.2.6 Generación de cíbridos transmitocondriales

A. Extracción y conservación de plaquetas

A.1 Extracción de plaquetas:

La extracción de plaquetas para la construcción de líneas cíbridas se realizó según (Chomyn, Lai et al. 1994). Brevemente, se parten de unos 15-20 ml de sangre en tubos con EDTA (tapón violeta), se pasan a un tubo de centrifuga de 15 ml, en caso de partir una cantidad de muestra mayor se pasarán a 2 falcón en lugar de a uno. Inmediatamente después, se añade sobre la sangre 1/9 de volúmenes de una solución de citrato sódico 0,1M y NaCl 0,15 M (su fin es evitar la agregación de las plaquetas), se mezcla bien por inversión, y se centrifuga a 1400 rpm durante 20 min a 12°C (Sorvall, rotor SS34). El resultado de la

centrifugación son tres capas bien diferenciadas, el plasma, de color amarillento, donde encontraremos nuestras plaquetas, una interfase de leucocitos, de color blanquecino, y en el fondo los eritrocitos (de color rojizo).

Para la extracción de las plaquetas se recogen $\frac{3}{4}$ partes del plasma, dejando aproximadamente unos 3 mm hasta la capa de células roja. A continuación, se centrifuga el plasma a 4500 rpm durante 20 min a 15°C (Sorvall, rotor SS34) para obtener el pellet de plaquetas. Una vez obtenido el sedimento celular que incluye las plaquetas, se realiza un lavado del pellet con suero salino, y una nueva centrifugación (4500 rpm, durante 20 min, a 15°C, Sorvall, rotor SS34). Así, el pellet obtenido será el utilizado bien para la fusión en fresco inmediatamente después, bien para su congelación.

A.2 Congelación y descongelación de plaquetas:

Para la congelación de las plaquetas se utiliza el *Cell Freezing Mr. Frosty* de igual modo que en las células en cultivo. El medio de congelación consta de PBS suplementado con FBS al 20% y DMSO al 10%. Así, una vez obtenido el pellet de plaquetas, se resuspenden en el medio de congelación, y se procede de igual modo que en el caso de las células en cultivo.

B. Fusión de plaquetas con líneas rho^o

Las líneas híbridas utilizadas en esta tesis doctoral han sido generadas indistintamente a partir de plaquetas frescas y congeladas según el protocolo de Chomyn (Chomyn, Lai et al. 1994).

Para la ejecución de la fusión, se obtuvo el pellet de plaquetas, y paralelamente, se tripsinizaron las células rho^o, se contaron, y se resuspendieron a una concentración de $0,5 \times 10^6$ /ml en medio DMEM 10% FBS.

Inmediatamente después, 2 ml de la solución celular (aproximadamente 1×10^6 /ml células) se añadieron suavemente sobre el pellet de plaquetas, evitando por todos los medios cualquier alteración de éste. Posteriormente, la solución

resultante se centrifugó a 1400 rpm durante 10 min a 20°C sin freno (Beckman Coulter Allegra X-22, rotor SX4250). Sobre el precipitado celular obtenido, se añadieron 0,1 ml de PEG al 42% para favorecer la fusión de sus membranas. El PEG es un detergente altamente tóxico, así se intentó resuspender la mezcla celular en el menor tiempo posible. Una vez rotos los agregados celulares, se contó 1 min, sin tocar la solución celular (para conseguir que entren en contacto las membranas celulares). Pasado ese tiempo, pipeteamos la mezcla vigorosamente durante 30s más para una mayor homogeneización, e inmediatamente después se diluyó hasta un volumen final de 10 ml de DMEM suplementado con 10% FBS para evitar el efecto tóxico del PEG y se centrifugo a 1300-1500 rpm (Beckman Coulter Allegra X-22, rotor SX4250) durante 5 min. El pellet celular obtenido se sembró en medio rho⁰ suplementado con 100 µg/ml de 5-BrdU.

Una vez sembradas se dejaron crecer hasta confluencia, se doblaron y de nuevo se dejaron crecer hasta un 90% de confluencia. Llegados a este punto, las células de una placa se congelaron, y las de la otra se les cambio el medio a medio selectivo (ver apartado VII.II.2.1).

El tiempo de selección de las líneas híbridas mitocondriales es de 21 días, aproximadamente, que cuentan desde el momento en que se añade el medio selectivo. Durante ese tiempo, el medio se va cambiando periódicamente, en función de las necesidades celulares, para evitar diluir los factores de crecimiento. Además, por regla general, a partir del día 15 se comienzan a observar clones de células apoltonados. En estos casos, se realizó una resiembra celular para mejorar el crecimiento. Una vez resembrados los posibles clones se extrajo DNA de una pequeña cantidad de células para la detección de la mutación de interés. En caso de confirmación de la mutación y/o polimorfismo, se crecieron de forma continúa hasta llegar a niveles de mtDNA basales.

II.2.7 Cariotipado de líneas celulares

Para el análisis citogenético de las líneas celulares partimos de células en crecimiento exponencial, a un 80% de confluencia aproximadamente. Brevemente, una vez obtenido el estado de crecimiento exponencial, se eliminó el medio de cultivo de la placa, y sobre éste se añadió medio con colchicina (0.5

µg/ml) que se incubó durante 4 h a 37°C. Pasado ese tiempo, retiramos el medio de cultivo y lo echamos a un tubo de centrifuga de 15 ml correctamente numerado, tripsinizamos las células, y las recogimos con el medio que previamente habíamos almacenado. Centrifugamos y, una vez obtenido el pellet resuspendimos en 2 ml medio hipotónico evitando la formación de burbujas. Una vez resuspendido, añadimos otros 3 ml y resuspendimos de nuevo y lo incubamos durante 30 min a 37°C. Inmediatamente después, le añadimos 3 gotas de fijador Carnoy (3 metanol: 1 ácido acético), resuspendimos bien para homogeneizar y centrifugamos para obtener el pellet a 1500-2000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente (Beckman Coulter Allegra X-22, rotor SX4250). Se eliminó de nuevo el sobrenadante, y se resuspendió el pellet con 2 ml de fijador Carnoy, le añadimos otros 3 ml, se homogeneizó bien y se dejó a temperatura ambiente durante 20 min. Pasado ese tiempo, centrifugamos de nuevo a 1500-2000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente (Beckman Coulter Allegra X-22, rotor SX4250), se repitió de nuevo el lavado con 5 ml de fijador Carnoy. Por último, sobre el sedimento celular se añadieron 0,5 ml de fijador, teniendo así la muestra preparada para su contaje.

Para el recuento añadimos unas gotas de la suspensión celular en un portaobjetos correctamente identificado y valoramos en un microscopio de campo claro el rendimiento de las metafases, 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

Nuestras muestras siempre tuvieron buen rendimiento, es decir entre 5 y 10 metafases en cada 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 fabrica (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.

II.2.8 Estudios de viabilidad celular

Para la determinación de la viabilidad celular utilizamos dos técnicas; la citometría de flujo utilizando la sonda fluorescente ioduro de propidio (IP)(Riccardi and Nicoletti 2006) y la espectroscopia de absorción empleando el colorante Neutral Red (Repetto, 2008).

A. Determinación de viabilidad celular con IP

El ioduro de propidio no tiene capacidad de pasar las membranas celulares cuando éstas están intactas, sin embargo, cuando las células están muertas la membrana se rompe y la sonda se une al DNA produciendo una señal lumínica detectable en el canal FL4 del citómetro (esta sonda da señal también en los demás canales). Así, una forma de cuantificar la cantidad de células muertas será el porcentaje de células teñidas (Nicoletti, Migliorati et al. 1991).

Para la determinación partimos del pellet celular recién tripsinizado, lo resuspendimos a una cantidad aproximada de $0,5-1 \cdot 10^6$ células en 500 μ l, se le añadió IP a una concentración final de 2,5 μ g/ml y se incubaron durante 10 min a 37°C protegida de la luz. Pasado ese tiempo, se midió el porcentaje de células teñidas tal y como se muestra en la figura VII.4. Los datos se expresan como % de células vivas, es decir, como porcentaje de células en el cuadrante D3 de la figura VII.4. En la figura VII.5 se adjunta un estudio de la linealidad de la técnica

Las condiciones de medida utilizadas son las siguientes:

FS: 50

SS: 59

FL1: 342

FL4: 304

Número de eventos: 20.000

Compensación:

FL1-FL4: 0

FL4-FL1: 45,1

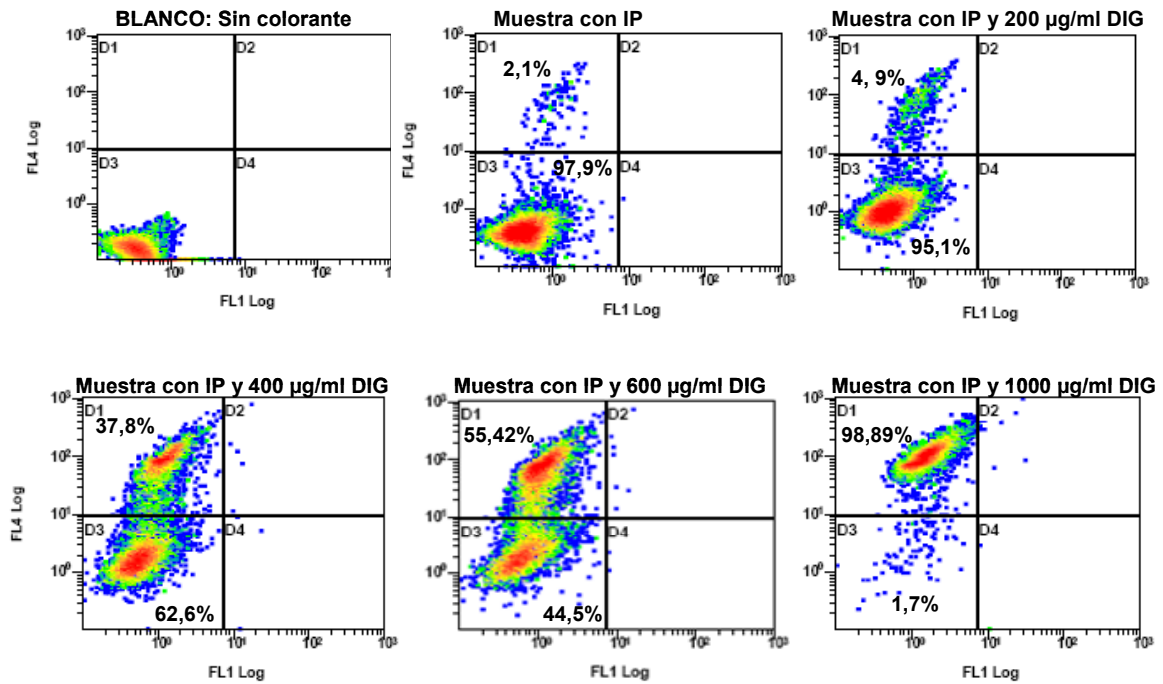


Figura VII.4: Estudio de viabilidad mediante citometría de flujo. El porcentaje situado en el cuadrante D3 representa las células vivas, no teñidas con IP, y el cuadrante D1 las células muertas, teñidas con el colorante. Representación de capacidad de detección de la sonda de muerte celular en células tratadas con digitonina.

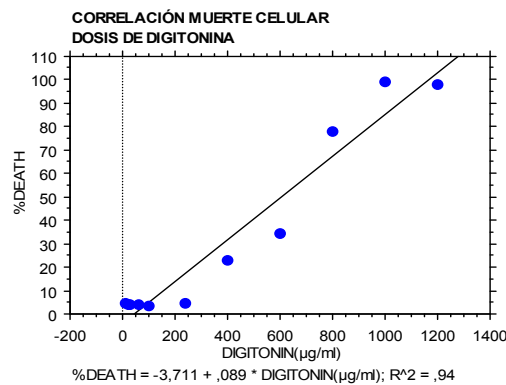


Figura VII.5: Estudio de viabilidad mediante citometría de flujo. Determinación de la linealidad de la técnica. Correlación entre muerte celular y dosis de digitonina.

B. Determinación de viabilidad celular por espectroscopía

La determinación de viabilidad celular se llevó a cabo utilizando el colorante Neutral Red (NR) o Rojo Neutro de la casa comercial **Sigma**. Un colorante ampliamente utilizado en estudios de citotoxicidad (Repetto, del Peso et al. 2008).

El fundamento de la técnica se basa en la naturaleza de ácido débil del NR que pasa a través de las membranas celulares por difusión pasiva concentrándose en los lisosomas, donde se une a los grupos aniónicos y fosfato de la matriz lisosomal, dando lugar a una reacción colorimétrica cuantificable a 540nm.

Brevemente, las células se sembraron a una densidad de 2500-25000 células/200 µl en placas de 96 pocillos, la cantidad depende de la finalidad del experimento. Así:

- Estudio de la concentración inhibitoria del 50% de crecimiento celular (CI₅₀) para lo cual se sembraron 2500 células para dejar crecer las células 48h (ver apartado II.9).
- Estudio de viabilidad celular: Para lo cuál sembramos 20000-25000 células 10-14 horas antes de medir y procedimos a la medida.

El día de la medida, se retiró el medio de cultivo de las placas, se añadió sobre las mismas medio de cultivo normal suplementado con NR (1:10), y se incubaron las células con el reactivo durante 2 h a 37°C y 5% de CO₂. Pasado ese tiempo, se llevaron a cabo dos lavados con PBS, y posteriormente se le añadió una solución de etanol: acético (1:50) (200 µl/pocillo) para liberar el contenido de neutral red del interior celular. A continuación, se agitó la placa durante 10 min a temperatura ambiente, y se procedió a la lectura. Para la determinación se midió la densidad óptica a 540 nm, teniendo en cuenta que el valor de absorbancia obtenido es proporcional a la cantidad de células vivas.

II.3 Preparación de extractos celulares totales

II.3.1 Para ensayos espectrofotométricos

Para realizar ensayos enzimáticos se prepararon homogenados celulares totales a partir de placas en cultivo en crecimiento exponencial. Así, una vez que las células alcanzaron el 80% de confluencia, se recogieron por tripsinización y centrifugación [1400 rpm durante 5 min a temperatura ambiente (Beckman Coulter Allegra X-22, rotor SX4250)]. El pellet obtenido se lavó con PBS frío y se volvió a centrifugar. Inmediatamente después, se decantó el sobrenadante, y el precipitado celular se resuspendió a 40.000 células/ μ l en tampón fosfato KP 20 mM pH 7,0. Posteriormente, se realizaron 5 ciclos de congelado-descongelado (entre ciclo y ciclo se homogeneizó la muestra) con el fin de romper las membranas celulares.

Las muestras se almacenaron, debidamente etiquetadas, a -80 °C hasta su utilización. Es importante señalar que se utilizó la misma muestra para el estudio de la actividad del complejo IV, citrato sintasa y proteínas totales.

II.3.2 Para actividad aconitasa

Se realizó un homogenado celular en fresco. Se necesitan unos 10×10^6 células para la realización de un triplicado. Para ello se tripsinizaron las células, se contaron y se lavaron con PBS frío. A continuación, cada 3×10^6 de células se resuspendieron en 100 μ l de Triton X-100 al 20% para desorganizar las membranas. Una vez resuspendidas se incubaron en hielo durante 5 min. Inmediatamente después, se homogeneizaron bien y se procedió a la medida, ya que esta enzima es muy inestable y pierde actividad con el tiempo (Gardner, Nguyen et al. 1994).

II.3.3. Geles desnaturalizantes

Normalmente, para la realización de geles desnaturalizantes partimos de células a un 80% de confluencia en una placa de 100mm, es decir,

aproximadamente unos $2,5-3,5 \times 10^6$ de células. Una vez obtenido el pellet celular tras la tripsinización, éstas lavaron las células con PBS frío 2 veces, y el precipitado celular resultante se congeló a -80°C , o bien se procesó como a continuación.

En función del pellet de partida, se añaden entre 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) (después de haberlo autoclavado) conteniendo inhibidores de proteasas. En nuestro caso, generalmente añadimos unos 100 μL . El homogenado obtenido se pasó a un *eppendorf*, y se incubó durante 15 min a 4°C en una rueda giratoria, para que el detergente rompa bien las membranas celulares. A continuación, se centrifugó a 13000 rpm a 4°C durante 15 min (Eppendorf, modelo 5415R), para eliminar los restos de membranas celulares. El sobrenadante resultante se alicuotó en *eppendorfs* debidamente etiquetado y se congeló a -80°C hasta su uso (máximo 2- 3 meses).

II.4 Estudio de la funcionalidad del sistema de fosforilación oxidativa

II.4.1 Estudio de la velocidad de crecimiento celular

Para determinar la velocidad de crecimiento celular se realizó un estudio comparativo del crecimiento de las líneas celulares. Para ello se realiza un crecimiento simultáneo de las líneas celulares en dos medios (ver sección II.2.1) uno rico en glucosa en el que las células crecerán utilizando la vía glicolítica, y otro rico en galactosa en el que el crecimiento será dependiente de la cadena respiratoria (Robinson, Petrova-Benedict et al. 1992).

Se sembraron 20.000 células por pocillo (placas de 6 pocillos), por triplicado, en ambos medios, por línea celular y por día. Las células se contaron cada 24 horas durante cinco días consecutivos, realizando un cambio de medio el día 3.

Para el cálculo del tiempo de duplicación (DT) o tiempo de doblaje se representó en una gráfica el número de células frente al tiempo transcurrido y se ajustó a una curva exponencial del tipo;

$$N=a \cdot e^{bt} \quad (1)$$

Cuando $t_0=0$, $N_0=a$. Si DT es el tiempo en el que se duplica, entonces

$$N= 2 N_0=2^a$$

Y sustituyendo a en la ecuación (1)

$$2^a=a \cdot e^{bt}$$

Así,

$$DT=\ln 2 / b$$

Este experimento se realizó por triplicado en cinco semanas diferentes. Sólo se consideraron aquellas curvas cuya $r^2 \geq 0,9$.

II.4.2 Estudios de competición celular

Los experimentos de competición celular (Gomez-Duran, Pacheu-Grau et al. 2010) se llevaron a cabo tras el crecimiento de cada una de las líneas celulares combinadas entre sí, una a una, en dos condiciones: con medio de glucosa y con medio de galactosa (ver VII.II.2.1). Posteriormente, se calculó el porcentaje del genotipo dominante en cada una de las mezclas por RT-PCR.

Así, partimos de una cantidad proporcional de células de cada extirpe, las mezclamos homogéneamente, y sembramos 50.000 células de la mezcla resultante en placas de 150 mm, en medio de glucosa y de galactosa. La mezcla se creció durante 10 días (aproximadamente, antes de que lleguen a confluencia), con cambios de medio cada 48h. Pasado ese tiempo, se recogieron las mezclas celulares mediante tripsinización y centrifugación, y realizaron dos lavados con

PBS frío. El pellet celular resultante se congeló a -80°C , para evitar variaciones con respecto a la mezcla inicial.

Para la estimación del genotipo predominante, se extrajo el DNA de todos los pellets celulares y se determinó la cantidad de cada genotipo por RT-PCR cuantitativa. Las condiciones de la RT-PCR son:

	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN REACCIÓN
GENE EXPRESION MASTER MIX	1X	12,5 μl
SONDAS	0,2 μM	0,5 μl
OLIGO F	0,9 μM	0,5 μl
OLIGO R	0,9 μM	0,5 μl
DNA	10 ng / μl	2 μl

Tabla VII.8: Reactivos necesarios para la cuantificación de un genotipo mediante RT-PCR.

- | | | | |
|-------------------------------|-------|--------|-------------|
| 1. Calentamiento: | 60°C; | 30 s | } 40 ciclos |
| 2. Desnaturalización inicial: | 95°C; | 10 min | |
| 3. Desnaturalización: | 95°C | 15 s | |
| 4. Annealing: | 60°C | 1 min | |

Se cuantificaron los datos de las tres condiciones:

- Cantidad de la mezcla inicial: La que sembramos.
- Cantidad de la mezcla en glucosa
- Cantidad de la mezcla en galactosa

Una vez cuantificada la cantidad del genotipo de elección, en cada una de las condiciones descritas, se obtuvieron los datos con referencia a cada mezcla celular inicial. Los datos se expresaron como ΔCt s de la mezcla en glucosa y en galactosa con respecto a la cantidad inicial de cada una. Así, cada mezcla corrigió con su muestra inicial, eliminando los posibles errores de mezcla. Posteriormente, comparamos el $\Delta\text{Ct}_{\text{GLU}}$ frente al $\Delta\text{Ct}_{\text{GAL}}$.

IV.4.3 Estudio de las actividades enzimáticas de los complejos

A. Actividad del la succinato deshidrogenasa (CII)

La actividad enzimática del complejo II o succinato deshidrogenasa (King 1966) se midió como el incremento de la absorbancia a 600 nm que se produce debido a la reducción del aceptor artificial utilizado, el diclorofenol- indofenol (DCPIP) ($\epsilon = 19,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La determinación se realizó a 30°C, durante 2 min.

Las medidas de cada muestra se realizaron por triplicado, como mínimo, y en 3 días distintos para una misma línea celular. Los valores se expresaron como actividad específica referida a la cantidad de proteínas presentes en la muestra, y también referidas a la actividad específica de la citrato sintasa (marcador mitocondrial, ver apartado II.5.1).

En la tabla VII.9 están los reactivos utilizados y la concentración de cada uno de ellos.

REACTIVOS	CANTIDAD PARA CUBETA (μl)	CANTIDAD LECTOR DE PLACAS
Tampón KP 100 mM pH 7,0	500	100
Agua destilada	c.s.p (1 ml)	c.s.p (200 μl)
Muestra	20	5
Succinato 320 mM	100	20
DCPIP 0,03%	100	20
KCN 30mM	50	10

Tabla VII.9: Reactivos necesarios para la medida de actividad de la succinato deshidrogenada

La actividad del complejo II (UI/l) se define como: $((\text{rate}/\text{min})/19,2) * (\text{Vol}_{\text{tot}}/\text{Vol}_{\text{muestra}}) * 1000$

B. Actividad de la citocromo c oxidasa (CIV)

La actividad del complejo IV (Tzagoloff, MacLennan et al. 1967) se midió como la disminución de la absorbancia a 550 nm debido a la oxidación del citocromo c reducido ($\epsilon = 18,7 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) a 38°C, durante 2 min.

Las medidas de cada muestra se realizaron por triplicado, como mínimo, y en 3 días distintos para una misma línea celular. Los valores se expresaron bien en actividad específica referida a la cantidad de proteínas presentes en la muestra, bien referidas a la actividad específica de la citrato sintasa (marcador mitocondrial, ver apartado II.5.1).

En la tabla VII.10 están los reactivos utilizados y la concentración de los mismos:

REACTIVOS	CANTIDAD PARA CUBETA (µl)
Tampón KP 100 mM pH 7,0	100
Agua destilada	c.s.p (1 ml)
Muestra	20
Citocromo c reducido 1%	100

Tabla VII.10: Reactivos necesarios para la medida de actividad de la citocromo c oxidasa.

El citocromo c reducido al 1% se preparó en fresco. Para unos 1-1,5 ml se pesaron de 10-15 mg de citocromo y se resuspendieron en 0,75-1 ml de tampón KP 10 mM pH 7,0, en función de la cantidad pesada. Para reducir el citocromo se añadió una punta de espátula de Boro-Hidruro de Sodio (NaBH₄). La mezcla se agitó y se mantuvo en hielo 30 min, durante ese tiempo se observa el cambio de color granate del citocromo oxidado al rosa del citocromo c reducido. A continuación, se ajustó el pH de la disolución a 7-7,3 con HCl 1N, y se completó el volumen requerido para llegar a 1-1,5 ml (según la cantidad pesada) con agua destilada. La disolución se mantuvo en hielo en todo momento.

La actividad del complejo IV (UI/l) se define como: $((\text{rate}/\text{min})/18.7) * (\text{Vol}_{\text{tot}}/\text{Vol}_{\text{muestra}}) * 1000$
--

C. Actividad y cantidad del complejo IV

La cantidad y la actividad del complejo IV se midieron secuencialmente sobre la misma muestra utilizando un kit comercial llamado “Complex IV Duplexing (Activity + Quantity) Microplate Assay Kit” de la casa comercial **Mitosciences**. Para su utilización se siguieron las directrices de la casa comercial.

La determinación de la actividad y cantidad se realizó por triplicado en cada placa en al menos tres experimentos diferentes. Los datos se expresaron como mOD/min/mg de proteína en ambos casos.

II.4.5 Electrodo de oxígeno

El consumo de oxígeno se midió en un sistema de alta resolución (Gnaiger, Steinlechner-Maran et al. 1995) llamado Oroboros® , cuyo principio está basado en el principio básico de la respirometría. Si en una cámara cerrada se introduce una muestra que consume el oxígeno, la concentración del mismo disminuye con el tiempo. Si representamos la concentración frente al tiempo, tendremos la velocidad de consumo del mismo (Chance and Williams 1955), tal como podemos ver en la figura VII.6.A.

Si queremos analizar la funcionalidad de la cadena que consume el oxígeno bastan con añadir distintas sustancias figura VII.6.A-B.

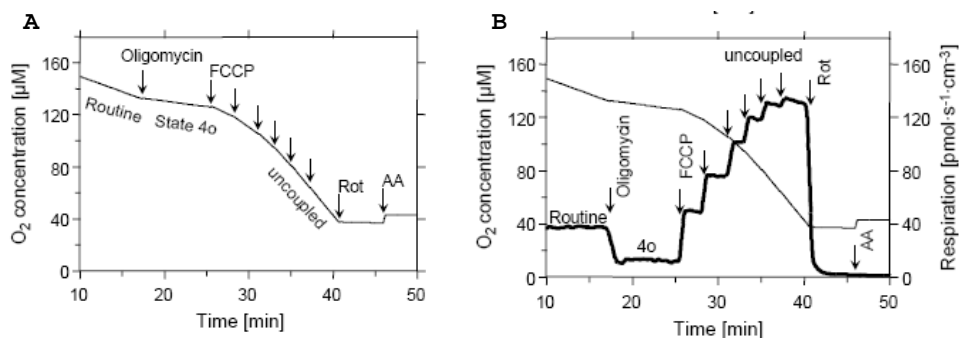


Figura VII.6: Respirometría. A. Disminución de la concentración de oxígeno con el tiempo. B. Estudio de la funcionalidad de la cadena respiratoria.

A diferencia de la respirometría tradicional, la respirometría de alta resolución utiliza electrodos muy sensibles diseñados para minimizar la difusión de oxígeno. Además, está acoplada a un software avanzado que nos da la información simultánea de la velocidad de consumo de oxígeno y de la estabilidad de la señal. Este sistema ha sido creado para poder controlar la concentración de oxígeno utilizando materiales que no consumen oxígeno (Ej: PEEK). Además, todas las posibles fugas de consumo como la solubilidad del oxígeno en el medio, la variación de la cámara, etc, se eliminan realizando

diferentes backgrounds (el químico, el del medio, el del cero...etc) (Hutter, Unterluggauer et al. 2006).

Otra de las ventajas que tiene es la necesidad de una menor cantidad de muestra (medio millón de células como mínimo). Además, el volumen de trabajo es variable 0,5 ml-8 ml y la temperatura está controlada utilizando un sistema Peltier®. En nuestro caso hemos elegido 2ml para evitar errores y las medidas se llevaron a cabo 37°C.

A. Consumo de oxígeno en células intactas

La determinación de consumo de oxígeno en células intactas se realizó a partir de células en crecimiento exponencial. Se tripsinizaron, se centrifugaron y contaron. Para la medida insertamos en la cámara 3×10^6 de células en DMEM normal sin FBS, para evitar posibles burbujas. Una vez insertadas las células, a la cámara se cierra y se espera a que el flujo sea estable (línea roja, ver figura VII.7). En ese momento determinamos la denominada **respiración endógena o de rutina** (Figura VII.7.A).

A continuación, se midió la **respiración filtrante o leak**, es decir, aquella que no está acoplada a la síntesis de ATP. Para ello añadimos 49 nM de oligomicina, un inhibidor la ATP sintasa. La cuantificación se realizó cuando la señal era estable (Figura VII.7.B)

Una vez cuantificada la respiración filtrante, el siguiente paso fue medir la capacidad máxima del sistema de transporte electrónico o **respiración desacoplada**. Para su determinación se adicionó sobre la cámara 1,2 mM de FCCP, un desacoplante inespecífico (Figura VII.7.C). Por último, determinamos la **respiración no dependiente de cadena respiratoria**, para ello se inhibe el complejo IV con cianuro (KCN).

La determinación de consumo de oxígeno se realizó, al menos, en tres ocasiones diferentes. La determinación se llevó a cabo alternando la cámara de medida para evitar posibles variaciones en la misma. Además, se puso especial interés en combinar las líneas celulares de estudio y entre cámaras, para evitar posibles errores debidos a la variación.

El software utilizado para la adquisición (1s por intervalo de tiempo) y análisis de datos fué el DatLab (Oroboros Instrument, Innsbruck, Austria) (Gnaiger, Steinlechner-Maran et al. 1995). Todos los inhibidores y drogas utilizadas fueron procedentes de la marca **Sigma** y todas las soluciones se realizaron en etanol.

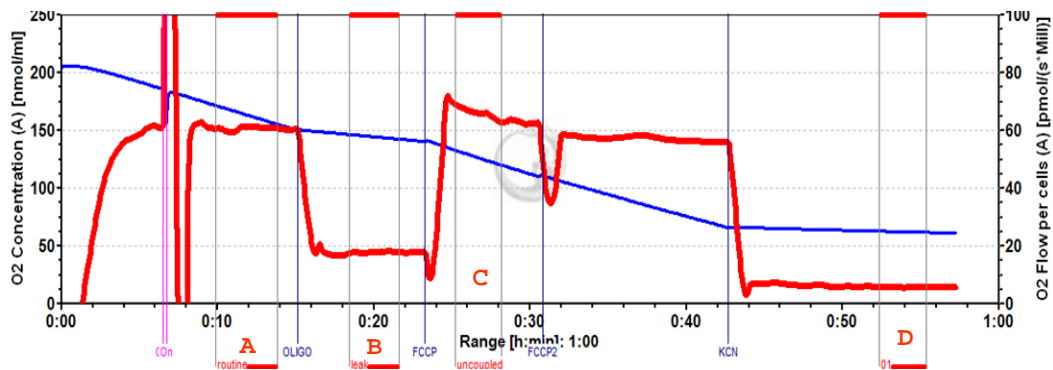


Figura VII.7: Consumo de oxígeno en células intactas. A. Respiración endógena o de rutina, B. Consumo filtrante o leak, C. Respiración desacoplada y D. Respiración resistente a cianuro o consumo independiente de la cadena de transporte electrónico.

B. Titulación de fármacos con consumo de oxígeno utilizando la bomba TIP-2K

La bomba TIP-2k es un accesorio del Oroboros® de gran utilidad para la titulación de drogas, y ha sido de gran provecho en el desarrollo de esta tesis doctoral. Su uso nos permite añadir pequeñas cantidades de droga (0,025-250 μ l) con una velocidad variable entre 0.01- 25 μ l.s⁻¹, en ambas cámaras simultáneamente, evitando así, el posible error manual en la adición de pequeñas cantidades de sustancias.

Un ejemplo de titulación se encuentra en la figura VII.8 donde mostramos la titulación de la concentración óptima de FCCP necesaria para conseguir la respiración desacoplada máxima, y evitar un efecto contrario.

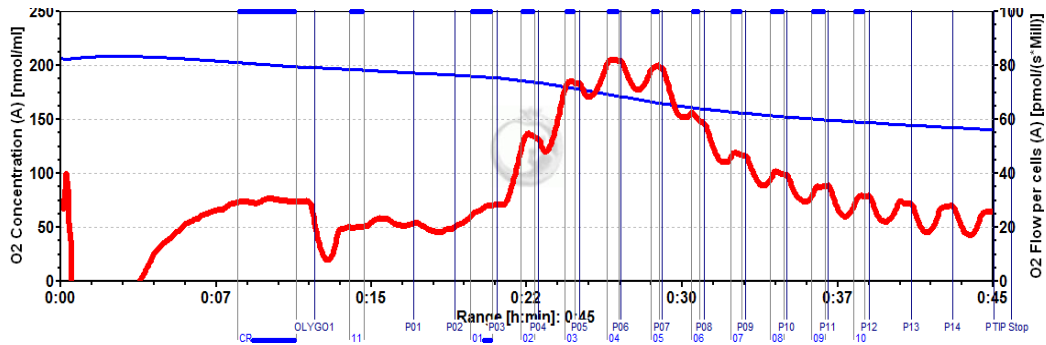


Figura VII.8: Titulación del FCCP utilizando la Bomba Tip-2K. Inyección de 2,5 μ l de FCCP 1mM cada 5 min

II.4.6 Medida del ATP total

Los niveles de ATP total se midieron siguiendo el método de luciferina/luciferasa según McKencie *et al.* (McKenzie, Liolitsa et al. 2007) con pequeñas modificaciones. Se empleó el kit de determinación *CellTiter-Glo® Luminiscent Cell Viability Assay* de la casa comercial **Promega**, según el protocolo del fabricante.

Brevemente, las células se sembraron entre 10-14 horas antes de la medida a una densidad de 20.000-25.000 células/200 μ l en DMEM normal suplementado con FBS. Para la siembra se utilizaron placas especiales de luminiscencia y cultivo simultáneamente de la casa comercial **Nunc**. Paralelamente se sembró una placa de cultivo normal de 96 pocillos para la determinación de la cantidad de proteínas.

El día siguiente, se realizaron dos veces con PBS y se le añadió el tampón de medida (200 μ l/pocillo) (ver composición en tabla VII.11 con las condiciones adecuadas al origen del ATP que queremos analizar (tabla VII.12)) y se incubó durante 2 o 6 horas a 37°C y 5% de CO₂. Se realizó la incubación de 6 horas para estudio de la cantidad de ATP entre filogenias mitocondriales, y durante 2 horas para el análisis de la acción de cada una las drogas objeto de estudio sobre la cantidad de ATP.

SUSTANCIA	CONCENTRACIÓN (mM)	CANTIDAD (g) 500 ml
NaCl	156	4,56
KCl	3	0,112
MgSO4	2	0,246
KH2PO4	1,25	0,085
CaCl2	2	0,147
HEPES	20	2,38

Tabla VII.11: Composición del tampon de medida y cantidades para preparar 0,5 L.

SUSTANCIA	CONCENTRACIÓN	MADRE
GLUCOSA	5 mM	9 mg/ml
D-DEOXI-GLUCOSA	5 mM	8,2 mg/ml
PIRUVATO	1 mM	11 mg/ml
OLIGOMICINA	2,5 µg/ml	41,25 µM

Tabla VII.12: Composición de los suplementos al tampón según condiciones de medida.

En todos los casos, pasado el tiempo de incubación se retiraron 90µL de tampón de medida de cada pocillo con la ayuda de una pipeta multicanal. Inmediatamente después, se añadió 1 volúmen de la solución con la luciferina/luciferasa en cada pocillo, preparado según las instrucciones del fabricante. A continuación, se agitó la placa durante un minuto, y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Seguidamente, realizamos la medida en luminiscencia por cinética lenta en cada pocillo.

Los valores se expresaron como cantidad de ATP/mg de proteína. Para la cuantificación de las proteínas, pasado el tiempo de incubación, se realizaron dos lavados con PBS, y cada pocillo se resuspendió en unos 10-30 µl de una solución con detergentes (solución 1, complejo IV, kit). A continuación, se incubaron durante 30 min a 4°C y se procedió a la cuantificación proteica por el método de Bradford.

Todas las medidas se realizaron por cuadruplicado, en al menos, tres experimentos independientes, utilizando un lector de placas NovoStar MBG de la casa comercial **Labtech**. Todos los compuestos utilizados son procedentes de **Sigma**.

II.4.7 Medida del potencial de membrana

La energía que se libera durante las reacciones de oxidación de la cadena de transporte electrónico genera un potencial eléctrico transmembrana que tiene carga negativa en el interior de la membrana con un valor aproximado de unos 180- 200 mV, y un gradiente protónico de una unidad aproximadamente. Esta energía es la que conduce la síntesis de ATP, que proporciona la energía necesaria para la realización de los procesos celulares. De esta forma, los cationes lipofílicos permeables a las membranas se acumulan en el interior de las células, las organelas y los liposomas, pues estos presentan un potencial negativo en su interior. Así cationes lipofílicos como el 3-3'-diexylocarbocinana iodido [DiOC₆(3)] se acumulan en el interior de dichos orgánulos en función de su carga, exhibiendo su actividad fluorescente, que puede ser cuantificada por citometría de flujo, fluorimetría...etc.

Para la medida del potencial de membrana durante el desarrollo de esta tesis doctoral se utilizaron dos sondas diferentes. Una para la medida mediante citometría de flujo el DiOC₆(3), y una para la medida por fluorimetría en placa de 96 pocillos Mito-ID® Membrana Potencial de **Enzo**.

A. Medida del potencial de membrana con DioC6(3)

El DiOC₆(3) es un catión lipofílico que se acumula en el interior de los orgánulos en función de su carga, exhibiendo su actividad fluorescente, que puede ser cuantificada por citometría de flujo, fluorimetría...etc y traduce en potencial de membrana interna mitocondrial (Troiano, Ferraresi et al. 2007; von Kleist-Retzow, Hornig-Do et al. 2007).

Para la medida partimos de células en crecimiento exponencial a un 80% de confluencia aproximadamente, es decir, unos 2,5-3,5x10⁶ de células. Se recogió el pellet por tripsinización y centrifugación a 1400 rpm durante 5 min a 20°C (Beckman Coulter Allegra X-22, rotor SX4250), y se resuspendió en 4-5 ml (para cuatro o cinco medidas) de DiOC₆(3) a 20 nM en Hank's Buffered Salt Solution (HBSS). Posteriormente, la resuspensión celular se incubó a 37°C durante 15 min protegido de la luz (en una estufa). Pasado ese tiempo, se realizó la medida en el canal FL1 del citómetro en las siguientes condiciones:

FS: 59
SS: 70
FL1: 416
FL2: 255
Número de eventos: 40.000

Los datos se expresan como intensidad de fluorescencia (IF). Como control positivo incubamos las células con un desacoplante (DNP, FCCP...etc) a altas dosis. Para ello, se incubaron las células con FCCP durante los 30 min previos a la tinción con la sonda, a continuación se procede con el protocolo anterior. En la figura VII.9 se muestra la determinación del potencial de membrana, así como la linealidad del mismo tras el tratamiento con dosis crecientes de DNP.

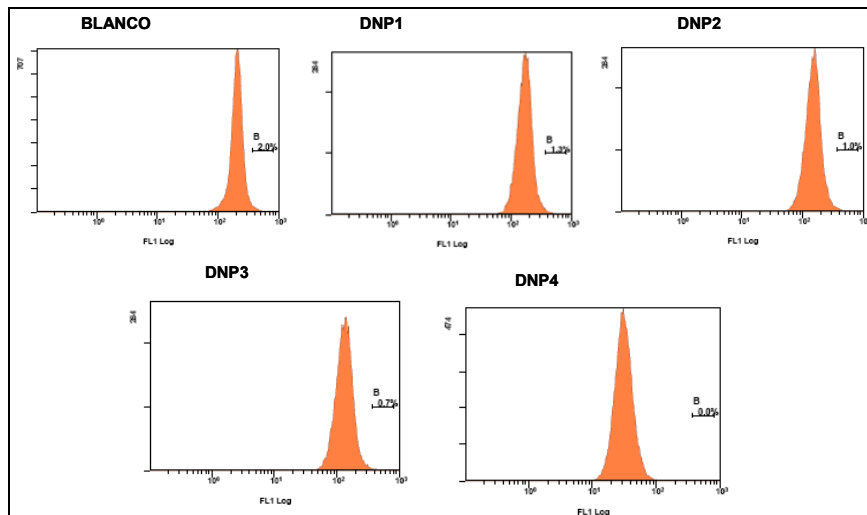


Figura VII.9: Linealidad en la detección de DNP por la DiOC6(3), como intensidad de fluorescencia en FL1.

B. Medida del potencial de membrana en placa con Mito-ID®

La medida del potencial de membrana por fluorimetría se realizó empleando el kit *Mito-ID® Membrane Potencial* de la casa comercial **Enzo**, según instrucciones del fabricante.

Abreviando, se sembraron 20.000-25.000 células/200 µl en DMEM normal suplementado con 5% de FBS en placas especiales para fluorescencia y cultivo simultáneamente, procedentes de la casa comercial **Nunc**.

Paralelamente se sembró una placa de cultivo normal de 96 pocillos para la determinación de la cantidad de proteínas. La siembra se realizó, en ambos casos, entre 10-14 horas antes de la medida. Pasado ese tiempo, se llevaron a cabo dos lavados con PBS, se le añadió el tampón de medida (200 μ l/pocillo) [ver composición en tabla VII.11 con glucosa y piruvato (tabla VII.12)] y se incubaron durante 2 horas a 37°C y 5% de CO₂.

Inmediatamente después del tiempo de incubación, se retiraron 90 μ L de tampón de medida de cada pocillo con la ayuda de una pipeta multicanal, y sobre el volumen restante, es decir, unos 100 μ L, se añadió 1 volumen de la solución de medida del MIMP. La mezcla resultante se incubó de nuevo durante 1 hora a 37°C y 5% de CO₂, y seguidamente se procedió a la medida de fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 510 nm y una de emisión de 580 nm.

Los datos se expresaron en unidades de fluorescencia/mg de proteína. La determinación de la cantidad de proteínas se llevó a cabo, tal y como se ha explicado en la determinación de ATP (ver apartado II.4). Todas las medidas se realizaron por cuadruplicado, en al menos, tres experimentos independientes, utilizando un lector de placas NovoStar MBG de la casa comercial **Labtech**. Todos los compuestos utilizados son procedentes de **Sigma**.

II.5 Estudios de contenido mitocondrial

II.5.1 Medida de la actividad de la Citrato Sintasa (CS)

La actividad citrato sintasa (Faloona and Srere 1969) se midió como el incremento de absorbancia a 412 nm debido a la aparición de la forma aniónica del ácido 5,5-Ditio-bis-2-nitrobenzónico (DTNB) tras añadir oxalacetato (OAA). La medida se llevó a cabo durante 1 min a 30°C.

Los reactivos y cantidades utilizadas se muestran en la tabla VII.13. Tanto el DTNB, como el OAA se prepararon en fresco. El primero disuelto en tampón de medida, y el segundo en H₂O destilada. El acetil-coA se guardó alicuotado a -80°C disuelto en H₂O destilada, y el tritón a temperatura ambiente.

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 VII.13: Reactivos necesarios para la medida de actividad de la citrato sintasa.

La actividad de la Citrato sintasa (UI/l) se define como: $((\text{rate}/\text{min})/13.6) * (\text{Vol}_{\text{tot}}/\text{Vol}_{\text{muestra}}) * 1000$

Se realizaron al menos tres medidas independientes por línea celular, por triplicado cada una. Los datos se expresaron AE (actividad en UI/mg de proteína).

II.5.2 Medida de la superficie de membrana interna mitocondrial

Para realizar la medida de superficie de masa interna mitocondrial, utilizamos la sonda naranja nonil de acridina (NAO, del inglés *Nonyl Acridine Orange*) que se une a la cardiolipina de forma directamente proporcional (Petit, Maftah et al. 1992; Petit, Huet et al. 1994).

Resumidamente, se partió de células en cultivo en crecimiento exponencial, a un nivel de confluencia de un 80% aproximadamente. La incubación con la sonda se realizó *in vivo*, es decir, directamente sobre la placa de cultivo. Así, tras retirar el medio y realizar un par de lavados con PBS, se añadió 1µM NAO en HBSS y se incubó durante 10 min a 37°C y 5% de CO₂. Seguidamente, retiramos la solución con la sonda, lavamos con PBS y se recogieron las células por tripsinización y posterior centrifugación (Beckman Coulter Allegra X-22, rotor SX4250). Tras el centrifugado el pellet obtenido se resuspendió en 3-4 ml, quedando así 0,75-1x10⁶ células/ml.

Para la medida se tomó 1 ml de la suspensión celular, y se midió la intensidad de fluorescencia en FL2 utilizando un citómetro de flujo Beckman Coulter Cytomics FC500, siguiendo las siguientes condiciones:

FS: 77

SS: 47

FL1: 247

Número de eventos: 20.000

Paralelamente, se llevó a cabo la medida de un control de blanco, es decir, células sin sonda, y un control de vehículo, es decir, células incubadas con el vehículo de la sonda. Las medidas se llevaron a cabo por triplicado y en tres días diferentes. Las células muertas fueron excluidas electrónicamente utilizando los datos del side scatter y del forward scatter. Los datos se expresan como intensidad de fluorescencia/Célula.

II.6 Manipulación y análisis de proteínas

II.6.1 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Para medir la cantidad de proteínas totales utilizamos el método colorimétrico de Bradford (Bradford 1976), con el reactivo comercial de **BioRad**. La detección se basa en el acoplamiento del colorante con la proteína, que se determina colorimetricamente midiendo la absorbancia a 595 nm. A esa longitud de onda, podemos medir la reacción directamente proporcional entre la señal del reactivo y la cantidad de proteínas presentes en la muestra, tal y como se muestra en la figura VII.10.

Para la detección se construye una recta patrón con una proteína de concentración conocida, en nuestro caso utilizamos la albúmina sérica bovina (BSA). Una vez obtenida la ecuación de la recta se interpolaron los valores de nuestras muestras.

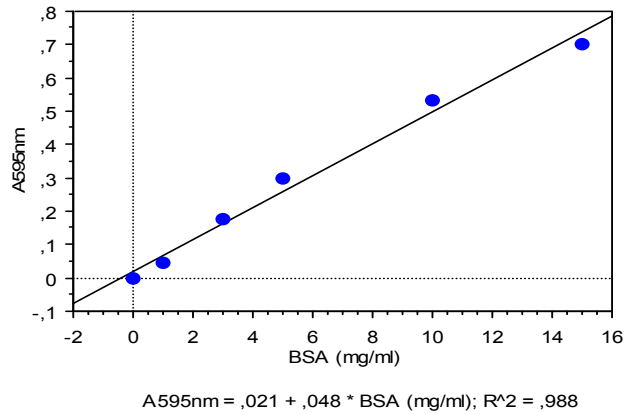


Figura VII.10: Representación gráfica de una determinación de proteínas por el método de Bradford. Recta de calibrado; concentración de BSA frente a absorbancia a 595 nm, también se muestra la ecuación de la recta a partir de la cuál se extrapolan los valores de la muestra problema

La técnica de Bradford se puede realizar de dos formas, durante el desarrollo de esta tesis doctoral ambos métodos fueron utilizados y se exponen a continuación.

A. Placa de 96 pocillos

Para la cuantificación de la cantidad de proteínas en placa de 96 pocillos, realizamos una recta de calibrado con BSA, partiendo de un stock de 1 mg/ml, con las siguientes diluciones:

BSA (mg/ml)	AGUA (µl)	BSA (µl)
0,5	500	500
0,4	600	400
0,3	700	300
0,2	800	200
0,1	900	100
Blanco	1000	0

Tabla VII.14: Diluciones de BSA para la recta de calibrado del Bradford en microplaca

Para la detección se cargaron los puntos de la recta por duplicado y las muestras por triplicado. La cantidad de muestra y de cada punto de la recta fue 10µl y la cantidad de reactivo utilizado de 200µl, el reactivo se utilizó en todos los casos diluido 1: 5.

B. Medida en cubeta

Para la cuantificación de la cantidad de proteínas en cubeta de 1ml. realizamos una recta de calibrado con BSA, partiendo de un stock de 1 mg/ml, con las siguientes diluciones:

CONCENTRACIÓN FINAL (µg / µl)	REACTIVO DE BRADFORD	BSA (µl) (1 mg/ ml)	H₂O
1	200 µl	1	799
3	200 µl	3	792
5	200 µl	5	795
10	200 µl	10	790
15	200 µl	15	775
20	200 µl	20	780
BLANCO	200 µl	0	800

Tabla VII.14: Diluciones de BSA para la recta de calibrado del Bradford en cubeta.

Para la detección se cargaron los puntos de la recta por duplicado y las muestras por triplicado. El reactivo de Bradford se utilizó sin diluir.

II.6.2 Síntesis “in vivo” de proteínas mitocondriales marcadas con ³⁵S-Metionina

La síntesis de proteínas mitocondriales *in vivo* se realizó siguiendo el método de Chomyn (Chomyn 1996). Para ello, las células se sembraron en placas de 100 mm de diámetro dos días antes del experimento para conseguir un 70-80% de confluencia en el momento del ensayo. El medio de cultivo se cambió aproximadamente 12 horas antes del experimento.

Antes de comenzar el experimento de marcaje, se retiró el medio de cultivo de la placa, y las células se lavaron una vez con PBS y se añadió DMEM libre de metionina suplementado con 5% de FBS dializado, piruvato 1 mM, uridina 50 µg/ml y L-Glutamina 2 mM. Las células se incubaron durante 5 min a 37°C en este mismo medio.

Transcurrido ese tiempo, se retiró el medio de la placa y se volvió a incubar durante otros 5-6 min a 37 °C, en el mismo medio suplementado con cicloheximida o emetina (100 µg/ml) según se quisiera una inhibición de la síntesis de proteínas citoplasmáticas reversible o irreversible.

A continuación, se añadió a la placa 0.1 mCi de “PRO-MIX™L-[³⁵S] in Vitro Cell Labeling Mix” cuya actividad específica era 1000 Ci/mmol, se mezcló cuidadosamente, y se dejó incubando a 37°C para marcar exclusivamente las proteínas sintetizadas en mitocondria. Este tiempo de marcaje varía en función del experimento y se denomina pulso. Utilizaremos un tiempo de marcaje de 2h para este experimento.

Una vez pasado el tiempo de marcaje, se eliminó el medio de las placas, se lavaron las células con PBS y se incubaron con medio completo durante un tiempo, denominado caza, que también es variable en función del experimento. En nuestro caso la “caza” se redujo a 2-3 min para que los ribosomas mitocondriales terminasen de sintetizar las cadenas polipeptídicas empezadas. El inhibidor utilizado en estos casos fue la emetina, para obtener una síntesis de proteínas citoplasmáticas irreversible.

Finalmente, las células se recogieron por tripsinización y centrifugación, y el pellet celular resultante se lavó con 1 ml de PBS y se resuspendió en un volumen de Tris-HCl 10 mM pH 7,4, SDS 0.1 %, PMSF 1 mM adecuado al tamaño de pellet celular, para completar la homogeneización celular se realizaron 4 ciclos de congelación (nitrogeno líquido) y descongelación. El extracto de proteínas se cargó en un gel desnaturizante en gradiente como se indica más adelante.

II.6.3 Electroforesis de proteínas

A. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La separación electroforética de las proteínas que componen los extractos celulares totales se llevó a cabo en geles desnaturizantes de SDS: poliacrilamida. Estos sistemas permiten la separación de las proteínas en

función de su peso molecular. Durante el desarrollo de esta tesis se utilizaron dos métodos para la separación de proteínas con geles desnaturalizantes el método de Laemmli (Laemmli 1970) o SDS-Tris-Glicina y el de Schagger (Schagger and von Jagow 1987) o SDS-Tris-Tricina.

A.1 SDS-Glicina en gel pequeño:

Los geles de SDS-TRIS-Glicina (Laemmli 1970) están formados por dos fases que difieren tanto en su composición, como en su función. La fase de apilamiento o *stacking* contiene un contenido en poliacrilamida del 5% y conforma $\frac{1}{4}$ de la superficie del gel. La fase de resolución o *running* gel es la parte donde se va a resolver la separación de las proteínas, tiene una composición de 10-15% de acrilamida-bisacrilamida. Las electroforesis de proteínas en SDS-TRIS-Glicina realizados durante esta tesis se llevaron a cabo utilizando un sistema Mini-PROTEAN® 3 Cell, en la siguiente figura se muestra una imagen.

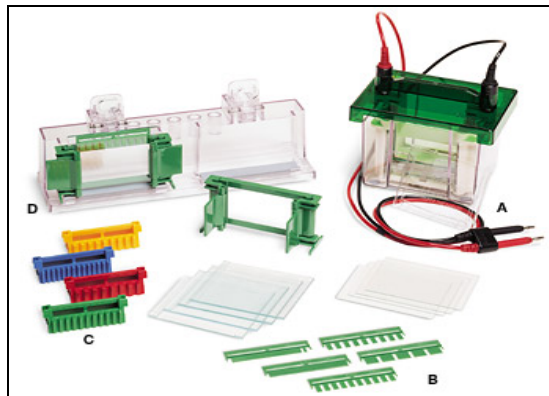


Figura VII.11: Mini-PROTEAN® 3 Cell. Utilizado en la electroforesis de geles pequeños en SDS-glicina.

Las disoluciones necesarias para la realización de estos geles son:

- **Acrilamida/bisacrilamida** 30%-0,8%
- **Tampón separador:** Tris-HCl 1,5 mM pH 8,8, SDS 0,4 %, EDTA 8 mM
- **Tampón apilamiento:** Tris-HCl 0,5 mM pH 6,8, SDS 0,4 %, EDTA 8 mM
- **Tampón electroforesis:** Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%.

Normalmente se prepara una madre 10x

- **Tampón de carga 4X:** Glicerol 20%, Tris-HCl 0,16M pH 6,8, EDTA 20mM, SDS 8% , azul de bromofenol 0,4%, β -mercaptoetanol 4%

En la preparación del gel en primer lugar se añadió el gel separador o *running* gel, cuya composición se encuentra recogida en la tabla VII.15. La mezcla se añadió evitando formar burbujas hasta que llegó a ocupar más o menos $\frac{3}{4}$ partes del montaje. Una vez añadido el *running* gel para acelerar el proceso de gelificación añadimos isopropanol.

COMPONENTE	10%	12,5%
Acrilamida: bisacrilamida (30%-0,8%)	1,7 ml	2,125 ml
Gel separador 4x	1,25 ml	1,25 ml
SDS 25%	20 μ L	25 μ L
AGUA	2 ml	1,5 ml
10% persulfato amónico (APS)	30 μ L	30 μ L
TEMED (comercial)	5 μ L	5 μ L

Tabla VII.15: Composición de las disoluciones para la preparación del gel de separación o *running buffer* para la electroforesis de proteínas por SDS-PAGE-Glicina. Las cantidades son para separadores de 0,75 mm.

Seguidamente, secamos el isopropanol con papel de filtro, y lavamos los restos 2 o 3 veces con agua destilada. Inmediatamente después, añadimos el gel de apilamiento o *stacking* (tabla VII.16) junto con el peine adecuado para nuestro número de muestras. Una vez polimerizado sacamos el peine, lavamos bien los pocillos con una jeringuilla y tampón de electroforesis, y preparamos las muestras para cargar.

COMPONENTE	5%
Acrilamida: bisacrilamida(30%-0,8%)	330 μ L
Gel de apilamiento 4x (Tris-HCl 0.5M pH6.8)	500 μ L
SDS 25%	10 μ L
AGUA	1,167 ml
10% persulfato amónico (APS)	20 μ L
TEMED (comercial)	5 μ L

Tabla VII.16: Composición de las disoluciones para la preparación del gel de apilamiento o *stacking buffer* para la electroforesis de proteínas por SDS-PAGE-Glicina. Las cantidades son para separadores de 0,75 mm.

Las muestras ya cuantificadas y preparadas, tal y como se explica en el apartado VII.II.3.1.2, se mezclaron con tampón de carga. Seguidamente, se

cargaron en el gel evitando hacer burbujas. Por regla general, la cantidad de proteína cargada fue de unos 20-50 µg.

La electroforesis se realizó a una intensidad inicial de 10 mA (40 V) hasta que las muestras entraron en el *running gel*, y a 20 mA (80 V) el resto del tiempo, generalmente se necesitaron unas 2 horas y media.

A.2 SDS-Tricina en gel grande:

Los geles de SDS-TRIS-Tricina surgieron como una alternativa a los de glicina para la mejorar la resolución de proteínas con un tamaño menor a 30 KDa (Schagger and von Jagow 1987).

Las disoluciones necesarias para este gel son las siguientes:

- **Acrilamida/bisacrilamida 50%** (48:1,5)
- **Tampón del gel:** 3M Tris, 0,3% SDS, pH 8,4
- **Tampón del ánodo:** 10X: 2M Tris, pH 8,9
- **Tampón del cátodo:** 0,1M Tris, 0,1M tricina, 0,1% SDS, pH 8,2
- **Tampón de carga 4X:** 40% glicerol, 8% SDS, 200 mM Tris-HCl pH 6,8;0,4%, azul de bromofenol, 4 % β-mercaptoetanol.

