

Trabajo Fin de Grado

Estudio de patogenicidad de mutaciones en el
gen *CHCHD6*

Study of pathogenicity of mutations in *CHCHD6* gene

Grado en Biotecnología

Autora

Alba Rubio Gayarre

Directora

María Pilar Bayona Bafaluy

Grupo Biogénesis y Patología Mitocondrial
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular
Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza

2019

ABREVIATURAS

APS	Persulfato de amonio
ATP	Adenosin trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
C	Línea celular control. Fibroblastos derivados de niño de 3 años
C+CHCHD6wt	Línea celular control transducida con el gen <i>CHCHD6/Mic25</i> silvestre
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc)
CHCHD6	<i>Coiled- coil- hélix- coiled- coil- helix domain- containing protein 6</i>
DAPI	4 ',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco; del ingles, <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico (ADN)
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
FADH₂	Flavin adenin dinucleótido
LB	Luria-Bertani
ME	Membrana externa
MICOS	Sistema de contacto mitocondrial y organización de crestas
mtDNA	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial (ADNmt)
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
ORF	Marco de lectura abierto; del inglés <i>Open Reading Frame</i>
OXPHOS	Sistema de fosforilación oxidativa
P	Línea celular de fibroblastos derivados del paciente
P+CHCHD6wt	Línea celular derivada del paciente transducida con el gen <i>CHCHD6/Mic25</i> silvestre
PBS	Tampón fosfato salino
PBS-T	Tampón fosfato salino-Tween20
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
RNA	Ácido ribonucleico (ARN)
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
TAE	Tris-Acetato-EDTA
T_m	Temperatura de hibridación
UTR	Región no traducida del gen; del inglés <i>Untranslated Region</i>
WT	Silvestre; del inglés <i>Wild Type</i>

ÍNDICE

1. Resumen.....	1
1.1. Resumen.....	1
1.2. Abstract.....	1
2. Introducción.....	2
2.1. El sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) y las enfermedades mitocondriales....	2
2.2. Organización de la membrana interna mitocondrial y el sistema MICOS.....	3
2.3. Subunidad del sistema MICOS CHCHD6/Mic25.....	4
3. Objetivos.....	6
4. Materiales y métodos.....	7
4.1. Materiales.....	7
4.1.1. Líneas celulares.....	7
4.1.2. Cepas bacterianas.....	7
4.1.3. Plásmidos.....	7
4.2. Medida de niveles de ATP mitocondrial.....	7
4.3. Inmunocitoquímica.....	8
4.4. Extracción de proteínas.....	8
4.5. Cuantificación de proteínas.....	8
4.6 Western blot e inmunodetección de proteínas.....	9
4.6.1. Electroforesis desnaturalizante de proteínas: SDS-PAGE.....	9
4.6.2. Transferencia de proteínas a membrana de PVDF.....	9
4.6.3. Incubación de anticuerpos.....	10
4.6.4. Detección quimioluminiscente.....	10
4.7. Microscopía electrónica.....	10
4.8. Retrotranscripción del mRNA por RT-PCR.....	10
4.9. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	11
4.10. Electroforesis horizontal en gel de agarosa.....	12
4.11. Clonaje de productos de PCR.....	12
4.12. Clonaje de insertos en vector lentiviral.....	12
4.12.1. Digestión de plásmido e insertos.....	13
4.12.2. Purificación de DNA desde gel de agarosa y cuantificación en gel de agarosa....	13
4.12.3. Reacción de ligación.....	13
4.13. Transformación de bacterias competentes.....	14
4.14. Selección de colonias positivas: PCR en colonia.....	14

4.15. Aislamiento de DNA plasmídico y cuantificación.....	14
4.16. Preparación de muestras para secuenciación.....	15
4.17. Herramientas informáticas y análisis estadístico.....	15
5. Resultados.....	16
5.1. Medida de niveles de ATP mitocondrial.....	16
5.2. Microscopía electrónica.....	17
5.3. Estudios de complementación funcional.....	18
5.4. Análisis de morfología de la red mitocondrial mediante inmunocitoquímica en líneas celulares.....	18
5.5. Estudio de niveles de proteínas del sistema MICOS y del sistema OXPHOS en las líneas celulares.....	19
5.5.1. Estudio de subunidades del sistema MICOS.....	20
5.5.2. Estudio de subunidades del sistema OXPHOS.....	21
6. Discusión de resultados.....	22
7. Conclusiones.....	24
7.1. Conclusiones.....	24
7.2. Conclusions.....	24
8. Referencias bibliográficas.....	25
Anexos.....	27
Anexo 1. Mapas genéticos de plásmidos.....	27
1.1. <i>pCRTM-Blunt II-TOPO®</i>	27
1.2. <i>pWPXLd Ires Neo</i>	27
Anexo 2. Secuencia CHCHD6/Mic25.....	28
2.1. <i>Cebadores</i>	28
Anexo 3. Anticuerpos.....	29
Anexo 4. Imágenes a microscopio óptico de las líneas celulares.....	30

1. RESUMEN

1.1. Resumen

La membrana interna mitocondrial se organiza en estructuras denominadas crestas, que son importantes para el funcionamiento de la mitocondria. Los complejos de la cadena respiratoria I-IV y F_1F_0 -ATP sintasa (CV) se localizan en las crestas y realizan el proceso de fosforilación oxidativa (OXPHOS) que produce ATP para la célula. El sistema MICOS (Sistema de contacto mitocondrial y organización de crestas) es importante en la formación y mantenimiento de las crestas. Se localiza en la zona de unión de crestas, que separa los dos dominios de la membrana interna: el dominio paralelo entre membranas y el dominio de crestas. El sistema MICOS se divide en dos subcomplejos: subcomplejo Mic60 y subcomplejo Mic10. Subunidades del sistema MICOS también se han relacionado con la estabilidad del mtDNA y con el importe de proteínas a la mitocondria. En el presente estudio se ha trabajado con fibroblastos derivados de un paciente al que, mediante secuenciación masiva, se le encontraron mutaciones en el gen *CHCHD6/Mic25*. *CHCHD6/Mic25* es una proteína periférica de la membrana interna, orientada hacia el espacio intermembrana y forma parte del subcomplejo Mic60. Nuestros resultados indican que los fibroblastos con mutaciones en *CHCHD6/Mic25* tienen niveles de ATP menores que el control y que poseen una estructura de crestas alterada. Los niveles de expresión de las demás proteínas del subcomplejo no cambian, aunque se observó un aumento de la expresión de subunidades del sistema OXPHOS. Se intentaron llevar a cabo estudios de complementación funcional, sin embargo, la sobreexpresión del gen resultó tóxica para las células. Bajos niveles de ATP mitocondrial y la alteración en las crestas indican que las mutaciones tienen efecto, sin embargo, es necesario modular la expresión del gen *CHCHD6/Mic25* para confirmar la patogenicidad de las mutaciones en nuestro paciente.

Palabras clave: MICOS, *CHCHD6/Mic25*, OXPHOS, crestas mitocondriales.

1.2. Abstract

Mitochondrial inner membrane is organized in structures called cristae, which are important for mitochondrial functions. The complexes I-IV of respiratory chain and F_1F_0 -ATP synthase (CV) are found in these cristae and carry out oxidative phosphorylation process (OXPHOS), which produces ATP for the cell. MICOS system (Mitochondrial contact site and cristae organizing system) is important for the formation and maintenance of cristae. It is located at crista junctions, which separate two domains of inner membrane: inner boundary membrane domain and cristae domain. MICOS system is divided in two subcomplex: Mic60 subcomplex and Mic10 subcomplex. MICOS system subunits have been related to mtDNA stability and mitochondrial proteins import. In the present study, we have worked with patient-derived fibroblasts in which mutations in *CHCHD6/Mic25* gene were found by massive sequencing. *CHCHD6/Mic25* is a peripheral inner membrane protein, facing the intermembrane space and is part of Mic60 subcomplex. Our results indicate that mutant *CHCHD6/Mic25* fibroblasts have lower ATP levels than control fibroblasts and they have a disturbed cristae structure. Expression of other subcomplex subunits do not change, although an increase in expression of OXPHOS system subunits was observed. Functional complementation studies were tried to carry out, although the overexpression of gene was toxic for the cells. Low ATP levels and alteration of cristae indicate that mutations have effect, although it is necessary to modulate *CHCHD6/Mic25* expression to confirm the pathogenicity of gene mutations in our patient.

Keywords: MICOS, *CHCHD6/Mic25*, OXPHOS, mitochondrial cristae.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. El Sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) y las enfermedades mitocondriales

La mitocondria es un orgánulo intracelular estructuralmente formado por dos membranas, externa e interna, las cuales separan tres espacios subcelulares: el citosol, el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial (1,2). Una de las principales funciones de la mitocondria es la obtención de energía, llevada a cabo por el proceso de fosforilación oxidativa (OXPHOS) (3,4). La mitocondria está implicada en otros procesos celulares como la apoptosis, la oxidación de ácidos grasos, metabolismo de los aminoácidos, el ciclo de la urea, entre otros (3,5).

La mitocondria tiene su propio genoma y toda la maquinaria necesaria para su expresión. Sin embargo, durante la evolución la mayor parte de los genes se transfirieron al núcleo (4). El genoma mitocondrial consta de 16.569 pares de bases, las cuales contienen la secuencia de 37 genes. De estos, 2 son RNA ribosómicos, 22 RNA de transferencia y 13 codifican proteínas. Estas están implicadas en el proceso de producción de ATP, llevado a cabo por el sistema OXPHOS (3,4). Sin embargo, subunidades de este sistema y proteínas que regulan su funcionamiento también están codificadas por el genoma nuclear (3,4).

El sistema OXPHOS está formado por cinco complejos: NADH:ubiquinona oxidoreductasa (Complejo I, CI), succinato:ubiquinona oxidoreductasa (Complejo II, CII), ubiquinol:citocromo C reductasa (Complejo III, CIII), citocromo C oxidasa (Complejo IV, CIV) y F_1F_0 -ATP sintasa (Complejo V, CV). Cuenta con dos transportadores de electrones: Coenzima Q (CoQ) y citocromo C (Cyt C) (Figura 1) (6).

El proceso consiste en un transporte de electrones, donados por $NADH+H^+$ y $FADH_2$, a través de los complejos I-IV hasta el aceptor final de electrones, el oxígeno, el cual se transforma en agua (Figura 1). A la vez, los distintos complejos bombean protones desde la matriz hacia el espacio intermembrana (Figura 2), creando un gradiente electroquímico. Este será aprovechado por la F_1F_0 -ATP sintasa (CV), que utilizará la energía de retorno de los protones a la matriz para la formación de ATP a partir de ADP y fósforo inorgánico (4).

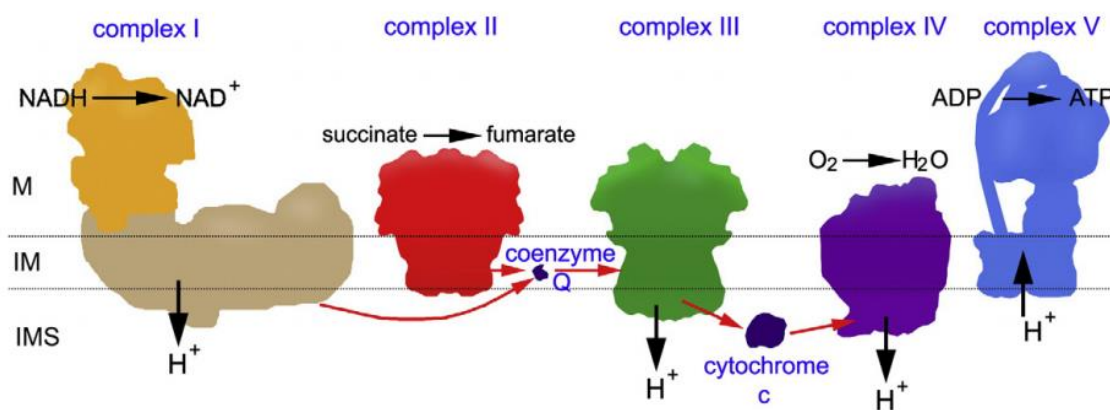


Figura 1. Esquema de los complejos y transportadores de electrones del sistema OXPHOS. Fuente: (7). Se muestra el bombeo de protones de los complejos, la formación de agua a partir de oxígeno y la formación de ATP por parte del complejo V. M: matriz; IM: membrana interna; IMS: espacio intermembrana.

Las patologías relacionadas con defectos en la producción de energía para la célula y con el sistema OXPHOS se denominan enfermedades mitocondriales. Es un grupo muy heterogéneo de enfermedades, que pueden manifestarse de forma multisistémica o afectar a tejidos específicos (4,8). Los tejidos más afectados son aquellos con mayores necesidades energéticas, causando síntomas tales como miopatía del músculo esquelético, cardiopatía, convulsiones, neuropatía,

fallo hepático, etc (3,8). Suelen presentarse a edades tempranas, aunque también se han visto implicadas en enfermedades neurodegenerativas en adultos (3,4).

Una de las características de este tipo de patologías es su variabilidad genética, ya que pueden ser causadas tanto por mutaciones en genes del DNA mitocondrial como del DNA nuclear (3,4,8,9). Se ha propuesto una clasificación en cinco rutas mitocondriales para incluir la variabilidad de procesos afectados en estas enfermedades: genes, tanto del DNA mitocondrial como nuclear, que codifican subunidades del propio sistema OXPHOS, genes implicados en el mantenimiento y expresión del DNA mitocondrial, genes implicados en la biogénesis, ensamblaje y regulación del sistema OXPHOS, genes que garantizan la síntesis y el transporte de los nucleótidos necesarios para la replicación y transcripción y, por último, genes implicados en la dinámica de membranas (5).

