

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**ASPECTOS BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES DE
LAS DEFICIENCIAS DE COMPLEJO I
MITOCONDRIAL LIGADOS AL CROMOSOMA X.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Daniel Fernández Moreira

Bajo la dirección del doctor

Miguel Ángel Martín Casanueva

Madrid, 2010

ISBN: 978-84-693-9233-1

© Daniel Fernández Moreira, 2010



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Facultad de Farmacia

Universidad Complutense de Madrid

ASPECTOS BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES DE LAS DEFICIENCIAS DE COMPLEJO I MITOCONDRIAL LIGADAS AL CROMOSOMA X

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Farmacia por

DANIEL FERNÁNDEZ MOREIRA

Madrid, Abril de 2010

**“Vivir no es sólo existir,
sino existir y crear,
saber gozar y sufrir
y no dormir sin soñar.
Descansar, es empezar a morir.”**

Gregorio Marañón (1887-1960)

“La verdadera ciencia enseña, por encima de todo, a dudar y a ser ignorante”.

Miguel de Unamuno (1864-1936)

Resulta complicado agradecer a todos aquellos que han hecho posible este trabajo, dado que no es “mi” trabajo exclusivo, sino la consecución de un trabajo coral del que yo soy el último firmante.

Primeramente, quiero agradecer al Dr. Miguel Ángel Martín Casanueva, mi director de tesis, su ayuda, comprensión, consejos y confianza desde el primer día que entré a formar parte del equipo de investigación, hace ya unos cuantos años.

Al Dr. Joaquín Arenas, mi codirector de tesis, expresarle mi más profunda admiración y agradecimiento por su apoyo profesional y personal, a lo largo de estos años de trabajo.

A la Dra. Yolanda Campos, igualmente gracias. Su apoyo para conmigo en todo este tiempo, ha sido una constante.

Gracias a la Dra. Ugalde, su ayuda y conocimientos han hecho posible completar este trabajo dotándolo de una calidad científica superior a la esperada. Igualmente, y por razones similares, muchas gracias al Dr. Jan A.M. Smeitink y todo su grupo en el “Centre for Mitochondrial Disorders, Laboratory of Paediatrics and Neurology, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen”, en Holanda. Sin su colaboración, este trabajo simplemente no hubiera sido posible.

A mis compañeros de laboratorio, unos cuantos a lo largo de este tiempo, auxiliares, técnicos, becarios, Doctores... a todos ellos muchas gracias de corazón; de todos he aprendido, y a todos espero haberos aportado algo, a nivel científico o personal.

Especial mención me gustaría hacer, sin menoscabo de nadie, a dos personas con las que empecé y terminé mi andadura en el grupo: Juan Carlos y Alber (nuestro conspicuo “Señor B”), muchas gracias amigos, ha sido un auténtico placer...

A mi familia, que obviamente, no por el apoyo científico, sino por el personal, han posibilitado mi dedicación al mundo de la ciencia y la investigación en todos estos años.

Gracias, Fer, sin tu ayuda, tu comprensión y tu amistad, hubiera sido mucho más difícil dedicarme a este “loco” mundo de la investigación.

Gracias, Miguel Ángel Girela, tu apoyo técnico, tu amistad, ha sido una gran ayuda.

Por último, pero ni mucho menos, menos importante, a la gran científica y muchísima mejor persona, sin la cual esta tesis me hubiera sido total y absolutamente imposible llevarla a cabo, por su apoyo, su tozudez, su sabiduría, su amor... muchas gracias Inma, este trabajo es también en parte tuyo, y a tí también va dedicado.

Dedicado a la memoria de mi padre
(Te echo de menos, viejo)

Tabla de contenido

I. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA GENÉTICA MITOCONDRIAL.....	14
1.1.1. Replicación del ADNmt.....	14
1.1.2 Transcripción del ADNmt.....	16
1.1.3. Traducción del ADNmt.....	18
1.2. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL SISTEMA GENÉTICO MITOCONDRIAL.....	19
1.3. IMPORTACIÓN DE PROTEÍNAS CODIFICADAS POR EL NÚCLEO.....	20
1.4. PECULIARIDADES DE LA GENÉTICA DEL ADN MITOCONDRIAL.....	22
1.4.1. Poliplasmia.....	22
1.4.2. Heteroplasmia.....	22
1.4.3. Efecto umbral.....	22
1.4.4. Segregación mitótica.....	23
1.4.5. Herencia materna.....	23
1.5. LA CADENA DE TRANSPORTE ELECTRÓNICO Y LA FOSFORILACIÓN OXIDATIVA.....	25
1.5.1. Complejo I: NADH- ubiquinona (CoQ) oxidoreductasa.....	27
1.5.2. Complejo II: succinato CoQ oxidorreductasa.....	28
1.5.3. Complejo III (complejo bc1): ubiquinol (QH ₂) citocromo c oxidorreductasa.....	29
1.5.4. Complejo IV: citocromo c oxidasa (COX).....	29
1.5.5. Complejo V: F ₀ -F ₁ ATP sintasa.....	30
1.6. MITOCONDRIA Y ENFERMEDAD.....	31
1.6.1. Defectos en el ADN mitocondrial.....	32
1.6.2. Defectos en el ADN nuclear.....	34
1.7. COMPLEJO I: NADH-Ubiquinona oxidoreductasa.....	36
1.8. NDUFA1 y NDUFB11.....	43
1.8.1. <i>NDUFA1</i>	43
1.8.2. <i>NDUFB11</i>	44
II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....	47
2.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	47
2.2. OBJETIVOS.....	48
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	50

3.1. PACIENTES Y CONTROLES.....	50
3.2. CASOS CLÍNICOS.	51
3.3. MÉTODOS.	53
3.3.1. Estudio de las Actividades Enzimáticas de los Complejos de la Cadena Respiratoria Mitocondrial.....	53
3.3.2. Extracción de ADN.....	56
3.3.3. Cribado Mutacional.....	57
3.3.3.a. <i>Southern Blot</i>	57
3.3.3.b. <i>Etapa de amplificación</i>	58
3.3.4. Secuenciación de dos genes ligados al cromosoma X y PCR-RFLP de dos nuevas mutaciones en <i>NDUFA1</i>	64
3.3.5. Cultivo de Fibroblastos y Aislamiento de Proteína Mitocondrial.	67
3.3.5.a. <i>Obtención de Extractos Mitocondriales con Digitonina para la realización de “Blue Native”</i>	67
3.3.5.b. <i>Obtención de Extractos Mitocondriales para la realización de Western Blot</i>	68
3.3.6. Estudio del ensamblaje y/o estabilidad de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial.	68
3.3.6.a. <i>Preparación del Gel de “Blue Native” de Primera Dimensión (1D)</i>	68
3.3.6.b. <i>Preparación de las muestras para “Blue Native”</i>	69
3.3.6.c. <i>Electroforesis</i>	69
3.3.6.d. <i>Ensayo de Actividad En Gel ó “In Gel Activity” (IGA)</i>	70
3.3.6.e. <i>Preparación del Gel de “Blue Native” de Segunda Dimensión (2D)</i>	70
3.3.6.f. <i>Transferencia</i>	71
3.3.6.g. <i>Western Blot</i>	71
IV. RESULTADOS.....	74
4.2. ANÁLISIS DE LAS NUEVAS MUTACIONES ENCONTRADAS EN EL GEN <i>NDUFA1</i>	77
4.3. LAS MUTACIONES p.Gly8Arg Y p.Arg37Ser ALTERAN DISTINTOS DOMINIOS FUNCIONALES DE LA SUBUNIDAD <i>NDUFA1</i>	81
4.4. LA INTEGRIDAD DEL COMPLEJO I MITOCONDRIAL HUMANO SE ALTERA POR LAS MUTACIONES EN <i>NDUFA1</i>	84
4.5. MUTACIONES EN LA SUBUNIDAD <i>NDUFA1</i> AFECTAN A LA EXPRESIÓN DE LOS COMPLEJOS RESPIRATORIOS MITOCONDRIALES 86	
4.6. LAS MUTACIONES EN <i>NDUFA1</i> PROVOCAN EFECTOS DIFERENTES SOBRE EL ENSAMBLAJE/ ESTABILIZACIÓN DEL COMPLEJO I MITOCONDRIAL..... 88	
V. DISCUSIÓN.....	92
VI. CONCLUSIONES.	99

VII. BIBLIOGRAFÍA	101
ANEXO	111

INTRODUCCIÓN



I. INTRODUCCIÓN.

El término encefalomiopatía mitocondrial fue inicialmente propuesto para incluir todos los fenotipos clínicos asociados a una disfunción mitocondrial. Actualmente se utiliza para referirse a aquellas patologías debidas a una alteración en el componente final del metabolismo oxidativo, es decir, la cadena respiratoria asociada a la fosforilación oxidativa. Estos trastornos que se asocian en una gran parte de los pacientes con afectación de tejidos de alta demanda energética, como el cerebro y el músculo esquelético (encefalomiopatías), son denominados con el concepto más genérico de enfermedad mitocondrial o enfermedad de la cadena respiratoria mitocondrial (DiMauro and Schon, 2003), debido a que afectan a la práctica totalidad de órganos y tejidos, siendo enfermedades multisistémicas. Durante casi tres décadas, el diagnóstico de las enfermedades mitocondriales se ha basado en la integración de la características clínicas, los hallazgos histomorfológicos de la biopsia de músculo, y las alteraciones de parámetros bioquímicos como la hiperlactacidemia y la elevación de creatinquinasa sérica, junto a la identificación de la deficiencia enzimática de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial en tejidos diana, principalmente en músculo esquelético. En las dos últimas décadas, la eclosión de las técnicas de biología molecular ha permitido mejorar de forma sustancial la caracterización de estas patologías, en particular aquellas relacionadas con alteraciones del ADN mitocondrial (ADNmt).

Las mitocondrias tienen su origen en las proteobacterias, las cuales se unieron a células eucariotas primitivas simbióticamente, hace más de mil millones de años (Dyall, et al., 2004). Éstas son pequeños orgánulos subcelulares localizados en el citoplasma de las células eucariotas. Poseen una membrana externa y otra interna que dan lugar a dos espacios perfectamente definidos, la matriz mitocondrial y el espacio intermembrana. En la membrana interna, que se encuentra plegada en forma de crestas, se localizan los

complejos enzimáticos de la cadena respiratoria. Es la única organela, junto con el núcleo, que posee su propio ADN, el ADNmt. La matriz mitocondrial contiene, además del ADNmt, las proteínas necesarias para la replicación y transcripción del mismo, los ribosomas, y otras enzimas que participan en otros procesos metabólicos tales como el ciclo de Krebs y la β -oxidación. Cada mitocondria suele contener de 5 a 10 copias de ADNmt y cada célula humana puede poseer hasta cientos de mitocondrias (p.ej. el óvulo puede tener hasta 100000 copias de ADNmt (Chen, et al., 1995)).

El ADNmt humano (Figura 1) es una molécula circular cerrada de doble cadena que consta de 16.569 pares de bases (pb). Las dos cadenas del mismo poseen diferentes densidades según su composición de C+G, lo que da lugar a la definición de una cadena pesada (H) y otra ligera (L). El ADNmt contiene la secuencia de 37 genes que corresponden a 2 ARN ribosómicos (ARNr), 22 ARN de transferencia (ARNt), y a la codificación de 13 polipéptidos los cuales forman parte de la estructura de varios complejos de la cadena respiratoria mitocondrial. Así, siete proteínas forman parte del complejo I (subunidades ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6); una corresponde al apocitocromo b del complejo III; tres subunidades pertenecen al complejo IV (COXI, COXII, COXIII), y las otras dos al complejo V (subunidades ATP6 y ATP8). El resto de las proteínas que forman parte de estos complejos y del complejo II, y las proteínas que componen la maquinaria de replicación y de expresión del propio genoma mitocondrial, están codificadas por genes nucleares, por tanto son traducidas en los ribosomas citoplásmicos e importados a la mitocondria mediante translocasas localizadas en las membranas, externa e interna, mitocondriales (Attardi and Schatz, 1988; Herrmann and Neupert, 2000).