Para la preparación del gel utilizamos el sistema Mini-PROTEAN® Cell-Xi. De forma similar al caso del montaje de los geles pequeños, en primer lugar añadimos el gel separador o *running gel*, en la mayoría de nuestros casos se utilizó un 10% de acrilamida:bisacrilamida (tabla VII.16). La solución del gel se añadió al montaje hasta que llegó a ocupar más o menos $\frac{3}{4}$ partes, y sobre este añadimos el isopropanol y esperamos unos 20 min a que solidificara.

A continuación, y después de lavar con agua destilada para eliminar el isopropanol, se añadió al sistema el gel concentrador o *stacking* (tabla VII.16) con el peine adecuado. Cuando polimerizó, se quitó el peine y se lavaron los pocillos con tampón del cátodo (parte superior) de la cubeta, se llenó la zona superior de tampón del cátodo, y la inferior de tampón del ánodo.

COMPONENTE	GEL SEPARADOR (10%)	GEL CONCENTRADOR (4%)
Acrilamida: bisacrilamida (48:1,5)	7,2 ml	1,2 ml
Tampón del gel	12 ml	3,6 ml
AGUA	13,2 ml	10,2 ml
APS (10%)	200 µl	120 µl
TEMED (comercial)	20 µl	24 µl

Tabla VII.16: Composición de las disoluciones para la preparación del gel para la electroforesis de proteínas por SDS-PAGE-Tricina. Las cantidades son para separadores de 1,5 mm del sistema Mini-PROTEAN Xi-Cell.

Se prepararon las muestras correctamente con el tampón de carga, y se cargaron entre 20-50 µg de proteína por muestra.

La electroforesis se desarrolló a un voltaje constante de 100 V hasta que las muestras llegaron al gel separador, momento en el que se subió a 200 V hasta que el marcador de pesos moleculares se separaba correctamente.

B. 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 describe Chomyn en su artículo de 1996 (Chomyn 1996).

Las disoluciones necesarias para la preparación del gel fueron las mismas que en el capítulo VII.II.6.3.A electroforesis de geles pequeños. Sin embargo para la electroforesis se utilizó el sistema de Mini-PROTEAN II 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 tabla VII.17. En el formador de gradientes (Figura VII.11) se coloca 13 ml del 15% en la cámara 1 y 15 ml del 20% en la cámara 2. Se conectó el formador a la bomba, a una velocidad de 16 µl/s, y cuando el gel entró en el sistema, abrimos la llave de paso. Esperamos a que

saliese la primera gota de gel y colocamos la punta de la goma entre los cristales, hasta llenar el gel. Cuando no quedó líquido en las cámaras añadimos 3 ml más de la disolución del 15% hasta que llegara a $\frac{3}{4}$ partes del gel. Finalmente, igual que en los geles desnaturalizantes añadimos isopropanol para favorecer la polimerización y eliminar las burbujas.

COMPONENTE	15%	20%
Acrilamida: bisacrilamida (30%-0,8%)	12,6 ml	8,4 ml
Gel separador 4x	6,3 ml	3,15 ml
SDS 25%	20 μ L	25 μ L
AGUA	6,25 ml	1,05ml
APS 10%	70 μ L	35 μ L
TEMED (comercial)	12 μ L	5 μ L

Tabla VII.17: Composición de las disoluciones para la preparación del gel de separación running buffer para la electroforesis de proteínas por SDS-PAGE-Glicina. Las cantidades son para separadores de 0,75 mm.



Figura VII.12: Ejemplo de formador de gradientes. La cámara de la izquierda es la cámara 1, en la que tendremos la mezcla del 15%, y la cámara 2 la de la derecha en la que añadiremos la mezcla de archilamida del 20%.

Una vez polimerizado retiramos el isopropanol, se elimina los restos de isopropanol tras varios lavados con agua destilada. En ese momento, se puede dejar con agua destilada tapado con papel film a 4°C, o bien proceder a añadir el gel de apilamiento.

En el momento que nos decidimos a hacer el gel se eliminó el agua y añadió el gel concentrador o *stacking* (tabla VII.18) con el peine adecuado en cada caso. Una vez polimerizado se procedió como en los casos anteriores al

lavado de los pocillos y carga de las muestras, en este caso se cargaron 50 µg de proteína por muestra con su tampón de carga correspondiente en cada caso. La preparación de las muestras está recogida en el apartado VII.II.3.1.

COMPONENTE	5%
Acrilamida: bisacrilamida(30%-0,8%)	1,2 ml
Gel de apilamiento 4x	2,0 ml
SDS 25 %	50 µL
AGUA	4,7 ml
10 % persulfato amónico (APS)	75 µL
TEMED (comercial)	20 µL

Tabla VII.18: Composición de las disoluciones para la preparación del gel de apilamiento o *stacking buffer* para la electroforesis de síntesis de proteínas mitocondriales “*in vivo*”. Las cantidades son para separadores de 0,75 mm.

La electroforesis se realizó a amperaje constante de 20 mA hasta que las muestras salieron del gel concentrador, o durante 30 min, y a continuación se dejaron a 30 mA hasta una hora después de que el frente saliera del gel. Aproximadamente toda la electroforesis suele durar unas 5 horas.

Cuando la electroforesis hubo finalizado se procedió a la tinción de gel con azul de Coomasie (ver apartado II.6.4).

II.6.4 Tinción de geles con azul de Coomasie

La tinción de los geles para el estudio de la síntesis mitocondrial de proteínas se llevó a cabo con el fin realizar un control de la cantidad de proteína cargada para cada muestra. De este modo, una vez finalizada la electroforesis, los geles se tiñeron durante aproximadamente 30 min con Azul de Coomasie al 0,025% en Metanol-Acético 30:10. Pasado ese tiempo se destiñeron con Metanol-Acético 50:10 durante el tiempo necesario (aproximadamente 30-45 min) para evitar un posible efecto apantallador del azul de coomasie a la señal radioactiva del S³⁵.

Una vez desteñado el gel, éste se hidrató con Metanol-Acético 20:10 durante toda la noche. Al día siguiente se amplificó la señal radiactiva con

Amplify (**VWR**) durante 30-45 min, y se procedió al secado del gel (ver apartado siguiente) previo a la exposición del mismo.

II.6.5 Secado de geles

Los geles todavía húmedos tras la amplificación de su señal con *Amplify* se pusieron sobre un papel Whatman 3MM de su tamaño y se cubrieron con un papel film. Posteriormente, se colocaron sobre la lámina porosa del secador en el siguiente orden;

- Papel Whatman de 3 MM
- Papel Whatman con el gel y el film
- Lámina de plástico del secador
- Tapa del secador

Una vez ubicados, se conectó el secador a la bomba de vacío y se fijó la temperatura a 80°C. El tiempo de secado generalmente fue de una hora, hasta que la superficie estuvo seca. Cuando el gel estuvo completamente seco se depositó en un cassette y se expuso a una placa autorradiográfica con pantalla amplificadora a -70°C durante 4 días, y posteriormente durante 7 días más. Pasado ese tiempo se procedió a su revelado y cuantificación. Los geles reactivos (ver apartado II.6.3.B) se secaron en un secador de geles de la casa comercial **Bio-Rad** conectado a una bomba de vacío.

II.6.6 Transferencia a membranas PVDF

Para la transferencia de proteínas a membranas PVDF utilizamos el sistema Transfer-Blot SD de **Biorad**, un sistema de transferencia semiseca.

Seguidamente a la electroforesis, se incubó el gel unos 20 min en tampón de transferencia o BSN (Tris 38mM, Glicina 39mM, Metanol 20%). Paralelamente preparamos la membrana (Hybond™ -P de **Amersham**) para la transferencia, para ello realizamos tres lavados: 30 s en metanol, 3 min en agua destilada y al menos 15 min en BSN para equilibrarla.

Una vez equilibrada la membrana y el gel en el tampón de transferencia, procedimos al montaje del sándwich en el orden que se muestra a en la figura VII.13.

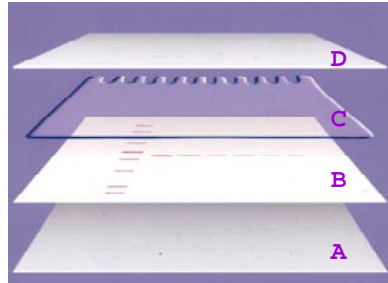


Figura VII.13: Montaje de transferencia semi-seca de proteínas. De abajo arriba: A.3 Papeles Whatman, B. Membrana, C. Gel, D. 3 Papeles Whatman.

La transferencia se realizó a temperatura ambiente y voltaje constante de 20V durante el tiempo necesario en función del tamaño del gel. Así, geles pequeños se transfirieron durante 30 min y los grandes 45 min. Una vez terminada, las proteínas se fijaron a la membrana sumergiéndola en metanol durante 10 s. Una vez fijada, esta se tiñó con rojo Ponceau para comprobar si se habían transferido las proteínas, se lavó bien con agua y con PBS, y se conservó a 4°C envuelta en film de plástico hasta su uso, o se procedió a su inmunodetección.

II.6.7 Inmunodetección de proteínas mediante “*Western-Blot*”

A. Incubación con anticuerpos primario y secundario

En el caso de que la membrana estuviera guardada, ésta se rehidrató con PBS-T, y una vez bien hidratada, se inició el bloqueo con PBS-T al 5% de leche desnatada en polvo durante 1h a temperatura ambiente, o bien toda la noche en la cámara fría. En cualquier caso, posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS-T de 10 min cada uno, para eliminar las trazas de la leche, y se incubó 1h a temperatura ambiente o bien a 4°C toda la noche con el anticuerpo primario.

Transcurrido ese tiempo, se realizaron de nuevo 3-4 lavados con PBS-T de 10 min para eliminar las trazas de anticuerpo primario, y se incubó con el

anticuerpo secundario en PBS-T al 0,1% de leche desnatada en polvo durante 1 hora. Seguidamente, se llevaron a cabo otros 3 lavados con PBS-T de 10 min cada uno, 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 encuentran recogidas en la sección I.3.

B. Detección de proteínas

La membrana se incubó durante 5 min con el sustrato quimioluminiscente y la luz emitida en dicha reacción se detectó mediante una placa de autorradiografía y su posterior revelado. Utilizamos el kit “*SuperSignal@West Pico Mouse IgG Detection Kit*” de la casa comercial **Pierce**.

C. Reutilización de membranas

Tras la detección se humedeció la membrana con PBS-T y se incubó con solución de *Stripping* (2-mercaptoetanol 100 mM, SDS 2%, Tris-HCl 62,5 mM pH 6,7) a 58°C durante 20-30 min. Seguidamente, se realizaron dos lavados de 10 min a temperatura ambiente con PBS-T para eliminar las trazas de solución de *stripping*, y se procedió a la siguiente inmunodetección repitiendo los procesos anteriormente descritos.

II.7 Estudio de estrés oxidativo en cultivos celulares

II.7.1 Medida de la actividad aconitasa

La actividad aconitasa (Gardner 2002) se determinó siguiendo el incremento lineal en la absorbancia a 340 nm que se produce debido a la formación de NADPH ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), en una mezcla que contenía citrato de sodio, NADP⁺, isocitrato DH y el homogenado celular.

Previamente a la medida, se llevó a cabo una incubación de la mezcla durante 8 min, sin la isocitrato deshidrogenasa (isocitrato-DH). Posteriormente,

se añadió la isocitrato-DH, y se esperaron de nuevo 2min y 30s hasta que la medida llegó a la fase lineal, posteriormente se llevó a cabo la determinación en la fase lineal durante 2 min, a 25°C.

La preparación de las muestras está recogida en el apartado VII.II.3.2. La mezcla de reacción y las distintas cantidades se encuentran en la tabla VII.19 que se presenta a continuación;

REACTIVO	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
Tris HCl pH 7,4, MnCl ₂ 0,6 mM	858,4 µl	50 mM
Citrato de Sodio 250Mm pH 7	20 µl	5 mM
Muestra	100 µl	
Isocitrato-DH (125U/ml)	1,6 µl	2 U
NADP ⁺ 20 mM	20 µl	0,4 mM

Tabla VII.19: Reactivos necesarios para la medida de actividad de la aconitasa.

$$\text{Actividad Aconitasa (UI/L): } ((\text{rate}/\text{min})/6,22) * (\text{Vol}_{\text{tot}}/\text{Vol}_{\text{muestra}}) * 1000$$

Las medidas de cada muestra se realizaron por triplicado, y con al menos 3 muestras independientes por línea. Los resultados se expresaron como actividad específica referida a la cantidad de proteínas presente en cada muestra.

II.7.2 Estudio de la expresión de la manganeso superóxido dismutasa

La medida de la expresión de la manganeso superóxido dismutasa (MnSOD) o SOD mitocondrial como marcador de daño oxidativo se realizó tal y como indicamos en el apartado VII.II.1.8.B. Los oligonucleótidos utilizados proceden de la casa comercial **Applied-Biosystems** y el gen de referencia utilizado fue el ribosómico nuclear 18S.

La determinación se llevó a cabo en dos experimentos independientes, por triplicado cada uno. Los datos se expresaron como Δ Cts entre el gen de la mtSOD y el del 18S.

II.7.3 Medida de la producción de H₂O₂ *in vivo* mediante citometría de flujo

La producción de H₂O₂ se midió utilizando la sonda Di-Cloro-Fluoresceína Di-Acetato (DCF-DA) (Carter, Narayanan et al. 1994), un sustrato no fluorescente que pierde el grupo acetato al pasar las membranas celulares (ver figura VII.10), dando lugar a la dicloro-fluorescina, sustancia que se une al peróxido de hidrógeno presente en el interior celular dando lugar a la diclorofluoresceína que absorbe a 485 nm y emite a 525 nm y puede ser determinado bien en sistema de multiplaca (Zuo and Clanton 2002), o bien utilizando un citometro de flujo (Carter, Narayanan et al. 1994).

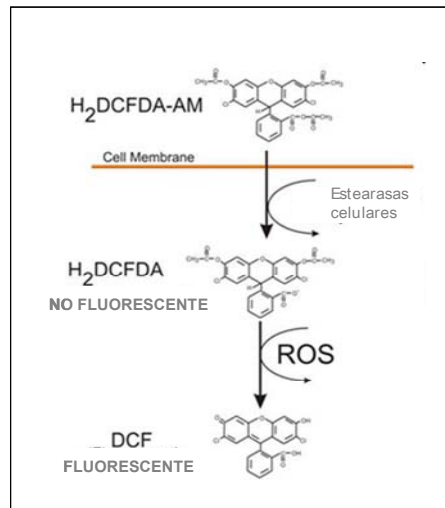


Figura VII.14: Formación del compuesto fluorescente DCF

Para la medida partimos de células en crecimiento exponencial a un 80% de confluencia aproximadamente, es decir, unos 2,5-3,5x10⁶ de células. Para ello retiramos el medio de cultivo, lavamos con PBS, incubamos con la DCF-DA a 20 μM en HBSS durante 30 min a 37°C. A continuación retiramos la disolución con la sonda, lavamos con PBS y recogimos el pellet por tripsinización y centrifugación (Beckman Coulter Allegra X-22, rotor SX4250). El pellet obtenido se resuspendió en 3-4 ml, quedando así 0,75-1x10⁶ células/ml.

Para la medida se tomó 1 ml de la suspensión celular, y se midió la intensidad de fluorescencia en FL1 utilizando un citómetro de flujo Beckman Coulter Cytomics FC500, siguiendo las siguientes condiciones:

FS: 59
SS: 70
FL1: 247
Número de eventos: 10.000

Paralelamente, se realizó control positivo incubando las células teñidas con 40 mM de peróxido de hidrógeno durante 10 min, la detección de un blanco control, es decir, células incubadas con HBSS sin sonda, y la del vehículo, es decir, células incubadas con HBSS y el vehículo, en este caso fue el DMSO. En la figura VII.11 se muestra un ejemplo de la medida de cada condición, así como el estudio de linealidad de la intensidad de fluorescencia con concentraciones crecientes de H₂O₂.

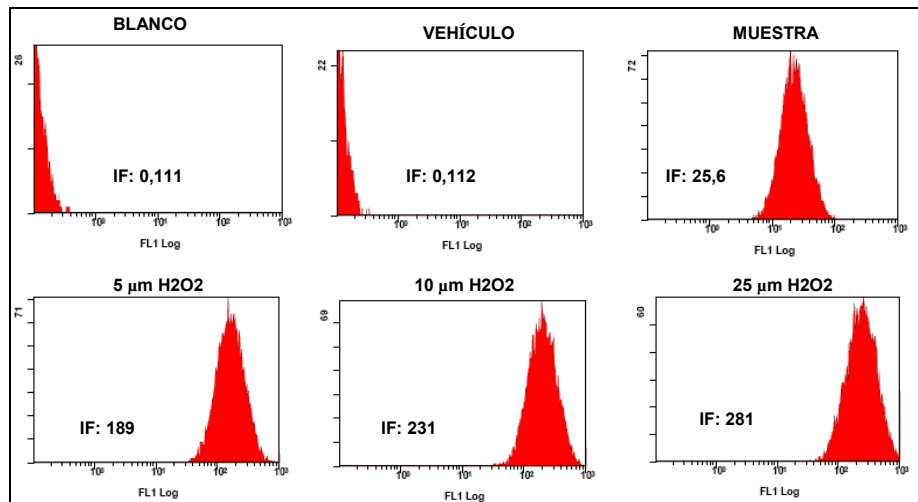


Figura VII.12: Linealidad en la detección de H₂O₂ por la DCF-DA, como intensidad de fluorescencia en FL1.

La detección se llevó a cabo utilizando un citómetro Beckman Coulter Cytomics FC500. Las células muertas fueron excluidas electrónicamente utilizando los datos del side scatter y del forward scatter. Los datos se expresaron como intensidad de fluorescencia. Se realizaron al menos tres medidas independientes por línea celular, cada una de ellas por triplicado.

II.7.4 Medida de la producción de H₂O₂ *in vivo* mediante fluorescencia

La producción de H₂O₂ se midió utilizando la sonda DCF-DA, el fundamento es el mismo que en el apartado anterior, pero en este caso se realizó la medida utilizando un lector de placas NovoStar MBG **Labtech**.

Abreviando, se sembraron 20.000-25.000 células/200 µl en DMEM normal suplementado con 5% de FBS en placas especiales para fluorescencia y cultivo simultáneamente, procedentes de la casa comercial **Nunc**. Paralelamente se sembró una placa de cultivo normal de 96 pocillos para la determinación de la cantidad de proteínas. La siembra se realizó, en ambos casos, entre 10-14 horas antes de la medida. Pasado ese tiempo, se llevaron a cabo dos lavados con PBS, y se le añadió el tampón de medida (200 µl/pocillo) [ver composición en tabla VII.11 con glucosa y piruvato (tabla VII.12)] y se incubaron las células con la solución de medida durante 2 horas a 37°C y 5% de CO₂.

Inmediatamente después del tiempo de incubación, se retiraron 90µL de tampón de medida de cada pocillo con la ayuda de una pipeta multicanal, y sobre el volumen restante, unos 100 µL, se añadió 1 volumen de con PBS la sonda a una concentración final de 10 µM. La mezcla se incubó de nuevo durante 30 min a 37°C y 5% de CO₂ y seguidamente se procedió a la medida de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 525 nm.

Los datos se expresaron en unidades de fluorescencia/mg de proteína. La determinación de la cantidad de proteínas se llevó a cabo, tal y como se ha explicado en la determinación de ATP (ver apartado II.4). Todas las medidas se realizaron por cuadruplicado, en al menos, tres experimentos independientes, utilizando un lector de placas NovoStar MBG de la casa comercial **Labtech**. Todos los compuestos utilizados son procedentes de **Sigma**.

Todas las medidas se realizaron usando el NovoStar MBG **Labtech**. Para cada línea celular se realizaron al menos tres experimentos independientes por cuadruplicado cada uno.

II.7.5 Medida de la producción de O_2^- mediante citometría de flujo

La medida de la producción de anión superóxido se llevó a cabo utilizando la sonda fluorescente mitocondrial hidroetidino o MITOSOX (Park, Sharma et al. 2009). A diferencia de la DCF-DA que reacciona con el peróxido de hidrógeno citosólico (apartado anterior), el mitosox es oxidado por el superóxido mitocondrial. Para la cuantificación seguimos el método de Mukhopadhyay *et al.* (Mukhopadhyay, Rajesh et al. 2007) y las recomendaciones del fabricante.

Brevemente, partimos de células en crecimiento exponencial a un 80% de confluencia aproximadamente, es decir, unos $2,5-3,5 \times 10^6$ de células. Se recogió el pellet por tripsinización y centrifugación (Beckman Coulter Allegra X-22, rotor SX4250), se contó y se resuspendió a $0,5 \times 10^6$ células/ml. Para cada tinción se tomaron 0,25 ml (aproximadamente 250.000 células), se pasaron a un *ependorf* y se tiñeron con Mitosox a una concentración final de $40 \mu\text{M}$, durante 10 min. Pasado ese tiempo se centrifugaron (Beckman Coulter Allegra X-22, rotor SX4250) y se realizaron dos lavados con PBS. Finalmente, el pellet celular se resuspendió de nuevo en PBS, y se midió la intensidad de fluorescencia en los canales FL2 o FL3 indistintamente en las siguientes condiciones:

FS: 77
SS: 47
FL2: 340
FL3: 300
Número de eventos: 20.000

Para la medida utilizamos un citómetro de flujo marca Beckman Coulter Cytomics FC500. Las células muertas fueron excluidas electrónicamente utilizando los datos del side scatter y del forward scatter. Los datos se expresaron como intensidad de fluorescencia, también se realizó control positivo de con altas dosis de antimicina A, incubándolo 10 min una vez teñidas las células.

Se realizaron al menos tres medidas independientes por línea celular, cada una de ellas por triplicado. Así como un control de blanco y de vehículo, el vehículo en este caso fue el DMSO.

II.8 Estudios bioinformáticos

A. Análisis de secuencias del DNA

Las secuencias del mtDNA se compararon con la secuencia de referencia Cambridge (GenBank NC_012920) (Andrews, Kubacka et al. 1999) utilizando el programa Sequence Detection System 1.9.1.

B. Estudios del índice de conservación

Por regla general, se cree que las variantes genéticas muy conservadas reflejan posiciones funcionalmente importantes, por el contrario habrían sido eliminadas por selección natural. Así pues, el índice de conservación (CI, del inglés *Conservation Index*) de una determinada posición en una determinada proteína se calcula como el porcentaje de especies que presentan el aminoácido tipo salvaje (wt, del inglés *Wild Type*) en humanos (Ruiz-Pesini, Mishmar et al. 2004).

Para llevar a cabo este estudio evolutivo, en primer lugar, se realiza una búsqueda de las secuencias de la proteína de interés en la base de datos electrónica GenBank. Posteriormente, todas las secuencias de una misma proteína, se alinean con la del humano utilizando un programa de alineamiento, en nuestro caso, el ClustalW® del European Bioinformatics Institute (EBI).

II.9 Estudios de citotoxicidad de fármacos

Los estudios de citotoxicidad de fármacos se llevaron a cabo utilizando el colorante NR tal y como se expone en el apartado II.2.8.B, para el cálculo de la concentración inhibitoria de crecimiento (IC₅₀) de todas los compuestos analizados.

II.10 Validación. Puesta a punto de técnicas

La validación de un método analítico por definición es el *proceso mediante el cuál se establece por medio de estudios de laboratorio que las características representativas del método analítico cumplen con las especificaciones para su aplicación*. Los límites varían según se trate de una técnica manual, o mecanizada.

En esta tesis doctoral se han validado los siguientes parámetros estadísticos para la validación de las técnicas utilizadas (Tabla VII.20):

- Evaluación intraensayo: Coeficiente de variación de la medida en varias repeticiones en un mismo día, con la misma muestra e idénticos reactivos.

- Evaluación interensayo: Coeficiente de variación de la medida en varios días diferentes, a poder ser con la misma muestra (en consumo de oxígeno y citometría de flujo no es posible) y distintos reactivos.

- Linealidad: Expresada como la correlación entre la cantidad de parámetro a detectar y la detección. Se analizó con el Z-test y se dan valores de la R².

- Blanco: Control de no actividad y/o de señal de los reactivos sin muestra, y/o de la muestra sin reactivos, dependiendo del ensayo.

- Vehículo: Control de no actividad, y/o señal de los reactivos sin muestra, o de la muestra sin reactivos dependiendo del caso, pero con el vehículo que los porta, ejemplo: DMSO en citometría de flujo o en titulación de fármacos.

Los datos referentes a la validación de todas las técnicas puestas a punto en el desarrollo de esta tesis se encuentran reflejadas en la tabla VII.20 que se expone a continuación:

PARÁMETROS	INTERENSAYO	INTRAENSAYO	BLANCO	VEHÍCULO	LINEARIDAD
ACTIVIDAD ACONITASA	2,37± 0,21(4) CV= 8,8%	2,15 ± 0,22 (16) CV=10,1%	0,01 ± 0,035 (8) p< 0,0001	No utilizado	R2: 0,848 p<0,0001
DCF-DA	27,16 ± 0,28(4) CV=1,1 %	27,56 ± 0,72(10) CV=2,6%	0,34 ± 0,03 (15) p< 0,0001	0,34 ± 0,04 (13) p< 0,0001	R2: 0,955 p<0,0001
DiOC6(3)	123,00 ± 6,09(4) CV=5,0 %	155,70 ± 4,08(10) CV=2,6%	0,111 ± 0,001 (5) p< 0,0001	0,112 ± 0,001 (6) p< 0,0001	R2: 0,933 p=0,043
MITOSOX	30,22 ± 6,00(4) CV=20%	36,825 ± 1,02(28) CV=2,8%	0,30 ± 0,22 (4) p< 0,0001	0,297 ± 0,02 (4) p< 0,0001	R2: 0,914 p=0,007
IP	96,55 ± 1,84(4) CV=0,5%	96,63 ± 0,44 (11) CV=1,9%	-----	-----	R2: 0,94 p<0,0001
ATP TOTAL	780,15± 51,61(4) CV=6,6%	235.419 ± 30.210 (8)** CV=12,8%	676,62 ± 161,31 (8) ** p< 0,0001	-----	R2: 0,99 p<0,0001
CONSUMO DE OXÍGENO	30,69 ± 0,63(4) CV=2,1%	30,39 ± 3,47 (8) CV=11,4%	-----	-----	R2: 0,98 p<0,0001

Tabla VII.20: Resultados de la validación de los métodos. CV: Coeficiente de variación; R²: correlación de regresión. p<0.05 significativo. (N); número de ensayos. Linealidad de la técnica por Z-test. Ensayos del blanco y vehículo, ensayos de normalidad por Kolmogorov-Smirnov, comparación de medias de tudent desapareada de dos colas.

II.10 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. Se podrían dividir en dos grupos; aquellos tenidos en cuenta en las validaciones de las técnicas a utilizar y los parámetros estadísticos para el estudio de nuestras variables.

- Validación: Se han realizado Z-score test para el estudio de correlación lineal de cada una de las técnicas puestas a punto, así como el estudio de la regresión lineal de todas ellas y su R². Se han estudiado también parámetros como el coeficiente de variación tanto intraensayo, como interensayo (ver apartado

anterior), así como test t-pareados para el estudio de blancos y efecto del vehículos o tampones en nuestras determinaciones.

- Estudio de nuestras variables: Estudio de la normalidad de todas las variables estudiadas se interpretó por el test de Kolmogorov-Smirnov. De este modo las variables no normales fueron sometidas a la prueba no paramétrica de Mann- Withney o Krustall-Wallis, si se trataba de 2 o más variables a estudiar, respectivamente, y las normales fueron comparados con test ANOVA desapareado de dos colas. En todo caso el nivel de significación elegido fue de 0,05. 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. Lo mismo ocurrió en los ensayos estructura-actividad de los compuestos estudiados en farmaQgenómica.

Por otro lado, cuando se quisieron relacionar variables que no se habían realizado partiendo de la misma muestra, como por ejemplo los niveles de mtDNA/niveles de síntesis de proteínas tuvimos en cuenta la siguiente ecuación para obtener las desviaciones estándar (SD) de los cocientes.

$$SD \ (a/b) = \sqrt{[SD(a)/x(a)]^2 + [SD(b)/x(b)]^2}$$

VIII. Bibliografía

- Achanta, G., R. Sasaki, et al. (2005). "Novel role of p53 in maintaining mitochondrial genetic stability through interaction with DNA Pol gamma." *EMBO J* **24**(19): 3482-3492.
- Achilli, A., C. Rengo, et al. (2005). "Saami and Berbers--an unexpected mitochondrial DNA link." *Am J Hum Genet* **76**(5): 883-886.
- 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.
- Alam, T. I., T. Kanki, et al. (2003). "Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM." *Nucleic Acids Res* **31**(6): 1640-1645.
- Aloni, Y. and G. Attardi (1972). "Expression of the mitochondrial genome in HeLa cells. XI. Isolation and characterization of transcription complexes of mitochondrial DNA." *J Mol Biol* **70**(2): 363-373.
- Allen, J. F. (1996). "Separate sexes and the mitochondrial theory of ageing." *J Theor Biol* **180**(2): 135-140.
- Amo, T. and M. D. Brand (2007). "Were inefficient mitochondrial haplogroups selected during migrations of modern humans? A test using modular kinetic analysis of coupling in mitochondria from cybrid cell lines." *Biochem J* **404**(2): 345-351.
- Amo, T., N. Yadava, et al. (2008). "Experimental assessment of bioenergetic differences caused by the common European mitochondrial DNA haplogroups H and T." *Gene* **411**(1-2): 69-76.
- Anderson, S., A. T. Bankier, et al. (1981). "Sequence and organization of the human mitochondrial genome." *Nature* **290**(5806): 457-465.
- 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.
- Anke, T., F. Oberwinkler, et al. (1977). "The strobilurins--new antifungal antibiotics from the basidiomycete *Strobilurus tenacellus*." *J Antibiot (Tokyo)* **30**(10): 806-810.
- Attardi, G. and G. Schatz (1988). "Biogenesis of mitochondria." *Annu Rev Cell Biol* **4**: 289-333.
- Bandy, B., J. Moon, et al. (1990). "Multiple actions of superoxide dismutase: why can it both inhibit and stimulate reduction of oxygen by hydroquinones?" *Free Radic Biol Med* **9**(2): 143-148.
- Baracca, A., G. Sgarbi, et al. (2007). "Biochemical phenotypes associated with the mitochondrial ATP6 gene mutations at nt8993." *Biochim Biophys Acta* **1767**(7): 913-919.
- Barnabas, S., Y. Shouche, et al. (2006). "High-resolution mtDNA studies of the Indian population: implications for palaeolithic settlement of the Indian subcontinent." *Ann Hum Genet* **70**(Pt 1): 42-58.
- 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.
- Barrientos, A. and C. T. Moraes (1999). "Titrating the effects of mitochondrial complex I impairment in the cell physiology." *J Biol Chem* **274**(23): 16188-16197.
- Barros, M. H., B. Bandy, et al. (2004). "Higher respiratory activity decreases mitochondrial reactive oxygen release and increases life span in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* **279**(48): 49883-49888.
- Bartlett, D. W., J. M. Clough, et al. (2002). "The strobilurin fungicides." *Pest Manag Sci* **58**(7): 649-662.
- Barton, V., N. Fisher, et al. (2010). "Inhibiting Plasmodium cytochrome bc1: a complex issue." *Curr Opin Chem Biol* **14**(4): 440-446.
- Bayona-Bafaluy, M. P., P. Fernandez-Silva, et al. (2002). "The thankless task of playing genetics with mammalian mitochondrial DNA: a 30-year review." *Mitochondrion* **2**(1-2): 3-25.
- Bayona-Bafaluy, M. P., E. Lopez-Gallardo, et al. (2011). "Maternally inherited susceptibility to cancer." *Biochim Biophys Acta* **1807**(6): 643-649.
- Bayona-Bafaluy, M. P., S. Muller, et al. (2005). "Fast adaptive coevolution of nuclear and mitochondrial subunits of ATP synthetase in orangutan." *Mol Biol Evol* **22**(3): 716-724.
- Beckstead, W. A., M. T. Ebbert, et al. (2009). "Evolutionary pressure on mitochondrial cytochrome b is consistent with a role of CytbI7T affecting longevity during caloric restriction." *PLoS One* **4**(6): e5836.

- Bellizzi, D., P. Cavalcante, et al. (2006). "Gene expression of cytokines and cytokine receptors is modulated by the common variability of the mitochondrial DNA in cybrid cell lines." Genes Cells **11**(8): 883-891.
- Bellizzi, D., D. Taverna, et al. (2009). "Mitochondrial DNA variability modulates mRNA and intra-mitochondrial protein levels of HSP60 and HSP75: experimental evidence from cybrid lines." Cell Stress Chaperones **14**(3): 265-271.
- Benecke, R., P. Strumper, et al. (1993). "Electron transfer complexes I and IV of platelets are abnormal in Parkinson's disease but normal in Parkinson-plus syndromes." Brain **116 (Pt 6)**: 1451-1463.
- Bentlage, H. A. and G. Attardi (1996). "Relationship of genotype to phenotype in fibroblast-derived transmitochondrial cell lines carrying the 3243 mutation associated with the MELAS encephalomyopathy: shift towards mutant genotype and role of mtDNA copy number." Hum Mol Genet **5**(2): 197-205.
- Bereiter-Hahn, J. (1990). "Behavior of mitochondria in the living cell." Int Rev Cytol **122**: 1-63.
- Beretta, S., L. Mattavelli, et al. (2004). "Leber hereditary optic neuropathy mtDNA mutations disrupt glutamate transport in cybrid cell lines." Brain **127**(Pt 10): 2183-2192.
- Bergen, W. G. (1971). "The in vitro effect of dieldrin on respiration of rat liver mitochondria." Proc Soc Exp Biol Med **136**(3): 732-735.
- Bindoff, L. A., M. A. Birch-Machin, et al. (1991). "Respiratory chain abnormalities in skeletal muscle from patients with Parkinson's disease." J Neurol Sci **104**(2): 203-208.
- Blin, O., C. Desnuelle, et al. (1994). "Mitochondrial respiratory failure in skeletal muscle from patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy." J Neurol Sci **125**(1): 95-101.
- Bodnar, A. G., J. M. Cooper, et al. (1993). "Nuclear complementation restores mtDNA levels in cultured cells from a patient with mtDNA depletion." Am J Hum Genet **53**(3): 663-669.
- Bogenhagen, D. F., Y. Wang, et al. (2003). "Protein components of mitochondrial DNA nucleoids in higher eukaryotes." Mol Cell Proteomics **2**(11): 1205-1216.
- Botchkina, G. I., R. H. Kim, et al. (2005). "Noninvasive detection of prostate cancer by quantitative analysis of telomerase activity." Clin Cancer Res **11**(9): 3243-3249.
- Bouhours-Nouet, N., P. May-Panloup, et al. (2005). "Maternal smoking is associated with mitochondrial DNA depletion and respiratory chain complex III deficiency in placenta." Am J Physiol Endocrinol Metab **288**(1): E171-177.
- Boveris, A., E. Cadenas, et al. (1976). "Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide." Biochem J **156**(2): 435-444.
- Boveris, A. and B. Chance (1973). "The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen." Biochem J **134**(3): 707-716.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Brand, M. D. (2000). "Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing." Exp Gerontol **35**(6-7): 811-820.
- Brand, M. D., C. Affourtit, et al. (2004). "Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins." Free Radic Biol Med **37**(6): 755-767.
- Briere, J. J., D. Schlemmer, et al. (2004). "Quinone analogues regulate mitochondrial substrate competitive oxidation." Biochem Biophys Res Commun **316**(4): 1138-1142.
- Brookes, P. S. (2005). "Mitochondrial H(+) leak and ROS generation: an odd couple." Free Radic Biol Med **38**(1): 12-23.
- Brown, M. D., J. C. Allen, et al. (2001). "Clinical, genetic, and biochemical characterization of a Leber hereditary optic neuropathy family containing both the 11778 and 14484 primary mutations." Am J Med Genet **104**(4): 331-338.
- Brown, M. D., E. Starikovskaya, et al. (2002). "The role of mtDNA background in disease expression: a new primary LHON mutation associated with Western Eurasian haplogroup J." Hum Genet **110**(2): 130-138.

- Brown, M. D., F. Sun, et al. (1997). "Clustering of Caucasian Leber hereditary optic neuropathy patients containing the 11778 or 14484 mutations on an mtDNA lineage." *Am J Hum Genet* **60**(2): 381-387.
- Brown, W. M. (1980). "Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(6): 3605-3609.
- Brun-Pascaud, M., P. Rajagopalan-Levasseur, et al. (1998). "Drug evaluation of concurrent *Pneumocystis carinii*, *Toxoplasma gondii*, and *Mycobacterium avium* complex infections in a rat model." *Antimicrob Agents Chemother* **42**(5): 1068-1072.
- Bruni, F., P. L. Polosa, et al. (2010). "Nuclear respiratory factor 2 induces the expression of many but not all human proteins acting in mitochondrial DNA transcription and replication." *J Biol Chem* **285**(6): 3939-3948.
- Bu, X. D. and J. I. Rotter (1991). "X chromosome-linked and mitochondrial gene control of Leber hereditary optic neuropathy: evidence from segregation analysis for dependence on X chromosome inactivation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(18): 8198-8202.
- Bustin, S. A., V. Benes, et al. (2009). "The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments." *Clin Chem* **55**(4): 611-622.
- Cann, R. L., M. Stoneking, et al. (1987). "Mitochondrial DNA and human evolution." *Nature* **325**(6099): 31-36.
- Cardellach, F., M. J. Martí, et al. (1993). "Mitochondrial respiratory chain activity in skeletal muscle from patients with Parkinson's disease." *Neurology* **43**(11): 2258-2262.
- 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. Franceschini, et al. (2007). "Grand rounds: could occupational exposure to n-hexane and other solvents precipitate visual failure in leber hereditary optic neuropathy?" *Environ Health Perspect* **115**(1): 113-115.
- Carelli, V., F. N. Ross-Cisneros, et al. (2004). "Mitochondrial dysfunction as a cause of optic neuropathies." *Prog Retin Eye Res* **23**(1): 53-89.
- Carelli, V., L. Vergani, et al. (2002). "Respiratory function in cybrid cell lines carrying European mtDNA haplogroups: implications for Leber's hereditary optic neuropathy." *Biochim Biophys Acta* **1588**(1): 7-14.
- Carrozzo, R., T. Rizza, et al. (2004). "Maternally-inherited Leigh syndrome-related mutations bolster mitochondrial-mediated apoptosis." *J Neurochem* **90**(2): 490-501.
- Carrozzo, R., A. Tessa, et al. (2001). "The T9176G mtDNA mutation severely affects ATP production and results in Leigh syndrome." *Neurology* **56**(5): 687-690.
- Carter, W. O., P. K. Narayanan, et al. (1994). "Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells." *J Leukoc Biol* **55**(2): 253-258.
- Cassarino, D. S., C. P. Fall, et al. (1997). "Elevated reactive oxygen species and antioxidant enzyme activities in animal and cellular models of Parkinson's disease." *Biochim Biophys Acta* **1362**(1): 77-86.
- Clay Montier, L. L., J. J. Deng, et al. (2009). "Number matters: control of mammalian mitochondrial DNA copy number." *J Genet Genomics* **36**(3): 125-131.
- Clayton, D. A. (1982). "Replication of animal mitochondrial DNA." *Cell* **28**(4): 693-705.
- Colman, E. (2007). "Dinitrophenol and obesity: an early twentieth-century regulatory dilemma." *Regul Toxicol Pharmacol* **48**(2): 115-117.
- Coskun, P., J. Wyrembak, et al. (2011). "A mitochondrial etiology of Alzheimer and Parkinson disease." *Biochim Biophys Acta*.
- Coskun, P. E., M. F. Beal, et al. (2004). "Alzheimer's brains harbor somatic mtDNA control-region mutations that suppress mitochondrial transcription and replication." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(29): 10726-10731.
- Coskun, P. E., J. Wyrembak, et al. (2010). "Systemic mitochondrial dysfunction and the etiology of Alzheimer's disease and down syndrome dementia." *J Alzheimers Dis* **20 Suppl 2**: S293-310.

- Cotan, D., M. D. Cordero, et al. (2011). "Secondary coenzyme Q10 deficiency triggers mitochondria degradation by mitophagy in MELAS fibroblasts." Faseb J **25**(8): 2669-2687.
- Cotney, J. and G. S. Shadel (2006). "Evidence for an early gene duplication event in the evolution of the mitochondrial transcription factor B family and maintenance of rRNA methyltransferase activity in human mtTFB1 and mtTFB2." J Mol Evol **63**(5): 707-717.
- Cotney, J., Z. Wang, et al. (2007). "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.
- Crofts, A. R. (2004). "The cytochrome bc1 complex: function in the context of structure." Annu Rev Physiol **66**: 689-733.
- Crofts, A. R., B. Barquera, et al. (1999). "Mechanism of ubiquinol oxidation by the bc(1) complex: different domains of the quinol binding pocket and their role in the mechanism and binding of inhibitors." Biochemistry **38**(48): 15807-15826.
- Crofts, A. R., M. Guergova-Kuras, et al. (1999). "Mechanism of ubiquinol oxidation by the bc(1) complex: role of the iron sulfur protein and its mobility." Biochemistry **38**(48): 15791-15806.
- Crofts, A. R., V. P. Shinkarev, et al. (2003). "The modified Q-cycle explains the apparent mismatch between the kinetics of reduction of cytochromes c1 and bH in the bc1 complex." J Biol Chem **278**(38): 36191-36201.
- Croteau, D. L., R. H. Stierum, et al. (1999). "Mitochondrial DNA repair pathways." Mutat Res **434**(3): 137-148.
- Cummins, J. (1998). "Mitochondrial DNA in mammalian reproduction." Rev Reprod **3**(3): 172-182.
- Cummins, J. M., A. M. Jequier, et al. (1994). "Molecular biology of human male infertility: links with aging, mitochondrial genetics, and oxidative stress?" Mol Reprod Dev **37**(3): 345-362.
- Chalmers, R. M., M. B. Davis, et al. (1996). "Evidence against an X-linked visual loss susceptibility locus in Leber hereditary optic neuropathy." Am J Hum Genet **59**(1): 103-108.
- Chance, B. and G. R. Williams (1955). "Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization." J Biol Chem **217**(1): 383-393.
- 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 tRNALys mutation causing myoclonic epilepsy and ragged red fibers." Am J Hum Genet **54**(6): 966-974.
- 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.
- D'Aurelio, M., C. Vives-Bauza, et al. (2010). "Mitochondrial DNA background modifies the bioenergetics of NARP/MILS ATP6 mutant cells." Hum Mol Genet **19**(2): 374-386.
- Dahmani, Y., A. Marcuello, et al. (2008). "Association of human mitochondrial DNA variants with plasma LDL levels." Mitochondrion **8**(3): 247-253.
- Danielson, S. R., V. Carelli, et al. (2005). "Isolation of transcriptomal changes attributable to LHON mutations and the cybridization process." Brain **128**(Pt 5): 1026-1037.
- Danielson, S. R., A. Wong, et al. (2002). "Cells bearing mutations causing Leber's hereditary optic neuropathy are sensitized to Fas-Induced apoptosis." J Biol Chem **277**(8): 5810-5815.
- Darin, N., N. Kadhom, et al. (2003). "Mitochondrial activities in human cultured skin fibroblasts contaminated by Mycoplasma hyorhinitis." BMC Biochem **4**: 15.
- Davis, A. F., P. A. Ropp, et al. (1996). "Mitochondrial DNA polymerase gamma is expressed and translated in the absence of mitochondrial DNA maintenance and replication." Nucleic Acids Res **24**(14): 2753-2759.

- De Benedictis, G., G. Rose, et al. (1999). "Mitochondrial DNA inherited variants are associated with successful aging and longevity in humans." *Faseb J* **13**(12): 1532-1536.
- de Duve, C. (2007). "The origin of eukaryotes: a reappraisal." *Nat Rev Genet* **8**(5): 395-403.
- Desquiret, V., D. Loiseau, et al. (2006). "Dinitrophenol-induced mitochondrial uncoupling in vivo triggers respiratory adaptation in HepG2 cells." *Biochim Biophys Acta* **1757**(1): 21-30.
- di Rago, J. P., X. Perea, et al. (1986). "DNA sequence analysis of diuron-resistant mutations in the mitochondrial cytochrome b gene of *Saccharomyces cerevisiae*." *FEBS Lett* **208**(2): 208-210.
- Dimauro, S. and G. Davidzon (2005). "Mitochondrial DNA and disease." *Ann Med* **37**(3): 222-232.
- DiMauro, S. and M. Hirano (1993). "Melas."
- DiMauro, S. and M. Hirano (1993). "Merrf."
- DiMauro, S. and E. A. Schon (2003). "Mitochondrial respiratory-chain diseases." *N Engl J Med* **348**(26): 2656-2668.
- Dominguez-Garrido, E., D. Martinez-Redondo, et al. (2009). "Association of mitochondrial haplogroup J and mtDNA oxidative damage in two different North Spain elderly populations." *Biogerontology* **10**(4): 435-442.
- Drechsel, D. A. and M. Patel (2008). "Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease." *Free Radic Biol Med* **44**(11): 1873-1886.
- Dunbar, D. R., P. A. Moonie, et al. (1995). "Different cellular backgrounds confer a marked advantage to either mutant or wild-type mitochondrial genomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(14): 6562-6566.
- Efremov, R. G. and L. A. Sazanov "Structure of the membrane domain of respiratory complex I." *Nature* **476**(7361): 414-420.
- Egensperger, R., S. Kosel, et al. (1997). "Association of the mitochondrial tRNA(A4336G) mutation with Alzheimer's and Parkinson's diseases." *Neuropathol Appl Neurobiol* **23**(4): 315-321.
- Ekstrand, M. I., M. Falkenberg, et al. (2004). "Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals." *Hum Mol Genet* **13**(9): 935-944.
- Enriquez, J. A., P. Fernandez-Silva, et al. (1996). "The synthesis of mRNA in isolated mitochondria can be maintained for several hours and is inhibited by high levels of ATP." *Eur J Biochem* **237**(3): 601-610.
- Esser, L., B. Quinn, et al. (2004). "Crystallographic studies of quinol oxidation site inhibitors: a modified classification of inhibitors for the cytochrome bc(1) complex." *J Mol Biol* **341**(1): 281-302.
- Esteves, A. R., D. M. Arduino, et al. (2010). "Dysfunctional mitochondria uphold calpain activation: contribution to Parkinson's disease pathology." *Neurobiol Dis* **37**(3): 723-730.
- Esteves, A. R., D. M. Arduino, et al. (2009). "Oxidative stress involvement in alpha-synuclein oligomerization in Parkinson's disease cybrids." *Antioxid Redox Signal* **11**(3): 439-448.
- Esteves, A. R., A. F. Domingues, et al. (2008). "Mitochondrial function in Parkinson's disease cybrids containing an nt2 neuron-like nuclear background." *Mitochondrion* **8**(3): 219-228.
- 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.
- Fernandez-Ortuno, D., J. A. Tores, et al. (2008). "Field resistance to QoI fungicides in *Podosphaera fusca* is not supported by typical mutations in the mitochondrial cytochrome b gene." *Pest Manag Sci* **64**(7): 694-702.
- Fernandez-Silva, P., J. A. Enriquez, et al. (2003). "Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA." *Exp Physiol* **88**(1): 41-56.
- Fernandez-Silva, P., F. Martinez-Azorin, et al. (1997). "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* **16**(5): 1066-1079.

- Fernandez-Vizarra, E., J. A. Enriquez, et al. (2011). "Tissue-specific differences in mitochondrial activity and biogenesis." *Mitochondrion* **11**(1): 207-213.
- Fernandez-Vizarra, E., J. A. Enriquez, et al. (2008). "Mitochondrial gene expression is regulated at multiple levels and differentially in the heart and liver by thyroid hormones." *Curr Genet* **54**(1): 13-22.
- 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.
- Fesahat, F., M. Houshmand, et al. (2007). "Do haplogroups h and u act to increase the penetrance of Alzheimer's disease?" *Cell Mol Neurobiol* **27**(3): 329-334.
- Fisher, N., A. C. Brown, et al. (2004). "Modeling the Qo site of crop pathogens in *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome b." *Eur J Biochem* **271**(11): 2264-2271.
- Fisher, N. and B. Meunier (2008). "Molecular basis of resistance to cytochrome bc1 inhibitors." *FEMS Yeast Res* **8**(2): 183-192.
- Fisher, N. and P. R. Rich (2000). "A motif for quinone binding sites in respiratory and photosynthetic systems." *J Mol Biol* **296**(4): 1153-1162.
- 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.
- Fleming, L., J. B. Mann, et al. (1994). "Parkinson's disease and brain levels of organochlorine pesticides." *Ann Neurol* **36**(1): 100-103.
- Floreani, M., E. Napoli, et al. (2005). "Antioxidant defences in cybrids harboring mtDNA mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy." *FEBS J* **272**(5): 1124-1135.
- Gabridge, M. G. (1975). "Oxygen consumption by trachea organ cultures infected with *Mycoplasma pneumoniae*." *Infect Immun* **12**(3): 544-549.
- Gaines, G., C. Rossi, et al. (1987). "Markedly different ATP requirements for rRNA synthesis and mtDNA light strand transcription versus mRNA synthesis in isolated human mitochondria." *J Biol Chem* **262**(4): 1907-1915.
- Gallardo, M. E., R. Moreno-Loshuertos, et al. (2006). "m.6267G>A: a recurrent mutation in the human mitochondrial DNA that reduces cytochrome c oxidase activity and is associated with tumors." *Hum Mutat* **27**(6): 575-582.
- Gao, X., X. Wen, 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**(30): 9067-9080.
- Gao, X., X. Wen, et al. (2002). "The crystal structure of mitochondrial cytochrome bc1 in complex with famoxadone: the role of aromatic-aromatic interaction in inhibition." *Biochemistry* **41**(39): 11692-11702.
- Gardner, P. R. (2002). "Aconitase: sensitive target and measure of superoxide." *Methods Enzymol* **349**: 9-23.
- Gardner, P. R., D. D. Nguyen, et al. (1994). "Aconitase is a sensitive and critical target of oxygen poisoning in cultured mammalian cells and in rat lungs." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(25): 12248-12252.
- Gaweda-Walerych, K., A. Maruszak, et al. (2008). "Mitochondrial DNA haplogroups and subhaplogroups are associated with Parkinson's disease risk in a Polish PD cohort." *J Neural Transm*.
- Gaweda-Walerych, K., A. Maruszak, et al. (2008). "Mitochondrial DNA haplogroups and subhaplogroups are associated with Parkinson's disease risk in a Polish PD cohort." *J Neural Transm* **115**(11): 1521-1526.
- Geromel, V., N. Darin, et al. (2002). "Coenzyme Q(10) and idebenone in the therapy of respiratory chain diseases: rationale and comparative benefits." *Mol Genet Metab* **77**(1-2): 21-30.
- Ghelli, A., A. M. Porcelli, et al. (2008). "Protection against oxidant-induced apoptosis by exogenous glutathione in Leber hereditary optic neuropathy cybrids." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **49**(2): 671-676.
- Ghelli, A., A. M. Porcelli, et al. (2009). "The background of mitochondrial DNA haplogroup J increases the sensitivity of Leber's hereditary optic neuropathy cells to 2,5-hexanedione toxicity." *PLoS ONE* **4**(11): e7922.

- Ghelli, A., C. Zanna, et al. (2003). "Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) pathogenic mutations induce mitochondrial-dependent apoptotic death in transmitochondrial cells incubated with galactose medium." *J Biol Chem* **278**(6): 4145-4150.
- Ghezzi, D., C. Marelli, et al. (2005). "Mitochondrial DNA haplogroup K is associated with a lower risk of Parkinson's disease in Italians." *Eur J Hum Genet* **13**(6): 748-752.
- 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., M. Montopoli, et al. (2010). "Oestrogens ameliorate mitochondrial dysfunction in Leber's hereditary optic neuropathy." *Brain*.
- Gnaiger, E. (2003). "Oxygen conformance of cellular respiration. A perspective of mitochondrial physiology." *Adv Exp Med Biol* **543**: 39-55.
- Gnaiger, E., R. Steinlechner-Maran, et al. (1995). "Control of mitochondrial and cellular respiration by oxygen." *J Bioenerg Biomembr* **27**(6): 583-596.
- 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.
- Gomez-Duran, A., D. Pacheu-Grau, et al. (2011) "Mitochondrial pharma-Q-genomics: targeting the OXPHOS cytochrome b." *Drug Discov Today* **16**(5-6): 176-180.
- Gormley, P. D., C. E. Pavesio, et al. (1998). "Effects of drug therapy on Toxoplasma cysts in an animal model of acute and chronic disease." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39**(7): 1171-1175.
- Gosset, P., B. Wallaert, et al. (1999). "Thiol regulation of the production of TNF-alpha, IL-6 and IL-8 by human alveolar macrophages." *Eur Respir J* **14**(1): 98-105.
- Graziewicz, M. A., M. J. Longley, et al. (2006). "DNA polymerase gamma in mitochondrial DNA replication and repair." *Chem Rev* **106**(2): 383-405.
- Green, D. and G. Kroemer (1998). "The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria?" *Trends Cell Biol* **8**(7): 267-271.
- Green, D. R. and J. C. Reed (1998). "Mitochondria and apoptosis." *Science* **281**(5381): 1309-1312.
- Grishanin, R. N., S. I. Bibikov, et al. (1996). "delta psi-mediated signalling in the bacteriorhodopsin-dependent photoresponse." *J Bacteriol* **178**(11): 3008-3014.
- Gu, M., J. M. Cooper, et al. (1998). "Mitochondrial DNA transmission of the mitochondrial defect in Parkinson's disease." *Ann Neurol* **44**(2): 177-186.
- Guan, M. X., N. Fischel-Ghodsian, et al. (1996). "Biochemical evidence for nuclear gene involvement in phenotype of non-syndromic deafness associated with mitochondrial 12S rRNA mutation." *Hum Mol Genet* **5**(7): 963-971.
- Guarnieri, M., B. Stechmiller, et al. (1971). "Use of an antibody to study the location of cardiolipin in mitochondrial membranes." *J Biol Chem* **246**(24): 7526-7532.
- Haas, R. H., F. Nasirian, et al. (1995). "Low platelet mitochondrial complex I and complex II/III activity in early untreated Parkinson's disease." *Ann Neurol* **37**(6): 714-722.
- Haefeli, R. H., M. Erb, et al. (2011). "NQO1-dependent redox cycling of idebenone: effects on cellular redox potential and energy levels." *PLoS One* **6**(3): e17963.
- Hao, H. and C. T. Moraes (1996). "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* **271**(4): 2347-2352.
- Hao, H. and C. T. Moraes (1997). "A disease-associated G5703A mutation in human mitochondrial DNA causes a conformational change and a marked decrease in steady-state levels of mitochondrial tRNA(Asn)." *Mol Cell Biol* **17**(12): 6831-6837.
- 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.
- Harper, M. E., K. Green, et al. (2008). "The efficiency of cellular energy transduction and its implications for obesity." *Annu Rev Nutr* **28**: 13-33.
- Hayashi, J., S. Ohta, et al. (1991). "Introduction of disease-related mitochondrial DNA deletions into HeLa cells lacking mitochondrial DNA results in mitochondrial dysfunction." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(23): 10614-10618.
- Hermann, T. (2007). "Aminoglycoside antibiotics: old drugs and new therapeutic approaches." *Cell Mol Life Sci* **64**(14): 1841-1852.

