

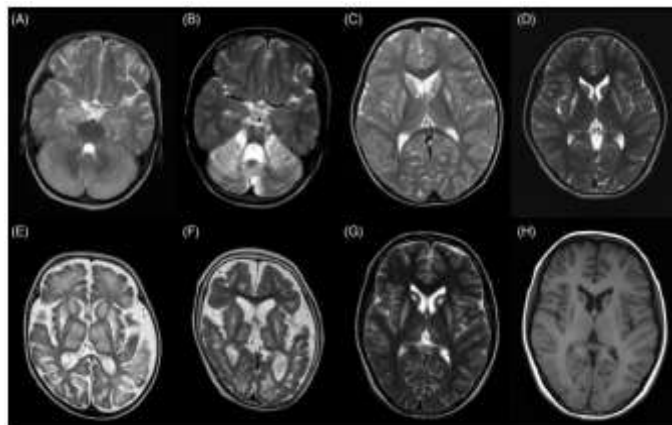
# Mutaciones en ARNt mitocondriales asociadas al síndrome de Leigh: Estudio de la mutación m.5537T

*Mitochondrial tRNAs mutations associated to Leigh  
syndrome: m.5537T mutation analysis*

Trabajo Fin de Grado. Grado en Biotecnología.

**Autora: Marina Martínez Cruz**

**Directoras: Sonia Emperador Ortiz / Carmen Hernández Aínsa**



Grupo de Biogénesis y Patología Mitocondrial. Departamento de  
Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Facultad de Veterinaria.

# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	
<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>1</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>2</b>
1.1 ADN MITOCONDRIAL Y ENFERMEDADES MITOCONDRIALES .....	2
1.2 ENCEFALOMIOPATÍA NECROTIZANTE SUBAGUDA O SÍNDROME DE LEIGH .....	3
1.2.1 <i>Etiología</i> .....	3
1.2.2 <i>Manifestaciones clínicas</i> .....	3
1.2.3 <i>Diagnóstico</i> .....	4
1.2.4 <i>Tratamiento</i> .....	5
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>5</b>
<b>3 METODOLOGÍA</b> .....	<b>6</b>
3.1 METODOLOGÍA PARA LA BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA.....	6
3.2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	7
3.2.1 <i>MATERIALES</i> .....	7
3.2.1.1 Material biológico y líneas celulares .....	7
3.2.1.2 Aparatos e instrumentos.....	7
3.2.2 <i>REACTIVOS</i> .....	7
3.2.2.1 Reactivos generales y kits comerciales .....	7
3.2.2.2 Medios de cultivo y material estéril .....	8
3.2.3 <i>MÉTODOS</i> .....	8
3.2.3.1 Técnicas de cultivo celular.....	8
3.2.3.1.1 Mantenimiento de los cultivos celulares .....	8
3.2.3.1.2 Tripsinización de los cultivos celulares.....	8
3.2.3.1.3 Recuento celular.....	8
3.2.3.1.4 Congelación de células .....	9
3.2.3.1.5 Selección clonal mediante dilución al límite .....	9
3.2.3.2 Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos .....	10
3.2.3.2.1 Extracción de ADN total a partir de lisados celulares con kit.....	10
3.2.3.2.2 Extracción de ADN total a partir de lisados con fenol-cloroformo .....	10
3.2.3.2.3 Cuantificación de ADN.....	10
3.2.3.2.4 PCR-RFLP .....	11
3.2.3.2.4.a Proceso de amplificación: reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	11
3.2.3.2.4.b Digestión de productos de PCR con enzimas de restricción .....	12
3.2.3.2.4.c Separación electroforética de ácidos nucleicos .....	12
3.2.3.2.5 Cuantificación del número de copias de ADNmt mediante RT-PCR .....	12
<b>4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>14</b>
4.1 MUTACIONES EN ARNt MITOCONDRIALES Y EN GENES NUCLEARES Y SU IMPLICACIÓN EN EL SÍNDROME DE LEIGH .....	14
4.2 ARNt TRIPTÓFANO: MUTACIONES Y ENFERMEDAD.....	15
4.3 MUTACIÓN M.5537T: CASOS DESCRITOS Y PATOGENICIDAD .....	16

4.4	OBTENCIÓN DE CLONES CON DIFERENTES PORCENTAJES DE HETEROPLASMA DE UN CÍBRIDO PORTADOR DE LA MUTACIÓN M.5537Ti.....	18
4.4.1	<i>Comprobación de la incorporación de la mutación m.5537Ti en el híbrido generado y análisis del porcentaje de heteroplasma: selección de clones para el estudio.....</i>	18
4.4.2	<i>Análisis del número de copias de ADNmt de los clones seleccionados .....</i>	20
5	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>22</b>
	<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>23</b>
6	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>24</b>
7	<b>ANEXOS .....</b>	<b>26</b>
7.1	ANEXO I: TABLA DE APARATOS E INSTRUMENTOS .....	26

## **ABREVIATURAS**

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNmt: ADN mitocondrial

ADNn: ADN nuclear

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ARNr: ARN ribosómico

ARNt: ARN de transferencia

ATP: Adenosin Trifosfato

COX: citocromo-c oxidasa

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: deoxyribonucleic acid

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

FAM: 6-carboxifluoresceína

Filtro ND: Filtro de Densidad Neutra

HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia

H strand: cadena pesada del ADNmt

IAC: alcohol isoamílico-cloroformo

L strand: cadena ligera del ADNmt

MELAS: síndrome de encefalopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios stroke-like

MERF: síndrome de epilepsia mioclónica asociada a fibras rojas rasgadas

MRI: imagen por resonancia magnética

MRS: espectroscopía de resonancia magnética

mtDNA: mitochondrial DNA

MTFMT: metionil-ARNt formiltransferasa mitocondrial

NGS: secuenciación de nueva generación

OH: origen de replicación de la cadena pesada del ADNmt

OL: origen de replicación de la cadena ligera del ADNmt

OXPHOS: sistema de fosforilación oxidativa

pb: pares de bases

PBS: tampón fosfato salino

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PH: origen de transcripción de la cadena pesada del ADNmt

PL: origen de transcripción de la cadena ligera del ADNmt

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

RNA: ribonucleic acid

ROS: especies reactivas de oxígeno

rpm: revoluciones por minuto

RT-PCR: PCR a tiempo real

SDS: dodecilsulfato sódico

SFB: Suero Fetal Bovino

Succinil-CoA: succinil Coenzima A

T<sup>ª</sup>: temperatura

Tris: 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol

tRNA: transference RNA

UZ: Universidad de Zaragoza

VIC: 2-cloro-7-fenil-1,4-dicloro-6-carboxifluoresceína

WoS: Web of Science

WT: wild-type

ρ<sup>º</sup>: Rho 0, células carentes de ADNmt

## **RESUMEN**

El síndrome de Leigh es una enfermedad neurodegenerativa progresiva que suele aparecer en los primeros años de vida y es una de las enfermedades mitocondriales más comunes. Inicialmente afecta al cerebro, pero a medida que progresa son los músculos los más afectados. Cursa con retraso psicomotor, trastornos musculares, ataxia o retrasos en el desarrollo. A pesar del desarrollo de las técnicas de secuenciación de nueva generación y de los avances realizados en su estudio, actualmente se trata de una patología sin tratamiento eficaz.

Se estima que un 30 % de los síndromes de Leigh se deben a mutaciones en el ADNmt que afectan, mayoritariamente, a los complejos I y IV de la cadena respiratoria. La parte bibliográfica de este trabajo se ha centrado en el estudio de las principales mutaciones en los ARNt mitocondriales, concretamente, en el ARNt triptófano, y su relación con el síndrome de Leigh, demostrando así que la localización de la mutación es esencial para la determinación del fenotipo. Por su parte, el inicio del trabajo experimental ha consistido en el análisis de la función mitocondrial, patogenicidad y nivel umbral de la mutación m.5537Ti en el ARNt triptófano mitocondrial en cíbridos portadores de la misma en diferente porcentaje de heteroplasma. Los estudios realizados permiten concluir que el número de copias de ADNmt es directamente proporcional a la carga de mutación. Asimismo, y en base a la bibliografía, m.5537Ti se consideraría patogénica. No obstante, sería necesario el análisis de otros parámetros bioquímicos para su confirmación.

## **ABSTRACT**

Leigh syndrome is an early-onset progressive encephalomyopathy and it is one of the most frequent mitochondrial alterations. Initially, the brain is affected but as it progresses, muscles are the most affected tissue. It is characterized by psychomotor delay, muscle disruptions, ataxia and developmental delays. Despite the development of next generation sequencing techniques and all the progress made in its study, an effective treatment for this pathology is still a challenge.

It is believed that 30 % of Leigh syndromes are due to mutations in the mtDNA that affect mostly complexes I and IV of OXPHOS. Bibliographic part of this project has focused on studying the major tRNAs mutations, in particular, on tryptophan tRNA and its relation with Leigh syndrome, showing that mutation's location is essential to determine the phenotype. On the other hand, the beginning of the experimental part has comprised the analysis of mitochondrial function, pathogenicity and threshold effect of m.5537Ti mitochondrial tryptophan tRNA mutation in cybrids which had different proportion of heteroplasmy. Performed studies in this project conclude that the number of mtDNA copies is proportional to the mutation load. Furthermore, and based on previous reports, m.5537Ti could be considered as pathogenic. Nevertheless, other biochemistry parameters' analysis would be needed for its confirmation.

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 ADN MITOCONDRIAL Y ENFERMEDADES MITOCONDRIALES

Las mitocondrias están presentes en todas las células eucariotas, ya que son unos orgánulos fundamentales para la obtención de energía. Esta energía se produce a nivel de la membrana interna, puesto que es ahí donde se localiza el sistema de fosforilación oxidativa OXPHOS, que conduce a la síntesis de ATP que la célula necesita para la realización de sus funciones. Además de producir energía, el sistema OXPHOS produce calor al generar un gradiente electroquímico, e interviene en diferentes procesos como la regulación de la apoptosis o muerte celular programada, la importación de proteínas al interior mitocondrial, la homeostasis y la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (1).

La biosíntesis de este sistema OXPHOS está controlada por los dos sistemas genéticos de la célula eucariota: el sistema genético nuclear y el mitocondrial. Estos sistemas genéticos difieren en el patrón de herencia. De esta forma, el genoma mitocondrial es de herencia materna, ya que el ADNmt paterno es eliminado por el óvulo mediante un mecanismo todavía desconocido (2); mientras que el genoma nuclear puede proceder tanto de un progenitor como de otro (1,2). Por tanto, los posibles defectos o alteraciones que puedan surgir en ambos sistemas darán lugar a las denominadas enfermedades mitocondriales, que son un grupo de patologías caracterizadas por un defecto en la biosíntesis de ATP y por su afectación multisistémica, lo que produce manifestaciones clínicas muy variadas. Las primeras mutaciones que afectaban al sistema OXPHOS fueron descubiertas en el ADNmt (1,2).

El genoma mitocondrial está constituido por múltiples moléculas de ADN circular de doble hebra compuesto por 16.569 pares de bases (pb). En él se encuentran genes que codifican 22 ARNs de transferencia (ARNt), los ARN ribosómicos (ARNr) 16S y 12S, y 13 proteínas. Estas últimas conforman las distintas subunidades de la cadena respiratoria junto con otras proteínas codificadas en el núcleo, lo que evidencia la relación entre los genomas nuclear y mitocondrial (2). Todo el genoma mitocondrial es codificante, a excepción de una pequeña zona situada cerca del origen de replicación de la cadena pesada (1,2).

La tasa de mutación espontánea del ADNmt es 10-20 veces superior a la del ADNn y esto se debe a la falta de histonas que lo protejan, a los pocos sistemas de reparación que poseen las mitocondrias y a la generación de radicales libres de oxígeno por parte de la cadena respiratoria (1). En contraposición con el ADNn, para el cual cada célula somática posee dos copias, del ADNmt existen entre 1.000-10.000 copias en las células, dependiendo de los requerimientos energéticos de las mismas. Generalmente todas ellas son iguales, lo que se denomina homoplasmia, pero cuando se producen mutaciones puede haber dos poblaciones distintas de ADNmt, dando lugar a heteroplasmia. Las proporciones de ambas poblaciones pueden diferir en función del tejido, de manera que aquellos tejidos con mayor carga mutante se verán más afectados y será en ellos donde más claramente se manifieste la enfermedad (1). Asimismo, cuando el nivel de mutación supere cierto umbral, aparecerán los síntomas y el fenotipo patológico (3).