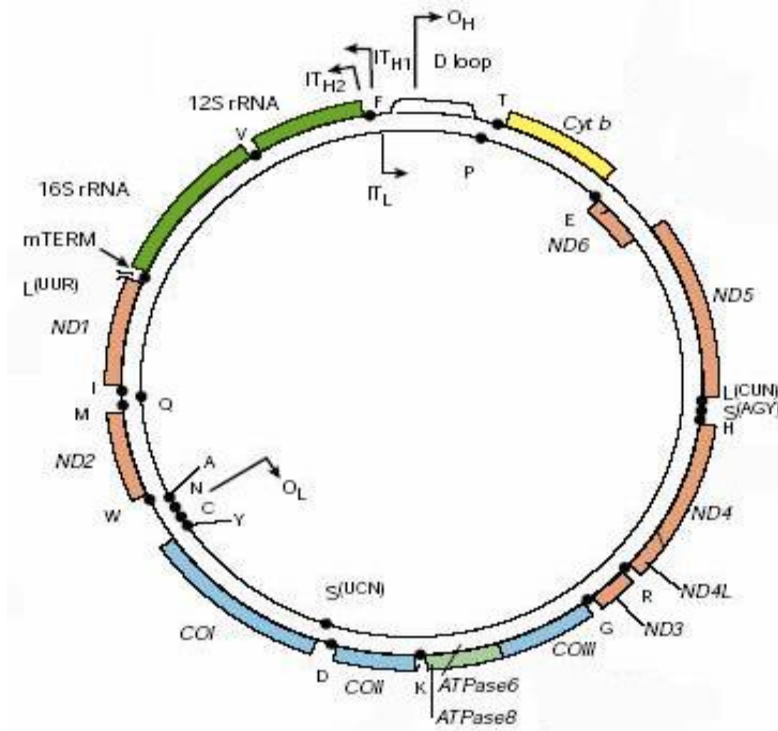


Figura 1. Representación esquemática del ADNmt. ND: genes codificantes de subunidades proteicas del Complejo I; CO: genes codificantes de subunidades del Complejo IV; ATPasas 6 y 8: genes codificantes de estas subunidades del Complejo V; ARNr 12S y 16S: genes codificantes de los ARN ribosomales mitocondriales. Los genes codificantes de los ARNt se encuentran representados con el código estándar. D-loop: bucle-D, región no codificante del ADNmt. P_H y P_L : promotores de transcripción de las cadenas pesada (H) y ligera (L). O_H y O_L : orígenes de replicación de las cadenas pesada y ligera. Las flechas indican el sentido de replicación y transcripción de ambas cadenas. (Smeitink, et al., 2001b).

1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA GENÉTICA MITOCONDRIAL.

El ADNmt se caracteriza por:

- una organización genética extremadamente compacta, con ausencia de intrones y sin prácticamente secuencias no traducidas, y
- una distribución espacial de los ARNt que delimita los genes que codifican los ARNr y los genes codificantes de proteínas (Montoya, et al., 1981).

1.1.1. Replicación del ADNmt.

La replicación del ADNmt es un proceso crucial en la biogénesis mitocondrial, que al contrario de lo que sucede en el ADNn, es independiente del ciclo celular (fase S), por

tanto las moléculas de ADNmt se pueden replicar en cualquier momento ((Bogenhagen and Clayton, 1977). Este proceso que fue descrito hace más de 20 años ((Kasamatsu and Vinograd, 1973) y estudiado en detalle por el grupo de Clayton (Clayton, 1982), consiste en un mecanismo asincrónico, con dos orígenes de replicación unidireccionales, es decir, la síntesis de una cadena comienza en el O_H, situado alrededor del nucleótido 200 (Anderson, 1981) en la llamada “región control” de 1123 pb localizada entre los genes que codifican ARNt^{Phe} y ARNt^{Pro}, avanzando en el sentido de las agujas del reloj, mientras que la síntesis de la otra cadena comienza, una vez que se han sintetizado dos terceras partes de la primera, en el O_L (situado en la posición 5750 entre los genes que codifican ARNt^{Cys} y ARNt^{Asn}) teniendo lugar en el sentido contrario a las agujas del reloj. Por tanto, las dos moléculas hijas resultantes son sintetizadas en dos tiempos diferentes.

De forma similar a la que ocurre en bacterias, es necesaria la síntesis previa de un ARN cebador, proceso que comienza a partir del promotor L. Posteriormente, se une el factor de transcripción mitocondrial A (mtTFA), lo que permite la separación de las cadenas. Este ARN, sintetizado por una ARN polimerasa mitocondrial, al hibridar con la cadena L, desplaza a la cadena H, y genera el bucle-D. La síntesis de ADN no comienza hasta que el ARN precursor no es digerido por la acción de una ribonucleasa procesadora de ARNmt (ARNsa MRP) y una endonucleasa G (Shadel and Clayton, 1997), dando lugar al cebador necesario para la acción de la ADN polimerasa- γ mitocondrial (gamma-pol). Esta enzima ha sido caracterizada en distintos seres vivos incluyendo la humana (Gray and Wong, 1992; Kaguni and Olson, 1989). Posee actividad ADN polimerasa en sentido 5'→3' y actividad exonucleasa en sentido 3'→5'. La holoenzima gamma-pol es, en vertebrados, un heterotrímero formado por una subunidad catalítica de 145 kDa denominada pol γ -A que está codificada por el gen *POLG*, y una subunidad accesoria dimérica formada por 2 monómeros idénticos de 55 kDa denominada pol γ -B y codificada por el gen *POLG2* (Yakubovskaya, et al., 2006). La elongación de la cadena H hija transcurre de forma unidireccional alrededor de la cadena L, al tiempo que se desplaza la H parental. La replicación de la cadena L comienza en el O_L, cuando éste queda en forma de cadena sencilla, momento en el que esta región adquiere la estructura de bucle.

En todo el proceso intervienen otra serie de proteínas accesorias como la proteína unida a ADN de cadena sencilla (mtSSB) (Van Tuyle and Pavco, 1985; Thommes, et al., 1995), topoisomerasas y helicasas (Taanman, 1999).

El modelo anteriormente mencionado es conocido como el “modelo de replicación de cadena asimétrica” del ADNmt, siendo, actualmente, el más sólido de los que se han postulado.

Sin embargo, experimentos desarrollados por Holt y colaboradores (Bowmaker, et al., 2003; Holt and Jacobs, 2003; Holt, et al., 2000; Yasukawa, et al., 2005) han cuestionado este modelo. El análisis de intermediarios de la replicación (del ADNmt) mediante técnicas electroforéticas de 2ª dimensión (2D), apuntó a un modelo de síntesis del ADN basado en el acoplamiento de la cadena rezagada y adelantada.

Recientemente se ha propuesto un modelo que pretende conciliar los aspectos más controvertidos de las distintas teorías, con la hipótesis original de la replicación. El llamado “modelo de desplazamiento modificado de cadena” incluye un punto de vista alternativo con respecto al origen de la cadena ligera, dando especial relevancia al tipo de migración en las moléculas replicadas de ADNmt (Brown, et al., 2005; Brown and Clayton, 2006).

1.1.2 Transcripción del ADNmt.

Al igual que sucede en el caso de la replicación, la transcripción del ADNmt tiene una serie de peculiaridades que la diferencian del ADNn y la asemejan a los mecanismos que suceden en los organismos procariotas.

La transcripción es un proceso que tiene lugar a partir de los promotores de transcripción de ambas cadenas (L, H₁, H₂), localizados en el bucle-D, procediendo en sentido contrario y de forma sincrónica. La transcripción de la cadena H comienza en dos sitios, IT_{H1} e IT_{H2}, mientras que la cadena ligera se transcribe a partir de uno solo, IT_{L1} (Montoya, et al., 1982; Montoya, et al., 1983). Los transcritos a partir de IT_{H2} e IT_{L1}, los cuales se localizan dentro del gen del ARNt^{Phe}, son policistrónicos y corresponden prácticamente a las secuencias completas de ambas cadenas, H y L, respectivamente. IT_{H1} se encuentra situado justo antes del gen del ARNt^{Phe}, y el transcrito generado a partir de él termina poco después del gen ARNr 16S, en el gen ARNt^{Leu(UUR)}.

El inicio de la transcripción requiere la intervención de una ARN polimerasa mitocondrial específica y el factor mtTFA (Parisi and Clayton, 1991), que reconoce

secuencias específicas en los promotores. Además de esta función, mtTFA es esencial para el mantenimiento del ADNmt en levaduras (Diffley and Stillman, 1991) y probablemente en mamíferos (Larsson, et al., 1998), debido a su capacidad de unirse de forma no específica al ADN. Por tanto, el mtTFA podría jugar un doble papel, como factor específico de activación de la transcripción y de empaquetador cromosomal. La afinidad de este factor es diferente por ambos promotores, siendo mayor en el caso de la cadena ligera, lo que se traduce en un mayor número de transcritos de la misma con respecto a la pesada (Tracy and Stern, 1995). Además, la existencia de dos unidades distintas de transcripción en el promotor de la cadena pesada, puede explicar, en parte, la activación preferencial en la síntesis de ARNrs frente al ARNm policistrónico total (Montoya, et al., 1983). En este caso parece intervenir también un factor regulador terminador (mTERF) (Kruse, et al., 1989), que reconocería una secuencia específica de 13 pares de bases en el ARNt^{Leu(UUR)}, regulándose no sólo la iniciación de la transcripción de la cadena H (Christianson and Clayton, 1988) sino también su terminación. Este mTERF parece también regular la transcripción de ARNm policistrónico procedente de la cadena ligera, pues normalmente éste se transcribe hasta aquí. Existe, por tanto, una serie de mecanismos reguladores que adaptarían la síntesis de las subunidades que forman parte de la cadena respiratoria en función de la demanda energética de la célula, de tal manera que niveles elevados de ATP estimularían la transcripción de los ARNrs y la cadena L, mientras que bajos niveles de ATP favorecerían la transcripción completa de la cadena H (Gaines, et al., 1987).

La estructura de los ARNt se caracteriza por contar con pocos nucleótidos, de 59 a 75, tener un tamaño variable del bucle “DHU” y, con la excepción del ARNt^{Ser(AGY)}, poder plegarse formando la estructura característica de “hoja de trébol”, hecho que es fundamental en el procesamiento de los ARNm policistrónicos.

Los productos de transcripción del ADNmt humano que se han aislado incluyen los dos ARNr, un ARN precursor de ambos, los 22 ARNt y 18 ARN poliadenilados en el extremo 3', la mayoría de los cuales corresponden a los ARN mensajeros (Montoya, et al., 1983). En general, los ARN maduros corresponden a un solo gen, y sólo en dos de ellos (los que codifican las subunidades del complejo I ND4 y ND4L, y la subunidades 6 y 8 de la ATPasa) contienen dos genes cada uno con el marco de lectura solapado.

Los ARNr se caracterizan por estar metilados y oligoadenilados en su extremo 3' contando con 1 a 10 adeninas no codificadas en el ADNmt (Dubin, et al., 1982).

En cuanto a los ARNm correspondientes a las 13 proteínas codificadas por el ADNmt se sabe que: i) contienen exclusivamente la secuencia del patrón de traducción y una cola de poliadenina en el extremo 3'; ii) comienzan por los codones de iniciación AUG, AUA o AUU, o tienen 1 a 3 nucleótidos delante de los mismos; iii) no poseen la estructura "cap" en el extremo 5' (Montoya, et al., 1981).; iv) en la mayor parte de ellos, el extremo 3' carece de región no codificante, finalizando en un codon de terminación incompleto, cuya posterior poliadenilación generará en todos ellos el codon de terminación UAA.

1.1.3. Traducción del ADNmt.

Los ARNm mitocondriales son traducidos en la matriz mitocondrial mediante sus propios ribosomas, cuyo coeficiente de sedimentación es 55S. Están compuestos por dos subunidades 28S y 39S, que contienen 32 y 52 proteínas, respectivamente, codificadas por el ADNn, junto a los ARNr codificados por el ADNmt.

El código genético utilizado por la mitocondria tiene una serie de diferencias con respecto al universal. Así, el codon UGA codifica triptófano en lugar de terminación; AUA indica metionina en lugar de isoleucina; y AGA y AGG especifican terminación en lugar de arginina. Este fenómeno asegura que sólo los mensajes codificados por el ADNmt serán traducidos satisfactoriamente en la matriz.

Otra peculiaridad destacable del sistema genético mitocondrial es el uso de un modelo inusual de reconocimiento de codones, que permite la lectura del código con sólo los 22 ARNt codificados por el ADNmt.

Los ARNm mitocondriales carecen de la secuencia 5'-UTR y de la típica estructura "cap" de los ARNm citoplasmáticos. Se desconoce la forma en la que los mitorribosomas reconocen el extremo 5' de los ARNm e inician la traducción. La iniciación y elongación de la traducción dependen de factores similares a sus correspondientes en procariotas, mtF2, mtEFTu, mtEFTs y mtEFG (Taanman, 1999). Recientemente se han empezado a caracterizar algunas aminoacil ARNt sintetasas (Jorgensen, et al., 2000).

1.2. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL SISTEMA GENÉTICO MITOCONDRIAL.

La regulación de la expresión del sistema genético mitocondrial está condicionada por los factores nucleares implicados en la modulación tanto de la replicación, como la transcripción y la traducción de la molécula. Así mismo, hay que considerar cómo se produce la integración de la actividad de este genoma con la expresión de genes nucleares codificantes de proteínas que forman parte de la cadena respiratoria.

Estudios realizados en células de mamíferos sugieren que la replicación del ADNmt tiene lugar en el espacio perinuclear. Aunque este proceso tiene lugar independientemente del ciclo celular, recientemente se ha demostrado en *Drosophila* la existencia de una relación entre la replicación de ambos genomas. Así se ha visto que existe un factor, implicado en la coordinación de genes involucrados en la replicación del ADNn y en el control del ciclo celular, denominado DREF, que regula también la proteína mtSSB y la expresión de la subunidad accesoria β de la γ -polimerasa (Lefai, et al., 2000; Ruiz De Mena, et al., 2000). Por tanto, DREF podría dirigir la respuesta de la maquinaria de replicación del ADNmt adecuándola a la síntesis del ADNn y el ciclo celular.

La expresión de los genes codificados en el ADNmt está regulada a distintos niveles:

1. Mediante el control de la dosis génica;
2. Regulación transcripcional;
3. Regulación postranscripcional, y
4. Regulación traduccional (Enriquez, et al., 1998).