La gran variabilidad genética y de síntomas clínicos hacen complicado el diagnóstico y la correlación con un genotipo concreto (3,9). Por este motivo, a pesar de que se está trabajando en terapias más específicas y que se han producido avances en este campo, las terapias utilizadas son la mayoría sintomáticas y paliativas (4,8).

2.2. Organización de la membrana interna mitocondrial y el sistema MICOS

La membrana interna mitocondrial está formada por dos dominios, el dominio paralelo entre membranas y el dominio de crestas mitocondriales. En estas se encuentra localizado el sistema OXPHOS. Ambos dominios se juntan en la zona de unión de crestas, lugar donde se localiza el sistema MICOS (Sistema de contacto mitocondrial y organización de crestas) (Figura 2) (1,2). El sistema MICOS es un complejo hetero-proteico que se ha visto que está implicado en la formación y mantenimiento de las crestas mitocondriales (1,2,10).

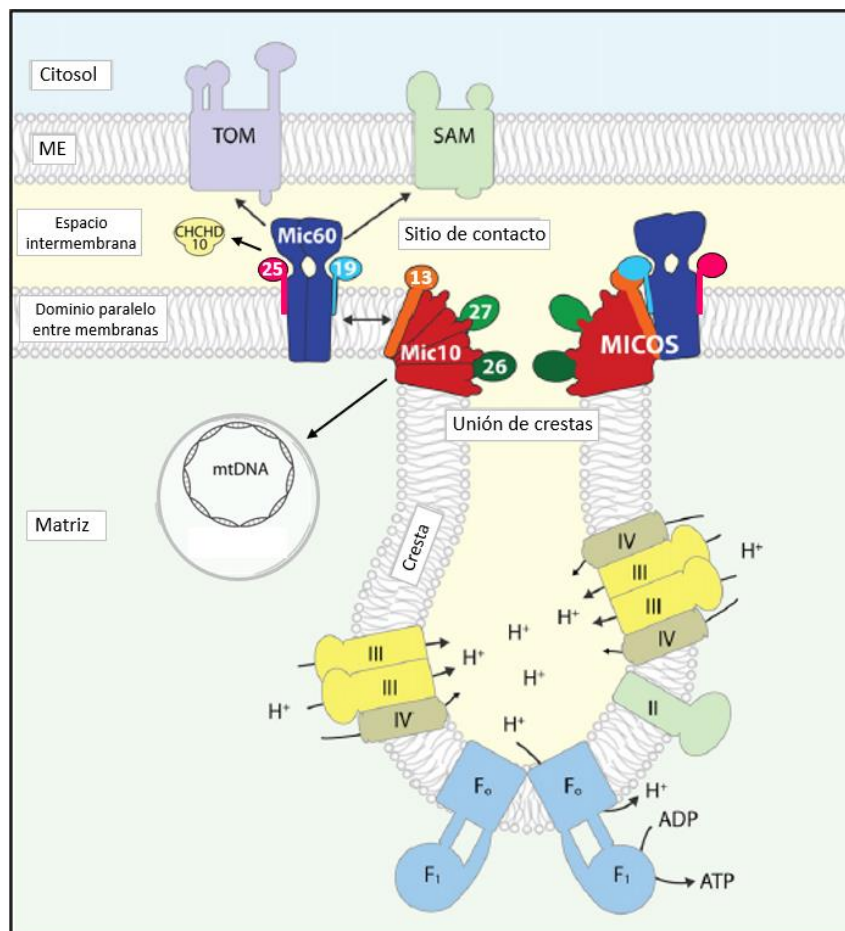


Figura 2. Esquema de organización estructural de la membrana interna mitocondrial y crestas en metazoos. Imagen tomada y modificada para representar los componentes encontrados en metazoos del artículo de *H. Rampelt et al.* (2016) (1), en el que se representa la organización del sistema MICOS en levaduras. La imagen muestra la localización del complejo MICOS en la zona de unión de crestas, los distintos complejos de la cadena respiratoria situados en las crestas y el dímero formado por el complejo V en el límite de la curvatura de la cresta. Se representa el bombeo de protones de los complejos a la zona del espacio intermembrana que forman las crestas y la formación de ATP por parte del complejo V. Se indican alguna de las interacciones de MICOS con proteínas de la membrana externa. ME: Membrana externa. MICOS: Sistema de contacto mitocondrial y organización de crestas. SAM: Maquinaria de ensamblaje y organización. TOM: Translocasa de la membrana externa.

Desde el descubrimiento de este complejo han ido apareciendo nuevas subunidades que forman parte del mismo. En este momento, en metazoos son siete las proteínas que lo conforman, que se agrupan en dos subcomplejos: subcomplejo Mic60, formado por Mic60, CHCHD6/Mic25 y Mic19 y el subcomplejo Mic10, formado por Mic10, Mic26, Mic27 y Mic13 (Figura 2) (1,2,10). El primero de ellos está situado hacia el dominio paralelo entre membranas y está relacionado con el contacto y comunicación con la membrana externa. El segundo se sitúa hacia la zona de unión de crestas y tiene una mayor relación con la formación de las crestas mitocondriales (1,2,10). Se han encontrado evidencias de que la proteína CHCHD10 pueda ser una nueva subunidad del complejo y que pasaría a denominarse Mic14(11).

La ausencia de cualquiera de los miembros se ha visto, en mayor o menor medida, que afecta a la estructura de las crestas mitocondriales, por lo que se le ha atribuido como la principal función del sistema MICOS (1,2,10). La estructura de crestas es importante para el proceso de formación de energía en forma de ATP para la célula. F_1F_0 -ATP sintasa (CV) forma dímeros que se colocan en el extremo de la curva que forman las crestas mitocondriales (Figura 2), ayudando al mantenimiento de la estructura (12). Se ha visto que en esta zona el gradiente de protones es mayor, debido a una mayor diferencia de pH, sugiriendo que las crestas actúen como trampas de protones, que serán aprovechados por el complejo V para formar ATP, mejorando así la eficacia del proceso de fosforilación oxidativa (12).

Este complejo también se ha relacionado con el importe de proteínas mitocondriales a la mitocondria, ya que varias de sus subunidades interaccionan con proteínas del complejo SAM (Maquinaria de ensamblaje y organización) de la membrana externa, encargado del importe de proteínas con estructura de barril β (10,13). Ambos complejos juntos se han denominado complejo puente del espacio intermembrana. Finalmente, se ha relacionado con la estabilidad de mtDNA, ya que se ha visto que Mic60 y Mic14 son importantes para el mantenimiento de los nucleoides mitocondriales (11,14).

2.3. Subunidad del sistema MICOS CHCHD6/Mic25

CHCHD6/Mic25 es una proteína que se demostró que pertenecía al sistema MICOS en 2011 (15). La proteína está codificada por un gen nuclear, que recibe el mismo nombre y que se localiza en el cromosoma 3 en *Homo sapiens* (16). CHCHD6/Mic25 tiene una longitud de 235 aminoácidos y una masa molecular de aproximadamente 26,5 kDa (15). Posee la modificación co-traducciona N-miristoilación (13,15). Esta modificación consiste en la adición del ácido mirístico (14:0) a una glicina en el extremo N-terminal, tras la eliminación de la primera metionina de la cadena polipeptídica (13). No se conoce muy bien su función en esta proteína, pero se cree que podría participar en el transporte de la proteína del citosol a la mitocondria tras su síntesis o en la interacción con proteínas de la membrana externa (13).

CHCHD6/Mic25 está presente en el sistema MICOS en metazoos, pero no en organismos inferiores. Surge de la duplicación génica de su parólogo Mic19. Ambos son ortólogos de Mic19 en levaduras (1,2,13). Pertenecen al subcomplejo Mic60, junto a Mic19 y la proteína integral

Mic60. Tanto Mic19 como CHCHD6/Mic25 son proteínas periféricas orientadas hacia el espacio intermembrana y que se anclan a la membrana interna por su unión a Mic60 (15,17) (Figura 2).

Como miembro del sistema MICOS se le ha visto relacionado con la estabilidad de las crestas mitocondriales (10,15,18). Se ha demostrado su interacción con proteínas de la membrana externa como Sam50 (18). CHCHD6/Mic25 se encontraría dentro del grupo de genes implicados en la dinámica de membrana dentro de la clasificación de los genes implicados en enfermedades mitocondriales.

3. OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es la determinación de la patogenicidad de las mutaciones en el gen *CHCHD6/Mic25* mediante estudios analíticos con fibroblastos derivados de un niño con síntomas de enfermedad mitocondrial del Hospital Sant Joan de Deu (Barcelona). Dichas mutaciones fueron encontradas mediante secuenciación masiva de exoma. Para llevar a cabo el objetivo principal, se establecieron los siguientes objetivos:

1. Analizar los niveles de ATP como indicador de la actividad del sistema OXPHOS en fibroblastos derivados del paciente y en fibroblastos control.
2. Observar mediante microscopía electrónica la estructura de las crestas mitocondriales en fibroblastos.
3. Estudiar la complementación funcional mediante la transducción del gen *CHCHD6/Mic25* a los fibroblastos derivados del paciente.
4. Estudiar los niveles de proteínas del sistema MICOS y de los distintos complejos de la cadena respiratoria en las líneas de fibroblastos y en dichas líneas transducidas con gen *CHCHD6/Mic25*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

4.1.1. Líneas celulares:

- Cultivo primario de fibroblastos derivados de un niño de 3 años, cedidos por Hospital Sant Joan de Deu (Barcelona). Utilizado como control en los ensayos (C).
- Cultivo primario de fibroblastos de paciente (P), cedidos por Hospital Sant Joan de Deu (Barcelona).

4.1.2. Cepas bacterianas:

Las cepas bacterianas utilizadas fueron bacterias competentes preparadas por el grupo de Biogénesis y patología mitocondrial de la Universidad de Zaragoza, a partir de la cepa DH5 α *Escherichia coli*. También se realizaron ensayos con cepa *Max EfficiencyTM DH5 α TM competent cell* (Thermo Fisher Scientific).

4.1.3. Plásmidos:

En el presente trabajo se ha clonado el gen *CHCHD6/Mic25*, objeto de estudio, en dos plásmidos diferentes (Anexo 1):

- Plásmido pCRTM-Blunt II-TOPO® (Life TechnologiesTM), indicado para clonaje de productos de PCR. Longitud: 3.519 pares de bases.
- Plásmido pWPXLd Ires Neo, el cual es una versión modificada de pWPXLd (Tronolab Addgene #12258), obtenido por el grupo Biogénesis y patología mitocondrial de la Universidad de Zaragoza. Longitud: 11.331 pares de bases.

4.2. Medida de niveles de ATP mitocondrial:

Para la medida se utilizaron placas de 96 pocillos de fondo blanco (Casa comercial Nunc), especiales para medidas de luminiscencia. En el ensayo se midió la cantidad de ATP por el método luciferina/luciferasa y el número de células viables mediante fluorescencia. Para cada uno se utilizaron 6 pocillos por línea celular, es decir, un total de 12 pocillos/línea celular. 10-14 horas antes del ensayo se sembraron $2 \cdot 10^4$ células por pocillo, en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) hasta un volumen de 200 μ l. El día del ensayo, se realizaron dos lavados con PBS de todos los pocillos y se añadieron 100 μ l de medios de cultivo correspondientes para cada ensayo (Tabla 1). Se incubaron 2 horas a 37°C y 5% de CO₂.

Tabla 1. Reactivos utilizados y sus concentraciones para cada uno de los ensayos.

Reactivo	ATP mitocondrial	Número de células viables
<i>Medio de cultivo</i>	DMEM <i>libre</i> (sin glucosa)*	DMEM <i>libre</i> (sin glucosa)*
<i>Piruvato</i>	1 mM	1 mM
<i>2-deoxi-glucosa*</i>	5 mM	-
<i>CellTiter-Blue® Cell Viability Assay (Promega)*</i>	-	20 μ l/pocillo

* El uso de medios sin glucosa y suplementados con piruvato impiden la síntesis de ATP por la vía glucolítica. Además, el uso de 2-deoxi-glucosa inhibe la primera enzima de esta vía. El reactivo CellTiter-Blue® Cell Viability Assay es metabolizado por las células viables produciendo fluorescencia a una longitud de onda de 600 nm.

Tras las 2 horas, se midió la fluorescencia (600 nm) en los pocillos destinados a la estimación de número de células. A continuación, en los pocillos destinados a la medida de ATP, se añadió un volumen de la solución luciferina/luciferasa (CellTiter-Glo® Luminiscent Cell Viability Assay, Promega), se agitó durante 1-2 minutos, para permitir el lisado celular, y se

incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron las medidas de luminiscencia. Para ambas medidas se utilizó el lector de placas NOVOSTar MBG (Labtech).

4.3. Inmunocitoquímica

Las células se sembraron en 2 ml de medio DMEM (Gibco-ThermoFisher Scientific) con 4,5 g/l D-glucosa, L-glutamina y piruvato suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco-ThermoFisher Scientific) y uridina a una concentración final de 50 µg/ml, en placa de 6 pocillos sobre cubreobjetos, debidamente esterilizados con etanol. Las células se dejaron reposar durante 12 horas para asegurar su adherencia al cubreobjetos y una confluencia del 30-50%. Pasado este tiempo, se retiró el medio y se incubaron con Mitotracker® Red CMXRos (Invitrogen) a una dilución 1:10.000 en medio DMEM (Gibco-ThermoFisher) sin SFB, hasta volumen final de 1,5 ml/pocillo, durante media hora a 37°C. Se retiró el medio y se incubó otra media hora en 1,5 ml de medio con suero a 37°C.