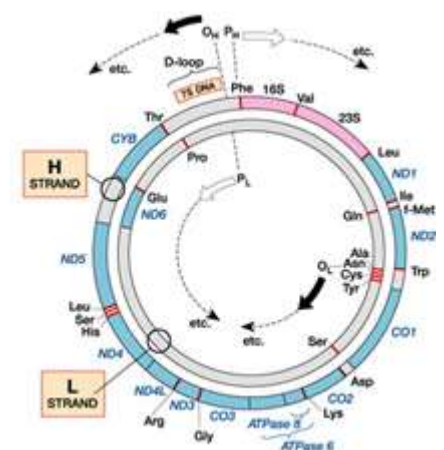


Imagen 1. Genoma mitocondrial humano. Aparecen señaladas las cadenas pesadas (H) y ligeras (L), así como sus orígenes de replicación ( $O_H$  y  $O_L$ ) y de transcripción ( $P_H$  y  $P_L$ ). Los genes codificantes de proteínas se muestran en azul, los genes codificantes de los ARN ribosómicos, en rosa; y los genes codificantes de los ARN transferencia, con rayas rojas.

Como resultado de la distinta carga de mutación entre tejidos, las enfermedades mitocondriales responden a una gran variabilidad fenotípica que complica su diagnóstico, haciendo necesaria en muchos casos la conjunción de un diagnóstico clínico con la determinación de las actividades enzimáticas de los distintos complejos del sistema OXPHOS (1,2). Individualmente, estas enfermedades son consideradas raras al afectar a un número pequeño de individuos, pero en conjunto conforman los errores congénitos más comunes del metabolismo. Por tanto, debido al papel fundamental de la mitocondria en la célula y a que generalmente carecen de una terapia eficaz aplicable, las enfermedades mitocondriales suponen un problema social y sanitario (1).

## 1.2 ENCEFALOMIOPATÍA NECROTIZANTE SUBAGUDA O SÍNDROME DE LEIGH

### 1.2.1 Etiología

Descrito en 1951 por Denis Leigh, el síndrome de Leigh es una enfermedad neurodegenerativa progresiva que suele aparecer durante los primeros años de vida, si bien también puede manifestarse en la edad adulta (4). Es una de las enfermedades mitocondriales más comunes, afecta a las áreas periventriculares del cerebro y a los ganglios basales (5).

Se estima que un 30 % de los síndromes de Leigh se deben a mutaciones en el ADNmt, las cuales afectan a algunas de las enzimas que participan en la cadena respiratoria, entre las que destacan los complejos mitocondriales I y IV (COX) (5). De esta forma, las mutaciones más frecuentes afectan al complejo I mitocondrial, con un 35 % de incidencia, seguidas por una deficiencia combinada de ambos complejos (22 %) y por deficiencias en el complejo IV (16 %) (4). Estas alteraciones producen deficiencias en la fosforilación oxidativa y conducen a un aumento de piruvato en el organismo y a una acumulación de lactato en el torrente sanguíneo y/o en el fluido cerebroespinal. Un estudio asoció estos niveles altos de lactato en el fluido cerebroespinal con la severidad de la enfermedad y su corta supervivencia, por lo que podrían funcionar como un marcador de pronóstico (4). Recientemente, la inserción de un nucleótido de timina en la posición 5537 del ADNmt que codifica para el ARNt triptófano se ha asociado con el síndrome de Leigh y, en concreto, con una deficiencia de la citocromoc oxidasa (COX) (6). Esta es la mutación cuya patogenicidad es objeto de estudio en este trabajo.

Por otro lado, el 70 % de los casos de Leigh se deben a mutaciones en el genoma nuclear, entre las que destacan algunas mutaciones en el complejo de la piruvato deshidrogenasa y deleciones en el gen *SURF1*, asociado con una deficiencia del complejo COX, ya que codifica para una proteína que regula la formación de dicho complejo (5). La asociación entre esta enfermedad y las mutaciones en *SURF1* parece ser específica, ya que hasta la fecha no se han detectado alteraciones en este gen en aquellos pacientes con el complejo IV alterado diagnosticados con una patología distinta a Leigh (7). Mutaciones en otros genes nucleares están asociadas con el resto de complejos mitocondriales. Asimismo, se han descubierto nuevos genes alterados en esta enfermedad implicados en el metabolismo y en la función, traducción y mantenimiento mitocondrial, como *VPS13D*, que codifica para una proteína del mismo nombre implicada en la mitofagia (5).

### 1.2.2 Manifestaciones clínicas

Respecto a la clínica, el síndrome de Leigh cursa con retraso psicomotor, trastornos musculares (distonía), espasticidad, ataxia (6), retrasos en el desarrollo, hipotonía, epilepsia, disfunción respiratoria, alimentación pobre y debilidad (4). Además de estos síntomas, se han descrito otros menos frecuentes en algunos pacientes, como migrañas, síntomas psiquiátricos y baja estatura (8). Por tanto, inicialmente este síndrome se manifiesta en el cerebro, donde se observa desmielinización, espongiosis, gliosis, necrosis y proliferación de los capilares. No obstante, en el progreso de la misma



es el músculo el que se ve más afectado, puesto que los fallos en la función cerebral impiden que el cerebro controle la contracción muscular (4).

### 1.2.3 Diagnóstico

La heterogeneidad clínica de este trastorno complica su diagnóstico, aunque técnicas como la imagen por resonancia magnética cerebral (6) o la biopsia muscular permiten su detección temprana (4). Previo a la realización de estas técnicas, conviene medir algunos parámetros en el laboratorio, como los niveles de lactato en sangre, orina y fluido cerebroespinal, ya que una característica común en la alteración del sistema OXPHOS es la acidemia láctica en dichas regiones del organismo. Además de los niveles de lactato, es recomendable analizar la concentración de aminoácidos y ácidos orgánicos en sangre y orina, puesto que se produce una elevación de alanina y la acumulación de algunos ácidos orgánicos como succinato, fumarato o malato, todos ellos intermediarios del ciclo de Krebs. Otro ácido orgánico que tiende a acumularse en aquellos pacientes con enfermedades mitocondriales es el ácido etilmalónico y dicha acumulación conduce a síntomas neurodegenerativos y a una deficiencia de la citocromo-c oxidasa. Concretamente, los casos de Leigh se caracterizan por una aciduria 3-metilglutacónica secundaria, la cual es causada por una deficiencia de la succinil-CoA sintasa, que a su vez conduce a deficiencias en los complejos I y IV de la cadena mitocondrial. Un último marcador molecular de Leigh es el factor de crecimiento de fibroblastos 21, que permite la distinción entre las alteraciones del sistema OXPHOS con manifestación muscular de las alteraciones sin dicha manifestación, pero este factor no ha sido catalogado todavía como marcador de rutina en la detección de esta patología (9).

Una vez medidos estos parámetros, si se sospecha que el paciente puede presentar el síndrome de Leigh, se lleva a cabo la técnica de imagen por resonancia magnética (MRI) cerebral. Para confirmar el diagnóstico, se deben observar lesiones simétricas en los ganglios basales o en áreas como la sustancia negra, el bulbo raquídeo o la médula espinal (9). Igualmente, se debería realizar una espectroscopía de resonancia magnética (MRS) para cuantificar los niveles de lactato en el Sistema Nervioso Central, concretamente en la sustancia blanca y gris, puesto que esta cuantificación es más sensible que la de los niveles de lactato en suero. Sin embargo, el lactato debe superar un umbral de concentración para ser detectado, por lo que la MRS no siempre es útil (9).

Las enfermedades mitocondriales se caracterizan también por alteraciones musculares. Por tanto, un análisis bioquímico de las biopsias musculares es otra herramienta de análisis importante en el diagnóstico de una deficiencia del sistema OXPHOS porque permite medir la energía mitocondrial generada y los componentes de dicho sistema (9). Igualmente, una simple observación al microscopio de esta biopsia aportaría información sobre la severidad de la enfermedad, puesto que permitiría la visualización de fibras rojas rasgadas. Sin embargo, Sofou et al. (10) afirmaron que estas fibras únicamente se observan en el 51 % de los pacientes de Leigh, por lo que sería necesaria la realización de otras pruebas, como las propuestas anteriormente, para confirmar el diagnóstico (4). Otro inconveniente que presenta esta técnica es su carácter invasivo, ya que requiere un procedimiento quirúrgico (9).

Un último aspecto referente a la detección del síndrome de Leigh es la realización de un diagnóstico genético. Para ello, a aquellos pacientes sospechosos para este síndrome se les toma una muestra de tejido afectado, generalmente muscular, y se lleva a cabo un análisis de la secuencia completa del ADNmt para localizar el gen mutado. Si hay evidencia de una alteración en el ADNmt pero no se detectan mutaciones en el mismo, se deben tener en cuenta las mutaciones en el gen que codifica

para la polimerasa gamma, que es la polimerasa responsable de la replicación y reparación del ADNmt. Tras esto, si sigue sin encontrarse la mutación responsable del síndrome de Leigh, basándose en las características clínicas y bioquímicas de los pacientes se seleccionan genes nucleares para su secuenciación. Normalmente, se secuencian aquellos genes con mayor frecuencia de mutación y, si esto tampoco permite localizar la ubicación de la mutación, se seleccionan otros genes a partir de información obtenida en bases de datos. Actualmente, el tiempo necesario para esta secuenciación se ha reducido considerablemente debido a las técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS) y ha permitido la identificación de nuevos genes relacionados con enfermedades mitocondriales. En un futuro, se espera que estas técnicas NGS permitan hacer un único screening de todos los genes candidatos a provocar la enfermedad. Este análisis genético es el más importante en el diagnóstico del síndrome de Leigh, sobre todo en casos de aparición tardía, puesto que las mutaciones en el ADNmt son la causa principal de su aparición en la edad adulta (9).

Todas estas técnicas o análisis hacen posible el diagnóstico del síndrome Leigh, pero también es importante la historia clínica del paciente y de sus familiares debido al carácter hereditario del mismo (9). Un diagnóstico temprano es fundamental para el tratamiento de la enfermedad (5).

#### 1.2.4 Tratamiento

Actualmente no existe ningún tratamiento específico para el síndrome de Leigh debido a la dificultad de realizar pruebas controladas a gran escala al tratarse de una enfermedad rara con una alta tasa de mortalidad durante la infancia. Pese a ello, para algunos casos se han sugerido una variedad de opciones de tratamiento, entre las que destacan tratamientos con fármacos y dietéticos (9).

Los nutracéuticos se han propuesto para el tratamiento tanto del síndrome de Leigh como de otras alteraciones mitocondriales. Dentro de este grupo de compuestos, destacan el coenzima Q10, el ácido  $\alpha$ -lipoico, la biotina o la tiamina por sus propiedades antioxidantes o por su función como cofactores del sistema OXPHOS (9). Se ha demostrado que altas concentraciones de estas dos últimas (biotina y tiamina) previenen el deterioro cerebral e incluso mejoran algunos aspectos clínicos (4). Adicionalmente y como medida preventiva, el ácido retinoico y la vitamina E pueden suplementarse por su efecto antioxidante (9).

Por otro lado, fallos en el crecimiento y problemas de alimentación son síntomas comunes en niños con defectos primarios en el sistema OXPHOS diagnosticados con síndrome de Leigh. Para solucionarlos, se ha propuesto una modificación de la dieta de estos niños adecuada a su edad y actividad física que permita la mejora de la capacidad mitocondrial para generar energía. Asimismo, es de vital importancia que los enfermos de Leigh lleven con ellos una tarjeta que los identifique como tal para evitar, ante una emergencia clínica, la administración de algunos fármacos como tetraciclina o valproato, ya que su aplicación alteraría su función mitocondrial (9). Sin embargo, la gran variedad de mutaciones responsables de esta enfermedad mitocondrial, así como su diversa localización, hacen que hasta el momento únicamente se hayan conseguido tratamientos sintomáticos que permiten un aumento de la esperanza y de la calidad de vida de los pacientes (4).

## 2 OBJETIVOS

El grupo de Biogénesis y Patología Mitocondrial de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza está especializado en el diagnóstico genético y molecular de enfermedades mitocondriales humanas. Por ello, numerosas muestras de pacientes bajo sospecha de padecer una patología mitocondrial determinada son enviadas a sus instalaciones para su análisis y caracterización.