La regulación por dosis génica se ha identificado en el músculo estriado de mamíferos, observándose una relación entre la concentración de ADNmt y ARNmt y la capacidad oxidativa del tejido. Esta regulación podría estar mediada por el componente ARN de la ARNsa MRP (Williams, 1986) o por variaciones en la expresión del mtTFA (Scarpulla, 1997).

La regulación transcripcional puede tener lugar en la iniciación o terminación del proceso, a nivel de la transcripción de la cadena pesada (Montoya, et al., 1982); (Montoya, et al., 1983), en el control de la síntesis de los ARNr (Kruse, et al., 1989) y la estabilidad de los distintos ARN (Gelfand and Attardi, 1981; Ostronoff, et al., 1995).

La regulación postranscripcional tiene lugar a nivel del procesamiento de los transcritos primarios (Ojala, et al., 1980) y de la estabilidad de los transcritos maduros (Gelfand and Attardi, 1981; Ostronoff, et al., 1995).

Algunos autores han propuesto también la existencia de una regulación a nivel de la traducción, basada en diferencias en la eficiencia de la traducción de los distintos mensajeros (Attardi, 1987), en la disponibilidad de subunidades sintetizadas en el citoplasma pertenecientes a un determinado complejo (Attardi, et al., 1990), etc.

Se ha observado que mutaciones en el Translocador de Nucleótidos de Adenina 1 (*ANT1*), que codifica la proteína más abundante en la membrana interna mitocondrial, cuya función es regular los niveles de ADP/ATP en el interior de la matriz mitocondrial y el citoplasma, además de formar parte del Poro de Transición de Permeabilidad Mitocondrial (MPTP) (Brustovetsky and Klingenberg, 1996) y mediar en el proceso de apoptosis (Marzo, et al., 1998), provocan alteraciones en la replicación del ADNmt dando lugar a deleciones múltiples del ADNmt (Kaukonen, et al., 2000).

Por último, variaciones en la disponibilidad de sustratos pueden alterar también la replicación del ADNmt, dando lugar a deleciones múltiples de este genoma. Este hecho queda ilustrado en el caso de mutaciones en el gen de la timidina fosforilasa, que siendo una proteína que no se expresa a nivel de músculo esquelético, interviene en el control de la síntesis de ADNmt de forma indirecta, regulando los niveles de timidina y desoxiuridina en sangre, que a su vez provocarían un desequilibrio entre las concentraciones de nucleótidos intramitocondriales, lo que llevaría a la síntesis anómala de ADNmt. Las mutaciones descritas en este gen se asocian al síndrome MNGIE (caracterizado por miopatía ocular, alteraciones de la motilidad intestinal, neuropatía periférica, miopatía, acidosis láctica y leucoencefalopatía) (Nishino, et al., 1999).

1.3. IMPORTACIÓN DE PROTEÍNAS CODIFICADAS POR EL NÚCLEO.

De las 1.000 proteínas que forman parte de la mitocondria, únicamente 13 son codificadas por el ADNmt. La mayoría, por tanto, son codificadas por el núcleo y tienen que ser importadas a la mitocondria desde el citosol. El proceso de importación es muy complejo, pues existen diferentes vías y un número elevado de posibles localizaciones de estas proteínas en la mitocondria (membrana externa, membrana interna, espacio intermembrana y matriz).

La internalización de las proteínas, sintetizadas en el citoplasma, parece tener lugar mediante la acción coordinada de dos maquinarias de translocación: 1) el complejo TOM, localizado en la membrana externa mitocondrial; 2) y dos complejos TIM, que permiten el transporte a través de la membrana interna (Neupert, 1997). La translocación inicial y el destino de las pre-proteínas que se dirigen a la matriz parece depender de la digestión selectiva de presecuencias en la región amino terminal de las mismas mediante proteasas específicas (Neupert, 1997). Frecuentemente esta zona contiene secuencias consenso de carácter básico (con abundantes residuos de arginina y lisina y un mínimo número de residuos de glutamato o aspartato), que determinan el punto exacto de corte de la presecuencia. Por el contrario, proteínas cuyo destino es la membrana externa, y algunas que se anclarán en la membrana interna, parecen no contener estas presecuencias diana.

Muchos de los componentes de la maquinaria de importación pertenecen a la familia de proteínas denominado “proteínas de choque térmico (heat-shock proteins o hsp) (Stuart, et al., 1994). Éstas constituyen un grupo de proteínas dependientes de ATP, encargadas de desplegar y plegar las proteínas a internalizar para permitir su paso a través de ambas membranas una vez han sido reconocidas por su receptor específico.

De todos los genes nucleares que codifican estas proteínas mitocondriales, existen un grupo de 50 a 100 que contienen elementos regulatorios transcripcionales en común. Dentro de ellos se encuentran varios que codifican subunidades que forman parte de la cadena respiratoria y algunos implicados en la replicación del ADNmt. Los factores nucleares de respiración 1 y 2 (NRF1, NRF2), constituyen dos buenos ejemplos de dichos elementos reguladores, y han sido identificados en la región promotora o en el primer intrón de varios de estos genes (Evans and Scarpulla, 1990; Virbasius, et al., 1993), como en el caso de la subunidad IV_c de la COX (Virbasius and Scarpulla, 1991).

Por otra parte, una vez que estas proteínas se encuentran en su forma madura han de anclarse en la membrana interna, en el complejo correspondiente, uniéndose adecuadamente a las subunidades codificadas por el ADNmt. En este proceso intervienen otras proteínas codificadas por el núcleo y cuya alteración puede ocasionar una miopatía mitocondrial, como ocurre, entre otras, en el caso de las codificadas por los genes *SURF1* (Zhu, et al., 1998) y *SCO2* (Papadopoulou, et al., 1999), asociadas al síndrome de Leigh y encefalomiocardiopatía, respectivamente.

1.4. PECULIARIDADES DE LA GENÉTICA DEL ADN MITOCONDRIAL.

El ADNmt tiene importantes características genéticas respecto al ADN de los cromosomas entre las que destacan la poliplasmia, y por ende la heteroplasmia, el efecto umbral, la segregación mitótica, y la herencia por vía materna.

1.4.1. Poliplasmia.

Cada célula, dependiendo de sus requerimientos de energía, contiene un número de mitocondrias, y cada una de ellas, en general, de 5 a 10 copias de ADNmt. Por tanto dentro de cada célula existirán miles de copias de cada gen codificado por el ADNmt.

1.4.2. Heteroplasmia.

Cuando una célula se divide, las mitocondrias se distribuyen al azar entre las dos células hijas. Es por ello que si esta célula posee dos poblaciones de mitocondrias, con ADNmt mutado y ADNmt con la secuencia consenso, las células hijas podrán ser de tres tipos: células con mitocondrias portadoras todas ellas de ADNmt normal, en cuyo caso hablaremos de homoplasmia normal; células en las que todas sus mitocondrias tengan el material genético mutado, en cuyo caso hablaremos de homoplasmia mutante; y células que porten los dos tipos de ADNmt, normales y mutantes, en cuyo caso las definiremos como heteroplásmicas. En términos muy generalista se puede decir que los polimorfismos neutros son homoplásmicos, mientras que las mutaciones patogénicas suelen, aunque no invariablemente, ser heteroplásmicas.

1.4.3. Efecto umbral.

La expresión fenotípica de una mutación patogénica del ADNmt no sigue las reglas de la herencia mendeliana, y depende, en gran medida, de las proporciones del ADNmt normal y mutado que existen en un tejido en particular. El efecto umbral representa la proporción mínima de ADNmt mutado necesaria para que se produzca la disfunción en un determinado órgano o tejido. Este porcentaje varía de unos tejidos a otros, y depende del requerimiento energético del mismo, en un momento dado y en una situación de estrés. Tejidos como el cerebro, corazón, músculo esquelético, y en particular la musculatura ocular, tienen grandes demandas de energía procedentes de la vía oxidativa y por tanto umbrales menores que otros, como la piel o la sangre. Así pues, la presencia

de una mutación en una determinada proporción en hígado puede ser clínicamente silente, mientras que la misma proporción en músculo o cerebro puede dar lugar a expresión fenotípica. Además, la vulnerabilidad metabólica puede variar en el mismo tejido con el tiempo y las demandas energéticas. Por ejemplo, la depleción parcial de ADNmt en músculo no produce expresión clínica los primeros meses de vida, pero causa una miopatía cuando la alteración del metabolismo oxidativo no puede hacer frente al incremento de la demanda energética (Moraes CT, 1993).

1.4.4. Segregación mitótica.

La división de las mitocondrias y la replicación del ADNmt son procesos independientes del ciclo celular. Además, cuando la célula se divide, las mitocondrias se distribuyen entre las células hijas al azar. Todo ello da lugar al fenómeno de segregación mitótica. Según este mecanismo, en un paciente con una mutación heteroplásmica, la proporción de moléculas de ADNmt mutadas puede variar de un tejido a otro, y en uno mismo a lo largo del tiempo. Esto puede significar que los síntomas observados en el mismo puedan variar con el paso del tiempo y que la edad de comienzo, para una misma alteración, sea diferente de unos pacientes a otros. El ejemplo más claro de este fenómeno es el síndrome de Pearson. Los niños con este síndrome presentan una severa anemia y pancitopenia, con elevados niveles de ADNmt delecionado en células sanguíneas. Si éstos sobreviven al cuadro de anemias repetitivas, desarrollan más tarde un síndrome de Kearns-Sayre, una encefalomiopatía muy grave que se caracteriza por tener niveles aumentados de ADNmt delecionado en músculo, pero niveles apenas indetectables en sangre (McShane, et al., 1991), posiblemente debido a un fenómeno de selección negativa contra las células que contienen altos niveles de ADNmt mutado, y a que en tejidos postmitóticos, como el músculo y el cerebro, el número de moléculas delecionadas tiende a aumentar con el paso del tiempo.

1.4.5. Herencia materna.

Durante la fertilización, prácticamente todo el ADNmt que contiene el cigoto es aportado por el óvulo. En general, una madre que lleve una mutación en su ADNmt puede transmitirla a su descendencia, pero únicamente sus hijas la transmitirán a la siguiente generación. Sin embargo la dosis de ADNmt mutado que porte cada uno de

sus óvulos puede variar ampliamente debido a un proceso de restricción y amplificación conocido como “cuello de botella” mitocondrial (Chinnery and Turnbull, 2000). Según este mecanismo, durante una etapa temprana de la embriogénesis, en la formación de la línea germinal de la mujer, el número de moléculas de ADNmt en cada oocito disminuiría drásticamente, siguiendo posteriormente una amplificación del ADNmt que daría lugar a las 100.000 copias que existen en el oocito maduro. Existirían diversas razones que justificarían la existencia de este “cuello de botella”; según Cree y colaboradores, la carencia de histonas que protegerían la estructura del ADNmt, su proximidad a la cadena respiratoria, fuente de radicales libres mutagénicos, así como los relativamente escasos mecanismos de reparación del ADN presentes en las mitocondrias, favorecería el alto porcentaje de mutaciones en el ADN mitocondrial. El “cuello de botella” permitiría una rápida segregación de nuevos genotipos, los cuales, o bien se perderían, o bien alcanzarían altos niveles, en el proceso de fecundación. De esta manera se facilitarían el proceso de eliminación de mutaciones deletéreas, importante no sólo a nivel de la línea germinal femenina, sino también masculina, ya que mutaciones a nivel del ADNmt podrían afectar a la motilidad espermática, y por ende, a la capacidad de fertilización. Mediante el “modelo biológico murino” postulado por Cree y colaboradores se explicaría cómo el reparto de las moléculas de ADNmt entre las distintas células antes y después de la implantación, seguido por el proceso de segregación del ADNmt replicado entre las células germinales primordiales, sería el responsable de las diferencias de porcentaje de ADNmt mutado entre óvulos y la descendencia. (Cree, et al., 2008).

Un estudio (Schwartz and Vissing, 2002), demostró que en determinadas circunstancias una mutación en el ADNmt puede ser heredada por vía paterna, alcanzando en un tejido, el músculo esquelético, el porcentaje suficiente para la manifestación de la patología. Sin embargo, en trabajos posteriores, como el también llevado a cabo por Schwartz y Vissing (Schwartz and Vissing, 2004), desarrollado en pacientes con miopatía mitocondrial, no pudo concluirse que el fenómeno de herencia paterna del ADNmt suceda a niveles significativos como para tenerlo en cuenta a nivel diagnóstico, o de consejo genético.

1.5. LA CADENA DE TRANSPORTE ELECTRÓNICO Y LA FOSFORILACIÓN OXIDATIVA.

El metabolismo mitocondrial tiene como función primordial la producción de energía a partir de la oxidación aeróbica de sustratos. El proceso oxidativo final está acoplado a una cadena de transporte electrónico, o cadena respiratoria (CR), encargada de transformar los potenciales de oxido-reducción generados en energía, en forma de ATP, mediante el acoplamiento a la fosforilación oxidativa (Figura 2).