Posteriormente, se retiraron los medios y se lavaron los pocillos con tampón fosfato salino (PBS) a pH 7,4 1X (Gibco-ThermoFisher Scientific). Las células se fijaron en 0,5 ml de paraformaldehído al 2% durante 15 minutos a temperatura ambiente. 3 lavados con PBS durante 5 minutos con agitación. Tras estos, incubación en metanol al 100% frío durante 15 minutos en agitación suave para la permeabilización de las membranas. Para la rehidratación de las muestras, se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos en agitación. A continuación, se procedió al montaje en el portaobjetos. Se añadió una gota de reactivo Slow Fade® Gold antifade con DAPI (Invitrogen) sobre el portaobjetos. Se colocó el cubreobjetos en el que están fijadas las células sobre la gota. Se dejaron secar las preparaciones protegidas de la luz. Finalmente, se observaron las preparaciones al microscopio de fluorescencia Carl Zeiss.

4.4. Extracción de proteínas

A partir de pellet celulares almacenados a -20°C, se realizó la extracción de proteínas con solución comercial de tampón de lisis RIPA, 10X (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, 10% NP-40 deoxicalato de sodio 2,5%, EDTA 10 mM, Millipore) y un inhibidor de proteasas, 25X (Protease Inhibitor Cocktail Tablets de Roche). Cada pellet se resuspendió en un volumen final de 75 µl de mezcla de RIPA e inhibidor de proteínas, llevados cada uno a concentración 1X y completando el volumen con agua destilada estéril (Gibco™). Se incubaron 15 minutos a 4°C en una rueda giratoria y se centrifugaron a 13.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Tras la centrifugación, se recogió el sobrenadante y se cuantificaron las proteínas de las muestras. Las proteínas se almacenaron a -80°C.

4.5. Cuantificación de proteínas:

La cuantificación de proteína se llevó a cabo siguiendo el método de Bradford. Primero, se construyó una recta de calibrado con concentraciones conocidas de proteína albúmina sérica bovina (BSA). Para ello se prepararon diluciones a partir de una solución 1 mg/ml de BSA (0, 1, 2, 3, 5, 10 y 15 µg/µl de BSA) con 200 µl de reactivo de Bradford (Protein Assay Dye, Bio-Rad) y agua hasta un volumen final de 1 ml. En cuanto a las muestras problema, se tomaron 2 µl de cada muestra, 200 µl de reactivo de Bradford y agua hasta volumen final de 1 ml. A continuación, los tubos se agitaron por inversión y se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se procedió a la medida de la absorbancia de las diluciones a 595 nm.

Una vez obtenida la absorbancia de las diluciones del patrón, se construyó una recta de calibrado, representando la absorbancia (y) frente a la concentración de BSA (µg/µl) (x). Se ajustó

a la ecuación $y = ax + b$; donde a es la pendiente de la recta y corresponde con el coeficiente de extinción molar (ϵ) a 595 nm. La concentración de las muestras vendría dada por:

$$[\text{proteína}] (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \frac{\text{Abs media} - b}{\epsilon}$$

4.6. Western blot e inmunodetección de proteínas

4.6.1. Electroforesis desnaturizante de proteínas: SDS-PAGE

Se realizó una separación de las proteínas mediante electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). El gel consta de dos tipos: gel concentrador y el gel separador, el cual se realizó a un porcentaje de 14%, que determina el tamaño de poro del gel. Los reactivos y cantidades para la elaboración de un gel se muestran en la Tabla 2. El gel concentrador y el gel separador difieren en tampón 4X utilizado para cada gel*:

- Tampón de gel separador 4X: Tris HCl 1,5M pH 8,8, SDS 0,4 %, EDTA 8 mM.
- Tampón de gel concentrador 4X: Tris HCl 0,5M pH 6,8, SDS 0,4 %, EDTA 8 mM.

Tabla 2. Reactivos y cantidades para la elaboración de un gel para electroforesis desnaturizante.

Reactivo	Gel separador (14 %)	Gel concentrador (8 %)
Acrilamina:bisacrilamida 30:0,8 (p/v)	2,33 ml	0,33 ml
Tampón 4X*	1,25 ml	0,5 ml
H ₂ O destilada	1,42 ml	1,167 ml
APS 20%	15 μ l	10 μ l
TEMED	5 μ l	5 μ l
Volumen total	5,02 ml	2,012 ml

Una vez preparado el soporte, se vertió el gel separador entre los dos cristales, dejando unos 2 cm de cristal. Tras esto, se añadió isopropanol para formar un frente recto. Una vez polimerizado, se retiró el isopropanol, se añadió el gel concentrador hasta rebosar y finalmente se colocó el peine (1 mm) para delimitar los pocillos y se dejó polimerizar.

Una vez polimerizado, se montaron los geles en vertical en la cubeta de electroforesis. La cubeta se llenó con tampón de electroforesis 1X (10X: Tris-HCl 250 mM, glicina 1,92 M, SDS 1% (p/v)) y se retiraron los peines. Se limpiaron los pocillos con tampón de electroforesis a presión con una jeringa y se procedió a cargar 30 μ g de cada muestra, con 3 μ l tampón de carga 4X (Glicerol 20%, Tris-HCl 0,16 M pH 6,8, EDTA 20 mM, SDS 8% (p/v), azul de bromofenol 0,4% (p/v), 2-mercaptoetanol 4% (v/v)) y agua hasta un volumen final de 12 μ l. Como marcador de pesos moleculares se utilizó Precision Plus Protein™ Standars (Bio-Rad) y se cargaron 6 μ l. Finalmente, la electroforesis se realizó a amperaje 12 mA constante hasta que las muestras entran al gel separador. Tras esto, se duplicó el amperaje y se dejó correr hasta que las muestras llegaron al final del gel.

4.6.2. Transferencia de proteínas a membrana de PVDF

La transferencia de las proteínas del gel de electroforesis a una membrana de PVDF se llevó a cabo mediante una electrotransferencia húmeda. Se cortó membrana de PVDF (Hybond™ Amersham™, GE Healthcare Life Science) del tamaño del gel, se activó con metanol durante 10 segundos y se lavó con agua destilada. Después, se procedió al montaje del “sándwich” y su colocación en la cubeta de transferencia, junto con un bloque de hielo, de tal forma que el orden fuera: polo negativo, esponja, dos papeles, gel, membrana, dos papeles, esponja, polo positivo. Así se asegura la transferencia de las proteínas a la membrana de PVDF. Todos los elementos necesarios para el “sándwich” se equilibraron antes del montaje en tampón de transferencia frío

(BSN: Tris 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20% (v/v)). La transferencia se realizó con agitación, a voltaje constante de 80 V, durante 2 horas a 4°C. Para comprobar que la transferencia se había realizado con éxito, se tiñó la membrana con reactivo Rojo Ponceau (SIGMA), el cual tiñe de manera inespecífica todas las proteínas. Este se eliminó lavando con agua destilada. Finalmente, para el bloqueo de la membrana, se incubó la membrana en una disolución de leche desnatada en polvo al 5% en PBS-T (Tween 20 al 0,1% en PBS) durante toda la noche, con agitación suave a 4°C. Así evitamos las uniones inespecíficas de anticuerpos y los falsos positivos.

4.6.3. Incubación de anticuerpos

Para la detección de proteínas en la membrana se utilizó un sistema de inmunodetección indirecta, que consiste en un anticuerpo primario que reconoce específicamente nuestra proteína de interés y un anticuerpo secundario que reconoce el anticuerpo primario. Este anticuerpo tiene acoplada una enzima que al añadir el sustrato produce una señal detectable.

El procedimiento de incubación y detección de proteínas se realizó de la misma manera para todos los anticuerpos utilizados. Para cada membrana se preparó una disolución de 6 ml de PBS-T al 0,25% de leche desnatada en polvo. A esta disolución se le añadió el anticuerpo correspondiente en cada caso, a una dilución adecuada. Todos los anticuerpos utilizados y sus diluciones se muestran en la Tabla 2 de Anexo 3. En primer lugar, se eliminó el exceso de agente bloqueante mediante 3 lavados de 5 minutos con PBS-T, a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó la membrana con el anticuerpo primario durante 2 horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se retiró y se lavó la membrana 3 veces con PBS-T, en agitación, durante 5 minutos a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario correspondiente, igualmente diluido (Tabla 2 Anexo 3) en disolución de PBS-T al 0,25% de leche desnatada en polvo, se incubó en las mismas condiciones durante una hora. Finalmente, se retiró este anticuerpo y se procedió a 3 lavados con PBS-T durante 10 minutos cada uno.

4.6.4. Detección quimioluminiscente

Para detectar la proteína de interés, la membrana se incubó durante un minuto con el reactivo PierceTM ECL Western Blotting Substrate (ThermoFisher Scientific). Este reactivo consta de una solución de peroxidasa y solución de luminol, las cuales se mezclaron en proporción 1:1. A continuación, se colocó en una funda transparente y se procedió al revelado. Esto se realizó en el revelador AMERSHAM Imager 600 imagers (GE Healthcare Life Science).

4.7. Microscopía electrónica

La preparación y la fijación de las células para la observación por microscopía electrónica se llevó a cabo en el laboratorio de cultivos del grupo de Biogénesis y patología mitocondrial. Se fijaron entre 20-35 mil células, dependiendo de la muestra, en portaobjetos que se colocaron en pocillos (Chamber slide, Sigma). El tratamiento posterior y la observación se llevó a cabo en el Servicio de microscopía electrónica de sistemas biológicos (Servicio General de Apoyo a la Investigación-SAI, Universidad de Zaragoza), con un microscopio de transmisión JEOL 1010 a 80 KV. Finalmente, las imágenes se tomaron con una cámara Gatan Bioscan.

4.8. Retrotranscripción del mRNA por RT-PCR

A partir del RNA total de varias líneas celulares se llevó a cabo la retrotranscripción para la obtención de cDNA mediante Transcriptor First Stand cDNA Synthesis kit (Roche). En primer lugar, se realizó una mezcla para cada RNA total de las distintas muestras (1 µg), con oligo(dT)₁₈

y H₂O destilada (Tabla 3.1). Cada muestra se desnaturalizó calentando 10 minutos a 65°C en el termociclador. Así se consigue eliminar las distintas estructuras secundarias del RNA que pueda haber presentes.

Tras la desnaturalización, se dejaron las muestras 5 minutos en hielo. Después de estos, se añadió los demás reactivos necesarios para la reacción (Tabla 3.2) hasta un volumen final de 20 µl para cada mezcla. Posteriormente, se incubaron las preparaciones 30 minutos a 55°C y finalmente 5 minutos a 85°C para inactivar la retrotranscriptasa y 5 minutos en hielo. El programa utilizado se usa para fragmentos de un tamaño menor de 4 kb.

Tabla 3.1. Cantidades de mezcla previas a la desnaturalización para retrotranscripción.

De los RNAs de las líneas celulares se tomó el volumen necesario para tener 1 µg.

Reactivo	Cantidad
RNA total	1 µg
Cebador Oligo(dT) ₁₈ *	1 µl
H ₂ O	Hasta 13 µl

Tabla 3.2. Resto de reactivos para la síntesis de cDNA

Reactivo	Vol. (µl)	Concentración final
Tampón de reacción (5X)	4	1X
Inhibidor de RNAsas	0,5	-
dNTPs (10 mM)	2	1 mM
Transcriptasa reversa	0,2	-

*Oligo(dT)₁₈ se utiliza como cebador en la retrotranscripción aprovechando la cola poliA que caracteriza al RNA maduro de eucariotas.

4.9. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para amplificar nuestras dos versiones deseadas: ORF del gen *CHCHD6/Mic25* y el fragmento ORF junto a la región 3' UTR, se realizaron dos PCR distintas. Los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 1 del anexo 2.1 y el programa para cada PCR en la Tabla 4.2. En Anexo 2 se muestra la secuencia del gen tomada de la base de datos Ensembl ENST00000290913.7(19) y cebadores utilizados para cada versión.

Para ambas versiones el volumen total de reacción fue de 20 µl y las cantidades de reactivos se muestran en la Tabla 4.1. Se utilizó la enzima polimerasa Phusion Hot Start II (Thermo ScientificTM), cuya reacción tiene dos fases, con dos temperaturas de hibridación de los cebadores: Tm1, la temperatura adecuada de los cebadores sin contar los sitios de restricción añadidos y la secuencia Kozak y Tm2, la temperatura adecuada de los cebadores al completo (Tabla 1 de Anexo 2.1). Como norma general, se estimaron 15 segundos/mil pares de bases.

Tabla 4.1. Reactivos y cantidades utilizados para PCR. Como DNA molde se utilizó el obtenido en la retrotranscripción de RNA (véase 4.8).

Reactivo	Volumen (µl)	Concentración final
Buffer 5X	4	1X
dNTPs 10 mM	0,4	0,2 mM
Cebador directo 10 µM	0,4	0,2 µM
Cebador reverso 10 µM	0,4	0,2 µM
Taq Phusion	0,4	
cDNA	2	
H ₂ O gibco	12,6	
Volumen total	20	

Tabla 4.2. Programa de PCR específico para polimerasa de alta fidelidad Phusion Hot Start II. Se realizó la amplificación de dos productos diferentes, utilizando cebadores diferentes (Tabla 1, Anexo 2.1.) y distintas condiciones como se muestra en esta tabla.