Una de las muestras recibidas corresponde a una paciente que presentaba una clínica compatible con el síndrome de Leigh. La realización de un estudio genético permitió descartar las principales mutaciones asociadas a esta patología y, mediante secuenciación, se encontró la mutación puntual m.5537Ti en el ADNmt, la cual se hallaba en homoplasmia. Dicha mutación había sido descrita previamente asociada a este síndrome (6,8), por lo que sería candidata a ser responsable de la patología de la paciente. Por ello, se propuso el estudio de la implicación de dicha mutación en asociación con el síndrome de Leigh. Para ello, se partió de muestras de la paciente y de su madre, ya que esta última presentaba la mutación en heteroplasmia, y se definieron los siguientes objetivos de Trabajo de Fin de Grado:

- Realizar un estudio en profundidad de mutantes en ARNt mitocondriales y, más concretamente, en mutaciones del ARNt triptófano descritas en la literatura y relacionadas con el síndrome de Leigh.
- Conocer el estado actual en lo referente a la mutación m.5537Ti, que es objeto de estudio en nuestro trabajo.
- Obtener clones con distinta carga de mutación m.5537Ti a partir del cíbrido transmitocondrial construido previamente en el laboratorio, con fondo genético nuclear de la línea celular 143B y fondo genético mitocondrial procedente de las plaquetas de la madre de la paciente (portadora de la mutación en heteroplasmia).
- Analizar la función mitocondrial de los cíbridos obtenidos para confirmar su patogenicidad y conocer el valor umbral.

### **3 METODOLOGÍA**

#### **3.1 METODOLOGÍA PARA LA BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA**

Dos de los objetivos de este Trabajo Fin de Grado requieren la realización de una búsqueda bibliográfica exhaustiva acerca de las mutaciones en ARNt mitocondriales, sobre todo de aquellas que ocurren en el ARNt triptófano y su relación con el síndrome de Leigh, así como en la mutación m.5537Ti. Para lograr dichos objetivos es necesario utilizar bases de datos científicas fiables. Los resultados obtenidos datan de artículos publicados entre los años 1995 y 2020 y la información ha sido seleccionada y extraída de tres bases de datos, un buscador online y un repositorio.

Se han utilizado las bases de datos Web of Science (WoS), PubMed y MITOMAP. Las dos primeras son bases bibliográficas multidisciplinares, mientras que MITOMAP ofrece información sobre el ADNmt y las mutaciones que ocurren en el mismo. Todas ellas se actualizan constantemente y son de acceso libre y gratuito. En cuanto al buscador online, se eligió AlcorZe porque permite el acceso a la mayoría de recursos de la Universidad de Zaragoza (UZ) y a más de 100 bases de datos externas como MEDLINE, así como a ZAGUAN, que es el repositorio de la UZ y en él se pueden encontrar trabajos de fin de grado y máster, tesis, ponencias, libros y revistas.

La realización de la búsqueda bibliográfica se llevó a cabo accediendo a las páginas web correspondientes a las bases de datos mencionadas anteriormente y escribiendo en los buscadores las palabras clave. Algunas de estas palabras clave fueron: *mitochondrial DNA*, *Leigh syndrome*, *mitochondrial tRNA*. Asimismo, en algunas ocasiones estas palabras clave se acompañaban del operador booleano "AND", que permitía la obtención de artículos que contuvieran ambos términos. De esta forma, algunas de las búsquedas realizadas fueron: *Leigh syndrome AND diagnosis* o

*mitochondrial tRNA AND tryptophan*. La búsqueda en MITOMAP fue ligeramente distinta, puesto que se llevó a cabo una búsqueda por alelos, para la cual se introdujo la mutación m.5537Ti y se obtuvieron un total de 6 artículos relacionados con la misma.

Otra opción de búsqueda empleada fue partir de la bibliografía utilizada en los artículos encontrados para añadir nuevos artículos a la revisión; mientras que la utilización del repositorio ZAGUAN sirvió para esquematizar y organizar el trabajo. Por otro lado, la selección de los artículos se realizó en base al número de citas y a la fecha de publicación de los mismos, priorizando aquellos que hubieran sido citados un mayor número de veces y fueran más recientes. En total, se han seleccionado 31 artículos para este Trabajo Fin de Grado.

## 3.2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### 3.2.1 MATERIALES

#### 3.2.1.1 *Material biológico y líneas celulares*

El trabajo se ha realizado a partir de un híbrido transmitocondrial previamente generado en el grupo de Biogénesis y Patología Mitocondrial de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza. Dicho híbrido proviene de la fusión de la línea de osteosarcoma 143b  $\rho^0$  (rho 0, carente de ADN mitocondrial) con plaquetas extraídas a partir de una muestra sanguínea de la madre de una paciente portadora de la mutación m.5537Ti del ARNt triptófano en heteroplasmia.

#### 3.2.1.2 *Aparatos e instrumentos*

El anexo I recoge una tabla en la que se indican los instrumentos y aparatos empleados en el desarrollo de este trabajo.

### 3.2.2 REACTIVOS

#### 3.2.2.1 *Reactivos generales y kits comerciales*

Los reactivos químicos utilizados eran de grado analítico o aptos para biología molecular y cultivo y la mayoría de ellos procedían de las casas comerciales Sigma-Aldrich, Bio-Rad, ThermoFischer Scientific, Merck, Roche y Panreac.

Por su parte, la polimerasa utilizada para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue la *Taq DNA Polymerase* contenida en el kit Multiplex PCR Master Mix de Emerald (Takara); mientras que los oligonucleótidos fueron sintetizados por ThermoFischer Scientific y purificados mediante el método de desalado. Por otro lado, los reactivos necesarios para la realización de la RT-PCR procedían del Master Mix de ThermoFischer Scientific, al igual que los oligonucleótidos y las sondas, los cuales fueron sintetizados y purificados por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Los kits comerciales utilizados para la realización del trabajo se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1** Listado de kits comerciales utilizados.

<b>Función</b>	<b>Nombre</b>	<b>Casa comercial</b>
Extracción de DNA	<i>Cells and Tissue DNA Isolation Kit</i>	Norgen Biotek Corp.
PCR-RFLP	<i>EmeraldAmp® GT PCR Master Mix</i>	Takara
PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR)	<i>TaqMan Gene Expression/Genotyping Mater Mix</i>	Applied-Biosystems

### 3.2.2.2 Medios de cultivo y material estéril

Los medios empleados y el suero fetal bovino (SFB) procedían de Gibco™, Invitrogen. Por su parte, el material de plástico empleado en cultivo (placas de 100mm, placas de 6, 10, 12, 24 o 96 pocillos, tubos Falcon, pipetas, criotubos) procedía de TPP, Suiza.

## 3.2.3 MÉTODOS

### 3.2.3.1 Técnicas de cultivo celular

#### 3.2.3.1.1 Mantenimiento de los cultivos celulares

Los cultivos celulares se llevaron a cabo utilizando concentraciones elevadas de glucosa, ya que promueve el crecimiento de las células portadoras de mutaciones en el ADNmt sin limitaciones. El medio empleado para ello fue *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) glucosa 4,5 g/L (25 mM) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 5 %. Para aquellos híbridos con un porcentaje de mutación superior al 50 % (clon 80 y clon 100), se añadió también uridina al 0,5 %. El cultivo con uridina tenía el objetivo de evitar la pérdida de mutación en aquellas líneas donde la carga de mutación era elevada, puesto que se ha demostrado que la presencia de uridina en cultivo evita la selección negativa de aquellos clones con mutaciones patológicas (11). Asimismo, para mantener la esterilidad de dichos cultivos, todas las manipulaciones se llevaron a cabo en campana de flujo laminar vertical y en condiciones de ausencia de antibióticos para evitar la inhibición a nivel mitocondrial. Las líneas celulares se cultivaron de manera rutinaria en placas de 100 o 150 mm en el medio adecuado, que fue renovado cada 2-3 días; y en un incubador termostatzado a 37 °C en atmósfera saturada de humedad y enriquecida con un 5 % de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).

#### 3.2.3.1.2 Tripsinización de los cultivos celulares

Las células 143B son adherentes, por lo que es necesario disociarlas de la placa de cultivo para su manejo, para lo cual se utilizó tripsina *TrypLE™ Express* de Gibco™, Invitrogen. Cuando las células en cultivo alcanzaron un grado de confluencia del 80 % aproximadamente, se retiró el medio de cultivo de la placa, se lavaron con PBS para eliminar aquellas proteínas del suero que hubieran podido quedar, inhibidoras del efecto de la tripsina, y se incubaron con tripsina durante 2-3 minutos a 37 °C para eliminar las uniones adherentes de las células con la placa. Pasado ese tiempo, se comprobó al microscopio invertido que las células se hubieran despegado y se recogieron en un tubo Falcon con un volumen de medio fresco dos veces superior al de tripsina utilizado. Se centrifugaron a 14000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y el pellet de células obtenido tras la centrifugación se procesó en función del uso posterior. De esta forma, si el objetivo era hacer un nuevo pase de células para mantenimiento, el pellet se resuspendió en un volumen de medio adecuado al volumen de pellet, generalmente 3-4 ml, se tomó 1 ml de la suspensión y se sembró en una placa en la que previamente se habían adicionado 9 ml de medio. Por el contrario, si el objetivo era la extracción de ADN o de proteínas, el pellet se almacenó a -20 °C o -80 °C respectivamente.

#### 3.2.3.1.3 Recuento celular

El recuento celular y el análisis de su viabilidad se realizó utilizando un contador automático de la marca ThermoFisher Scientific con capacidad para detectar densidades desde  $1 \times 10^4$  hasta  $1 \times 10^7$  células/ml y siguiendo la técnica del Azul Tripán, un colorante capaz de penetrar en aquellas células con la membrana plasmática dañada, de forma que las células viables quedan sin colorear y las no viables, teñidas de azul. Para ello, el pellet de células obtenido tras centrifugar se resuspendió en un volumen de medio adecuado y se tomaron 20 µl de suspensión, que fueron mezclados con el mismo

volumen de Azul Tripán y homogeneizados. Hecho esto, la suspensión con el colorante se analizó en el interior de cámaras desechables por duplicado, obteniendo así la viabilidad y el número de células por mililitro.

#### 3.2.3.1.4 Congelación de células

La congelación de cultivos es un procedimiento que asegura el mantenimiento de las líneas celulares en el tiempo. Para llevarla a cabo, las células se despegaron de la superficie de la placa mediante tripsinización y el pellet obtenido tras centrifugación se resuspendió en medio de congelación para obtener una densidad de 2 millones de células por mililitro y se pasó a un criotubo. Este medio de congelación estaba compuesto por DMEM suplementado con un 20 % de SFB y con un 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO), que es un crioprotector que actúa evitando la formación de cristales de hielo, lo que dañaría a las células. Una vez añadidos todos los componentes, se homogeneizaron y los criotubos se introdujeron en el Mr.Frosty, que se almacenó en el congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 2 días y, transcurrido ese tiempo, los criotubos se pasaron a un contenedor de nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ . El sistema de congelación Mr.Frosty consiste en un contenedor de policarbonato que contiene alcohol isoamílico, de forma que al someterlo a congelación permite un descenso gradual de la temperatura a una velocidad de  $1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ .

#### 3.2.3.1.5 Selección clonal mediante dilución al límite

La técnica de siembra por dilución al límite permitió la selección de clones con diferente porcentaje de mutación, para el estudio del carácter patogénico de la mutación y la determinación del umbral patológico. Para ello, se recogieron las células por tripsinización (apartado 3.2.3.1.2) y el pellet se resuspendió en un volumen de medio adecuado. A continuación, se llevó a cabo un recuento de las células mediante el contador automático de la marca ThermoFisher Scientific siguiendo el protocolo (apartado 3.2.3.1.3) y se diluyeron para obtener una densidad de 1 célula por cada  $200\ \mu\text{l}$  de medio, equivalente a 5 células por ml de disolución. Para obtener dicha densidad se llevaron a cabo varias diluciones seriadas y, obtenida la concentración deseada, se sembraron las células en una placa de 96 pocillos, utilizando una pipeta multicanal y añadiendo  $200\ \mu\text{l}$  de disolución en cada pocillo.