- Herrnstadt, C. and N. Howell (2004). "An evolutionary perspective on pathogenic mtDNA mutations: haplogroup associations of clinical disorders." Mitochondrion **4**(5-6): 791-798.
- Hinttala, R., M. Kervinen, et al. (2010). "Analysis of functional consequences of haplogroup J polymorphisms m.4216T>C and m.3866T>C in human MT-ND1: mutagenesis of homologous positions in Escherichia coli." Mitochondrion **10**(4): 358-361.
- Hofmann, S., R. Bezold, et al. (1997). "Wolfram (DIDMOAD) syndrome and Leber hereditary optic neuropathy (LHON) are associated with distinct mitochondrial DNA haplotypes." Genomics **39**(1): 8-18.
- Hofmann, S., M. Jaksch, et al. (1997). "Population genetics and disease susceptibility: characterization of central European haplogroups by mtDNA gene mutations, correlation with D loop variants and association with disease." Hum Mol Genet **6**(11): 1835-1846.
- Holt, I. J., A. E. Harding, et al. (1988). "Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies." Nature **331**(6158): 717-719.
- Holt, I. J., H. E. Lorimer, et al. (2000). "Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA." Cell **100**(5): 515-524.
- Houshmand, M., M. H. Sanati, et al. (2005). "Population screening for association of mitochondrial haplogroups BM, J, K and M with multiple sclerosis: interrelation between haplogroup J and MS in Persian patients." Mult Scler **11**(6): 728-730.
- Houshmand, M., F. Sharifpanah, et al. (2004). "Leber's hereditary optic neuropathy: the spectrum of mitochondrial DNA mutations in Iranian patients." Ann N Y Acad Sci **1011**: 345-349.
- Howell, N. (1998). "Leber hereditary optic neuropathy: respiratory chain dysfunction and degeneration of the optic nerve." Vision Res **38**(10): 1495-1504.
- Howell, N., C. Herrnstadt, et al. (2003). "Low penetrance of the 14484 LHON mutation when it arises in a non-haplogroup J mtDNA background." Am J Med Genet A **119A**(2): 147-151.
- Hudson, E. K., B. A. Hogue, et al. (1998). "Age-associated change in mitochondrial DNA damage." Free Radic Res **29**(6): 573-579.
- Hudson, G., V. Carelli, et al. (2007). "X-Inactivation patterns in females harboring mtDNA mutations that cause Leber hereditary optic neuropathy." Mol Vis **13**: 2339-2343.
- 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.
- Hudson, G. and P. F. Chinnery (2006). "Mitochondrial DNA polymerase-gamma and human disease." Hum Mol Genet **15 Spec No 2**: R244-252.
- Huerta, C., M. G. Castro, et al. (2005). "Mitochondrial DNA polymorphisms and risk of Parkinson's disease in Spanish population." J Neurol Sci **236**(1-2): 49-54.
- Hutter, E., H. Unterluggauer, et al. (2006). "High-resolution respirometry--a modern tool in aging research." Exp Gerontol **41**(1): 103-109.
- Indo, H. P., M. Davidson, et al. (2007). "Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage." Mitochondrion **7**(1-2): 106-118.
- Iwata, T., M. L. Paddock, et al. (2009). "Identification of FTIR bands due to internal water molecules around the quinone binding sites in the reaction center from Rhodospirillum rubrum." Biochemistry **48**(6): 1220-1229.
- Jastroch, M., A. S. Divakaruni, et al. (2010). "Mitochondrial proton and electron leaks." Essays Biochem **47**: 53-67.
- Jenuth, J. P., A. C. Peterson, et al. (1996). "Random genetic drift in the female germline explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial DNA." Nat Genet **14**(2): 146-151.
- Ji, Y., A. M. Zhang, et al. (2008). "Mitochondrial DNA haplogroups M7b1'2 and M8a affect clinical expression of leber hereditary optic neuropathy in Chinese families with the m.11778G-->a mutation." Am J Hum Genet **83**(6): 760-768.
- Kaaman, M., L. M. Sparks, et al. (2007). "Strong association between mitochondrial DNA copy number and lipogenesis in human white adipose tissue." Diabetologia **50**(12): 2526-2533.

- Karamanlidis, G., L. Nascimben, et al. (2010). "Defective DNA replication impairs mitochondrial biogenesis in human failing hearts." *Circ Res* **106**(9): 1541-1548.
- Kazuno, A. A., K. Munakata, et al. (2007). "Mitochondrial DNA-dependent effects of valproate on mitochondrial calcium levels in transmitochondrial cybrids." *Int J Neuropsychopharmacol*: 1-8.
- Kazuno, A. A., K. Munakata, et al. (2006). "Identification of mitochondrial DNA polymorphisms that alter mitochondrial matrix pH and intracellular calcium dynamics." *PLoS Genet* **2**(8): e128.
- Keeney, P. M., J. Xie, et al. (2006). "Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled." *J Neurosci* **26**(19): 5256-5264.
- Khusnutdinova, E., I. Gilyazova, et al. (2008). "A mitochondrial etiology of neurodegenerative diseases: evidence from Parkinson's disease." *Ann N Y Acad Sci* **1147**: 1-20.
- King, M. P. and G. Attardi (1989). "Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation." *Science* **246**(4929): 500-503.
- King, M. P. and G. Attardi (1993). "Post-transcriptional regulation of the steady-state levels of mitochondrial tRNAs in HeLa cells." *J Biol Chem* **268**(14): 10228-10237.
- King, M. P. and G. Attardi (1996). "Isolation of human cell lines lacking mitochondrial DNA." *Methods Enzymol* **264**: 304-313.
- King, T. E. (1966). "Reconstitution of the respiratory chain." *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **28**: 155-236.
- Kirkman, M. A., P. Yu-Wai-Man, et al. (2009). "Gene-environment interactions in Leber hereditary optic neuropathy." *Brain* **132**(Pt 9): 2317-2326.
- Kitazawa, M., V. Anantharam, et al. (2001). "Dieldrin-induced oxidative stress and neurochemical changes contribute to apoptotic cell death in dopaminergic cells." *Free Radic Biol Med* **31**(11): 1473-1485.
- Koch, C. J. and J. E. Biaglow (1983). "Cyanide insensitive respiration in mammalian cells: an artifact of mycoplasmal contamination." *Adv Exp Med Biol* **159**: 337-345.
- Krahenbuhl, S., T. Schafer, et al. (1996). "Determination of the activities of the enzyme complexes of the electron transport chain in human fibroblasts." *Clin Chim Acta* **253**(1-2): 79-90.
- Krahenbuhl, S., C. Talos, et al. (1994). "Development and evaluation of a spectrophotometric assay for complex III in isolated mitochondria, tissues and fibroblasts from rats and humans." *Clin Chim Acta* **230**(2): 177-187.
- Kraytsberg, Y., M. Schwartz, et al. (2004). "Recombination of human mitochondrial DNA." *Science* **304**(5673): 981.
- Kroger, A. and M. Klingenberg (1973). "Further evidence for the pool function of ubiquinone as derived from the inhibition of the electron transport by antimycin." *Eur J Biochem* **39**(2): 313-323.
- 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.
- Kucharczyk, R., M. Zick, et al. (2009). "Mitochondrial ATP synthase disorders: molecular mechanisms and the quest for curative therapeutic approaches." *Biochim Biophys Acta* **1793**(1): 186-199.
- Kulawiec, M., K. M. Owens, et al. (2009). "mtDNA G10398A variant in African-American women with breast cancer provides resistance to apoptosis and promotes metastasis in mice." *J Hum Genet* **54**(11): 647-654.
- Laderman, K. A., J. R. Penny, et al. (1996). "Aging-dependent functional alterations of mitochondrial DNA (mtDNA) from human fibroblasts transferred into mtDNA-less cells." *J Biol Chem* **271**(27): 15891-15897.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-685.
- Lamminen, T., K. Huoponen, et al. (1997). "mtDNA haplotype analysis in Finnish families with leber hereditary optic neuroretinopathy." *Eur J Hum Genet* **5**(5): 271-279.
- Latsoudis, H., C. Spanaki, et al. (2008). "Mitochondrial DNA polymorphisms and haplogroups in Parkinson's disease and control individuals with a similar genetic background." *J Hum Genet* **53**(4): 349-356.

- Li, X., L. S. Zhang, et al. (2005). "Biochemical characterization of the deafness-associated mitochondrial tRNA^{Ser}(UCN) A7445G mutation in osteosarcoma cell cybrids." Biochem Biophys Res Commun **328**(2): 491-498.
- Lopez-Gallardo, E., R. Iceta, et al. (2011). "OXPHOS toxicogenomics and Parkinson's disease." Mutat Res **728**(3): 98-106.
- Lopez-Gallardo, E., A. Solano, et al. (2009). "NARP syndrome in a patient harbouring an insertion in the MT-ATP6 gene that results in a truncated protein." J Med Genet **46**(1): 64-67.
- Ma, Y., R. K. Bai, et al. (2010). "Mitochondrial dysfunction in human breast cancer cells and their transmitochondrial cybrids." Biochim Biophys Acta **1797**(1): 29-37.
- 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.
- Man, P. Y., D. M. Turnbull, et al. (2002). "Leber hereditary optic neuropathy." J Med Genet **39**(3): 162-169.
- Marcuello, A., J. Gonzalez-Alonso, et al. (2005). "Skeletal muscle mitochondrial DNA content in exercising humans." J Appl Physiol **99**(4): 1372-1377.
- Marcuello, A., D. Martinez-Redondo, et al. (2009). "Human mitochondrial variants influence on oxygen consumption." Mitochondrion **9**(1): 27-30.
- Martinez-Redondo, D., A. Marcuello, et al. (2010). "Human mitochondrial haplogroup H: the highest VO₂max consumer--is it a paradox?" Mitochondrion **10**(2): 102-107.
- Maruszak, A., K. Gaweda-Walerych, et al. (2006). "Mitochondrial DNA in pathogenesis of Alzheimer's and Parkinson's diseases." Acta Neurobiol Exp (Wars) **66**(2): 153-176.
- Masucci, J. P., M. Davidson, et al. (1995). "In vitro analysis of mutations causing myoclonus epilepsy with ragged-red fibers in the mitochondrial tRNA(Lys) gene: two genotypes produce similar phenotypes." Mol Cell Biol **15**(5): 2872-2881.
- McDonnell, M. T., A. M. Schaefer, et al. (2004). "Noninvasive diagnosis of the 3243A > G mitochondrial DNA mutation using urinary epithelial cells." Eur J Hum Genet **12**(9): 778-781.
- McKenzie, M., D. Liolitsa, et al. (2007). "Mitochondrial ND5 gene variation associated with encephalomyopathy and mitochondrial ATP consumption." J Biol Chem **282**(51): 36845-36852.
- 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, S. W., P. A. Trimmer, et al. (1996). "Creation and characterization of mitochondrial DNA-depleted cell lines with "neuronal-like" properties." J Neurochem **67**(5): 1897-1907.
- 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.
- Mitchell, P. (1961). "Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism." Nature **191**: 144-148.
- Mitchell, P. (1975). "The protonmotive Q cycle: a general formulation." FEBS Lett **59**(2): 137-139.
- Montiel-Sosa, F., E. Ruiz-Pesini, et al. (2006). "Differences of sperm motility in mitochondrial DNA haplogroup U sublineages." Gene **368**: 21-27.
- 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., D. Ojala, et al. (1981). "Distinctive features of the 5'-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs." Nature **290**(5806): 465-470.
- Moreno-Loshuertos, R., R. Acin-Perez, et al. (2006). "Differences in reactive oxygen species production explain the phenotypes associated with common mouse mitochondrial DNA variants." Nat Genet **38**(11): 1261-1268.

- Moreno-Loshuertos, R., G. Ferrin, et al. (2011). "Evolution meets disease: penetrance and functional epistasis of mitochondrial tRNA mutations." *PLoS Genet* **7**(4): e1001379.
- Muftuoglu, M., B. Elibol, et al. (2004). "Mitochondrial complex I and IV activities in leukocytes from patients with parkin mutations." *Mov Disord* **19**(5): 544-548.
- Mukhopadhyay, P., M. Rajesh, et al. (2007). "Simultaneous detection of apoptosis and mitochondrial superoxide production in live cells by flow cytometry and confocal microscopy." *Nat Protoc* **2**(9): 2295-2301.
- Murphy, W. I., B. Attardi, et al. (1975). "Evidence for complete symmetrical transcription in vivo of mitochondrial DNA in HeLa cells." *J Mol Biol* **99**(4): 809-814.
- Nakagawa-Hattori, Y., H. Yoshino, et al. (1992). "Is Parkinson's disease a mitochondrial disorder?" *J Neurol Sci* **107**(1): 29-33.
- Nass, M. M. and S. Nass (1963). "Intramitochondrial Fibers with DNA Characteristics. I. Fixation and Electron Staining Reactions." *J Cell Biol* **19**: 593-611.
- Navarro, A. and A. Boveris (2007). "Brain mitochondrial dysfunction in aging: conditions that improve survival, neurological performance and mitochondrial function." *Front Biosci* **12**: 1154-1163.
- Navarro, A., M. J. Sanchez Del Pino, et al. (2002). "Behavioral dysfunction, brain oxidative stress, and impaired mitochondrial electron transfer in aging mice." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **282**(4): R985-992.
- Nicoletti, I., G. Migliorati, et al. (1991). "A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry." *J Immunol Methods* **139**(2): 271-279.
- Niemi, A. K., A. Hervonen, et al. (2003). "Mitochondrial DNA polymorphisms associated with longevity in a Finnish population." *Hum Genet* **112**(1): 29-33.
- Niemi, A. K. and K. Majamaa (2005). "Mitochondrial DNA and ACTN3 genotypes in Finnish elite endurance and sprint athletes." *Eur J Hum Genet* **13**(8): 965-969.
- Nishioka, T., A. Soemantri, et al. (2004). "mtDNA/nDNA ratio in 14484 LHON mitochondrial mutation carriers." *J Hum Genet* **49**(12): 701-705.
- Ojala, D., J. Montoya, et al. (1981). "tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria." *Nature* **290**(5806): 470-474.
- Okura, T., M. Koda, et al. (2003). "Association of the mitochondrial DNA 15497G/A polymorphism with obesity in a middle-aged and elderly Japanese population." *Hum Genet* **113**(5): 432-436.
- Onyango, I. G., J. B. Tuttle, et al. (2005). "Brain-derived growth factor and glial cell line-derived growth factor use distinct intracellular signaling pathways to protect PD cybrids from H₂O₂-induced neuronal death." *Neurobiol Dis* **20**(1): 141-154.
- Otaegui, D., A. Saenz, et al. (2004). "Mitochondrial haplogroups in Basque multiple sclerosis patients." *Mult Scler* **10**(5): 532-535.
- Pacheu-Grau, D., A. Gomez-Duran, et al. (2011). "'Progress' renders detrimental an ancient mitochondrial DNA genetic variant." *Hum Mol Genet* **20**(21): 4224-4231.
- 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.
- Padalko, V. I. (2005). "Uncoupler of oxidative phosphorylation prolongs the lifespan of *Drosophila*." *Biochemistry (Mosc)* **70**(9): 986-989.
- Pakendorf, B. and M. Stoneking (2005). "Mitochondrial DNA and human evolution." *Annu Rev Genomics Hum Genet* **6**: 165-183.
- Palanichamy, M. G., C. Sun, et al. (2004). "Phylogeny of mitochondrial DNA macrohaplogroup N in India, based on complete sequencing: implications for the peopling of South Asia." *Am J Hum Genet* **75**(6): 966-978.
- Pallotti, F., A. Baracca, et al. (2004). "Biochemical analysis of respiratory function in cybrid cell lines harbouring mitochondrial DNA mutations." *Biochem J* **384**(Pt 2): 287-293.
- Parasassi, T., R. Brunelli, et al. (2010). "Thiol redox transitions in cell signaling: a lesson from N-acetylcysteine." *ScientificWorldJournal* **10**: 1192-1202.
- Park, C. B. and N. G. Larsson (2011). "Mitochondrial DNA mutations in disease and aging." *J Cell Biol* **193**(5): 809-818.

- Park, J. S., L. K. Sharma, et al. (2009). "A heteroplasmic, not homoplasmic, mitochondrial DNA mutation promotes tumorigenesis via alteration in reactive oxygen species generation and apoptosis." *Hum Mol Genet* **18**(9): 1578-1589.
- Pellegrini, M., J. Asin-Cayuela, et al. (2009). "MTERF2 is a nucleoid component in mammalian mitochondria." *Biochim Biophys Acta* **1787**(5): 296-302.
- Pello, R., M. A. Martin, et al. (2008). "Mitochondrial DNA background modulates the assembly kinetics of OXPHOS complexes in a cellular model of mitochondrial disease." *Hum Mol Genet* **17**(24): 4001-4011.
- Pello, R., M. A. Martin, et al. (2008). "Mitochondrial DNA background modulates the assembly kinetics of OXPHOS complexes in a cellular model of mitochondrial disease." *Hum Mol Genet*.
- 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.
- Pereira, L., P. Soares, et al. (2011). "Comparing phylogeny and the predicted pathogenicity of protein variations reveals equal purifying selection across the global human mtDNA diversity." *Am J Hum Genet* **88**(4): 433-439.
- Peters, J. M., N. Chen, et al. (2002). "Mutations in cytochrome b resulting in atovaquone resistance are associated with loss of fitness in *Plasmodium falciparum*." *Antimicrob Agents Chemother* **46**(8): 2435-2441.
- Petit, J. M., O. Huet, et al. (1994). "Direct analysis and significance of cardiolipin transverse distribution in mitochondrial inner membranes." *Eur J Biochem* **220**(3): 871-879.
- Petit, J. M., A. Maftah, et al. (1992). "10N-nonyl acridine orange interacts with cardiolipin and allows the quantification of this phospholipid in isolated mitochondria." *Eur J Biochem* **209**(1): 267-273.
- Petit, P. X., M. Goubern, et al. (1998). "Disruption of the outer mitochondrial membrane as a result of large amplitude swelling: the impact of irreversible permeability transition." *FEBS Lett* **426**(1): 111-116.
- Pochini, L., M. Galluccio, et al. (2008). "Interaction of beta-lactam antibiotics with the mitochondrial carnitine/acylcarnitine transporter." *Chem Biol Interact* **173**(3): 187-194.
- Prieto-Martin, A., J. Montoya, et al. (2001). "A study on the human mitochondrial RNA polymerase activity points to existence of a transcription factor B-like protein." *FEBS Lett* **503**(1): 51-55.
- Pyle, A., T. Foltynie, et al. (2005). "Mitochondrial DNA haplogroup cluster UKJT reduces the risk of PD." *Ann Neurol* **57**(4): 564-567.
- Quintana-Murci, L., R. Chaix, et al. (2004). "Where west meets east: the complex mtDNA landscape of the southwest and Central Asian corridor." *Am J Hum Genet* **74**(5): 827-845.
- Radloff, P. D., J. Philipps, et al. (1996). "Atovaquone and proguanil for *Plasmodium falciparum* malaria." *Lancet* **347**(9014): 1511-1514.
- Renner, K., A. Amberger, et al. (2003). "Changes of mitochondrial respiration, mitochondrial content and cell size after induction of apoptosis in leukemia cells." *Biochim Biophys Acta* **1642**(1-2): 115-123.
- 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.
- Reynier, P., I. Penisson-Besnier, et al. (1999). "mtDNA haplogroup J: a contributing factor of optic neuritis." *Eur J Hum Genet* **7**(3): 404-406.
- Rhouda, T., D. Martinez-Redondo, et al. (2009). "Moroccan mitochondrial genetic background suggests prehistoric human migrations across the Gibraltar Strait." *Mitochondrion* **9**(6): 402-407.
- Riccardi, C. and I. Nicoletti (2006). "Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry." *Nat Protoc* **1**(3): 1458-1461.
- Robberson, D. L. and D. A. Clayton (1972). "Replication of mitochondrial DNA in mouse L cells and their thymidine kinase - derivatives: displacement replication on a covalently-closed circular template." *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**(12): 3810-3814.
- Robin, E. D. and R. Wong (1988). "Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells." *J Cell Physiol* **136**(3): 507-513.

- 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.
- Rocher, C., J. W. Taanman, et al. (2008). "Influence of mitochondrial DNA level on cellular energy metabolism: implications for mitochondrial diseases." J Bioenerg Biomembr **40**(2): 59-67.
- Rolfe, D. F. and M. D. Brand (1996). "Contribution of mitochondrial proton leak to skeletal muscle respiration and to standard metabolic rate." Am J Physiol **271**(4 Pt 1): C1380-1389.
- 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.
- Rose, G., G. Passarino, et al. (2001). "Paradoxes in longevity: sequence analysis of mtDNA haplogroup J in centenarians." Eur J Hum Genet **9**(9): 701-707.
- Ross, O. A., R. McCormack, et al. (2001). "Mitochondrial DNA polymorphism: its role in longevity of the Irish population." Exp Gerontol **36**(7): 1161-1178.
- Ross, O. A., R. McCormack, et al. (2003). "mt4216C variant in linkage with the mtDNA T1 cluster may confer a susceptibility to mitochondrial dysfunction resulting in an increased risk of Parkinson's disease in the Irish." Exp Gerontol **38**(4): 397-405.
- 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., E. Lopez-Gallardo, et al. (2006). "[Diseases of the human mitochondrial oxidative phosphorylation system]." Rev Neurol **43**(7): 416-424.
- 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.
- Ruiz De Mena, I., E. Lefai, et al. (2000). "Regulation of mitochondrial single-stranded DNA-binding protein gene expression links nuclear and mitochondrial DNA replication in drosophila." J Biol Chem **275**(18): 13628-13636.
- Sagan, L. (1967). "On the origin of mitosing cells." J Theor Biol **14**(3): 255-274.
- Saillard, J., P. J. Magalhaes, et al. (2000). "Mitochondrial DNA variant 11719G is a marker for the mtDNA haplogroup cluster HV." Hum Biol **72**(6): 1065-1068.
- Sala, G., F. Trombin, et al. (2008). "Antioxidants partially restore glutamate transport defect in leber hereditary optic neuropathy cybrids." J Neurosci Res **86**(15): 3331-3337.
- SanGiovanni, J. P., D. E. Arking, et al. (2009). "Mitochondrial DNA variants of respiratory complex I that uniquely characterize haplogroup T2 are associated with increased risk of age-related macular degeneration." PLoS ONE **4**(5): e5508.
- Saraste, M. (1999). "Oxidative phosphorylation at the fin de siecle." Science **283**(5407): 1488-1493.
- Sarikaya, I., H. Apaydin, et al. (2006). "Cyanide-induced parkinsonism and F-18 FDG PET/CT findings." Clin Nucl Med **31**(6): 363-364.
- Schagger, H. and G. von Jagow (1987). "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa." Anal Biochem **166**(2): 368-379.
- Schapira, A. H., J. M. Cooper, et al. (1989). "Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease." Lancet **1**(8649): 1269.
- Schultz, J. and R. J. Wiesner (2000). "Proliferation of mitochondria in chronically stimulated rabbit skeletal muscle--transcription of mitochondrial genes and copy number of mitochondrial DNA." J Bioenerg Biomembr **32**(6): 627-634.
- Seibel, N. L., P. G. Steinherz, et al. (2008). "Early postinduction intensification therapy improves survival for children and adolescents with high-risk acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group." Blood **111**(5): 2548-2555.
- Seibel, P., C. Di Nunno, et al. (2008). "Cosegregation of novel mitochondrial 16S rRNA gene mutations with the age-associated T414G variant in human cybrids." Nucleic Acids Res **36**(18): 5872-5881.

- Sgarbi, G., A. Baracca, et al. (2006). "Inefficient coupling between proton transport and ATP synthesis may be the pathogenic mechanism for NARP and Leigh syndrome resulting from the T8993G mutation in mtDNA." *Biochem J* **395**(3): 493-500.
- Sgarbi, G., G. A. Casalena, et al. (2009). "Human NARP mitochondrial mutation metabolism corrected with alpha-ketoglutarate/aspartate: a potential new therapy." *Arch Neurol* **66**(8): 951-957.
- Shafa Shariat Panahi, M., M. Houshmand, et al. (2006). "Mitochondrial D-loop variation in leber hereditary neuropathy patients harboring primary G11778A, G3460A, T14484C mutations: J and W haplogroups as high-risk factors." *Arch Med Res* **37**(8): 1028-1033.
- Shankar, S. P., J. H. Fingert, et al. (2008). "Evidence for a novel x-linked modifier locus for leber hereditary optic neuropathy." *Ophthalmic Genet* **29**(1): 17-24.
- Sheehan, J. P., R. H. Swerdlow, et al. (1997). "Altered calcium homeostasis in cells transformed by mitochondria from individuals with Parkinson's disease." *J Neurochem* **68**(3): 1221-1233.
- Shibanuma, M., T. Kuroki, et al. (1994). "Inhibition by N-acetyl-L-cysteine of interleukin-6 mRNA induction and activation of NF kappa B by tumor necrosis factor alpha in a mouse fibroblastic cell line, Balb/3T3." *FEBS Lett* **353**(1): 62-66.
- Shinde, S. and K. Pasupathy (2006). "Respiratory-chain enzyme activities in isolated mitochondria of lymphocytes from patients with Parkinson's disease: preliminary study." *Neurol India* **54**(4): 390-393.
- Shinkarev, V. P., N. B. Ugulava, 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**(46): 14232-14237.
- Shoffner, J. M., R. L. Watts, et al. (1991). "Mitochondrial oxidative phosphorylation defects in Parkinson's disease." *Ann Neurol* **30**(3): 332-339.
- Simon, D. K., S. M. Pulst, et al. (1999). "Familial multisystem degeneration with parkinsonism associated with the 11778 mitochondrial DNA mutation." *Neurology* **53**(8): 1787-1793.
- Skulachev, V. P. (1996). "Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants." *Q Rev Biophys* **29**(2): 169-202.
- Skulachev, V. P. (2004). "Mitochondria, reactive oxygen species and longevity: some lessons from the Barja group." *Aging Cell* **3**(1): 17-19.
- Spelbrink, J. N. (2011). "Functional organization of mammalian mitochondrial DNA in nucleoids: history, recent developments, and future challenges." *IUBMB Life* **62**(1): 19-32.
- Stoneking, M. (1994). "Mitochondrial DNA and human evolution." *J Bioenerg Biomembr* **26**(3): 251-259.
- Stoneking, M. and H. Soodyall (1996). "Human evolution and the mitochondrial genome." *Curr Opin Genet Dev* **6**(6): 731-736.
- Strehlow, K., S. Rotter, et al. (2003). "Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen." *Circ Res* **93**(2): 170-177.
- Sudoyo, H., H. Suryadi, et al. (2002). "Asian-specific mtDNA backgrounds associated with the primary G11778A mutation of Leber's hereditary optic neuropathy." *J Hum Genet* **47**(11): 594-604.
- Suissa, S., Z. Wang, et al. (2009). "Ancient mtDNA genetic variants modulate mtDNA transcription and replication." *PLoS Genet* **5**(5): e1000474.
- Sun, G., X. Xu, et al. (2008). "Mycoplasma pneumoniae infection induces reactive oxygen species and DNA damage in A549 human lung carcinoma cells." *Infect Immun* **76**(10): 4405-4413.
- Sutovsky, P., R. D. Moreno, et al. (2000). "Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos." *Biol Reprod* **63**(2): 582-590.
- Sutovsky, P., J. Ramalho-Santos, et al. (1999). "On-stage selection of single round spermatids using a vital, mitochondrion-specific fluorescent probe MitoTracker(TM) and high resolution differential interference contrast microscopy." *Hum Reprod* **14**(9): 2301-2312.
- Swartz, N. and P. J. Savino (1994). "Is all nondefinable optic atrophy Leber's hereditary optic neuropathy?" *Surv Ophthalmol* **39**(2): 146-150.

- Swerdlow, R. H. (2007). "Mitochondria in cybrids containing mtDNA from persons with mitochondrialriopathies." J Neurosci Res.
- Swerdlow, R. H., J. K. Parks, et al. (2001). "Biochemical analysis of cybrids expressing mitochondrial DNA from Contursi kindred Parkinson's subjects." Exp Neurol **169**(2): 479-485.
- Swerdlow, R. H., J. K. Parks, et al. (1998). "Matrilinial inheritance of complex I dysfunction in a multigenerational Parkinson's disease family." Ann Neurol **44**(6): 873-881.
- Swerdlow, R. H., J. K. Parks, et al. (1996). "Origin and functional consequences of the complex I defect in Parkinson's disease." Ann Neurol **40**(4): 663-671.
- Taanman, J. W. (1999). "The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication." Biochim Biophys Acta **1410**(2): 103-123.
- Taylor, R. W., M. J. Barron, et al. (2003). "Mitochondrial DNA mutations in human colonic crypt stem cells." J Clin Invest **112**(9): 1351-1360.
- Taylor, R. W. and D. M. Turnbull (2005). "Mitochondrial DNA mutations in human disease." Nat Rev Genet **6**(5): 389-402.
- Tharaphan, P., W. L. Chuenkongkaew, et al. (2006). "Mitochondrial DNA haplogroup distribution in pedigrees of Southeast Asian G11778A Leber hereditary optic neuropathy." J Neuroophthalmol **26**(4): 264-267.
- Thyagarajan, D., S. Bressman, et al. (2000). "A novel mitochondrial 12SrRNA point mutation in parkinsonism, deafness, and neuropathy." Ann Neurol **48**(5): 730-736.
- Tokuda, Y., S. Crane, et al. (2000). "The levels and kinetics of oxygen tension detectable at the surface of human dermal fibroblast cultures." J Cell Physiol **182**(3): 414-420.
- Torrioni, A., K. Huoponen, et al. (1996). "Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations." Genetics **144**(4): 1835-1850.
- Torrioni, A., M. Petrozzi, et al. (1997). "Haplotype and phylogenetic analyses suggest that one European-specific mtDNA background plays a role in the expression of Leber hereditary optic neuropathy by increasing the penetrance of the primary mutations 11778 and 14484." Am J Hum Genet **60**(5): 1107-1121.
- Torrioni, A., M. Richards, et al. (2000). "mtDNA haplogroups and frequency patterns in Europe." Am J Hum Genet **66**(3): 1173-1177.
- Trifunovic, A., A. Hansson, et al. (2005). "Somatic mtDNA mutations cause aging phenotypes without affecting reactive oxygen species production." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(50): 17993-17998.
- Trimmer, P. A., M. K. Borland, et al. (2004). "Parkinson's disease transgenic mitochondrial cybrids generate Lewy inclusion bodies." J Neurochem **88**(4): 800-812.
- Trimmer, P. A., R. H. Swerdlow, et al. (2000). "Abnormal mitochondrial morphology in sporadic Parkinson's and Alzheimer's disease cybrid cell lines." Exp Neurol **162**(1): 37-50.
- Troiano, L., R. Ferraresi, et al. (2007). "Multiparametric analysis of cells with different mitochondrial membrane potential during apoptosis by polychromatic flow cytometry." Nat Protoc **2**(11): 2719-2727.
- Trounce, I., S. Neill, et al. (1994). "Cytoplasmic transfer of the mtDNA nt 8993 T->G (ATP6) point mutation associated with Leigh syndrome into mtDNA-less cells demonstrates cosegregation with a decrease in state III respiration and ADP/O ratio." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(18): 8334-8338.
- Trumpower, B. L. (1990). "The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc1 complex." J Biol Chem **265**(20): 11409-11412.
- Trumpower, B. L. (2002). "A concerted, alternating sites mechanism of ubiquinol oxidation by the dimeric cytochrome bc(1) complex." Biochim Biophys Acta **1555**(1-3): 166-173.
- Tsao, K., P. A. Aitken, et al. (1999). "Smoking as an aetiological factor in a pedigree with Leber's hereditary optic neuropathy." Br J Ophthalmol **83**(5): 577-581.
- Tyynismaa, H., H. Sembongi, et al. (2004). "Twinkle helicase is essential for mtDNA maintenance and regulates mtDNA copy number." Hum Mol Genet **13**(24): 3219-3227.

- 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.
- van der Walt, J. M., K. K. Nicodemus, et al. (2003). "Mitochondrial polymorphisms significantly reduce the risk of Parkinson disease." *Am J Hum Genet* **72**(4): 804-811.
- Vazquez-Memije, M. E., S. Shanske, et al. (1998). "Comparative biochemical studies of ATPases in cells from patients with the T8993G or T8993C mitochondrial DNA mutations." *J Inherit Metab Dis* **21**(8): 829-836.
- Veech, G. A., J. Dennis, et al. (2000). "Disrupted mitochondrial electron transport function increases expression of anti-apoptotic bcl-2 and bcl-X(L) proteins in SH-SY5Y neuroblastoma and in Parkinson disease cybrid cells through oxidative stress." *J Neurosci Res* **61**(6): 693-700.
- Vergani, L., A. Martinuzzi, et al. (1995). "MtDNA mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy: studies on cytoplasmic hybrid (cybrid) cells." *Biochem Biophys Res Commun* **210**(3): 880-888.
- Villani, G. and G. Attardi (1997). "In vivo control of respiration by cytochrome c oxidase in wild-type and mitochondrial DNA mutation-carrying human cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(4): 1166-1171.
- Villani, G. and G. Attardi (2001). "In vivo measurements of respiration control by cytochrome c oxidase and in situ analysis of oxidative phosphorylation." *Methods Cell Biol* **65**: 119-131.
- Vives-Bauza, C., R. Gonzalo, et al. (2006). "Enhanced ROS production and antioxidant defenses in cybrids harbouring mutations in mtDNA." *Neurosci Lett* **391**(3): 136-141.
- von Kleist-Retzow, J. C., H. T. Hornig-Do, 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**(14): 3076-3089.
- Wallace, D. C. (2005). "A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine." *Annu Rev Genet* **39**: 359-407.
- Wallace, D. C., M. D. Brown, et al. (1999). "Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease." *Gene* **238**(1): 211-230.
- Wallace, D. C. and W. Fan (2010). "Energetics, epigenetics, mitochondrial genetics." *Mitochondrion* **10**(1): 12-31.
- Wallace, D. C., W. Fan, et al. (2010). "Mitochondrial energetics and therapeutics." *Annu Rev Pathol* **5**: 297-348.
- Wallace, D. C., J. M. Shoffner, et al. (1995). "Mitochondrial DNA mutations in human degenerative diseases and aging." *Biochim Biophys Acta* **1271**(1): 141-151.
- Wallace, D. C., X. X. Zheng, et al. (1988). "Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF): genetic, pathophysiological, and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease." *Cell* **55**(4): 601-610.
- Weisiger, R. A. and I. Fridovich (1973). "Superoxide dismutase. Organelle specificity." *J Biol Chem* **248**(10): 3582-3592.
- Welle, S., K. Bhatt, et al. (2003). "Reduced amount of mitochondrial DNA in aged human muscle." *J Appl Physiol* **94**(4): 1479-1484.
- Wenz, T. (2009). "PGC-1 α activation as a therapeutic approach in mitochondrial disease." *IUBMB Life* **61**(11): 1051-1062.
- Wibrand, F., K. Ravn, et al. (2001). "Multisystem disorder associated with a missense mutation in the mitochondrial cytochrome b gene." *Ann Neurol* **50**(4): 540-543.
- Winklhofer, K. F. and C. Haass (2010). "Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease." *Biochim Biophys Acta* **1802**(1): 29-44.
- Wojewoda, M., J. Duszynski, et al. (2010). "Antioxidant defence systems and generation of reactive oxygen species in osteosarcoma cells with defective mitochondria: effect of selenium." *Biochim Biophys Acta* **1797**(6-7): 890-896.
- Wong-Riley, M. T. (1989). "Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity." *Trends Neurosci* **12**(3): 94-101.
- Yasukawa, T., T. Suzuki, et al. (2000). "Modification defect at anticodon wobble nucleotide of mitochondrial tRNAs(Leu)(UUR) with pathogenic mutations of

- mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes." J Biol Chem **275**(6): 4251-4257.
- Yoneda, M., A. Chomyn, et al. (1992). "Marked replicative advantage of human mtDNA carrying a point mutation that causes the MELAS encephalomyopathy." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(23): 11164-11168.
- Yoshino, H., Y. Nakagawa-Hattori, et al. (1992). "Mitochondrial complex I and II activities of lymphocytes and platelets in Parkinson's disease." J Neural Transm Park Dis Dement Sect **4**(1): 27-34.
- Yu-Wai-Man, P., P. G. Griffiths, et al. (2011). "Mitochondrial optic neuropathies - disease mechanisms and therapeutic strategies." Prog Retin Eye Res **30**(2): 81-114.
- Yu, C. A., D. Xia, et al. (1998). "Structural basis of functions of the mitochondrial cytochrome bc1 complex." Biochim Biophys Acta **1365**(1-2): 151-158.
- Zancan, P., M. Sola-Penna, et al. (2010). "Differential expression of phosphofructokinase-1 isoforms correlates with the glycolytic efficiency of breast cancer cells." Mol Genet Metab **100**(4): 372-378.
- Zanna, C., A. Ghelli, et al. (2003). "Apoptotic cell death of cybrid cells bearing Leber's hereditary optic neuropathy mutations is caspase independent." Ann N Y Acad Sci **1010**: 213-217.
- Zanna, C., A. Ghelli, et al. (2005). "Caspase-independent death of Leber's hereditary optic neuropathy cybrids is driven by energetic failure and mediated by AIF and Endonuclease G." Apoptosis **10**(5): 997-1007.
- Zhang, J., V. A. Fitsanakis, et al. (2003). "Manganese ethylene-bis-dithiocarbamate and selective dopaminergic neurodegeneration in rat: a link through mitochondrial dysfunction." J Neurochem **84**(2): 336-346.
- 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.
- Zielonka, J. and B. Kalyanaraman (2008). "'ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis'--a critical commentary." Free Radic Biol Med **45**(9): 1217-1219.
- Zsurka, G., K. G. Hampel, et al. (2007). "Inheritance of mitochondrial DNA recombinants in double-heteroplasmic families: potential implications for phylogenetic analysis." Am J Hum Genet **80**(2): 298-305.
- Zsurka, G., Y. Kraytsberg, et al. (2005). "Recombination of mitochondrial DNA in skeletal muscle of individuals with multiple mitochondrial DNA heteroplasmy." Nat Genet **37**(8): 873-877.
- Zuo, L. and T. L. Clanton (2002). "Detection of reactive oxygen and nitrogen species in tissues using redox-sensitive fluorescent probes." Methods Enzymol **352**: 307-325.

IX. Anexos

TABLA A.I.1. HAPLOGRUPADO DE MUESTRAS. SECUENCIACION

M	HAPLOGRUPO	HVII	HVI
A1	H3	m.263A>G, m.309Ci,m.315Ci,	m.16192C>T
A2	H3	m.263A>G, m.309Ci,m.315Ci	m.16527Gi
A3	Uk	m.73A>G, m.152T>C, m.263A>G, m.315Ci, m.497C>T,	C16224, m.16519T>C
A4	U5a	m.73A>G, m.153A>G, m.195T>C, m.215A>T, m.263A>G,	m.16192A>T, m.16256C>T, m.16270C>T, m.16320C>T
A5	J1b1	m.73A>G, m.214A>T, m.215A>T, m.242C>T, m.263A>G,	m.16069C>T, m.16126T>C, m.16145G>A, m.16222C>T, m.16172C>T, m.16261C>T, m.16305A>T
A6	U5b	m.73A>G, m.150C>T, m.263A>G, m.315Ci	m.15884C>T, m.16061T>C, SE QUEDA CORTA
A7	D	m.73A>G, m.152T>C, m.211A>T, m.214A>T, m.215A>T, m.263A>G, m.482C>T,	m.16223C>T, m.16325T>C, m.16356T>C, m.16362T>C
A8	Uk	m.73A>G, m.146C>T, m.152C>T, m.263A>G ,m.309Ci, m.315Ci	m.16224T>C, m.16293A>G, m.16519G>T,
A9	I	m.73A>G, m.199T>C, m.250T>C, m.263A>G, m.411G>C, m.414T>G	m.16129G>A, m.16223C>T, m.16148C>T, m.16391G>A, m.16413T>G
A10	U5a	m.73A>G, m.263A>G,m.315Ci	m.16192A>T, m.16256C>T, m.16270C>T, m.16526G>A
A11	H1	FS	FS
A12	V	m.73A>G, m.186C>T, m.309Ci, m.315Ci	m.16298T>C, m.16519T>C,
A13	J2	m.73A>G, m.185G>A, m.188A>G, m.228G>A, m.263A>G, m.295C>T, m.309Ci, m.315Ci, m.462C>T, m.489T>C,	m.16069CT, m.16126T>C, m.16278C>T, m.16366C>T
A14	H*	m.263A>G,m.309Ci,m.315Ci,	m.16129G>A, m.16519T>C
A15	V	m.150C>T, m.263A>G, i308C, m.309Ci, m.315Ci,	m.16298T>C, m.16519T>C
A16	H*	FS	FS
A17	B	m.263A>G,FS	m.16189T>C
A18	H3	m.263A>G,m.315Ci	m.16519C>T
A19	H3	m.263A>G,m.315Ci	m.16519TC
A20	HV	m.58Ci, m.64C>T, m.309Ci, m.315Ci	m.16126T>C, m.16362T>C
A21	H1	FS	FS
A22	H	m.263A>G,m.315Ci, m.477T>C	FS
A23	H*	FS	m.16157T>G, m.16184C>T, m.16311C>G
A24	H*	m.43Ci, m.55T>C, m.57T>C, T146, m.199T>C, m.265A>G, m.309Ci,	m.16184C>T
A25	H1	m.150C>T, m.263A>G	m.15946C>T
A26	H1	m.182C>T, m.200A>G, m.263A>G,	m.16519T>G
A27	H1	FS	FS
A28	H1	m.263A>G,m.309Ci,m.315Ci	m.16519T>C
A29	T	m.73A>G, m.122C>A, FS	m.15928G>A, m.16126T>C, m.16148C>T, m.16294C>T, m.16296C>T, m.16304TC, m.16470Gi
A30	H1	m.152T>C, .m263A>G,m.315Ci	m.16183A>C, m.16189T>C, m.16239C>T, m.16519T>C
A31	H1	m.263A>G,m.315Ci, FS	m.16188C>G, m.16189T>C, m.16311T>C, 16352C, m.16519T>C,
A32	J2	m.73A>G, m.185G>A, m.228G>A, m.299C>T, m.462C>T, m.489T>C	m.15492T>C, m.16069C>T, m.16126T>C, m.16300A>G,
A33	HV	m.73A>G, m.152T>C, m.263A>G, m.315Ci, m.497C>T,	m.16224T>C, m.16416Gi, m.16524T>C
A34	J1	m.73A>G, m.228G>A, m.263A>G, m.295C>T, m.309Ci, m.315Ci, m.462C>T, m.489T>C	m.16069C>T, m.16126T>C, m.16240A>G, m.16319G>A
A35	H1	m.263A>G,m.315Ci	m.16362T>C, m.16519T>C
A36	U5a1	m.73A>G, m.263A>G, m.303Ci, m.315Ci	m.16256C>T, m.16270C>T, m.16399A>G
A37	H1	m.263A>G, m.315Ci	m.16183A>C, m.16311T>C, m.16519T>C
A38	H2	m.150C>T, m.263A>G, m.309Ci, m.315Ci	m.16519T>C
A39	H1	m.93*>G, m.263A>G,	m.16093T>C, m.16519G>T
A40	H2	m.263A>G, CORTA	m.16356C>T,
A41	T	m.73A>G, m.263A>G,	m.15928G>A, m.16126T>C, m.16294C>T, 16296T, m.16519T>C.
A42	H1	m.263A>G,m.315Ci	rCRS
A43	H1	m.263A>G, m.477T>C,	m.16522T>G
A44	H3	m.64C>T, m.263A>G, m.309Ci, m.315Ci,	m.16519T>C, FS

A45	H1	FS	FS
A46	H1	m.263A>G,	m.16278C>T, m.16519C>C
A47	H1	FS	FS
A48	Uk	m.73A>G, m.263A>G, m.497C>T	m.16129G>A, m.16168C>T, m.16224T>C, m.16311T>C, m.16519T>C
A49	T	m.73A>G, C151T, m.263A>G, m.315Ci	m.15928G>A, m.16126T>C, m.16257C>T, m.16294C>T, m.16296C>T, m.16304T>T
A50	N1b	FS	FS
A51	H1	m.263A>G, m.292T>C, m.315Ci	m.16093T>C, m.16519T>C
A52	H1	m.263A>G, m.315Ci,	m.15941T>C, m.16129G>A, salta en 16181, inserción en 16414G, m.16445T>C (dudoso), m.16519T>C,
A53	H3	m.263A>G, m.309Ci, m.315Ci,	rRCS
A54	H3	m.263A>G, m.315Ci,	m.16209T>C, C16301,
A55	H*	m.263A>G, m.309Ci, m.315Ci ,	m.16221C>T, m.16291C>T
A56	H*	m.263A>G, m.309Ci	m.16293 ^a >G, m.16412Gi, m.16519T>C,
A57	H1	m.263A>G, m.315Ci	rRCS
A58	H1	m.263A>G, m.292C>T, m.315Ci,	m.16093T>C, m.16519T>C
A59	H3	m.73A>G, m.195T>C, m.263A>G, m.315Ci, m.499G>A,	m.15693T>C, m.16356T>C, m.16519T>C
A60	H5	FS	FS
A61	HV	FS	FS
A62		FS	FS
A63	HV	FS	FS
A64		FS	FS
A65	U5b	FS	FS
A66	H5	FS	FS
A67	H1	FS	FS
A68	T	FS	FS
A69		FS	FS
A70	H3	m.72T>C, m.146T>C, m.195T>C, m.263A>G, m.309Ci, m.315Ci, i318C, m.456C>T, m.499G>A,	FS
A71	H5	m.263A>G, m.315Ci, m.316Ci, i318C, m.577G>T,	m.15904C>T y m.16298T>C,
A72	T	m.9G>A, m.263A>G, m.309Ci, m.315Ci,	m.15928G>A, m.16126T>C, , m.16189T>C corta
A73	H3	m.73A>G, m.263A>G, m.309Ci, i315C,	m.16291C>T
A74	H1	m.93G>A, m.263A>G, m.315Ci	m.16093T>C, m.16519T>C
A75	H3	m.152T>C, m.263A>G, i315C	m.16176C>T
A76	Uk	FS	FS
A77	H1	m.263A>G, m.315Ci	FS
A78	J1	m.73A>G, m.228A>G, m.263A>G, m.295C>T, m.315Ci	FS
A79	U5a	m.73A>G, m.150C>T, m.263A>G, inserción en 315,	m.16192C>T, m.16270C>T, m.16291C>T, m.16319G>A
A80	U5b	m.73A>G, m.150C>T, m.263A>G, inserción en 315,	m.16192C>T, m.16270C>T, m.16319G>A
A81	H3	m.263A>G, m.309Ci, m.315Ci	rRCS
A82	V	FS	FS
A83	V	m.72T>C, m.195C>T, m.263A>G, i390C, m.315Ci	m.16298T>C, m.16320C>T, m.16325 ^a >G, revisar de todas formas
A84	N1b	m.73A>G, m.97G>A, m.11A>C, m.152T>C, m.189A>G, m.195T>C, m.263A>G, Ci309, m.315Ci,	m.15705C>T, m.16145G>A, m.16176C>G, m.16223C>T, T16352, m.16390G>A
A85	H1	FS	m.16093C>G, m.16193Ti
A86	U5a	m.73A>G, m.150C>T, m.263A>G, m.315Ci	m.16074A>G, m.16189T>C, m.16270C>T
A87	L3b	m.73A>G, m.263A>G, m.315Ci,	m.16051C>T, m.16223C>T, m.16278C>T, m.16362T>C, m.16519T>C,
A88	H5	m.263A>G, FS	FS
A89	H5	m.263A>G, m.315Ci	m.16129C>A, m.16316A>G,
A90	H1	m.150C>T, m.195C>T, m.263A>G, m.309Ci, m.315Ci, m.351A>G	m.16519C>T
A91	V	m.72T>C, m.150C>T, m.263A>G, m.309Ci	m.15904C>T, m.16298T>C, m.16311T>C,
A92	H3	m.150T>C, m.263A>G, m.309Ci, m.315Ci,	m.16304T>C

A93	U5a	m.73A>G, m.93A>G, m.263A>G,m.315Ci	m.16093T>C, m.16189T>C, m.16224T>C, FS, m.16519C>T
A94	J2	m.73A>G, m.150T>C, m.152C>T, m.295T>C, m.315Ci, m.489C>T	FS
A95	H	FS	FS
A96	U2	m.73A>G, m.152T>C, m.217T>C, m.263A>G, m.303Ci, m.304Ci, m.309Ci	m.508A>G, m.15907A>G, m.16051A>G, m.16129G>A , FALTA PARTE m.16519T>C
A97	H	m.93A>G, m.263A>G, m.309Ci, m.315Ci, m.527C>G,	m.16093T>C, m.16519G>T
A98	Uk	FS	FS
A99	U?	m.263A>G, m.309Ci, m.315Ci	m.16221C>T, m.16519G>T
A100	U5b	FS	FS
A101	H1	FS	FS
A102	H1	FS	FS
A103	N*	FS	FS
A104	HV	m.192C>T, m.263A>G, m.309Ci, m.315Ci, m.498C>G	m.15757A>G, 15903T, m.16192C>T
A105	U5?	m.73A>G, m.150C>T, m.263A>G, m.309Ci, m.533A>G	m.16192C>T, m.16270C>T, m.16319G>A
A106	J2	m.73A>G, m.150C>T, m.195T>C, m.215A>G, m.263A>G, m.310Ci, m.311Ci, m.319T>C, m.489T>C,	m.16069CT, m.16126T>C, m.16142C>T, m.16231T>C, m.16261C>T
A107	H1	FS	FS
A108	H*	FS	FS
A109	H	m.73A>G, m.263A>G, m.303Ci, m.309Ci, m.315Ci	m.16172C>T, corta
A110	Uk	m.73A>G, m.114C>T, m.263A>G, m.310Ci, m.497C>T,	m.16192C>T, m.16224T>C, m.16311T>C, m.16519T>C
A111	T	FS	FS
A112	U5b	FS	FS
A113	U5b	m.73A>G, m.150C>T, m.263A>G, m.315Ci, m.533A>G	m.16192C>T, m.16270C>T, m.16319G>A
A114	H?	m.263A>G,m.315Ci ,	m.16519T>C
A115	H1	FS	FS
A116	H1	m.73A>G, m.152T>C, m.263A>G, m.285C>T, m.309Ci FS	FS
A117	U*	FS	FS
A118	H1	m.146T>C, m.263A>G, m.309Ci	m.16234C>T, m.16519T>C
A119	H?	FS	FS
A120	H1	FS	FS
A121	U*	FS	FS
A122	HV	m.263A>G, m.309Ci, m.315Ci	m.16519T>C
A123	H1	m.150C>T, m.263A>G, m.309Ci,	m.16172C>T, m.16519T>C
A124	J2	m.73A>G, m.150T>C, m.152T>C, m.195T>C, m.215A>G, m.295C>T, m.309Ci, m.319T>C, m.340C>T, m.489T>C	m.16069C>T, m.16126T>C, m.16145G>A, m.16231T>C, m.16234T>C, m.16261C>T
A125	U5b	m.73A>G, m.146T>C, m.150C>T, m.189A>G, m.199C>T, m.263A>G, m.309Ci	m.16270C>T
A126	T	m.73A>G, m.152T>C, m.195T>C, m.263A>G, m.309Ci	m.15928G>A, m.15977C>T, m.16126T>C, m.16163A>G, m.16186C>T, m.16189T>C, m.16294C>T
A127	V	m.72T>C, m.263A>G, m.309Ci, m.315Ci	m.15904C>T, m.16298T>C,
A128	J1c	m.185G>A, m.228G>A, m.263A>G, m.295C>T, m.309Ci, m.310Ci, m.482T>C, m.489T>C	m.16069C>T, m.16126T>C, m.16145G>A, m.16362T>C
A129	H1	m.73A>G, m.263A>G, m.295C>T, m.309Ci, m.310Ci, T482C, m.489T>C	rRCS
A130	H	m.263A>G,m.309Ci, m.310Ci	m.16269A>G, m.16304T>C
A131	Uk	m.73A>G, m.263A>G,m.309Ci,i315C	m.16093T>C, m.16224T>C, m.16311T>C
A132	H1	m.263A>G,m.309Ci	m.15796T>C, m.16320C>T
A133	J1	m.73A>G, m.146T>C, m.189A>G, m.242C>T, m.263A>G, m.315Ci, m.462C>T, m.489T>C	m.16069C>T, m.16126T>C, m.16145G>A, m.16172T>C, m.16261C>T
A134	J1	m.73A>G, m.185G>A, m.228G>A, m.263A>G, m.295C>T, m.309Ci, m.489T>C	m.16069C>T, m.16126T>C
A135	J2	m.73G>A, m.146C>T, m.152C>T, m.263A>G, m.309Ci, m.315Ci,	m.16069C>T, m.16126T>C, m.16193C>T, m.16220A>T, m.16278C>T, m.16525A>G
A136		m.73A>G, m.146T>C, m.150C>T, m.263A>G, m.315Ci	m.16051A>G, m.16189T>C CORTA
A137	J2	m.73A>G, m.150T>C, m.152C>T, m.263A>G, m.295T>C, m.309Ci, m.315Ci, m.489C>T	FS
A138	H1	FS	FS

A139	J1c	m.73A>G, m.185G>A, m.263A>G, m.315Ci, m.462C>T, m.489T>C	m.16069C>T, m.16126T>C
A140	H	m.73A>G, m.150C>T, m.263A>G, m.309Ci, m.315Ci	rRCS
A141	H	FS	FS
A142	H	FS	FS
A143	HV	FS	FS
A144	J1c	FS	FS
A145		FS	FS
A146	H3	FS	FS
A147	H3	FS	FS

Tabla A.1: Secuencias correspondientes a la HVI y HVII de muestras de DNA procedentes de individuos sanos. HVI: Incluye de la posición 16023 a la 16568. La HVII abarca de la posición 1 a la 577. Se marcan los cambios producidos con respecto a la secuencia de referencia Cambridge revisada (rRCS). FS: Denota falta de secuencia. rRCS: Denota secuencia correspondiente con la rRCS. i: Denota inserción y la posición en la que se inserta la nueva base. M: Denota el código utilizado para nombrar la muestra de DNA.