	Etapa	Producto 1: ORF CHCHD6		Producto 2: ORF + 3' UTR	
		Temperatura (°C)	Tiempo	Temperatura (°C)	Tiempo
x10	Desnaturalización	98	30 s	98	30 s
	Fase I	98	10 s	98	10 s
	Hibridación cebador sin sitios restricción ni Kozak (Tm1)	Tm (PCR)1 (Tabla 1, Anexo 2.1)	20 s	Tm (PCR) 1 (Tabla 1, Anexo 2.1)	20 s
	Elongación	72	20 s	72	25 s
x28	Fase II	98	10 s	98	10 s
	Hibridación cebador completo (Tm2)	Tm (PCR) 2 (Tabla 1, Anexo 2.1)	20 s	Tm (PCR) 2 (Tabla 1, Anexo 2.1)	20 s
	Elongación	72	20 s	72	25 s
	Terminación	72	5 min	72	5 min
	Final	4	∞	4	∞

4.10. Electroforesis horizontal en gel de agarosa

Para separar fragmentos de DNA según su tamaño se utilizaron geles de agarosa al 1% (p/v) en TAE 1X. Durante el transcurso de este trabajo se realizaron geles con distinta porosidad según los objetivos. Para la obtención de los geles se disolvió la cantidad de agarosa necesaria para obtener la concentración requerida en 50 ml de TAE 1X (Tris 40 mM, pH 8, ácido acético 20 mM y EDTA 0,5 M). Para ayudar a disolver, se hirvió la disolución y tras su enfriamiento se adicionó 4 µl de bromuro de etidio, para poder realizar la observación posterior con luz UV.

Posteriormente, se vertió en el soporte electroforético, previamente sellado con cinta de carroceros y con los peines necesarios. Una vez polimerizado, se retiró la cinta de carroceros y se colocó en la cubeta de electroforesis. La cubeta se llenó hasta cubrir el gel con TAE 1X y se retiraron los peines. A continuación, se procedió a cargar las muestras de DNA. El volumen utilizado fueron 13 µl con 2 µl de tampón de carga (Ficoll 15% con azul de bromofenol al 0,25 en TAE) por pocillo. Como marcador de peso molecular se utilizó Low DNA Mass Ladder (100-2000 pb) (Invitrogen), del cual se añadieron 4 µl por pocillo. Finalmente, se procedió a la separación aplicando un voltaje 100V constante durante unos 30-40 minutos.

4.11. Clonaje de productos de PCR

Para el clonaje de los distintos productos de PCR se utilizó el plásmido pCRTM-Blunt II-TOPO® (Life TechnologiesTM) (Anexo 1.1), haciendo uso del kit comercial Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit (Life TechnologiesTM) y siguiendo las instrucciones de este durante el proceso. Los reactivos y cantidades se muestran en la Tabla 5. Las distintas mezclas se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente se congelaron a -20°C hasta el día siguiente.

Tabla 5. Reactivos para el clonaje de los productos de PCR en el plásmido pCRTM-Blunt II-TOPO®.

Versión	Producto PCR*	Sal	Vector	H ₂ O	Total
ORF CHCHD6	1 µl	1 µl	1 µl	3 µl	6 µl
ORF + 3' UTR	4 µl	1 µl	1 µl	-	6 µl

* La cantidad de producto de PCR añadido se eligió según la intensidad de banda en el gel de agarosa.

4.12. Clonaje de insertos en vector lentiviral

Tras la selección de colonias que incorporaron el plásmido pCRTM-Blunt II-TOPO® con los distintos insertos, la extracción de DNA plasmídico y, finalmente, la comprobación del clonaje

mediante secuenciación (véase apartados 4.14, 4.15, 4.16.), se procedió a la liberación de los distintos insertos y la posterior clonación en el vector lentiviral pWPXLd Ires Neo (Anexo 1.2).

4.12.1. Digestión de plásmido e insertos

En la amplificación de los insertos mediante PCR (véase 4.9.) se introdujeron las secuencias de corte de las enzimas de restricción *Bam*HI y *Pme*I (New England BioLabs®). Con la mezcla de digestión (Tabla 6) se liberaron los insertos (708 pb y 910 pb) de pCR™-Blunt II-TOPO®. De la misma forma se digirió el plásmido pWPXLd Ires Neo y así se linealizó. Las mezclas se incubaron 1 hora a 37°C. Tras este tiempo, a la mezcla de digestión de pWPXLd Ires Neo se le añadió 1 µl de fosfatasa CIAP (Invitrogen) y se incubó 30 minutos más a 37°C. El resto de las muestras se mantuvieron en hielo.

Tabla 6. Reactivos para la digestión de pCR™-Blunt II-TOPO® + insertos y pWPXLd Ires Neo.

	DNA	<i>Pme</i> I	<i>Bam</i> HI	Tampón de corte	Agua
pWPXLd Ires Neo	1000 ng/[pWPXLd Ires Neo]	2 µl	1 µl	5 µl	Hasta 50 µl
pCR™-Blunt II-TOPO® + CHCHD6	1000 ng/[CHCHD6]	2 µl	1 µl	5 µl	Hasta 50 µl
pCR™-Blunt II-TOPO® + CHCHD6-cDNA	1000 ng/[CHCHD6-cDNA]	2 µl	1 µl	5 µl	Hasta 50 µl

Posteriormente, se realizó un gel de agarosa al 0,7% (p/v) en TAE 1X (véase 4.10). Se cargó todo el volumen de las distintas muestras (25 µl/pocillo) junto a 2 µl tampón de carga (Ficoll 15% con azul de bromofenol al 0,25% en TAE). Como marcadores de peso molecular se usaron High DNA Mass Ladder (1000-10.000 pb) y Low DNA Mass Ladder (100-2000 pb) (Invitrogen). Finalmente, se aplicó un voltaje constante de 100V hasta la correcta separación.

4.12.2. Purificación de DNA desde gel de agarosa y cuantificación en gel de agarosa

Tras la separación electroforética en un gel de agarosa al 0,7% (p/v) en TAE 1X, se visualizó el gel bajo luz UV. Se cortaron las bandas de interés con un bisturí estéril. El DNA se purificó utilizando el kit comercial Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Science), siguiendo paso a paso las instrucciones del fabricante.

Una vez purificadas las bandas de DNA, tanto de los insertos como del plásmido, se llevó a cabo una cuantificación en gel de agarosa. Para ello, se realizó un gel de agarosa al 2% (p/v) en TAE 1X (véase 4.10). Se cargaron 4 µl de Low DNA Mass Ladder y 4 µl de High DNA Mass Ladder. El marcador se encontraba diluido a la mitad por lo que en realidad se aplicaron 2 µl. De cada muestra a cuantificar se cargaron 2 µl. Tras la separación electroforética, se procedió a la visualización bajo luz UV. La determinación de la concentración se realizó por comparación por intensidad de banda de las muestras con las bandas de marcador. Las concentraciones de las bandas del marcador son conocidas y añadiendo la misma cantidad de muestra que de marcador (2 µl) se pudo hacer una correlación de concentraciones de DNA.

4.12.3. Reacción de ligación

En la mezcla de ligación de inserto con el plásmido pWPXLd Ires Neo tiene que haber una proporción vector:inserto 1:3. La cantidad de DNA de cada componente que hay que añadir viene dada por la ecuación: $Cantidad\ DNA\ (\mu g) = fentomol/3000 \cdot kb\ de\ fragmento$.

Una vez tuvimos la cantidad de DNA de inserto y vector que necesitábamos y con las concentraciones de cada uno de ellos, se calculó el volumen a adicionar de cada uno para mezcla de ligación (volumen=cantidad DNA necesario/[DNA]). Así se mezcló el volumen de inserto y de vector necesario, junto con 1 µl de enzima T4 DNA ligasa (New England BioLabs®), 2 µl de tampón para ligación y agua hasta completar un volumen total de 20 µl. Las mezclas se incubaron hasta el día siguiente a 16°C. La mezcla de ligación se conservó a -20°C hasta su uso.

4.13. Transformación de bacterias competentes

Las bacterias competentes utilizadas en el presente trabajo se especifican en el apartado 4.1.2. Todas las operaciones del presente trabajo que implique el trabajo con bacterias se realizaron en condiciones de esterilidad con mechero Bunsen y desinfectando la superficie de trabajo al inicio y al final con etanol al 70%.

Para llevar a cabo la transformación bacteriana se descongelaron alícuotas de 50 µl de bacterias competentes, mantenidas a -80°C y se mezclaron con 2 µl de ligación. Después, se mantuvieron 30 minutos en hielo y tras estos, se realizó el choque térmico incubando 45 segundos a 42°C. Tras 3 minutos en hielo, se añadieron 250 µl de medio Luria-Bertani (LB) sin antibiótico, se selló el eppendorf con parafilm y se colocó en orbital a 250 rpm, durante 1 hora a 37°C. Tras este tiempo, las bacterias se sembraron en placas de LB agar con el antibiótico correspondiente (kanamicina para pCR™-Blunt II-TOPO® y ampicilina para pWPXLd Ires Neo). La siembra se realizó con asa de vidrio, esterilizada previamente con etanol al 70%. Se dejaron crecer las bacterias durante toda la noche en estufa a 37°C.

4.14. Selección de colonias positivas: PCR de colonia

Tras una noche de incubación de las placas sembradas, se observó si había crecimiento de colonias. En el caso positivo, se comprobó que las colonias que se han formado a partir de una bacteria recombinante poseen el inserto de interés. Para esto se realizó una PCR de colonia, en la que se utilizó como cebador directo CHCHD6-F y el cebador CHCHD6-intR (Tabla 1. Anexo 2.1), el cual hibrida en la parte interna del gen de interés, amplificando un fragmento de 242 pb (véase Anexo 2).

Se picaron varias colonias con una punta de micropipeta estéril y se inoculó en eppendorf con 50 µl de LB sin antibiótico. A continuación, se incubaron los distintos eppendorf durante 30 minutos a 37°C para promover crecimiento microbiano. Tras estos, se dividió cada eppendorf: 20 µl se conservó a 4°C y con los otros 30 µl se continuó el proceso, calentando durante 5 minutos a 95°C. Después se centrifugó a 4000 rpm, 5 minutos. Del sobrenadante resultante se tomaron 2 µl para la realización de la mezcla de reactivos para la PCR que se muestran en la Tabla 7.1. La enzima polimerasa utilizada en esta reacción es la Taq DNA polimerasa (Ibian®), la cual lleva a cabo el programa que se muestra en la Tabla 7.2. Una vez realizada la reacción se comprobó si había productos de amplificación cargando las muestras en gel de agarosa al 1% (p/v) en TAE 1X, separando la muestra mediante electroforesis y finalmente se visualizaron los resultados bajo luz UV (véase apartado 4.10).

Tabla 7.1. Reactivos necesarios para PCR de colonia.

Reactivo	Vol. (µl)
Buffer 10X	2
dNTPs 10 mM	0,4
Cebador directo 10 µM	0,4
Cebador reverso (IntR) 10 µM	0,4
Taq Ibian	0,2
Sobrenadante colonia	2
H ₂ O gibco	14,6
Volumen total	20

Tabla 7.2. Programa para PCR específico de enzima Taq DNA polimerasa (Ibian®).

Temperatura	Tiempo
94°C	5 min
94°C	1 min
T _m (PCR) (Anexo 2.1)	1 min
72°C	30 seg/0,5 kb
72°C	5 min
4°C	∞

x30

4.15. Aislamiento de DNA plasmídico y cuantificación

Las colonias en las que se demostró que posea el plásmido mediante la PCR de colonia, se procedió al crecimiento bacteriano y la consiguiente extracción de DNA plasmídico. En primer

lugar, se prepararon tubos falcon de 15 ml a los que se les añadió 6 ml de cultivo LB líquido sin antibiótico. A cada tubo se añadió el antibiótico específico contra el que las bacterias recombinantes habían adquirido resistencia (kanamicina (50 µg/ml) para pCRTM-Blunt II-TOPO® y ampicilina (100 µg/ml) para pWPXLd Ires Neo). A continuación, a cada tubo de medios se inocularon los 20 µl de las alícuotas correspondientes a los cultivos bacterianos de las colonias positivas y que habían sido guardadas a 4°C (véase apartado 4.14). Todos los tubos se dejaron en orbital a 250 rpm, durante toda la noche a 37°C.

Al día siguiente, se procedió a la purificación del DNA plasmídico. Para el plásmido pCRTM-Blunt II-TOPO® se utilizó el kit comercial NucleoSpin® Plasmid EasyPure (Macherey-Nagel) y para el plásmido pWPXLd Ires Neo el kit NucleoSpin® Plasmid Transfection-grade (Macherey-Nagel). La diferencia entre estos dos kits es que el último contiene reactivos para la eliminación de endotoxinas producidas por bacterias que podrían dañar las células al transducir. En ambos casos se procedió siguiendo instrucciones del fabricante. Finalmente, se determinó la concentración de DNA purificado mediante el espectrofotómetro NanoVueTM Plus (GE Healthcare Life Science). Se depositó 2 µl de muestra para mirar concentración. Se tuvo en cuenta que los criterios de pureza para muestras de DNA: A_{280}/A_{260} en torno a 1,8.