Se sembraron un total de 6 placas, las cuales se mantuvieron 2-3 semanas en la estufa y, durante ese tiempo, se fue comprobando el crecimiento celular de las mismas al observar cambios en la coloración del medio. Este cambio de coloración se produce porque las células consumen los nutrientes del medio, liberando metabolitos que acidifican el medio y, por consiguiente, el color adquiere una tonalidad diferente: pasa de rojo/rosa a amarillo/naranja. Al observar dicho crecimiento en alguno de los pocillos, las células presentes en el mismo se recogieron por tripsinización y se sembraron en una placa de 24 pocillos. Esto mismo se hizo con todos aquellos clones para los que se observó crecimiento. Del mismo modo, una vez las células sembradas en la placa de 24 pocillos alcanzaron la confluencia, se volvieron a recoger y sembrar en una placa de 12, posteriormente en una placa de 6 y, finalmente, se pasaron a una placa de 100. Una vez esta última placa estuvo cercana al 100 % de confluencia, las células de la misma se recogieron y el pellet obtenido tras tripsinizar y centrifugar se dividió en dos, de manera que la mitad de este se resembró y la otra mitad se congeló para, posteriormente, proceder a la extracción del ADN y, al estudio de la presencia de dicha mutación y, en caso positivo, de la cantidad de la misma mediante una PCR-RFLP.

### 3.2.3.2 Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos

#### 3.2.3.2.1 Extracción de ADN total a partir de lisados celulares con kit

Esta extracción se utilizó para el análisis de la presencia de la mutación en los diferentes clones celulares obtenidos. Para ello, se partió de pellets celulares, congelados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  o frescos, obtenidos de cultivos celulares siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.2.3.1.2. Se lavaron con  $800\text{ }\mu\text{l}$  de PBS, se centrifugó a  $8000\text{ rpm}$  durante 5 minutos y, pasado ese tiempo, se eliminó el sobrenadante. Para la extracción de ADN se utilizó el kit de columnas *Cells and Tissue DNA isolation* de la casa comercial Norgen Biotek siguiendo el protocolo facilitado por el fabricante para la preparación de lisados celulares a partir de células que crecen en monocapa y, seguidamente, para la purificación de ADN genómico para todos los tipos de lisado. Finalmente, se obtuvo el ADN de cada clon celular eluido en un volumen de  $40\text{ }\mu\text{l}$  de agua pura.

#### 3.2.3.2.2 Extracción de ADN total a partir de lisados con fenol-cloroformo

Este otro método de extracción de ADN se utilizó para cuantificar el número de copias del ADN ya que, por la experiencia del grupo, la extracción con columnas presenta un bajo rendimiento y mucha variabilidad. Al igual que en el método anterior, se partió de pellets celulares, congelados o frescos, que fueron resuspendidos en  $250\text{ }\mu\text{l}$  de TE 10:1 (Tris  $10\text{ mM}$ , EDTA  $1\text{ mM}$ ) y tratados con  $5\text{ }\mu\text{l}$  de SDS al 25% y con  $1,25\text{ }\mu\text{l}$  de proteinasa K. Se mezclaron bien los componentes y se dejó incubando toda la noche a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Transcurrido ese tiempo, se procedió a la extracción del ADN del lisado añadiendo  $250\text{ }\mu\text{l}$  Fenol IAC (alcohol isoamílico-cloroformo) en proporción 25:24:1, se agitó en el vórtex hasta obtener una mezcla blanquecina y se centrifugó 5 minutos a  $3000\text{ rpm}$ . Tras la centrifugación, se obtuvieron dos fases, una superior acuosa donde se encuentra el ADN y una inferior orgánica donde están los restos celulares. Con cuidado y con ayuda de una pipeta Pasteur se recogió esta fase superior y se pasó a un nuevo eppendorf, al que se le añadieron  $200\text{ }\mu\text{l}$  de cloroformo, se agitó en el vórtex hasta conseguir una mezcla homogénea y se centrifugó 5 minutos a  $3000\text{ rpm}$ . Después de esta segunda centrifugación se obtuvieron tres fases y, de nuevo, se recogió la fase superior con una pipeta Pasteur y se pasó a un nuevo eppendorf.

A este nuevo eppendorf se le añadió el doble de volumen de etanol frío respecto al volumen de la fase acuosa recogida y se agitó por inversión. En algunos casos, al agitar se visualizó el ovillo de ADN, por lo que se recogió con pipeta Pasteur, se pasó a un nuevo eppendorf y se secó en el speedvac a  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 2-5 minutos. Sin embargo, también hubo casos en los que el ovillo no era visible, por lo que se dejó precipitando 1h a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  y, pasado ese tiempo, se centrifugó a  $14000\text{ rpm}$  durante 30 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se decantó el sobrenadante y el pellet de ADN se secó en el speedvac y se resuspendió en  $100\text{-}200\text{ }\mu\text{l}$  de agua pura. Por último, el ADN extraído se dejó incubando toda la noche en agitación a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Todo este proceso de extracción se llevó a cabo en campana dada la toxicidad de los productos.

#### 3.2.3.2.3 Cuantificación de ADN

La cantidad de ácidos nucleicos obtenidos tras la extracción, independientemente del método utilizado para ello, se determinó mediante el espectrofotómetro ND-1000 de la marca Nanodrop y su programa informático, el cual es capaz de realizar una lectura a una longitud de onda de  $260\text{ nm}$  y  $280\text{ nm}$  a partir de un volumen ínfimo de muestra ( $2\text{ }\mu\text{l}$ ). De esta forma, primero se procedió a la realización del blanco utilizando agua pura, ya que era el disolvente en el que se encontraba disuelta la muestra, y, una vez fijado este blanco, se cargaron las muestras. El espectrofotómetro aporta directamente la concentración de ADN en  $\text{ng}/\mu\text{l}$ , así como el ratio de absorbancia 260/280, que permite evaluar la pureza de la muestra ante una posible contaminación por proteínas, considerándose un valor óptimo

un ratio de 1,8; y el ratio de absorbancia 260/230 para evaluar la pureza frente a compuestos orgánicos o fenólicos derivados del proceso de extracción, siendo un valor óptimo un ratio de 2.

Finalizadas las determinaciones, se realizaron dos medidas consecutivas con agua destilada para eliminar cualquier resto de ácido nucleico que hubiera podido quedar.

#### 3.2.3.2.4 PCR-RFLP

La PCR de tipo RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) se basa en la amplificación de una región determinada del material genético de interés, en este caso, del ADNmt, seguida de una digestión con endonucleasas específicas de restricción. Esta técnica se llevó a cabo para comprobar que los cíbridos obtenidos habían incorporado correctamente el ADNmt de la madre de la paciente y, por tanto, portaban la mutación m.5537Ti.

##### 3.2.3.2.4.a Proceso de amplificación: reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción de PCR se realizó partiendo del ADN de los cíbridos, previamente extraído con un kit (apartado 3.2.2.1) y cuantificado. Se llevó a cabo en tubos de 200  $\mu$ l y en un volumen final de reacción de 25  $\mu$ l que contenía (Tabla 2):

**Tabla 2. Lista de reactivos para la PCR-RFLP y mezcla de reacción**

Reactivo	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen ( $\mu$ l)/pocillo
Master Mix Emerald	2X	1X	12,5
Cebador hmtL	25 $\mu$ M	12,5 $\mu$ M	0,5
Cebador hmtH	25 $\mu$ M	12,5 $\mu$ M	0,5
H <sub>2</sub> O estéril	-	-	10,5
ADN	-	150 ng/ $\mu$ l	1

Asimismo, para descartar la presencia de contaminación, en cada experimento se utilizó un blanco que contenía la mezcla de reacción descrita, pero sin la presencia de ADN. Los cebadores utilizados se detallan en la Tabla 3:

**Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para llevar a cabo la PCR. Se incluye su secuencia y el tamaño del amplificado resultante.**

Primer 5'→3'	Hebra del ADNmt	Secuencia 5'→3'	Tamaño (pb)
hmtL 5536	L	5' GAAATTTAGGTTAAATACAGA 3'	285
hmtH 5798	H	5' GCAAATTCGAAGAAG CAGCTT 3'	

Una vez preparadas todas las mezclas de reacción, incluido el blanco, se introdujeron en un termociclador para que tuviera lugar el proceso de amplificación. Los ciclos de temperatura de la PCR-RFLP se muestran en la Tabla 4. La temperatura de hibridación es específica para cada cebador.

**Tabla 4. Especificaciones del programa térmico empleado para la amplificación del ADNmt por PCR.**

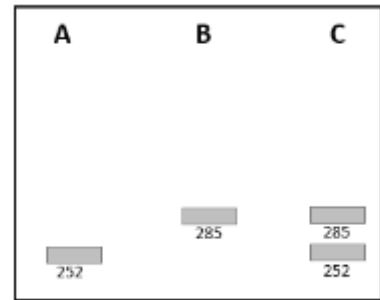
	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 minutos	1
Desnaturalización	95	45 segundos	35
Hibridación	62	45 segundos	
Extensión	72	45 segundos	
Elongación	72	5 minutos	1
Enfriamiento	4	-	-



#### 3.2.3.2.4.b Digestión de productos de PCR con enzimas de restricción

Este ensayo se utilizó para determinar la presencia o ausencia de la mutación puntual m.5537Ti en el ADNmt de los híbridos transmitocondriales. Para ello, se utilizó la enzima de restricción *MbolI*, capaz de reconocer y escindir el sitio de restricción 5' GAAGAN<sub>8</sub>^ 3', de manera que corta en la secuencia normal o *wild-type* (WT) pero no en la secuencia mutada, permitiendo así la identificación de la presencia de la inserción puntual en el ADNmt.

Concretamente, en los pacientes carentes de mutación, la enzima escinde el ADNmt amplificado por PCR en dos regiones, dando lugar a dos fragmentos de 252 y 33 pb. Por el contrario, en el caso de los pacientes portadores de la mutación, la enzima no corta y da lugar a un único fragmento de 285 pb si se encuentra en homoplasmia o a dos fragmentos de 285 y 252 pb si está en heteroplasmia (Imagen 2). Para llevar a cabo esta digestión, se tomaron 5 µl de muestra amplificada y se mezclaron con 1 µl de enzima de restricción *MbolI*, con 1 µl del tampón de incubación de la misma y con 3 µl de agua destilada, obteniendo un volumen total de 10 µl. La reacción se dejó en agitación toda la noche a 37 °C. Cuantitativamente, el porcentaje de mutación de cada clon fue calculado con el programa informático Gel-Pro Analyzer. Este programa mide la intensidad de las bandas del gel de digestión y estima un porcentaje de mutación basándose en la intensidad relativa de las bandas.



**Imagen 2** Patrón de corte esperado tras la PCR-RFLP en gel de agarosa al 2,5%. Siendo A: muestra normal; B: muestra mutante homoplásmica; C: muestra mutante heteroplásmica.

#### 3.2.3.2.4.c Separación electroforética de ácidos nucleicos

Para verificar el éxito del proceso de amplificación por PCR, el producto se comprobó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1 %, mientras que para determinar la presencia de mutaciones por digestión enzimática se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 2,5 %.

La preparación de los geles de agarosa fue la misma, únicamente se modificó la concentración de esta. En ambos casos, tras pesar la cantidad adecuada de agarosa en una balanza, se añadieron 100 ml de tampón TBE 1X (50 mM Tris, 50 mM ácido bórico, 1 mM EDTA-Na y pH 8,3) y se calentó en un microondas para conseguir su disolución. Una vez disuelta, se añadieron 6,5 µl de bromuro de etidio (1 µg/ml) en campana y se dejó gelificar en las camas de electroforesis. Tras la gelificación, se mezcló un volumen de 5 µl de amplificado o de 10 µl de producto digerido con un volumen adecuado de tampón de carga (0,21 % (p/v) azul de bromofenol, EDTA 0,2 M pH 8, 50 % (v/v) glicerol en agua pura) y se cargó en los pocillos del gel junto con un marcador de peso molecular de 1 kb. La electroforesis se desarrolló a 50 V durante quince minutos aproximadamente para permitir la entrada de los ácidos nucleicos al gel y a 100 V el tiempo restante hasta la llegada del marcador azul de bromofenol al final del gel. Las bandas resultantes se observaron mediante la exposición del gel a radiación ultravioleta en el transiluminador Gel Doc XR+System (Bio-Rad).