TABLA A.I.2. ÍNDICE DE CONSERVACIÓN p.MT-CYB

POSICIÓN	aa	MAMÍFEROS	CI (%)	Q/NOQ	Qi-Qo/NOQ
1	M	275	99,638	NOQ	NOQ
2	T	248	89,855	NOQ	NOQ
3	P	229	82,971	NOQ	NOQ
4	M	28	10,145	NOQ	NOQ
5	R	276	100,000	NOQ	NOQ
6	K	276	100,000	NOQ	NOQ
7	I	4	1,449	NOQ	NOQ
8	N	32	11,594	NOQ	NOQ
9	P	271	98,188	NOQ	NOQ
10	L	269	97,464	NOQ	NOQ
11	M	137	49,638	NOQ	NOQ
12	K	276	100,000	NOQ	NOQ
13	L	19	6,884	NOQ	NOQ
14	I	190	68,841	NOQ	NOQ
15	N	276	100,000	Q	Qi
16	H	96	34,783	Q	Qi
17	S	199	72,101	Q	Qi
18	F	220	79,710	Q	Qi
19	I	255	92,391	Q	Qi
20	D	276	100,000	Q	Qi
21	L	276	100,000	Q	Qi
22	P	276	100,000	Q	Qi
23	T	125	45,290	Q	Qi
24	P	276	100,000	Q	Qi
25	S	263	95,290	Q	Qi
26	N	262	94,928	Q	Qi
27	I	271	98,188	Q	Qi
28	S	275	99,638	Q	Qi
29	A	102	36,957	Q	Qi
30	W	276	100,000	Q	Qi
31	W	276	100,000	Q	Qi
32	N	275	99,638	Q	Qi
33	F	273	98,913	Q	Qi
34	G	275	99,638	Q	Qi
35	S	276	100,000	Q	Qi
36	L	274	99,275	Q	Qi
37	L	276	100,000	Q	Qi
38	G	249	90,217	Q	Qi
39	A	45	16,304	Q	Qi
40	C	276	100,000	Q	Qi
41	L	276	100,000	NOQ	NOQ
42	I	174	63,043	NOQ	NOQ
43	L	149	53,986	NOQ	NOQ
44	Q	276	100,000	NOQ	NOQ
45	I	272	98,551	NOQ	NOQ
46	T	9	3,261	NOQ	NOQ
47	T	276	100,000	NOQ	NOQ

48	G	276	100,000	NOQ	NOQ
49	L	275	99,638	NOQ	NOQ
50	F	275	99,638	NOQ	NOQ
51	L	276	100,000	NOQ	NOQ
52	A	273	98,913	NOQ	NOQ
53	M	276	100,000	NOQ	NOQ
54	H	275	99,638	NOQ	NOQ
55	Y	276	100,000	NOQ	NOQ
56	S	24	8,696	NOQ	NOQ
57	P	75	27,174	NOQ	NOQ
58	D	275	99,638	NOQ	NOQ
59	A	22	7,971	NOQ	NOQ
60	S	51	18,478	NOQ	NOQ
61	T	254	92,029	NOQ	NOQ
62	A	276	100,000	NOQ	NOQ
63	F	276	100,000	NOQ	NOQ
64	S	256	92,754	NOQ	NOQ
65	S	276	100,000	NOQ	NOQ
66	I	42	15,217	NOQ	NOQ
67	A	109	39,493	NOQ	NOQ
68	H	276	100,000	NOQ	NOQ
69	I	274	99,275	NOQ	NOQ
70	T	33	11,957	NOQ	NOQ
71	R	276	100,000	NOQ	NOQ
72	D	273	98,913	NOQ	NOQ
73	V	275	99,638	NOQ	NOQ
74	N	263	95,290	NOQ	NOQ
75	Y	263	95,290	NOQ	NOQ
76	G	276	100,000	NOQ	NOQ
77	W	276	100,000	NOQ	NOQ
78	I	150	54,348	NOQ	NOQ
79	I	252	91,304	NOQ	NOQ
80	R	276	100,000	NOQ	NOQ
81	Y	233	84,420	NOQ	NOQ
82	L	179	64,855	NOQ	NOQ
83	H	275	99,638	NOQ	NOQ
84	A	270	97,826	NOQ	NOQ
85	N	276	100,000	NOQ	NOQ
86	G	275	99,638	NOQ	NOQ
87	A	275	99,638	NOQ	NOQ
88	S	275	99,638	NOQ	NOQ
89	M	254	92,029	NOQ	NOQ
90	F	269	97,464	NOQ	NOQ
91	F	268	97,101	NOQ	NOQ
92	I	215	77,899	NOQ	NOQ
93	C	274	99,275	NOQ	NOQ
94	L	271	98,188	NOQ	NOQ
95	F	176	63,768	NOQ	NOQ
96	L	129	46,739	NOQ	NOQ
97	H	275	99,638	NOQ	NOQ

98	I	61	22,101	NOQ	NOQ
99	G	275	99,638	NOQ	NOQ
100	R	275	99,638	NOQ	NOQ
101	G	264	95,652	NOQ	NOQ
102	L	193	69,928	NOQ	NOQ
103	Y	276	100,000	NOQ	NOQ
104	Y	276	100,000	NOQ	NOQ
105	G	276	100,000	NOQ	NOQ
106	S	275	99,638	NOQ	NOQ
107	F	45	16,304	NOQ	NOQ
108	L	93	33,696	NOQ	NOQ
109	Y	74	26,812	NOQ	NOQ
110	S	50	18,116	NOQ	NOQ
111	E	264	95,652	NOQ	NOQ
112	T	276	100,000	NOQ	NOQ
113	W	276	100,000	NOQ	NOQ
114	N	276	100,000	NOQ	NOQ
115	I	238	86,232	NOQ	NOQ
116	G	276	100,000	NOQ	NOQ
117	I	189	68,478	NOQ	NOQ
118	I	189	68,478	NOQ	NOQ
119	L	276	100,000	NOQ	NOQ
120	L	275	99,638	Q	Qo
121	L	91	32,971	Q	Qo
122	A	79	28,623	Q	Qo
123	T	63	22,826	Q	Qo
124	M	276	100,000	Q	Qo
125	A	268	97,101	Q	Qo
126	T	275	99,638	Q	Qo
127	A	276	100,000	Q	Qo
128	F	275	99,638	Q	Qo
129	M	207	75,000	Q	Qo
130	G	276	100,000	Q	Qo
131	Y	276	100,000	Q	Qo
132	V	275	99,638	Q	Qo
133	L	276	100,000	Q	Qo
134	P	276	100,000	Q	Qo
135	W	276	100,000	Q	Qo
136	G	276	100,000	Q	Qo
137	Q	276	100,000	Q	Qo
138	M	276	100,000	Q	Qo
139	S	276	100,000	Q	Qo
140	F	276	100,000	Q	Qo
141	W	276	100,000	Q	Qo
142	G	275	99,638	Q	Qo
143	A	276	100,000	Q	Qo
144	T	276	100,000	Q	Qo
145	V	276	100,000	Q	Qo
146	I	276	100,000	Q	Qo
147	T	276	100,000	Q	Qo

148	N	276	100,000	Q	Qo
149	L	276	100,000	Q	Qo
150	L	270	97,826	Q	Qo
151	S	275	99,638	Q	Qo
152	A	275	99,638	Q	Qo
153	I	256	92,754	Q	Qo
154	P	276	100,000	Q	Qo
155	Y	276	100,000	Q	Qo
156	I	249	90,217	Q	Qo
157	G	276	100,000	Q	Qo
158	T	244	88,406	Q	Qo
159	D	93	33,696	Q	Qo
160	L	271	98,188	Q	Qo
161	V	272	98,551	Q	Qo
162	Q	57	20,652	Q	Qo
163	W	276	100,000	Q	Qo
164	I	229	82,971	Q	Qo
165	W	273	98,913	Q	Qo
166	G	273	98,913	Q	Qo
167	G	276	100,000	Q	Qo
168	Y	32	11,594	Q	Qo
169	S	267	96,739	Q	Qo
170	V	258	93,478	Q	Qo
171	D	269	97,464	Q	Qo
172	S	12	4,348	Q	Qo
173	P	24	8,696	Q	Qo
174	T	275	99,638	Q	Qo
175	L	275	99,638	Q	Qo
176	T	266	96,377	Q	Qo
177	R	273	98,913	Q	Qo
178	F	276	100,000	Q	Qo
179	F	275	99,638	Q	Qo
180	T	39	14,130	Q	Qo
181	F	238	86,232	Q	Qo
182	H	275	99,638	Q	Qo
183	F	274	99,275	NOQ	NOQ
184	I	246	89,130	NOQ	NOQ
185	L	267	96,739	NOQ	NOQ
186	P	276	100,000	NOQ	NOQ
187	F	276	100,000	NOQ	NOQ
188	I	233	84,420	NOQ	NOQ
189	I	222	80,435	NOQ	NOQ
190	A	78	28,261	Q	Qi
191	A	262	94,928	Q	Qi
192	L	247	89,493	Q	Qi
193	A	143	51,812	Q	Qi
194	A	55	19,928	Q	Qi
195	L	25	9,058	Q	Qi
196	H	276	100,000	Q	Qi
197	L	275	99,638	Q	Qi

198	L	258	93,478	Q	Qi
199	F	275	99,638	Q	Qi
200	L	276	100,000	Q	Qi
201	H	276	100,000	Q	Qi
202	E	276	100,000	Q	Qi
203	T	270	97,826	Q	Qi
204	G	276	100,000	Q	Qi
205	S	276	100,000	Q	Qi
206	N	273	98,913	Q	Qi
207	N	275	99,638	Q	Qi
208	P	276	100,000	Q	Qi
209	L	42	15,217	Q	Qi
210	G	276	100,000	Q	Qi
211	I	199	72,101	Q	Qi
212	T	25	9,058	Q	Qi
213	S	246	89,130	Q	Qi
214	H	8	2,899	Q	Qi
215	S	149	53,986	Q	Qi
216	D	275	99,638	Q	Qi
217	K	249	90,217	Q	Qi
218	I	273	98,913	Q	Qi
219	T	18	6,522	Q	Qi
220	F	273	98,913	Q	Qi
221	H	275	99,638	Q	Qi
222	P	276	100,000	Q	Qi
223	Y	275	99,638	Q	Qi
224	Y	264	95,652	Q	Qi
225	T	266	96,377	Q	Qi
226	I	237	85,870	Q	Qi
227	K	275	99,638	Q	Qi
228	D	275	99,638	Q	Qi
229	A	29	10,507	Q	Qi
230	L	265	96,014	Q	Qi
231	G	275	99,638	Q	Qi
232	L	97	35,145	Q	Qi
233	L	179	64,855	Q	Qi
234	L	183	66,304	Q	Qi
235	F	13	4,710	Q	Qi
236	L	84	30,435	Q	Qi
237	L	220	79,710	Q	Qi
238	S	7	2,536	Q	Qi
239	L	259	93,841	Q	Qi
240	M	126	45,652	NOQ	NOQ
241	T	89	32,246	NOQ	NOQ
242	L	275	99,638	NOQ	NOQ
243	T	60	21,739	NOQ	NOQ
244	L	257	93,116	NOQ	NOQ
245	F	258	93,478	NOQ	NOQ
246	S	181	65,580	NOQ	NOQ
247	P	275	99,638	NOQ	NOQ

248	D	270	97,826	NOQ	NOQ
249	L	219	79,348	NOQ	NOQ
250	L	276	100,000	Q	Qo
251	G	257	93,116	Q	Qo
252	D	275	99,638	Q	Qo
253	P	276	100,000	Q	Qo
254	D	270	97,826	Q	Qo
255	N	276	100,000	Q	Qo
256	Y	244	88,406	Q	Qo
257	T	183	66,304	Q	Qo
258	L	9	3,261	Q	Qo
259	A	275	99,638	Q	Qo
260	N	263	95,290	Q	Qo
261	P	276	100,000	Q	Qo
262	L	275	99,638	Q	Qo
263	N	167	60,507	Q	Qo
264	T	275	99,638	Q	Qo
265	P	276	100,000	Q	Qo
266	P	241	87,319	Q	Qo
267	H	276	100,000	Q	Qo
268	I	276	100,000	Q	Qo
269	K	276	100,000	Q	Qo
270	P	276	100,000	Q	Qo
271	E	276	100,000	Q	Qo
272	W	276	100,000	Q	Qo
273	Y	275	99,638	Q	Qo
274	F	276	100,000	Q	Qo
275	L	276	100,000	Q	Qo
276	F	274	99,275	Q	Qo
277	A	274	99,275	Q	Qo
278	Y	275	99,638	Q	Qo
279	T	11	3,986	Q	Qo
280	I	276	100,000	Q	Qo
281	L	276	100,000	Q	Qo
282	R	275	99,638	Q	Qo
283	S	276	100,000	Q	Qo
284	V	37	13,406	Q	Qo
285	P	276	100,000	Q	Qo
286	N	274	99,275	Q	Qo
287	K	276	100,000	Q	Qo
288	L	275	99,638	Q	Qo
289	G	276	100,000	Q	Qo
290	G	276	100,000	Q	Qo
291	V	276	100,000	Q	Qo
292	L	249	90,217	Q	Qo
293	A	275	99,638	Q	Qo
294	L	276	100,000	Q	Qo
295	L	92	33,333	NOQ	NOQ
296	L	160	57,971	NOQ	NOQ
297	S	276	100,000	NOQ	NOQ

298	I	276	100,000	NOQ	NOQ
299	L	266	96,377	NOQ	NOQ
300	I	235	85,145	NOQ	NOQ
301	L	276	100,000	NOQ	NOQ
302	A	162	58,696	NOQ	NOQ
303	M	9	3,261	NOQ	NOQ
304	I	173	62,681	NOQ	NOQ
305	P	276	100,000	NOQ	NOQ
306	I	16	5,797	NOQ	NOQ
307	L	270	97,826	NOQ	NOQ
308	H	264	95,652	NOQ	NOQ
309	M	13	4,710	NOQ	NOQ
310	S	237	85,870	NOQ	NOQ
311	K	253	91,667	NOQ	NOQ
312	Q	268	97,101	NOQ	NOQ
313	Q	35	12,681	NOQ	NOQ
314	S	218	78,986	NOQ	NOQ
315	M	227	82,246	NOQ	NOQ
316	M	214	77,536	NOQ	NOQ
317	F	270	97,826	NOQ	NOQ
318	R	275	99,638	NOQ	NOQ
319	P	276	100,000	NOQ	NOQ
320	L	139	50,362	NOQ	NOQ
321	S	258	93,478	NOQ	NOQ
322	Q	276	100,000	NOQ	NOQ
323	S	4	1,449	NOQ	NOQ
324	L	232	84,058	NOQ	NOQ
325	Y	31	11,232	NOQ	NOQ
326	W	275	99,638	NOQ	NOQ
327	L	136	49,275	NOQ	NOQ
328	L	274	99,275	NOQ	NOQ
329	A	19	6,884	NOQ	NOQ
330	A	230	83,333	NOQ	NOQ
331	D	208	75,362	NOQ	NOQ
332	L	270	97,826	NOQ	NOQ
333	L	219	79,348	NOQ	NOQ
334	I	44	15,942	NOQ	NOQ
335	L	276	100,000	NOQ	NOQ
336	T	275	99,638	NOQ	NOQ
337	W	276	100,000	NOQ	NOQ
338	I	274	99,275	NOQ	NOQ
339	G	276	100,000	NOQ	NOQ
340	G	250	90,580	NOQ	NOQ
341	Q	272	98,551	NOQ	NOQ
342	P	276	100,000	NOQ	NOQ
343	V	274	99,275	NOQ	NOQ
344	S	20	7,246	NOQ	NOQ
345	Y	51	18,478	NOQ	NOQ
346	P	275	99,638	NOQ	NOQ
347	F	178	64,493	NOQ	NOQ

348	T	17	6,159	NOQ	NOQ
349	I	164	59,420	NOQ	NOQ
350	I	249	90,217	NOQ	NOQ
351	G	274	99,275	NOQ	NOQ
352	Q	275	99,638	NOQ	NOQ
353	V	51	18,478	NOQ	NOQ
354	A	273	98,913	NOQ	NOQ
355	S	276	100,000	NOQ	NOQ
356	V	33	11,957	NOQ	NOQ
357	L	211	76,449	NOQ	NOQ
358	Y	276	100,000	NOQ	NOQ
359	F	276	100,000	NOQ	NOQ
360	T	84	30,435	NOQ	NOQ
361	T	41	14,855	NOQ	NOQ
362	I	208	75,362	NOQ	NOQ
363	L	238	86,232	NOQ	NOQ
364	I	118	42,754	NOQ	NOQ
365	L	232	84,058	NOQ	NOQ
366	M	255	92,391	NOQ	NOQ
367	P	275	99,638	NOQ	NOQ
368	T	35	12,681	NOQ	NOQ
369	I	17	6,159	NOQ	NOQ
370	S	163	59,058	NOQ	NOQ
371	L	125	45,290	NOQ	NOQ
372	I	194	70,290	NOQ	NOQ
373	E	275	99,638	NOQ	NOQ
374	N	266	96,377	NOQ	NOQ
375	K	85	30,797	NOQ	NOQ
376	M	72	26,087	NOQ	NOQ
377	L	230	83,333	NOQ	NOQ
378	K	260	94,203	NOQ	NOQ
379	W	213	77,174	NOQ	NOQ
380	A	2	0,725	NOQ	NOQ

Tabla A.2: Análisis del índice de conservación (CI) de todas las posiciones aminoacídicas del p.MT-CYB con respecto a la posición original en el humano. El CI se expresa en % de especies que presentan el aa presente en el humano en 276 especies de mamíferos. Las secuencias se han alineado con el programa ClustalW del EBI. Las siglas aa, NoQ, Q, Qi y Qo denotan aminoácido, posición aminoacídica fuera de un centro catalítico Q, posición aminoacídica en un centro catalítico Q, centro Q interno y centro Q externo, respectivamente. Se han considerado los centros Q de acuerdo a Gao, 2002 y Gao, 2003.

FIGURAS A.I. CARIOTIPADO DE LÍNEAS CELULARES

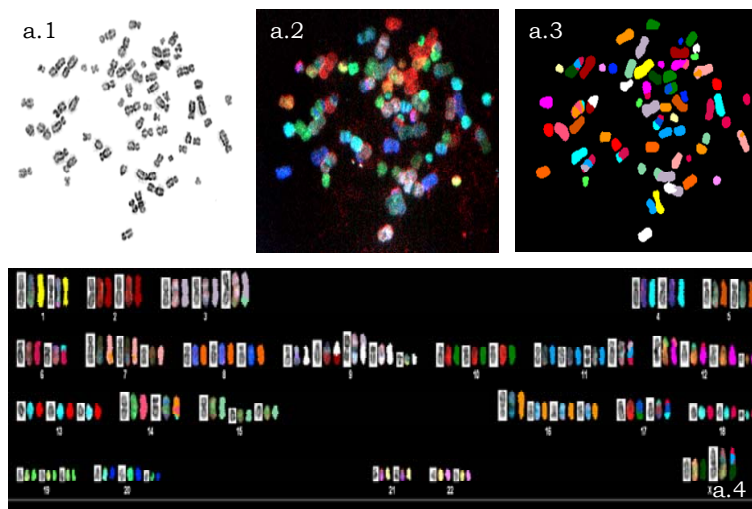


Figura II.A.1: Cariotipo de la línea celular AcH. a.1) Cariotipo espectral (SKY); a.2) Metafase después de la tinción DAPI e hibridación SKY; a.3) Clasificación por colores a.4) Los cromosomas estructuralmente reordenados son agrupados según el tipo de cromosoma de su componente principal

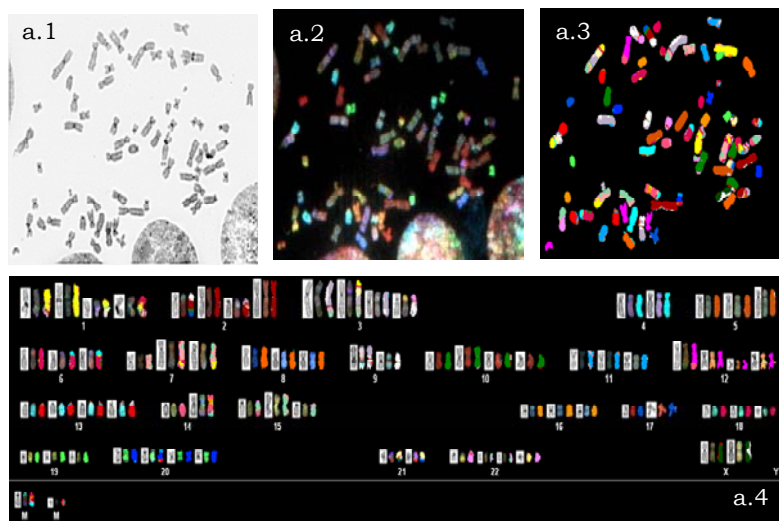


Figura II.A.2: Cariotipo de la línea celular RicH. a.1) Cariotipo espectral (SKY); a.2) Metafase después de la tinción DAPI e hibridación SKY; a.3) Clasificación por colores a.4) Los cromosomas estructuralmente reordenados son agrupados según el tipo de cromosoma de su componente principal

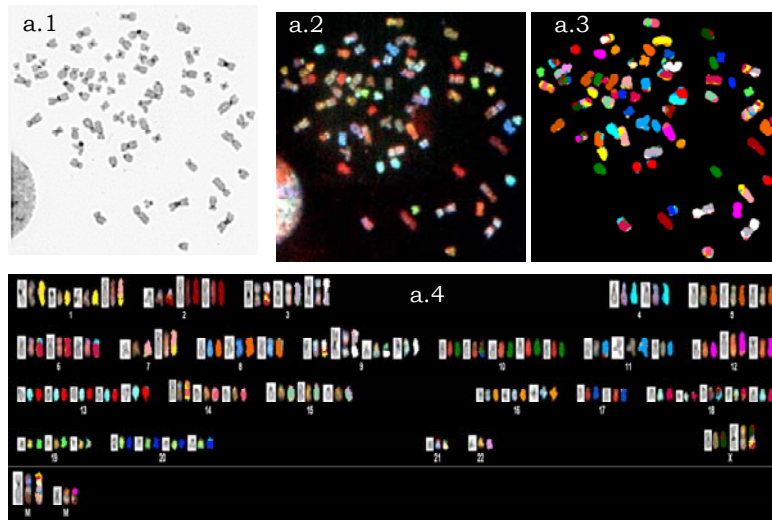


Figura II.A.3: Cariotipo de la línea celular 25H. a.1) Cariotipo espectral (SKY); a.2) Metafase después de la tinción DAPI e hibridación SKY; a.3) Clasificación por colores a.4) Los cromosomas estructuralmente reordenados son agrupados según el tipo de cromosoma de su componente principal

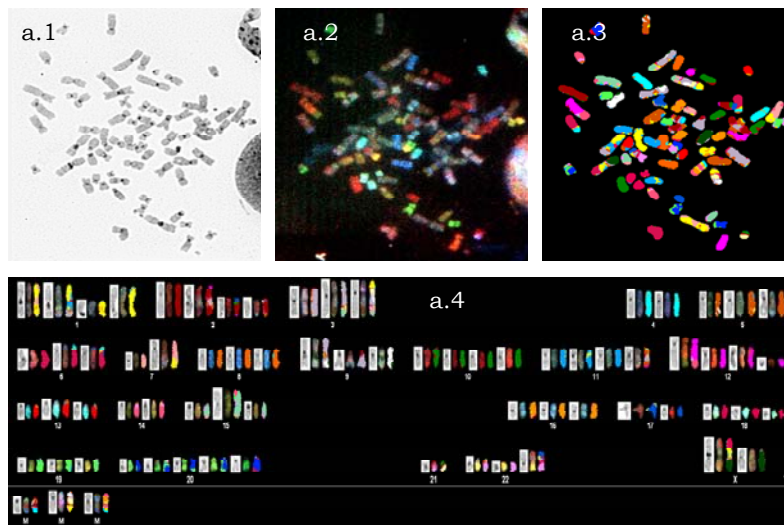


Figura II.A.4: Cariotipo de la línea celular 612H. a.1) Cariotipo espectral (SKY); a.2) Metafase después de la tinción DAPI e hibridación SKY; a.3) Clasificación por colores a.4) Los cromosomas estructuralmente reordenados son agrupados según el tipo de cromosoma de su componente principal

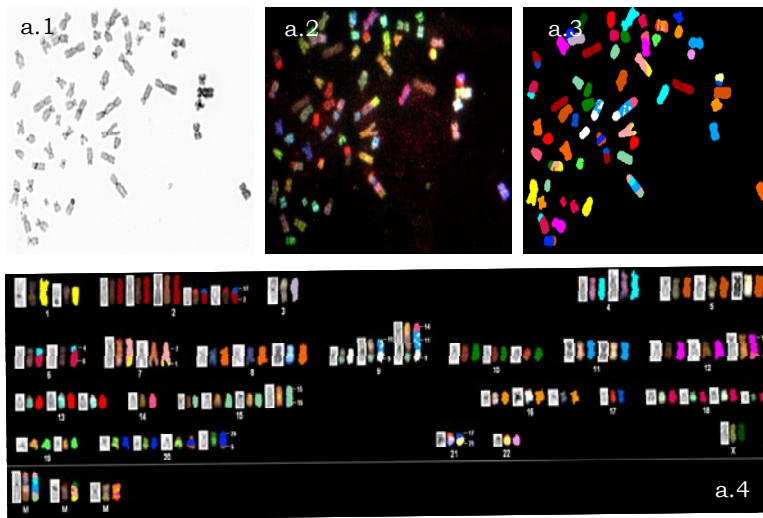


Figura II.A.5: Cariotipo de la línea celular 613H. a.1) Cariotipo espectral (SKY); a.2) Metafase después de la tinción DAPI e hibridación SKY; a.3) Clasificación por colores a.4) Los cromosomas estructuralmente reordenados son agrupados según el tipo de cromosoma de su componente principal.

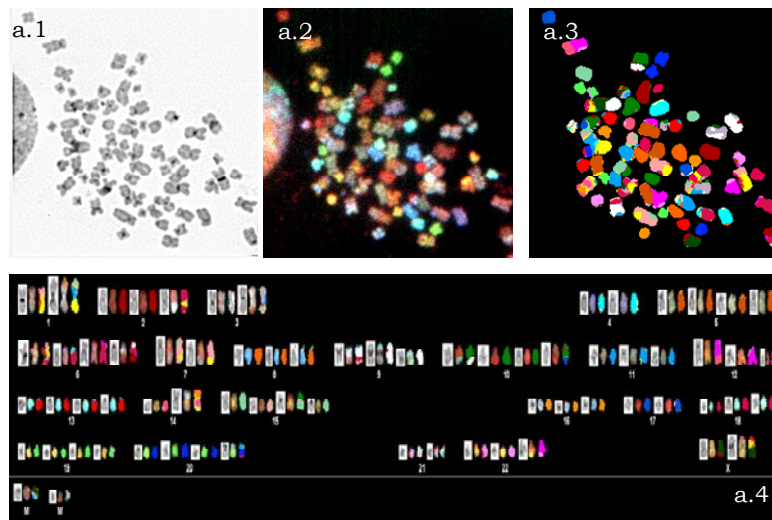


Figura II.A.6: Cariotipo de la línea celular 3K. a.1) Cariotipo espectral (SKY); a.2) Metafase después de la tinción DAPI e hibridación SKY; a.3) Clasificación por colores a.4) Los cromosomas estructuralmente reordenados son agrupados según el tipo de cromosoma de su componente principal.

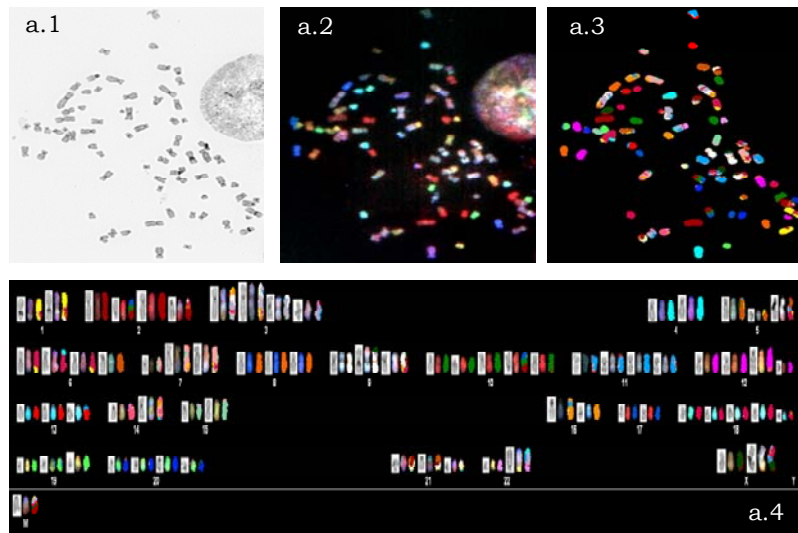


Figura II.A.7: Cariotipo de la línea celular 8K. a.1) Cariotipo espectral (SKY); a.2) Metafase después de la tinción DAPI e hibridación SKY; a.3) Clasificación por colores a.4) Los cromosomas estructuralmente reordenados son agrupados según el tipo de cromosoma de su componente principal.

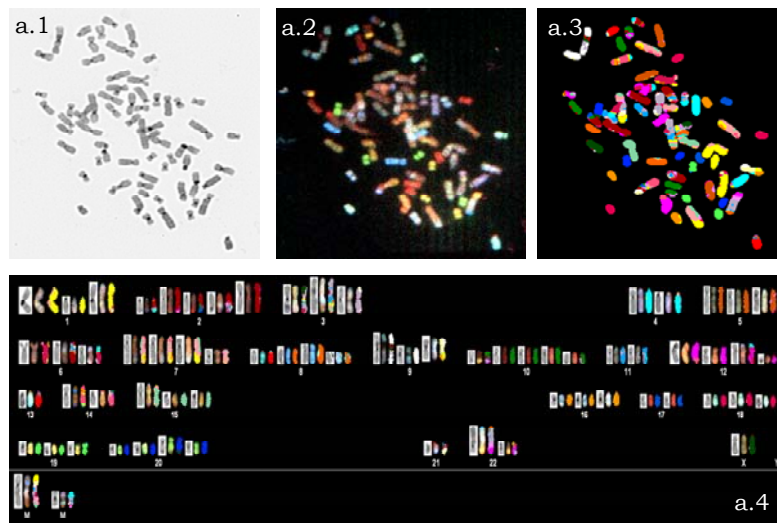


Figura II.A.8: Cariotipo de la línea celular 98K. a.1) Cariotipo espectral (SKY); a.2) Metafase después de la tinción DAPI e hibridación SKY; a.3) Clasificación por colores a.4) Los cromosomas estructuralmente reordenados son agrupados según el tipo de cromosoma de su componente principal.

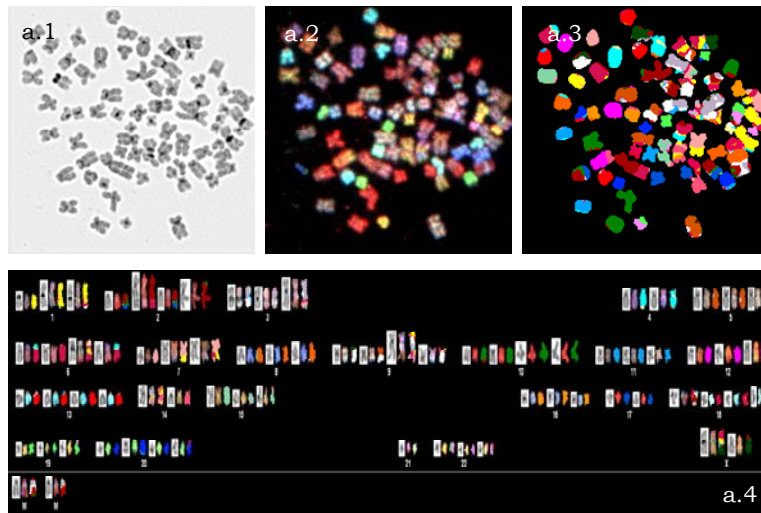


Figura II.A.9: Cariotipo de la línea celular 110K. a.1) Cariotipo espectral (SKY); a.2) Metafase después de la tinción DAPI e hibridación SKY; a.3) Clasificación por colores a.4) Los cromosomas estructuralmente reordenados son agrupados según el tipo de cromosoma de su componente principal.

FIGURAS A.I. SÍNTESIS DE PROTEÍNAS MITOCONDRIALES

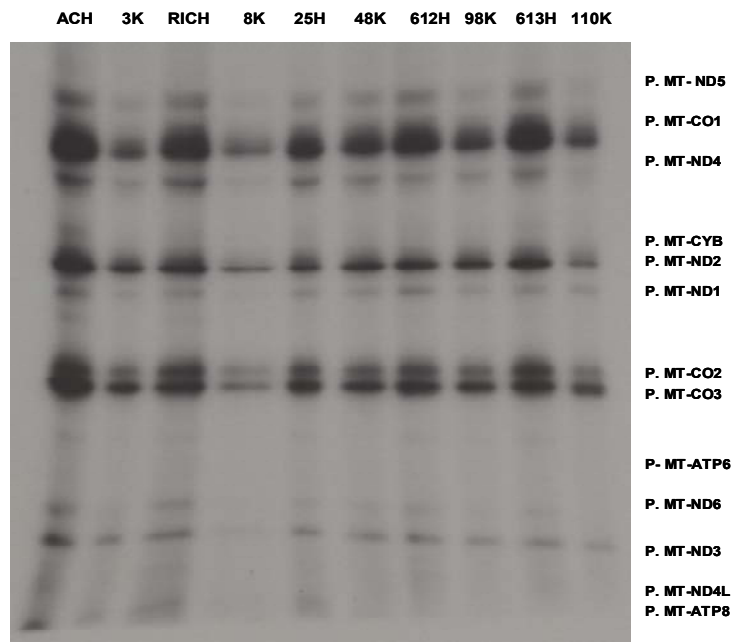


Figura A.10: Síntesis de proteínas mitocondriales de las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y Uk. Patrón de electroforesis de los productos de traducción mitocondrial de las líneas celulares híbridas.

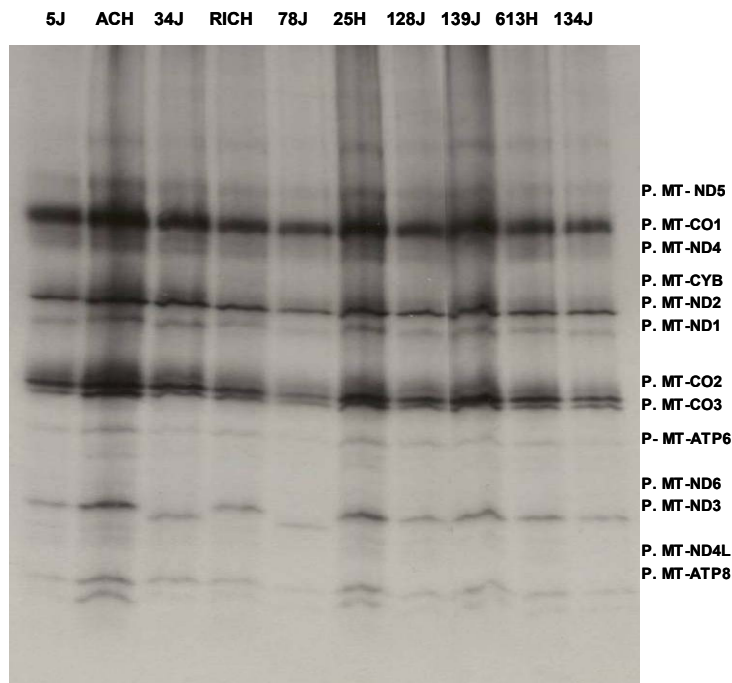


Figura A.11: Síntesis de proteínas mitocondriales de las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J1c. Patrón de electroforesis de los productos de traducción mitocondrial de las líneas celulares híbridas.

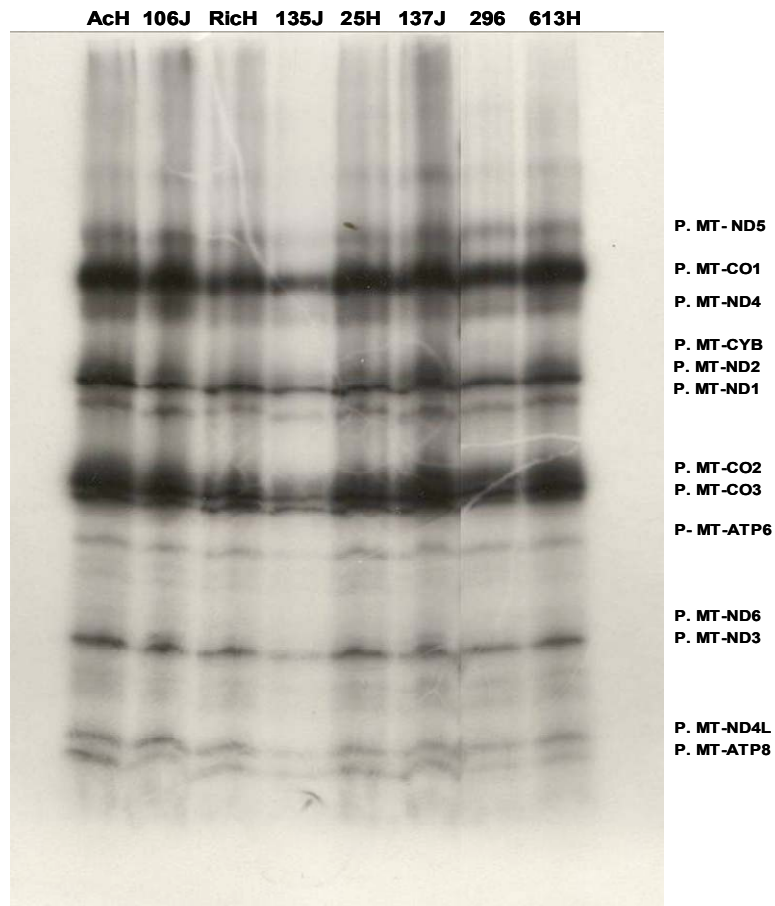


Figura A.12: Síntesis de proteínas mitocondriales de las líneas híbridas pertenecientes a los haplogrupos H y J2. Patrón de electroforesis de los productos de traducción mitocondrial de las líneas celulares híbridas.

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PRUEBAS GENÉTICO-MOLECULARES Y DETERMINACIÓN DE MUTACIONES NUEVAS

Paciente:

Familiar al que se va a realizar el estudio y relación con el paciente:

Persona a quien informa (DNI)

Relación con el paciente

Testigo de la información (DNI)

_____ declaro estar informado y haber comprendido que (nombre del paciente o familiar si es menor de edad) _____ puede estar afectado o ser portador de un trastorno genético hereditario y que el diagnóstico se basa en los resultados de distintas pruebas de laboratorio, las cuales se realizan a partir de muestra biológicas del paciente y de otros familiares cuando sea necesario.

Doy consentimiento al equipo de Bioquímica, Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza para utilizar estas muestras en el proceso diagnóstico, en el propio departamento y en otros centros designados por este, siempre de acuerdo con las regulaciones y normas éticas vigentes.

SI

NO

Doy consentimiento para el almacenamiento y conservación de las muestras, para posibles investigaciones futuras sobre la enfermedad genética.

SI

NO

Doy consentimiento para a la utilización de las muestras como población control en otros estudios científicos dirigidos a mejorar el conocimiento de otras enfermedades genéticas.

SI

NO

Doy mi conformidad para que se envíe un breve resumen de mi historia clínica (síntomas, neuroimagen, histología, bioquímica, etc), con nombre y número de historia clínica, y puedan ser revisados por el personal ajeno al centro hospitalario que tenga que estar implicado en el análisis de la muestra, para los fines del estudio, y soy consciente de que este consentimiento es revocable.

SI

NO

Se me ha informado que tengo derecho a decidir si quiero saber o no el resultado de las pruebas realizadas, y que tengo derecho a cambiar de opinión en el futuro. Actualmente,

Si deseo conocer el resultado en relación a la patología del paciente

No deseo conocer el resultado en relación a la patología del paciente

Si deseo conocer el resultado en relación a otras patologías

No deseo conocer el resultado en relación a otras patologías

Lugar y fecha:

Firma:

Firma del paciente o persona responsable Firma testigo
(Relación con el paciente)

TABLA A.3: PCR-RFLP

POSICIÓN	HG	OLIGONUCLEÓTIDO	Ta	E R	Sc	Tc	CORTE	
							NORMAL	MUTADO
m.1715C>T	X	L-1621 (23)(AAGCACCCAACCTACACTTAGGA) H- 1894 (21)(CTTTGGCTCTCCTTGCAAAGT)	60	Ddel	GG/CC	37°	17+30+48 + 179	17+30+227
m.1811A>G	U18 11	L-1641(20)[GGAGATTTCACCTTAACCTTG] Hmt H-2174(20)[ATTGGTGGCTGCTTTTAGGC]	60	Psi I	TTA/ATT	37°	365 + 168	533
m.3010G>A	H1/ J1	HmtL-2797 (21) (GTCCTAAACTACCAAACCTGC) HmtH-3733 (20) (ATGATGGCTAGGGTGACTTC)	60	BccI	CCATCNNNN/ N	37°	294+225, 214+ 100+39	439+294+ 180+39
m.3394T>C	X	L-3192 (20) (CTTAGTATTATACCCACACC) H-3560 (20) (AGTAGAAGAGCGATGGTGAG)	61	HaeIII	GG/CC	37°	125+97+1 5+132	125+ 78+ 19+15+ 132
m.4216T>C	JT	L-4096 (20) (CTACTTCTAACCTCCCTGTT) H- 4407 (20) (CTTACTTTAGGATGGGGTGT)	64	Afl III	A/CRYGT	37°	312	121+191
m.4336T>C	H5	L-4096(20) (CTACTTCTAACCTCCCTGTT) HmtH-4501 (20) (TGTGCCTGCAAAGATGGTAG)	60	AvaII	G/GWCC	37°	425	256 + 169
m.4529A>T	I	L-4096 (20) (CTACTTCTAACCTCCCTGTT) H5340 (20) (AGAGGTTAAGGAGGGTGATG)	55	Hae II	RGCGC/Y	37°	1245	438+ 807
m.4580G>A	V	L-4308(18) (GGAGCTTAAACCCCTTA) H-4739 (20) (GGTAGTATTGGTTATGGTTC)	60	NlaIII	CATG	37°	469	178+ 291
m.4769A>G	H2	Hmt L- 4322 (21) (ATAATAGGAGCTTAAACCCCC) Hmt H- 5175 (20) (AGCTAACATGACTAACACCC)	60	AluI	AG/CT	37°	9 + 101+ 10 +116 + 47+48+ 54 +84+221 +186 +16	9 + 101 + 10 + 116 + 47 + 48 + 54 + 305 + 186+ 16
m.4917A>G	T	L-4791(20) ; LC L (ATAGCCCCCTTCACTTCTG) H-5340 (20); LC H (AGAGGTTAAGGAGGGTGATG)	63	Mae I	C/TAG	45°	345+ 120+ 85	306+ 39+ 120+ 85
m.5178G>A	D	HmtL-5061 (20) AGCAGTTCTACCGTACAACC HmtH-5252: (20) CGATAATGGCCATTTGGGC	60	AluI	AG/CT	37°	136 + 94	230
m.6776T>C	H3	HmtL- 6563 (20) ACCTCAACACCACCTTCTTC H-6807 (27) mp (TGTCTACGTCTATTCTACTGTAAACA)	60	AluI	AG/CT	37°	290	56+ 234
m.7028C>T	H	L-6874 (19) : TCGCCACACTCCACGGAAG H-7134 (20); TGGCGTAGGTTTGGTCTAGG	65	AluI	AG/CT	37°	183+ 78	152+ 31+ 78
m.8994A>G	W	L-8896 (19) (GCCCTAGCCCACTTCTTAC) H-9203 (27)(GTGTTGCTGTCAGGTAGAGGCTTcCT)	60	HaeIII	GG/CC	37°	131+177	100+ 31+ 177
m.9055G>A	Uk	L-8896 (19)(GCCCTAGCCCACTTCTTAC) H-9187 (20) (AGAGGCTTACTAGAAGTGTG)	63	HhaI	GCG/C	37°	132/ 160	292
m.9744G>A	U5	COIII9184 (20) CTCTACCTGCACGACAACAC Hmt H-9819 ((21) GCCAATAATGACGTGAAGTCC	60	ApoI, Acs I	R/AATTY	37°	656	362 + 294
m.10086A>G	L3B	L- G9967(21) TCTTCCATCTATTGATGAGGG Hmt H-10598 (21) GTTGAGGGTTATGAGAGTAGC	60	TaqI	T/CGA	65°	109 + 270 + 134	109 + 174 + 96 + 134
m.12308A>G	U	L12201 (25): CTCAACCCGACATCATTACC H12338 (30);2 mp: ATTACTTTTATTGGAGTTGCACCAAGATT	64	HinFI	G/ANTC	37°	67+ 168	67+ 138+ 30
m.12501G>A	N1b	L-12339 (19) (CCATGTCTAACAACATGGC) Hmt H-12862 (20) (AAACCGATATCGCCGATACG)	56	Nde I	CA/ATTG	37°	541	179 + 362
m.13708G>A	J	L-13617 (20) TCTTCTCACCTAACAGGTC H-13863 (20) GTTGGTTAGGTAGTTGAGGT	63	MvaI	CC/(T/A)GG	37°	164 + 85	249
m.14766T>C	HV	L-14674 (20) (TATTCTCGCACGGACTACAA) H-14807 (20) (GGTCGATGAATGAGTGGTTA)	64	MseI= TruI	T/TAA	65°	93+ 17+4+20	110+ 4+ 20

m.14793A>G	U5a	L-14674 (20) TATTCTCGCACGGACTACAA Hmt H-15153 (21)CCCCTCAGAATGATATTTGGC	60	BsrBI / MbiI	CCACT	37°	520	140 + 380
m.14798T>C	K y J1c	HmtL-14424:CAAGACCTCAACCCCTGA HmtH-14802 mp: TCATCGACCTCCCCACCCCATCCAACATC	60	DdeI	C/TNAG	37°	28 + 174 + 219	28 + 174 + 190 + 29
m.15257G>A	J2	L-14826 (20) TCTCCGCATGATGAAACTC H-15369 (20) GATCCCGTTTCGTGCAAGAA	63	AccI	GT/(A/C)(T/G) AC	37°	430/ 105	535

Tabla A.3: Polimorfismos, condiciones de amplificación y RFLPs. Los oligonucleótidos se denotan en el extremo 3', se nombran como H y L para indicar la hebra pesada y la ligera, respectivamente. Las siglas HG, Ta, ER, Sc, Tc, mp denotan haplogrupo, temperatura de *annealing*, enzima de restricción, secuencia de corte de la enzima de restricción, temperatura de corte de la misma, y *miss-pairing* o desapareamiento respectivamente.

TABLA A.4: OLIGONUCLEÓTIDOS

NOMBRE	TAMAÑO (bp)	T _m (3)	SECUENCIA (5'-3')
hmtH112	20(10/10)	65.8	ACAGATACTGCGACATAGGG
hmtL569	20(10/10)	65.8	AACCAAACCCCAAAGACACC
hmtH626	20(10/10)	65.8	TTTATGGGGTGATGTGAGCC
hmtL1305	19(8/11)	65.8	GTAAGCGCAAGTACCCACG
hmtH1405	20(10/10)	65.8	ATCCACCTTCGACCCTTAAG
hmtL2070	20(10/10)	65.8	AATTTGCCACAGAACCCCTC
hmtH2174	20(10/10)	65.8	ATTGGTGGCTGCTTTTAGGC
hmtL2638	20 (10/10)	65.8	TAGGGACCTGTATGAATGGC
hmtL2797	21(11/10)	67.3	GTCTAAACTACCAAACCTGC
hmtH2982	20(9/11)	67.3	CTGATCCAACATCGAGGTGC
hmtH3140	20(10/10)	65.8	AAGGCGCTTTGTGAAGTAGG
hmtL3568	20(10/10)	65.8	CGCTCTTCTACTATGAACCC
hmtH3733	20(10/10)	65.8	ATGATGGCTAGGGTGACTTC
hmtL4322	21(12/9)	65.8	ATAATAGGAGCTTAAACCCCC
hmtH4501	20(10/10)	65.8	TGTGCCTGCAAAGATGGTAG
hmtL5061	20(10/10)	65.8	AGCAGTTCTACCGTACAACC
hmtH5174	20(12/8)	62.9	GTGTTAGTCATGTTAGCTTG
hmtL5828	20(9/11)	67.3	GAAAATCACCTCGGAGCTGG
hmtH5993	20(10/10)	65.8	TAAGGAGGCTTAGAGCTGTG
hmtL6563	20(10/10)	65.8	ACCTCAACACCACCTTCTTC
hmtH6753	20(10/10)	65.8	TGTGCTCACACGATAAACCC
hmtL7336	21(11/10)	67.3	GATTTGAGAAGCCTTCGCTTC
hmtH7497	21(12/9)	65.8	TTTGAAAAAGTCATGGAGGCC
hmtL8080	20(10/10)	65.8	TCTTGCACTCATGAGCTGTC
hmtH8251	20(10/10)	65.8	GCTATAGGGTAAATACGGGC
hmtL8815	20(10/10)	65.8	CTCATTTACACCAACCACCC
hmtH9030	21(11/10)	67.3	CCAATTAGGTGCATGAGTAGG
hmtH9187	20(10/10)	65.8	AGAGGCTTACTAGAAGTGTG
hmtL9611	20(10/10)	65.8	TCCCCTCCTAAACACATCC
hmtH9819	21(11/10)	67.3	GCCAATAATGACGTGAAGTCC
hmtL10380	20(10/10)	65.8	TCTGGCCTATGAGTGACTAC
hmtH10598	21(11/10)	67.3	GTTGAGGGTTATGAGAGTAGC
hmtL11107	21(12/9)	65.8	TTCACAGCCACAGAACTAATC
hmtH11381	20(10/10)	65.8	AAGTGAGTCCGTAAGAGG
hmtL11727	17(6/11)	62.9	GCCACGGGCTTACATC
hmtH12111	20(10/10)	65.8	AAACCCGGTAATGATGTCGG
hmtL12640	21(12/9)	65.8	TCGTTACATGGTCCATCATAG
hmtH12862	20(10/10)	65.8	AAACCGATATCGCCGATACG
hmtL13389	21(12/9)	65.8	TCCATCATCCACAACCTTAAC
hmtL13568	20(10/10)	65.8	CGCTCTTCTACTATGAACCC
hmtH13627	20(10/10)	65.8	AAGCGAGGTTGACCTGTTAG
hmtL14130	20(10/10)	65.8	TCTTCCCCTCATCCTAACC
hmtL14424	20(10/10)	65.8	CAAGACCTCAACCCCTGA
hmtH14432	20(10/10)	65.8	ATTGAGGAGTATCCTGAGGC
hmtH14559	20(9/11)	67.3	GATTGTTAGCGGTGTGGTGC
hmtL14637	20(10/10)	65.8	AACCCCAAAACCCATTAC
hmtL14838	20(10/10)	65.8	TCCAACATCTCCGCATGATG
hmtH15153	21(11/10)	67.3	CCCCTCAGAATGATATTTGGC
hmtL15591	20(10/10)	65.8	TTCGCCTACACAATTCTCCG
hmtH15912	20(10/10)	65.8	TCTCCGGTTTACAAGACTGG
hmtL16365	20(9/11)	67.3	GTCAAATCCCCTTCTCGTCCC

Tabla A.3: Oligonucleótidos. Los oligonucleótidos se denotan por la posición del extremo 3', bp: significa par de bases y T_m temperatura *melting*. La secuencia del oligo se muestra en dirección 5'-3'.

X. Publicaciones

**The risk of Leber's hereditary optic neuropathy is modified
by differences in the oxidative phosphorylation system
between mitochondrial DNA haplogroups**

Journal:	<i>Journal of Medical Genetics</i>
Manuscript ID:	jmedgenet-2011-100691
Article Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	12-Dec-2011
Complete List of Authors:	Gómez-Durán, Aurora; Universidad de Zaragoza, Bioquímica, Biología Molecular y Celular; Centro de Investigaciones Biomédicas en Red de Enfermedades Raras, CIBERER Pacheu-Grau, David; Universidad de Zaragoza, Bioquímica, Biología Molecular y Celular; Centro de Investigaciones Biomédicas en Red de Enfermedades Raras, CIBERER Martínez-Romero, Íñigo; Universidad de Zaragoza, Bioquímica, Biología Molecular y Celular; Centro de Investigaciones Biomédicas en Red de Enfermedades Raras, CIBERER López-Gallardo, Ester; Universidad de Zaragoza, Bioquímica, Biología Molecular y Celular; Centro de Investigaciones Biomédicas en Red de Enfermedades Raras, CIBERER López-Pérez, Manuel Montoya, Julio; Universidad de Zaragoza, Bioquímica, Biología Molecular y Celular; Centro de Investigaciones Biomédicas en Red de Enfermedades Raras, CIBERER Ruiz-Pesini, Eduardo; Universidad de Zaragoza, Bioquímica, Biología Molecular y Celular; Centro de Investigaciones Biomédicas en Red de Enfermedades Raras, CIBERER
Keywords:	LHON, OXPHOS, mtDNA, Haplogroup, Cybrid

1
2
3 **The risk of Leber's hereditary optic neuropathy is modified by differences in the oxidative**
4 **phosphorylation system between mitochondrial DNA haplogroups**
5
6
7

8
9 Aurora Gómez-Durán,¹ David Pacheu-Grau,¹ Íñigo Martínez-Romero,¹ Ester López-Gallardo,¹
10
11 Manuel J. López-Pérez,¹ Julio Montoya,¹ and Eduardo Ruiz-Pesini^{1,2,*}
12
13

14
15
16 ¹Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular, Centro de Investigaciones
17
18 Biomédicas En Red de Enfermedades Raras (CIBERER) and ²Fundación ARAID. Universidad de
19
20 Zaragoza, Zaragoza, Spain.
21
22

23
24
25 * Corresponding author: Eduardo Ruiz-Pesini. Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y
26
27 Celular. Universidad de Zaragoza. C/Miguel Servet 177, 50013-Zaragoza, Spain. Tel +34-
28
29 976761640; Fax: +34-976761612; Email: eduruiz@unizar.es
30
31

32
33
34 Keywords: LHON, OXPHOS, mtDNA, Haplogroup, Cybrid
35
36

37
38 Word count (excluding title page, abstract, references, figures and tables): 4,000
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

ABSTRACT

Background: Leber's hereditary optic neuropathy is a maternally inherited optic atrophy caused by mitochondrial DNA point mutations. Epidemiological studies have shown that individuals from mitochondrial genetic backgrounds (haplogroups) J/Uk and H have higher and lower risk, respectively, of suffering this disorder. **Methods:** To analyze the bases of these associations at cell and molecular levels, we have used the cybrids' model. **Results:** Cybrids from haplogroup J contain less mitochondrial DNA and RNA and synthesize a smaller amount of mitochondrial DNA-encoded polypeptides than those from haplogroup H. Haplogroup J cybrids also display lower oxygen consumption, mitochondrial inner membrane potential and total ATP levels. Mitochondrial DNA levels correlate with many parameters of the oxidative phosphorylation system. **Conclusions:** These results suggest that the mitochondrial DNA amount determines oxidative phosphorylation capacity. Moreover, our results and other recent observations support the possibility that mitochondrial DNA levels may be responsible for the bias of the disorder toward males, for the incomplete penetrance of mutations causing Leber's hereditary optic neuropathy and for the association of the disease with particular mitochondrial DNA haplogroups. Thus, individuals with a physiologic, environmental or genetic incapacity to sufficiently increase mtDNA levels in response to a LHON mutation will have higher susceptibilities to develop LHON.

INTRODUCTION

Leber's hereditary optic neuropathy (LHON, MIM 535000) is the most frequent mitochondrial DNA (mtDNA) disease. The endpoint of the disease is an optic atrophy associated with loss of central vision. Most LHON patients harbor one of the three primary mtDNA point mutations in genes from respiratory complex I (CI): m.3460G>A/*MT-ND1*/p.MT-ND1:A52T, m.11778G>A/*MT-ND4*/p.MT-ND4:R340H and m.14484T>C/*MT-ND6*/p.MT-ND6:M64V. While the pathomechanisms for these mutations are beginning to unravel,[1] why mainly males are affected with LHON and why many homoplasmic mutant maternal relatives do not develop the disease is still unknown.

Since the middle of the 1990s, different studies have found epidemiologic associations between LHON and particular phylogenetically related mtDNA genotypes, known as mtDNA haplogroups. In 1997, analyzing North American, German, Finish and Italian white patients, four different groups found that haplogroup J was overrepresented in LHON patients who harbored the pathologic mtDNA mutations m.11778G>A or m.14484T>C.[2-5] The risk of visual failure was also increased in haplogroup Uk patients who had m.3460G>A.[6] In contrast, haplogroup H appears to be a LHON resistance factor.[7] Combined, these results suggest that single nucleotide polymorphisms (SNPs) defining these haplogroups contribute to the pathologic phenotype.

Because it is impossible to control all environmental factors that affect humans, epidemiological studies inherently involve a heterogeneous subject pool. Moreover, nuclear DNA (nDNA) represents 99.9995% of the human genome and, therefore, many nuclear SNPs could affect the results of epidemiological studies on mtDNA. These disadvantages are only partially counteracted by increasing the sample size, and this is a difficult task for rare diseases such as LHON.[8] To overcome such problems, and analyze the bases of these associations at cell and molecular levels, an appropriate model such as the transmitochondrial cell line, cytoplasmic hybrid or cybrid model was required.[9] Cybrid cell lines share the same nuclear genetic background and

1
2
3 environmental conditions but differ in their mtDNA genotype. Using this approach, we have
4
5 recently shown that mtDNA and mtRNA levels, mitochondrial protein synthesis, cytochrome
6
7 oxidase activity and amount, normalized oxygen consumption, mitochondrial inner membrane
8
9 potential and growth capacity are different between cybrids of haplogroup H and Uk.[10]
10

11 Because haplogroups J/Uk and H are susceptibility and resistance factors, respectively, for
12
13 LHON disease and that haplogroups H and Uk are different from a biochemical phenotype point of
14
15 view, we used the cybrid model to investigate whether epidemiologic associations of haplogroup J
16
17 were based on the same biochemical events as those of haplogroup Uk. Our results confirm that the
18
19 mtDNA levels determine, in a large part, oxidative phosphorylation (OXPHOS) capacity of the cell
20
21 and that the lower amount of mtDNA in haplogroup J and Uk individuals can be responsible for
22
23 their higher susceptibilities to develop LHON.
24
25
26
27
28

29 MATERIAL AND METHODS

30 Biological samples and growth conditions

31
32 After winning the approval of the Ethics Committee of the Government of Aragón (Acta
33
34 n817/2008) and securing signed informed consent from the healthy volunteers, blood was obtained,
35
36 and platelets of five and nine individuals from mtDNA haplogroups H and J, respectively, were
37
38 used to build cybrids with the osteosarcoma 143B rho⁰ nuclear background.
39
40
41
42

43 Experiments were performed with cell lines grown in Dulbecco's modified eagle medium
44
45 (DMEM) containing glucose (4.5 g/l), pyruvate (0.11 g/l) and fetal bovine serum (FBS) (5%)
46
47 without antibiotics. When cells were grown with an antioxidant, 5 mM of N-acetyl cysteine (NAC)
48
49 was used in the culture medium. The analyses below reported were performed following protocols
50
51 previously published.[10]
52
53
54
55

56 Molecular-genetic analysis

57
58
59
60

1
2
3 Samples from volunteers were genetically characterized by performing PCR-RFLP for
4 mitochondrial haplogroup-defining SNPs in the coding region and sequencing the hypervariable
5 regions I and II. The mtDNA sequence was obtained by using the BigDye Terminator v 3.1 Cycle
6 Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and an ABI Prism 3730xl DNA analyzer (Applied
7 Biosystems, Foster City, CA, USA). The mtDNA content was measured by the qPCR method using
8 an Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Thermal Cycling Block (Applied
9 Biosystems). The mtDNA levels were determined in triplicate in three to six independent
10 experiments.