4.16. Preparación de muestras para secuenciación.

Se comprobó por secuenciación la correcta clonación de los insertos. La secuenciación se realizó en el Servicio de Secuenciación de DNA de la empresa Secugen S.L. Todas las muestras se prepararon a una concentración de 100 ng/µl en un volumen total de 15 µl y por duplicado. A las muestras se les adicionó 1,5 µl de los cebadores pertinentes para la secuenciación. Finalmente, los resultados se analizaron con el programa de alineamiento de secuencias Codon Code Aligner v3.7.1, tomando como transcrito el gen *Mic25* (NM_001320610).

4.17. Herramientas informáticas y análisis estadístico

- ImageQuant TL, *1D gel analysis*, para cuantificación de membranas de Western Blot.
- StatView 6.0, programa con el cual se han realizado todos los análisis estadísticos. Los datos se expresaron como media ± desviación estándar (SD). Para evaluar la significancia estadística entre los grupos experimentales se utilizó la prueba de Mann Whitney. P-Valor menores de 0,05 ($p < 0,05$) se consideró estadísticamente significativo.
- GraphPad Prims 6, para la realización de gráficos del presente trabajo.
- Codon Code Aligner v3.7.1., para el análisis de los electroferogramas obtenidos por secuenciación Sanger.

5. RESULTADOS

5.1. Medida de niveles de ATP mitocondrial

Para determinar el efecto de las mutaciones en el gen *CHCHD6/Mic25* en el funcionamiento del sistema de fosforilación oxidativa, se realizaron medidas de los niveles de ATP mitocondrial. Para impedir la síntesis de ATP por la vía glucolítica se utilizó un medio sin glucosa y se añadió un inhibidor de una de las enzimas de la glucólisis. Se suplementó con piruvato para que se pudiera realizar el ciclo de Krebs y las células consiguieran poder reductor que se oxidara en la cadena de transporte de electrones.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3. Se realizaron 6 replicados de cada línea celular. Los niveles de ATP mitocondrial, tanto de fibroblastos control (C) como de fibroblastos derivados del paciente (P), se normalizaron por número de células viables y se representaron en porcentaje respecto a la línea de fibroblastos control (C), que se tomó como la máxima producción de ATP mitocondrial/célula viable (100%).

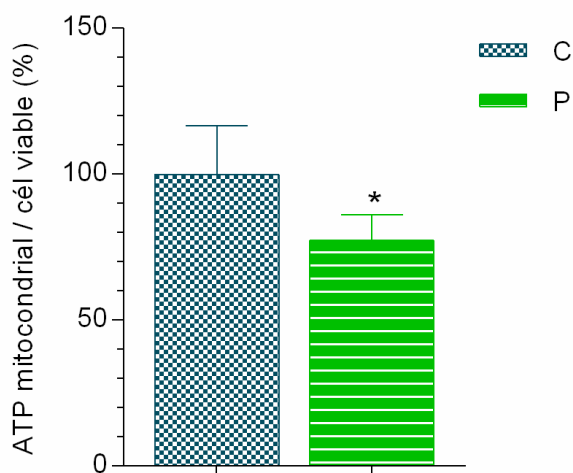


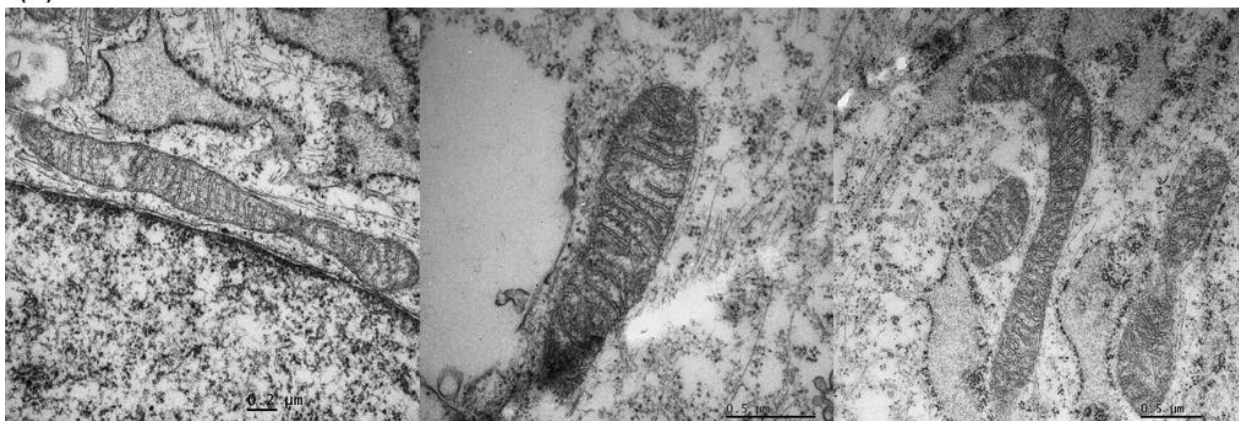
Figura 3. Niveles de ATP mitocondrial por célula viable en fibroblastos control y paciente. Las barras representan el porcentaje del nivel de ATP mitocondrial normalizado por el número de células, con respecto a la línea de fibroblastos control (C), tomando esta como la máxima productora de ATP mitocondrial/célula viable (100%). Los niveles de células viables se determinaron mediante fluorescencia y los niveles de ATP mediante luminiscencia. Ambas medidas se realizaron con el lector de placas NOVOSTar MBG (Labtech). El análisis estadístico se realizó con StatView 6.0, expresando los datos como media de ATP mitocondrial/células viables \pm desviación estándar (barra de error) de los seis replicados. La evaluación de la significancia estadística entre paciente y control se realizó con la prueba Mann Whitney. (*): Diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio (p valor < 0,05).

Los niveles del ATP mitocondrial por célula viable en fibroblastos derivados del paciente se encontraron reducidos en un 33% con respecto a los fibroblastos control. Según el análisis estadístico realizado esta diferencia entre paciente y control es significativa. Este resultado sugiere que las mutaciones en el gen *CHCHD6/Mic25* podrían afectar a las funciones bioenergéticas de la mitocondria en el paciente.

5.2. Microscopía electrónica

Para observar las crestas se prepararon las muestras tanto de fibroblastos control de edad 3 años (C) como de fibroblastos derivados del paciente (P) para su visualización por microscopía electrónica. Con las imágenes obtenidas (Figura 4) se trató de encontrar diferencias cualitativas en la morfología de las crestas de la membrana.

(A) Control



(B) Paciente

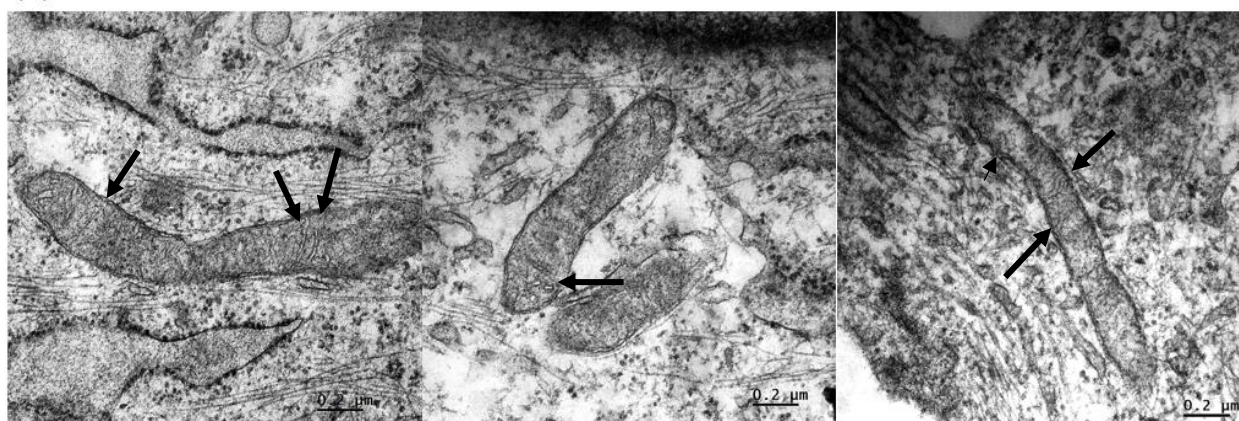


Figura 4. En las imágenes se observan la forma de distintas mitocondrias, con las estructuras de sus crestas, correspondientes a los fibroblastos control (A) y fibroblastos derivados del paciente (B). Las flechas negras marcan algunas de las crestas encontradas en fibroblastos derivados del paciente (B), las cuales no son tan definidas y son invaginaciones más cortas que en el control. La visualización se llevó a cabo en el Servicio de microscopía electrónica de sistemas biológicos (Servicio General de Apoyo a la Investigación-SAI, Universidad de Zaragoza).

Los resultados de la observación cualitativa no muestran diferencias en la morfología de las mitocondrias del paciente con respecto al control. Poseen una morfología ovalada, más o menos alargada, y algunas redondeadas. En cuanto a la estructura de las crestas mitocondriales, sí que se encontraron diferencias entre control y paciente. En el control (Figura 4.A) se observaron las crestas definidas, transversales y uniformes a lo largo de la mitocondria, mientras que en los fibroblastos derivados del paciente (Figura 4.B) se encontraron mitocondrias con un número de crestas menor. Las invaginaciones que formaban las crestas no eran tan definidas y eran más cortas, siendo pocas las que atravesaban casi toda la mitocondria de forma transversal.

5.3. Estudios de complementación funcional

Una vez que se obtienen mutaciones en un gen candidato mediante secuenciación masiva, es importante demostrar la patogenicidad de dichas mutaciones y así obtener un diagnóstico definitivo para un paciente. Una de las técnicas para este objetivo es demostrar que existe complementación funcional al expresar el gen candidato silvestre (wt) en las células derivadas del paciente y ver si se recupera la función de la proteína codificada por dicho gen.

Para los estudios de complementación se clonaron dos versiones del gen: la primera fue el marco de lectura abierto del gen *CHCHD6/Mic25*, **ORF *CHCHD6/Mic25* (708 pb)**, y la segunda el marco de lectura junto a la región 3'UTR, **ORF *CHCHD6/Mic25-3'UTR* (910 pb)** (Anexo 2). Esta última incluye secuencias reguladoras que podrían evitar la toxicidad de la proteína por sobreexpresión. Con la expresión de estas dos versiones se comprobaría si los fibroblastos derivados del paciente recuperan funciones tales como la síntesis de ATP mitocondrial o la formación de la estructura de las crestas.

Se procedió a la amplificación de ambas versiones a partir de RNA retrotranscrito de fibroblastos que poseían al gen silvestre y la clonación secuencial en los plásmidos pCRTM-Blunt II-TOPO® y el plásmido lentiviral pWPXLd Ires Neo. Ambas clonaciones se comprobaron mediante secuenciación antes de continuar con el proceso. La clonación en el primer plásmido fue correcta en ambas versiones, sin embargo, la clonación en el plásmido lentiviral solo fue exitosa en el caso de la versión ORF *CHCHD6/Mic25*. Utilizando esta versión, el grupo de Biogénesis y patología mitocondrial obtuvo dos líneas celulares transducidas a las que se les denominó: **C+*CHCHD6*wt**, derivada de fibroblastos control de 3 años y **P+*CHCHD6*wt**, obtenida a partir de fibroblastos derivados del paciente. Con estas dos líneas junto a las ya utilizadas hasta ahora (P, C) se continuó con los estudios.

5.4. Análisis de morfología de la red mitocondrial mediante inmunocitoquímica en las líneas celulares

Durante el mantenimiento de los cultivos celulares, se observó que el crecimiento de las líneas transducidas era más lento que el de las líneas no transducidas. Mediante microscopio óptico se observó una elongación de los fibroblastos transducidos (Figura S3, Anexo 4). En estado normal, los fibroblastos suelen tener una forma fusiforme o incluso estrellada, debido a las prolongaciones citoplásmicas. Por último, incluso después del proceso de selección de células que habían introducido el plásmido lentiviral, las células transducidas morían, observándose células despegadas en el medio de cultivo.

La red mitocondrial se observó mediante microscopía de fluorescencia tanto en las líneas transducidas (C+*CHCHD6*wt, P+*CHCHD6*wt) como en las líneas no transducidas (C, P). Los resultados se muestran en la Figura 5. En las imágenes se observan las mitocondrias en rojo debido a la tinción con Mitotracker® Red CMXRos (Invitrogen) y los núcleos en azul, debido a la tinción con DAPI.

De forma cualitativa, en las líneas no transducidas (C, P) se observó una red mitocondrial continua y uniforme, distribuida por toda la célula. A pesar de que el paciente tenga un defecto en una proteína mitocondrial, la morfología de las mitocondrias no estaba alterada, como también se vio en microscopía electrónica (Figura 4). En cuanto a las líneas transducidas, en C+*CHCHD6*wt no se encontraron diferencias evidentes con las líneas C y P. Sin embargo, en la línea P+*CHCHD6*wt se encontraron células con mitocondria distribuidas por toda la célula y células en las que no había una red continua y uniforme. En estas últimas se observaron puntos

de mayor fluorescencia roja, pareciendo que las mitocondrias estaban aglutinadas o habían aumentado de tamaño y cambiado su morfología.