La glucólisis y el ciclo del ácido cítrico generan una cantidad relativamente baja de energía en forma de ATP. Sin embargo, seis pasos de deshidrogenación (uno en la glucólisis, otro en la reacción de la piruvato deshidrogenasa y cuatro más en el ciclo de Krebs) reducen, en total, 10 moles de NAD^+ a NADH y dos moles de FAD a FADH_2 , por mol de glucosa. La reoxidación de estos equivalentes reductores genera la mayor parte de la energía necesaria para la síntesis de ATP. La reoxidación del NADH y FADH_2 tiene lugar, en las células eucariotas, en un proceso en el que se producen reacciones acopladas de oxidación-reducción, con el paso de electrones a través de transportadores electrónicos integrados en la membrana interna mitocondrial. El último paso es la reducción del O_2 a agua. La energía liberada en estos procesos se utiliza para bombear protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana, y el gradiente electroquímico generado es utilizado para la síntesis de ATP. La secuencia global de transporte electrónico es, por ello, exergónica. Un par de equivalentes reductores, generados a partir de 1 mol de NADH, basta para dar origen a la síntesis acoplada de unos 3 moles de ATP, a partir de ADP y P_i , mediante la fosforilación oxidativa.

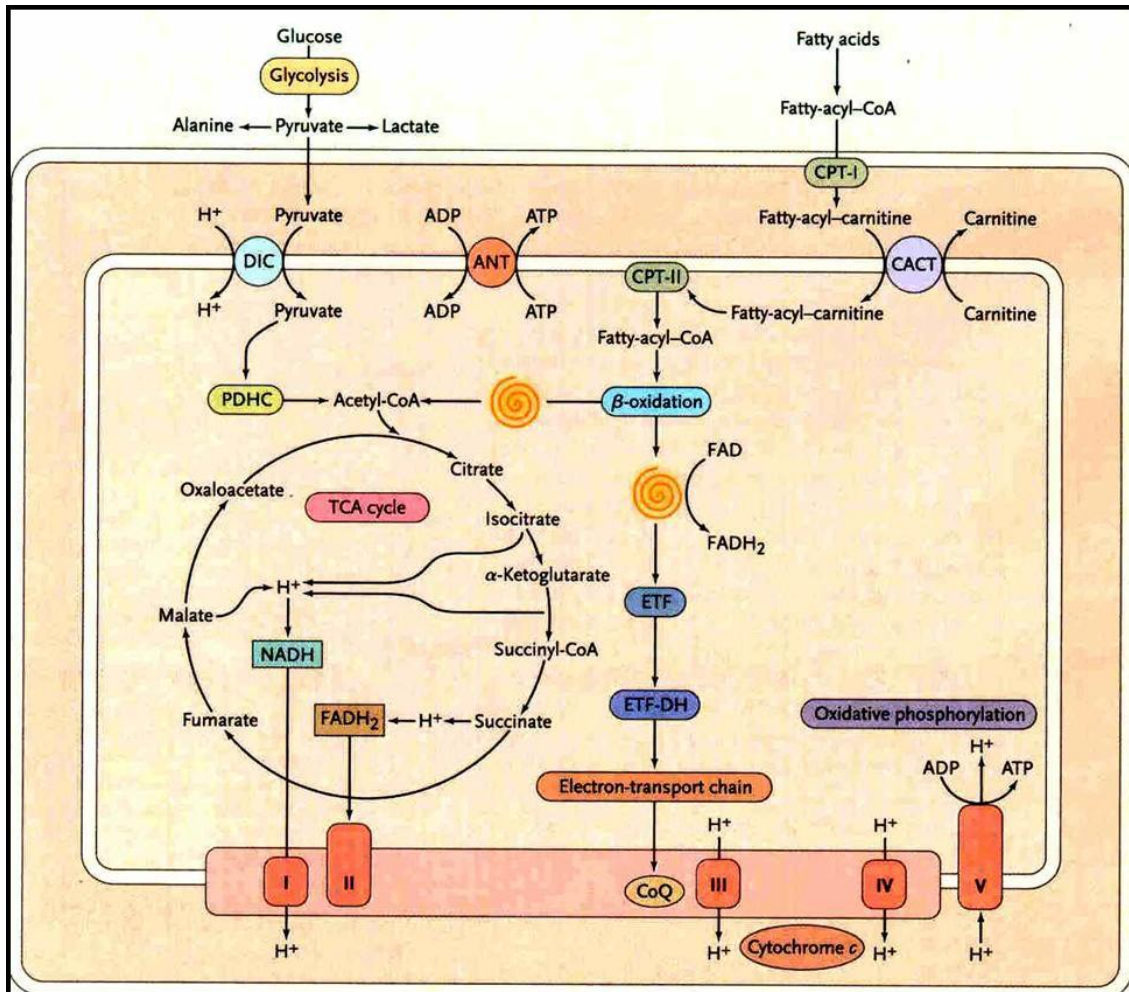


Figura 2. Rutas metabólicas en la mitocondria. Las espirales representan el conjunto de reacciones de la β-oxidación, que conllevan a la formación de acetil-coenzima A (CoA) y la reducción de flavoproteína. ADP: adenosín difosfato; ATP: adenosín trifosfato; ANT: transportador de nucleótidos de adenina; CACT: carnitín acil-carnitín translocasa; CoQ: coenzima Q; CPT: carnitín palmitoil transferasa; DIC: transportador de dicarboxilato; ETF: electron-transfer flavoproteína; ETF DH: electron-transfer deshidrogenasa; FAD: flavín adenín dinucleótido; FADH₂: flavín adenín dinucleótido reducido; NADH: nicotinamida adenín dinucleótido reducido; PDHC: complejo piruvato deshidrogenasa; TCA: ácido tricarbóxico; I: complejo I; II: complejo II; III: complejo III; IV: complejo IV; V: complejo V. (DiMauro and Schon, 2003).

La cadena respiratoria mitocondrial está constituida por cinco complejos enzimáticos y dos moléculas que actúan a modo de nexos de unión o lanzadera (coenzima Q y citocromo c), (Figura 3). Sólo los tres primeros complejos (I, II y III) actúan como transportadores de electrones. El complejo IV utiliza estos electrones para reducir el oxígeno molecular (O₂) a agua (H₂O). El complejo V es la ATP sintetasa. Además, para un perfecto funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial es necesario un funcionamiento adecuado de otras tres enzimas: dihidroorotato CoQ oxidorreductasa (DHO-CoQO), flavoproteína transportadora de electrones CoQ oxidorreductasa (ETF-

CoQO) y el translocador de nucleótidos de adenina (ANT), encargado de exportar al citosol el ATP sintetizado en la mitocondria, a la vez que introduce en la matriz ADP y P_i .

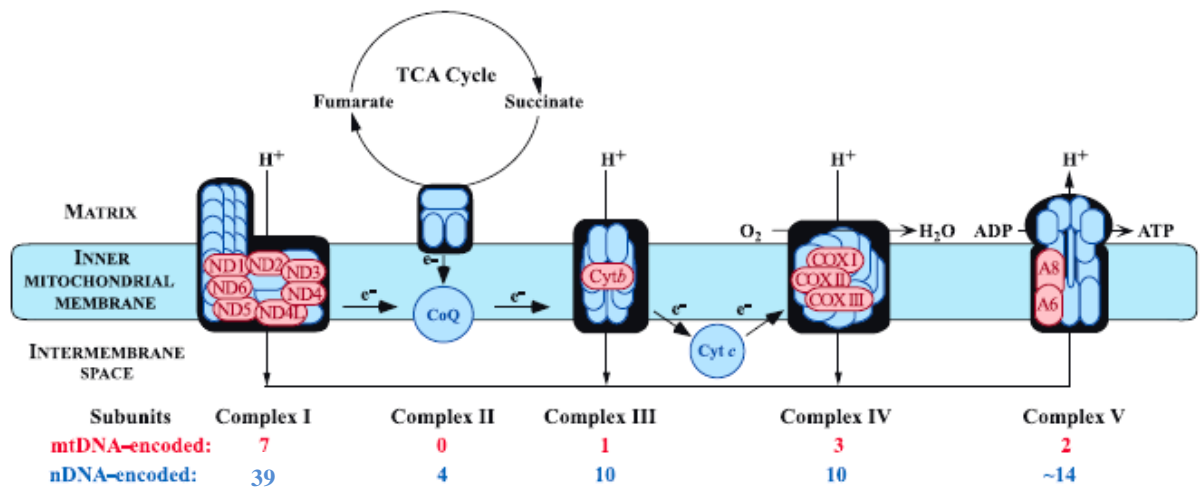


Figura 3. Esquema de la cadena respiratoria. Las subunidades codificadas por el ADN mitocondrial (mtDNA) aparecen en rojo y las codificadas por el ADN nuclear (nDNA) en azul. Al tiempo que los electrones fluyen a través de la cadena de transporte electrónico, los protones son bombeados desde la matriz al espacio intermembranal mediante los complejos I, III, y IV. De ahí, los protones pasan de nuevo a la matriz mitocondrial a través del complejo V, produciendo ATP. (DiMauro, 2004)

1.5.1. Complejo I: NADH- ubiquinona (CoQ) oxidoreductasa.

El complejo I (EC 1.6.5.3) constituye el primer paso en la cadena de transporte electrónico. Su función es aceptar dos electrones procedentes del NADH y transferirlos, a través de los transportadores electrónicos que lo constituyen, a la ubiquinona (coenzima Q_{10}). De forma acoplada se producirá la translocación de dos protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana.

En humanos este complejo se encuentra constituido por 46 subunidades, siendo su peso molecular de aproximadamente 980 kDa. Además, forman parte del mismo varios componentes no proteicos como el flavín mononucleótido (FMN), varios núcleos de hierro-azufre de naturaleza no hemínica y fosfolípidos (Walker, 1995).

Mediante el uso de agentes caotrópicos, el complejo I puede separarse en tres fracciones: dos hidrofílicas, la fracción flavoproteica y la fracción de proteínas hierro-azufre; y una fracción hidrofóbica.

La fracción flavoproteica está formada por las subunidades NDUFV1, NDUFV2 y NDUFV3, todas ellas codificadas por genes nucleares. Comprende, además, el FMN y seis átomos de hierro (Chen and Guillory, 1981).

La fracción de proteínas hierro-azufre está formada por 9 polipéptidos, NDUFS1-NDUFS8 Y NDUFA5, y contiene 9 ó 10 átomos de hierro implicados en la transferencia de electrones a la ubiquinona. La subunidad ND6, codificada por el ADNmt, parece formar parte también de este fragmento (Chomyn, et al., 1986).

El resto de las proteínas forman parte de la fracción hidrofóbica: NDUFA1-NDUFA4, NDUFA6-NDUFA10, NDUFAB1, NDUFB1-NDUFB10, NDUFC1 Y NDUFC2. Esta fracción contiene los centros hierro-azufre donadores de electrones a la ubiquinona. En ella parecen encontrarse también el resto de subunidades codificadas por el ADNmt (Ohnishi, 1998; Ragan, 1987).

1.5.2. Complejo II: succinato CoQ oxidoreductasa.

Está formado por cuatro polipéptidos, todos ellos codificados por el ADN nuclear. Cataliza la oxidación, en la matriz mitocondrial, de succinato a fumarato transfiriendo los electrones al “pool” de ubiquinona (Ackrell BAC, 1992).

El complejo II se puede dividir en dos fracciones: una soluble, formada por la SDH, y otra insoluble constituida por las proteínas que participan en el anclaje a la membrana. La SDH está formada por una subunidad flavoproteica, denominada SDHA, que contiene los sitios de unión del succinato y del flavin adenin dinucleótido (FAD), y una subunidad hierro-azufre, SDHB, que contiene 3 núcleos de dichas características químicas (Ackrell BAC, 1992). La fracción insoluble está formada por dos proteínas, llamadas SDHC y SDHD, que contienen un grupo hemo cada una, los citocromos cybL y cybS. Este complejo no transloca protones desde la matriz al espacio intermembrana.

1.5.3. Complejo III (complejo bc₁): ubiquinol (QH₂) citocromo c oxidorreductasa.

El complejo bc₁ es un dímero anclado a la membrana interna mitocondrial. El monómero contiene 11 subunidades (denominadas I-XI), con un peso molecular total de 240 kDa. De estas subunidades, sólo una, el citocromo b (subunidad III), se encuentra codificada por el ADNmt. Las tres subunidades que forman el centro funcional del complejo son: el citocromo c₁ (subunidad IV), que contiene un grupo hemo c₁; la proteína hierro-azufre de Rieske (subunidad V) y el citocromo b, que contiene dos grupos hemo, b₅₆₂ (bH) y b₅₆₆ (bL). El resto de las subunidades son pequeñas proteínas que rodean el núcleo metaloproteico.

El complejo III tiene como función primordial la transferencia de electrones del ubiquinol al citocromo c, acoplada al bombeo de protones a través de la membrana interna.

1.5.4. Complejo IV: citocromo c oxidasa (COX).

El complejo IV cataliza la transferencia de cuatro electrones desde el citocromo c al oxígeno molecular. La energía generada por la reacción permite el bombeo de dos protones desde la matriz al espacio intermembrana. El citocromo c cede los electrones al centro activo del complejo, el cual contiene un grupo hierro-hemo asociado a un átomo de cobre, y son utilizados para reducir el O₂ a dos moléculas de agua.

La citocromo oxidasa se encuentra anclada a la membrana interna en forma de dímero. El monómero está formado por trece subunidades con un peso molecular total de 204 kDa. Las subunidades I, II y III, codificadas por el ADNmt constituyen el centro funcional del complejo. El resto de subunidades (IV, Va, Vb, VIa, VIb, VIc, VIIa, VIIb, VIIc y VIII) se encuentran rodeando al núcleo central, modulando la actividad del complejo. El complejo contiene además dos átomos de hierro, tres átomos de cobre, un átomo de zinc y otro de magnesio.