11
12 To assess the RNA levels, total RNA was isolated from exponentially growing cells using a
13 RNA isolation kit (NucleoSpin® RNA II) from Macherey-Nagel according to the manufacturer's
14 protocol; 2.5 µg of total RNA was reversed-transcribed into cDNA with the High capacity cDNA
15 reverse transcription kit (Applied Biosystems), using the manufacturer's conditions. The mRNA
16 levels of manganese superoxide dismutase (MnSOD), 6-phosphofructo-1-kinase-L (PFKL) and
17 mtRNAs were determined in triplicate in two independent experiments by RT-qPCR using the One-
18 Step Real-Time system (Applied Biosystems). The mRNA levels of mitochondrial DNA
19 polymerase subunit B (POLG2), TWINKLE helicase, single stranded DNA-binding protein
20 (mtSSB), mitochondrial RNA polymerase (POLRMT), mitochondrial transcription factor B2
21 (TFB2M) and mitochondrial termination factor (MTERF) were determined using probes described
22 previously.[11] The expression levels were normalized using the 18S rRNA reference gene. The
23 comparative *C_q* method was used for relative quantification of gene expression as described by the
24 real-time PCR machine manual. Differences in the *C_q* values (*dC_q*) of the transcript of interest and
25 the reference gene were used to determine the relative expression of the gene in each sample. The
26 *dC_q* method was used to calculate fold expression. StepOne software version 2.0 (Applied
27 Biosystems) was used for data analysis.

MtDNA-encoded protein synthesis

The mitochondrial protein synthesis was analyzed as previously described 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 fluorogram from at least two independent gels were quantified by densitometric analysis with the Gelpro analyzer v 4.0. Three bands, corresponding to p.MT-CO1, p.MT-ND2 and p.MT-ND3 (upper, middle and lower parts of the gel, respectively) polypeptides were selected to quantification.

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 μ M) respiration analysis were performed. To correct for the oxygen consumption that is not due to electron transport chain (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.

Mitoprofile[®] Human Complex IV Activity and Quantity from Mitosciences (Invitrogen) was used according to the manufacturer's instructions for the determination of CIV activity and levels. The enzymatic activities of respiratory complex II (CII) and IV (CIV) and citrate synthase (CS) were assayed in a NovoStar MBG Labtech microplate instrument.

Determination of mitochondrial inner membrane potential and surface

The determination of mitochondrial inner membrane potential (MIMP) was done in triplicate in at least three independent experiments using 3,3'-dihexyloxycarbocyanine [DiOC₆(3)]. Mitochondrial inner membrane surface (MIMS) was measured, based on the quantity of cardiolipin, four times in three independent experiments by using nonyl-acridine orange (NAO). A Beckman Coulter Cytomics FC500 cytometer was used for measurements of intracellular fluorescence.

Determination of ATP levels

ATP levels were measured four times in three independent experiments using the CellTiter-Glo[®] Luminescent 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 µg/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 µg/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.

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 and the unpaired two-tailed *t*-test was used to compare parameters. P-values of < 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

To analyze haplogroup J OXPHOS function attempting to avoid the introduction of clonal effects, we built nine different cybrids in the nuclear background of osteosarcoma 143B cells. The epidemiological differences described in the introduction have been found in European or European-descended individuals, and the major European subhaplogroups J are J1c and J2. To minimize phenotypic effects due to subhaplogroup-defining SNPs, we built the same number of J1c- and J2-derived cybrids (supplementary figure 1). We also included one sample from J1b, a less frequent subhaplogroup J in European populations.[12] The same five haplogroup H cybrids that we used to evaluate haplogroup Uk OXPHOS function were also used here as the reference group;[10] these transmitochondrial cell lines included haplotypes of three subhaplogroups H, two of which are widely represented in Europe.

mtDNA and mtRNA levels and mitochondrial protein synthesis are lower in cybrids from haplogroup J

It has been reported that one of the mtDNA variants that distinguishes haplogroups H and J (m.295C>T/*MT-DLOOP*) increases mitochondrial transcription factor A (TFAM) binding and mtDNA copy numbers. In fact, cybrids from haplogroup J were found to have two times more mtDNA than those of haplogroup H.[13] In contrast to the previous results, we observed that mtDNA levels were in fact 11% lower in cybrids from haplogroup J than in those of haplogroup H (Figure 1A). Possible explanations for this discrepancy could be different nDNA-mtDNA interactions due to distinct nuclear donor rho⁰ cell lines (lymphoblastoid Wal2A versus osteosarcoma 143B) or differences in mitochondrial genetic background (1 J1, 1 J1b2, 1 H1, 2 H6 and 2 H* versus 1 J1b1, 4 J1c, 4 J2, 3 H1, 1 H5 and 1 H13). Because cybrids from haplogroup J did not have other SNPs in sequences involved in mtDNA replication, we reasoned that some other mechanism was responsible for the differences in mtDNA levels.

1
2
3 It has been reported that high reactive oxygen species (ROS) levels enhanced mtDNA
4 replication and that the antioxidant NAC can decrease mtDNA levels.[14,15] The mRNA levels of
5 the antioxidant enzyme MnSOD were the same in cybrids H and J (Figure 1B), suggesting that the
6 difference in mtDNA levels between the cybrids probably was not caused by differences in ROS
7 levels. However, we did find that cybrids H mtDNA levels were significantly reduced by treatment
8 with NAC, though this compound left cybrids J mtDNA levels largely unaltered (Figure 1A).
9
10
11
12
13
14
15

16 It has been suggested that NAC may not function to scavenge ROS but rather to interfere
17 with the formation of disulfide bonds involved in functional redox switches and signaling
18 pathways.[16] If this were the case, it is possible that a NAC-sensitive regulatory pathway
19 controlling mtDNA levels is differentially affected in the cybrids of the two different haplogroups.
20 It has already been shown that expression levels of several nuclear genes are different between
21 cybrids H and J and that NAC affects the levels of some of them.[17-19] To check for potential
22 differences in the expression of mtDNA replication genes, we measured mRNA levels for POLG2,
23 TWINKLE, mtSSB and POLRMT.[11] However, we did not find differences between cybrids from
24 the two haplogroups (Figure 1C). Thus, NAC either acts directly at the protein level or the effects
25 we observe involve some other cell pathway.
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37

38 After evaluating cybrid mtDNA levels, we then turned our attention to mtDNA gene
39 expression. The levels of all mtRNAs were decreased in cybrids from haplogroup J; however, the
40 differences for 16S rRNA, p.MT-ND4/ND4L, p.MT-ND6, p.MT-CO1, p.MT-CO3 and p.MT-
41 ATP6/8 were the only ones that were statistically significant (Figure 2A). The mean total mtRNA
42 levels of cybrids from haplogroup J were 18% lower than those of haplogroup H (Figure 2B). These
43 levels were similarly lower for cybrids J RNAs from the three mtDNA transcription units (Figure
44 2C); moreover, RNA levels of the three transcription units showed a significant positive correlation
45 ($r \geq 0.77$, $P \leq 0.0007$). None of the genetic differences between cybrids H and J are in sequences
46 involved in mtDNA transcription, and the analysis of mRNA levels for proteins involved in mtDNA
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 transcription, such as POLRMT, TFB2M and MTERF, neither showed differences between cybrids
4
5 H and J (Figure 2D). Therefore, these results point to a general mechanism controlling these
6
7 mtRNA levels. The relationship between mtDNA and mtRNA levels has been frequently
8
9 reported,[10,20-24] and it has been previously shown that p.MT-ATP6 and p.MT-CO1 mRNA
10
11 levels correlate significantly with mtDNA copy number.[24,25] In our cybrids, RNA levels from
12
13 transcription units L and H₁ correlate significantly with mtDNA levels ($r \geq 0.57$, $P \leq 0.031$), a result
14
15 that further supports the interpretation that lower cybrid J mtRNA levels are due to reduced mtDNA
16
17 amounts.
18
19

20
21 To determine the effect of lower mtRNA levels in cybrids J, we studied the synthesis of
22
23 mtDNA-encoded polypeptides. The analysis of mitochondrial translation products showed a
24
25 significant decrease in mitochondrial protein synthesis in cybrids J (Figure 3). Only m.2706A>G, a
26
27 mutation in the 16S rRNA gene (*MT-RNR2*), could explain the lower mitochondrial protein
28
29 synthesis in cybrids J. However, we found that mtDNA amount and RNA levels for genes from
30
31 transcription unit H1 were significantly correlated with mitochondrial protein synthesis ($r \geq 0.62$, P
32
33 ≤ 0.016). These correlations, along with previous observations,[10,23] suggest that lower
34
35 mitochondrial nucleic acids levels are probably responsible for the lower synthesis of mtDNA-
36
37 encoded polypeptides.
38
39
40
41
42

43 **The mitochondrial mass of haplogroups H and J cybrids is similar**

44
45 The lower mtDNA and mtRNA levels and a decreased mitochondrial protein synthesis in
46
47 cybrids J could result from having fewer mitochondria. To check for potential differences in the cell
48
49 fraction occupied by mitochondria, we determined the specific activity of CS, a nDNA-encoded
50
51 mitochondrial matrix enzyme that it is frequently used as a marker for the mitochondrial number or
52
53 size. We also measured the specific activity of CII, a nDNA-encoded mitochondrial inner
54
55 membrane enzyme, as well as MIMS. These experiments, however, did not reveal any differences
56
57
58
59
60

1
2
3 between cybrid H and J values for the parameters tested (Figure 4A and B). Therefore, the lower
4
5 mitochondrial nucleic acid and protein levels in cybrids J are not due to having fewer mitochondria.
6

7 It has recently been found that mtDNA levels correlate with CIV activity.[26,27] Although
8
9 we demonstrate that CIV amount and activity are indeed correlated ($r = 0.81$, $P = 0.0002$), there
10
11 were no significant differences in these values between both haplogroups (Figure 4C). Interestingly,
12
13 a general tendency for a faster recovery and higher final CIV levels after treatment with
14
15 doxycycline were previously observed in haplogroup J LHON mutant cybrids.[28] These results
16
17 suggest the possibility that the mtDNA genetic background of cybrids J somehow influences CIV
18
19 assembly or stability. Such an observation could be the reason that the CIV of cybrids H and J is of
20
21 similar quantity and activity even though mitochondrial gene expression in cybrids J is lower.
22
23
24
25
26

27 **Oxygen consumption and mitochondrial inner membrane potential are lower in cybrids from** 28 29 **haplogroup J** 30

31 The absence of differences in CIV activity and quantity between cybrids H and J does not
32
33 rule out the possibility for differences in other respiratory complexes and OXPHOS function. In
34
35 fact, it has been shown that mtDNA levels also correlate with respiratory complex III (CIII)
36
37 activity.[26] ETC is the main oxygen consumer in the cell. Oxidation of substrates generates
38
39 reducing power and these electrons will travel through the ETC complexes (CI-IV), which
40
41 ultimately lead to the reduction of oxygen to water. We therefore measured oxygen consumption of
42
43 our cybrids and found significant differences in endogenous respiration between cybrids H and J
44
45 (expressed as fmole/min/cell) (Figure 5A). Interestingly, we have previously observed that healthy
46
47 Spanish males of haplogroup J have significantly lower VO_{2max} than non-J individuals and H
48
49 individuals, in particular.[29,30] Moreover, it has been reported that mtDNA levels correlate with
50
51 VO_{2max} and with cell oxygen consumption.[21,31,32] Despite having similar CIV values, the
52
53 different cybrids showed a significant positive correlation between CIV specific activity and
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 endogenous respiration ($r = 0.65$, $P = 0.009$).
4

5 Respiratory ETC is coupled to the pumping of protons into the intermembrane space, a
6 process that generates an electrochemical gradient across the mitochondrial inner membrane. This
7 gradient can, by feedback, inhibit the proton pumping and, as a consequence, oxygen consumption.
8 To rule out indirect effects of the electrochemical gradient on oxygen consumption, we treated the
9 cybrids with the ATP synthase inhibitor oligomycin (leaking respiration) or the uncoupler FCCP
10 (uncoupled respiration), compounds that, respectively increase or decrease the electrochemical
11 gradient. This analysis, however, showed that uncoupled respiration was not significantly lower in
12 cybrids J. Interestingly, others have described a correlation between mtDNA levels and uncoupled
13 oxygen consumption in mouse cybrids.[33] Leaking respiration was significantly lower in cybrids
14 from haplogroup J (Figure 5A). There was a positive correlation between CIV specific activity and
15 leaking respiration ($r = 0.60$, $P = 0.020$) as well as between endogenous and leaking or uncoupled
16 respiration ($r \geq 0.65$, $P \leq 0.010$). Thus, the lower oxygen consumption of cybrids J was apparently
17 not due to a higher electrochemical gradient. In fact, MIMP of cybrids from haplogroup J was
18 significantly lower (Figure 5B), and MIMP was significantly correlated with mtDNA levels,
19 endogenous respiration and leaking respiration ($r \geq 0.56$, $P \leq 0.042$). It is possible that the lower
20 MIMP of cybrids J results secondarily from reduced proton pumping, because a lower electron flow
21 rate through the ETC complexes, which in turn causes lowered oxygen consumption. Supporting
22 this interpretation, rotenone inhibition of CI from osteosarcoma 143B cells inhibited cell respiration
23 and decreased MIMP.[34] Moreover, a mutation in the *MT-ND5* gene of osteosarcoma 143B
24 cybrids resulted in decreases in both respiration and MIMP.[35]
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48

49 Between cybrids H and J, there are nine different SNPs in mtDNA protein-coding genes that
50 could potentially explain the differences we observe in oxygen consumption. While four of the
51 SNPs are synonymous changes (m.7028C>T, m.11251A>G, m.11719G>A and m.12612A>G),
52 three of the non-synonymous SNPs affect CI subunits (m.4216T>C/p.MT-ND1:Y304H,
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 m.10398A>G/p.MT-ND3:T114A and m.13708G>A/p.MT-ND5:A458T). It was shown that a
4 cybrid harboring threonine at p.MT-ND3 residue 114 (as in cybrids H) had increased CI activity
5 and *Escherichia coli* harboring histidine at NuoH residue 316 (homologous to human p.MT-ND1
6 residue 304) had a markedly decreased hexamine ruthenium reductase activity, indicating that
7 structural integrity of CI was affected.[36,37] The two other non-synonymous SNPs are in p.MT-
8 CYB (m.14766C>T/p.MT-CYB:T7I and m.15452C>A/p.MT-CYB:L236I), and it has been
9 suggested that Thr7 in p.MT-CYB, like in cybrids H, can increase the efficiency of the Q-cycle and
10 the ETC overall.[38]
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

23 **ATP levels are also lower in cybrids from haplogroup J**

24
25 Because mitochondrial ATP synthesis is dependent on MIMP, we decided to measure ATP
26 levels in our cybrids and found that ATP levels were significantly lower in cybrids from haplogroup
27 J when grown in the presence of glucose (Figure 6A). Under these conditions, there was also a
28 significant correlation between ATP levels and MIMP ($r = 0.80$, $P = 0.007$). In contrast, we did not
29 find any difference in ATP levels when the cybrids were grown in deoxyglucose with pyruvate, a
30 glycolytic inhibitor and a substrate that is consumed by the OXPHOS system. ATP levels were also
31 significantly different when the cybrids were grown in glucose with oligomycin (Figure 6A). These
32 results therefore suggest that cybrids J are defective in some aspect of glycolysis. To test this
33 hypothesis, we first analyzed the mRNA levels of the main glycolytic regulator enzyme PFKL.
34 Contrary to our expectations, PFKL levels were significantly higher in cybrids J (Figure 6B), an
35 effect that probably results from a compensatory response. However, it has been suggested that
36 glycolytic ATP can supply energy for maintaining MIMP.[35,39] Therefore, it is possible that the
37 lower ATP levels in cybrids J is the combined result of an incomplete compensatory glycolytic
38 response and the increased demand for ATP needed to maintain MIMP. Because glycolytic
39 enzymes are nDNA-encoded, this result also suggests that OXPHOS differences due to mtDNA
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 SNPs can influence the expression of nuclear genes, as has been shown previously by others.[40]
4
5
6

7 **DISCUSSION**

8
9 The correlations found between mtDNA levels and many other OXPHOS parameters, such
10 as mtRNA levels, mtDNA-encoded protein amount, respiratory complexes activities, oxygen
11 consumption and MIMP, confirm that mtDNA amount largely determines the OXPHOS function.
12
13 Cybrids from haplogroups Uk and J contain less mtDNA than those from haplogroup H.[10]
14
15 Considering that the nuclear genetic background and culture conditions are the same in all these
16 cybrids, the differences between them must be due to particular mtDNA SNPs. Because none of the
17 mtDNA SNPs examined were in sequences involved in mtDNA replication and because mtDNA
18 encodes only OXPHOS proteins, it is likely that the lower mtDNA amounts we observe are the
19 result of an indirect OXPHOS effect due to other mtDNA SNPs. OXPHOS is a metabolic pathway
20 involved in many cell functions, including the regulation of cell red-ox state and the levels of ROS,
21 calcium and ATP. These compounds act as second messengers that trigger retrograde signaling
22 responses.[41,42] Thus, the mtDNA genotype must be able to provoke differences in these
23 parameters. In support of this hypothesis, it has been shown that intracellular calcium dynamics are
24 different in cybrids from mtDNA haplogroups N and non-N.[43] Similar to our study, it was
25 recently reported that ATP levels were higher in CD4⁺ cells from haplogroup H versus non-H
26 patients suffering from Huntington disease.[44] Therefore, these differences in second messengers
27 might alter some of the many cellular pathways regulated by these compounds.
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46

47 One of the five SNPs that differentiate haplogroups J and Uk from haplogroup H is located
48 in the mtDNA control region but does not affect sequences that are functionally important. While
49 two of the other SNPs are synonymous, the remaining two, m.2706A>G/*MT-RNR2* and
50 m.14766C>T/*MT-CYB*/p.MT-CYB:T7I, are not. In cybrids Uk and J,[10] these latter two SNPs are
51 suggested to indirectly reduce mtDNA, mtRNA and mitochondrial protein levels as well as MIMP.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Alternatively, it is possible that the OXPHOS differences we observe are instead determined by
4 SNPs defining haplogroups J1c, J2 and Uk. Haplogroups Uk and J1c share a non-synonymous SNP
5 in the cytochrome b gene (m.14798T>C/p.MT-CYB:F18L), while haplogroup J2 is defined by a
6 different amino acid change in this protein (m.15257G>A/p.MT-CYB:D171N). Interestingly, such
7 a scenario in which J1c and J2 were the key OXPHOS determinants would explain why haplogroup
8 J and LHON are not correlated in Iran,[45] as the major subhaplogroup J in this region is J1b.[46]
9 The haplogroup J1b is not defined by amino acid changes in cytochrome b, and hybrids from this
10 haplogroup have higher mtDNA levels than those from haplogroup H.[13]
11
12
13
14
15
16
17
18
19

20
21 Our results suggest that individuals from haplogroups Uk,[10] J1c and J2 are more
22 susceptible to LHON because they have reduced OXPHOS capacity, which results from lower
23 mtDNA levels. The mtDNA amounts may also explain why LHON is more highly prevalent in
24 males. It has recently been reported that estrogens can increase mtDNA, mtRNA and mtDNA-
25 encoded polypeptides levels and enhance oxygen consumption and ATP levels in a glucose
26 medium.[47] Moreover, mtDNA levels are lower in LHON-affected individuals as compared to
27 their unaffected homoplasmic mutant maternal relatives.[48] Thus, a complete compensatory
28 response could be achieved by increasing mtDNA amounts. According to this model, individuals
29 incapable of increasing mtDNA amounts sufficiently will develop LHON, a relationship that could
30 very well explain why LHON has incomplete penetrance. Environmental factors precipitate the loss
31 in vision and contribute to explain the marked incomplete penetrance of LHON. A strong and
32 consistent association between loss in vision and smoking has recently been reported in LHON
33 pedigrees,[49] and it has been observed that smokers have fewer copies of mtDNA per nuclear
34 genome.[50]
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

51
52 Our results confirm that ancient, highly frequent and inherited mtDNA genetic variants,
53 such as those defining mtDNA haplogroups, differently affect OXPHOS function and human
54 health. However, recent, rare and somatic mtDNA mutations can also alter this function and
55
56
57
58
59
60

1
2
3 manifest phenotypical effects in the organism.[33] Therefore, an important part of our susceptibility
4
5 to different pathologies appears to be mtDNA-mediated.
6
7

8 9 **COMPETING INTERESTS**

10
11 None
12
13

14 15 **FUNDING**

16
17 This work was supported by grants from Instituto de Salud Carlos III [FIS grant numbers
18
19 PI08/0264 to E.R-P., PI10/00662 to J.M.]; Departamento de Ciencia, Tecnología y Universidad del
20
21 Gobierno de Aragón y Fondo Social Europeo [grant number Grupos Consolidados B33 to J.M.];
22
23 Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud [grant number PIPAMER10-010 to E.R-P.]; Fundación
24
25 ARAID [Programa de Apoyo a la I+D+I para jóvenes investigadores 2010 to E.L-G.]; and
26
27 Asociación de Enfermos de Patología Mitocondrial (AEPMI) to A.G-D. The CIBERER is an
28
29 initiative of the ISCIII. The funders had no role in study design, data collection and analysis,
30
31 decision to publish, or preparation of the manuscript.
32
33
34
35
36
37

38 39 **REFERENCES**

- 40
41 1. Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Chinnery PF. Mitochondrial optic neuropathies - disease
42
43 mechanisms and therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res* 2011;**30**:81-114.
44
45 2. Brown MD, Sun F, Wallace DC. Clustering of Caucasian Leber hereditary optic neuropathy
46
47 patients containing the 11778 or 14484 mutations on an mtDNA lineage. *Am J Hum Genet*
48
49 1997;**60**:381-7.
50
51 3. Hofmann S, Bezold R, Jaksch M, Obermaier-Kusser B, Mertens S, Kaufhold P, Rabl W,
52
53 Hecker W, Gerbitz KD. Wolfram (DIDMOAD) syndrome and Leber hereditary optic
54
55 neuropathy (LHON) are associated with distinct mitochondrial DNA haplotypes. *Genomics*
56
57
58
59
60

- 1
2
3 1997;**39**:8-18.
4
5 4. Lamminen T, Huoponen K, Sistonen P, Juvonen V, Lahermo P, Aula P, Nikoskelainen E,
6
7 Savontaus ML. mtDNA haplotype analysis in Finnish families with leber hereditary optic
8
9 neuroretinopathy. *Eur J Hum Genet* 1997;**5**:271-9.
10
11 5. Torroni A, Petrozzi M, D'Urbano L, Sellitto D, Zeviani M, Carrara F, Carducci C, Leuzzi V,
12
13 Carelli V, Barboni P, De Negri A, Scozzari R. Haplotype and phylogenetic analyses suggest
14
15 that one European-specific mtDNA background plays a role in the expression of Leber
16
17 hereditary optic neuropathy by increasing the penetrance of the primary mutations 11778
18
19 and 14484. *Am J Hum Genet* 1997;**60**:1107-21.
20
21
22 6. Hudson G, Carelli V, Spruijt L, Gerards M, Mowbray C, Achilli A, Pyle A, Elson J, Howell
23
24 N, La Morgia C, Valentino ML, Huoponen K, Savontaus ML, Nikoskelainen E, Sadun AA,
25
26 Salomao SR, Belfort R Jr, Griffiths P, Man PY, de Coo RF, Horvath R, Zeviani M, Smeets
27
28 HJ, Torroni A, Chinnery PF. Clinical expression of Leber hereditary optic neuropathy is
29
30 affected by the mitochondrial DNA-haplogroup background. *Am J Hum Genet* 2007;**81**:228-
31
32 33.
33
34
35 7. Howell N, Herrnstadt C, Shults C, Mackey DA. Low penetrance of the 14484 LHON
36
37 mutation when it arises in a non-haplogroup J mtDNA background. *Am J Med Genet A*
38
39 2003;**119A**:147-51.
40
41
42 8. Man PY, Griffiths PG, Brown DT, Howell N, Turnbull DM, Chinnery PF. The
43
44 epidemiology of Leber hereditary optic neuropathy in the North East of England. *Am J Hum*
45
46 *Genet* 2003;**72**:333-9.
47
48
49 9. King MP, Attardi G. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous
50
51 mitochondria by complementation. *Science* 1989;**246**:500-3.
52
53
54 10. Gómez-Durán A, Pacheu-Grau D, López-Gallardo E, Díez-Sánchez C, Montoya J, López-
55
56 Pérez MJ, Ruiz-Pesini E. Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS
57
58
59
60

- 1
2
3 differences between mitochondrial haplogroups. *Hum Mol Genet* 2010;**19**:3343-53.
4
5
6 11. Bruni F, Polosa PL, Gadaleta MN, Cantatore P, Roberti M. Nuclear respiratory factor 2
7 induces the expression of many but not all human proteins acting in mitochondrial DNA
8 transcription and replication. *J Biol Chem* 2010;**285**:3939-48.
9
10
11 12. Carelli V, Achilli A, Valentino ML, Rengo C, Semino O, Pala M, Olivieri A, Mattiazzi M,
12 Pallotti F, Carrara F, Zeviani M, Leuzzi V, Carducci C, Valle G, Simionati B, Mendieta L,
13 Salomao S, Belfort R Jr, Sadun AA, Torroni A. Haplogroup effects and recombination of
14 mitochondrial DNA: novel clues from the analysis of Leber hereditary optic neuropathy
15 pedigrees. *Am J Hum Genet* 2006;**78**:564-74.
16
17
18 13. Suissa S, Wang Z, Poole J, Wittkopp S, Feder J, Shutt TE, Wallace DC, Shadel GS,
19 Mishmar D. Ancient mtDNA genetic variants modulate mtDNA transcription and
20 replication. *PLoS Genet* 2009;**5**:e1000474.
21
22
23 14. Achanta G, Sasaki R, Feng L, Carew JS, Lu W, Pelicano H, Keating MJ, Huang P. Novel
24 role of p53 in maintaining mitochondrial genetic stability through interaction with DNA Pol
25 gamma. *EMBO J* 2005;**24**:3482-92.
26
27
28 15. Moreno-Loshuertos R, Acín-Pérez R, Fernández-Silva P, Movilla N, Pérez-Martos A,
29 Rodríguez de Cordoba S, Gallardo ME, Enríquez JA. Differences in reactive oxygen species
30 production explain the phenotypes associated with common mouse mitochondrial DNA
31 variants. *Nat Genet* 2006;**38**:1261-8.
32
33
34 16. Parasassi T, Brunelli R, Costa G, De Spirito M, Krasnowska E, Lundeberg T, Pittaluga E,
35 Ursini F. Thiol redox transitions in cell signaling: a lesson from N-acetylcysteine.
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52 17. Bellizzi D, Cavalcante P, Taverna D, Rose G, Passarino G, Salvioli S, Franceschi C, De
53 Benedictis G. Gene expression of cytokines and cytokine receptors is modulated by the
54 common variability of the mitochondrial DNA in cybrid cell lines. *Genes Cells*
55
56
57
58
59
60

- 2006;**11**:883-91.
18. Bellizzi D, Taverna D, D'Aquila P, De Blasi S, De Benedictis G. Mitochondrial DNA variability modulates mRNA and intra-mitochondrial protein levels of HSP60 and HSP75: experimental evidence from cybrid lines. *Cell Stress Chaperones* 2009;**14**:265-71.
19. Shibamura M, Kuroki T, Nose K. Inhibition by N-acetyl-L-cysteine of interleukin-6 mRNA induction and activation of NF kappa B by tumor necrosis factor alpha in a mouse fibroblastic cell line, Balb/3T3. *FEBS Lett* 1994;**353**:62-6.
20. Williams RS. Mitochondrial gene expression in mammalian striated muscle. Evidence that variation in gene dosage is the major regulatory event. *J Biol Chem* 1986;**261**:12390-4.
21. Welle S, Bhatt K, Shah B, Needler N, Delehanty JM, Thornton CA. Reduced amount of mitochondrial DNA in aged human muscle. *J Appl Physiol* 2003;**94**:1479-84.
22. Coskun PE, Beal MF, Wallace DC. Alzheimer's brains harbor somatic mtDNA control-region mutations that suppress mitochondrial transcription and replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;**101**:10726-31.
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* 2007;**35**:4042-54.
24. Karamanlidis G, Nascimben L, Couper GS, Shekar PS, del Monte F, Tian R. Defective DNA replication impairs mitochondrial biogenesis in human failing hearts. *Circ Res* 2010;**106**:1541-8.
25. Kaaman M, Sparks LM, van Harmelen V, Smith SR, Sjölin E, Dahlman I, Arner P. Strong association between mitochondrial DNA copy number and lipogenesis in human white adipose tissue. *Diabetologia* 2007;**50**:2526-33.
26. Rocher C, Taanman JW, Pierron D, Faustin B, Benard G, Rossignol R, Malgat M, Pedespan L, Letellier T. Influence of mitochondrial DNA level on cellular energy metabolism:

- 1
2
3 implications for mitochondrial diseases. *J Bioenerg Biomembr* 2008;**40**:59-67.
- 4
5 27. Fernández-Vizarra E, Enríquez JA, Pérez-Martos A, Montoya J, Fernández-Silva P. Tissue-
6
7 specific differences in mitochondrial activity and biogenesis. *Mitochondrion* 2011;**11**:207-
8
9 13.
- 10
11 28. Pello R, Martín MA, Carelli V, Nijtmans LG, Achilli A, Pala M, Torroni A, Gómez-Durán
12
13 A, Ruiz-Pesini E, Martinuzzi A, Smeitink JA, Arenas J, Ugalde C. Mitochondrial DNA
14
15 background modulates the assembly kinetics of OXPHOS complexes in a cellular model of
16
17 mitochondrial disease. *Hum Mol Genet* 2008;**17**:4001-11.
- 18
19 29. Marcuello A, Martínez-Redondo D, Dahmani Y, Casajús JA, Ruiz-Pesini E, Montoya J,
20
21 López-Pérez MJ, Díez-Sánchez C. Human mitochondrial variants influence on oxygen
22
23 consumption. *Mitochondrion* 2009;**9**:27-30.
- 24
25 30. Martínez-Redondo D, Marcuello A, Casajús JA, Ara I, Dahmani Y, Montoya J, Ruiz-Pesini
26
27 E, López-Pérez MJ, Díez-Sánchez C. Human mitochondrial haplogroup H: the highest
28
29 VO₂max consumer--is it a paradox? *Mitochondrion* 2010;**10**:102-7.
- 30
31 31. Bentlage HA, Attardi G. Relationship of genotype to phenotype in fibroblast-derived
32
33 transmitochondrial cell lines carrying the 3243 mutation associated with the MELAS
34
35 encephalomyopathy: shift towards mutant genotype and role of mtDNA copy number. *Hum*
36
37 *Mol Genet* 1996;**5**:197-205.
- 38
39 32. Laderman KA, Penny JR, Mazzucchelli F, Bresolin N, Scarlato G, Attardi G. Aging-
40
41 dependent functional alterations of mitochondrial DNA (mtDNA) from human fibroblasts
42
43 transferred into mtDNA-less cells. *J Biol Chem* 1996;**271**:15891-7.
- 44
45 33. Li Y, Li HZ, Hu P, Deng J, Banoei MM, Sharma LK, Bai Y. Generation and bioenergetic
46
47 analysis of cybrids containing mitochondrial DNA from mouse skeletal muscle during
48
49 aging. *Nucleic Acids Res* 2010;**38**:1913-21.
- 50
51 34. Barrientos A, Moraes CT. Titrating the effects of mitochondrial complex I impairment in the
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 cell physiology. *J Biol Chem* 1999;**274**:16188-97.
4
5 35. McKenzie M, Liolitsa D, Akinshina N, Campanella M, Sisodiya S, Hargreaves I,
6
7 Nirmalananthan N, Sweeney MG, Abou-Sleiman PM, Wood NW, Hanna MG, Duchon MR.
8
9 Mitochondrial ND5 gene variation associated with encephalomyopathy and mitochondrial
10
11 ATP consumption. *J Biol Chem* 2007;**282**:36845-52.
12
13
14 36. Kulawiec M, Owens KM, Singh KK. mtDNA G10398A variant in African-American
15
16 women with breast cancer provides resistance to apoptosis and promotes metastasis in mice.
17
18 *J Hum Genet* 2009;**54**:647-54.
19
20
21 37. Hinttala R, Kervinen M, Uusimaa J, Maliniemi P, Finnilä S, Rantala H, Remes AM,
22
23 Hassinen IE, Majamaa K. Analysis of functional consequences of haplogroup J
24
25 polymorphisms m.4216T>C and m.3866T>C in human MT-ND1: mutagenesis of
26
27 homologous positions in Escherichia coli. *Mitochondrion* 2010;**10**:358-61.
28
29
30 38. Beckstead WA, Ebbert MT, Rowe MJ, McClellan DA. Evolutionary pressure on
31
32 mitochondrial cytochrome b is consistent with a role of CytbI7T affecting longevity during
33
34 caloric restriction. *PLoS One* 2009;**4**:e5836.
35
36
37 39. Desquret V, Loiseau D, Jacques C, Douay O, Malthiery Y, Ritz P, Roussel D.
38
39 Dinitrophenol-induced mitochondrial uncoupling in vivo triggers respiratory adaptation in
40
41 HepG2 cells. *Biochim Biophys Acta* 2006;**1757**:21-30.
42
43
44 40. Hwang S, Kwak SH, Bhak J, Kang HS, Lee YR, Koo BK, Park KS, Lee HK, Cho YM.
45
46 Gene expression pattern in transmitochondrial cytoplasmic hybrid cells harboring type 2
47
48 diabetes-associated mitochondrial DNA haplogroups. *PLoS One* 2011;**6**:e22116.
49
50
51 41. Butow RA, Avadhani NG. Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Mol Cell*
52
53 2004;**14**:1-15.
54
55
56 42. Finley LW, Haigis MC. The coordination of nuclear and mitochondrial communication
57
58 during aging and calorie restriction. *Ageing Res Rev* 2009;**8**:173-88.
59
60

- 1
2
3 43. Kazuno AA, Munakata K, Nagai T, Shimozone S, Tanaka M, Yoneda M, Kato N,
4
5 Miyawaki A, Kato T. Identification of mitochondrial DNA polymorphisms that alter
6
7 mitochondrial matrix pH and intracellular calcium dynamics. *PLoS Genet* 2006;**2**:e128.
8
9
10 44. Arning L, Haghikia A, Taherzadeh-Fard E, Saft C, Andrich J, Pula B, Höxtermann S,
11
12 Wiczorek S, Akkad DA, Perrech M, Gold R, Epplen JT, Chan A. Mitochondrial
13
14 haplogroup H correlates with ATP levels and age at onset in Huntington disease. *J Mol Med*
15
16 2010;**88**:431-6.
17
18 45. Houshmand M, Sharifpanah F, Tabasi A, Sanati MH, Vakilian M, Lavasani SH,
19
20 Joughehdoust S. Leber's hereditary optic neuropathy: the spectrum of mitochondrial DNA
21
22 mutations in Iranian patients. *Ann N Y Acad Sci* 2004;**1011**:345-9.
23
24 46. Quintana-Murci L, Chaix R, Wells RS, Behar DM, Sayar H, Scozzari R, Rengo C, Al-
25
26 Zahery N, Semino O, Santachiara-Benerecetti AS, Coppa A, Ayub Q, Mohyuddin A, Tyler-
27
28 Smith C, Qasim Mehdi S, Torroni A, McElreavey K. Where west meets east: the complex
29
30 mtDNA landscape of the southwest and Central Asian corridor. *Am J Hum Genet*
31
32 2004;**74**:827-45.
33
34 47. Giordano C, Montopoli M, Perli E, Orlandi M, Fantin M, Ross-Cisneros FN, Caparrotta L,
35
36 Martinuzzi A, Ragazzi E, Ghelli A, Sadun AA, d'Amati G, Carelli V. Oestrogens ameliorate
37
38 mitochondrial dysfunction in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain* 2011;**134**:220-34.
39
40 48. Nishioka T, Soemantri A, Ishida T. mtDNA/nDNA ratio in 14484 LHON mitochondrial
41
42 mutation carriers. *J Hum Genet* 2004;**49**:701-5.
43
44 49. Kirkman MA, Yu-Wai-Man P, Korsten A, Leonhardt M, Dimitriadis K, De Coo IF,
45
46 Klopstock T, Chinnery PF. Gene-environment interactions in Leber hereditary optic
47
48 neuropathy. *Brain* 2009;**132**:2317-26.
49
50 50. Bouhours-Nouet N, May-Panloup P, Coutant R, de Casson FB, Descamps P, Douay O,
51
52 Reynier P, Ritz P, Malthièry Y, Simard G. Maternal smoking is associated with
53
54
55
56
57
58
59
60

mitochondrial DNA depletion and respiratory chain complex III deficiency in placenta. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;**288**:E171-7.

Figure legends

Figure 1. mtDNA quantity and expression levels of genes associated with mtDNA replication.

White and black bars represent mean values for cybrids H and J, respectively. The mean value for cybrids H has been set to 100%. A. mtDNA levels. The mean value for cybrids H not treated with NAC was set to 100%. H, $100 \pm 4.2\%$ (5); H (NAC), $84.1 \pm 5.1\%$ (5); J, $88.8 \pm 4.6\%$ (9); J (NAC), $88.6 \pm 5.1\%$ (9). * $P = 0.0007$. B. MnSOD mRNA levels. H, $100 \pm 15.6\%$ (5); J, $98.2 \pm 12.5\%$ (9). C. mRNA levels of different genes involved in mtDNA replication. POLGB: H, $100 \pm 15.9\%$ (5); J, $88.9 \pm 14.6\%$ (9). TWINKLE: H, $100 \pm 10.1\%$ (5); J, $92.3 \pm 9.0\%$ (9). mtSSB: H, $100 \pm 16.2\%$ (5); J, $95.1 \pm 25.7\%$ (9) and POLRMT: H, $100 \pm 12.2\%$ (5); J, $94.0 \pm 9.8\%$ (9).

Figure 2. mtRNA quantity and expression levels of genes associated with mtDNA transcription.

White and black bars represent mean values for cybrids H and J, respectively. The mean value for cybrids H was set to 100%. * $P \leq 0.05$. A. mtRNA levels. 12S: H, $100 \pm 12.7\%$ (5); J, $88.3 \pm 18.6\%$ (9). 16S: H, $100 \pm 16.4\%$ (5); J, $75.8 \pm 20.3\%$ (9). ND4/4L: H, $100 \pm 17.4\%$ (5); J, $78.9 \pm 17.4\%$ (9). ND6: H, $100 \pm 18.5\%$ (5); J, $76.9 \pm 11.9\%$ (9). CYB: H, $100 \pm 18.2\%$ (5); J, $84.8 \pm 16.7\%$ (9). CO1: H, $100 \pm 11.7\%$ (5); J, $80.0 \pm 16.9\%$ (9). CO2: H, $100 \pm 23.4\%$ (5); J, $91.7 \pm 34.4\%$ (9). CO3: H, $100 \pm 13.9\%$ (5); J, $78.0 \pm 14.2\%$ (9). ATP6/8: H, $100 \pm 12.9\%$ (5); J, $83.6 \pm 12.7\%$ (9). B. Total mtRNA levels. H, $100 \pm 14.7\%$ (5); J, $82.0 \pm 14.2\%$ (9). C. Levels of mtRNA products according to transcription unit. L: H, $100 \pm 18.5\%$ (5); J, $76.9 \pm 11.9\%$ (9). H₁: H, $100 \pm 14.3\%$ (5); J, $82.1 \pm 14.6\%$ (9). H₂: H, $100 \pm 15.3\%$ (5); J, $82.8 \pm 15.9\%$ (9). D. mRNA levels of genes involved in mtDNA transcription. POLRMT: H, $100 \pm 12.2\%$ (5); J, $94.0 \pm 9.8\%$ (9). TFB2M: H, $100 \pm 18.5\%$ (5); J, $91.7 \pm 18.0\%$ (9). MTERF: H, $100 \pm 13.0\%$ (5); J, $96.7 \pm 14.6\%$ (9).

1
2
3
4
5 Figure 3. mtDNA-encoded protein levels. White and black bars represent mean values for cybrids H
6 and J, respectively. The mean value for cybrids H was set to 100%. H, $100 \pm 12.1\%$ (5); J, $70.4 \pm$
7 16.6% (9); * P = 0.005.
8
9

10
11
12
13
14 Figure 4: Cell fraction occupied by mitochondria. White and black bars represent mean values for
15 cybrids H and J, respectively. The mean value for cybrids H was set to 100%. A. Specific activities
16 of nDNA-encoded mitochondrial enzymes. CS: H, $100 \pm 37.3\%$ (5); J, $119.9 \pm 44.0\%$ (9); CII: H,
17 $100 \pm 38.9\%$ (5); J, $83.3 \pm 35.4\%$ (9). B. MIMS. H, $100 \pm 5.0\%$ (5); J, $110.9 \pm 11.0\%$ (9). C. CIV
18 specific activities and levels. Specific activities: H, $100 \pm 13.5\%$ (5); J, $88.6 \pm 17.1\%$ (9). CIV
19 levels: H, $100 \pm 18.1\%$ (5); J, $104.2 \pm 16.6\%$ (9).
20
21
22
23
24
25
26
27

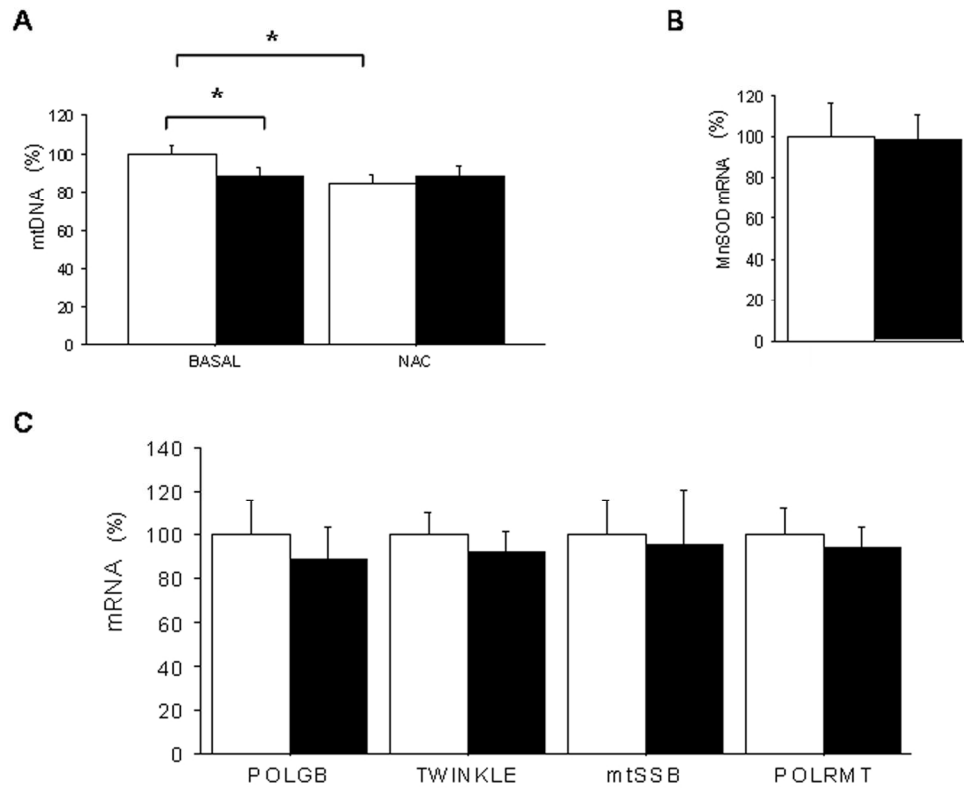
28
29 Figure 5: Oxygen consumption and MIMP. White and black bars represent mean values for cybrids
30 H and J, respectively. A. Oxygen consumption. E, L and U stand for endogenous, leaking and
31 uncoupled respiration, respectively. The mean value for E respiration in cybrids H was set to 100%.
32 E: H, $100 \pm 24.5\%$ (5); J, $70.2 \pm 15.6\%$ (9). L: H, $30.9 \pm 11.2\%$ (5); J, $18.0 \pm 5.0\%$ (9). U: H, 189.2
33 $\pm 47.3\%$ (5); J, $159.3 \pm 29.5\%$ (9). * P = 0.01. B. MIMP. The mean value for cybrids H was set to
34 100%. H, $100 \pm 13.5\%$ (5); J, $58.9 \pm 15.7\%$ (9). * P = 0.006.
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44

45 Figure 6. ATP and PFKL mRNA levels. A. ATP levels. G, DGP, DGPO, GO are abbreviations for
46 glucose, 2-deoxy-glucose plus 1 mM pyruvate, 2-deoxy-glucose plus 1 mM pyruvate and 2.5 $\mu\text{g/ml}$
47 oligomycin and glucose plus 2.5 $\mu\text{g/ml}$ oligomycin, respectively. The mean value for cybrids H in
48 glucose was set to 100%. G: H, $100 \pm 7.8\%$ (5); J, $70.3 \pm 19.4\%$ (9). DGP: H, $49.3 \pm 2.2\%$ (5); J,
49 $43.3 \pm 15.3\%$ (9). DGPO: H, $5.6 \pm 1.6\%$ (5); J, $5.8 \pm 3.2\%$ (9). GO: H, $84.0 \pm 10.9\%$ (5); J, $51.6 \pm$
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

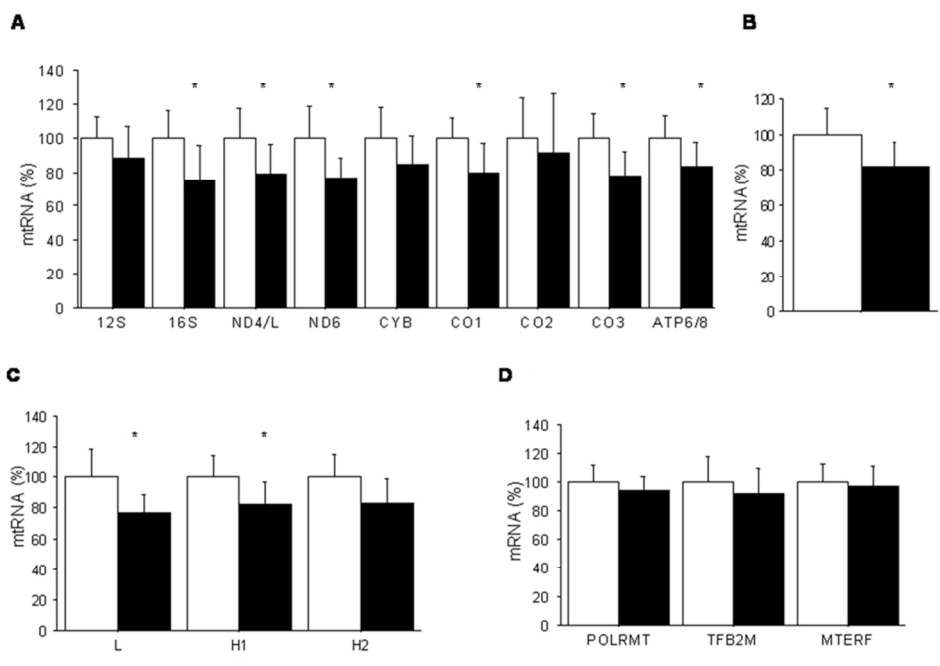
17.8% (9). * P = 0.003. B. PFKL mRNA levels. The mean value for cybrids H was set to 100%. H, 100 ± 8.3% (5); J, 122.3 ± 12.7% (9). * P = 0.006.

Confidential: For Review Only

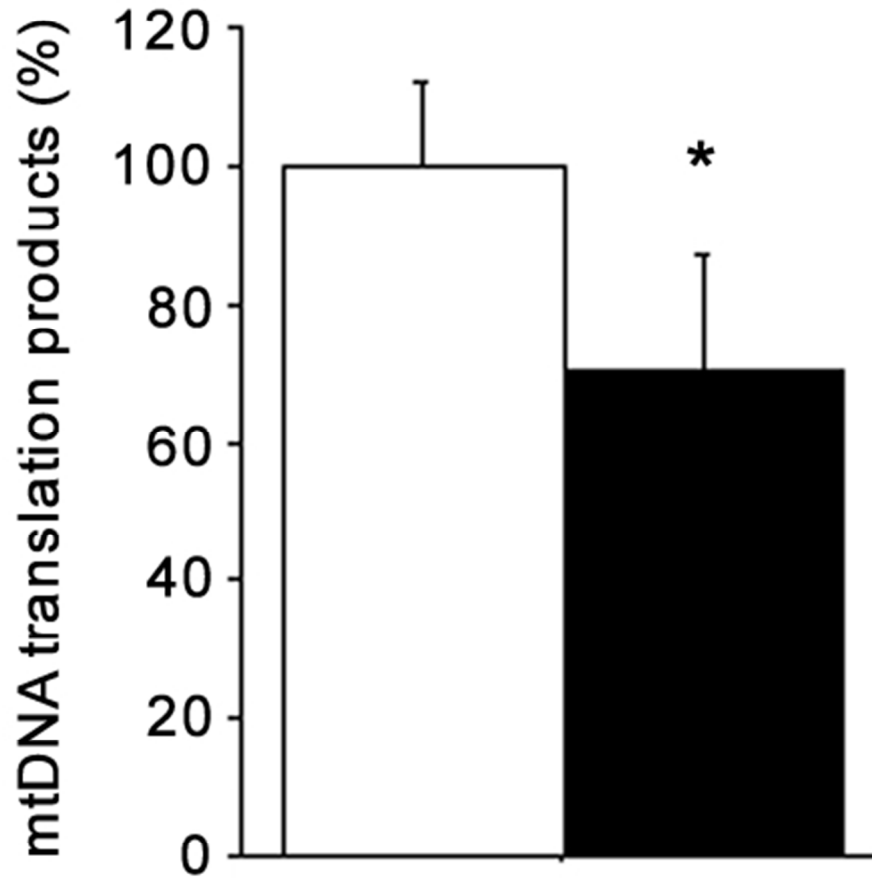


124x100mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



80x54mm (300 x 300 DPI)

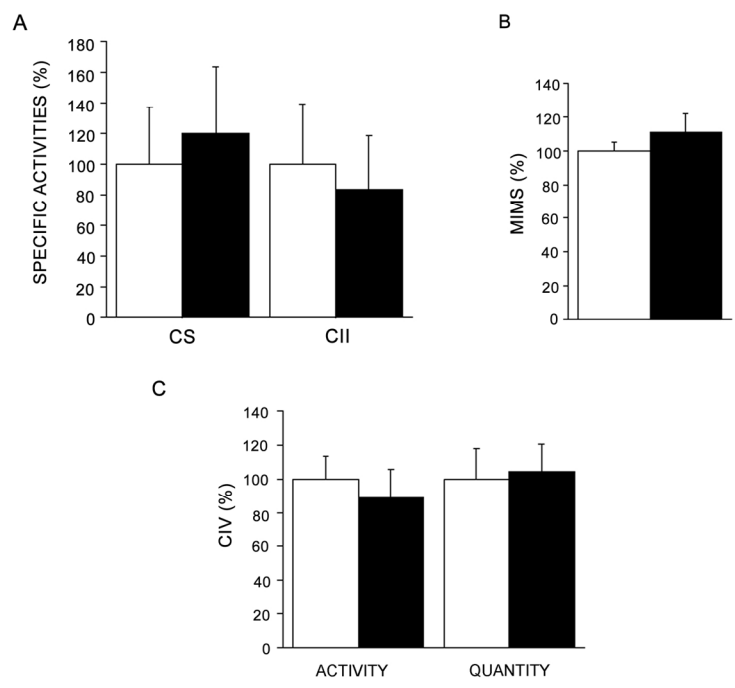


41x43mm (300 x 300 DPI)

Manuscript Only

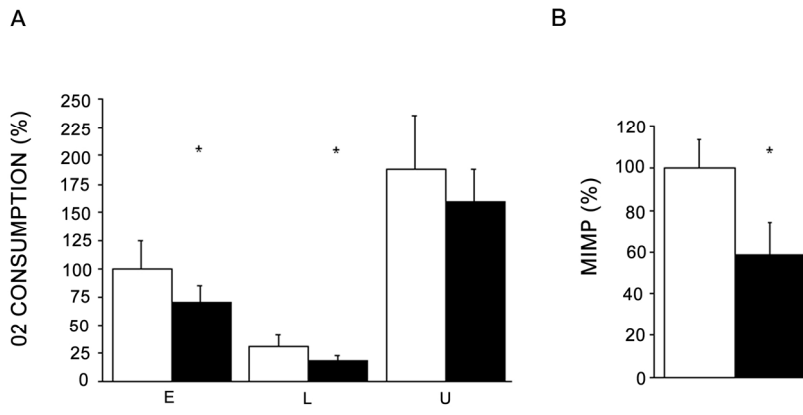
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

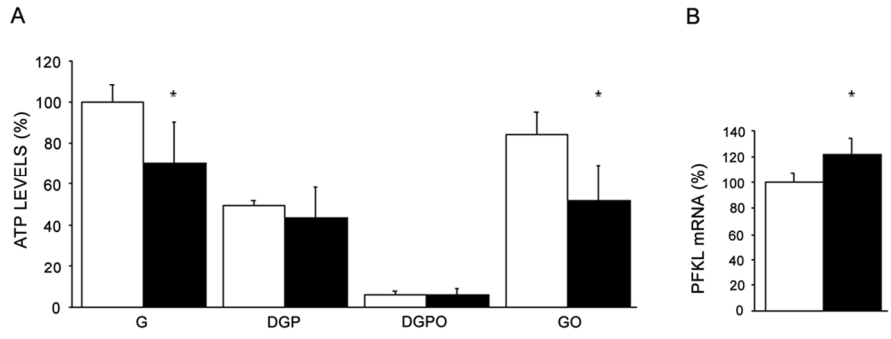


163x142mm (300 x 300 DPI)

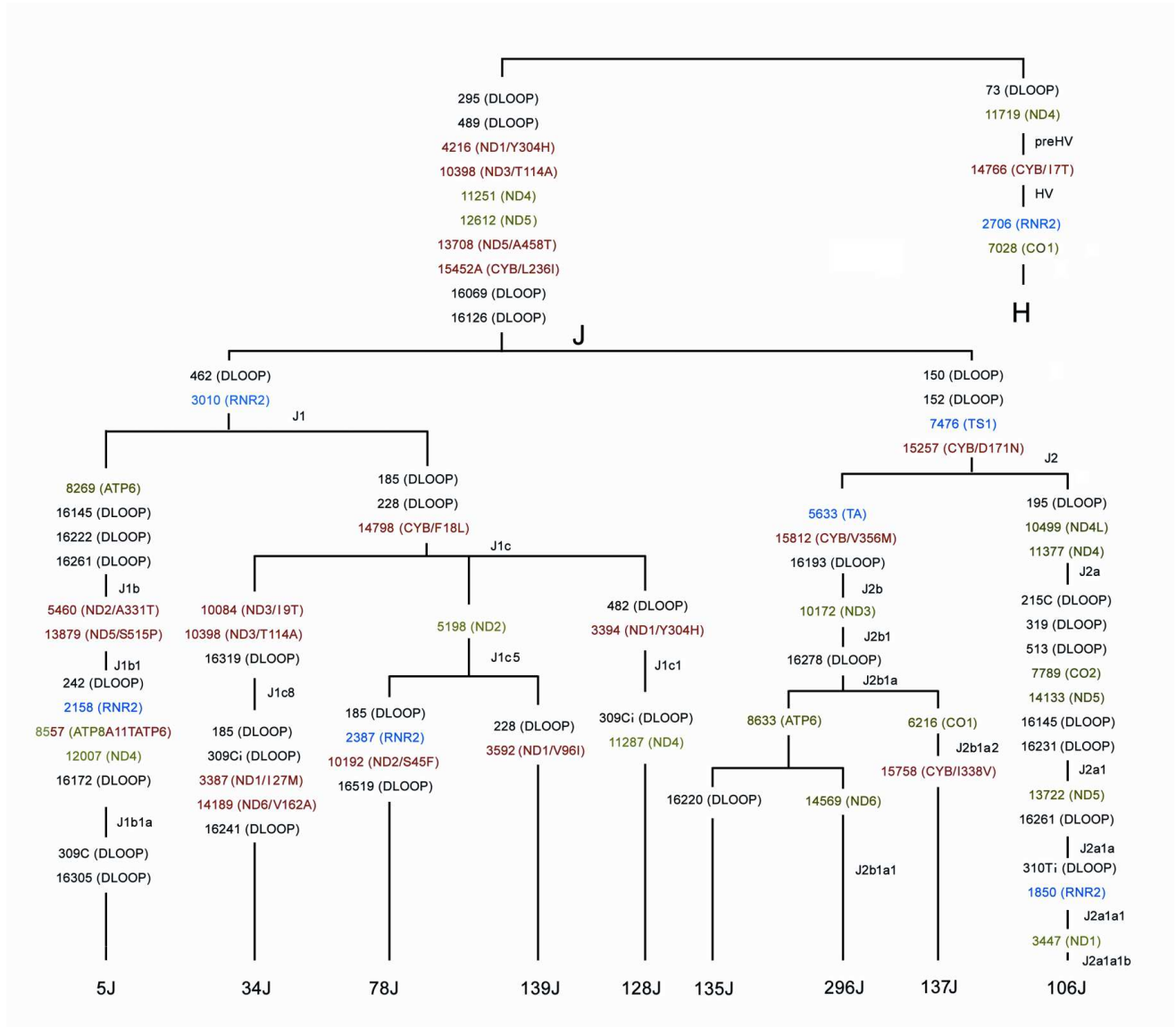
Review Only



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



109x60mm (300 x 300 DPI)



Supplementary Figure 1. Phylogenetic tree depicting the relationships between mtDNA of different cybrids. Control region (black), protein synonymous (green), protein non-synonymous (red) and RNA (blue) mutations are color-coded accordingly. The affected mtDNA gene or sequence is showed in brackets. The amino acid substitution and position of non-synonymous mutations are indicated as well. Sequence comparisons were made using the revised Cambridge Reference Sequence.[1] Nomenclature for the haplogroups was as described previously.[2] Most of the mutations are transitions; however, transversions and insertions are indicated as well. Only m.3387T>A/p.MT-ND1:I27M, m.3592G>A/p.MT-ND1:V96I and m.14189A>G/p.MT-ND6:V162A had not been previously reported. These mutations, however, have a low pathogenicity score and thus are probably not functionally significant.[3] The Genbank accession numbers for cybrids J are JN635298-JN635306. The sequences of the five cybrids from haplogroup H have been previously published.[4]

1. 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.