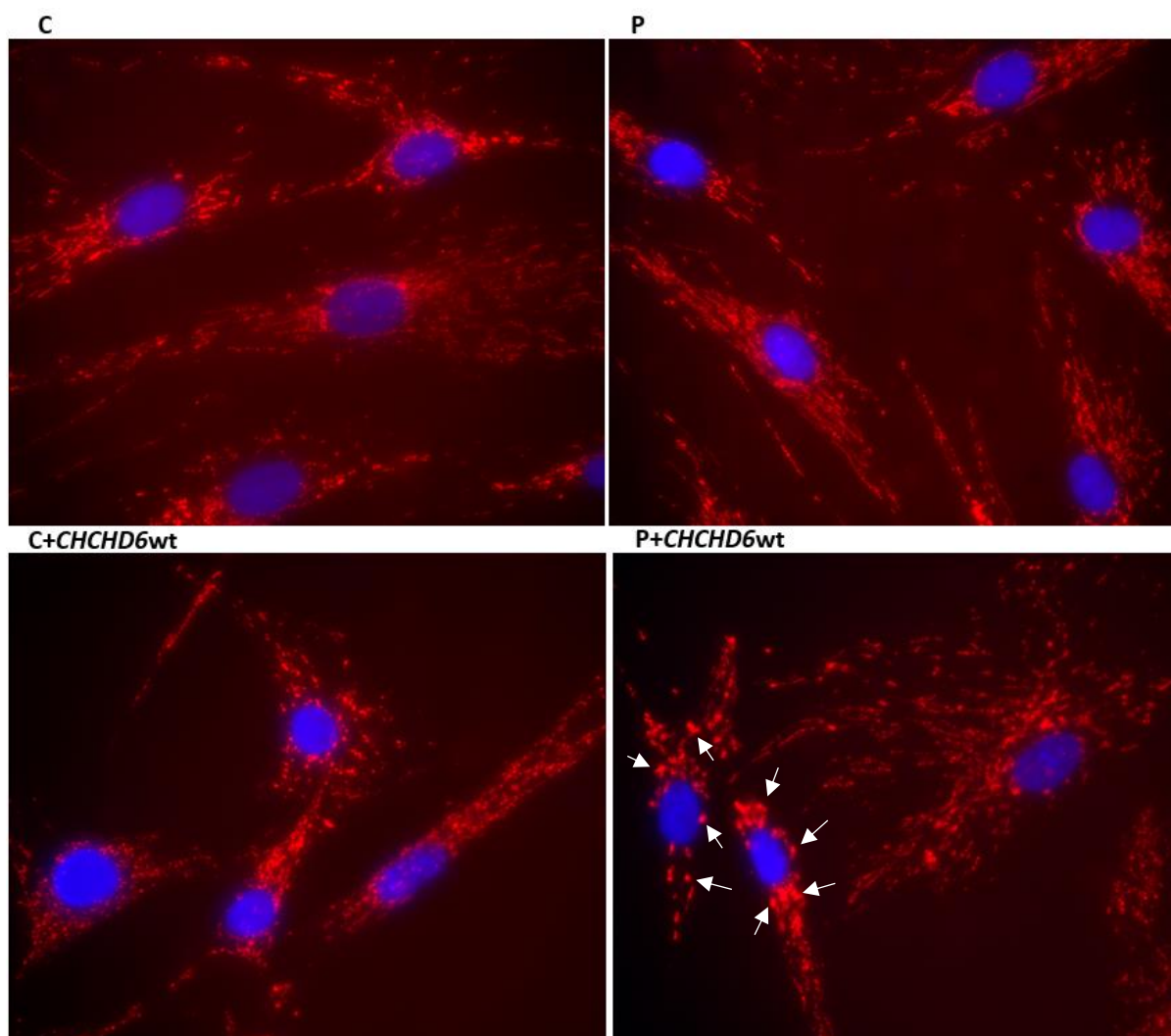


Figura 5. Imágenes de microscopía de fluorescencia (Aumentos: 400x). Se muestran las líneas C, C+*CHCHD6*wt, P, P+*CHCHD6*wt. Se utilizaron dos filtros para la observación: 573/20 para la observación de las mitocondrias (fluorescencia roja) y 357/50 para la observación de los núcleos (fluorescencia azul). Las flechas blancas indican mitocondrias con distinta morfología y tamaño encontradas en la línea P+*CHCHD6*wt.

Se puede concluir que entre las líneas no transducidas no se encuentran diferencias en la red mitocondrial, mientras que sí se encuentran diferencias cualitativas en la línea P+*CHCHD6*wt, lo que podría explicar el crecimiento lento de la misma. Sin embargo, los resultados de este ensayo no llevaron a la explicación del crecimiento lento de la línea C+*CHCHD6*wt, al no observarse diferencias claras.

5.5. Estudio de niveles de proteínas del sistema MICOS y del sistema OXPHOS en las líneas celulares

Con el fin de determinar si las mutaciones en el gen codificante de *CHCHD6*/Mic25 o la sobreexpresión del gen en líneas celulares afectaban a la homeostasis de distintas proteínas mitocondriales, se realizaron estudios de niveles de proteínas mediante Western blot. En primer lugar, se analizaron proteínas que forman parte del mismo subcomplejo MICOS que

CHCHD6/Mic25 y, en segundo lugar, se analizaron proteínas del sistema OXPHOS, ya que se había observado en el paciente una disminución del ATP mitocondrial.

Las membranas en las que habían sido transferidas las proteínas totales tras la separación electroforética se incubaron con los diferentes anticuerpos (Anexo 3) de las proteínas a analizar y se tomaron imágenes de las bandas detectadas (Figura 6.A, 7.A). También se incubaron con anticuerpo anti- α -tubulina que fue utilizado como estándar interno. La cuantificación de la intensidad de banda se realizó con el programa ImageQuant TL y se normalizó con respecto a la α -tubulina (Figura 6.B, 6.B). Con los datos obtenidos se realizó estadística para determinar si existía diferencia significativa entre los grupos de estudio mediante la prueba de Mann Whitney. Las medidas, tanto de línea control (C) como de la línea derivada del paciente (P), se realizaron por triplicado, mientras que de las líneas transducidas solo se obtuvo una muestra de proteínas totales debido al crecimiento celular lento.

5.5.1. Estudio de subunidades del sistema MICOS

Se estudió la homeostasis del subcomplejo Mic60, compuesto por CHCHD6/Mic25, su parólogo Mic19 y la proteína integral Mic60. Las líneas transducidas, al tener solo una muestra de proteínas totales, no se incluyeron en el análisis estadístico, pero se representaron para mostrar que la transducción se realizó correctamente (véase CHCHD6/Mic25 Figura 6.B).

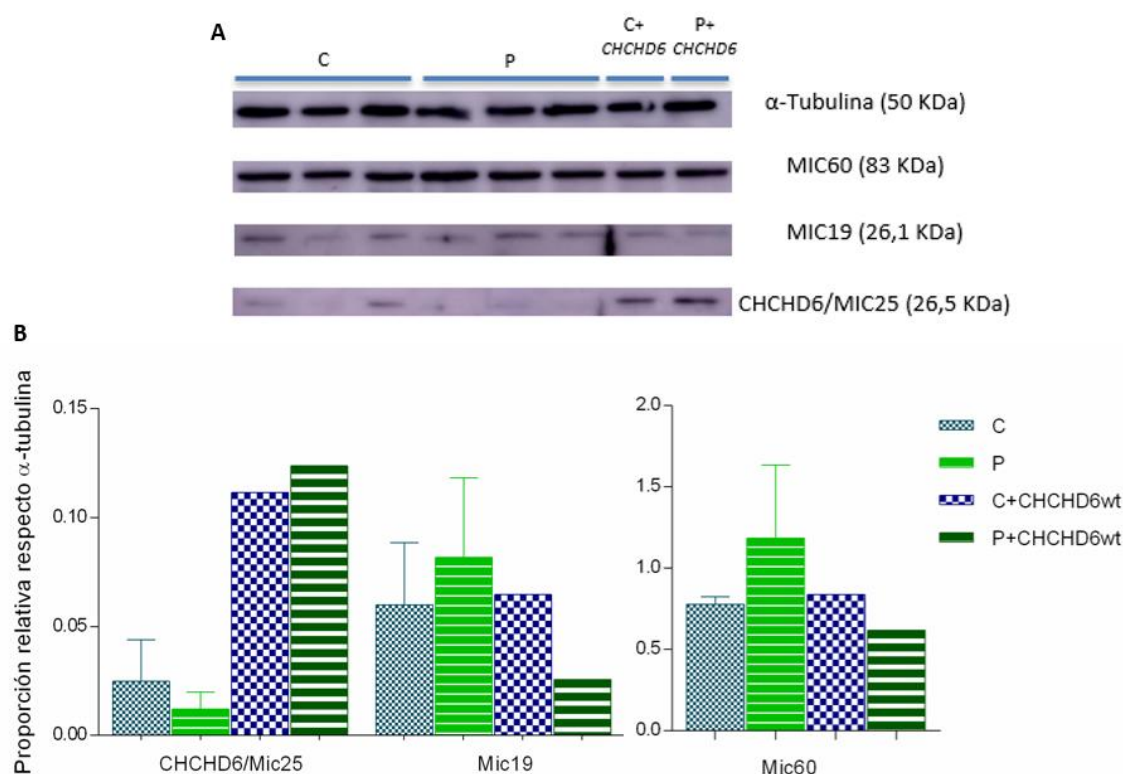


Figura 6. Estudio de la homeostasis del subcomplejo Mic60. A. Bandas detectadas tras la incubación con anticuerpos de las proteínas pertenecientes al subcomplejo Mic60. B. Análisis cuantitativo de la expresión de proteínas del subcomplejo Mic60: CHCHD6/Mic25, Mic19 y Mic60. Las barras representan la proporción relativa de proteína en cada línea, normalizada respecto a la cantidad de α -tubulina. La cuantificación de intensidad de banda se realizó mediante el programa ImageQuant TL. El análisis estadístico se realizó entre los grupos C y P, con el programa StatView 6.0 y los datos fueron representados como media \pm desviación estándar (barra de error) de tres replicados. La evaluación de la significancia estadística se hizo mediante la prueba Mann Whitney para valores de p-valor $<0,05$. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre C y P.

En el caso de la subunidad CHCHD6/Mic25 se comprobó que en el paciente tenía baja expresión de la proteína (Figura 6.A). En el control no se encontró una expresión mucho mayor, lo que sugiere que la expresión basal de esta proteína es baja y menor que la de Mic19 y Mic60 (Figura 6.A, 6.B). Mic60 tiene la mayor expresión de las proteínas analizadas. A diferencia de CHCHD6/Mic25, tanto Mic60 como Mic19 experimentan un ligero aumento de expresión en la línea derivada del paciente. Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre paciente y control en ninguna de las proteínas que pertenecen al subcomplejo Mic60.

Aunque no se consiguieron suficientes medidas de las líneas transducidas parece ser que en el caso del control transducido (C+CHCHD6wt) con respecto al control (C) se mantiene la expresión tanto de Mic60 como de Mic19. Sin embargo, en el caso del paciente transducido (P+CHCHD6wt) se observó una caída de la expresión en ambas proteínas con respecto al paciente sin transducir (P).

5.5.2. Estudio de subunidades del sistema OXPHOS

Al ver reducida la producción de ATP en las células del paciente, se estudió la homeostasis del sistema OXPHOS, responsable de esta función de la mitocondria. Los resultados se muestran en la Figura 7. El análisis cuantitativo de los niveles de expresión solo se realizó de las líneas derivada del paciente (P) y control (C) (Figura 7.B).

La expresión de subunidad SHDA del complejo II fue semejante en ambas líneas. En el resto de las subunidades analizadas se observó una mayor expresión en la línea derivada del paciente que en el control. Sin embargo, el análisis estadístico determinó que estas diferencias entre paciente y control eran significativas solo en la subunidad Core2 del complejo III y en la subunidad CoxII del complejo IV.

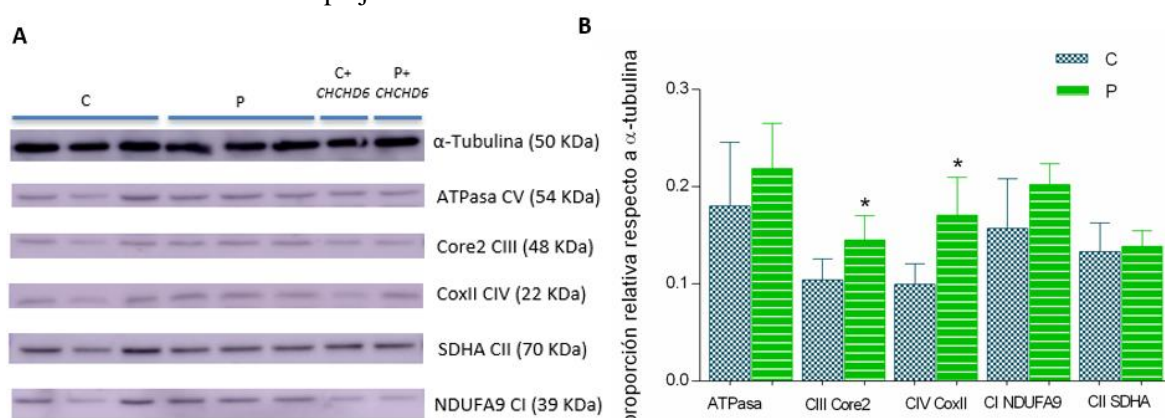


Figura 7. Estudio de la homeostasis de subunidades del sistema OXPHOS. A. Bandas detectadas tras la incubación con anticuerpos contra subunidades del sistema OXPHOS. B. Análisis cuantitativo de la expresión de las subunidades de los complejos del sistema OXPHOS. Las barras representan la proporción relativa de proteína en cada línea (P y C) normalizada respecto a la cantidad de α -tubulina. La cuantificación de intensidad de banda se realizó mediante el programa ImageQuant TL. El análisis estadístico se realizó con el programa StatView 6.0 representando los datos como media \pm desviación estándar (barra de error) de tres replicados. La evaluación de la significancia estadística se realizó mediante la prueba Mann Whitney. (*): Diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio (p valor<0,05).