#### 3.2.3.2.5 Cuantificación del número de copias de ADNmt mediante RT-PCR

La determinación de los niveles de ADNmt se basó en la técnica de sondas TaqMan, la cual consiste en la cuantificación relativa de un gen mitocondrial presente en una región conservada del genoma (12S), al que se le une la sonda fluorescente FAM; frente a un gen presente en monocopia en el genoma nuclear haploide (RNasa P) al que se le une la sonda fluorescente VIC.

Para la cuantificación, se interpolaron los datos en una recta patrón generada mediante diluciones seriadas de una solución madre de plásmidos portadores de ambos genes y que contenía  $9 \times 10^6$  copias del gen mitocondrial y  $9 \times 10^4$  copias del gen nuclear. La solución inicial se obtuvo a través de la dilución

1:200 en Tris-HCl 10 mM pH 8,5 de la solución madre. Tomando como referencia esta solución inicial se realizaron diluciones 1/3, 1/9, 1/27 y 1/81 en el mismo tampón. Por otro lado, tras cuantificar el ADN extraído con el método de fenol-cloroformo, se tomó una concentración de ADN de 10-15 ng/μl. En algunos casos fue necesario diluir el ADN hasta alcanzar dicha concentración. El volumen final de reacción fue de 20 μl y se añadieron los siguientes reactivos (Tabla 5):

**Tabla 5. Reactivos para la cuantificación del número de copias de ADNmt mediante RT-PCR y volúmenes para la mezcla de reacción**

Reactivo	Concentración Stock	Volumen (μl)/pocillo
TaqMan Gene Expression Master Mix	2X	10
Sonda mitocondrial (FAM)	10X	0,5
Sonda RNasaP (VIC)	20X	1
Cebador Mt-L	5 μM	0,5
Cebador Mt-H	5 μM	0,5
H <sub>2</sub> O estéril	-	2,5

Las secuencias de los cebadores, de la sonda RNasaP (VIC) y de la sonda mitocondrial (FAM) empleadas fueron las siguientes (Tabla 6):

**Tabla 6. Cebadores y sondas utilizadas para la determinación del número de copias de ADNmt mediante RT-PCR. Se incluyen sus secuencias y las temperaturas de hibridación.**

Sonda/Cebadores	Secuencia 5'→3'	Temperatura (°C)
Sonda RNasaP	AGATTTGGACCTGCGAGCG	69,3
Sonda FAM	FAM-TGCCAGCCACCGCG	69,3
Cebador Mt-L	CCACGGGAAACAGCATGTATT	58,4
Cebador Mt-H	CTATTGACTTGGGTTAATCGTGTGA	58,2

La RT-PCR se llevó a cabo en una placa de 96 pocillos, de forma que cada muestra se midió por duplicado y a cada pocillo se le añadieron 15 μl de mezcla de reacción y 5 μl de ADN. Además, dos pocillos se destinaron a un blanco, en el que se sustituyó el ADN por agua pura, y otros dos pocillos al ADN procedente de las células Rho 0 para comprobar que no tuvieran ADNmt. La placa de 96 pocillos cargada con las muestras se introdujo en el termociclador StepOne System de Applied Biosystems y la RT-PCR se desarrolló con las siguientes condiciones (Tabla 7):

**Tabla 7. Descripción del programa empleado en la determinación del número de copias de ADNmt mediante RT-PCR.**

	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Calentamiento	50	2 minutos	1
Desnaturalización inicial	95	10 minutos	1
Desnaturalización	95	15 segundos	40
Elongación	60	1 minuto	
Estabilización	50	30 segundos	1

Finalizado el ensayo, los resultados obtenidos se analizaron con el programa StepOne Software v2.3, que permite visualizar las curvas de amplificación, así como su ausencia en el caso del blanco y la veracidad de los duplicados (lo ideal es que se trate de curvas superpuestas). Este programa calcula, mediante la interpolación de los valores de concentración en la recta patrón, el número de copias de gen mitocondrial y nuclear para cada uno de los pocillos. Los resultados se expresan como el cociente:

$$\frac{N^{\circ} \text{ copias gen mitocondrial}}{N^{\circ} \text{ copias gen nuclear}}$$

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 MUTACIONES EN ARNt MITOCONDRIALES Y EN GENES NUCLEARES Y SU IMPLICACIÓN EN EL SÍNDROME DE LEIGH

La síntesis de proteínas es un proceso fundamental en las células y en él participan los ribosomas, los ARNs mensajeros (ARNm) (12) y los ARNs de transferencia (ARNt). Estos últimos son los adaptadores que transportan los aminoácidos equivalentes a los tripletes de los ARNm hasta los ribosomas para formar la cadena polipeptídica, por lo que los ARNt son el eje de los dos códigos genéticos (ARNm y aminoácidos) (13).

Esta misma síntesis de proteínas a partir del ARNm también ocurre en las mitocondrias, si bien en este caso el número de péptidos traducidos es menor (13 péptidos) y todos ellos participan en la fosforilación oxidativa. Otra diferencia de la traducción mitocondrial respecto a la nuclear es la variación en algunos de los codones en cuanto a los aminoácidos que codifican. Sin embargo, los tres tipos de ARNs (mensajeros, de transferencia y ribosómicos) desempeñan las mismas funciones en ambos genomas, por lo que los ARNm mitocondriales poseen la información codificada en el genoma mitocondrial y los ARNr mitocondriales son los encargados de formar, junto a proteínas ribosomales, los ribosomas (14). Por su parte, los ARNt mitocondriales poseen una estructura secundaria en forma de hoja de trébol con 4 brazos y 3 loops y sufren modificaciones postranscripcionales en posiciones específicas, así como aminoacilación (reacción de unión del aminoácido al ARNt), todas ellas reguladas por el genoma nuclear. Cualquier variante que dañe la estructura del ARNt mitocondrial o altere alguno de estos procesos de modificación y procesamiento podría interrumpir la función mitocondrial.

Los genes codificantes para estos ARNt mitocondriales suponen un 8 % del genoma mitocondrial. Sin embargo, la frecuencia de variantes patogénicas en los mismos es significativamente superior a la de otros ARNs como los mensajeros, por lo que son una de las causas más frecuentes de los desórdenes producidos en el ADNmt (15). Mutaciones en estos ARNs de transferencia disminuyen la síntesis de proteínas mitocondriales produciendo alteración en la cadena de transporte mitocondrial (16), sobre todo en los complejos I y IV (6).

Algunas de estas variantes provocan sustituciones en el brazo del anticodón, donde se une el ARNm correspondiente, interfiriendo así con el proceso de decodificación del ARNt, por lo que es muy probable que sean patogénicas. No obstante, apenas se han reportado casos de dichas sustituciones, lo que indicaría que son incompatibles con las etapas tempranas de desarrollo o letales en la embriogénesis. En cuanto a las inserciones y las deleciones, no alteran el marco de lectura del ARNt, algo que sí ocurre en el ARNm, y su patogenicidad es dependiente de la estructura, de manera que generalmente son más patogénicas aquellas mutaciones en los brazos que en los loops (15). Sin embargo, estas inserciones en los ARNt mitocondriales son también una causa rara de desorden mitocondrial (6).

Hasta la fecha, se han identificado más de 75 genes nucleares relacionados con el síndrome de Leigh y algunos estudios sugieren que las mutaciones genéticas causantes de esta enfermedad varían en función de la etnia o entre poblaciones (5). Se han publicado artículos que afirman que las mutaciones o defectos en genes nucleares que codifican para las aminoacil ARNt sintetasas, encargadas de catalizar la unión del ARNt con su aminoácido correspondiente, son una causa bastante frecuente del síndrome de Leigh (5). Concretamente, la mutación en la metionil-ARNt formiltransferasa mitocondrial (MTFMT), necesaria para la iniciación y elongación de la traducción en la síntesis de proteínas mitocondriales, se relaciona con una aparición tardía de Leigh y con una mayor tasa de supervivencia.

Esto podría deberse a que los individuos portadores de esta variación no suelen presentar alteraciones en el bulbo raquídeo ni en los ganglios basales, pero sí en la médula espinal y es en ella donde se ve afectado el complejo I de la cadena respiratoria o una combinación de varios complejos (17).

Sin embargo, son las mutaciones en el ADNmt las que provocan un fenotipo más severo (18). La mayoría de las alteraciones en los ARNt relacionadas con Leigh ocurren en los genes codificantes para los ARNt leucina, isoleucina y lisina (5). No obstante, el estudio de dos hermanos con síndrome de Leigh de aparición en la edad adulta permitió el descubrimiento de una mutación en el ARNt de valina, donde se había producido una transversión (cambio de base púrica por pirimidínica o viceversa). Esta sustitución presenta carácter patogénico porque podría tener consecuencias estructurales y, por consiguiente, funcionales. Además, el ARNt valina mitocondrial, junto con los dos ARNr de 12 y 16S, forma parte del transcrito primario de la cadena H del genoma mitocondrial de mamíferos, que es el transcrito más corto y abundante. Por tanto, una mutación en el ARNt valina mitocondrial podría alterar el splicing de los ARNr y del propio ARNt valina en este transcrito primario (18).

## **4.2 ARNt TRIPTÓFANO: MUTACIONES Y ENFERMEDAD**

Generalmente, las enfermedades mitocondriales debidas a mutaciones en genes codificantes de ARNt mitocondriales son desórdenes multisistémicos cuyos primeros síntomas aparecen en la infancia o en la adolescencia y, los últimos, a mediana edad. Estas mutaciones se caracterizan por un descenso generalizado en la cantidad de enzimas de la cadena respiratoria que contienen subunidades codificadas por el ADNmt, reflejado por una deficiencia en la traducción del mismo (19). Dentro de estas mutaciones, las encontradas en el ARNt de triptófano son consideradas raras, ya que únicamente se han descrito unos pocos casos, los cuales se describen a continuación.

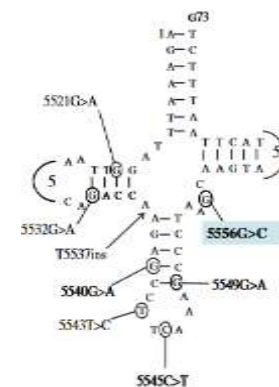
La primera mutación descrita en el ARNt mitocondrial de triptófano fue el polimorfismo m.5549G>A, detectada en un paciente con demencia, corea y ataxia cerebelar en cuyo fenotipo estaba implicado el sistema nervioso central y el metabolismo oxidativo, al igual que ocurre en la mutación m.5537Ti (8,20), objeto de estudio de nuestro trabajo. Un año más tarde, se identificó el polimorfismo m.5521G>A, asociado con un descenso selectivo de la actividad de COX, mientras que el resto de actividades de la cadena respiratoria no se encontraban afectadas. Al igual que el resto de mutaciones patogénicas del ARNt triptófano, se encuentra en una región conservada del genoma mitocondrial y los pacientes cursan con encefalomiopatías mitocondriales tardías a nivel muscular y cerebral (19). Una reducción similar de la actividad de COX fue detectada en pacientes con otro polimorfismo en el ARNt triptófano, m.5540G>A, que también cursaban con encefalomiopatía (21); mientras que aquellos que portaban la transición m.5532G>A presentaron síndrome neurogastrointestinal, caracterizado por fallos en el desarrollo, retrasos psicomotores, encefalopatía y oftalmoplejía, entre otros (22). Sin embargo, aquellos pacientes portadores de la mutación m.5543T>C en el ARNt triptófano no presentaron oftalmoplejía externa progresiva ni ninguna implicación neurológica, lo que sugiere que la correlación entre las manifestaciones clínicas de un determinado individuo y el ARNt específico mutado es mínima (23). Por su parte, la mutación m.5545C>T afecta a la base central del anticodón del ARNt de triptófano. Esta base es una citosina invariable entre especies que interacciona con la guanina central del codón del ARNm y es fundamental para determinar la especificidad del ARNt. Se piensa que dicha mutación supone una ganancia de función (24).