- 1
 - 2
 - 3
 - 4
 - 5
 - 6
 - 7
 - 8
 - 9
 - 10
 - 11
 - 12
 - 13
 - 14
 - 15
 - 16
 - 17
 - 18
 - 19
 - 20
 - 21
 - 22
 - 23
 - 24
 - 25
 - 26
 - 27
 - 28
 - 29
 - 30
 - 31
 - 32
 - 33
 - 34
 - 35
 - 36
 - 37
 - 38
 - 39
 - 40
 - 41
 - 42
 - 43
 - 44
 - 45
 - 46
 - 47
 - 48
 - 49
 - 50
 - 51
 - 52
 - 53
 - 54
 - 55
 - 56
 - 57
 - 58
 - 59
 - 60
2. van Oven M, Kayser M. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum Mutat* 2009;**30**:E386-94.
 3. Pereira L, Soares P, Radivojac P, Li B, Samuels DC. Comparing phylogeny and the predicted pathogenicity of protein variations reveals equal purifying selection across the global human mtDNA diversity. *Am J Hum Genet* 2011;**88**:433-9.
 4. Gómez-Durán A, Pacheu-Grau D, López-Gallardo E, Díez-Sánchez C, Montoya J, López-Pérez MJ, Ruiz-Pesini E. Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups. *Hum Mol Genet* 2010;**19**:3343-53.

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

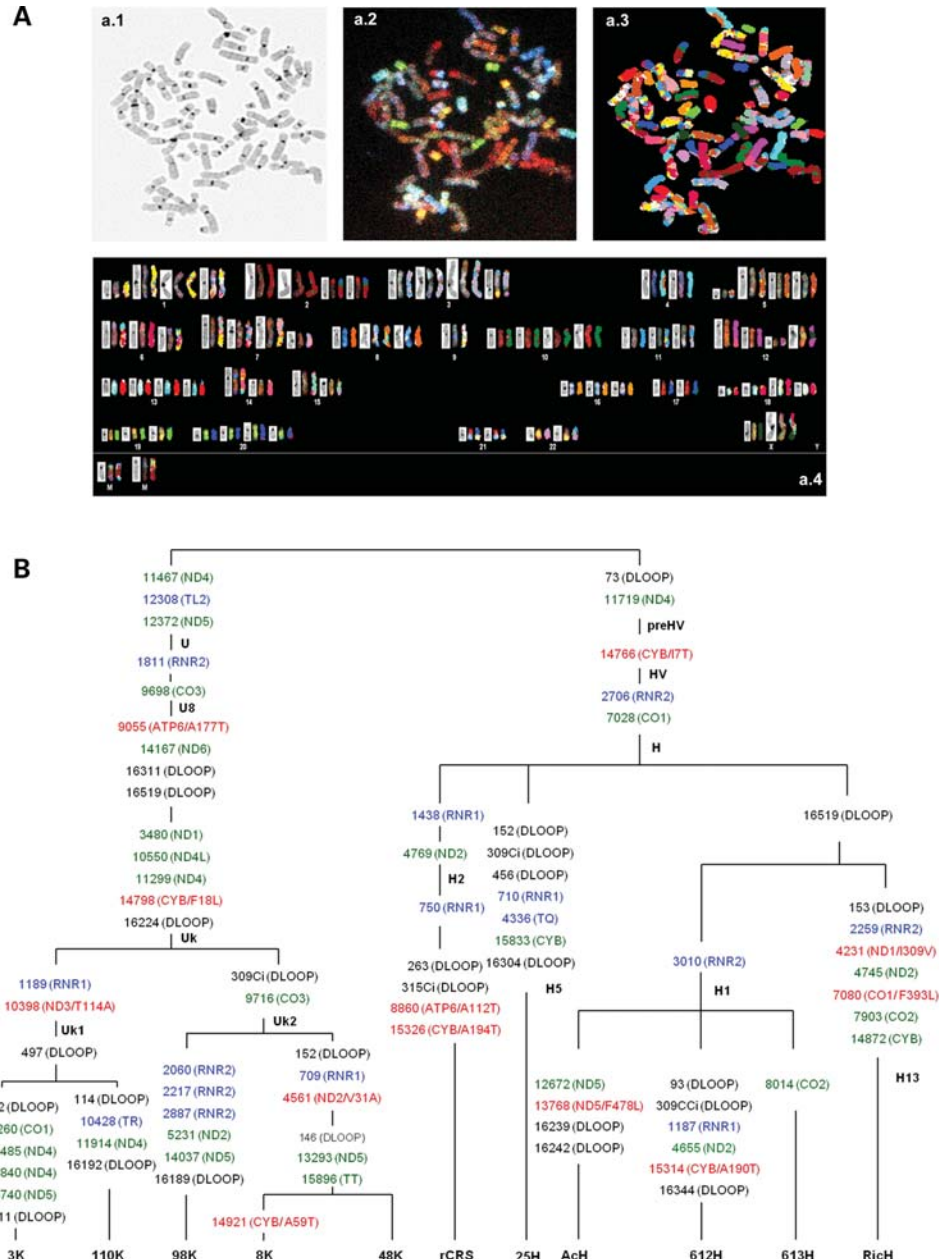


Figure 1. Nuclear and mitochondrial genome analysis in cybrids H and Uk. (A) Spectral karyotyping (SKY) analysis of the cybrids. Metaphase after DAPI stain (a.1), SKY hybridization (a.2) or classified colors (a.3). In this karyotype of one cybrid cell 48K (a.4), structurally rearranged chromosomes are 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.

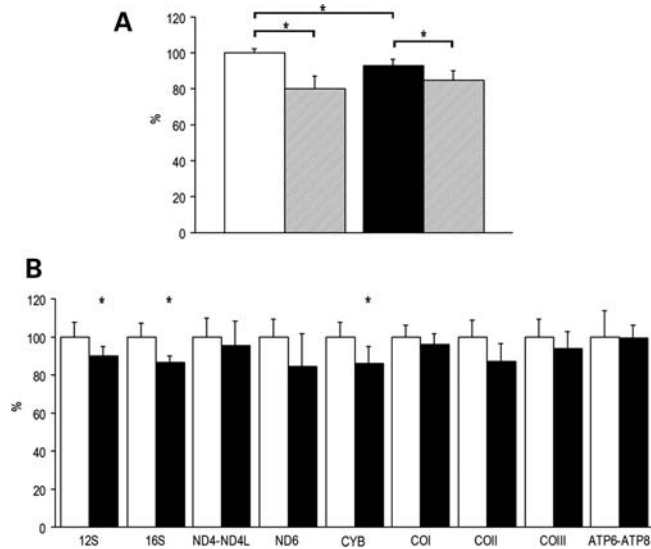


Figure 2. Nucleic acid levels in cybrids H and Uk. White and black bars represent mean values for cybrids H and Uk, respectively. (A) mtDNA levels. The mean value for cybrids H without NAC has been set to 100%. H, $100.0 \pm 2.6\%$ (5); H (NAC), $79.8 \pm 7.0\%$ (5); Uk, $92.7 \pm 3.6\%$ (5); Uk (NAC), $85.0 \pm 5.2\%$ (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

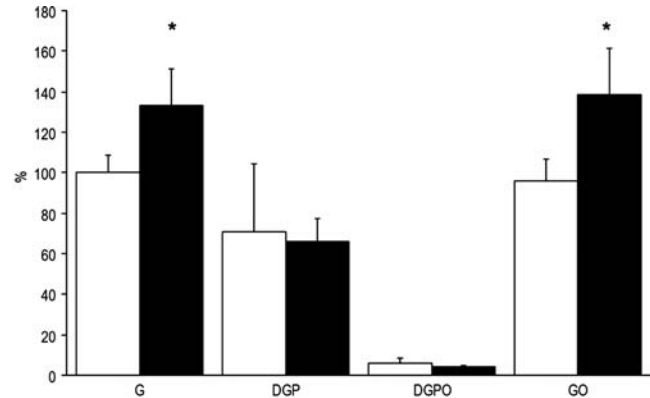


Figure 3. ATP levels in cybrids H and Uk. G, DGP, DGPO and GO are abbreviations for glucose, 2-deoxy-glucose plus 1 mM pyruvate, 2-deoxy-glucose plus 1 mM pyruvate and 2.5 µg/ml oligomycin and glucose plus 2.5 µg/ml oligomycin, respectively. The mean value for cybrids H in glucose has been set to 100%. 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.

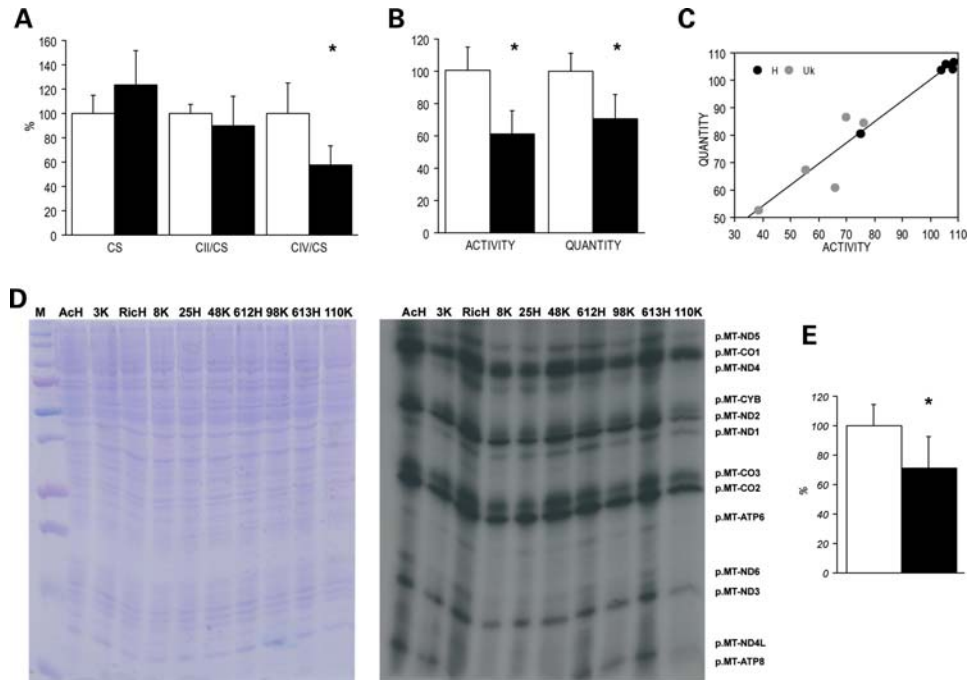


Figure 4. Mitochondrial enzyme and protein synthesis analysis. White and black bars represent the mean values for cybrids H and Uk, respectively. The mean value for cybrids H has been set to 100% in **A**, **B**, **C** and **E**. (**A**) Enzyme activities. CS: H, $100.0 \pm 12.6\%$ (5); Uk, $123.5 \pm 27.3\%$ (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

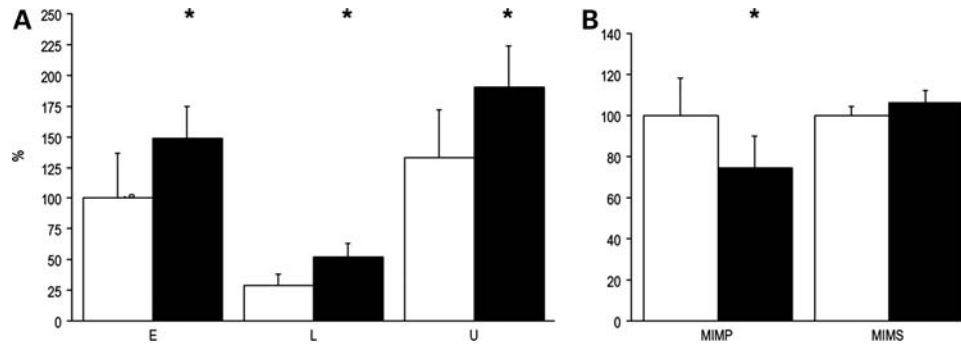


Figure 5. Oxygen consumption and mitochondrial inner membrane potential (MIMP) and surface (MIMS) in cybrids H and Uk. White and black bars represent the mean values for cybrids H and Uk, respectively. (A) Corrected oxygen consumption (oxygen consumption per ETC unit). E, L and U code for endogenous, 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).

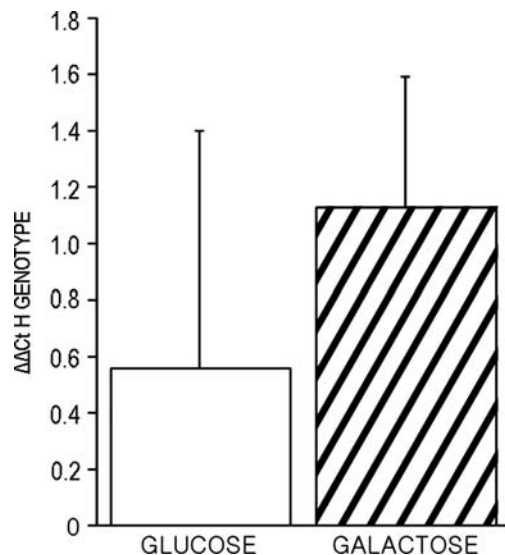


Figure 6. Growth capacity of cybrids H and Uk. White and striped bars represent the genotype H shift, compared with its initial situation, when growing in glucose and galactose, respectively. Glucose and galactose indicate glucose minus initial and galactose minus initial genotype H percentage, respectively. $\Delta\Delta C_t$ 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-Mothejzlikova, 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., Kadhon, N., Ceballos-Picot, I., Ouari, O., Polidori, A., Munnich, A., Rotig, A. and Rustin, P. (2001) Superoxide-induced massive apoptosis in cultured skin fibroblasts harboring the neurogenic ataxia retinitis pigmentosa (NARP) mutation in the ATPase-6 gene of the mitochondrial DNA. *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 1221–1228.
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 DNA background modulates the assembly kinetics of OXPHOS complexes in a cellular model of mitochondrial disease

Rosa Pello^{1,2}, Miguel A. Martín^{1,2}, Valerio Carelli³, Leo G. Nijtmans⁴, Alessandro Achilli^{5,6}, Maria Pala⁵, Antonio Torroni⁵, Aurora Gómez-Durán^{7,8}, Eduardo Ruiz-Pesini^{7,8}, Andrea Martinuzzi⁹, Jan A. Smeitink⁴, Joaquín Arenas^{1,2} and Cristina Ugalde^{1,2,*}

¹CIBERER-U723 and ²Centro de Investigación, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid 28041, Spain, ³Dipartimento di Scienze Neurologiche, Università di Bologna, Bologna 40123, Italy, ⁴Nijmegen Centre for Mitochondrial Disorders, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen 6500 HB, The Netherlands, ⁵Dipartimento di Genetica e Microbiologia, Università di Pavia, Pavia 27100, Italy, ⁶Dipartimento di Biologia Cellulare e Ambientale, Università di Perugia, Perugia 06123, Italy, ⁷CIBERER-U727 and ⁸Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza, Zaragoza 50013, Spain and ⁹E. Medea Scientific Institute, Conegliano Research Centre, Conegliano 21015, Italy

Received August 7, 2008; Revised and Accepted September 16, 2008

Leber's hereditary optic neuropathy (LHON), the most frequent mitochondrial disorder, is mostly due to three mitochondrial DNA (mtDNA) mutations in respiratory chain complex I subunit genes: 3460/ND1, 11778/ND4 and 14484/ND6. Despite considerable clinical evidences, a genetic modifying role of the mtDNA haplogroup background in the clinical expression of LHON remains experimentally unproven. We investigated the effect of mtDNA haplogroups on the assembly of oxidative phosphorylation (OXPHOS) complexes in trans-mitochondrial hybrids (cybrids) harboring the three common LHON mutations. The steady-state levels of respiratory chain complexes appeared normal in mutant cybrids. However, an accumulation of low molecular weight subcomplexes suggested a complex I assembly/stability defect, which was further demonstrated by reversibly inhibiting mitochondrial protein translation with doxycycline. Our results showed differentially delayed assembly rates of respiratory chain complexes I, III and IV amongst mutants belonging to different mtDNA haplogroups, revealing that specific mtDNA polymorphisms may modify the pathogenic potential of LHON mutations by affecting the overall assembly kinetics of OXPHOS complexes.

INTRODUCTION

Leber's hereditary optic neuropathy (LHON, MIM#535000) is a maternally inherited blinding disease characterized by sub-acute degeneration of retinal ganglion cells (RGCs) leading to optic nerve atrophy and bilateral loss of central vision, prevalently in young males (1). In ~95% of cases worldwide, LHON is caused by three point mutations in mitochondrial DNA (mtDNA) respiratory chain complex I subunit genes:

m.3460G > A in *ND1* (3460/*ND1*), m.11778G > A in *ND4* (11778/*ND4*), and m.14484T > C in *ND6* (14484/*ND6*) (2). Although the genetic basis are known since 1988 (3), the pathogenesis of LHON via complex I dysfunction remains poorly understood. Most LHON families carry the mtDNA pathogenic mutation in homoplasmic condition, but not all maternally related individuals develop visual loss, suggesting additional genetic or epigenetic determinants for the phenotypic

*To whom correspondence should be addressed at: Centro de Investigación, Hospital Universitario 12 de Octubre, Avda. de Córdoba s/n, Madrid 28041, Spain. Tel: +34 913908763; Fax: +34 913908544; Email: cugalde@h12o.es
New Genbank accession numbers: EU915472, EU915473, EU915474, EU915475, EU915476, EU915477, EU915478, EU915479, FJ178379, FJ178380

expression of LHON. To date, the most compelling evidence for a genetic modifying role comes from the mtDNA haplogroup hosting the primary LHON mutations. Independent studies revealed that the Eurasian haplogroup J is preferentially associated with the 11778/*ND4* and 14484/*ND6* LHON pathogenic mutations (4–6). Recently, this association was narrowed to haplogroup J1 for the 14484 mutation, and to subclades J1c and J2b for the 11778 mutation, suggesting that specific mutational motifs, which included non-synonymous variants in complex I and III subunit genes, could increase the penetrance and risk of LHON expression by structural alterations in the mitochondrial respiratory chain complexes or supercomplexes (7,8).

Due to the lack of animal models to study mitochondrial disorders caused by mtDNA gene defects, transmitochondrial cytoplasmic hybrids (cybrids) have become a major cellular model to analyze the pathophysiological consequences of LHON mutations. Cybrids are generated by fusing mtDNA-depleted human cells (rho zero cells) with enucleated cells (cytoplasts) from LHON patients. The resulting cybrid clones contain a uniform nuclear DNA (nDNA) and an exogenous mtDNA harboring the LHON mutation of interest, allowing direct comparisons of biochemical phenotypes due solely to different mtDNA species (9). Bioenergetics studies demonstrated that the 3460/*ND1* mutation, associated with the most severe clinical phenotype (10), consistently led to a complex I activity decrease, while the 11778/*ND4* and 14484/*ND6* mutations presented normal or slightly reduced activities in both patients and cybrids (11–14). Complex I-dependent (pyruvate or glutamate-malate) respiration studies showed a variable reduction in the oxygen consumption rates depending on the mutation (11,12,14,15), which was accompanied by a severe impairment of complex I-driven ATP synthesis (15). A prevalent role of increased reactive oxygen species (ROS) production in LHON pathogenesis was proposed (16,17), as well as a decrease in antioxidant defenses that was particularly evident for the 3460/*ND1* and 11778/*ND4* mutations (18). Moreover, incubation of LHON cybrids in galactose medium impaired cell growth and caused massive apoptotic cell death, being the 3460/*ND1* and 14484/*ND6* mutations more susceptible to apoptosis than the 11778/*ND4* mutation (12,18,19).

In the present study, we have investigated control and LHON cybrids in which the mtDNA genome was completely sequenced. By using blue native gel electrophoresis (BN-PAGE) in combination with immunodetection, we aimed to elucidate the effect that common primary LHON mutations on different mtDNA haplogroups might exert on the assembly of complex I and other mitochondrial respiratory chain complexes. To address the dynamics of assembly, we partially depleted control and LHON cybrids of oxidative phosphorylation (OXPHOS) complexes by doxycycline treatment, which reversibly inhibits mitochondrial translation. Our results showed altered kinetics of complex I assembly and defective recovery of complex I activity in all LHON cybrids, and differential alterations in the assembly kinetics of respiratory chain complexes III and IV that can be attributed to specific genetic variations amongst the mtDNA backgrounds hosting the primary LHON mutations.

RESULTS

Cybrid clones and complete sequence analysis of mtDNA

In the present study we have used six homoplasmic mutant LHON cybrid cell lines (two for each common mutation), previously investigated and extensively characterized (11,15,17–19) and four control cybrid cell lines. In all cases the complete sequence of the cybrid-repopulating mtDNAs was determined. All non-synonymous polymorphic variants found in the mtDNA coding regions relative to the revised Cambridge reference sequence (20) are listed in Table 1.

Steady-state levels of individual respiratory chain complexes in LHON cybrids

To analyze the respiratory chain content in the four control and six mutant cybrids harboring different mtDNA backgrounds (Table 1), we performed BN-PAGE combined with complex I *in-gel* activity (IGA) assay and western blot analysis with antibodies raised against specific OXPHOS subunits (Fig. 1A). Normal complex I activities were found in all cybrids, and no significant differences were observed in the steady-state levels of fully assembled complexes I, III and IV between controls and mutants. For complex II, a relative lower signal was found in the 11778/*ND4* mutant clones (Fig. 1A, lowest panel), which might reflect a decreased amount of mitochondria as suggested by the previously reported decreased citrate synthase activity of these clones compared with controls (15). The rest of cybrid clones showed comparable complex II expression levels, which correlated with their normal citrate synthase activities (15). In order to exclude expression differences among the clones due to variations in their mitochondrial mass, the signal obtained from the complex II antibody was used to normalize for the expression levels of mitochondrial respiratory chain complexes (Fig. 1B). No significant differences were observed among control cybrids belonging to different haplogroups. A general tendency for higher complex I activity or expression levels of mitochondrial complexes I, III and IV, and for the supercomplex CIII₂+CIV (but not complex II) was observed in the haplogroup J1 mutant cells. This increase was not statistically significant for the clones characterized by the 14484/*ND6* mutation on haplogroup J1 (ND6/J1 and ND6/J1'). However, the clone carrying the 11778/*ND4* mutation on haplogroup J1 (ND4/J1) showed significantly higher steady-state levels ($P < 0.05$) of all respiratory chain complexes when compared with the controls or to its counterpart ND4/U5, which harbored the same mutation on a haplogroup U5a mtDNA. Clone ND4/U5 on the contrary did not show significant differences when compared with controls. Similarly, no significant differences were found in the expression levels of respiratory chain complexes I, III, and IV between controls and the clones harboring the 3460/*ND1* mutation on different subclades (H* and H12) of haplogroup H. A ~4-fold decrease ($P < 0.05$) in the expression levels of supercomplex CIII₂+CIV was observed in clone ND1/H12, but this result did not correlate with a decreased expression of individual complexes III or IV (Fig. 1B).

The mtDNA copy number was calculated for each clone in order to exclude that the differences in the steady-state

Table 1. Haplogroup affiliation and non-synonymous nucleotide changes of mtDNAs from the cybrid clones used in this study

Cybrid cell lines	Genbank ID	LHON mutation	Haplogroup	Non-synonymous polymorphisms relative to rCRS ^a	Amino acid change
CON/T2	FJ178379	Control	T2	T4216C (<i>ND1</i>) A4917G (<i>ND2</i>) A10398G (<i>ND3</i>) ^b C14766T (<i>CYTB</i>) C15452A (<i>CYTB</i>)	Tyr>His Asn>Asp Thr>Ala Thr>Ile Leu>Ile
CON/J1 ^c	FJ178380	Control	J1b	T4216C (<i>ND1</i>) A4917G (<i>ND2</i>) ^c G5460A (<i>ND2</i>) G8557A (<i>ATP6</i>) A10398G (<i>ND3</i>) G13708A (<i>ND5</i>) T13879C (<i>ND5</i>) C14766T (<i>CYTB</i>) C15452A (<i>CYTB</i>)	Tyr>His Asn>Asp Ala>Thr Ala>Thr Thr>Ala Ala>Thr Ser>Pro Thr>Ile Leu>Ile
CON/K1	EU915473	Control	K1a2	A4024T (<i>ND1</i>) G9055A (<i>ATP6</i>) A10398G (<i>ND3</i>) T11025C (<i>ND4</i>) C14766T (<i>CYTB</i>) T14798C (<i>CYTB</i>) A7245G (<i>COI</i>)	Thr>Ser Ala>Thr Thr>Ala Leu>Pro Thr>Ile Phe>Leu Thr>Ala
CON/H5	EU915472	Control	H5	–	–
ND1/H*	EU915474	G3460A	H*	A14552G (<i>ND6</i>)	Val>Ala
ND1/H12	EU915475	G3460A	H12	T4216C (<i>ND1</i>) A10398G (<i>ND3</i>) T12083G (<i>ND4</i>) G13708A (<i>ND5</i>) C14766T (<i>CYTB</i>) T14798C (<i>CYTB</i>)	Tyr>His Thr>Ala Ser>Ala Ala>Thr Thr>Ile Phe>Leu
ND4/J1	EU915476	G11778A	J1c	T4216C (<i>ND1</i>) A10398G (<i>ND3</i>) T12083G (<i>ND4</i>) G13708A (<i>ND5</i>) C14766T (<i>CYTB</i>) T14798C (<i>CYTB</i>) C15452A (<i>CYTB</i>)	Tyr>His Thr>Ala Ser>Ala Ala>Thr Thr>Ile Phe>Leu Leu>Ile
ND4/U5	EU915477	G11778A	U5a	G9477A (<i>COIII</i>) A9667G (<i>COIII</i>) C14766T (<i>CYTB</i>) A14793G (<i>CYTB</i>)	Val>Ile Asn>Ser Thr>Ile His>Arg
ND6/J1	EU915478	T14484C	J1b	T4216C (<i>ND1</i>) G5460A (<i>ND2</i>) G8557A (<i>ATP6</i>) A10398G (<i>ND3</i>) G13708A (<i>ND5</i>) T13879C (<i>ND5</i>) C14766T (<i>CYTB</i>) C15452A (<i>CYTB</i>)	Tyr>His Ala>Thr Ala>Thr Thr>Ala Ala>Thr Ser>Pro Thr>Ile Leu>Ile
ND6/J1'	EU915479	T14484C	J1c	T4216C (<i>ND1</i>) T7042C (<i>COI</i>) A10398G (<i>ND3</i>) G13708A (<i>ND5</i>) G14279A (<i>ND6</i>) C14766T (<i>CYTB</i>) T14798C (<i>CYTB</i>) C15452A (<i>CYTB</i>)	Tyr>His Val>Ala Thr>Ala Ala>Thr Ser>Leu Thr>Ile Phe>Leu Leu>Ile

^arCRS refers to the revised Cambridge reference sequence (20). In addition, all mtDNAs differed from rCRS, which belongs to haplogroup H2a, for A8860G (*ATP6*) and A15326G (*CYTB*).

^bThe 10398 polymorphism in CON/T2, and

^cthe 4917 polymorphism in CON/J1, have been confirmed by RFLP analysis and sequencing. Both 10398 and 10463 (tRNA^{Arg}) polymorphisms, and both 4917 and 5460 polymorphisms, were present in the same electropherogram without double peaks.

expression levels of respiratory chain complexes were influenced by variations in the mtDNA content among individual clones. No significant differences were found in the mtDNA/nDNA ratio between controls belonging to different

haplogroups (Table 2). Although no differences were found between controls and clone ND1/H*, the rest of LHON mutant cybrids showed either increased or reduced mtDNA content. Clones ND1/H12, ND4/U5 and ND4/J1 exhibited the highest mtDNA/nDNA rates. These cells consistently showed the lowest relative levels of complex II or citrate synthase activities (15), suggesting that the high mtDNA content might represent a compensatory mechanism for the reduced mitochondrial mass. On the contrary, the 14484/*ND6* mutant clones exhibited the lowest mtDNA/nDNA rates but showed normal levels of complex II or citrate synthase activities. These relative differences in the mtDNA content did not seem to influence the steady-state levels of respiratory chain complexes in any clone except ND4/J1, which showed a significant increase in the expression levels of OXPHOS complexes. These expression differences might be due to the presence in each individual clone of specific polymorphisms in the D-loop control region or within the non-protein coding regions of mtDNA, such as the 12S and 16S rRNAs and the mitochondrial tRNAs. Polymorphic variations within these regions might affect the translation efficiency of mitochondrial proteins, which could account for the differences observed in the steady-state levels of the native OXPHOS complexes.

Differential accumulation of low molecular weight complex I subcomplexes in mutated LHON cybrids

In order to study whether the primary LHON mutations in the mitochondrial *ND1*, *ND4* and *ND6* genes could affect complex I assembly or stability, and to investigate the possible presence of complex I assembly intermediates or breakdown products, two-dimensional (2D) BN/SDS-PAGE electrophoresis was performed. Gels were blotted and incubated with an antibody against the complex I NDUFA9 subunit (Fig. 2). Each mutant cell line was compared with a control belonging to the closest evolutionarily related mtDNA haplogroup. Cybrids harboring the 3460/*ND1* mutation on haplogroup H12 mtDNA (ND1/H12) showed a smeary pattern of accumulated NDUFA9 subunit-containing subcomplexes, suggestive of a complex I assembly or stability defect, while the haplogroup H* clone (ND1/H*) showed normal amounts of fully assembled complex I and a regular pattern of low molecular weight subcomplexes. The same observation was made for the 11778/*ND4* mutation clones: the haplogroup U5a cybrid (ND4/U5a), showed an accumulation of NDUFA9-containing subcomplexes compared with its K1a control (K is a subclade of haplogroup U), while the haplogroup J1 clone (ND4/J1) showed normal amounts of fully assembled complex I and no accumulation of low molecular weight subcomplexes relative to the J1 control. A normal complex I assembly pattern was also observed for the 14484/*ND6* LHON mutation clones characterized by a J1 mtDNA. Our results suggest that the assembly and/or stability of mitochondrial respiratory chain complex I would be more severely affected by the primary LHON mutations when associated with certain mtDNA backgrounds, such as H12 or U5a, while the same mutation on a different haplogroup would cause a less severe disturbance on complex I.

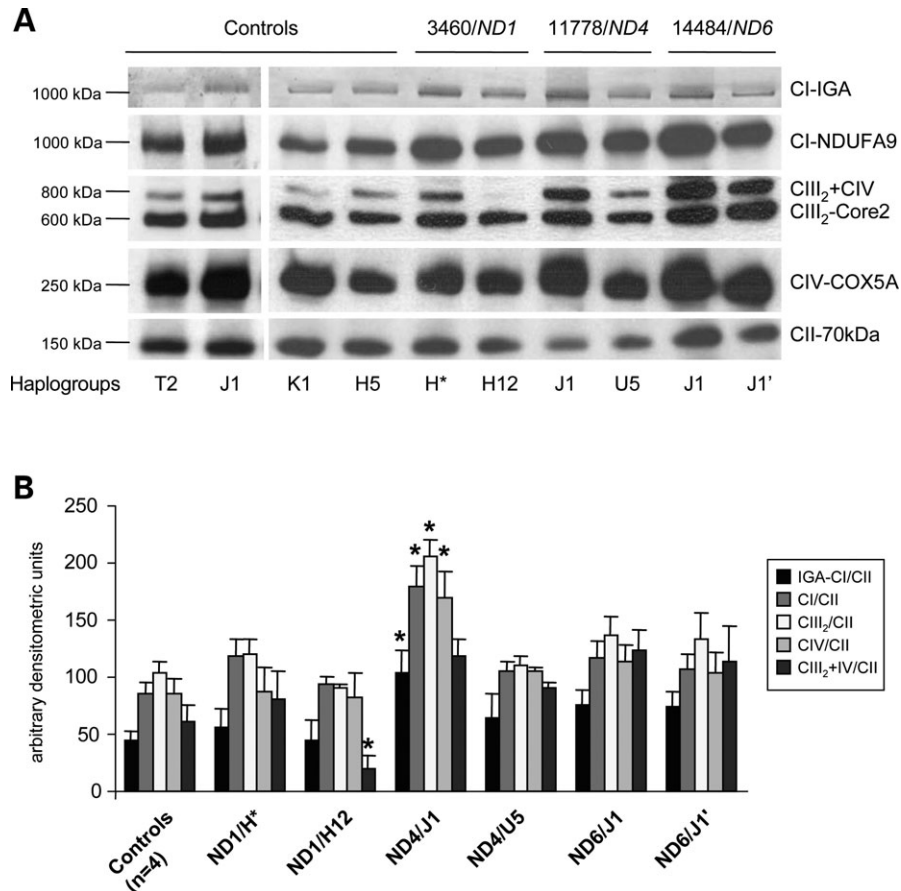


Figure 1. (A) BN-PAGE analysis of mitochondrial respiratory chain complexes in control and LHON cybrids. Mitochondrial particles were isolated as described in Materials and Methods and 40 μ g protein was analyzed on a 5–15% BN-PAGE for the separation of multisubunit complexes. First panel, complex I IGA assay. A second gel was run in duplicate and western blot analysis was performed using antibodies against complex I NDUFA9 subunit (second panel), complex III core2 protein (third panel), complex IV COX5A subunit (fourth panel), or complex II-70 kDa subunit (fifth panel). CI, fully assembled complex I; CIII₂, complex III dimer; CIV, complex IV; CIII₂ + CIV indicates the presence of a supercomplex containing complexes III and IV, frequently observed on BN-PAGE. (B) To calculate the steady-state levels of complex I activity and fully assembled complexes I, III, IV and supercomplex CIII₂ + CIV, five independent blue native blots were quantified, and the average numerical values normalized to those obtained from complex II. Significant differences (*t*-student, $P < 0.05$) are highlighted with an asterisk.

Table 2. MtDNA copy number in cybrid cell lines expressed as mtDNA/nDNA ratio

Cybrid cell lines	mtDNA/nDNA
143B TK ⁻ 206	381 \pm 20
Controls ($n = 4$)	355 \pm 44
ND1/H*	395 \pm 36
ND1/H12	517 \pm 62
ND4/J1	639 \pm 35
ND4/U5	553 \pm 32
ND6/J1	243 \pm 26
ND6/J1'	239 \pm 20
143B rho zero	n.d.

Numbers indicate the mean values of four independent measurements per sample \pm standard deviation; n.d., not-detectable.

Assembly kinetics of respiratory chain complexes in control cybrids

In order to analyze possible differences in the assembly kinetics of respiratory chain complexes in control cybrids

with different mtDNA backgrounds, we depleted the cells of complex I and other OXPHOS complexes containing mitochondrial-encoded subunits, by reversibly blocking mitochondrial protein translation with doxycycline. This strategy was successfully used to follow the assembly kinetics of respiratory chain complex I in the parental 143B TK⁻206 cell line (21), and helped the interpretation of assembly defects in complex I-deficient patients with mutations in structural genes (22). Because further treatment with doxycycline affected cell viability in our culture conditions, cells were cultured for 6 days in the presence of the inhibitor. After the release of drug inhibition, cells grown in exponential conditions started translating mitochondrial proteins, and the assembly of newly synthesized respiratory chain complexes was investigated. To follow the reappearance of mitochondrial complexes after the reversible block of assembly, samples were collected at different time points (0, 6, 15, 24, 48, 72 and 96 h) after doxycycline removal, run on BN-PAGE and assayed for complex I IGA, or alternatively, blotted on nitrocellulose and incubated with antibodies raised against specific OXPHOS subunits. Results showed no significant differences

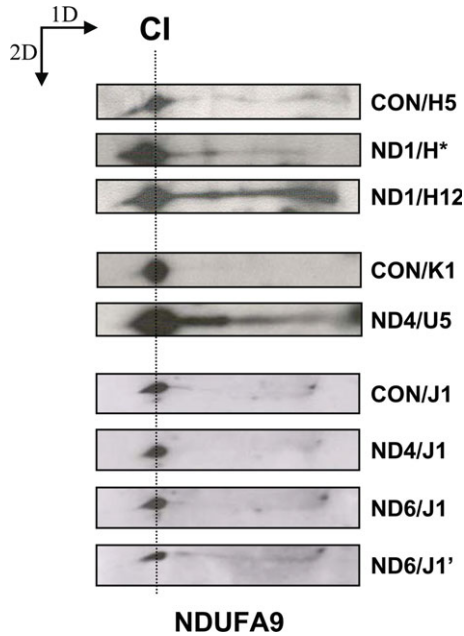


Figure 2. 2D-BN/SDS-PAGE analysis of mitochondrial respiratory complex I in LHON mutants. For the separation of individual subunits a 10% tricine SDS-gel was run in the second dimension. Gels were blotted. For the positioning of complex I (~980 kDa) a primary antibody against complex I subunit NDUFA9 (39 kDa) was used in control and mutant cybrids. CI indicates the relative position of fully assembled complex I. The directions of the first (1D) and second (2D) dimension are shown.

in the recovery kinetics of respiratory chain complexes among control cybrids belonging to different haplogroups (data not shown). For this reason, we quantified the signals obtained from the IGA assays and western blots in the four independent control cell lines, normalized them for the expression levels of mitochondrial complex II, expressed them as a percentage of the untreated cells (which correspond to the steady-state expression levels), and calculated the average numerical values for the complex I activity restoration curve and the assembly rates of respiratory chain complexes I, III, IV and supercomplex $CIII_2 + CIV$ (Fig. 3).

Consistent with previous observations, after 6 days of doxycycline treatment (Fig. 3, T0 point), we observed ~70–90% reduction of complex I activity or fully assembled respiratory chain complexes in control cybrids compared with untreated cells (Fig. 3, SS point) (21). As shown in Figure 3A, controls mainly acquired fully assembled complex I between 24 and 48 h after doxycycline removal, and gained complex I activity 48 h after removing the drug. Restoration to normal complex I steady-state levels occurred at time 72–96 h, and normal complex I activity levels were reached at 96 h. The observed time course for complex I assembly and activity was comparable with previous findings (21,23,24). Fully assembled complex III was restored in a similar time course as complex I (Fig. 3B). Fully assembled complex IV, however, was acquired ~24 h later than complexes I and III (Fig. 3C). Similarly, the formation of the mitochondrial supercomplex $CIII_2 + CIV$ paralleled the complex IV assembly kinetics, suggesting that a minimum pool of individual complexes III and IV is necessary in order to form supercomplex $CIII_2 + CIV$ (Fig. 3C). Restoration to normal complex IV and super-

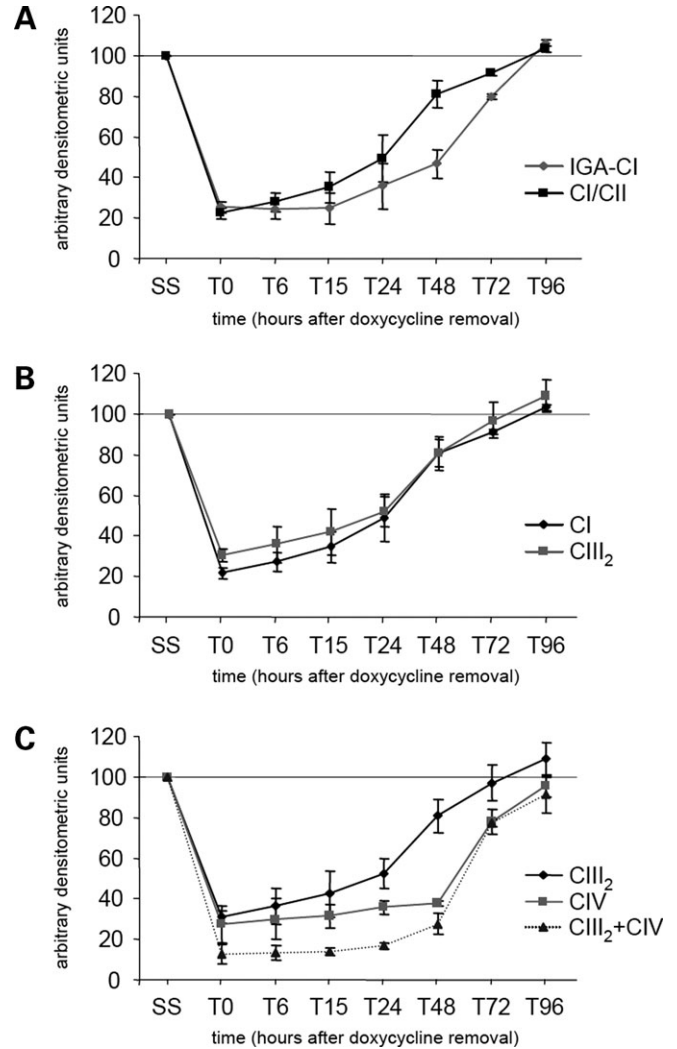


Figure 3. Assembly kinetics of respiratory chain complexes in control cybrids. The four controls used in this study were treated for 6 days with doxycycline (an inhibitor of mitochondrial translation), the medium was replaced by doxycycline-free medium and cells were grown for the indicated time (in hours). Forty microgram of crude mitochondrial pellets was analyzed by BN-PAGE in combination with complex I-IGA assay. Duplicate gels were blotted and incubated with antibodies against the NDUFA9 complex I subunit, complex III core2 protein, complex IV COX5A subunit and complex II-70 kDa subunit (data not shown). The signals were quantified, expressed as percentage of the untreated cells (indicated as SS), normalized with the complex II-70 kDa subunit and plotted. (A) Complex I activity recovery kinetics versus complex I assembly rates. (B) Complex I versus complex III assembly rates. (C) Complex III versus complex IV and supercomplex $CIII_2 + CIV$ assembly kinetics.

complex $CIII_2 + CIV$ steady-state levels occurred 96 h after removing the drug. These results match other studies in which no bioenergetic differences were observed in control cybrid cell lines carrying European mtDNA haplogroups (25,26).

Delayed assembly kinetics of respiratory chain complex I in cybrids harboring LHON primary mutations

To check whether the assembly kinetics of respiratory chain complex I was affected by the LHON mutations, we used

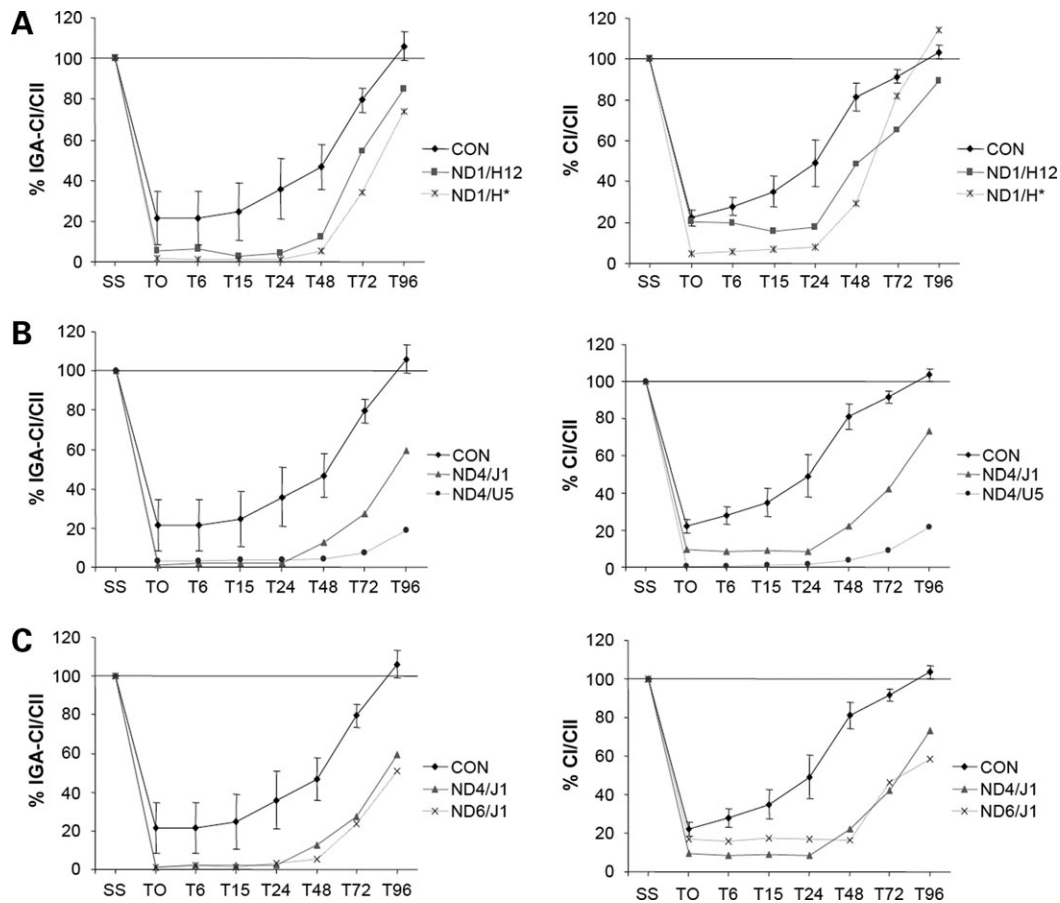


Figure 4. Re-appearance of respiratory chain complex I in LHON cybrids. The signals corresponding to complex I-IGA assays and western blots incubated with the NDUFA9 antibody (Supplementary Material, Figure S1) were quantified, expressed as percentage of the untreated cells (indicated as SS), normalized with the complex II-70 kDa subunit, plotted, and compared with the average assembly kinetics of the controls. (A) Clones ND1/H* and ND1/H12, harboring the 3460/*ND1* mutation on subclades H* and H12, respectively. (B) Clones ND4/J1 and ND4/U5, harboring the 11778/*ND4* mutation on haplogroups J1 and U5a, respectively. (C) Clones ND4/J1 and ND6/J1, harboring the 11778/*ND4* and 14484/*ND6* mutations on haplogroup J1 mtDNAs.

the same doxycycline inhibition strategy in our mutant cybrids (Supplementary Material, Figure S1). The complex I signals from blue native experiments were quantified, and normalized as previously mentioned. Cell lines were grouped according to the LHON mutation they harbored and compared with the 'average' control numerical values. After 6 days of doxycycline treatment (Fig. 4, T0 points), we observed a practically total reduction of complex I activity and ~85–100% reduction of fully assembled respiratory chain complex I in the mutant cybrids compared with the untreated cells (Fig. 4, SS points). These values contrast with those obtained for the controls during the inhibition process, suggesting that LHON mutations probably affect complex I stability.

Differences were found in the assembly kinetics of respiratory chain complex I between controls and LHON mutants. Clones characterized by the 3460/*ND1* mutation on haplogroups H12 and H* (ND1/H12 and ND1/H*, respectively) showed a similar 24 h delay in the recovery of complex I activity compared with controls (Fig. 4A, left). Controls gained ~50% of total complex I activity 48 h after doxycycline removal, and the 3460/*ND1* clones between 72 and 96 h. At time 96 h, controls showed 100% of complex I activity, while clones ND1/H12 and ND1/H* recovered

75–85% of total complex I activity. Similar results were obtained for the recovery of fully assembled complex I (Fig. 4A, right). Controls gained ~50% of total holocomplex I at time 24 h, and the 3460/*ND1* clones between 48 and 72 h. From time 48 h on complex I assembly kinetics seemed to speed up in the mutants, since at time 96 h clone ND1/H12 recovered ~90% of total holocomplex I, and the ND1/H* clone presented more fully assembled complex I than the controls. This effect might represent a compensatory mechanism as a response to the inhibition of mitochondrial protein synthesis. This might involve a general increase in mitochondrial mass because complex II, which only contains nuclear encoded subunits, also shows such an increase at 96 h in the ND1/H* cells (Supplementary Material, Figure S1).

Differences in the complex I assembly rates were detected between clones characterized by the 11778/*ND4* mutation on J1 and U5a haplogroups (Fig. 4B). Both the ND4/J1 and ND4/U5 cell lines showed a minimum of 48 h delay in the recovery of complex I activity and fully assembled complex I compared with controls. Clone ND4/J1 gained ~50% of total complex I activity and fully assembled complex I between 72 and 96 h after the drug removal, but clone ND4/U5a could not even reach these levels at 96 h.

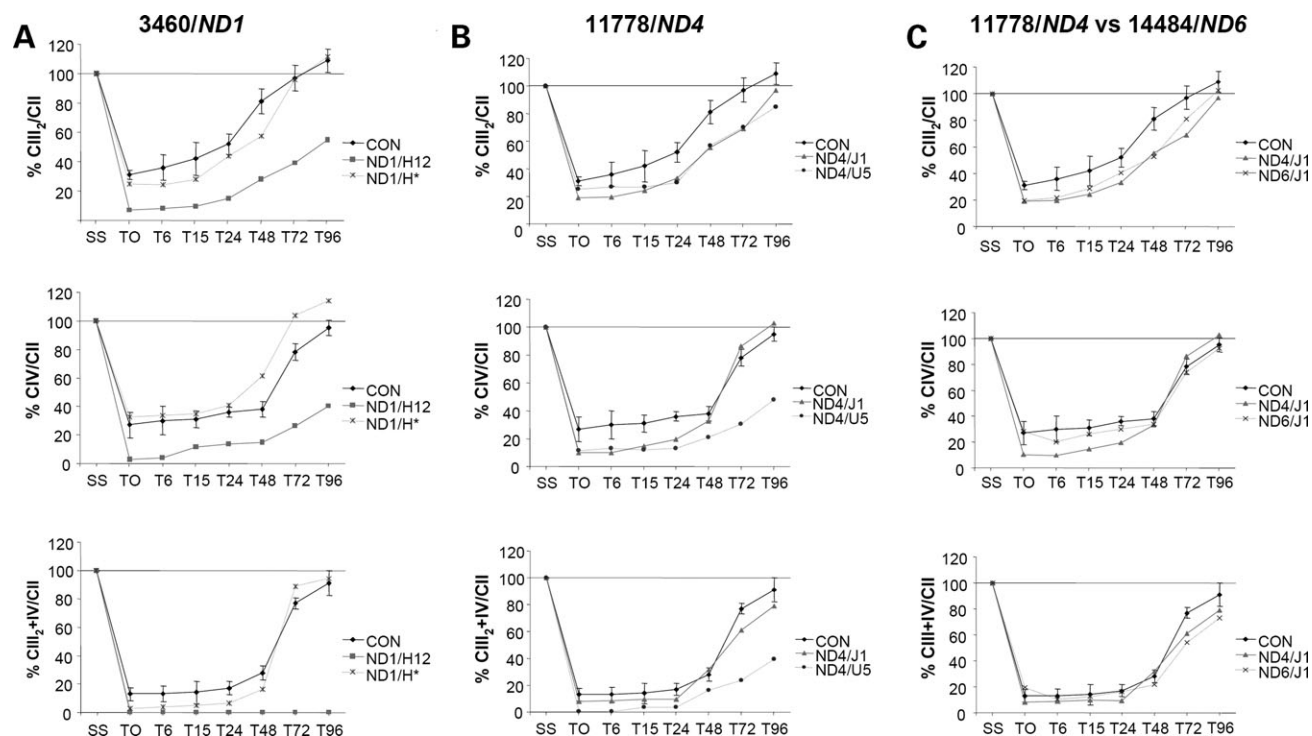


Figure 5. Assembly kinetics of respiratory chain complexes III and IV in LHON cybrids. The signals corresponding to western blots incubated with antibodies against the complex III core2 protein and complex IV COX5A subunit (Supplementary Material, Figure S1) were quantified, expressed as the percentage of untreated cells (indicated as SS), normalized with the complex II-70 kDa subunit, plotted, and compared with the control average assembly kinetics. (A) Signals corresponding to cybrid clones ND1/H* and ND1/H12, which harbor the 3460/ND1 mutation. (B) Signals corresponding to cell lines ND4/J1 and ND4/U5 that harbor the 11778/ND4 mutation. (C) Signals from cells harboring the 11778/ND4 and 14484/ND6 mutations on a haplogroup J1 mtDNA, which correspond to cell lines ND4/J1 and ND6/J1. Top graphs represent the complex III assembly curves. Middle graphs represent the complex IV assembly rates. Bottom graphs represent the supercomplex CIII₂ + CIV assembly kinetics.

No differences were found in the complex I assembly kinetics of clones harboring the 14484/ND6 mutation on a J1 mtDNA (data not shown). We next compared the 11778/ND4 and 14484/ND6 clones characterized by the same haplogroup J1 background (ND4/J1 and ND6/J1, respectively). Curiously, both clones showed similar delayed assembly kinetics of respiratory chain complex I (Fig. 4C). Our results demonstrate hampered kinetics of complex I assembly and activity recovery in all LHON cybrids.

MtDNA background influences the assembly kinetics of respiratory chain complexes III and IV in LHON cybrids

It has been suggested that the mitochondrial background, in particular subclades of haplogroups J or H that harbour specific polymorphisms in the *CYTB* gene, could interact synergistically with the primary LHON mutations, either altering the physical interaction between complexes I and III, or stabilizing the supercomplex CI + CIII₂ (7). Some alterations could add a negative effect on complex I function, since it has been reported that fully assembled complex III and lately, complex IV, are essential for the stability of mitochondrial complex I (27–29). For these reasons, we decided to test the assembly kinetics of respiratory chain complexes III and IV in our LHON cybrids (Fig. 5). Main differences were observed between the 3460/ND1 mutant clones (Fig. 5A). Although no real differences were found in the recovery rates between

clone ND1/H* and controls, the ND1/H12 cell line showed a minimum of 72 h delay in the recovery of fully assembled complex III (Fig. 5A, top). Controls gained ~50% of fully assembled complex III at time 24 h, whereas clone ND1/H12 reached these levels 96 h after doxycycline removal. Similarly, controls gained ~50% of total holocomplex IV between 24 and 48 h after doxycycline removal, whereas clone ND1/H12 could not reach these levels before 96 h (Fig. 5A, middle). In accordance with these results, clone ND1/H12 barely showed any expression of the mitochondrial supercomplex CIII₂ + CIV (Fig. 5A, bottom).

Conversely both 11778/ND4 clones only presented a slight delay in the complex III assembly kinetics relative to controls (Fig. 5B, top). At 96 h after doxycycline removal, clone ND4/J1 had recovered ~97% of total holocomplex III, and clone ND4/U5 ~85%. The main differences between these clones were found in the assembly kinetics of respiratory chain complex IV (Fig. 5B, middle). Mutant clone ND4/J1 presented no differences in the recovery kinetics of holocomplex IV, or supercomplex CIII₂ + CIV, with controls. However, the ND4/U5 cell line showed ~48 h delay in the recovery of fully assembled complex IV compared with ND4/J1 and controls. Controls gained ~50% of fully assembled complex IV between 48 and 72 h after doxycycline removal, whereas clone ND4/U5 almost reached these levels at 96 h. Similarly, the formation of the mitochondrial supercomplex CIII₂ + CIV in the ND4/U5 clone paralleled the complex IV assembly time

course (Fig. 5B, bottom), with ~38% of the total amount of the supercomplex at time 96 h.