A pesar de la disminución de los niveles de ATP mitocondrial observada en los fibroblastos derivados del paciente, algunos de los complejos respiratorios tienen la tendencia a aumentar su expresión en la línea celular que presenta mutaciones en el gen CHCHD6/Mic25 (P). Este aumento podría ser debido a un intento de compensación del déficit de ATP.

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente trabajo se ha estudiado la patogenicidad del gen *CHCHD6/Mic25*, el cual codifica para la proteína de mismo nombre que pertenece al sistema MICOS (Sistema de contacto mitocondrial y organización de crestas) de la mitocondria. Hasta el momento, en la literatura solo se han descrito dos pacientes, hermanos entre sí, con mutaciones en uno de los miembros del sistema MICOS, la proteína QIL1/Mic13 (20). Los estudios que proponen a *CHCHD10/Mic14* como nuevo miembro del complejo también son con células derivadas de paciente con mutaciones en este gen (11). De los demás miembros, incluido *CHCHD6/Mic25*, los estudios disponibles en la literatura son con líneas celulares modelos de mamíferos en las que, mediante métodos de ingeniería genética, se ha anulado la expresión del gen. En este trabajo, se han realizado estudios con fibroblastos derivados de un niño, con sintomatología de enfermedad mitocondrial y al que mediante secuenciación masiva se le encontraron mutaciones en el gen *CHCHD6/Mic25*. Se realizaron estudios comparativos con fibroblastos de un niño de 3 años, utilizados como control y se llevó a cabo un estudio de complementación funcional para comprobar que la causa de la enfermedad del paciente se debía a las mutaciones en el gen.

Mediante microscopía electrónica se comprobó que las mutaciones en *CHCHD6/Mic25* producían desestabilización de las crestas mitocondriales (Figura 4), puesto que en la línea celular derivada del paciente se observó una reducción del número de crestas. Las crestas que se observaron tenían menos longitud, sin embargo, se seguían observando como invaginaciones de la membrana interna. En estudios encontrados en la bibliografía, en los que se eliminaron otras subunidades del complejo MICOS, se vio que la eliminación de *Mic60* traía efectos fenotípicos más drásticos, que no se observaban con la eliminación de *CHCHD6/Mic25*. En estos casos la estructura de las crestas cambiaba, denominándola “estructura de cebolla”, ya que poseían crestas concéntricas (15,18).

La producción de ATP mitocondrial se lleva a cabo mediante el proceso de fosforilación oxidativa por los complejos de la cadena respiratoria (sistema OXPHOS) (4). Los diferentes complejos están colocados en las crestas que forma la membrana interna mitocondrial (1,2) (Figura 2). Debido a que el paciente presentaba una sintomatología de enfermedad mitocondrial se estudiaron los niveles de ATP mitocondrial producido por célula viable. Este ensayo mostró diferencias significativas entre control y paciente (Figura 3), sugiriendo que las mutaciones en el gen afectan a las funciones bioenergética de la célula. Esto puede ser una consecuencia indirecta de la disminución del número de crestas, haciendo que los complejos no se puedan ensamblarse correctamente y llevar a cabo su función. En un trabajo en el que se eliminó *Mic60*, se demostró que su ausencia llevaba a una disminución mayor de ATP, a la vez que un efecto mayor en la desestabilización de las crestas (18). En este trabajo también se ha estudiado la homeostasis de subunidades del sistema OXPHOS mediante Western blot (Figura 7). A pesar de la disminución de la producción de ATP en las células del paciente, los niveles de expresión de las subunidades pertenecientes a los distintos complejos tendían a aumentar con respecto al control, aunque la diferencia solo fue significativa en el caso de los complejos III y IV. Estos resultados sugieren que la célula exprese más cantidad de complejos para compensar el déficit de ATP. La disminución de ATP podría deberse a que el cambio de estructura de las crestas no proporcione una curvatura óptima. Por tanto, a pesar de que los complejos de la cadena respiratoria bombeen protones al espacio intermembrana, las crestas no concentren bien los protones en torno al complejo V y el proceso de fosforilación oxidativa pierda eficacia.

El sistema MICOS está formado por dos subcomplejos: subcomplejo *Mic60* y subcomplejo *Mic10*. *CHCHD6/Mic25* pertenece al primero de ellos, del cual también se estudió los niveles de expresión de las proteínas que forman parte: *Mic60*, *Mic19* y *CHCHD6/Mic25* (Figura 6). Los resultados indican que las mutaciones en el gen *CHCHD6/Mic25* no afectan a la homeostasis del subcomplejo, manteniéndose la expresión de *Mic60* y *Mic19* en control y

paciente. La ausencia de *CHCHD6/Mic25* se ha visto en estudios anteriores que no afectaba al resto de subunidades del sistema MICOS (10,14,18). Al ser una proteína periférica, puede ser que su eliminación no afecte al resto del subcomplejo. Por el contrario, la eliminación de la proteína integral *Mic60* sí que causa una disminución importante tanto de *CHCHD6/Mic25* como *Mic19* (10,14,18). Ambos parálogos están unidos a *Mic60* por el dominio CHCH en su extremo C-terminal, quedando así orientadas hacia el espacio intermembrana(15,17).

Para validar que la causa de la patología del paciente son las mutaciones en nuestra proteína, se intentó llevar a cabo estudios de complementación funcional y así ver si se recuperaban los niveles de ATP y la morfología normal de las crestas. Sin embargo, la velocidad de crecimiento de las líneas transducidas era menor que las líneas no transducidas y las células no sobrevivían. Como muestran los niveles de proteínas (véase *CHCHD6/Mic25* en P+*CHCHD6*wt y C+*CHCHD6*wt, Figura 6), la transducción del gen se realizó de forma exitosa, ya que estas líneas sobreexpresaban la proteína. En las líneas control (C) se muestra una expresión basal baja de la proteína. Esta expresión es menor que la de su parálogo *Mic19* en la misma línea celular (Figura 6). Esto nos lleva a la hipótesis de que quizá las células no soportan una expresión tan alta de la proteína, resultando tóxica para ellas, ralentizando su crecimiento y produciendo la muerte celular. Alta cantidad de esta proteína podría afectar a otras rutas de la mitocondria como la producción de energía.

La red mitocondrial de las distintas líneas se estudió mediante microscopía de fluorescencia (Figura 5). De forma cualitativa no se observaron diferencias evidentes entre las líneas C, P, C+*CHCHD6*wt. Sin embargo, en la línea P+*CHCHD6*wt la red experimentaba un cambio en el que se veía las mitocondrias con una morfología diferente y un aparente aumento de tamaño. Esta morfología recuerda a la descrita en un estudio anterior, en los que la proteína ausente era *Mic60*(14). En este observaron que al eliminar *Mic60*, pero no al eliminar *CHCHD6/Mic25*, se producía un cambio en el que la mitocondria se alargaba y adoptaba una forma en espiral. A este tipo de mitocondrias se les denominó “mitocondrias gigantes”(14). El estudio de niveles de proteínas de la línea P+*CHCHD6*wt (Figura 6), muestra una disminución considerable de *Mic60* en esta línea con respecto a P, resultado que podría explicar el cambio observado por microscopía de fluorescencia. Desafortunadamente, no se consiguieron suficientes replicados de las líneas transducidas como para realizar un análisis estadístico y sacar conclusiones concluyentes.

Finalmente, los estudios encontrados en la bibliografía disminuían o anulaban la expresión de *CHCHD6/Mic25* mediante técnicas de ingeniería genética. Sus ensayos mostraban que los efectos fenotípicos eran leves tanto en la afectación a la estructura de las crestas mitocondriales como en las funciones bioenergéticas (10,14,15,18), sugiriendo que la proteína tenga una función regulatoria o que su función sea compensada por la presencia de su parálogo *Mic19* (10,13,14,18). Sin embargo, los resultados de los ensayos a nivel celular de este trabajo sugieren que las mutaciones en el gen *CHCHD6/Mic25* pueden ser la causa de los síntomas de patología mitocondrial observados en el paciente. En estudios futuros, dada la relación de subunidades del complejo MICOS con la estabilidad del mtDNA (11,14), se estudiará como afectan las mutaciones en *CHCHD6/Mic25* en el número de copias del mtDNA. También se tratará de modular la expresión del gen *CHCHD6/Mic25* en las líneas transducidas. Esto se podría llevar a cabo con un plásmido con promotor inducible, de tal forma que podamos hacer que se exprese durante poco tiempo y tener menos cantidad de proteína. Así se tendría un muestreo suficiente para hacer los estudios de complementación necesarios para concluir la patogenicidad de las mutaciones del gen en el paciente.

7. CONCLUSIONES

7.1. Conclusiones

1. Los fibroblastos derivados del paciente (P) tienen niveles de ATP menores que los fibroblastos control (C).
2. Cualitativamente, células con mutaciones en el gen *CHCHD6/Mic25* (P) tienen una estructura de las crestas mitocondriales alterada y se observa una disminución del número de estas.
3. Los niveles de expresión de Mic19 y Mic60 no se ven alterados en el paciente (P).
4. Las subunidades Core2 del complejo III y CoxII del complejo IV del sistema OXPHOS experimentan un aumento en su expresión estadísticamente significativo.
5. Es necesario modular la sobreexpresión del gen *CHCHD6/Mic25* para estudiar la complementación funcional en fibroblastos derivados del paciente y confirmar la patogenicidad de las mutaciones del paciente.

7.2. Conclusions

1. Patient-derived fibroblasts (P) have lower ATP levels than control fibroblasts (C).
2. Qualitatively, *CHCHD6/Mic25* mutant cells (P) have a structure of mitochondrial cristae which is disturbed and a decrease in the number of cristae is observed.
3. Expression levels of Mic19 and Mic60 do not change in the patient (P).
4. Core2 of complex III and CoxII of complex IV subunits of OXPHOS system have a statistically significant expression increase.
5. It is necessary to modulate the overexpression of *CHCHD6/Mic25* gene to study functional complementation in patient-derived fibroblasts and to confirm the pathogenicity of patient mutations.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rampelt H, Zerbes RM, van der Laan M, Pfanner N. Role of the mitochondrial contact site and cristae organizing system in membrane architecture and dynamics. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2016; 1864: p. 737-46.
2. van der Laan M, Horvath SE, Pfanner N. Mitochondrial contact site and cristae organizing system. *Curr Opin Cell Biol.* 2016; 41: p. 33-42
3. Calvo SE, Mootha VK. The Mitochondrial Proteome and Human Disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2010; 11 (2): p.1-20.
4. Montoya Villaroya J. Del genoma mitocondrial a la enfermedad. 1ª edición. Zaragoza: Prensas Universitarias de Zaragoza; 2010.
5. Kirby DM, Thorburn DR. Approaches to Finding the Molecular Basis of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation Disorders. *Twin Res Hum Genet.* 2008;11(4): p. 395–411.
6. Enríquez JA. Supramolecular Organization of Respiratory Complexes. *Annu Rev Physiol.* 2016; 78(1): p. 533–61.
7. Dudkina NV, Kouril R, Peters K, Braun H-P, Boekema EJ. Structure and function of mitochondrial supercomplexes. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2010; 1797: p. 664-70.
8. Scarpelli M, Todeschini A, Volonghi I, Padovani A, Filosto M. Mitochondrial diseases: advances and issues. *Appl Clin Genet.* 2017; 10: p. 21-26.
9. Kremer LS, Prokisch H. Identification of disease-causing mutations by functional complementation of patient-derived fibroblast cell lines. *Methods Mol Biol.* 2017; 1567: p. 391–406.
10. Ott C, Dorsch E, Fraunholz M, Straub S, Kozjak-Pavlovic V. Detailed analysis of the human mitochondrial contact site complex indicate a hierarchy of subunits. *PLoS One.* 2015; 10(3): p. 1-15. Disponible en: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0120213>.
11. Genin EC, Plutino M, Bannwarth S, Villa E, Cisneros-Barroso E, Roy M, et al. CHCHD10 mutations promote loss of mitochondrial cristae junctions with impaired mitochondrial genome maintenance and inhibition of apoptosis. *EMBO Mol Med.* 2015; 8(1): p. 58–72.
12. Strauss M, Hofhaus G, Schröder RR, Kühlbrandt W. Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *EMBO J.* 2008; 27: p. 1154–60.
13. Utsumi T, Matsuzaki K, Kiwado A, Tanikawa A, Kikkawa Y, Hosokawa T, et al. Identification and characterization of protein N-myristoylation occurring on four human mitochondrial proteins, SAMM50, TOMM40, MIC19, and MIC25. *PLoS One.* 2018; 13(11): p. 1-17 . Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206355>.
14. Li H, Ruan Y, Zhang K, Jian F, Hu C, Miao L, et al. Mic60 / Mitofilin determines MICOS assembly essential for mitochondrial dynamics and mtDNA nucleoid organization. *Cell Death Differ.* 2016; 23: p. 380–92.
15. An J, Shi J, He Q, Lui K, Liu Y, Huang Y, et al. CHCM1/CHCHD6, novel mitochondrial protein linked to regulation of mitofilin and mitochondrial cristae morphology. *J Biol Chem.* 2012; 287(10): p. 7411–26.
16. UniProtKB [Internet]. Uniprot Consortim; 2002 [2019, junio 2019]. MIC25_HUMAN (Q9BRQ6); 1. Disponible en: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9BRQ6>.
17. Darshi M, Mendiola VL, Mackey MR, Murphy AN, Koller A, Perkins GA, et al. ChChd3, an inner mitochondrial membrane protein, is essential for maintaining crista integrity and mitochondrial function. *J Biol Chem.* 2011; 286(4): p. 2918–32.
18. Ding C, Wu Z, Huang L, Wang Y, Xue J, Chen S, et al. Mitofilin and CHCHD6 physically interact with Sam50 to sustain cristae structure. *Sci Rep.* 2015; 5: p. 1-11. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/srep16064>.
19. Ensembl release 96 [Internet]. EMBL-EBI. [Julio 2019; Junio 2019]. CHCHD6 (Human Gene) ENSG00000159685; 1 Disponible en: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000159685;r=3:126704220-126960406
20. Guarani V, Jardel C, Chrétien D, Lombès A, Bénit P, Labasse C, et al. QIL1 mutation causes MICOS disassembly and early onset fatal mitochondrial encephalopathy with liver disease. *eLife.* 2016; 52016;5: p. 1-18. Disponible en: <https://doi.org/10.7554/eLife.17163>.