Recientemente, se describió la transversión m.5556G>C en el ARNt triptófano, caracterizada como patogénica, y en la que se produce un defecto en la actividad del complejo COX. El paciente portador fue diagnosticado con el síndrome de Leigh de aparición tardía y cursaba con retinitis pigmentosa,

epilepsia, miopatía y neuropatía, todos ellos síntomas característicos de una mutación en el ARNt mitocondrial (25). Se piensa que la región en la que se produce la mutación m.5556G>C es importante para las interacciones trans-moleculares entre bases que dan lugar al plegamiento terciario de la molécula, pero no afecta al emparejamiento de bases ni altera la estructura del ARNt. Por ello, esta localización podría ser la razón por la cual la mutación produce una aparición tardía del síndrome de Leigh, como ya se observó en estudios previos de mutaciones en otros ARNt (valina y fenilalanina) (18,26). Esto concuerda con el hecho de que la posición de una mutación en la molécula de ARNt es más importante en la determinación del fenotipo que la especificidad de aminoácido de dicha molécula (25).

Asimismo, y sorprendentemente, el paciente portador de la alteración m.5556G>C presentaba una mayor carga de mutación en el músculo esquelético, mientras que en el sistema nervioso central la carga era muy baja, a pesar de ser este último el lugar de aparición del síndrome. Una posible explicación a este fenómeno es que algunos tejidos celulares son más sensibles que otros a la presencia de una mutación en el ARNt. Además, el estudio familiar del paciente permitió observar que dicha mutación no se encontraba en ningún otro miembro, por lo que todo apuntaba a que se trataba de una mutación esporádica que había aparecido *de novo* (25).

Hasta la fecha se han descrito 8 mutaciones en el gen que codifica el ARNt triptófano, siete de las cuales se localizan en una región conservada del mismo, mientras que la restante lo hace en una región variable (imagen 3) (21,25). La mayor parte de dichas mutaciones causan el síndrome de Leigh, si bien los síntomas que provocan son muy variados, y producen una alteración del complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial. Por tanto, todo parece indicar que COX podría ser más susceptible que otros complejos de la cadena respiratoria a las mutaciones en el ARNt triptófano (21).



**Imagen 3 Estructura secundaria del ARNt triptófano mitocondrial** (25). Se muestran las ocho mutaciones descritas hasta la fecha para este ARNt. m.5556G>C afecta a la región variable del gen, mientras que el resto afectan al brazo del anticodón o al emparejamiento de bases.

### 4.3 MUTACIÓN m.5537Ti: CASOS DESCRITOS Y PATOGENICIDAD

La mutación m.5537Ti del ADNmt afecta al gen *MT-TW*, el cual codifica para el ARNt triptófano, y fue caracterizada por primera vez por Santorelli et al. (8) al estudiar a cinco miembros de una misma familia pertenecientes a diferentes generaciones (6). El paciente principal de esta familia presentaba encefalomiopatía mitocondrial, mientras que su hermano fallecido había sido diagnosticado con el síndrome de Leigh. Las antepasadas maternas de los hermanos también fueron estudiadas debido a la herencia materna de las mutaciones mitocondriales (8).

De esta forma, llevaron a cabo un estudio morfológico y bioquímico de biopsias musculares y fibroblastos en los cuales midieron la actividad de las enzimas de la cadena respiratoria y de la citrato sintasa por espectrofotometría. Asimismo, en estudios de genética molecular realizaron PCR-RFLPs para detectar las mutaciones más frecuentes en el genoma mitocondrial, lo que les permitió descartarlas y descubrir que se trataba de una nueva mutación. Una secuenciación posterior les llevó al descubrimiento de la inserción de un residuo de timina en la posición 5537 (8).

En dicho estudio mostraron también que los dos niños de la última generación poseían un alto porcentaje de esta mutación en diferentes tejidos con una alta heteroplasmia, siendo más abundante en algunas áreas del cerebro (ganglios basales, sustancia negra y bulbo raquídeo), donde alcanzaba incluso la homoplasmia. Sin embargo, otros órganos como el hígado o el riñón no mostraban alteraciones a pesar de tener porcentajes similares de ADNmt mutado. Estos resultados les llevaron a sugerir que la expresión fenotípica de la mutación podría estar modulada por otros factores (8).

Respecto a la clínica, el paciente con un 92 % de mutación mostraba síntomas de encefalomiopatía (niveles elevados de lactato, valores bajos de la cadena respiratoria y baja actividad residual del complejo IV), mientras que el niño con el 95 % de mutación había sido diagnosticado con Leigh y, como es característico, murió antes de los dos años de edad. Por otro lado, las antepasadas maternas de estos niños no cursaban con alteraciones neurológicas, pero hacían sospechar la presencia de una enfermedad mitocondrial al exhibir dolores de cabeza similares a la migraña, síntomas psiquiátricos y una baja estatura. El estudio genético demostró que eran portadoras de la mutación en heteroplasmia (8).

La mutación m.5537Ti cumple los criterios de patogenicidad de las mutaciones mitocondriales, ya que es más frecuente y severa en la descendencia y su expresión es más temprana con el paso de las generaciones. Estos autores asociaron dicha mutación con el síndrome de Leigh, convirtiéndose así en la segunda alteración descrita para el gen codificante del ARNt triptófano. La consideraron patogénica y no un polimorfismo neutral puesto que en muchos miembros de la familia se encontraba en heteroplasmia. Además, la correlación entre su abundancia y la severidad de los síntomas que producía era buena. Por tanto, la inserción de timina en la posición 5537 del ADNmt se asocia con el síndrome de Leigh y podría ser la responsable de defectos en las enzimas de la cadena respiratoria que estarían ocasionados por una síntesis proteica deficiente (8).

Años más tarde, una segunda familia con esta mutación fue estudiada por Tulinius et al. (6). El objeto de estudio fue un niño de 9 años de padres sanos cuya evolución fue observada desde los 8 meses de edad, siendo sus primeros síntomas irritabilidad e hipotonía, y que degeneró hasta sufrir ceguera y microcefalia, entre otras. Estudios bioquímicos de este paciente mostraron niveles altos de lactato en sangre, fluido cerebroespinal y orina. Asimismo, presentaba un patrón de lesión simétrico en el tracto corticoespinal, un grave retraso mental y mitocondrias anormales, visualizadas por microscopía electrónica. El análisis histoquímico enzimático del músculo mostró una reducción general de la actividad del complejo IV, algo que también revelaron los análisis bioquímicos de las mitocondrias del músculo esquelético. Además, a esta deficiencia del complejo IV se le sumó una deficiencia en el complejo I. Todo ello llevó a los autores a secuenciar el ADN del paciente en muestras de sangre, hígado y músculo y, utilizando el mismo protocolo que Santorelli et al. (8), descubrieron que el paciente poseía la mutación m.5537Ti en un porcentaje superior al 95 % en sangre. Un análisis de sangre de la madre del paciente reveló la presencia de esta mutación en un 81 %, pero en este caso no mostraba síntomas. A pesar de estas evidencias, los autores consideran necesaria una investigación neuropatológica para la asignación de esta mutación al síndrome de Leigh (6).

Estos han sido los dos únicos artículos publicados hasta la fecha donde se ha caracterizado y estudiado la mutación m.5537Ti del ADNmt. En ambos se recomienda hacer un screening de esta mutación en aquellos pacientes diagnosticados con síndrome de Leigh en los que una mutación de SURF1 haya sido descartada y, sobre todo, cuando además presenten una reducción en la actividad de los complejos I y IV (6,8).

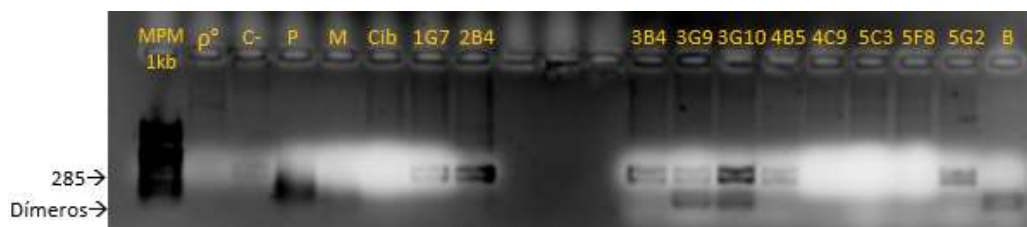
#### 4.4 OBTENCIÓN DE CLONES CON DIFERENTES PORCENTAJES DE HETEROPLASMA DE UN CÍBRIDO PORTADOR DE LA MUTACIÓN m.5537Ti

Para estudiar la patogenicidad de la mutación m.5537Ti se ha trabajado con cíbridos o híbridos transmitocondriales, que son el modelo celular más ampliamente utilizado para el estudio de patologías mitocondriales. Estos híbridos se habían construido previamente en el laboratorio por fusión de la línea tumoral 143B  $\rho^{\circ}$  con plaquetas de la madre de la paciente, la cual era portadora de la mutación en heteroplasmia. Con el objetivo de determinar el nivel umbral a partir del cual se observa una expresión fenotípica de dicha inserción, se trató de seleccionar clones con diferente porcentaje de mutación a partir del protocolo explicado en el apartado 3.2.3.2.4.b.

##### 4.4.1 Comprobación de la incorporación de la mutación m.5537Ti en el cíbrido generado y análisis del porcentaje de heteroplasmia: selección de clones para el estudio

Partiendo del cíbrido construido y mediante el proceso de dilución al límite, explicado en el apartado 3.2.3.1.5, se seleccionaron varios clones, los cuales habían crecido a partir de una única célula. Para comprobar la incorporación de la mutación de estudio y la heteroplasmia de la misma, se extrajo el ADN de los cíbridos construidos a partir de un pellet de células siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.2.3.2.1 y se realizó una PCR-RFLP, según indica el apartado 3.2.3.2.4 para comprobar el patrón de bandas tras una digestión con la enzima de restricción *MbolI*.

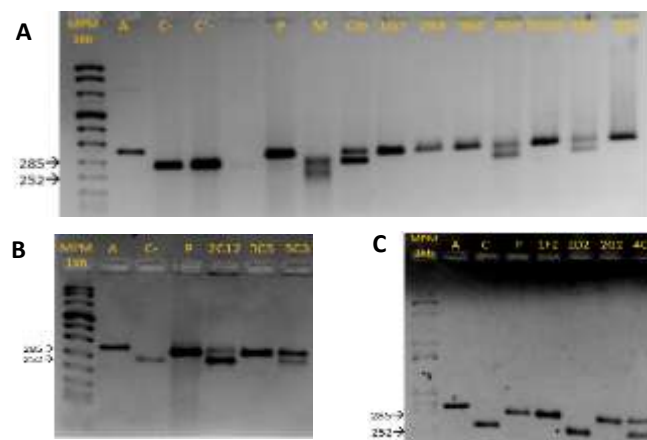
Primero, se amplificó una región de 285 pb por PCR-RFLP que incorporaba la zona donde debía encontrarse la mutación m.5537Ti y se visualizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Además del ADN extraído de los clones, se añadió también a la PCR una muestra denominada blanco para confirmar que la PCR se había realizado correctamente. Los resultados se pueden observar en la imagen 4.



**Imagen 4.** PCR-RFLP en gel de agarosa al 1% de varios clones. Siendo MPM un marcador de peso molecular de 1kb,  $\rho^{\circ}$  células de la línea 143B sin ADNmt, C- una muestra de ADN control sin mutación, P una muestra de ADN de sangre de la paciente, M una muestra de ADN de sangre de la madre de la paciente, Cib una muestra de ADN del cíbrido previo a la selección clonal y B el blanco. Aparecen también los clones 1G7, 2B4, 3B4, 3G9, 3G10, 4B5, 4C9, 5C3, 5F8 y 5G2.

La diferente intensidad en las bandas de los distintos clones de la imagen 3 se debe al diferente éxito en la reacción de amplificación por PCR de los mismos. No obstante, la presencia de la banda, independientemente de su intensidad, revela que se ha producido la amplificación del ADNmt, si bien todavía no se puede conocer si dicho ADNmt presenta o no la mutación de interés. Asimismo, en algunos casos se podía observar la presencia de más de una banda, indicando así la presencia de dímeros de cebadores, fenómeno que ocurre cuando se añaden los cebadores en exceso. Por el contrario, también se pudo observar la ausencia de banda en algunos casos, ya que no todos los clones extraídos amplificaron a la primera, por lo que en estos casos fue necesaria la realización de la PCR-RFLP de nuevo hasta conseguir la amplificación. Por tanto, como se muestra en la imagen 3, se produjo la amplificación del ADNmt de los clones 1G7, 2B4, 3B4, 3G9, 3G10, 4B5 y 5G2, mientras que en los pocillos correspondientes a las muestras  $\rho^{\circ}$ , C-, P, M, Cib, 4C9, 5C3 y 5F8 no se observó la presencia de banda de amplificación de 285 pb y fue necesaria una nueva PCR-RFLP.