We next compared the ND4/J1 and ND6/J1 mutants (Fig. 5C). No differences were found in the assembly kinetics of any respiratory chain complex.

DISCUSSION

The cybrids used in this study have been extensively analyzed as a model to investigate LHON pathophysiology, providing substantial evidence of complex I-dependent defects in respiration, ATP synthesis, and increased ROS production (11,15,17–19). In the present investigation we have further analyzed the effect of the most common LHON mutations on the assembly or stability of native mitochondrial respiratory chain complexes, and checked whether different mitochondrial genetic backgrounds could affect this process.

Our results are two-fold. First, we show that steady-state levels of fully assembled complex I and other respiratory chain complexes are not decreased in LHON mutant cybrids, but complex I assembly kinetics is delayed and complex I stability is reduced by the LHON mutations. This is illustrated by differences in the complex I assembly profile in 2D-BN/SDS gels, increased complex I turnover in the LHON mutant cells after a 6 days incubation with doxycycline, and differences in the recovery kinetics of respiratory chain complex I among LHON clones. Secondly, this defect in complex I assembly/stability is further modified by the mtDNA haplogroup, and may be mediated by the assembly rates and stability of respiratory chain complexes III and IV. Thus, the present results provide the first experimental evidence that certain mtDNA haplogroups, in combination with the LHON pathogenic mutations, may contribute to the severity of this disease by shifting the assembly kinetics of respiratory chain complexes.

Our study also describes a useful mechanism to unveil assembly defects in patients with apparently normal respiratory chain enzyme activities. At first glance, the normal steady-state levels of fully assembled complex I in LHON mutant cybrids looked as if there is no effect of LHON primary mutations on the formation of this complex. However, a differential accumulation of complex I subassemblies in several mutants was suggestive of a complex I assembly or stability defect. This defect was more evident in cybrids harboring the 3460/ND1 and 11778/ND4 mutations on H12 and U5a haplogroups, while clones harboring the same mutations on a different mtDNA background showed normal amounts of fully assembled complex I, and a normal pattern of low molecular weight subcomplexes. These results suggest that, in LHON cybrids, the severity of the complex I assembly and/or stability defect might depend on the association of the primary LHON mutations with specific mtDNA backgrounds.

The analysis of respiratory chain complexes after a transient depletion of OXPHOS complexes with doxycycline further supported a decreased assembly or stability of complex I in the LHON mutants. Remarkably, after 6 days in the presence of the inhibitor all mutant cybrids presented a stronger decrease of complex I compared with the controls, indicating

that complex I is more unstable in the LHON mutants. Moreover, LHON cybrids characterized by different primary mutations displayed clear differences in complex I recovery kinetics. The 3460/ND1 mutation exerted the mildest defect, whereas the 11778/ND4 and 14484/ND6 mutations hindered complex I assembly more severely. In addition to differences in complex I stability and assembly kinetics, clear differences were observed for the assembly and stability of complexes III and IV among LHON mutants characterized by different mtDNA backgrounds. In particular, the clone harboring the 11778/ND4 mutation on a haplogroup U5a background showed, besides a strong complex I assembly defect, a severe impairment of complex IV and supercomplex CIII₂ + CIV assembly rates. This effect can only be explained by the presence of two mtDNA polymorphic variants affecting the *COIII* gene, G9477A and A9667G, (Table 1) which could add a deleterious effect to that of the 11778/ND4 mutation. Unambiguously, the most affected clone was characterized by the 3460/ND1 mutation on haplogroup H12 (ND1/H12), which showed a severe delay in the recovery rate of complexes III and IV, and consequently almost no expression of mitochondrial supercomplex CIII₂ + CIV. In contrast, the 3460/ND1 clone with a haplogroup H* mtDNA (ND1/H*) showed normal assembly rates for complexes III and IV. These differences can be attributed to the presence in clone ND1/H12 of one specific non-synonymous variant (A14552G) affecting the complex I *ND6* gene (Table 1). This genetic variant, together with the 3460/ND1 LHON mutation, might decrease the stability of mitochondrial respiratory chain complexes and/or supercomplexes, but additional experiments are required to fully confirm this hypothesis. Finally, no differences in the recovery rates of respiratory chain complexes III and IV were detected between controls and clones harboring LHON mutations on haplogroup J1, despite a mild delay in the formation of complex III that soon reached normal levels. This is a remarkable and unexpected result, especially when considering that one 14484/ND6 clone carries an additional non-synonymous mutation in *ND6* (14279/ND6), which has been proposed as a primary LHON mutation in a family of Russian ancestry (30). In that case, the 14279/ND6 mutation was found on a U4 mtDNA haplogroup. These results suggest, in contrast to what has been previously proposed (7,8), that the combined accumulation of *ND* and *CYTB* non-synonymous variants on specific haplogroup J clades may exert a protective effect on the stability of respiratory chain complexes and supercomplexes. This may support the association of haplogroup J with successful ageing (31), or reduced risk of Parkinson disease (32). However, this result does not explain the increased LHON penetrance of the 11778/ND4 and 14484/ND6 mutations on certain haplogroup J backgrounds and further studies are needed to properly elucidate this issue.

Based on the present results on defective complex I assembly kinetics, the phenotypic severity of LHON mutations would increase from 3460/ND1 < 14484/ND6 < 11778/ND4. Our data agree with those obtained by others (15), who observed a direct correlation between defects of complex I-driven ATP synthesis and the clinical severity of LHON mutations. However, considering the global recovery kinetics of all respiratory chain complexes, the severity of the

LHON mutations would increase from 14484/ND6<11778/ND4<3460/ND1. These results match the data obtained from the polarographic assessment of complex I activity defects, as well as the clinical criteria for ranking the pathogenic potential of each LHON mutation (10). In our cellular model, the 14484/ND6 cybrids presented the best global respiratory chain assembly recovery. Accordingly, the highest frequency of spontaneous visual recovery is found in LHON patients carrying the 14484/ND6 mutation, commonly associated with haplogroup J1. Thus, our results suggest that the differences found in the assembly kinetics of respiratory chain complexes III and IV amongst the mutant clones can be a contributing factor to the differences of disease expression.

This study may also provide a further scenario for understanding the pathogenesis of LHON. Under regular physiological conditions, it is likely that the synthesis of respiratory chain complexes reaches a balance between newly synthesized and degraded respiratory chain complexes to cope with the tissue energy demand. A possibility is that under certain stress conditions in which the respiratory demand increases, a rapid energy supply is achieved through an increased rate of synthesis and enzyme activation of respiratory chain complexes. On certain mtDNA genetic backgrounds, the primary LHON mutations may not only alter the assembly rate of respiratory chain complex I, but also affect the formation of complexes III and IV. It is very likely that this defective assembly adds a negative effect on complex I stability (27–29), worsening the complex I activity defect. This in turn would decrease complex I-driven ATP synthesis (15), and increase ROS production and apoptosis, as demonstrated in cybrids (16–19). Conversely, when normal conditions are recovered, restoration of respiratory chain complexes would lead to normal respiratory chain activities and ATP synthesis. Our data plead in favor of a spontaneous visual recovery in those LHON patients in whom the RGCs degeneration prompted by a lack of energy has not yet reached a critical threshold (10). In agreement, allotopic expression of nuclear-re-coded ND4 using a recombinant adenovirus-based vector led to a partial rescue of the mitochondrial OXPHOS deficiency caused by the G11778A mutation in the cybrid model (33).

Although mtDNA haplogroups have been previously suggested to contribute in disease predisposition, possibly by modulating ROS production as recently shown in mouse cells (34), our current study demonstrates that biochemical differences in OXPHOS assembly kinetics could be an additional contributing factor. Still key features of LHON such as the incomplete penetrance of LHON mutations, male prevalence, tissue specificity to RGCs, and the mitochondrial bioenergetics and dynamics in neurons cannot be fully explained by the mtDNA genetic background. Thus, the putative role of nuclear modifying genes or epigenetic/environmental factors in the pathogenesis of LHON requires further investigation. In this regard, the influence that different nuclear genetic backgrounds may exert on further modulating the assembly kinetics of the respiratory chain complexes in LHON cybrids with the same mtDNA background will aid future studies. The upcoming results on the assembly kinetics of respiratory chain complexes will provide essential

information about the nature of mitochondrial respiratory chain deficiencies, and will enhance our understanding of OXPHOS disease mechanisms.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and culture conditions

Cybrid cell lines were constructed using the osteosarcoma 143B TK⁻206 cell line as an acceptor rho zero cell line, and either enucleated fibroblasts from two healthy controls (CON/K and CON/H) and six LHON probands carrying the 3460/ND1, 11778/ND4 and 14484/ND6 LHON primary mutations, or platelets from two healthy controls (CON/T2 and CON/J1) as mitochondria donors (9). Cells were cultured in high-glucose DMEM (Life Technologies) supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate and antibiotics. To block mitochondrial translation, 15 µg/ml doxycycline were added to the culture medium. Cells were grown in exponential conditions and harvested at the indicated time points.

MtDNA sequencing and quantification of mtDNA copy number

The entire mtDNA sequences of LHON and control cybrid cell lines were determined and analyzed as previously reported (7,35,36). Relative quantification of mtDNA versus nDNA was performed by real-time PCR in a HT 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) as previously described with minor modifications (37). Briefly, total DNA was extracted from cultured cells with the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). For each sample, mtDNA and nDNA were quantified in the same reaction tube. MtDNA detection was performed by one set of primers (forward primer: 5'-CCA CGG GAA ACA GCA GTG ATT-3', reverse primer: 5'-CTA TTG ACT TGG GTT AAT CGT GTG A-3') and FAM-labeled TaqMan probe (5'-FAM-TGC CAG CCA CCG CG-MGB-3') targeted to 12S ribosomal gene of mtDNA. For nDNA detection, a kit including a TaqMan VIC-labeled probe for the RNase P nuclear gene was used (Human RNase P PDAR; Applied Biosystems). Thermal cycler conditions were as follows: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, and 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. All samples were tested in duplicate at two levels of DNA concentration. The relative quantification of mtDNA versus nDNA was calculated by using a calibration curve consisting of serial dilutions of a stock solution made up of plasmids constructs with mtDNA 12S and RNase fragments inserts. The mtDNA copy number was determined by division of the total DNA concentration by the weight of each plasmid molecule.

Mitochondria preparation

Mitochondrial membranes were isolated from cell cultures, as previously described with minor modifications (38). Briefly, cybrid clones were cultured until cells were ~70% confluent. Cells were harvested with trypsin, washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), and re-suspended in 100 µl

PBS plus 100 μ l of digitonin solution (4 mg/ml). The cell solution was kept on ice for 10 min to dissolve the membranes. One milliliter of cold PBS was added to the cells, which were spun for 10 min at 10 000 r.p.m. at 4°C. The supernatant was removed, the pellet washed one more time in 1 ml cold PBS, and the protein concentration was determined using the MicroBCA protein assay kit (Pierce). For the preparation of native mitochondrial complexes, pellets were solubilized in 100 μ l buffer containing 1.5 M aminocaproic acid, 50 mM Bis-Tris, pH 7.0. Next, 2% (w/v) *n*-dodecyl β -D-maltoside was added and the cells were incubated on ice for 10 min. After centrifugation for 30 min at 13 000 r.p.m. at 4°C, the supernatant was combined with 10 μ l of sample buffer (750 mM aminocaproic acid, 50 mM Bis-Tris, 0.5 mM EDTA, 5% Serva Blue G-250) prior to loading.

Blue native electrophoresis and IGA assays

Blue native 5–15% gradient gels were loaded with 40 μ g of mitochondrial protein using 50 mM Bis-Tris as an anode buffer and 15 mM Bis-Tris/50 mM tricine containing 0.02% Serva Blue G-250 as a cathode buffer. After electrophoresis, proteins were transferred to a PROTAN[®] nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell) at 25 V, overnight, and probed with specific antibodies. Duplicate gels were further processed for second dimension 10% SDS-PAGE following previously described methods. (38).

For complex I IGA assay, gels were incubated for 2 h at room temperature with the following solutions: 2 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1 mg/ml NADH, and 2.5 mg/ml NTB (nitrotrazolium blue). Gels were washed in distilled water, scanned and photographed immediately.

Antibodies

Western blotting was performed using primary antibodies raised against the following subunits of the human mitochondrial OXPHOS complexes: NDUFA9 (39 kDa), UQCRC2, COX5A and SDHA, (Molecular Probes). Peroxidase-conjugated anti-mouse IgG was used as a secondary antibody (Molecular Probes). The signal was detected with ECL[®] plus (Amersham Biosciences) and the quantification of the blots was performed by using the ImagePro-Plus 4.1 image analysis software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at *HMG* Online.

FUNDING

This study was partially supported by Fundación de Investigación Biomédica del Hospital Universitario 12 de Octubre/Agencia Pedro Laín Entralgo, and Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) to C.U. (grant numbers 04/00011 and PI05-0379), by Fundación ARAID and ISCIII to E.R.P. (PI05-0647), by a Telethon-Italy grant (#GGP06233) to V.C., by Progetti Ricerca Interesse Nazionale 2007 (Italian Ministry of the University) to A.T., and by Fundación de

Investigación Médica Mutua Madrileña to M.A.M. (2005-069).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr A. García-Redondo, A. Blázquez and A. Delmiro for useful discussions and technical support.

Conflict of Interest statement. None of the coauthors of the present manuscript have any financial interests or connections, direct or indirect, or other situations that might raise the question of bias in the work reported or the conclusions, implications, or opinions stated – including pertinent commercial or other sources of funding for the individual author(s) or for the associated department(s) or organization(s), personal relationships, or direct academic competition.

REFERENCES

- Riordan-Eva, P., Sanders, M.D., Govan, G.G., Sweeney, M.G., Da Costa, J. and Harding, A.E. (1995) The clinical features of Leber's hereditary optic neuropathy defined by the presence of a pathogenic mitochondrial DNA mutation. *Brain*, **118**, 319–337.
- Harding, A.E., Sweeney, M.G., Govan, G.G. and Riordan-Eva, P. (1995) Pedigree analysis in Leber hereditary optic neuropathy families with a pathogenic mtDNA mutation. *Am. J. Hum. Genet.*, **57**, 77–86.
- Wallace, D.C., Singh, G., Lott, M.T., Hodge, J.A., Schurr, T.G., Lezza, A.M., Elsas, L.J. and Nikoskelainen, E.K. (1988) Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science*, **242**, 1427–1430.
- Brown, M.D., Sun, F. and Wallace, D.C. (1997) Clustering of Caucasian Leber hereditary optic neuropathy patients containing the 11778 or 14484 mutations on an mtDNA lineage. *Am. J. Hum. Genet.*, **60**, 381–387.
- Hofmann, S., Jaksch, M., Bezold, R., Mertens, S., Aholt, S., Paprotta, A. and Gerbitz, K.D. (1997) Population genetics and disease susceptibility: characterization of central European haplogroups by mtDNA gene mutations, correlation with D loop variants and association with disease. *Hum. Mol. Genet.*, **6**, 1835–1846.
- Torroni, A., Petrozzi, M., D'Urbano, L., Sellitto, D., Zeviani, M., Carrara, F., Carducci, C., Leuzzi, V., Carelli, V., Barboni, P. *et al.* (1997) Haplotype and phylogenetic analyses suggest that one European-specific mtDNA background plays a role in the expression of Leber hereditary optic neuropathy by increasing the penetrance of the primary mutations 11778 and 14484. *Am. J. Hum. Genet.*, **60**, 1107–1121.
- Carelli, V., Achilli, A., Valentino, M.L., Rengo, C., Semino, O., Pala, M., Olivieri, A., Mattiazzi, M., Pallotti, F., Carrara, F. *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**, 564–574.
- Hudson, G., Carelli, V., Spruijt, L., Gerards, M., Mowbray, C., Achilli, A., Pyle, A., Elson, J., Howell, N., La Morgia, C. *et al.* (2007) Clinical expression of Leber hereditary optic neuropathy is affected by the mitochondrial DNA-haplogroup background. *Am. J. Hum. Genet.*, **81**, 228–233.
- King, M.P. and Attardi, G. (1989) Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science*, **246**, 500–503.
- Carelli, V., Ross-Cisneros, F.N. and Sadun, A.A. (2004) Mitochondrial dysfunction as a cause of optic neuropathies. *Prog. Retin. Eye Res.*, **23**, 53–89.
- Vergani, L., Martinuzzi, A., Carelli, V., Cortelli, P., Montagna, P., Schievano, G., Carozzo, R., Angelini, C. and Liguori, E. (1995) MtDNA mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy: studies on cytoplasmic hybrid (cybrid) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **210**, 880–888.
- Hofhaus, G., Johns, D.R., Hurko, O., Attardi, G. and Chomyn, A. (1996) Respiration and growth defects in trans-mitochondrial cell lines carrying the 11778 mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *J. Biol. Chem.*, **271**, 13155–13161.

13. Cock, H.R., Tabrizi, S.J., Cooper, J.M. and Schapira, A.H. (1998) The influence of nuclear background on the biochemical expression of 3460 Leber's hereditary optic neuropathy. *Ann. Neurol.*, **44**, 187–193.
14. Brown, M.D., Trounce, I.A., Jun, A.S., Allen, J.C. and Wallace, D.C. (2000) Functional analysis of lymphoblast and cybrid mitochondria containing the 3460, 11778, or 14484 Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA mutation. *J. Biol. Chem.*, **275**, 39831–39836.
15. Baracca, A., Solaini, G., Sgarbi, G., Lenaz, G., Baruzzi, A., Schapira, A.H., Martinuzzi, A. and Carelli, V. (2005) Severe impairment of complex I-driven adenosine triphosphate synthesis in Leber hereditary optic neuropathy cybrids. *Arch. Neurol.*, **62**, 730–736.
16. Wong, A., Cavelier, L., Collins-Schramm, H.E., Seldin, M.F., McGrogan, M., Savontaus, M.L. and Cortopassi, G.A. (2002) Differentiation-specific effects of LHON mutations introduced into neuronal NT2 cells. *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 431–438.
17. Beretta, S., Mattavelli, L., Sala, G., Tremolizzo, L., Schapira, A.H., Martinuzzi, A., Carelli, V. and Ferrarese, C. (2004) Leber hereditary optic neuropathy mtDNA mutations disrupt glutamate transport in cybrid cell lines. *Brain*, **127**, 2183–2192.
18. Floreani, M., Napoli, E., Martinuzzi, A., Pantano, G., De Riva, V., Trevisan, R., Bisetto, E., Valente, L., Carelli, V. and Dabbeni-Sala, F. (2005) Antioxidant defences in cybrids harboring mtDNA mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *FEBS J.*, **272**, 1124–1135.
19. Ghelli, A., Zanna, C., Porcelli, A.M., Schapira, A.H., Martinuzzi, A., Carelli, V. and Rugolo, M. (2003) Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) pathogenic mutations induce mitochondrial-dependent apoptotic death in transmitochondrial cells incubated with galactose medium. *J. Biol. Chem.*, **278**, 4145–4150.
20. 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.
21. Ugalde, C., Vogel, R., Huijbens, R., van den Heuvel, B., Smeitink, J. and Nijtmans, L. (2004) Human mitochondrial complex I assembles through the combination of evolutionary conserved modules: a framework to interpret complex I deficiencies. *Hum. Mol. Genet.*, **13**, 2461–2472.
22. Ugalde, C., Janssen, R.J., van den Heuvel, L.P., Smeitink, J.A. and Nijtmans, L.G. (2004) Differences in assembly or stability of complex I and other mitochondrial OXPHOS complexes in inherited complex I deficiency. *Hum. Mol. Genet.*, **13**, 659–667.
23. Yadava, N., Houchens, T., Potluri, P. and Scheffler, I.E. (2004) Development and characterization of a conditional mitochondrial complex I assembly system. *J. Biol. Chem.*, **279**, 12406–12413.
24. Lazarou, M., McKenzie, M., Ohtake, A., Thorburn, D.R. and Ryan, M.T. (2007) Analysis of the assembly profiles for mitochondrial- and nuclear-DNA-encoded subunits into complex I. *Mol. Cell Biol.*, **27**, 4228–4237.
25. Carelli, V., Vergani, L., Bernazzi, B., Zampieron, C., Bucchi, L., Valentino, M., Rengo, C., Torrioni, A. and Martinuzzi, A. (2002) Respiratory function in cybrid cell lines carrying European mtDNA haplogroups: implications for Leber's hereditary optic neuropathy. *Biochim. Biophys. Acta*, **1588**, 7–14.
26. 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.
27. Schagger, H., De Coo, R., Bauer, M.F., Hofmann, S., Godinot, C. and Brandt, U. (2004) Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I. *J. Biol. Chem.*, **279**, 36349–36353.
28. Acin-Perez, R., Bayona-Bafaluy, M.P., Fernandez-Silva, P., Moreno-Loshuertos, R., Perez-Martos, A., Bruno, C., Moraes, C.T. and Enriquez, J.A. (2004) Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria. *Mol. Cell*, **13**, 805–815.
29. Diaz, F., Fukui, H., Garcia, S. and Moraes, C.T. (2006) Cytochrome c oxidase is required for the assembly/stability of respiratory complex I in mouse fibroblasts. *Mol. Cell Biol.*, **26**, 4872–4881.
30. Zhadanov, S.I., Atamanov, V.V., Zhadanov, N.I., Oleinikov, O.V., Osipova, L.P. and Schurr, T.G. (2005) A novel mtDNA *ND6* gene mutation associated with LHON in a Caucasian family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **332**, 1115–1121.
31. De Benedictis, G., Rose, G., Carrieri, G., De Lonlay, M., Falcone, E., Passarino, G., Bonafe, M., Monti, D., Baggio, G., Bertolini, S. *et al.* (1999) Mitochondrial DNA inherited variants are associated with successful aging and longevity in humans. *FASEB J.*, **13**, 1532–1536.
32. van der Walt, J.M., Nicodemus, K.K., Martin, E.R., Scott, W.K., Nance, M.A., Watts, R.L., Hubble, J.P., Haines, J.L., Koller, W.C., Lyons, K. *et al.* (2003) Mitochondrial polymorphisms significantly reduce the risk of Parkinson disease. *Am. J. Hum. Genet.*, **72**, 804–811.
33. Guy, J., Qi, X., Pallotti, F., Schon, E.A., Manfredi, G., Carelli, V., Martinuzzi, A., Hauswirth, W.W. and Lewin, A.S. (2002) Rescue of a mitochondrial deficiency causing Leber hereditary optic neuropathy. *Ann. Neurol.*, **52**, 534–542.
34. 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.
35. Achilli, A., Rengo, C., Magri, C., Battaglia, V., Olivieri, A., Scozzari, R., Cruciani, F., Zeviani, M., Briem, E., Carelli, V. *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**, 910–918.
36. 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.
37. Crespo, M., Sauleda, S., Esteban, J.I., Juarez, A., Ribera, E., Andreu, A.L., Falco, V., Quer, J., Ocana, I., Ruiz, I. *et al.* (2007) Peginterferon alpha-2b plus ribavirin vs interferon alpha-2b plus ribavirin for chronic hepatitis C in HIV-coinfected patients. *J. Viral Hepat.*, **14**, 228–238.
38. Nijtmans, L.G., Henderson, N.S. and Holt, I.J. (2002) Blue native electrophoresis to study mitochondrial and other protein complexes. *Methods*, **26**, 327–334.



Contents lists available at ScienceDirect

Mitochondrion

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mito

Moroccan mitochondrial genetic background suggests prehistoric human migrations across the Gibraltar Strait

Taha Rhouda^{a,b,c}, Diana Martínez-Redondo^{a,b}, Aurora Gómez-Durán^{a,b}, Nouredine Elmtili^c, Mouhamed Idaomar^c, Carmen Díez-Sánchez^{a,b}, Julio Montoya^{a,b}, Manuel José López-Pérez^{a,b}, Eduardo Ruiz-Pesini^{a,b,d,*}

^a Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza, Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, Spain

^b CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, Spain

^c Université Abdelmalek Essaadi, Faculté des Sciences, Département de la Biologie, BP 2121, 93002 Tetouan, Morocco

^d Fundación Aragón I+D, Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 March 2009

Received in revised form 8 July 2009

Accepted 17 July 2009

Available online 23 July 2009

Keywords:

mtDNA

Haplogroups

North Africa

Gibraltar Strait

ABSTRACT

Migrations into Africa from the Levant have greatly determined the mitochondrial genetic landscape of North Africa. After analyzing samples from North Morocco to Spain, we show that three fourths of the Moroccan individuals belong to Western Eurasian haplogroups and the frequencies of these are much more similar to those of the Iberian Peninsula than to those of the Middle East. This is particularly true for the mitochondrial haplogroups H1, H3 and V, which experienced a late-glacial expansion from this region, that repopulated much of Central and Northern Europe. Iberian Peninsula was also a source for prehistoric migrations to North Africa.

© 2009 Elsevier B.V. and Mitochondria Research Society. All rights reserved.

1. Background

Early in the eighties, mitochondrial DNA (mtDNA) started to be used as a tool in population genetics (Denaro et al., 1981). These studies allowed the unmasking of different aspects of the human evolution such as the origin of anatomically modern humans in Sub-Saharan Africa (Cann et al., 1987) and the pathways that they followed to colonize the rest of the world (Forster and Matsumura, 2005; Macaulay et al., 2005; Quintana-Murci et al., 1999; Thangaraj et al., 2005). It is now thought that human beings left Africa through the Bab al Mandab Strait, at the far southwestern point of the Arabian Peninsula, 65,000 years before present (YBP) (Mishmar et al., 2003). This event was facilitated by the short distance (17 km) between both sides of the Red Sea (Forster, 2004).

By studying the distribution and frequency of the mitochondrial haplogroups, groups of phylogenetically related mitochondrial genotypes, it was possible to unravel the population history of

most of the regions of the world (Wallace, 1995). Surprisingly, mtDNA haplogroups from the south coast of the Mediterranean Sea have been poorly studied. However, it is well known that North Africans are genetically quite distinct from Sub-Saharan Africans (Forster and Romano, 2007) and the analysis of their mtDNA haplotypes has shown that they carry a set of mtDNA haplogroups already found in Europe and the Middle East. Because the Middle East is the cradle for most of the European haplogroups, it is thought that North African mtDNA haplogroups are largely descended from a back-migration into Africa from the Levant (Olivieri et al., 2006). However, an ancient specific contribution from Europe, and particularly from the Iberian Peninsula, has not been seriously evaluated.

The spatial distribution of the H1, H3 and V clusters appears to indicate the presence of a gradient with a peak centered at the Iberian Peninsula and declining frequencies towards both the northeast and southeast. These findings attest that the Franco-Cantabrian refuge area was indeed the source of late-glacial expansions of hunter-gatherers that repopulated much of Central and Northern Europe (Achilli et al., 2004; Loogvali et al., 2004; Pereira et al., 2005; Torroni et al., 1998, 2001). Morocco is the closest North African country to the Iberian Peninsula. The Strait of Gibraltar is only 14.4 km in its narrowest part (Strauss, 2001) and, therefore, narrower than the Bab al Mandab Strait, the one thought to be crossed in the first successful human migration out of Africa.

* Corresponding author. Address: Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza, CIBERER-ISCIII, Fundación ARAID, Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, Spain. Tel.: +34 976761640; fax: +34 976761612.

E-mail addresses: taha@unizar.es (T. Rhouda), dianamr@unizar.es (D. Martínez-Redondo), auroragd@unizar.es (A. Gómez-Durán), elmtili@hotmail.com (N. Elmtili), idaomar@gmail.com (M. Idaomar), cardisan@unizar.es (C. Díez-Sánchez), jmontoya@unizar.es (J. Montoya), lopezper@unizar.es (M.J. López-Pérez), edurui-z@unizar.es (E. Ruiz-Pesini).

Although Neolithic and historical population exchanges have been described previously (Plaza et al., 2003; Rando et al., 1998), to unmask the role of the Iberian Peninsula on more ancient pre-historic colonization of North Africa, we decided to study these mtDNA haplogroups in the Moroccan population and compare them to those of the Iberian Peninsula (Portugal and Spain), the rest of Europe and the Middle East countries.

2. Materials and methods

2.1. Samples

Most of the studies carried out with North Africa populations have studied very small sample sizes and very geographically limited populations. Because consanguinity is a big issue in this part of the world (Cherkaoui et al., 2005), we collected 557 blood samples of unrelated healthy volunteers from five relatively big and geographically dispersed North Moroccan populations (80 from Alhoceima, 32 from Azilal, 34 from Chefcheouen, 193 from Oujda and 218 from Tetouan) and 504 blood samples from unrelated healthy volunteers of the center (Madrid) and northeast (Zaragoza) of the Iberian Peninsula. All the participants in this study gave their informed consent. The study was approved by the ethical committee of the Royaume du Maroc (Ref. No. 000595). For comparison purposes, we also collected data from the literature for Morocco, Iberian Peninsula, the rest of Europe and the Middle East and, specially, all the H1, H3 and V data from the literature defined by single nucleotide polymorphisms (SNPs) at nucleotides (nts) m.7028T > C, m.3010G > A, m.6776T > C and m.4580G > A (Achilli et al., 2004; Brandstatter et al., 2006; Castro et al., 2006; Dubut et al., 2004; Gonzalez et al., 2003; Larruga et al., 2001; Maca-Meyer et al., 2003; Macaulay et al., 1999; Pereira et al., 2005; Richard et al., 2007; Torroni et al., 2001). However, some of the populations (Achilli et al., 2004) came from a previous publication (Loogvali et al., 2004) and, in this article, the haplogroup H frequencies were not observed but estimated. Thus, these populations were not considered in our analysis. Similarly, Pereira did not subhaplogroup all the H samples (Pereira et al., 2005). Therefore, we only considered those populations where all the H individuals were characterized.

2.2. DNA analysis

DNA was extracted by standard methods. All the samples were genetically characterized by PCR/RFLP for haplogroup- and subhaplogroup-defining SNPs in the coding region and sequencing in both senses the hypervariable region I (HVRI) (Macaulay et al., 1999). For comparison reason, we only considered SNPs between nts 16,090 and 16,365 in the HVRI.

2.3. Data analysis

Reduced median networks of haplotypes (defined by their HVRI sequence) were manually constructed (Torroni et al., 2001). Coalescence ages of subhaplogroups were calculated based on the network, by means of the average transitional distance from the root haplotypes (ρ), although strong caution should be applied to inferences made from molecular dates based on the ρ statistic (Cox, 2008). When ρ is applied to HVRI, the number of transitions, within nucleotides 16,090–16,365, is counted from each sampled sequence to the corresponding founder sequence (ignoring transversions and indels). In order to estimate the sampling error for ρ , we assumed a Poisson process, which is approximately justified for starlike haplogroups such as those described in this study. The SD is then calculated as $\sqrt{(\rho/n)}$, where n denotes the sample size

(Torroni et al., 1998). One transitional step between nts 16,090 and 16,365 was taken equal to 20,180 years (Forster et al., 1996).

3. Results

3.1. Frequency of the mitochondrial DNA haplogroups in Morocco

To unravel the contribution of the Iberian Peninsula to the mtDNA pool of the Moroccan population, we studied 557 samples from five different Moroccan cities (Table S1 online) divided in the major mtDNA genetic lineages, L, M and N and compared them with 216 samples obtained in other studies (Table 1). Although the samples from other studies were mainly haplogrouped only by sequencing the HVRI, the frequencies were very similar to those that we have found in our population, analyzed by HVRI sequencing and by PCR/RFLP of particular polymorphisms in the coding region. A fifth and three fourths of the Moroccan samples belong to Sub-Saharan and Western Eurasian haplogroups, respectively.

Interestingly, if we only consider the Western Eurasian haplogroups, the Moroccan frequencies are more similar to those of the Iberian Peninsula than to those of the Middle East and this is especially true for the R0 lineage (Table 2).

3.2. Frequency of the mitochondrial DNA haplogroups in Imazighen and Arabs

Imazighen (singular Amazigh, the Berber word derives from the Greek Barbaroi which is a pejorative designation) have been widely regarded as aboriginal North Africans. A strong cultural and possible genetic influence may have resulted from the Islamic expansion during the 6th and 7th centuries. To unravel this genetic contribution, we have analyzed the mtDNA haplogroups M1 and U6 in both ethnic groups. According to a very recent study, these haplogroups arrived in ancient times (40,000 years ago) in North Africa (Olivieri et al., 2006). However, there are no differences in the distribution of these haplogroups between these two ethnic populations ($\chi^2 = 6.8$, df = 5, $P = 0.2384$) and their frequencies are slightly higher in the Arab population (Table 3).

3.3. Goodness of the polymorphisms defining H, H1, H3 and V clusters

Haplogroup H and subhaplogroups H1 and H3 cannot be defined by SNPs in the HVRI of the mtDNA, except by the absence of characteristic motifs for other haplogroups. However, they can perfectly be characterized by SNPs in the coding region. Haplogroup H is defined by the SNP at nucleotide position m.7028T > C, thus removing the recognition site by the restriction enzyme AluI. This restriction enzyme recognizes positions between nucleotides 7025 and 7028. Only five from more than 2901 non-H individuals from all around the world have SNPs at these positions

Table 1

Absolute and relative (in brackets) frequencies of the mitochondrial DNA haplogroups in the Moroccan population. Samples from other studies were obtained from Brakez et al. (2001), Falchi et al. (2006), Pinto et al. (1996), Plaza et al. (2003), Rando et al. (1998) (18, 74, 50, 22 and 52 samples, respectively). Others denotes those samples that were not classified in a particular haplogroup.

Mitochondrial clusters	This study	Other studies	Total
L	103 (18.5)	42 (19.4)	145 (18.8)
M	20 (3.6)	3 (1.4)	23 (3.0)
R0	230 (41.3)	85 (39.4)	315 (40.8)
U	124 (22.3)	43 (19.0)	167 (21.6)
JT	57 (10.2)	31 (14.4)	88 (11.4)
NIWX	23 (4.1)	2 (0.9)	25 (3.2)
Others	0 (0)	10 (4.6)	10 (1.3)
Total	557	216	773

Table 2

Absolute and relative (in brackets) frequencies of the Western Eurasian mitochondrial DNA haplogroups in the Moroccan, Iberian and Middle Eastern populations. Samples from Iberian Peninsula were obtained from Castro et al. (2006), Dahmany et al. (2006), Huerta et al. (2005), Larruga et al. (2001), Pereira et al. (2005), Picornell et al. (2005), Plaza et al. (2003), Richards et al. (2000), Torroni et al. (1999). Samples from Middle East were obtained from (Abu-Amro et al. (2007), Amar et al. (2007), Macaulay et al. (1999). Others denotes those samples that were not classified in a particular haplogroup.

Mitochondrial clusters	Morocco	Iberian Peninsula	Middle East
R0	315 (50.2)	1721 (55.2)	155 (33.0)
U	167 (26.6)	581 (18.6)	124 (26.4)
JT	88 (14.0)	600 (19.2)	83 (17.7)
NIWX	25 (4.0)	138 (4.4)	60 (12.8)
Others	10 (1.6)	79 (2.5)	48 (10.2)
Total	628	3119	470

Table 3

M1 and U6 haplogroups absolute and relative frequencies in Arab and Imazighen populations. Samples were obtained from Brakez et al. (2001), Falchi et al. (2006), Olivieri et al. (2006), Pinto et al. (1996), Plaza et al. (2003), Rando et al. (1998), Rosa et al. (2004) and this study.

Ethnic	M1	U6	Rest	Total
Arabs	31 (3.6)	75 (8.7)	759 (87.7)	865
Imazighen	18 (2.9)	34 (5.4)	575 (91.7)	627
Total	49	109	1334	1492

that remove the cutting site (Ruiz-Pesini et al., 2007). H1 is defined by the SNP at m.3010G > A, and it is not cut with *bclI*. This restriction enzyme recognizes positions between nucleotides 3009 and 3013. Only one of 227 H1 individuals in this sample collection is cut with this enzyme and only one of 440 H non-H1 individuals has lost this recognition site. H3 is defined by m.6776T > C and it is not cut with *NlaIII*. This restriction enzyme recognizes positions between nucleotides 6774 and 6777. None of the 581 H non-H3 individuals has SNP at these positions that remove the cutting site.

Haplogroup V cannot be feasibly defined by SNPs in the HVRI, although most of the V individuals contain a SNP at m.16298T > C. However, it can perfectly be defined by m.4580G > A in the coding region and it is not cut with *NlaIII*. This restriction enzyme recognizes positions between nucleotides 4577 and 4580. Only two of 3491 non-V individuals in this sample collection have one SNP at these positions that remove the cutting site. Therefore, these SNPs are very good markers for defining haplogroups H and V and sub-haplogroups H1 and H3.

3.4. Distribution and frequency of H, H1, H3 and V clusters

By using these SNPs, we analyzed 504 samples from Spain and 557 from Morocco and combined them with other previously published data (Table 4). The frequencies of H, H1 and H3 are higher in the Iberian Peninsula than in North West Africa. However, H1 represents

almost the same proportion of the haplogroup H in both populations (51.5% and 48.6%, respectively). H3 is 17.9% of the haplogroup H in the Iberian Peninsula but only 8.2% in the North West Africa. Similarly, the frequency of H1 is higher in North West Africa than in Europe or the Middle East and H1 and H3 represent a lower proportion of the haplogroup H in these populations (22.8%, 12.7%, 7.7% and 0.6%, respectively).

The frequency of V is higher in North West Africa than in the Iberian Peninsula, the rest of Europe or the Middle East (Table 5).

3.5. H1, H3 and V diversity

Since there were no published HVRI sequences for sub-haplogroups H1 and H3 in the Iberian Peninsula and North West Africa and almost no sequences for the haplogroup V in North West Africa. Therefore, to study the diversity of these clusters in these regions, we sequenced the HVRI and compared them to those of the rest of Europe and the Middle East (Table 6, Fig. 1 and Table S2 online).

A high percent of the haplotypes in North West Africa are unique (14/37, 37.8%). The percentage of unique haplotypes is higher in the other regions (48/78, 61.5% in the Iberian Peninsula; 70/102, 68.5% in the rest of Europe and 13/27, 48.1% in the Middle East). North West Africa shares more H1 and V haplotypes with the Iberian Peninsula than with the rest of Europe or the Middle East. The percentage of H3 haplotypes shared with the Middle East is higher but this is only due to the fact that there are only two H3 haplotypes present in the Middle East and they are the commonest.

The age estimations for the European and Middle East H1 haplogroup, by using HVRI sequences, are the same than those previously described (Roostalu et al., 2007) and also the same for the Iberian Peninsula H1 (Pereira et al., 2005). This is also true for H3 (Pereira et al., 2005; Roostalu et al., 2007) and V (Torroni et al., 2001). H1, H3 and V clusters in North West Africa were younger than in the Iberian Peninsula. The range of ages for these three haplogroups in North Africa was between 11,959 and 9497 YBP.

Table 5

Frequency and distribution of haplogroup V in Europe, Iberian Peninsula, North West Africa (Morocco and Algeria) and the Middle East. In square brackets we represent the samples from this study. C, D, G, L, M, MM, R, T and Rh encode for Castro et al. (2006), Dubut et al. (2004), Gonzalez et al. (2003), Larruga et al. (2001), Maca-Meyer et al. (2003), Macaulay et al. (1999), Richard et al. (2007), Torroni et al. (2001) and this study, respectively.

	N	V	References
Rest of Europe (RE)	6232	181 (2.9%)	T,R,D
Iberian Peninsula (IP)	2029 [504]	96 [21] (4.7%)	T,L,G,MM,C,Rh
North West Africa (NWA)	783 [557]	46 [36] (5.9%)	M,T,Rh
Middle East (ME)	380	0 (0%)	T

Table 4

Frequency and distribution of haplogroup H and sub-haplogroups H1 and H3 in Europe, Iberian Peninsula, North West Africa (Morocco, Algeria and Tunisia) and the Middle East. In square brackets, we represent the samples from this study. A, B, P and Rh encode for Achilli et al. (2004), Brandstatter et al. (2006), Pereira et al. (2005) and this study, respectively.

	N	H	H1	H3	References
Rest of Europe (RE)	4244	1712 (40.3%)	392 (9.2%)	130 (3.1%)	A,B,P
Iberian Peninsula (IP)	1204 [504]	512 [265] (42.5%)	263 [117] (21.9%)	92 [42] (7.6%)	A,Rh
North West Africa (NWA)	847 [557]	249 [160] (29.4%)	121 [81] (14.3%)	20 [17] (2.4%)	A,Rh
Middle East (ME)	804	127 (15.8%)	16 (2.0%)	1 (0.1%)	A,P

Table 6

Analysis of the H1, H3 and V haplotypes. *N* is the sample size. In square brackets, samples from this study. Hts encode for haplotypes. NWA, IP, RE and ME, North West Africa, Iberian Peninsula, Rest of Europe and the Middle East, respectively.

SubHgs	<i>N</i>	Hts	Unique Hts	IP	RE	ME	$\rho \pm \sigma$	Age
H1 (NWA)	81 [81]	19	8 (42.1)	7/48 (14.6)	6/55 (10.9)	4/38 (10.5)	0.5185 ± 0.0800	11,959 ± 1725
H1 (IP)	117 [117]	36	22 (61.1)		10/68 (14.7)	8/51 (15.7)	0.7265 ± 0.0788	14,661 ± 1590
H1 (RE)	131	42	29 (69.0)			6/59 (10.2)	1.1221 ± 0.0926	22,644 ± 1869
H1 (ME)	72	23	13 (56.5)				0.9722 ± 0.1162	19,619 ± 2345
H3 (NWA)	17 [17]	6	3 (50.0)	3/22 (13.6)	2/14 (14.3)	2/6 (33.3)	0.4706 ± 0.1664	9497 ± 3358
H3 (IP)	47 [47]	19	15 (78.9)		3/26 (11.5)	2/19 (10.5)	0.5957 ± 0.1126	12,021 ± 2272
H3 (RE)	24	10	7 (70.0)			2/10 (20.0)	0.7917 ± 0.1816	15,977 ± 3665
H3 (ME)	4	2	0 (0)				0.5000 ± 0.3536	10,090 ± 7136
V (NWA)	45 [35]	12	3 (25.0)	7/30 (23.3)	9/52 (17.3)	1/13 (7.7)	0.5333 ± 0.1089	10,762 ± 2202
V (IP)	82 [14]	25	12 (48.0)		12/62 (19.7)	1/26 (3.8)	0.8049 ± 0.0991	16,243 ± 2000
V (RE)	181	49	34 (69.4)			2/49 (4.0)	0.6648 ± 0.0604	13,416 ± 1219
V (ME)	3	2	0 (0)				0.6667 ± 0.4714	13,454 ± 9513

Surprisingly, H1 and H3 were older in the rest of Europe than in the Iberian Peninsula.

4. Discussion

The slightly higher frequencies of the haplogroups U6 and M1 in Moroccan Arabs versus Imazighen have been also found in other countries like Tunisia (Cherni et al., 2005; Loueslati et al., 2006). Because they are ancient haplogroups in North Africa, their frequencies should be higher in Imazighen, as descendants of the first colonizers of this region. This fact suggests that arabization was a cultural phenomenon not accompanied by an important gene flow. This result confirms others found by analyzing different genetic markers (Bosch et al., 2000; Ennafaa et al., 2006).

Our data support an ancient contact between the Iberian Peninsula and North West Africa. The frequencies of H1, H3 and V are much higher (7.2, 24 and ∞ times) in North West Africa than in the Middle East. Moreover, these two regions only share the commonest haplotypes. In fact, these haplotypes are also shared with the Iberian Peninsula. Therefore, the Middle East was not the source of North West African H1, H3 and V haplotypes. On the contrary, these subhaplogroups in North West Africa and the Iberian Peninsula have similar frequencies (0.7, 0.3 and 1.3 times) and they would be genetically closer if Sub-Saharan haplotypes L were removed from the analysis (Plaza et al., 2003) because it is thought that Sub-Saharan haplotypes arrived in North Africa in more recent times (Krings et al., 1999), thus diluting the frequencies of the other haplogroups. Moreover, North West Africa and the Iberian Peninsula share more haplotypes (16/99, 16.2%). Thus, the Iberian Peninsula was probably the source population for these subhaplogroups in North West Africa. This statement is reinforced by the analysis of one complete mtDNA sequence (number 30) shared by one Amazigh and some Saami people (Achilli et al., 2005).

An archeological finding is concordant with this statement. The Taforalt harpoon was found in the Taforalt Cave in the North East of Morocco and it is a fragment of a harpoon with three short barbs on the edge (Strauss, 2001). This object must be around 11,000 years old and it is contemporaneous with the harpoons of

the Mediterranean Spanish Magdalenian. A very likely hypothesis to explain this coincidence would be the existence of human contacts across the Strait of Gibraltar in the period between 12,000 and 10,500 years ago. Successful seafaring was clearly among the capacities of early forms of genus *Homo* in South East Asia. Navigation of an age at least equivalent to the Final Magdalenian seems to have been very fairly common throughout the Mediterranean Sea (Strauss, 2001). The high frequency of unique H1, H3 and V haplotypes in North West Africa and the other regions, along with the relatively low frequency of shared haplotypes with the Iberian Peninsula, indicates an ancient divergence and a rapid spread from the Iberian Peninsula. The age of these subhaplogroups in North West Africa is between 11,959 and 9497 YBP, only slightly lower than the age in the Iberian Peninsula and coincident with the archeological evidences. Moreover, and although they were not checked for haplogroup-defining polymorphisms in the coding region, the analysis of ancient DNA of human bones from the Taforalt Cave showed that two of them had the 16,298 and 16,261 mutations, respectively (Kefi et al., 2005). The first one could be a member of the mitochondrial haplogroup V. The second one has been found only two times (one French and one Russian individual) in the 401 H1 sequences (0.5%).

Although the frequencies of the haplogroup H are much lower in the Middle East than in Europe, it is nowadays though that this haplogroup arose in the Near East or in the Caucasus (Richards et al., 2000; Roostalu et al., 2007). Similarly, and although the frequencies of H1 and H3 are higher in the Iberian Peninsula than in the rest of Europe, the ages of these subhaplogroups are younger in the Iberian Peninsula (Loogvali et al., 2004; Pereira et al., 2005; and this article). Therefore, it is very likely that these two subhaplogroups had not arisen in the Iberian Peninsula, but they were present in Europe before the retreat of the populations and they resettled Europe from several southern refuge areas.

5. Conclusions

Our data suggests the existence of prehistoric contacts between the northern and southern shores of the Gibraltar Strait. These contacts were probably established after the last glacial maximum,

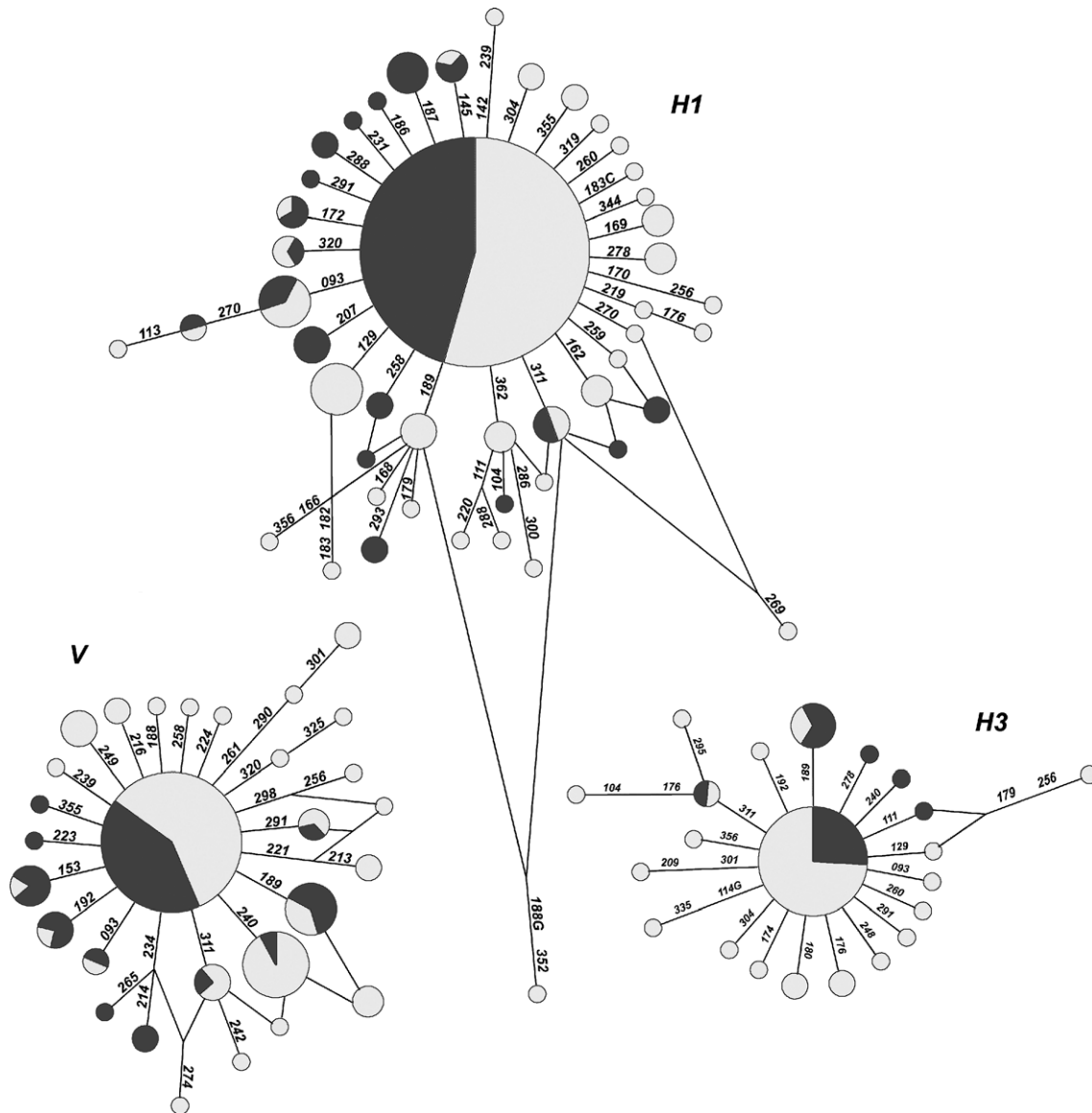


Fig. 1. Phylogenetic networks for mitochondrial haplogroups H1, H3 and V. Nucleotide positions between 16,090 and 16,365 are indicated (less 16,000). The circle area is proportional to the frequency of the haplotypes. White and black colors indicate Iberian Peninsula and North Africa haplotypes, respectively.

when a population expansion from the Iberian Peninsula also resettled Europe.

Acknowledgements

We would like to thank Santiago Morales for his help in the laboratory. This project was supported by grants from Instituto de Salud Carlos III-FIS (PI08-0264, PI07-0045, PI07/90512) and Diputación General de Aragón (Grupos Consolidados B33, PM-078/2006, PM-063/2007).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.mito.2009.07.003](https://doi.org/10.1016/j.mito.2009.07.003).

References

Abu-Amro, K.K., Gonzalez, A.M., Larruga, J.M., Bosley, T.M., Cabrera, V.M., 2007. Eurasian and African mitochondrial DNA influences in the Saudi Arabian population. *BMC Evol. Biol.* 7, 32.

- Achilli, A., Rengo, C., Magri, C., Battaglia, V., Olivieri, A., Scozzari, R., Cruciani, F., Zeviani, M., Briem, E., Carelli, V., Moral, P., Dugoujon, J.M., Roostalu, U., Loogvali, E.L., Kivisild, T., Bandelt, H.J., Richards, M., Villems, R., Santachiara-Benerecetti, A.S., Semino, O., Torroni, A., 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, 910–918.
- Achilli, A., Rengo, C., Battaglia, V., Pala, M., Olivieri, A., Fornarino, S., Magri, C., Scozzari, R., Babudri, N., Santachiara-Benerecetti, A.S., Bandelt, H.J., Semino, O., Torroni, A., 2005. Saami and Berbers – an unexpected mitochondrial DNA link. *Am. J. Hum. Genet.* 76, 883–886.
- Amar, S., Shamir, A., Ovadia, O., Blaranu, M., Reshef, A., Kremer, I., Rietschel, M., Schulze, T.G., Maier, W., Belmaker, R.H., Ebbstein, R.P., Agam, G., Mishmar, D., 2007. Mitochondrial DNA HV lineage increases the susceptibility to schizophrenia among Israeli Arabs. *Schizophr. Res.* 94, 354–358.
- Bosch, E., Calafell, F., Perez-Lezaun, A., Clarimon, J., Comas, D., Mateu, E., Martinez-Arias, R., Morera, B., Brakez, Z., Akhayat, O., Sefiani, A., Hariti, G., Cambon-Thomsen, A., Bertranpetit, J., 2000. Genetic structure of north-west Africa revealed by STR analysis. *Eur. J. Hum. Genet.* 8, 360–366.
- Brakez, Z., Bosch, E., Izaabel, H., Akhayat, O., Comas, D., Bertranpetit, J., Calafell, F., 2001. Human mitochondrial DNA sequence variation in the Moroccan population of the Souss area. *Ann. Hum. Biol.* 28, 295–307.
- Brandstatter, A., Salas, A., Niederstatter, H., Gassner, C., Carracedo, A., Parson, W., 2006. Dissection of mitochondrial superhaplogroup H using coding region SNPs. *Electrophoresis* 27, 2541–2550.
- Cann, R.L., Stoneking, M., Wilson, A.C., 1987. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 325, 31–36.