Figura S2. Mapa genético del plásmido lentiviral pWPXLd Ires Neo. Plásmido obtenido por el grupo de Biogénesis y patología mitocondrial a partir del vector pWPXLd (Tronolab). La secuencia IRES-Neo se tomó del plásmido pQCXI-N, mediante el corte con enzimas EcoRV y BamHI. pWPXLd se digirió con SmaI y BamHI, eliminando *EGFP*. pWPXLd Ires Neo es un plásmido lentiviral con gen de resistencia a Ampicilina para la selección de bacterias recombinantes y gen de resistencia a Neomicina para la selección de células transducidas. Tiene una longitud de 11.331 pb. Imagen original pertenece al plásmido pWPXLd, obtenido del repositorio de plásmido *addgene*, entrada #12258 (<https://www.addgene.org/12258/>). La imagen ha sido modificada para explicar los cambios realizados para la obtención del plásmido utilizado en este trabajo.

Anexo 2. Secuencia *CHCHD6/Mic25*

Secuencia completa del gen *CHCHD6/Mic25*. Se muestra subrayado las zonas en las que hibridan los cebadores diseñados para la amplificación de los diferentes fragmentos utilizados en el presente trabajos (Tabla 1, Anexo 2.1.).

Transcrito *CHCHD6-201* (ENST00000290913.7) (19)

```

1  CGCGGCCGCGCGAGTCCTGGAAGCGTTGTTGGCCCGGTTGCTCTGGAGCCGGGTCTCGG      60
61  GTCTGGTGGCTGCCGGCCCTGCGGCATCTCGCCATGGGGAGCACGGAGAGCAGCGAGGGC      120
121 CGCAGGGTGTCTTCGGAGTGGACGAGGAGGAGCGGGTCCGGGTGCTGCAGGGTGTCCGG      180
181 CTGTCTGAAAACGTGGTGAACCGCATGAAGGAGCCCAGCTCTCCACCCCCTGCTCCCACA      240
241 TCTTCTACCTTTGGCCTTCAAGATGGCAACTTGAGAGCCCCCTCACAAGAATCCACACTG      300
301 CCCAGGTTCGGGGAGCAGTGGTGGCCAGCAGCCCTCAGGGATGAAGGAGGGTGTCAAGAGG      360
361 TATGAACAGGAGCATGCTGCTATCCAGGATAAGCTCTTCCAGGTGGCAAAGAGGGAAAGA      420
421 GAGGCTGCCACCAAGCACTCCAAGGCATCCCTGCCCACGGGCGAAGGCAGCATCAGCCAT      480
481 GAGGAGCAGAAGTCAGTCCGGCTGGCCAGGGAGCTGGAGAGCAGAGAGGCAGAGCTAAGA      540
541 CGCCGTGACACCTTCTACAAGGAGCAGCTGGAGCGTATTGAGAGGAAGAATGCTGAGATG      600
601 TATAAACTGTCTTCAGAGCAATTCCATGAGGCAGCCTCAAAGATGGAGAGCACAATAAAG      660
661 CCCCCGAGGGTGGAGCCCCGTCTGCTCAGGGTTGCAGGCCAGATTCTCCACTGCTACCGA      720
721 GATCGCCCCGATGAGGTGCTGCTGTGCTCGGACCTGGTCAAGGCATACCAGCGCTGCGTG      780
781 AGCGCCGCCCAAGGGCTGAGGAGCAGACATCATTCCTGCCCTGGCAGTGACTTGGAG      840
841 CCCTGAAGAAGGGACCAATCATGGGACCACAGCCACTGTGCCCTGCCGTTTCTCTGCTGGG      900
901 CCCCTGCATATGCCCTGAGCCTGGGGCTGCCACGTGTTTAGGAAACAAAGTATGCGCTA      960
961 CTGTCTGAAAACAAATAAAGCAGATGCCTTTGTTTTTCAGTCGTTGA      1006

```

Marco de lectura abierto del gen *CHCHD6/Mic25* se encuentra resaltado en *cursiva*. El marco incluye también las secuencias de los cebadores CHCHD6-F, CHCHD6 intR y CHCHD6-R. Los distintos cebadores utilizados para los distintos ensayos se muestran con distinto patrón de subrayado (véase Tabla 1, Anexo 2.1)

2.1. Cebadores

Tabla 1. Cebadores utilizados para los dos productos amplificados deseados. La secuencia amplificada en cada caso se muestra en el Anexo 2. En la secuencia de los cebadores se encuentra subrayada la secuencia de restricción añadida y en **negrita** la secuencia Kozak, en el caso de haberse incluido. La temperatura de hibridación ha sido calculada mediante Tm Calculator de Thermo Fisher Scientific.

Ensayo	Producto amplificado	Cebadores	Secuencia (5'→3')	Tm 1 (°C)	Tm 2 (°C)	Tm (PCR)*	
						Tm1	Tm2
Reacción en cadena de la polimerasa (4.9)	ORF <i>Mic25/CHCHD6</i> (708 pb)	<u>CHCHD6-F</u>	<u>GTTTAAACGCCACCAT</u> GGGGAGCACGGAGAGC AGC	64,3	75,8	64	72
		<u>CHCHD6-R</u>	<u>GGATCCTCAGCCCTTGT</u> GGGCGGCGCT	69,2	76,8		

Reacción en cadena de la polimerasa (4.9)	ORF+3' UTR (cDNA: 910 pb)	<u>CHCHD6-F</u>	<u>GTTTAAACGCCACCAT</u> GGGGAGCACGGAGAGC AGC	64,3	75,8		
		<u>CHCHD6-cDNA-R</u>	<u>GGATCCTCAACGACTGA</u> AAACAAAGGCATC	56,2	66,3	56	70,3
Selección de colonias positivas: PCR en colonia (4.14)	Fragmento interno gen <i>CHCHD6</i> (240 pb)	<u>CHCHD6-F</u>	<u>GTTTAAACGCCACCAT</u> GGGGAGCACGGAGAGC AGC	64,3	75,8		
		<u>CHCHD6-intR</u>	<u>GAGGGCTGCTGGCCA</u> CCACTGC	-	-	57**	-

**T_m* (PCR) hace referencia a la temperatura utilizada en el programa del termociclador.

** Para el programa de la enzima Taq DNA polimerasa (Ibian®) la temperatura recomendada es 57°C, independientemente de su temperatura de hibridación.

Anexo 3. Anticuerpos

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en los ensayos de inmunodetección realizados en el presente TFG.

*Anti-Mouse y Anti-Rabbit, son los anticuerpos secundarios conjugados con enzima.

Anticuerpo		Peso (kDa)	Concentración	Anti-Anticuerpo	Casa comercial
Total OXPHOS Human Antibody Cocktail (monoclonal)	ATPasa (CV)	54	1:1500	Anti-Mouse	abcam
	Core 2 (CIII)	48			
	SDHB (CII)	29			
	COX II (CIV)	22			
	NDUFB8 (CI)	18			
Anti-NDUFA9 (CI) (monoclonal)		36	1:1000	Anti-Mouse	ThermoFisher
Anti-SDHA (CII) (monoclonal)		72,6	1:2000	Anti-Mouse	ThermoFisher
Anti-Actina (policlonal)		42	1:10.000	Anti-Rabbit	Sigma
Anti-Tubulina (monoclonal)		50	1:10.000	Anti-Mouse	Sigma
Anti-MIC19 (policlonal)		26	1:1000	Anti-Rabbit	Cedido por el Prof. Peter Rehling, (Georg-August-Univesität, Göttingen).
Anti-MIC25 (policlonal)		≈26	1:1500	Anti-Rabbit	Cedido por el Prof. Peter Rehling, (Georg-August-Univesität, Göttingen).
Anti-MIC60 (policlonal)		83	1:200	Anti-Rabbit	Cedido por el Prof. Peter Rehling, (Georg-August-Univesität, Göttingen).
Anti-Mouse*		-	1:5000	-	Amersham
Anti-Rabbit*		-	1:5000	-	Amersham

Anexo 4. Imágenes a microscopio óptico de las líneas celulares

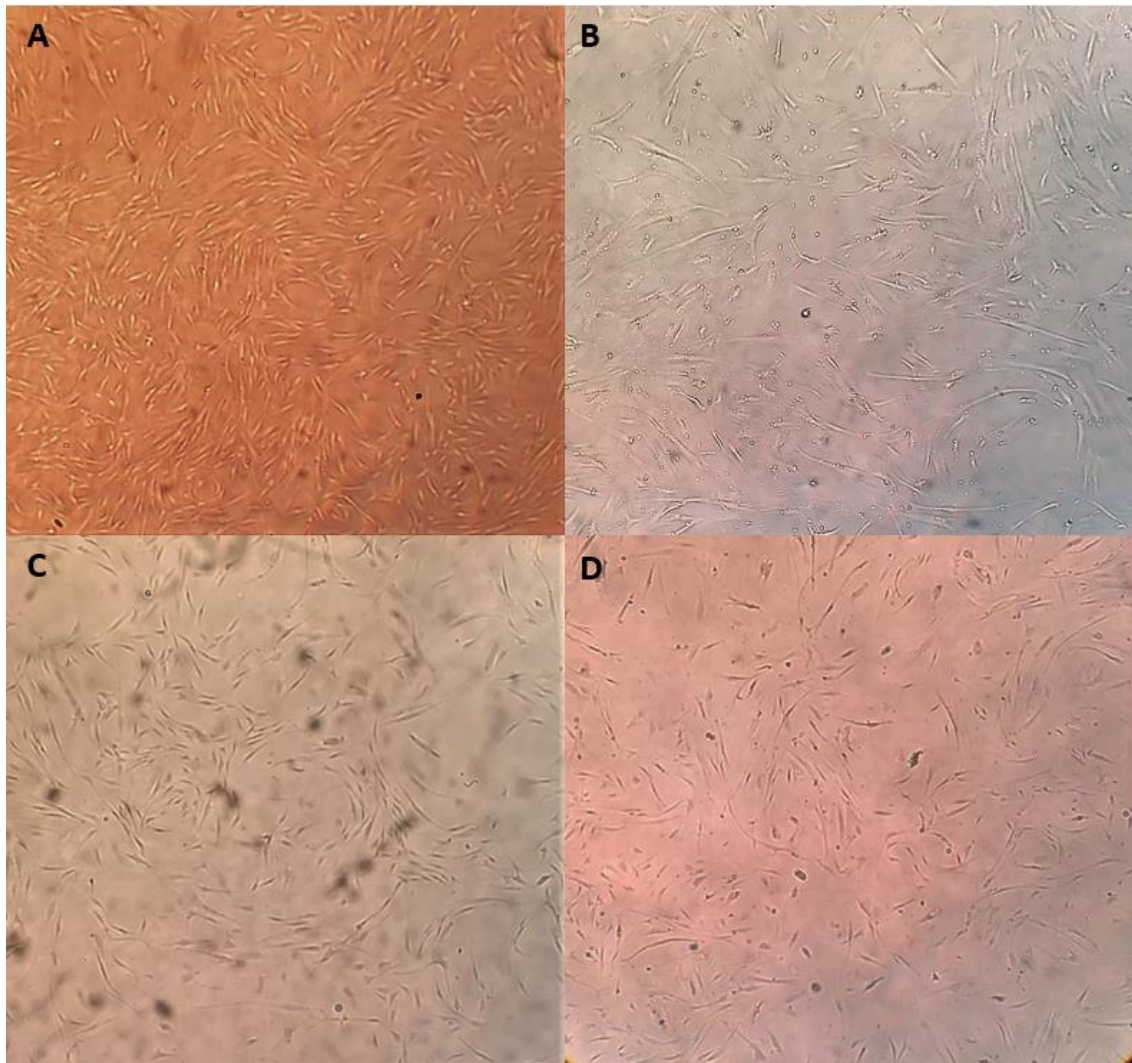


Figura S3. Imágenes al microscopio óptico de las distintas líneas celulares (Aumento: 40x). A. Fibroblastos control (C). B. Fibroblastos control transducidos (C+*CHCHD6*wt). C. Fibroblastos derivados de paciente (P). D. Fibroblastos derivados de paciente transducidos (P+*CHCHD6*wt). Las imágenes se tomaron al observar un crecimiento lento de las líneas transducidas y que las células no sobrevivían. Se observa una elongación de los fibroblastos transducidos (B, D) con respecto a los fibroblastos no transducidos (A, C)