1.5.5. Complejo V: F0-F1 ATP sintasa.

La ATP sintasa es una enzima funcionalmente reversible, capaz de sintetizar ATP, utilizando la energía electroquímica producida durante la translocación de protones en la cadena de transporte electrónico, y de hidrolizar ATP bombeando protones en contra de gradiente. En humanos se han identificado 16 subunidades.

La ATP sintasa se puede dividir en dos fracciones: F1 o fracción catalítica, soluble en agua, cuya función es sintetizar ATP a partir de ADP y Pi; y fracción F0, soluble mediante detergentes, cuya función es transportar protones desde el espacio intermembrana al interior de la matriz mitocondrial a fin de generar la energía necesaria para que se libere el ATP sintetizado en la fracción F1 (Loeffen, et al., 2000).

La fracción F1 o catalítica está constituida por cinco tipos diferentes de subunidades con una proporción estequiométrica: $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$. El resto de subunidades (a, b, c, d, e, f, g, F6, ATPasa 8, A6L, la proteína que confiere sensibilidad a la oligomicina u OSCP y el factor de acoplamiento CF6) constituyen la fracción F0.

Se ha observado en distintos organismos, desde bacterias a mamíferos, que los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria mitocondrial pueden agruparse en estructuras supramoleculares, con distintas estequiometrias, llamados *supercomplejos* (Schagger and Pfeiffer, 2000). Los supercomplejos formados por los complejos I, III y IV son también conocidos como *respirasomas*.

La formación de estos supercomplejos, parece esencial para la estabilización y/o ensamblaje de los distintos complejos OXPHOS (Acin-Perez, et al., 2004; Schagger, et al., 2004; Vonck and Schafer, 2009).

1.6. MITOCONDRIA Y ENFERMEDAD.

Debido al papel central que desempeña la mitocondria en la fisiología celular, con numerosas vías metabólicas compartimentalizadas en su interior, la patología mitocondrial comprende un grupo heterogéneo de enfermedades bajo el punto de vista clínico, bioquímico y genético, que pueden afectar a diferentes tejidos. Entre ellas, las que cursan con un defecto en la capacidad de síntesis de ATP celular, con una incidencia global considerable en la población, se han denominado históricamente “enfermedades mitocondriales”, aunque el término podría aplicarse a cualquier enfermedad causada por defectos en alguno de los numerosos procesos que suceden en la mitocondria. Precisamente debido a esto, el término de “enfermedad mitocondrial” podría redefinirse en un concepto más amplio como el de “medicina mitocondrial” (Zeviani and Carelli, 2007), englobando éste, un amplio grupo de entidades clínicas, caracterizadas por alteraciones en la mitocondria en su función de producción de energía, generadora de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS), e iniciadora de procesos apoptóticos. Todas estas funciones, interrelacionadas entre sí, jugarían un papel fundamental en la homeostasis tanto celular, como tisular. De esta manera, se podría explicar la gran complejidad de las patologías mitocondriales, así como la cada vez más reconocida relevancia de las alteraciones mitocondriales en procesos de neurodegeneración y de envejecimiento celular.

Las patologías mitocondriales pueden afectar a un único órgano, pero en general se presentan como enfermedades multisistémicas, afectando a tejidos con alta demanda energética, frecuentemente músculo y sistema nervioso. Por ello, las citopatías mitocondriales causadas por fallos en la capacidad oxidativa cursan con un fenotipo muy agresivo que ocasionan patologías muy graves, en general síndromes neurodegenerativos asociados a encefalomiopatías. Se han descrito también alteraciones de la función mitocondrial asociada a enfermedades neurodegenerativas de alta incidencia como Alzheimer, Huntington y Parkinson.

Dado que en la biogénesis de la cadena respiratoria participan los dos sistemas genéticos de la célula, las citopatías mitocondriales pueden estar ocasionadas por mutaciones en el ADNmt o por mutaciones en genes nucleares. A día de hoy, es quizá éste, el punto de partida más útil a la hora de establecer una clasificación con respecto a las enfermedades mitocondriales.

La primera mutación en el ADNmt responsable de un grupo de encefalomiopatías fue descrita en 1989 (Singh, et al., 1989) mientras que la primera alteración en un gen nuclear responsable de una enfermedad mitocondrial fue puesta de manifiesto unos años más tarde, en 1995 (Bourgeron, et al., 1995). Actualmente, la búsqueda e identificación de genes nucleares implicados en patología mitocondrial es un campo en continua expansión, habiéndose identificado recientemente varias mutaciones tanto en genes estructurales de la cadena respiratoria, como en genes que codifican factores reguladores de la biogénesis mitocondrial.

Como se ha apuntado anteriormente, las enfermedades mitocondriales pueden clasificarse en función de la localización del defecto genético, esto es, a) como enfermedades debidas a defectos en el ADNmt, que siguen una genética mitocondrial, y b) enfermedades debidas a defectos en el ANDn, que siguen una genética mendeliana (Andreu and DiMauro, 2003; Debray, et al., 2008; Filosto and Mancuso, 2007).

1.6.1. Defectos en el ADN mitocondrial:

a1. Reorganizaciones esporádicas.

Síndrome de Kearns-Sayre

Síndrome de Pearson

Diabetes y sordera

Oftalmoplejía Externa Progresiva (PEO)

a2. Mutaciones puntuales esporádicas.

Oftalmoplejía Externa Progresiva (PEO)

Encefalomiopatía mitocondrial con Acidosis Láctica y Accidentes Cerebro-Vasculares (MELAS)

Intolerancia al ejercicio

Miopatía aislada

a3. Reorganizaciones de herencia materna.

Oftalmoplejía Externa Progresiva (PEO)

Síndrome multisistémico

a4. Mutaciones puntuales de herencia materna.

a4.1. Mutaciones en genes codificantes de proteínas estructurales.

Neuropatía Óptica de Leber (LHON)

Neuropatía, Ataxia y Retinitis Pigmentosa (NARP)

Síndrome de Leigh (LS)

a4.2. *Mutaciones en genes codificantes de ARNt.*

Epilepsia Mioclónica con Fibras Rojo-Rasgadas (MERRF)

MELAS

PEO

Cardiomiopatía y Miopatía (MIMyCa)

Diabetes y sordera

Sordera neurosensorial

Cardiomiopatía hipertrófica

Tubulopatía

a4.3. *Mutaciones en genes codificantes de ARNr.*

Sordera no síndrómica inducida por aminoglucósidos

Cardiomiopatía hipertrófica

Dentro de este primer grupo, se han caracterizado un elevado número de mutaciones en el ADNmt, que incluyen más de 100 deleciones/reorganizaciones (en general esporádicas), y más de 50 mutaciones puntuales (de herencia materna) en genes que codifican ARNs de transferencia, ARNs ribosómicos o proteínas (Servidei, 1999; DiMauro, 2006).

Dichas alteraciones provocan una amplia variedad de síntomas que afectan fundamentalmente a cerebro y músculo. Entre ellos hay que incluir epilepsia, mioclonías, ataxia, hipotonías, atrofia óptica, sordera neurosensorial, trastornos piramidales y extrapiramidales, miopatías y cardiopatías entre otros, sabiéndose desde hace tiempo que estos síntomas son debidos a la presencia de altas proporciones de ADNmt mutado en áreas como corteza cerebral, cerebelo, nervio óptico, acústico, ganglios basales, mesencéfalo, músculo o corazón. Las diferentes mutaciones del ADNmt tienen por tanto una gran variabilidad fenotípica y su expresión cerebral y muscular puede producir una combinación de todos los síntomas y signos ya mencionados. Se pueden distinguir, no obstante, algunas enfermedades con entidad clínica definida, entre las cuales se pueden mencionar la Oftalmoplejía Externa Progresiva (PEO), consecuencia de deleciones únicas del ADNmt, el Síndrome de Kearns-Sayre (KSS), el Síndrome de Pearson, la Neuropatía Óptica Hereditaria de Leber (LHON), la Neuropatía, Ataxia y Retinitis Pigmentosa (NARP), asociada normalmente a mutaciones en el gen de la ATPasa6, el Síndrome de Leigh (LS), la

Epilepsia Mioclónica con Fibras Rojo-Rasgadas (MERRF) y la Encefalomiopatía mitocondrial con Acidosis Láctica y Accidentes Cerebro-Vasculares (MELAS), estas dos últimas consecuencia de mutaciones en los genes codificantes de ARN de transferencia, como el ARNt^{Ser(UCN)}, o el ARNt^{Leu(UUR)}, o la Sordera no síndrómica inducida por aminoglucósidos (mtNSSND), ligada a mutaciones en genes codificantes de ARN ribosomales, como la subunidad 12S, entre otras (Zeviani and Di Donato, 2004; DiMauro, 2006; Filosto and Mancuso, 2007).

1.6.2. Defectos en el ADN nuclear:

b1. *Defectos en genes codificantes de proteínas estructurales de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial.*

Síndrome de Leigh (LS)

Cardiomiopatía

Paraganglioma

Síndrome multisistémico

b2. *Defectos en genes codificantes de factores relacionados en el ensamblaje de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial.*

Síndrome de Leigh (LS)

Síndrome multisistémico

b3. *Defectos a nivel de comunicación intergenómica.*

Oftalmoplejía Externa Progresiva autosómica

Parkinsonismo

Encefalomiopatía neurogastrointestinal mitocondrial (MNGIE)

Síndrome multisistémico

Síndromes de depleción del ADNmt

b4. *Deficiencia de Coenzima Q₁₀.*

Encefalomiopatía

Encefalomiopatía con disfunción renal

Ataxia con atrofia cerebelar

b5. *Defectos en el entorno lipídico.*

Síndrome de Barth

b6. *Síndromes causados por defectos en procesos de modificación de ácidos ribonucleicos mitocondriales.*

Miopatía mitocondrial y anemia sideroblástica (MLASA)

b7. *Defectos en la traducción mitocondrial.*

Síndrome de la mutación MRPS16

b8. *Defectos en la fusión o fisión mitocondrial.*

Atrofia óptica autosómica dominante (ADOA)

Aunque la mayoría de las proteínas asociadas a la cadena respiratoria mitocondrial están codificadas por genes nucleares, el número conocido de enfermedades causadas por defectos en el ADN nuclear, es todavía hoy limitado (DiMauro, 2006; Filosto and Mancuso, 2007).

Atendiendo a la clasificación anteriormente mencionada, dentro de los casos de mutaciones que implican a subunidades de los complejos de la cadena respiratoria, cabe destacar aquellas que afectan a nivel estructural, dando lugar, entre otros, al Síndrome de Leigh (mutaciones en el gen *SDHA*, p.ej), o las que afectan a genes del ensamblaje como , como *SURF1* (a nivel de la subunidad COX del complejo IV), *SCO2* (en casos de cardioencefalomiopatía), *SCO1* (en encefalomiopatía y disfunción hepática neonatal)...

Se han identificados 9 genes nucleares implicados en la comunicación intergenómica, es decir, en el mantenimiento de la integridad y estabilidad del ADNmt y su replicación, cuyas alteraciones conducen a deleciones múltiples o depleción del mismo (Zeviani, et al., 2003), el gen codificante para la subunidad catalítica de la gamma-polimerasa *POLG1* (Van Goethem, et al., 2001), implicado en cuadros de oftalmoplejía externa progresiva autosómica dominante o recesiva (ad/ar PEO); el gen que codifica la subunidad accesoria de la gamma-polimerasa *POLG2* (ad PEO) (Longley, et al., 2006), una helicasa mitocondrial (Twinkle , C10orf2) (Spelbrink, et al., 2001) el gen del transportador de nucleótidos de adenina 1 *ANT-1*, actualmente renombrado como SLC25A4 (solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 4) (ad PEO) (Hudson, et al., 2006), el gen de la timidina fosforilasa *TYMP* (asociado al síndrome MNGIE) (Hirano and DiMauro, 2001; Hirano, et al., 2004); y los genes de la deoxiguanosina quinasa *dGK* (DGUOK) (Johansson and Karlsson, 1996), *SUCLA2* (succinate-CoA ligase, ADP-forming, beta subunit2) (Chinnery, 2007), *SUCLG1* (succinate-CoA ligase, alpha subunit) (Ostergaard, et al., 2007), *MPV17* (MpV17 mitochondrial inner membrane protein) (Spinazzola, et al.,

2006) y la timidina quinasa 2 *TK2* (Saada, et al., 2003) (todos ellos asociados a síndromes de depleción mitocondrial).

En el déficit de Coenzima Q10, se ha observado una mutación en el gen *COQ2* (para-hidroxibenzoato-poliprenil transferasa) en niños de padres con una deficiencia primaria severa de esta enzima (Quinzii, et al., 2006).