- Castro, M.G., Huerta, C., Reguero, J.R., Soto, M.I., Domenech, E., Alvarez, V., Gomez-Zaera, M., Nunes, V., Gonzalez, P., Corao, A., Coto, E., 2006. Mitochondrial DNA haplogroups in Spanish patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Int. J. Cardiol.* 112, 202–206.
- Cherkaoui, M., Baali, A., Larrouy, G., Sevin, A., Boetsch, G., 2005. Consanguinity, fertility of couples and mortality of children in the high Atlas population (commons of Anougal and Azgour, Marrakesh, Morocco). *Int. J. Anthropol.* 20, 199–206.
- Cherni, L., Loueslati, B.Y., Pereira, L., Ennafaa, H., Amorim, A., El Gaied, A.B., 2005. Female gene pools of Berber and Arab neighboring communities in central Tunisia: microstructure of mtDNA variation in North Africa. *Hum. Biol.* 77, 61–70.
- Cox, M.P., 2008. Accuracy of molecular dating with the rho statistic: deviations from coalescent expectations under a range of demographic models. *Hum. Biol.* 80, 335–357.
- Dahmany, Y., Marcuello, A., Montiel-Sosa, F.J., Montoya, J., Diez-Sanchez, C., Lopez-Perez, M.J., Ruiz-Pesini, E., 2006. Mitochondrial lineages distribution in the Spanish population: anticipating association studies. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 72, 37–47.
- Denaro, M., Blanc, H., Johnson, M.J., Chen, K.H., Wilmsen, E., Cavalli-Sforza, L.L., Wallace, D.C., 1981. Ethnic variation in Hpa I endonuclease cleavage patterns of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 5768–5772.
- Dubut, V., Chollet, L., Murail, P., Cartault, F., Beraud-Colomb, E., Serre, M., Mogentale-Proffiz, N., 2004. MtDNA polymorphisms in five French groups: importance of regional sampling. *Eur. J. Hum. Genet.* 12, 293–300.
- Ennafaa, H., Amor, M.B., Yacoubi-Loueslati, B., Khodjet el-khil, H., Gonzalez-Perez, E., Yacoubi-Loueslati, B., Moral, P., Maca-Meyer, N., Elgaied, A., 2006. Alu polymorphisms in Jerba Island population (Tunisia): comparative study in Arab and Berber groups. *Ann. Hum. Biol.* 33, 634–640.
- Falchi, A., Giovannoni, L., Calo, C.M., Piras, I.S., Moral, P., Paoli, G., Vona, G., Varesi, L., 2006. Genetic history of some western Mediterranean human isolates through mtDNA HVRI polymorphisms. *J. Hum. Genet.* 51, 9–14.
- Forster, P., 2004. Ice Ages and the mitochondrial DNA chronology of human dispersals: a review. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 359, 255–264 (discussion 264).
- Forster, P., Matsumura, S., 2005. Evolution. Did early humans go north or south? *Science* 308, 965–966.
- Forster, P., Romano, V., 2007. Timing of a back-migration into Africa. *Science* 316, 50–53.
- Forster, P., Harding, R., Torroni, A., Bandelt, H.J., 1996. Origin and evolution of Native American mtDNA variation: a reappraisal. *Am. J. Hum. Genet.* 59, 935–945.
- Gonzalez, A.M., Brehm, A., Perez, J.A., Maca-Meyer, N., Flores, C., Cabrera, V.M., 2003. Mitochondrial DNA affinities at the Atlantic fringe of Europe. *Am. J. Phys. Anthropol.* 120, 391–404.
- Huerta, C., Castro, M.G., Coto, E., Blazquez, M., Ribacoba, R., Guisasaola, L.M., Salvador, C., Martinez, C., Lahoz, C.H., Alvarez, V., 2005. Mitochondrial DNA polymorphisms and risk of Parkinson's disease in Spanish population. *J. Neurol. Sci.* 236, 49–54.
- Kefi, R., Stevanovitch, A., Bouzaid, E., Beraud-Colomb, E., 2005. Diversité mitochondriale de la population de taforal (12.000 ans bp – maroc): une approche genetique a l'etude du peuplement de l'afrique du Nord. *Anthropologie* 43, 1–11.
- Krings, M., Salem, A.E., Bauer, K., Geisert, H., Malek, A.K., Chai, L., Simon, C., Welsby, D., Di Rienzo, A., Utermann, G., Sajantila, A., Paabo, S., Stoneking, M., 1999. MtDNA analysis of Nile River Valley populations: A genetic corridor or a barrier to migration? *Am. J. Hum. Genet.* 64, 1166–1176.
- Larruga, J.M., Diez, F., Pinto, F.M., Flores, C., Gonzalez, A.M., 2001. Mitochondrial DNA characterisation of European isolates: the Maragatos from Spain. *Eur. J. Hum. Genet.* 9, 708–716.
- Loogvali, E.L., Roostalu, U., Malyarchuk, B.A., Derenko, M.V., Kivisild, T., Metspalu, E., Tambets, K., Reidla, M., Tolk, H.V., Parik, J., Pennarun, E., Laos, S., Lunkina, A., Golubenko, M., Barac, L., Pericic, M., Balanovsky, O.P., Gusar, V., Khusnutdinova, E.K., Stepanov, V., Puzyrev, V., Rudan, P., Balanovska, E.V., Grechanina, E., Richard, C., Moisan, J.P., Chaventre, A., Anagnou, N.P., Pappa, K.I., Michalodimitrakis, E.N., Claustres, M., Golge, M., Mikerezi, I., Usanga, E., Villems, R., 2004. Disuniting uniformity: a pied cladistic canvas of mtDNA haplogroup H in Eurasia. *Mol. Biol. Evol.* 21, 2012–2021.
- Loueslati, B.Y., Cherni, L., Khodjet-Elkhil, H., Ennafaa, H., Pereira, L., Amorim, A., Ben Ayed, F., Ben Ammar Elgaied, A., 2006. Islands inside an island: reproductive isolates on Jerba island. *Am. J. Hum. Biol.* 18, 149–153.
- Maca-Meyer, N., Sanchez-Velasco, P., Flores, C., Larruga, J.M., Gonzalez, A.M., Oterino, A., Leyva-Cobian, F., 2003. Y chromosome and mitochondrial DNA characterization of Pasiegos, a human isolate from Cantabria (Spain). *Ann. Hum. Genet.* 67, 329–339.
- Macaulay, V., Richards, M., Hickey, E., Vega, E., Cruciani, F., Guida, V., Scozzari, R., Bonne-Tamir, B., Sykes, B., Torroni, A., 1999. The emerging tree of West Eurasian mtDNAs: a synthesis of control-region sequences and RFLPs. *Am. J. Hum. Genet.* 64, 232–249.
- Macaulay, V., Hill, C., Achilli, A., Rengo, C., Clarke, D., Meehan, W., Blackburn, J., Semino, O., Scozzari, R., Cruciani, F., Taha, A., Shaari, N.K., Raja, J.M., Ismail, P., Zainuddin, Z., Goodwin, W., Bulbeck, D., Bandelt, H.J., Oppenheimer, S., Torroni, A., Richards, M., 2005. Single, rapid coastal settlement of Asia revealed by analysis of complete mitochondrial genomes. *Science* 308, 1034–1036.
- Mishmar, D., Ruiz-Pesini, E., Golik, P., Macaulay, V., Clark, A.G., Hosseini, S., Brandon, M., Easley, K., Chen, E., Brown, M.D., Sukernik, R.I., Olckers, A., Wallace, D.C., 2003. Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 171–176.
- Olivieri, A., Achilli, A., Pala, M., Battaglia, V., Fornarino, S., Al-Zahery, N., Scozzari, R., Cruciani, F., Behar, D.M., Dugoujon, J.M., Coudray, C., Santachiara-Benerecetti, A.S., Semino, O., Bandelt, H.J., Torroni, A., 2006. The mtDNA legacy of the Levantine early Upper Palaeolithic in Africa. *Science* 314, 1767–1770.
- Pereira, L., Richards, M., Goios, A., Alonso, A., Albarran, C., Garcia, O., Behar, D.M., Golge, M., Hatina, J., Al-Gazali, L., Bradley, D.G., Macaulay, V., Amorim, A., 2005. High-resolution mtDNA evidence for the late-glacial resettlement of Europe from an Iberian refugium. *Genome Res.* 15, 19–24.
- Picornell, A., Gomez-Barbeito, L., Tomas, C., Castro, J.A., Ramon, M.M., 2005. Mitochondrial DNA HVRI variation in Balearic populations. *Am. J. Phys. Anthropol.* 128, 119–130.
- Pinto, F., Gonzalez, A.M., Hernandez, M., Larruga, J.M., Cabrera, V.M., 1996. Genetic relationship between the Canary Islanders and their African and Spanish ancestors inferred from mitochondrial DNA sequences. *Ann. Hum. Genet.* 60, 321–330.
- Plaza, S., Calafell, F., Helal, A., Bouzerna, N., Lefranc, G., Bertranpetit, J., Comas, D., 2003. Joining the pillars of Hercules: mtDNA sequences show multidirectional gene flow in the western Mediterranean. *Ann. Hum. Genet.* 67, 312–328.
- Quintana-Murci, L., Semino, O., Bandelt, H.J., Passarino, G., McElreavey, K., Santachiara-Benerecetti, A.S., 1999. Genetic evidence of an early exit of Homo sapiens sapiens from Africa through eastern Africa. *Nat. Genet.* 23, 437–441.
- Rando, J.C., Pinto, F., Gonzalez, A.M., Hernandez, M., Larruga, J.M., Cabrera, V.M., Bandelt, H.J., 1998. Mitochondrial DNA analysis of northwest African populations reveals genetic exchanges with European, near-eastern, and sub-Saharan populations. *Ann. Hum. Genet.* 62, 531–550.
- Richard, C., Pennarun, E., Kivisild, T., Tambets, K., Tolk, H.V., Metspalu, E., Reidla, M., Chevalier, S., Giraudet, S., Lauc, L.B., Pericic, M., Rudan, P., Claustres, M., Journel, H., Dorval, I., Muller, C., Villems, R., Chaventre, A., Moisan, J.P., 2007. An mtDNA perspective of French genetic variation. *Ann. Hum. Biol.* 34, 68–79.
- Richards, M., Macaulay, V., Hickey, E., Vega, E., Sykes, B., Guida, V., Rengo, C., Sellitto, D., Cruciani, F., Kivisild, T., Villems, R., Thomas, M., Rychkov, S., Rychkov, O., Rychkov, Y., Golge, M., Dimitrov, D., Hill, E., Bradley, D., Romano, V., Cali, F., Vona, G., Demaine, A., Papiha, S., Triantaphyllidis, C., Stefanescu, G., Hatina, J., Belledi, M., Di Rienzo, A., Novelletto, A., Oppenheim, A., Norby, S., Al-Zaheri, N., Santachiara-Benerecetti, S., Scozzari, R., Torroni, A., Bandelt, H.J., 2000. Tracing European founder lineages in the Near Eastern mtDNA pool. *Am. J. Hum. Genet.* 67, 1251–1276.
- Roostalu, U., Kutuv, I., Loogvali, E.L., Metspalu, E., Tambets, K., Reidla, M., Khusnutdinova, E.K., Usanga, E., Kivisild, T., Villems, R., 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, 436–448.
- Rosa, A., Brehm, A., Kivisild, T., Metspalu, E., Villems, R., 2004. MtDNA profile of West Africa Guineans: towards a better understanding of the Senegambia region. *Ann. Hum. Genet.* 68, 340–352.
- Ruiz-Pesini, E., Lott, M.T., Procaccio, V., Poole, J.C., Brandon, M.C., Mishmar, D., Yi, C., Kreuziger, J., Baldi, P., Wallace, D.C., 2007. An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny. *Nucleic Acids Res.* 35, D823–D828.
- Strauss, L.G., 2001. Africa and Iberia in the Pleistocene. *Quatern. Int.* 25, 91–102.
- Thangaraj, K., Chaubey, G., Kivisild, T., Reddy, A.G., Singh, V.K., Rasalkar, A.A., Singh, L., 2005. Reconstructing the origin of Andaman Islanders. *Science* 308, 996.
- Torroni, A., Bandelt, H.J., D'Urbano, L., Lahermo, P., Moral, P., Sellitto, D., Rengo, C., Forster, P., Savontaus, M.L., Bonne-Tamir, B., Scozzari, R., 1998. MtDNA analysis reveals a major late Paleolithic population expansion from southwestern to northeastern Europe. *Am. J. Hum. Genet.* 62, 1137–1152.
- Torroni, A., Cruciani, F., Rengo, C., Sellitto, D., Lopez-Bigas, N., Rabionet, R., Govea, N., Lopez De Munain, A., Sardu, M., Romero, L., Villamar, M., del Castillo, I., Moreno, F., Estivill, X., Scozzari, R., 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.
- Torroni, A., Bandelt, H.J., Macaulay, V., Richards, M., Cruciani, F., Rengo, C., Martinez-Cabrera, V., Villems, R., Kivisild, T., Metspalu, E., Parik, J., Tolk, H.V., Tambets, K., Forster, P., Karger, B., Francalacci, P., Rudan, P., Jancijevic, B., Rickards, O., Savontaus, M.L., Huoponen, K., Laitinen, V., Koivumaki, S., Sykes, B., Hickey, E., Novelletto, A., Moral, P., Sellitto, D., Coppa, A., Al-Zaheri, N., Santachiara-Benerecetti, A.S., Semino, O., Scozzari, R., 2001. A signal, from human mtDNA, of postglacial recolonization in Europe. *Am. J. Hum. Genet.* 69, 844–852.
- 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.

Association of mitochondrial haplogroup J and mtDNA oxidative damage in two different North Spain elderly populations

Elena Domínguez-Garrido · Diana Martínez-Redondo · Carmen Martín-Ruiz ·
Aurora Gómez-Durán · Eduardo Ruiz-Pesini · Pilar Madero · Manuel Tamparillas ·
Julio Montoya · Thomas von Zglinicki · Carmen Díez-Sánchez ·
Manuel J. López-Pérez

Received: 22 July 2008 / Accepted: 30 September 2008 / Published online: 18 October 2008
© Springer Science+Business Media B.V. 2008

Abstract This work investigates the association between longevity, mitochondrial DNA (mtDNA) variants and oxidative DNA damage in an older than 85 years population. The participants, similar in genetic and cultural background as well as gender distribution, come from villages near to the Pyrenees Mountains (900–1,400 m altitude) ($n = 69$) and the

Ebro's Valley (200–300 m altitude) ($n = 69$) in Spain. Our results show an accumulation of the haplogroup J in elderly individuals with an over-representation of J2 in Pyrenees group but not in the Ebro's Valley, the former associating with a diminished DNA damage. In conclusion, our results suggest that J mitochondrial variant, that induce lower mtDNA damage, could present a phenotypic survival advantage to environmental conditions and, thus, accumulate in elderly population.

E. Domínguez-Garrido · D. Martínez-Redondo ·
A. Gómez-Durán · E. Ruiz-Pesini · J. Montoya ·
C. Díez-Sánchez (✉) · M. J. López-Pérez
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y
Celular, Universidad de Zaragoza, Miguel Servet 177,
Zaragoza 50013, Spain
e-mail: cardisan@unizar.es

D. Martínez-Redondo · A. Gómez-Durán ·
E. Ruiz-Pesini · J. Montoya · C. Díez-Sánchez ·
M. J. López-Pérez
Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBER)
for Rare Diseases, Instituto de Salud Carlos III,
Miguel Servet 177, Zaragoza 50013, Spain

C. Martín-Ruiz · T. von Zglinicki
Henry Wellcome Lab. for Biogerontology Research,
School of Clinical Medical Sciences—Gerontology,
Newcastle General Hospital, Newcastle University,
Newcastle upon Tyne NE4 6BE, UK

E. Ruiz-Pesini
Fundación Agencia Aragonesa para la Investigación y el
Desarrollo (ARAID), Zaragoza, Spain

P. Madero · M. Tamparillas
Centro de Análisis Genéticos, Santa Teresa de Jesús 45,
Zaragoza 50006, Spain

Keywords Ageing · Longevity · mtDNA damage ·
ROS · Mitochondrial haplogroups

Introduction

Different evidences recently reported suggest that major mechanisms underlying longevity are linked to oxidative stress-related DNA damage (von Zglinicki et al. 2001). In addition to several nuclear factors, one of the most relevant features involved in the ageing processes is the loss of mitochondrial function. Mitochondria are involved in ATP production, through the oxidative phosphorylation system (OXPHOS), reactive oxygen species (ROS) generation, many metabolic processes and apoptosis. Since mtDNA lacks histone protein protection, it is more exposed to ROS effects and, thus, could suffer more mutagenic events than nuclear DNA. The

accumulation of somatic mutations in mtDNA throughout life span has been proposed as the most important factor in the age-related mitochondrial decline (Wallace 1999; Chinnery et al. 2002; Wallace et al. 2003).

The protein constituents of OXPHOS are encoded by two distinct genomes, the nuclear and the mitochondrial genomes. The mtDNA presents continent-specific polymorphisms that determine mtDNA haplogroups characteristic of the different geographic regions (Torroni et al. 1996; Macaulay et al. 1999; Finnila et al. 2001). Each haplogroup is defined as an individual group characterized by the presence of a particular set of polymorphisms, defined by the use of data from HVR-I (Richards et al. 1998), RFLPs (Torroni et al. 1996) of the coding region (Macaulay et al. 1999) and from HVR-II analysis (Helgason et al. 2000).

Results obtained during the last years suggest that non-pathological mtDNA variability is potentially responsible for mild differences in OXPHOS activity that may have phenotypic expression in the form of neurodegenerative diseases (van der Walt et al. 2003), penetrance of some diseases (Brown et al. 1997), spermatozoa motility in humans (Ruiz-Pesini et al. 2000; Montiel-Sosa et al. 2006) and longevity in different populations (Ivanova and Lepage 1998; De Benedictis et al. 1999; Rose et al. 2001; Ross et al. 2001; Niemi et al. 2003; Santoro et al. 2006), but not in Southern Italy (Dato et al. 2004) that point out towards a specific population effect of the mtDNA variant accumulation in longevity.

With the purpose of studying the association between longevity, mtDNA variants and oxidative damage we selected two gender-matched populations with similar genetic and cultural background but different geographical origin: one from the Pyrenees Mountains (900–1,400 m altitude) and the other from the Ebro's Valley (200–300 m altitude). As control population of mtDNA variants distribution, we used the same figure of healthy blood donors, randomly selected. Our results showed the over-representation of haplogroup J in elderly population, especially J2 subhaplogroup in Pyrenees Mountains that, besides, showed the lowest mtDNA damage. In summary, the results here reported suggest that different mtDNA variants could present an advantage to environmental conditions and accumulate in elderly population.

Material and methods

Subjects

We selected our individuals ($n = 138$), along spring and summer of the same year, in four care homes of elderly people. All subjects over 85 years old, non-demented, non-related, healthy (non-smokers, non-alcoholic consumers, no high blood pressure) took part in the study: 69 of them living in villages (that by no means are isolated) near to Pyrenees Mountains (900–1,400 m altitude) and 69 from villages of Ebro's Valley (200–300 m altitude) (Table 1). Blood samples were obtained for all of them. We considered as control population for haplogroup distribution, a total of 138 healthy (non-smokers, non-alcoholic or drug consumers, no high blood pressure) blood donors (male, $n = 76$; female, $n = 62$) of a younger age group (20–40 years) coming from the "Hospital 12 de Octubre" of Madrid (Spain). They were randomly recruited among blood donors of spring and summer of the same year as the older individuals. Beforehand, we checked that the haplogroup distribution of this control population did not show significant difference with the Spanish haplogroup distribution that we published previously (Ruiz-Pesini et al. 2000).

To take part in the study, subjects and/or their families were fully informed of the aims of the research before signing the informed consent form. The study conforms to the code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) and was approved by the Ethics Committee of the University of Zaragoza (approval number PI04/01).

DNA extraction

Total DNA was extracted from elderly and control participants blood samples by conventional methods (Sambrook et al. 1989) with some modifications. Peripheral blood (3–5 ml in EDTA) was diluted with four volumes of TE buffer (20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA pH 8). After gently mixing, tubes were kept on ice for 15 min and centrifuged at $600\times g$, 4°C, 15 min. The pellet was washed with 20 ml TE buffer and a further 15 min spin at $600\times g$, 4°C. The final pellet was then resuspended in 1.5 ml of 0.4% SDS, 200 µg/ml Proteinase K in TE buffer and incubated at 37°C over night. The suspension was treated twice

Table 1 Distribution of gender and age in two Spanish elderly populations coming from villages near to the Pyrenees Mountains and from the Ebro's Valley

Age	Pyrenees (<i>n</i> = 69)		Ebro's Valley (<i>n</i> = 69)	
	Male (<i>n</i> = 21)	Female (<i>n</i> = 48)	Male (<i>n</i> = 17)	Female (<i>n</i> = 52)
85–90 years	13	34	12	30
Older than 90 years	8	14	5	22

with 1.5 volumes of phenol:isoamyl alcohol:chloroform (25:25:1), vortex for 5 min and centrifuged at 200×*g*, 5 min at room temperature. Afterwards, 1.5 volume of chloroform:isoamyl alcohol (24:1) was added to the aqueous phase and centrifuged another 5 min at 200×*g*. The aqueous phase was recovered and 2 volumes of cold 99% ethanol were added for the precipitation of total DNA at −20°C overnight. Total DNA clew was recovered, air-dried to eliminate ethanol and finally resuspended in sterile water.

Haplogrouping strategy

The samples were haplogrouped by PCR amplification of short mtDNA fragments, followed by restriction enzyme analysis (RFLP) and confirmed by HVR-I and HVR-II sequencing (Macaulay et al. 1999). We used the haplogrouping strategy as previously described (Macaulay et al. 1999) with some modifications (Ruiz-Pesini et al. 2000) (Table 2). Phylogenetic relationship among the main mitochondrial lineages could be observed elsewhere (Kivisild et al. 2006). By means of three attempts, we achieved a 100% of genotyping success in all groups that discards any source of misclassification bias.

MtDNA content and damage estimation

The relative mtDNA content (mtDNA/nDNA) was assessed as the ratio of the amplifications of mtDNA fragment (12S RNA) respect to a single copy nuclear gene (RNase P) by real-time PCR, using an ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA). The fragment of mtDNA assayed was a 123 bp (807–929) of 12S RNA. The primers for the 12S sequences, MT-L (5'-CCACGGGAAACAGCAGTGATT-3') and MT-H (5'-CTATTGACTTGGGTTAATCGTGTGA-3') were used together with the mtDNA specific MGB (minor groove binding) probe (5'-TGCCAGCCACCGCG-3'), which

Table 2 RFLP's used in the haplogroup determination of control and elderly populations

Polymorphism	Haplogroup	Restriction enzyme	RFLP
C1715T	X	<i>DdeI</i>	–
G3010A	H1, J1	<i>BccI</i>	–
C3594T	L (no L3)	<i>HpaI</i>	+
T4216C	JT	<i>AflIII</i>	+
A4529T	I	<i>HaeII</i>	–
G4580A	V	<i>NlaIII</i>	–
A4917G	T	<i>MaeI</i>	+
C7028T	H	<i>AluI</i>	–
G8994A	W	<i>HaeIII</i>	–
G9055A	Uk	<i>HhaI</i>	–
A10398G	Uk1	<i>DdeI</i>	+
C10400T	M	<i>AluI</i>	+
T10873C	N	<i>MnlII</i>	+
A12308G	U	<i>HinfI</i>	+
G13708A	J	<i>MvaI</i>	–
T14470C	X	<i>AccI</i>	+
C14766T	HV	<i>MseI</i>	–
T14798C	Uk, J1c	<i>DdeI</i>	+
G15257A	J2, Uk1b1a	<i>AccI</i>	–
G15812A	J2b	<i>RsaI</i>	–

was internally labeled by the fluorescent dye FAM. Probe and primers designs were performed with Primer Express 2.0 software (Applied Biosystems, Foster City, CA). To quantify nuclear DNA (nDNA), a commercial kit was used (PDA Rs RNase P; Applied Biosystems, Foster City, CA), in which the DNA-specific fluorescent probe was internally labeled with VIC as fluorescent dye. Real-time PCR amplification was carried out in a 20 µl final volume containing 10–15 ng total DNA, 10 µl Platinum Quantitative PCR (QPCR) SuperMix-UDG containing ROX as reference dye (Invitrogen, Carlsbad, CA), 110 nM of each mtDNA primer, 125 nM MGB probe and 1 µl PDA Rs RNase P kit. The thermal cycling conditions

were 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, 40 cycles of 95°C for 15 s, and 60°C for 1 min. Tenfold serial dilutions of standard were included in each experiment to generate a standard curve. At least two “no-template controls” were included in each experiment.

The mtDNA damage was also estimated using real-time PCR, a more sensitive technique that has been proved to detect different types of damage in nucleotides of a DNA sequence (Sikorsky et al. 2004). To do so, and considering the characteristics of this technique, we calculated the rate of an 80 bp (260–339 position) to a 162 bp (260–421 position) fragment amplification of the same sample. For performing real-time PCR reactions of both fragments we used Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG with ROX as reference dye (Invitrogen, Carlsbad, CA) in an ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Primers used were: HVII-FOR260 (5'-GC CACTTTCACACAGACATCATA-3'), HVII-L421 (5'-AGTGCATACCGCCAAAAGATAAA-3') and HVII-C339 (5'-TGTTTAAGTGCTGTGGCCAGA-3'). The amplification reaction of both fragments was performed in a total volume of 20 µl with 10 ng of total DNA, 10 µl SYBR Green Mix and 0.1 µM of each primer. The PCR conditions were 2 min at 50°C, 95°C for 10 min, 40 cycles at 95°C for 15 s, 60°C for 1 min for the long fragment and 30 s for the short fragment. As absolute standard curve it was used an 870 bp amplified product of the mtDNA region (16,346–645) with 15× rat DNA in order to simulate the complexity of the extracted DNA samples. The amplification of this 870 bp fragment was carried out in a total volume of 50 µl with 50 ng of commercial DNA (Applied Biosystems, Foster City, CA), 0.5 µM each primer (hmtL16365: 5'-GTC AAATCCCTTCTCGTCCC-3' and hmtH626: 5'-TTT ATGGGGTGATGTGAGCC-3'), 10 mM dNTPs, 1 mM of MgCl₂, 1 µl of *Taq* polymerase (1 U/µl) (Biotools, Madrid, Spain) and 5 µl polymerase buffer. The PCR conditions were 95°C for 5 min and 35 cycles at 95°C for 45 s, 64°C for 30 s, 72°C for 1 min followed by a final extension of 72°C for 5 min. Tenfold serial dilutions (1, 1/10, 1/100 and 1/1,000) of the standard fragment with rat DNA were included in each experiment to generate the absolute standard curve.

We considered valid real-time PCR experiments only when the standard curve of Cts measured had a

slope between –3.0 and –4.0 with a regression coefficient about 0.99 and the standard deviation of triplicates was < 0.30, according with technical recommendations (User Bulletins of ABI PRISM 7700 Sequence detection system).

Statistical analysis

The distribution of mitochondrial variants between populations was assessed by the χ^2 -independence test from contingency tables and post hoc analysis. Comparison of the mean level of MtDNA/nDNA ratio and mtDNA oxidative damage in control and elderly populations and among mitochondrial haplogroups were assessed using a one-way analysis of variance (ANOVA) test and Fisher exact test depending on analyses. Results were expressed as mean \pm standard deviation (*SD*). Significant differences were assumed when $P \leq 0.05$. Statistical analysis was carried out with the statistical package Stat View 5.0 for Macintosh (SAS Institute, Inc.).

Results

MtDNA variants

In order to investigate the potential genetic association between mtDNA variants and longevity, we estimated the frequency of each haplogroup in control and elderly populations (Table 3). Since the expected frequencies for several haplogroups were smaller than five, we have grouped the low represented ones (I, W, X,) as O. In this way, the minimum expected frequency to assure the accuracy in the χ^2 -independence test is reached. When we performed the χ^2 -independence test ($\chi^2 = 6.3$) from contingency tables and post hoc analysis in haplogroups of both populations, it could be appreciated that J (contribution to $\chi^2 = 2.23$) was the main responsible for χ^2 ($P = 0.027$). Furthermore, Fisher's exact test also suggests a significant deviation from the expected frequencies for J (J versus non J: $\chi^2 = 5.3$; J contribution to $\chi^2 = 2.23$; $P = 0.03$; $df = 1$) and U (U versus non U: $\chi^2 = 4.8$; U contribution to $\chi^2 = 1.96$; $P = 0.04$; $df = 1$) mtDNA haplogroups.

Although haplogroup U was significant under-represented in the elderly population, considering that this haplogroup is a wide and heterogeneous group

Table 3 Haplogroup frequencies observed for both control and elderly populations

Haplogroup	Elderly (<i>n</i> = 138)						<i>P</i>
	Pyrenees Mountains		Ebro's Valley		Control (<i>n</i> = 138)		
	Male (<i>n</i> = 21)	Female (<i>n</i> = 48)	Male (<i>n</i> = 17)	Female (<i>n</i> = 52)	Male (<i>n</i> = 76)	Female (<i>n</i> = 62)	
H	9 (42.8%)	21 (43.7%)	12 (70.5%)	29 (55.7%)	31 (40.8%)	30 (48.4%)	0.027
V	0 (0%)	2 (4.2%)	1 (5.9%)	3 (5.8%)	6 (7.9%)	2 (3.2%)	
J	6 (28.6%)	12 (25%)	2 (11.8%)	9 (17.3%)	10 (13.1%)	5 (8%)	
T	1 (4.8%)	3 (8.3%)	1 (5.9%)	3 (5.8%)	4 (5.3%)	4 (6.5%)	
U	5 (23.8%)	5 (10.4%)	1 (5.9%)	7 (13.5%)	18 (23.7%)	14 (22.6%)	
O	0 (0%)	5 (10.4%)	0 (0%)	1 (1.9%)	7 (9.2%)	7 (11.3%)	

Test χ^2 between total control and total elderly population = 6.31 (J elderly contribution to $\chi^2 = 2.227$; $P = 0.027$)

and the small number of samples of this study, we consider that further works must confirm this trend. We have previously shown that sublineages of this haplogroup may have contradictory phenotypes. For instance, some U sublineages associate with low sperm motility and vitality whereas others are linked to high ones (Montiel-Sosa et al. 2006). Due to the small number of individuals carrying this haplogroup in the elderly population tested, no conclusions to this respect could be made (data not shown).

Further characterization of mtDNA from haplogroup J-harboring elderly people showed the existence of two major subgroups, J2 and non-J2 with the latter harboring J1c and J1* variants. Accumulation of haplogroup J showed no significant difference between the Pyrenees Mountains and Ebro's Valley populations. However, accumulation of J2 resulted significantly higher in the Pyrenees (Table 4).

Table 4 Frequencies of J mitochondrial haplogroup and subhaplogroups

	Pyrenees		Ebro's Valley		<i>P</i>
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
J	18	26.1	11	15.9	0.1
Non J	51	73.9	58	84.1	
J2	11	61.1	1	10	0.006*
Non J2	7	38.9	10	90	

Significant statistical difference was found between distribution of J2 individuals in Pyrenees Mountains and Ebro's Valley (χ^2 -independence test)

* J2 versus non J2 test $\chi^2 = 7.6$ (J2 Ebro's Valley contribution to $\chi^2 = 2.8$; $P = 0.006$; $df = 1$)

Assessment of mtDNA damage

Different authors have developed some quantitative polymerase chain reaction (QPCR) methods to assess DNA damage based on the fact that this damage reduces, but no blocks, template amplification (Salazar and Van Houten 1997; Sawyer and Van Houten 1999; Ayala-Torres et al. 2000; Sikorsky et al. 2004). Based in these techniques and taking into account that the most real-time PCR protocols propose a short target of DNA (about 150 bp) to assure high amplification efficiency and reliable quantification, we developed a technique for the measurement of mtDNA damage calculating the ratio of 80 bp (260–339 position) to 162 bp (260–421 position) fragment amplification of the same sample.

As DNA amplification is affected by the presence of oxidative-damaged nucleotides (Van Houten et al. 2000; Sikorsky et al. 2004) in a discrete mtDNA sequence, the number of defective amplification events is positively correlated to the size of the fragment to amplify. Therefore, the ratio between estimated copies of an amplified short fragment within this discrete mtDNA sequence and those of a longer one in the same region will be higher as the levels of damage increase. In this way, the efficiency of amplification of the short respect to long fragment will be an index of the mtDNA damage.

Furthermore, to assess the relative mtDNA genomic dose we have used the ratio of an mtDNA fragment (12S RNA) amplification respect to a nuclear DNA (RNase P) one. Our results, a decrease in mtDNA genomic dose (mtDNA/nDNA ratio) associated with ageing (Fig. 1a), confirmed a

previous report (Liu et al. 2003) showing that, in human leukocytes, mtDNA copy number reaches a maximum between the ages of 50 and 60 years and then is followed by a progressive decrease. In parallel, we also found that mtDNA damage increases with ageing (Fig. 1b) and, interestingly, that mtDNA damage was higher in Ebro's Valley individuals than in Pyrenees ones (Fig. 1b).

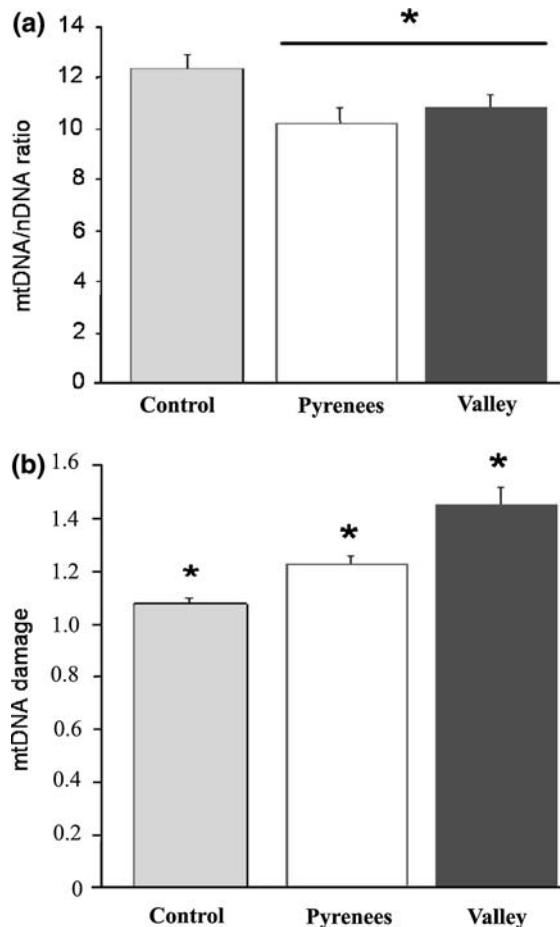


Fig. 1 MtDNA/nDNA ratio and mtDNA oxidative damage in control and elderly (Pyrenees Mountains and Ebro's Valley) populations. (a) MtDNA/nDNA ratio between control and elderly populations, *t*-test, $P = 0.04$; control versus Pyrenees Mountains, $P > 0.05$ and control versus Ebro's Valley, $P > 0.05$. (b) MtDNA oxidative damage between control, Pyrenees Mountains and Ebro's Valley elderly populations. Control versus Pyrenees Mountain Fisher test, $P = 0.02$; control versus Ebro's Valley, $P < 0.0001$; Pyrenees Mountain versus Ebro's Valley, $P = 0.001$; control versus elderly, $P = 0.0009$. Values in Y-axis represent mtDNA damage as described in M&M. Bars represent mean \pm SD

Correlation of mtDNA variants and mtDNA damage

An initial Fisher exact test across the different mtDNA variants in Pyrenees group showed that the mtDNA damage presents with significant differences among sublineages (Fig. 2). Interestingly J2 displayed lower levels of damage than H ($P = 0.02$), V ($P = 0.03$), both phylogenetically linked, and T haplogroup ($P = 0.02$) as well as respect to the rest of J subvariants ($P = 0.003$) and the rest of haplogroups ($P = 0.01$). To further deep, we performed a paired analysis between individuals of same gender, age and location, using the most frequent haplogroup H as reference. Only H versus J2 showed significant difference in mtDNA damage ($n = 12$; $P = 0.04$) (data not shown).

Discussion

From the work we present here some interesting results and conclusions arise: (1) J mitochondrial variant is over-represented in the elderly population and, in particular, J2 mitochondrial subvariant accumulates in the Pyrenees group but not in Ebro's Valley one; (2) we confirmed that mtDNA damage is higher in elderly people, as previously it has been reported; (3) J2 shows a diminished mtDNA damage

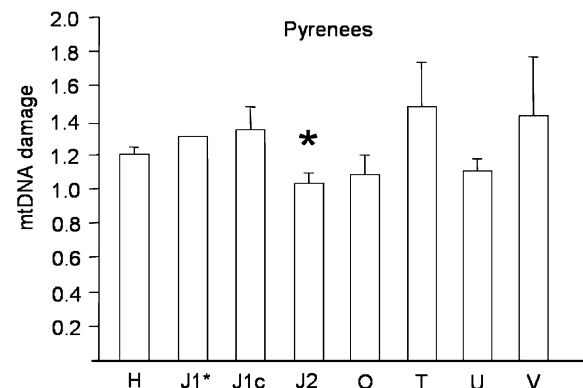


Fig. 2 Fisher test analysis of mtDNA oxidative damage among different haplogroups in elderly population from Pyrenees Mountains. H $n = 30$; J $n = 18$ (J1* $n = 1$; J1c $n = 6$; J2 $n = 11$); O $n = 5$; T $n = 4$; U $n = 10$; V $n = 2$. * MtDNA oxidative damage Fisher's test: J2 versus H, $P = 0.04$; J2 versus T, $P = 0.02$; J2 versus V, $P = 0.04$; J2 versus rest of J subvariants ($P = 0.003$) and J2 versus rest of haplogroups ($P = 0.01$). Bars represent mean \pm SD

compared to the rest of mitochondrial variants in Pyrenees Mountains and (4) mtDNA damage is lower in the Pyrenees group than in Valley one.

Our results in two Spanish populations confirm those previously found in other European populations that reported an accumulation of haplogroup J in elderly people (De Benedictis et al. 1999). Although this effect appears to be population specific and we have also found differences in the two elderly groups studied, it can be concluded that this accumulation appears to be general in European populations although affected by some other environmental factors that will explain the geographical specificity of this genetic effect. A decrease in haplogroup U was also observed, although the heterogeneity of this haplogroup (Montiel et al. 2006) and the low number of elderly samples available does not allow us to infer further conclusions.

According to our results and others (Niemi et al. 2003) haplogroup J2 appears to be the major contributor to the over-representation of haplogroup J with longevity in Pyrenees. Sublineage J2 is defined by the mutation G15257A that is also presents in Uk1b1a. However, after characterizing all Uk individuals ($n = 8$), we have not found any samples with this polymorphism.

Mutation G15257A produces a change D171N in cytochrome *b*. An analysis of 1,307 sequences of cytochrome *b* from different species (published in MITOMAP (www.mitomap.org) until 2008) (Table 5) showed that in 82.3% of them D171 was conserved, indicating the relevance of this position in the cytochrome function. D171 is located close to the cytochrome *b* arm that transfers electrons to cytochrome *c*1. It has been proposed (Ruiz-Pesini et al. 2004; Montiel-Sosa et al. 2006) that the cytochrome *b* mutations defining human haplogroups could account for less coupled phenotypes, leading to lower levels of ATP production and, thus, also lower levels of oxidative damage, one of which consequences could be that J2 harboring individuals reach longevity.

The effect of mtDNA damage on ageing has been repeatedly reported since somatic mutations in mtDNA accumulate throughout life span (Wallace 1999; Chinnery et al. 2002; Wallace et al. 2003). From that point of view, our results confirm these reports in two different ways: (a) the control population, 20–40 years old, presents lesser mtDNA damage than the elderly one, as it was expected,

Table 5 Analysis of 1,307 sequences in position 171 of cytochrome *b* from all species published in MITOMAP web (www.mitomap.org) until 2008

Species	<i>n</i>	Position 171		
		Asp (D)	Asn (N)	Others
Mammal	247	240	3	4
Bird	85	85	0	0
Reptile	69	52	16	1
Amphibian	78	78	0	0
Fish	437	432	1	4
Non vertebrate	391	187	32	172
Total	1,307	1,074 (82.3%)	52 (3.9%)	181 (13.8%)

and (b) J2 mitochondrial variant, proposed as the least ROS producing, is over-represented in the elderly population, in particular in Pyrenees one.

Interestingly, ANOVA and *t*-paired analysis of mtDNA damage and mtDNA variants showed that J2, the sublineage that preferentially accumulates in Pyrenees, is associated with lesser oxidative damage than the haplogroup H. This result is in concurrence with a previous hypothesis suggesting differences in coupling efficiencies and ROS productions for different mitochondrial genetic backgrounds (Ruiz-Pesini et al. 2004). Therefore, J2 accrual would be more favored in conditions of less oxidative damage, as it is the case in higher altitudes.

Furthermore, our observations suggest that more geographical altitude (Pyrenees Mountains >900 m), with a consequently lower partial oxygen pressure, could determine lesser ROS production and favor reduced levels of mtDNA damage. According with this idea, J2 subjects from Pyrenees group would take two adaptive advantages: a mitochondrial genetic background and an environment that, inferring lesser ROS production, could favor diminished mtDNA damage and, thus, longevity.

In conclusion, the results presented here show that differences in mtDNA damage could underlie the over-representation of J, in particular J2, in elderly population when, under specific environmental conditions, confers a phenotypic advantage for survival. Thus, although the small number of subjects could require further confirmation, we think that our results open an interesting question about mitochondrial genetic background and environment influence on longevity.

Acknowledgments This study was supported by grants from the Aragón General Government (Grupos Consolidados Group B33), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (FIS-PI07-0045 and PI050647), CIBER for Rare Diseases is an initiative of ISCIII.

References

- Ayala-Torres S, Chen Y et al (2000) Analysis of gene-specific DNA damage and repair using quantitative polymerase chain reaction. *Methods* 22(2):135–147. doi:[10.1006/meth.2000.1054](https://doi.org/10.1006/meth.2000.1054)
- Brown MD, Sun F et al (1997) Clustering of Caucasian Leber hereditary optic neuropathy patients containing the 11778 or 14484 mutations on an mtDNA lineage. *Am J Hum Genet* 60(2):381–387
- Chinnery PF, Samuels DC et al (2002) Accumulation of mitochondrial DNA mutations in ageing, cancer, and mitochondrial disease: is there a common mechanism? *Lancet* 360(9342):1323–1325. doi:[10.1016/S0140-6736\(02\)11310-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)11310-9)
- Dato S, Passarino G et al (2004) Association of the mitochondrial DNA haplogroup J with longevity is population specific. *Eur J Hum Genet* 12(12):1080–1082. doi:[10.1038/sj.ejhg.5201278](https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201278)
- De Benedictis G, Rose G et al (1999) Mitochondrial DNA inherited variants are associated with successful aging and longevity in humans. *FASEB J* 13(12):1532–1536
- Finnila S, Lehtonen MS et al (2001) Phylogenetic network for European mtDNA. *Am J Hum Genet* 68(6):1475–1484. doi:[10.1086/320591](https://doi.org/10.1086/320591)
- Helgason A, Sigureth ardottr S et al (2000) MtDNA and the origin of the Icelanders: deciphering signals of recent population history. *Am J Hum Genet* 66(3):999–1016. doi:[10.1086/302816](https://doi.org/10.1086/302816)
- Ivanova R, Lepage V (1998) Mitochondrial genotype associated with French Caucasian centenarians. *Gerontology* 44(6):349. doi:[10.1159/000022041](https://doi.org/10.1159/000022041)
- Kivisild T, Shen P et al (2006) The role of selection in the evolution of human mitochondrial genomes. *Genetics* 172(1):373–387. doi:[10.1534/genetics.105.043901](https://doi.org/10.1534/genetics.105.043901)
- Liu CS, Tsai CS et al (2003) Oxidative stress-related alteration of the copy number of mitochondrial DNA in human leukocytes. *Free Radic Res* 37(12):1307–1317. doi:[10.1080/10715760310001621342](https://doi.org/10.1080/10715760310001621342)
- Macaulay V, Richards M 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. doi:[10.1086/302204](https://doi.org/10.1086/302204)
- Montiel-Sosa F, Ruiz-Pesini E et al (2006) Differences of sperm motility in mitochondrial DNA haplogroup U sublineages. *Gene* 368:21–27. doi:[10.1016/j.gene.2005.09.015](https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.09.015)
- Niemi AK, Hervonen A et al (2003) Mitochondrial DNA polymorphisms associated with longevity in a Finnish population. *Hum Genet* 112(1):29–33. doi:[10.1007/s00439-002-0843-y](https://doi.org/10.1007/s00439-002-0843-y)
- Richards MB, Macaulay VA et al (1998) Phylogeography of mitochondrial DNA in western Europe. *Ann Hum Genet* 62:241–260. doi:[10.1046/j.1469-1809.1998.6230241.x](https://doi.org/10.1046/j.1469-1809.1998.6230241.x)
- Rose G, Passarino G et al (2001) Paradoxes in longevity: sequence analysis of mtDNA haplogroup J in centenarians. *Eur J Hum Genet* 9(9):701–707. doi:[10.1038/sj.ejhg.5200703](https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200703)
- Ross OA, McCormack R et al (2001) Mitochondrial DNA polymorphism: its role in longevity of the Irish population. *Exp Gerontol* 36(7):1161–1178. doi:[10.1016/S0531-5565\(01\)00094-8](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(01)00094-8)
- Ruiz-Pesini E, Lapena AC et al (2000) Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *Am J Hum Genet* 67(3):682–696. doi:[10.1086/303040](https://doi.org/10.1086/303040)
- Ruiz-Pesini E, Mishmar D et al (2004) Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA. *Science* 303(5655):223–226. doi:[10.1126/science.1088434](https://doi.org/10.1126/science.1088434)
- Salazar JJ, Van Houten B (1997) Preferential mitochondrial DNA injury caused by glucose oxidase as a steady generator of hydrogen peroxide in human fibroblasts. *Mutat Res* 385(2):139–149
- Sambrook J, Fritsch EF et al (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor
- Santoro A, Salvioli S et al (2006) Mitochondrial DNA involvement in human longevity. *Biochim Biophys Acta* 1757(9–10):1388–1399. doi:[10.1016/j.bbabi.2006.05.040](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.05.040)
- Sawyer DE, Van Houten B (1999) Repair of DNA damage in mitochondria. *Mutat Res* 434(3):161–176
- Sikorsky JA, Primerano DA et al (2004) Effect of DNA damage on PCR amplification efficiency with the relative threshold cycle method. *Biochem Biophys Res Commun* 323(3):823–830. doi:[10.1016/j.bbrc.2004.08.168](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.08.168)
- Torroni A, Huoponen K et al (1996) Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics* 144(4):1835–1850
- van der Walt JM, Nicodemus KK et al (2003) Mitochondrial polymorphisms significantly reduce the risk of Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 72(4):804–811. doi:[10.1086/373937](https://doi.org/10.1086/373937)
- van Houten B, Cheng S et al (2000) Measuring gene-specific nucleotide excision repair in human cells using quantitative amplification of long targets from nanogram quantities of DNA. *Mutat Res* 460(2):81–94
- von Zglinicki T, Burkle A et al (2001) Stress, DNA damage and ageing—an integrative approach. *Exp Gerontol* 36(7):1049–1062. doi:[10.1016/S0531-5565\(01\)00111-5](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(01)00111-5)
- Wallace DC (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283(5407):1482–1488. doi:[10.1126/science.283.5407.1482](https://doi.org/10.1126/science.283.5407.1482)
- Wallace DC, Ruiz-Pesini E et al (2003) MtDNA variation, climatic adaptation, degenerative diseases, and longevity. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 68:479–486. doi:[10.1101/sqb.2003.68.471](https://doi.org/10.1101/sqb.2003.68.471)



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

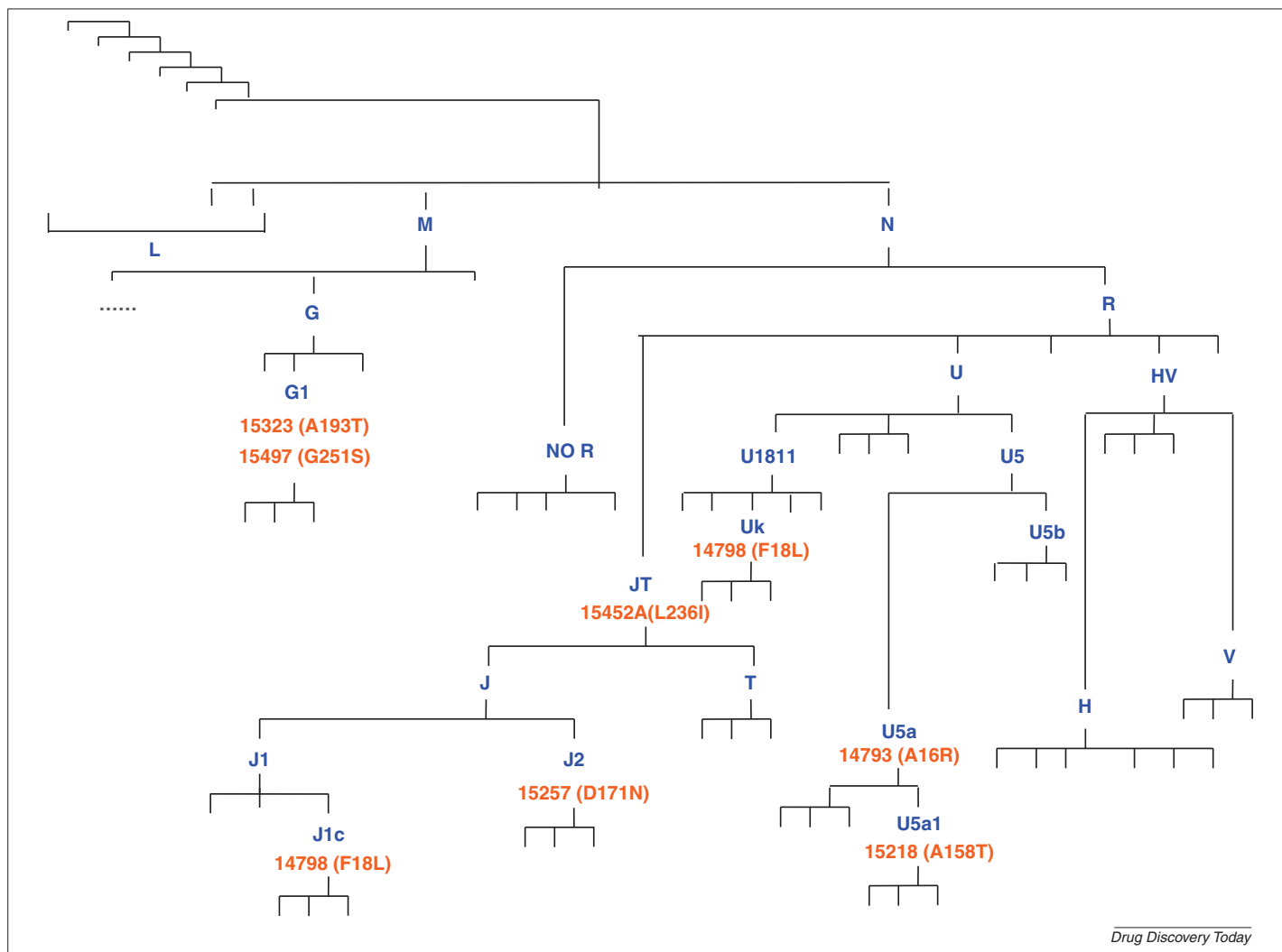


FIGURE 1

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).

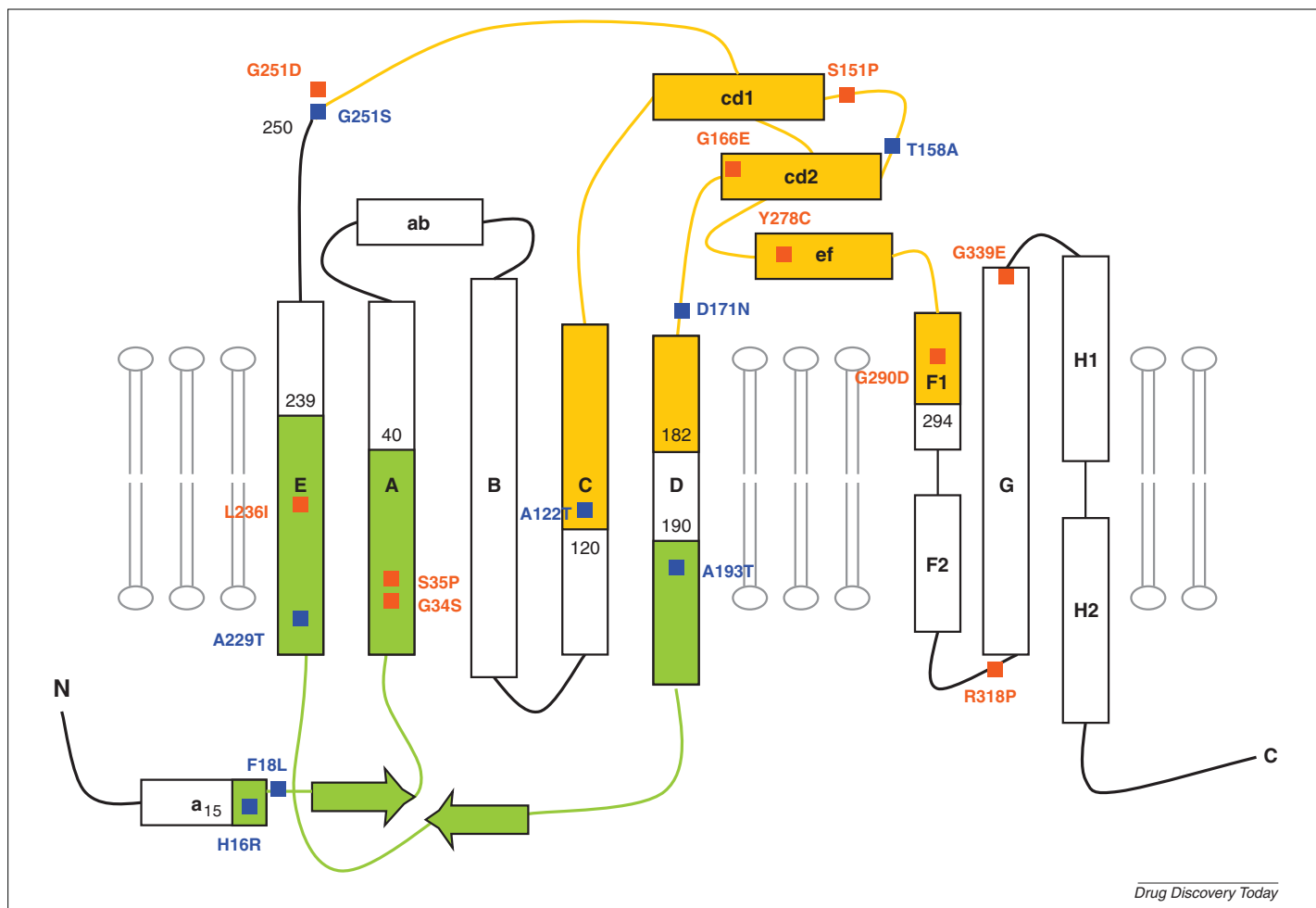


FIGURE 2

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.

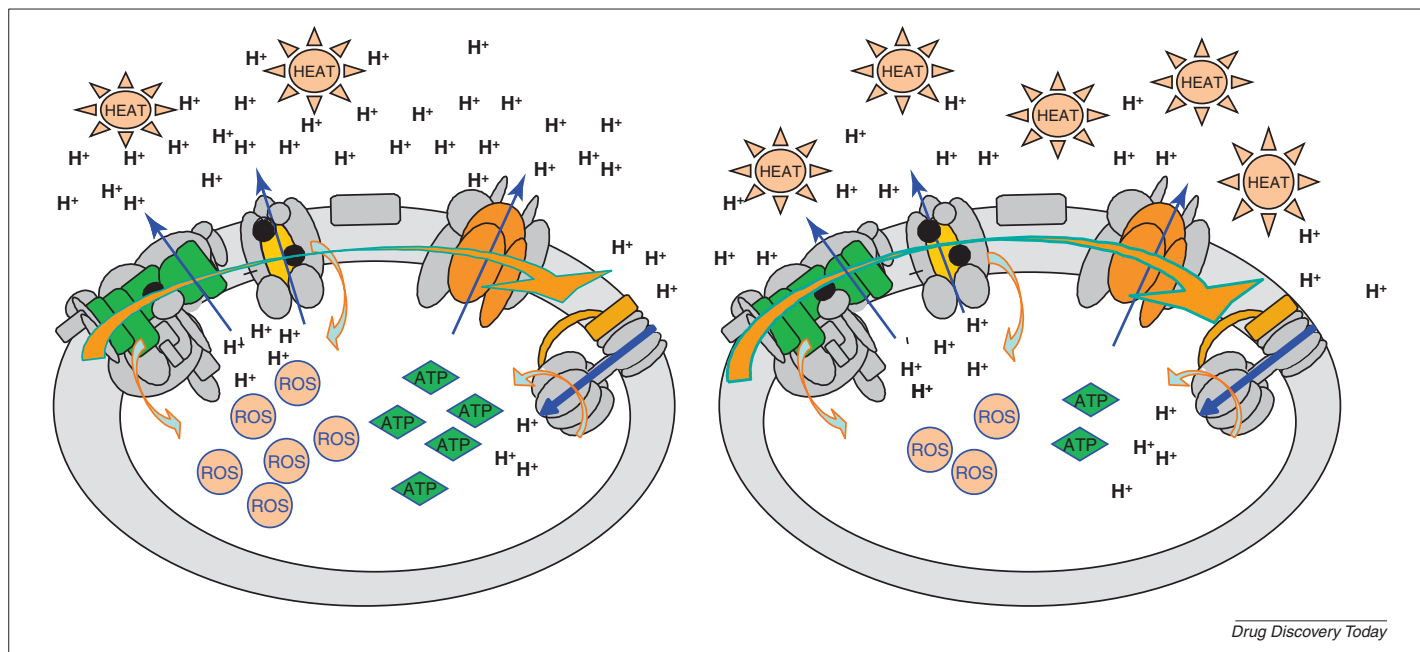


FIGURE 3

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

ÍTACA

Cuando emprendas tu viaje hacia Ítaca
debes rogar que el viaje sea largo,
lleno de peripecias, lleno de experiencias.
No has de temer ni a los lestrigones ni a los cíclopes,
ni la cólera del airado Posidón.
Nunca tales monstruos hallarás en tu ruta
si tu pensamiento es elevado, si una exquisita
emoción penetra en tu alma y en tu cuerpo.
Los lestrigones y los cíclopes
y el feroz Posidón no podrán encontrarte
si tú no los llevas ya dentro, en tu alma,
si tu alma no los conjura ante ti.
Debes rogar que el viaje sea largo,
que sean muchos los días de verano;
que te vean arribar con gozo, alegremente,
a puertos que tú antes ignorabas.
Que puedas detenerte en los mercados de Fenicia,
y comprar unas bellas mercancías:
madreperlas, coral, ébano, y ámbar,
y perfumes placenteros de mil clases.
Acude a muchas ciudades del Egipto
para aprender, y aprender de quienes saben.
Conserva siempre en tu alma la idea de Ítaca:
llegar allí, he aquí tu destino.
Mas no hagas con prisas tu camino;
mejor será que dure muchos años,
y que llegues, ya viejo, a la pequeña isla,
rico de cuanto habrás ganado en el camino.
No has de esperar que Ítaca te enriquezca:
Ítaca te ha concedido ya un hermoso viaje.
Sin ellas, jamás habrías partido;
mas no tiene otra cosa que ofrecerte.
Y si la encuentras pobre, Ítaca no te ha engañado.
Y siendo ya tan viejo, con tanta experiencia,
sin duda sabrás ya qué significan las Ítacas.