Seguidamente, se procedió a la digestión con la enzima de restricción *MbolI* para conocer el porcentaje o la cantidad de mutación m.5537Ti de cada uno de los cíbridos anteriores según se indica en el apartado 3.2.3.2.4.b. Además de las muestras de los clones amplificados, se trató también con *MbolI* una muestra control negativa para la mutación de manera que su banda de 252 pb sirviera, principalmente, para confirmar que la enzima cortaba el fragmento amplificado, descartando así posibles fallos en la enzima; además de como referencia para la identificación de aquellos clones sin mutación. Por otro lado, se añadió también un amplificado sin digerir para descartar la presencia de bandas inespecíficas que pudieran dificultar la interpretación de los resultados; así como un control positivo (ADN de sangre de la paciente, de la madre de la paciente o de ambas) para confirmar que la enzima estaba cortando correctamente y, por tanto, sirvió también como patrón de corte para aquellos clones mutados al poseer una única banda de 285 pb. Esta digestión se visualizó y analizó posteriormente a través de una electroforesis en gel de agarosa al 2,5 % (imagen 5).



**Imagen 5. Digestiones enzimáticas en gel de agarosa al 2 % de los clones amplificados.** Siendo MPM un marcador de peso molecular de 1kb, A el amplificado sin digerir, C- y C'- muestras control negativas, P y M los controles positivos y Cib una muestra de ADN del cíbrido previo a la selección clonal. Se muestran también los clones 1G7, 2B4, 3B4, 3G9, 3G10, 4B5 y 5G2 en 4.A; los clones 2C12, 3C5 y 5C3 en 4.B y los clones 1F2, 2D2, 2G2 y 4C5 en 4.C. Asimismo, en 4.A aparecen dos controles negativos, C- y C'-, porque la amplificación de uno de ellos era de carácter dudoso.

Como se muestra en 4.A, de los 7 clones analizados, 5 clones (1G7, 2B4, 3B4, 3G10 y 5G2) presentaron la mutación en homoplasmia, mientras que los otros 2 clones restantes (3G9 y 4B5) la presentaron en heteroplasmia. Respecto a 4.B, se analizaron 3 clones, de los cuales 2 (2C12 y 5C3) eran heteroplásmicos para m.5537Ti y 3C5, homoplásmico. Por último, de los 4 clones estudiados en 4.C, 2 de ellos (1F2 y 2G2) resultaron homoplásmicos, 4C5 resultó heteroplásmico y 2D2 no portaba la mutación de interés.

Por tanto, se obtuvieron varios clones portadores de la mutación, siendo mayoritarios aquellos que se encontraban en homoplasmia (100 % de mutación) y un único clon sin mutación. Pese a conseguir varios clones con el mismo porcentaje de mutación, únicamente se trabajó con un clon de cada porcentaje, de manera que el resto fue descartado o almacenado como reserva en caso de que hubiera variaciones en el porcentaje a lo largo del estudio. Los clones estudiados y su respectivo porcentaje de mutación, calculado mediante el programa Gel-Pro Analyzer (apartado 3.2.3.2.4.b), se muestran en la Tabla 8.



**Tabla 8. Lista de clones estudiados por PCR-RFLP. Los clones marcados en verde fueron seleccionados para continuar con el estudio por presentar la mutación en diferentes porcentajes.**

CLON	% MUTACIÓN ESTIMADO
1G7	100
<b>2B4</b>	<b>100</b>
3B4	100
3G9	50
3G10	100
<b>4B5</b>	<b>50</b>
4C9	50
<b>5C3</b>	<b>80</b>
5F8	100
5G2	100
<b>2D2</b>	<b>0</b>
2G2	100
<b>2C12</b>	<b>20</b>
3C5	100
1F2	100
4C5	50

Las enfermedades mitocondriales se caracterizan por debutar cuando la cantidad de mutación supera cierto nivel. Este nivel umbral fenotípico es específico de cada mutación y tejido y es útil para demostrar la patogenicidad de dicha mutación así como para el estudio de posibles terapias o tratamientos (3,27). La importancia de este umbral en la expresión de mutaciones patogénicas en el ADNmt humano se ha estudiado a través de cíbridos construidos a partir de líneas celulares derivadas de pacientes con MERF o MELAS, ambas enfermedades mitocondriales (3).

En este trabajo se seleccionaron aquellos clones con un porcentaje de mutación del 20 %, 50 %, 80 % y 100 % con el objetivo de conocer el nivel umbral de la misma. El clon con un 0 % de mutación podría utilizarse en dichos experimentos como control isogénico, es decir, sería portador de los mismos cambios en el ADNmt a excepción de la mutación de estudio. Asimismo, en función del porcentaje de mutación, los cíbridos pasaron a cultivarse en un medio suplementado con uridina (80 y 100 %) o sin uridina (0, 20 y 50 %), como se detalla en el apartado 3.2.3.1.1.

#### 4.4.2 Análisis del número de copias de ADNmt de los clones seleccionados

La creación de cíbridos transmitocondriales permite la construcción de células con una alta tasa de división y proliferación y portadoras de una mutación de interés. No obstante, para dicha creación se parte de plaquetas de pacientes, que tienen una baja cantidad de mitocondrias y, por ende, de una baja concentración de ADNmt, por lo que previamente a la realización de cualquier estudio con dichos cíbridos se debe comprobar que han recuperado sus niveles de ADNmt. Algunos estudios afirman que una célula normal posee entre 450-800 copias de ADNmt, mientras que en el caso de tumores este número puede llegar a triplicarse (28). Estos niveles de ADNmt se recuperan haciendo pases sucesivos, es decir, cultivando los clones en placas de 100 hasta alcanzar la confluencia, tripsinizando y resemebrando el pellet resuspendido en un volumen de medio adecuado. Cada vez que se realiza este procedimiento es un pase.

Para verificar que los cíbridos con porcentajes de mutación 0, 20, 50, 80 y 100 % habían recuperado los niveles de ADNmt, se cuantificó el número de copias de ADNmt de dichos cíbridos mutantes por medio de un ensayo de RT-PCR cuantitativo, según se indica en el apartado 3.2.2.1, partiendo de ADNmt extraído por el método de fenol-cloroformo (apartado 3.2.2.2). Por tanto, se midieron las cantidades de ADNmt y ADNn correspondientes a tres pases alternos. Generalmente, el número de copias se expresa como el cociente número de copias del gen mitocondrial/número de copias del gen nuclear, pero en este caso los duplicados de cada pase no mostraron una coincidencia total. Por tanto, se decidió calcular el número de copias de ADNmt por célula para cada duplicado por separado y, partiendo de esos resultados, se calculó la media global. Los resultados aparecen representados en la Tabla 9.

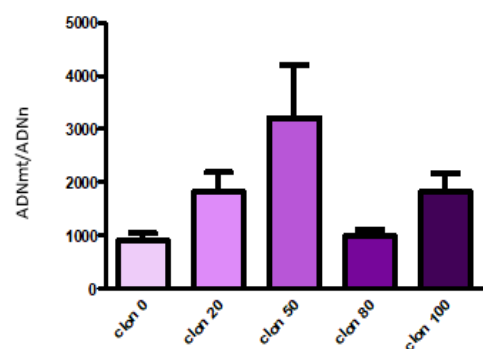
**Tabla 9. Número de copias de ADNmt por célula en los cinco cíbridos transmitocondriales seleccionados con porcentajes de mutación 0, 20, 50, 80 y 100 % y durante tres pases sucesivos.**

Cíbrido	Estado	Número de copias de ADNmt/célula
2D2 (0%)	Pase 12	862
	Pase 13	1172
	Pase 15	668
2C12 (20%)	Pase 12	2124
	Pase 13	1098
	Pase 15	2240
4B5 (50%)	Pase 12	5173
	Pase 13	2483
	Pase 15	1955
5C3 (80%)	Pase 12	1129
	Pase 13	739
	Pase 15	1096
2B4 (100%)	Pase 11	1127
	Pase 13	2063
	Pase 15	2272

Como se aprecia en la tabla 9, en términos generales se observó un incremento en el número de copias con los sucesivos pases realizados y, en todos los casos, este número es superior a las 500 copias de ADNmt, por lo que se puede afirmar que los clones han recuperado sus niveles de material genético mitocondrial.

La imagen 6 muestra que el clon con mayor número de copias era el correspondiente al 50 % de mutación. Cuando el ADNmt está mutado, la cadena respiratoria se ve afectada, por lo que no se produce toda la energía necesaria para la realización de las funciones celulares. Esto lleva a la célula a incrementar la producción de mitocondrias en un vano intento por obtener dicha energía, fenómeno conocido como biogénesis mitocondrial (29,30).

Según esto, se podría esperar que fuera el clon con un 100 % de mutación, seguido del clon con un 80 %, aquel con una mayor carga de genoma mitocondrial. Una posible explicación a este fenómeno podría ser el medio de cultivo, ya que los clones con mutaciones del 0, 20 y 50 %



**Imagen 6. Representación del número de copias de ADNmt por célula en los distintos clones. La representación se ha realizado con el programa informático PRISMA.**

crecieron en un medio de cultivo suplementado únicamente con SFB mientras que el medio de los clones mutados al 80 y 100 % estaba suplementado con SFB y uridina. Esta explicación sería consistente con la observación de un aumento gradual del número de copias de ADNmt en estos dos grupos por separado. Una explicación menos probable a este suceso sería que el clon con un 50 % de ADNmt mutado habría aumentado su cantidad de genoma mitocondrial mutado respecto al momento en que se midió dicha cantidad, ya que la heteroplasmia fluctúa, no es constante (16,31).

La resolución de estas dos hipótesis exigiría la confirmación de la cantidad de mutación por secuenciación y la repetición del ensayo creciendo las células en las mismas condiciones de cultivo.

## **5 CONCLUSIONES**

Los genes que codifican los ARNt mitocondriales suponen el 8 % del genoma mitocondrial, pero su frecuencia de mutación con carácter patogénico es superior a otros tipos de ARNs y esto los convierte en una de las causas más frecuentes de las enfermedades mitocondriales. Mutaciones en los ARNt alteran la cadena de transporte mitocondrial, mayoritariamente los complejos I y IV, conduciendo a una disminución de la síntesis de proteínas.

Dichas mutaciones se relacionan con el síndrome de Leigh, que es una enfermedad neurodegenerativa mitocondrial progresiva que tiende a aparecer en los primeros años de vida, aunque también se han descrito casos de aparición tardía. Para su diagnóstico, se miden parámetros como la acidosis láctica, se hacen pruebas de imagen en busca de lesiones cerebrales, biopsias musculares y un diagnóstico genético para hallar la mutación causante del mismo. Sin embargo, hasta el momento no hay un tratamiento efectivo debido a su alta tasa de mortalidad, si bien se han sugerido algunos fármacos y dietéticos para paliarlo.

Se han descrito 8 mutaciones en el ARNt triptófano mitocondrial relacionadas con el síndrome de Leigh, 7 de las cuales afectan a la estructura del mismo, mientras que solo una ocurre en la región variable del ARNt y esta podría ser la diferencia entre una aparición temprana y una aparición tardía, respectivamente. Todo ello sugiere la importancia de la localización de la mutación en la determinación del fenotipo. Asimismo, la mayoría de estas mutaciones afectan al complejo IV del sistema OXPHOS, por lo que se piensa que este complejo podría ser más sensible a las mutaciones en el ARNt triptófano que otros.

Una de las 7 mutaciones que afectan a la estructura del ARNt triptófano mitocondrial es m.5537Ti, en la cual se centra la parte experimental de este trabajo. Se han descrito dos casos de la misma, ambos relacionados con el síndrome de Leigh, que la catalogan como patogénica por su mayor severidad con el paso de las generaciones y por su correlación entre severidad y porcentaje de mutación. La mayoría de los pacientes estudiados portadores de dicha mutación se caracterizan por tener el complejo IV afectado, pero también se han descrito casos donde tanto el complejo IV como el complejo I están alterados.