Otros genes a destacar, asociados a este grupo de alteraciones serían, el gen de la tafazina (*TAZ*), responsable de un déficit de cardiolipina, característico del Síndrome de Barth; el gen de la pseudouridina sintasa 1 (*PUS1*), cuyas mutaciones dan lugar al síndrome autosómico recesivo MLASA; el gen *MRPS16* (mitochondrial ribosomal protein S16), cuya mutación tiene implicaciones en traducción mitocondrial a nivel de la subunidad 16S del ARN ribosomal y el gen *OPA1*(optic atrophy 1 (autosomal dominant)), implicado en el control de la proliferación mitocondrial y su distribución citoplasmática, además de su implicación en fusión mitocondrial, y cuyas mutaciones son la causa de la atrofia óptica autosómica dominante (ADOA). Recientemente *OPA1* se ha asociado a deleciones múltiples de ADN mitocondrial, lo que la define claramente como patología mitocondrial (Amati-Bonneau, et al., 2008; Hudson, et al., 2008; Loiseau, et al., 2007).

1.7. COMPLEJO I: NADH-Ubiquinona oxidoreductasa.

La actividad del complejo I consiste en la deshidrogenación de la molécula de NADH y el transporte de electrones hasta el coenzima Q₁₀. Este sistema de transporte electrónico funciona de manera acoplada al sistema de translocación protónica a través de la membrana interna mitocondrial, creando así un gradiente de protones cuyo potencial energético es finalmente responsable de la producción de ATP por acción de la ATP sintetasa.

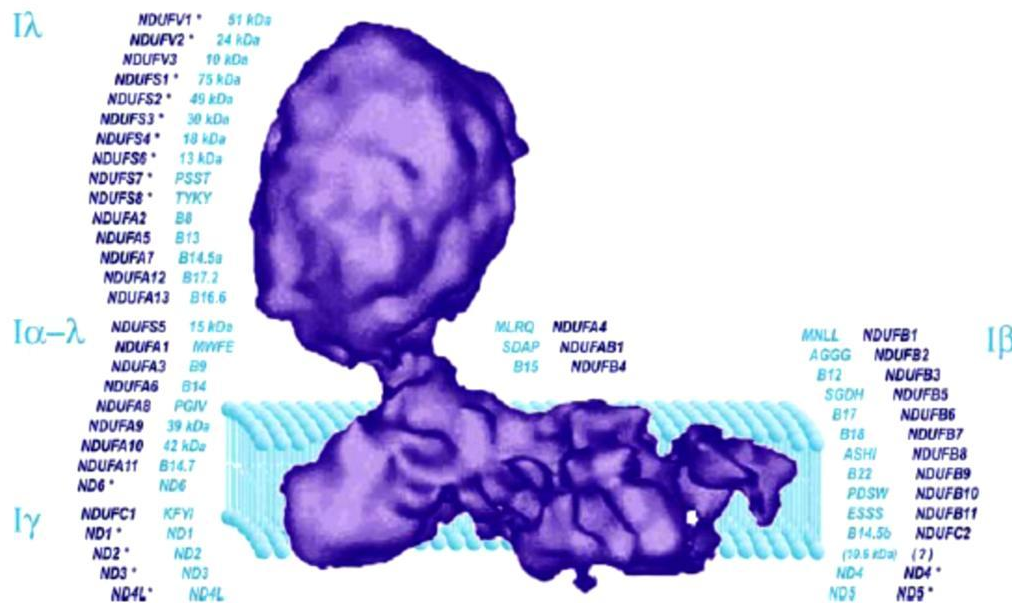


Figura 4. Representación esquemática de las subunidades del complejo I humano y su topología dentro del complejo. Las subunidades homólogas bovinas, aparecen en azul claro. Las subunidades marcadas con * son aquellas en las que se han descrito mutaciones patógenas causantes de deficiencia de Complejo I. (Janssen, et al., 2006)

El complejo I humano (EC 1.6.5.3), es el mayor de los cinco complejos que constituyen la cadena respiratoria mitocondrial, así como uno de los dos puntos de entrada, siendo el complejo II (EC 1.3.5.1) el otro, del sistema OXPHOS.

Suponiendo que existe una copia de cada subunidad, del total de las 46 descritas para esta holoenzima, su peso molecular es de, aproximadamente, 980kDa (Hirst, et al., 2003).

Está constituida por dos estructuras funcionales:

- un brazo periférico catalítico, que penetra en la matriz mitocondrial y
- un brazo de membrana responsable de la translocación protónica, el cual se embebe en la membrana interna mitocondrial. La estructura tridimensional del complejo I tanto en *E. coli*, *Neurospora crassa*, *Bos taurus*, como en humanos, presenta esta configuración en forma de L (Figura 4).

Mediante el uso de detergentes caotrópicos suaves el complejo I puede descomponerse en 4 subcomplejos: I α , I β , I λ y I γ (Carroll, et al., 2002; Carroll, et al., 2003; Sazanov, et al., 2000).

El subcomplejo I α estaría formado por el brazo periférico (hidrofílico) junto con parte del brazo de membrana (hidrofóbico). Bajo condiciones ligeramente diferentes, éste puede disociarse dando lugar al subcomplejo I λ , conteniendo 15 subunidades, incluyendo las 7 subunidades nucleares esenciales (NDUFV1, NDUFV2, NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS7 Y NDUFS8) junto con todos los cofactores redox (el FMN y los 8 centros hierro-azufre). El subcomplejo I β correspondería a la parte principal del brazo de membrana; está constituido por 12 subunidades, conteniendo la mayor parte de las helices transmembranales de todos los subcomplejos. Existen subunidades que no quedarían englobadas en ninguno de los subcomplejos I α , I β , y que conforman el subcomplejo I γ .

Para la correcta estabilización, así como la activación del complejo I, se ha comprobado la importancia de componentes constitutivos de naturaleza lipídica, mediante el desarrollo de un método de preparación de complejo I totalmente activo, obtenido a partir de extractos mitocondriales de tejido cardiaco bovino (Hirst, et al., 2003). De entre las sustancias de naturaleza fosfolipídica relevantes, cabría destacar la cardiolipina, necesaria para la integridad del complejo, así como, probablemente, su funcionalidad, o las interacciones con fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, esenciales para la actividad catalítica del mismo (Sharpley, et al., 2006).

El complejo I, en humanos, está formado por al menos 39 proteínas estructurales diferentes, codificadas por el genoma nuclear y 7 subunidades codificadas por el DNAmT (ND1-6 y ND4L); éstas últimas son todas de naturaleza hidrofóbica, y junto con unas, aproximadamente, 20 proteínas integrales de membrana, conforman el brazo de membrana de la enzima, contribuyendo a más de 60 segmentos transmembranales (Potluri, et al., 2004) (Tabla 1).

De las 39 subunidades codificadas nuclearmente, 18 presentan secuencias de “diana” mitocondrial (MTSs o mitochondrial targeting sequences); las 20 restantes (dado que una de ellas todavía no está claramente caracterizada) carecen de estas secuencias precursoras de importación, internalizándose de alguna manera, mediante un sistema de señalización interna de la proteína madura.

Dentro de estas subunidades, se conocen algunas que llevan ligadas mecanismos post-traduccionales de fosforilación. Este hecho es de especial relevancia si se tiene en cuenta que la fosforilación reversible de subunidades del complejo I está íntimamente implicada en la regulación de la actividad enzimática del complejo, y muy posiblemente

actúe afectando a nivel de la transferencia electrónica, así como a la producción de superóxido (Schilling, et al., 2005).

Dos de las subunidades fosforiladas identificadas, y que conforman los sitios de fosforilación AMPc dependientes, de la proteína (Kennelly and Krebs, 1991), son la subunidad de 18 kDa ESSS (NDUFB11), cuyo sitio de fosforilación se ubica en el residuo serina-20, y la subunidad MWFE (NDUFA1), con el sitio de fosforilación ubicado en el residuo serina-55 (Chen, et al., 2004). La tercera subunidad fosforilada identificada, es la subunidad de 42 kDa (NDUFA10), con sitio de fosforilación en serina-59, localizada en el brazo de membrana; a diferencia de las otras dos, ésta parece estar fosforilada cuando se aísla directamente de la mitocondria (Schulenberg, et al., 2003; Schilling, et al., 2005).

Por otro lado, varios componentes del complejo no son de naturaleza protéica como el flavín mononucleótido (FMN), varios núcleos de hierro-azufre de naturaleza no hémica y fosfolípidos (Walker, 1995). Los núcleos transportadores electrónicos de este complejo incluyen la molécula de FMN y seis centros hierro-azufre denominados N-1a, N-1b, N-2, N-3, N-4 y N-5 (Ohnishi, 1998).

En *Escherichia coli*, el complejo I está formado por 14 polipéptidos (subunidades Nuo) (Weidner, et al., 1993). Siete son homólogos a los genes de mamíferos localizados en el mtDNA y el resto tienen su homología en mamíferos, NDUFV1, NDUFV2, NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS7 Y NDUFS8 y por tanto parecen ser esenciales para el funcionamiento de este complejo (“core subunits”). Es esta la razón por la que se han convertido en genes diana para el estudio de pacientes con déficits aislados del complejo I.

HUMANO	HOMÓLOGO BOVINO	SUBCOMPLEJO ^a	HOMÓLOGO Neurospora crassa ^b	HOMÓLOGO E.coli	MASA MOLECULAR de proteína madura (kDa) ^d
ND1	ND1	I γ	ND1	Nuo H	35,7
ND2	ND2	I γ	ND2	Nuo N	39
ND3	ND3	I γ	ND3	Nuo A	13,2
ND4	ND4	I β	ND4	Nuo M	51,6
ND4L	ND4L	I γ	ND4L	Nuo K	10,7
ND5	ND5	I β	ND5	Nuo L	67
ND6	ND6	I α	ND6	Nuo J	18,7
NDUFV1	51kDa	I λ	51kDa	Nuo F	48,6
NDUFV2	24kDa	I λ	24kDa	Nuo E	23,7
NDUFV3	10kDa	I λ			8,4
NDUFS1	75kDa	I λ	78kDa	Nuo G	77
NDUFS2	49kDa	I λ	49kDa	Nuo CD	49,1
NDUFS3	30kDa	I λ	30,4kDa	Nuo CD	26,4
NDUFS4	18kDa(AQDQ)	I λ	21kDa		15,4
NDUFS5	15kDa	I α	Ortólogo previsto ^c		12,4
NDUFS6	13kDa	I λ	28,7kDa		10,7
NDUFS7	PSST	I λ	19,3kDa	Nuo B	19,8
NDUFS8	TYKY	I λ	21,3kDa	Nuo I	20,3
NDUFA1	MWFE	I α	9,8kDa		8
NDUFA2	B8	I λ	10,5kDa		10,8
NDUFA3	B9	I α	9,3kDa		9,3
NDUFA4	MLRQ	??			9,4
NDUFA5	B13	I λ	29,9kDa		13,3
NDUFA6	B14	I α	14,8kDa		15
NDUFA7	B14,5a	I λ			12,4
NDUFA8	PGIV	I α	20,8kDa		20
NDUFA9	39kDa	I α	40kDa		38,9
NDUFA10	42kDa	I α			37,1
NDUFA11	B14,7	I α	21,3kDa		14,9
NDUFA12 (DAB13)	B17,2	I λ	13,4kDa		17,1
NDUFA13 (GRIM-19)	B16,6	I λ	Ortólogo previsto ^c		16,6
NDUFB1	MNLL	I β			7
NDUFB2	AGGG	I β	Ortólogo previsto ^c		8,6

NDUFB3	B12	I β		11,3
NDUFB4	B15	I α Y I β	Ortólogo previsto ^c	15,1
NDUFB5	SGDH	I β		17
NDUFB6	B17	I β		15,4
NDUFB7	B18	I β	Ortólogo previsto ^c	16,3
NDUFB8	ASHI	I β	19kDa	18,8
NDUFB9	B22	I β	Ortólogo previsto ^c	21,7
NDUFB10	PDSW	I β	12,3kDa	20,7
NDUFB11 (NP17.3)	ESSS	I β	Ortólogo previsto ^c	17,3
NDUFAB1	SDAP	I α Y I β	9,6kDa	10,2
NDUFC1	KFYI	I γ		5,9
NDUFC2	B14,5b	I β		14,2
????	(10,6kDa)			????

Tabla 1. Composición de las subunidades del complejo I. Modificada de Janssen (Janssen, et al., 2006)

^aDistribución de las subunidades en los subcomplejos según (Carroll, et al., 2003)

^bSegún (Videira and Duarte, 2002)

^cOrtólogos previstos según (Gabaldon, et al., 2005)

^dMasas moleculares según Murray (Murray, et al., 2003), excepto para NDUFC1, ND4L, ND6, y el homólogo en humano de la, todavía sin caracterizar, proteína 10,6kDa.

El déficit aislado de complejo I es la causa más frecuente de las encefalomiopatías mitocondriales (Robinson, 1998; Smeitink, et al., 2001b). Supone más de un tercio de todos los casos conocidos de déficits de cadena respiratoria mitocondrial (von Kleist-Retzow, et al., 1998; Kirby, et al., 1999) estando asociado a una amplia variedad de síntomas clínicos, desde alteraciones neurológicas, tales como el síndrome de Leigh (Morris, et al., 1996), hasta cardiomiopatías, miopatías o fallo hepático.

En los últimos años se han descrito diversas mutaciones patogénicas en nueve de los genes nucleares estructurales del complejo I. Estos genes (*NDUFS1*, *NDUFS2*, *NDUFS3*, *NDUFS4*, *NDUFS6*, *NDUFS7*, *NDUFS8*, *NDUFV1*, y *NDUFV2*, *NDUFA2* (Benit, et al., 2001; Loeffen, et al., 2001; Benit, et al., 2004; van den Heuvel, et al., 1998; Kirby, et al., 2004; Triepels, et al., 1999b; Loeffen, et al., 1998b; Schuelke, et al., 1999; Benit, et al., 2003; Hoefs, et al., 2008), se encuentran altamente conservados evolutivamente hablando, poseyendo, además, un papel primordial en la actividad catalítica del complejo.