Dentro de la parte experimental, se han obtenido clones del híbrido portador de la mutación m.5537Ti con diferentes porcentajes de heteroplasmia. El análisis de los niveles de ADNmt de los mismos demuestra que los híbridos están recuperados y sugiere que el número de copias de ADNmt es directamente proporcional a la carga de mutación. Sin embargo, sería necesario el análisis de otros parámetros bioquímicos, como la cantidad de subunidades mitocondriales o el consumo de oxígeno, para demostrar la patogenicidad de la mutación.

## CONCLUSIONS

An 8 % of the mitochondrial genome encodes mitochondrial tRNAs, but they tend to mutate and be pathogenic in a higher proportion than other RNAs, which make them one of the most frequent causes of mitochondrial alterations. Mutations in these tRNAs affect the mitochondrial electron transport chain, mostly complexes I and IV, and this leads to a protein synthesis decrease.

These mutations are related with Leigh syndrome, an early-onset progressive mitochondrial encephalomyopathy, although there have been reported some cases with a late-onset. Its diagnosis is based in measuring some laboratory parameters such as lactic acidosis, doing some imaging tests in order to find brain lesions, muscle biopsies and a genetic diagnosis to discover the mutation that causes the syndrome. However, there is not an effective treatment at the moment due to its high mortality rate, even though some drugs and dietetics have been suggested.

8 tryptophan tRNA mutations have been related to Leigh syndrome. 7 of these affect its structure while the remaining one takes place in the variable region. This could make the difference between an early and a late-onset, respectively, and all of that suggests how important the mutation's location is to determine the phenotype. In addition, most of these mutations affect OXPHOS' complex IV, which proposes that this complex could be more sensitive to tryptophan tRNA alterations than others.

One of the 7 mutations that affect mitochondrial tryptophan tRNA structure is m.5537Ti, which is also the main focus of the experimental work in this project. This mutation has been described in two papers, both related to Leigh syndrome, and it has been considered as pathogenic due to its higher severity throughout generations and because there was a good correlation between abundance of the mutation and severity of clinical symptoms. Most of studied patients with this mutation have complex IV affected, but there have also been described cases where both complex I and IV were affected.

Regarding experimental work, m.5537Ti cybrid's clones with different proportion of heteroplasmy have been obtained. The analysis of mtDNA levels proves that they are recovered and suggests that the number of mtDNA copies is proportional to the mutation load. Nevertheless, other biochemistry parameters' analysis would be needed, such as the number of mitochondrial subunits or the oxygen consumption rate, in order to confirm the mutation pathogenicity.

## 6 BIBLIOGRAFÍA

1. Villarroya JM, Ortiz SE, Ciberer DER, Aragonés I, De DC. enfermedades metabólicas producidas por alteración del ADN mitocondrial. Diagnóstico y Trat las enfermedades metabólicas Hered (Sanjurjo, P y Baldellou, A,Eds) 4ª Edición Capítulo 54 Ergon Madrid 2014 pp 773-790 ISBN 978-84-15351-96-2. (7).
2. Graff C, Bui TH, Larsson NG. Mitochondrial diseases. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2002;16(5):715–28.
3. Rossignol R, Faustin B, Rocher C, Malgat M, Mazat JP, Letellier T. Mitochondrial threshold effects. Biochemical Journal. 2003.
4. Chang X, Wu Y, Zhou J, Meng H, Zhang W, Guo J. A meta-analysis and systematic review of Leigh syndrome: clinical manifestations, respiratory chain enzyme complex deficiency, and gene mutations. Medicine (Baltimore). 2020;99(5):e18634.
5. Lee JS, Yoo T, Lee M, Lee Y, Jeon E, Kim SY, et al. Genetic heterogeneity in Leigh syndrome: Highlighting treatable and novel genetic causes. Clin Genet. 2020;(November 2019):586–94.
6. Tulinius M, Moslemi AR, Darin N, Westerberg B, Wiklund LM, Holme E, et al. Leigh syndrome with cytochrome-c oxidase deficiency and a single T insertion nt 5537 in the mitochondrial tRNA<sup>Trp</sup> gene. Neuropediatrics. 2003;34(2):87–91.
7. Ribeiro C, do Carmo Macário M, Viegas AT, Pratas J, Santos MJ, Simões M, et al. Identification of a novel deletion in SURF1 gene: Heterogeneity in Leigh syndrome with COX deficiency. Mitochondrion. 2016;
8. Santorelli FM, Tanji K, Sano M, Shanske S, El-Shahawi M, Kranz-Eble P, et al. Maternally inherited encephalopathy associated with a single-base insertion in the mitochondrial tRNA(Trp) gene. Ann Neurol. 1997;
9. Baertling F, Rodenburg RJ, Schaper J, Smeitink JA, Koopman WJH, Mayatepek E, et al. A guide to diagnosis and treatment of Leigh syndrome. Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry. 2014.
10. Sofou K, Steneryd K, Wiklund LM, Tulinius M, Darin N. MRI of the brain in childhood-onset mitochondrial disorders with central nervous system involvement. Mitochondrion. 2013;
11. Van Den Ouweland JMW, De Klerk JBC, Van De Corput MP, Dirks RW, Raap AK, Scholte HR, et al. Characterization of a novel mitochondrial DNA deletion in a patient with a variant of the Pearson marrow-pancreas syndrome. Eur J Hum Genet. 2000;
12. Slack JMW. Molecular Biology of the Cell. In: Principles of Tissue Engineering: Fourth Edition. 2013.
13. Kuhn C-D. RNA versatility governs tRNA function. BioEssays. 2016;
14. Aguilar Guerra K, Vilchis Peluyera A, Valdés López V. Los códigos genéticos mitocondriales: características, origen y evolución. Rev Educ Bioquímica [Internet]. 2018;36(4):129–40. Available from: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=77739>
15. Wong LJC, Chen T, Wang J, Tang S, Schmitt ES, Landsverk M, et al. Interpretation of mitochondrial tRNA variants. Genet Med [Internet]. 2020;0(0):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41436-019-0746-0>
16. Cox R, Platt J, Chen LC, Tang S, Wong LJ, Enns GM. Leigh syndrome caused by a novel m.4296G>A mutation in mitochondrial tRNA isoleucine. Mitochondrion [Internet].

2012;12(2):258–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2011.09.006>

17. Hayhurst H, de Coo IFM, Piekutowska-Abramczuk D, Alston CL, Sharma S, Thompson K, et al. Leigh syndrome caused by mutations in MTFMT is associated with a better prognosis. *Ann Clin Transl Neurol.* 2019;
18. Chalmers RM, Lamont PJ, Nelson I, Ellison DW, Thomas NH, Harding AE, et al. A mitochondrial DNA tRNA(Val) point mutation associated with adult-onset Leigh syndrome. *Neurology.* 1997;
19. Silvestri G, Rana M, DiMuzio A, Uncini A, Tonali P, Servidei S. A late-onset mitochondrial myopathy is associated with a novel mitochondrial DNA (mtDNA) point mutation in the tRNA(Trp) gene. *Neuromuscul Disord.* 1998;
20. Nelson I, Hanna MG, Alsanjari N, Scaravilli F, Morgan-Hughes JA, Harding AE. A new mitochondrial DNA mutation associated with progressive dementia and chorea: A clinical, pathological, and molecular genetic study. *Ann Neurol.* 1995;
21. Silvestri G, Mongini T, Odoardi F, Modoni A, DeRosa G, Doriguzzi C, et al. A new mtDNA mutation associated with a progressive encephalopathy and cytochrome c oxidase deficiency. *Neurology.* 2000;
22. Maniura-Weber K, Taylor RW, Johnson MA, Chrzanowska-Lightowlers Z, Morris AAM, Charlton CPJ, et al. A novel point mutation in the mitochondrial tRNATrp gene produces a neurogastrointestinal syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2004;
23. Anitori R, Manning K, Quan F, Weleber RG, Buist NRM, Shoubridge EA, et al. Contrasting phenotypes in three patients with novel mutations in mitochondrial tRNA genes. *Mol Genet Metab.* 2005;
24. Sacconi S, Salviati L, Nishigaki Y, Walker WF, Hernandez-Rosa E, Trevisson E, et al. A functionally dominant mitochondrial DNA mutation. *Hum Mol Genet.* 2008;
25. Sanaker PS, Nakkestad HL, Downham E, Bindoff LA. A novel mutation in the mitochondrial tRNA for tryptophan causing a late-onset mitochondrial encephalomyopathy. *Acta Neurol Scand.* 2010;
26. Deschauer M, Swalwell H, Strauss M, Zierz S, Taylor RW. Novel mitochondrial transfer RNAPhe gene mutation associated with late-onset neuromuscular disease. *Arch Neurol.* 2006;
27. Larsson N-G. Somatic Mitochondrial DNA Mutations in Mammalian Aging. *Annu Rev Biochem.* 2010;
28. Kondadi AK, Anand R, Reichert AS. Functional interplay between cristae biogenesis, mitochondrial dynamics and mitochondrial DNA integrity. *International Journal of Molecular Sciences.* 2019.
29. Giordano C, Iommarini L, Giordano L, Maresca A, Pisano A, Valentino ML, et al. Efficient mitochondrial biogenesis drives incomplete penetrance in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain.* 2014;
30. Iommarini L, Maresca A, Caporali L, Valentino ML, Liguori R, Giordano C, et al. Revisiting the issue of mitochondrial dna content in optic mitochondrial pathies. *Neurology.* 2012;
31. Aryaman J, Johnston IG, Jones NS. Mitochondrial heterogeneity. *Front Genet.* 2019;10(JAN):1–16.

## 7 ANEXOS

### 7.1 ANEXO I: TABLA DE APARATOS E INSTRUMENTOS

Listado de instrumentos y aparatos utilizados. Se incluyen el modelo, la marca y la función, así como algunas observaciones.

Función	Aparato	Modelo	Marca	Observaciones
Esterilización	Estufa	S-201	P-selecta	Vidrio (160 °C, overnight)
	Autoclave	437	P-selecta	Plástico y diluciones (120 °C, 1 atm, 20 min)
Balanza	Granatario	FA-2000	AND	Precisión 0,1 g
Almacenamiento	Ultracongelador	CFC Free	Sanyo	Muestras biológicas (-80 °C)
	Criopreservador	ESPACE 151-331-661	Air Liquid	Células en N <sub>2</sub> líquido
	Frigoríficos y congeladores	Varios	Whirlpool, Bosch, Lynx...	Reactivos y diluciones (4°C y -20 °C)
Manejo de volúmenes	Micropipetas	Nichipet EX	Nichiryo	2, 10, 20, 200 y 1000 µl
	Micropipetas multicanal	Finnpipette	ThermoFischer Scientific	50 y 300 µl
	Pipeteador automático	PipetBoy	Integra (Biosciences)	1-50ml
Recuento celular	Contador	Countess Automated Cell Counter	ThermoFischer Scientific	Azul tripán
Congelación de células	Criocontenedor	Mr. Frosty™	ThermoFischer Scientific	Adición de isopropanol y rampa de temperatura de 1 °C/min
Cultivo celular	Incubador	DHD Autoflow	Nuaire	37 °C, 5 % CO <sub>2</sub> , atmósfera húmeda
	Campanas de flujo laminar	Campana LaminAir HB2448	Holten	
		LabGard ES UN-437 Class II, type A2 Biosafety	Nuaire	
Atemperado	Baño termostatzado	Precistern	Selecta	Con agua destilada

Centrífugas	Microcentrífuga	MiniSpin plus	Eppendorf	Refrigerada
	A Tª ambiente	Allegra X-22	Beckman Coulter	
	Termostatzada	RC 5B PLUS	Sorvall	Rotores HS4 y SS34
PCR	Termociclador	T3 Thermocycler	Biometra	
	RT-PCR	StepOne™System	ThermoFischer Scientific	96 pocillos
Espectrofotómetro	Nano-drop	ND-1000	ThermoFischer Scientific	Ácidos nucleicos
Electroforesis	Cubetas	Sub-Cell GT Cell	Bio-Rad	Ácidos nucleicos
	Fuente de alimentación	PowerPac™ Universal	Bio-Rad	50-500V
Tratamiento de geles y membranas	Generador de gradiente	Hoefer SG30	Amersham	
	Visualización	Gel Doc™XR+System	Bio-Rad	Ultravioleta (UV)
Microscopía	Invertido	DMIL	Leica	Cámara ICC50 HD