El debut de los síntomas en esta deficiencia puede ocurrir en los primeros momentos de la vida, en la infancia temprana, o en la etapa adulta.

En el primer caso suele manifestarse por una disfunción cerebral, en ocasiones acompañada de anomalías en otros tejidos de alto requerimiento energético, como el músculo esquelético y el corazón. El cuadro clínico más frecuente es el síndrome de Leigh (Morris, et al., 1996) . Los criterios diagnósticos para la definición este síndrome fueron definidos por Rahman et al., en 1996 (Rahman, et al., 1996):

- Daño neurológico progresivo con retraso del desarrollo motor e intelectual.
- Signos y síntomas de lesiones en tallo cerebral y/o en los ganglios basales.
- Aumento de la concentración de lactato en sangre y/o en líquido cefalorraquídeo (LCR).

La acidosis láctica es habitual si bien no es una característica definitoria. Suele ser más frecuente en LCR que en suero. Los aminoácidos plasmáticos pueden presentar una concentración de alanina elevada.

Hallazgos característicos en el examen neuropatológico, o bien, si este no se ha realizado, lesiones simétricas bilaterales en los ganglios de la base, a nivel de imagen neurorradiológica.

Además del síndrome de Leigh, se utiliza la terminología síndrome de Leigh-like en aquellos individuos con hallazgos clínicos sugestivos del síndrome de Leigh pero que no se ajustan de manera completa a los criterios del primero.

Únicamente un porcentaje minoritario de los casos de deficiencia enzimática del complejo I, se han asociado con mutaciones en los genes anteriormente mencionados, lo cual parecería sugerir que las causas moleculares de las enfermedades asociadas a este déficit, podrían encontrarse en otras subunidades o factores implicados en el ensamblaje, la regulación catalítica o el mantenimiento del complejo I.

En 2005, se describió el primer caso de una mutación en una chaperona (B17.2L) implicada en el ensamblaje del complejo I, en un paciente con encefalopatía progresiva (Ogilvie, et al., 2005), lo cual parecería apoyar la teoría previamente sugerida.

Este grupo de proteínas participan en el proceso de ensamblaje del complejo I pero no forman parte de la estructura final del enzima. Se han descrito mutaciones patogénicas, algunas muy recientemente, en seis genes humanos: *NDUFAF1* (*CIA30*) (Dunning, et al., 2007), *NDUFAF2* (*NDUFA12L*) (Ogilvie, et al., 2005), *NDUFAF4* (*C6ORF66*),

C8ORF38, *C20ORF7* (Sugiana, et al., 2008) y *NDUFAF3* (*C3ORF60*) (Saada, et al., 2009).

La primera mutación fue detectada en un paciente con encefalopatía progresiva y anomalías en el ensamblaje del complejo I en el gen *NDUFA12L*, un ortólogo de la subunidad estructural *NDUFA12*. *NDUFA12L* se asocia con un intermediario de subensamblaje de ~830kDa del complejo I, que se halla habitualmente presente en pacientes con mutaciones en *NDUFVI*, *NDUFS4*, y *NDUFS6*. Otras mutaciones se han identificado en pacientes con cardiomiocencefalopatía (*NDUFAF1*), encefalopatía infantil mitocondrial o cardiomiopatía antenatal (*C6ORF66*) (Saada, et al., 2008) y síndrome de Leigh (*C8ORF38*) (Pagliarini, et al., 2008).

Además, estudios realizados anteriormente en cohortes de pacientes con déficit aislado de complejo I, mostraron una mayor prevalencia en la población masculina, pudiendo indicar esto una posible relación causal con mutaciones en genes estructurales del complejo, codificados a nivel del cromosoma sexual X (Robinson, 1998; Kirby, et al., 1999; Loeffen, et al., 1998a; Wittig, et al., 2001).

Sin embargo, hasta ahora no se habían descrito mutaciones en ninguno de los dos genes conocidos del complejo I ligados al cromosoma X, *NDUFA1* y *NDUFB11*.

1.8. *NDUFA1* y *NDUFB11*.

1.8.1. *NDUFA1*.

En 1996 Zhuchenko y col. (Zhuchenko, et al., 1996) aislaron y localizaron el gen *NDUFA1*, dentro del brazo largo del cromosoma X, (Xq24). Este pequeño gen posee un tamaño de 7,5kb, presentando dos regiones intrónicas de 1,5 y 3 kb, y tres regiones exónicas (Figura 5). Codifica una pequeña proteína integral de membrana, englobada dentro del subcomplejo I α , llamada *NDUFA1* ó *MWFE*, nombrada así por sus cuatro primeros aminoácidos (metionina, triptófano, fenilalanina y ácido glutámico).

Se cree que la presencia de esta proteína es fundamental para la síntesis de las subunidades mitocondriales ND, y su incorporación dentro del complejo (Yadava, et al., 2002; Yadava, et al., 2004). Ésta se encuentra altamente conservada en diversas especies de mamíferos y vertebrados, habiéndose descrito ortólogos tanto en hongos como en plantas superiores (Gabaldon, et al., 2005).

La proteína MWFE se ha demostrado que juega un papel fundamental a nivel de la ruta de ensamblaje y función del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, tanto en hongos como en mamíferos (Au, et al., 1999; Yadava, et al., 2002; Yadava, et al., 2004; Marques, et al., 2003).

No.	Exon / Intron	Start	End	Length	Sequence
-	5' upstream sequence	-	-	-acgtcactccaagttgctccgcccgggagtcgaagca aaagacactgacggaagaggactgcgagagcccagcgcccgtctctcttctgacctagc
1	ENSE00001455228	118,889,762	118,890,004	243	AGATTCCTGTCCTTCCTCCGGAGCCGTAAGTGGCAACCCGCCGCTCCGGGGCCGCGCG GGCTTCCTTCGGGAAGAGAGCCGAAGCCAGGTCACCTTTCAGGACCCAGAACTAGGGTTCCT GGCTTAGGTAAACGGGGCAGAGATGTGGTTCGAGATTCCTCCCGGACTTCCTGTCATGGGC GTGTGCTTCGTGATTCAGGACTGGCTACTGCTACATCCACAGGTCACCTAACGGGGGC AAG
	<u>Intron 1-2</u>	118,890,005	118,891,294	1,290	gtaagccggcttcggccggggccgactccagggctgattccgaaaa.....tgggtcactcactttataaaactgcaacaataatgtctcttattgaag
2	ENSE00000854502	118,891,295	118,891,384	90	GAAAAAAGGGTTCCTCATTTGGGTATCACTGGAGTCTGATGGAAAGAGATAGGCGCATC TCTGGAGTTCGATCGTACTATGTGTCAAAG
	<u>Intron 2-3</u>	118,891,385	118,894,504	3,120	gtaagatgccactctgagccagccttttccaggggtgaggtgggttct.....ctttgatgggaacagactgtcacattctccttttaaaactgttttcag
3	ENSE00001455224	118,894,505	118,894,624	120	GGTTTGGGAGAACAATTGATTAAGGAAGCAATTTCCCTGATTCGATGAAAAAATAACTCAGTT ATGGCCATTCACCCCTGCTAGAAGGTTACAGTGTATATGAGCAATGCAATGTGTATGT
-	3' downstream sequence	-	-	-	agtgcttaataaaaaataaaatgaaaaaatgcatttcttttttaaatatgttacaaa aatcaagcaatctacccaatgtagtctttatcacttaaaa.....

Figura. 5. Secuencia del gen *NDUF4I*. Los exones aparecen en mayúsculas: en negro las regiones codificante y en morado las regiones UTR (UnTranslated Region). Los intrones y secuencias flanqueantes aparecen en minúsculas: en azul los intrones y en verde las secuencias flanqueantes 3' y 5'. (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG00000125356;r=X:118889762-118894624;t=ENST00000371437)

1.8.2. *NDUF4I*.

Posteriormente al descubrimiento del gen *NDUF4I*, como único gen conocido hasta entonces, ligado al cromosoma X, dentro del complejo I, hubo de añadirse una nueva subunidad, la ESSS, codificada por el gen *NDUF4I* e igual que la anterior, ligada al mismo cromosoma (Xp11.3) (Figura 6).

La proteína ESSS es una proteína integral de membrana, localizada en el subcomplejo β , según describieron Walker y colaboradores (Carroll, et al., 2003; Hirst, et al., 2003). Se ha demostrado la esencialidad de esta proteína tanto a nivel de ensamblaje como de actividad, para el complejo I, al no detectarse niveles del mismo, mediante técnicas de BN-PAGE, en ausencia de la proteína, así como al observarse ausencia de respiración rotenona-sensible, medida mediante técnicas polarográficas (Scheffler, et al., 2004).

No.	Exon / Intron	Start	End	Length	Sequence
-	5' upstream sequence	-	-	-attgcaccaacccctcgttcoggcacatctcccogaccc gaagtcogccctcgcgcctcctctaogtccccgccccggccccttaacctccgcccccaac
1	ENSE00001475208	46,888,816	46,889,847	1,032	GACCAGCGTCGACGGTCACCTTCFCGCGCCCGGGCTGTCGAGGAAGGGCTCCCGAGACATCA CTTCFCGCCCCGCGGCCACCTCCCTCCCACTFCFCGCGAGCTCAGCGGGAGCGGAGCGGCAAC AACCAAGTCGAGACTGGAGGCGAGATCGGGGGGAGGGGAGAAGGCGCAAGCGGCTFCGCC TCCAGGGAAACTFCACTTCGCCCTFCCTCCAGCGCGGCCACAGTCACCGAGCTCAAAAATGCG GACGACGAGAAGGGAGTCGGCGCTCCGACCCACATCCACTACTCAGGAGCGGCTFCFCG GCCGCCCCCGCGGATTCGTCACCGCCCGCTCAGGGGACAGCCCTTCGCCCTFCFCGATTCGCG AAGCGCTTCGGCCACTTCGCCACACCCCTTCGCGAAGCTTCGCCCTCAGTCGAGAAAAGGAGTAC CTATCAGCCAAATTCGGCAGGGCCCGCTTCFCGAGAGCTFCGATTCCTTCGAGGATGAAAG ACTCAGCGGAAGCTFCFCGCTFCFCFCGCCAGTCGGCGAGGGAACTTCGGCGGATTCGCTTCGG AATCTCFCACCCCAAAATGTCACCGATTCFCFCATGCGAGAAATGAGCAGACCCATCA ATAGAAAATTCFCAGCTTCGCGGAAAATGCTTCGGCCCAAGAGCCACGACACTTCGAG GCAAGAGGGTTCGCTCAACCGCCCGCTFCATTCGAAAACCAAAATCAGATTCGAGACTAT ATAGCGTCGGCGAGGCGGGGGGATGATTCGCGCTTCGCAACCACTTCGAGCTTCGCGACAG TTCGATTCFCFCFCGCCCGCCCTTCGAGACCTTCGAGCAACATTCGATTCGAGCGCTTCGGCTTCG TTCGCTTCGAGCGCTTCGCGCTTCFCFCGGCGGCAAGCGGACCGGAGGGCTTCGCGCGCGCC CGGCTTCGCTTCGGAATCTAGCTTCFCAGGACTTCGCTTCGCGCGCTTCGCGCTTCGCGGGGA AAGCGGCCCCGAGAACCACCCGTCAGGCAAGAGGACCCAGAACCCGAGGACGAAAAC TTCGATGAGAAG
	Intron 1-2	46,887,088	46,888,815	1,728	gtgagagcggggggggggggggtagtggggaaggaaacccgaagg.....aggctttgtggagcagcaggaagccctcattgaacctatcttctccacag
2	ENSE00001432338	46,886,957	46,887,087	131	AACCCAGACTCCCAATGGTATGACAAGGACCCCGTTCGAGCTTCGGAACATCGACTTC GTCTFCFCFCFCGCGCTCCATCACTCGCTTCGCGAGCACTTCGTCGCGCTATCTCG CTGACTACAG
	Intron 2-3	46,886,784	46,886,956	173	gtgcacaggtgtccaagagcgtgggatgggttaagagcagagggcagggga.....ggtatcagttgaggtccctcaogtctacccctgctatttgactaccag
3	ENSE00000978832	46,886,559	46,886,783	225	GATGAAAAGATGCTCCCGCCGGAAGCTTCGAGAGGCTTCGAAAATCCGAGAGGCGCAATGG CTTCGCCATCAGGAAATCCAACTGCTTCGACCCCGAGCAAGATCCAGCTTCGCGAGGATGA GTGACCACTFCGCTCAGTCGGGCTCAAGAAGCAACCGCTTCGCCCAACCCCTTCGCTTCGCAAT CTGACTTCFCFCGAGGCACTAAATCAAAGGGGCTGAAAATTCGA
-	3' downstream sequence	-	-	-	ctcgtagttgttatgtgtgttgaaggggatatgggatgggggtgtcaaaagctttaa agggctgctgcaaccttcctgggtgttctgggttatat.....

Figura. 6. Secuencia del gen *NDUFB11*. Los exones aparecen en mayúsculas: en negro las regiones codificantes y en morado las regiones UTR (UnTranslated Region). Los intrones y secuencias flanqueantes aparecen en minúsculas: en azul los intrones y en verde las secuencias flanqueantes 3' y 5'. (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG00000147123;r=X:4688655-9-46889847;t=ENST00000377811)

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.

2.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO.

El déficit de complejo I mitocondrial podría estar asociado a mutaciones en genes codificantes de subunidades no estructurales o “acesorias”.

La hipótesis de partida se fundamenta en el hecho de que un porcentaje minoritario de los casos de deficiencia enzimática del complejo I se han asociado con mutaciones en los genes estructurales o esenciales de este complejo. Este dato sugiere que las causas moleculares de las enfermedades asociadas a este déficit podrían encontrarse en otras subunidades o factores implicados en el ensamblaje, la regulación catalítica o el mantenimiento del complejo I.

Esta hipótesis se fundamenta en los siguientes hallazgos:

1. En el año 2005, se describió el primer caso de una mutación en una chaperona (B17.2L) implicada en el ensamblaje del complejo I, en un paciente con encefalopatía progresiva (Ogilvie, et al., 2005).
2. Estudios realizados anteriormente en cohortes de pacientes con déficit aislado de complejo I, mostraron una mayor prevalencia en la población masculina, lo que puede indicar una posible relación causal con mutaciones en genes estructurales del complejo codificados en el cromosoma sexual X (Robinson, 1998; Kirby, et al., 1999; Loeffen, et al., 1998a; Wittig, et al., 2001).
3. La relevancia funcional de ciertos genes “no estructurales” para la actividad, fosforilación, ensamblaje y estabilidad del complejo I (Au, et al., 1999; Yadava, et al., 2002; Yadava, et al., 2004; Marques, et al., 2003; Chen, et al., 2004; Yadava, et al., 2008).

2.2. OBJETIVOS.

El **objetivo global** de este trabajo ha sido investigar posibles mutaciones en los genes ligados al cromosoma X, *NDUFA1* y *NDUFB11*, asociadas a alteraciones primarias del proceso de la fosforilación oxidativa.

Para ello planteamos los siguientes **objetivos específicos**:

1. Determinación bioquímica, de la cadena respiratoria mitocondrial, para el cribado de pacientes con deficiencia de actividad enzimática del complejo I.
2. Análisis molecular del/de los genes portadores de la/las posibles mutaciones encontradas.
3. Estudio de los efectos sobre la funcionalidad, a nivel de la subunidad afectada, de las mutaciones identificadas.
4. Afectación de la integridad y expresión tanto del complejo I, como del resto de complejos respiratorios mitocondriales, como consecuencia de las mutaciones.
5. Análisis de los efectos de las mutaciones sobre el ensamblaje y/o estabilización del complejo I mitocondrial.

MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1. PACIENTES Y CONTROLES.

Para el desarrollo del estudio, se incluyeron veintiséis pacientes (12 niñas y 14 niños) con deficiencia aislada del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, cuyo diagnóstico se realizó mediante la medida de la actividad enzimática de los complejos de la CRM en tejido muscular esquelético. Se obtuvo el consentimiento escrito de todos ellos, siendo aprobado el trabajo por el Comité Ético Institucional del Hospital 12 de Octubre (Madrid), en consonancia con la Declaración de Helsinki para la Investigación en Humanos.

Dado que las mutaciones en el genoma mitocondrial pueden ser de naturaleza esporádica o producirse de novo, se descartaron, mediante el empleo de métodos establecidos, la presencia de las mutaciones más frecuentes y relevantes del ADN mitocondrial (ADNmt) relacionadas con encefalopatías progresivas variables y déficit del complejo I, tales como las mutaciones puntuales A3243G, T9176C, T3271C, A8344G, T8993G/C, reagrupamientos, como deleciones únicas y múltiples, y depleción del ADNmt.

Así mismo, se secuenciaron genes asociados al complejo I de la cadena respiratoria, tales como los 7 genes codificados a nivel mitocondrial, del complejo I (*ND1*, *ND2*, *ND3*, *ND4*, *ND4L*, *ND5* y *ND6*), 9 genes codificados por ADN nuclear (*NDUFV1*, *NDUFS1*, *NDUFS2*, *NDUFS3*, *NDUFS4*, *NDUFS7*, *NDUFS8*, y *NDUFAB1*), así como el factor de ensamblaje del complejo, *NDUFAF1* (también conocido como *CIA30*).

A excepción de un caso previamente descrito y publicado, en el que se identificó una mutación en el gen *NDUFS1* (Martin, et al., 2005), no se encontró ninguna otra mutación patogénica en la serie de pacientes estudiados.

Para los estudios genéticos-moleculares se estudiaron 200 sujetos controles sanos (400 alelos) con el mismo origen étnico, mediante PCR y análisis de restricción de los fragmentos de longitud polimórfica (PCR-RFLP) para descartar mutaciones en la

población sana. Para los estudios proteómicos se emplearon como controles, cultivos de fibroblastos procedentes de cuatro individuos sanos.

3.2. CASOS CLÍNICOS.

Paciente A

Varón concebido mediante fertilización “in vitro”, en el la cual el óvulo fue aportado por la madre, mientras que los gametos masculinos fueron aportados por un donante anónimo procedente de banco de esperma. El paciente presentó, tras un embarazo y parto normal, un peso de 3.210 g. A los 4 meses de edad se le identificaron los primeros signos de retraso en el desarrollo. A la edad de 7 meses comenzó a desarrollar un cuadro de hipotonía axial, nistagmo vertical, coreoatetosis generalizada y reflejos osteotendinosos disminuidos. En la imagen de la Resonancia Magnética Cerebral se evidenciaron lesiones a nivel del tálamo, pedúnculos cerebrales y tallo cerebral. La exploración cardiológica así como oftalmológica, no revelaron datos anormales. Los análisis bioquímicos de laboratorio mostraron aumento de ácido láctico sérico 32mg/dl (valores de referencia < 20mg/dl). Los resultados neurofisiológicos de la electromiografía y de las velocidades de conducción nerviosa resultaron normales. Se le realiza una biopsia muscular en la que no se muestran alteraciones histomorfológicas. Se obtuvo una biopsia de piel, en cuyos fibroblastos se determinó la actividad piruvato deshidrogenasa, obteniéndose valores dentro de la normalidad. A partir de los 13 meses se produjo un deterioro progresivo, desarrollando un patrón respiratorio anormal, conducente, durante el transcurso de una infección respiratoria, a una insuficiencia respiratoria, requiriendo de ventilación asistida. El paciente finalmente falleció de parada cardiorrespiratoria a los 14 meses de edad.

Su hermano mayor, fue producto de una gestación con un padre biológico distinto. El embarazo y el parto no tuvieron complicaciones. Su peso al nacer fue de 3200g. A los 9 meses de edad, empezó a mostrar signos de retraso psicomotor. A partir de los 12 meses mostró alteraciones extrapiramidales con afectación mayoritaria de las extremidades superiores. Fue ingresado a los 19 meses con un cuadro de coreoatetosis e hipotonía generalizada. Se le practicó una Resonancia Magnética Cerebral, observándose lesiones bilaterales a nivel de ganglios basales, putamen y caudado, así como lesiones en el tallo encefálico. Los parámetros bioquímicos séricos habituales mostraron valores normales, aunque no se determinaron niveles de lactato. El estado del paciente empeoró

gravemente tras una infección respiratoria, falleciendo a los 19 meses de edad como consecuencia de un fallo cardiorrespiratorio.

La historia familiar mostró la existencia de 3 hermanos en la rama materna que fallecieron como consecuencia de una enfermedad desconocida.

Paciente B

Varón nacido de padres no consanguíneos sanos. A los 6 meses presentó un retraso psicomotor evidente, que le incapacitó para andar sin apoyo hasta la edad de 4 años, cuando comenzó a caminar con ayuda, y un retraso importante en el desarrollo de las habilidades del lenguaje. A los 3 años de edad presentó un cuadro generalizado de hipotonía. A los 6 años se le practicó una biopsia muscular, la cuál no mostró alteraciones histoquímicas ni morfológicas reseñables. A los 9 años desarrolló un cuadro de epilepsia mioclónica, que fué tratado con levetiracetam; la exploración neurológica a esta edad reveló hipotonía global, presencia de reflejos osteotendinosos exaltados en las cuatro extremidades. Los valores de laboratorio, incluyendo los niveles séricos de lactato, piruvato y amonio, se encontraron dentro de los límites normales.

Los resultados obtenidos en el estudio de los potenciales auditivos de tronco sugirieron un defecto en la conducción del sistema auditivo, a nivel del puente y mesencéfalo. La Resonancia Magnética cerebral mostró signos de atrofia cerebelosa con alteraciones de señal en los núcleos dentados y sin alteraciones acompañantes de estructuras supratentoriales ni del tronco encefálico. El estudio poligráfico de siesta reveló una actividad de fondo con ritmos fisiológicos de vigilia, descargas epileptiformes de ondas en polipunta, con una distribución en las reacciones posteriores de ambos hemisferios o generalizada. El electroretinograma no mostró resultados anormales.

El paciente tiene actualmente 10 años y su evolución clínica permanece estable.

La historia familiar destaca por una hermana asintomática y un antecedente de aborto en la madre.

3.3. MÉTODOS.

3.3.1. Estudio de las Actividades Enzimáticas de los Complejos de la Cadena Respiratoria Mitocondrial.

Para la medida de las actividades enzimáticas de los distintos complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, en homogenado muscular y cultivo de fibroblastos de piel, se emplearon métodos previamente descritos (Martinez, et al., 2001; Smeitink, et al., 2001a; Martin, et al., 2005; van den Heuvel, et al., 1998).

Los valores obtenidos, se expresaron relativos a la actividad de la citrato sintasa, para el músculo, y de las actividades de la citocromo c oxidasa (COX) o de la citrato sintasa, en el caso de los fibroblastos.

Para músculo esquelético:

Se partió de 20-30 mg de tejido que fue homogeneizado en 15 volúmenes de tampón fosfato 20 mM pH= 7 en un homogenizador manual de vidrio. La fracción rica en mitocondrias se obtuvo centrifugando este homogenado a 800 x g, a 4 °C, durante 10 minutos y recogiendo el sobrenadante con pipeta Pasteur, situándolo inmediatamente en un recipiente con hielo para evitar la degradación enzimática.

La actividad de las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial fue estudiada mediante técnicas cinético-colorimétricas, según técnicas descritas con modificaciones (DiMauro, et al., 1987), en un espectrofotómetro DU-68 (Beckman Instrument) con el software incorporado para la medida de reacciones cinéticas.

El complejo I (NADH CoQ₁ oxidoreductasa sensible a rotenona) se determinó mediante el seguimiento de oxidación del NADH a 340 nm en tampón fosfato 20 mM pH=8, NADH 0.2 mM, NaN₃ 1 mM, BSA-EDTA 0.1% y CoQ₁ 200 µM. La reacción fue inhibida al 80% tras añadir rotenona 5µM.

El complejo II (succinato deshidrogenasa) se determinó monitorizando la oxidación del succinato (32 mM) a 600 nm, en un tampón fosfato 50 mM pH=7, KCN 1.5 mM y CoQ₁ 50 µM, en presencia de un aceptor artificial de electrones, el 2,6 diclorofenol-indofenol 0.1 mM.

El complejo III (Decilubiquinol citocromo c oxidorreductasa), sensible a antimicina, fue medido observando la producción de citocromo c reducido a 550 nm, en una mezcla de tampón fosfato 50 mM pH=7.5, NaN_3 2 mM, BSA-EDTA 0.1%, citocromo c 1 mM y 50 μM de decilubiquinol (DBH_2). La reacción fue inhibida en más de un 90% con 10 μL de antimicina A (1 mg/mL en etanol al 50%). El DBH_2 se obtuvo mediante reducción de decilubiquinona comercial (DB) en presencia de borohidruro sódico en medio ácido con posterior reconstitución en etanol del residuo seco del extracto en eter/hexano.

La actividad del complejo IV (citocromo c oxidasa) se determinó observando la disminución de la absorbancia a 550 nm producida por la oxidación del citocromo c reducido (80 μM) en una solución con tampón fosfato 10 mM pH=7.

Se determinaron las actividades de los complejos I+III (NADH-citocromo C-reductasa) y II+III (Succinato-citocromo C-reductasa) a 550 nm, utilizando como aceptor electrónico el citocromo C oxidado, y como sustratos donadores NADH 1 mM y succinato 30 mM, respectivamente.

La temperatura de incubación fue de 30 °C para todas las reacciones excepto para el complejo IV que fue de 38 °C y el volumen final en todas ellas fue de 1 mL, siendo realizado cada ensayo por duplicado.

Las actividades enzimáticas se calcularon en UI/L utilizando los siguientes coeficientes de absorptividad milimolar: 6,8 para complejo I; 19,2 para complejo II, y 21,0 para los complejos III, IV, I+III y II+III, empleando las siguientes fórmulas:

Actividad de complejo I (actividad sensible a rotenona):

$$\Delta (\text{Abs}/\text{min}) = \text{Abs}/\text{min con CoQ}_1 - \text{Abs}/\text{min con rotenona}$$

Actividad de complejo II:

$$\Delta \text{ de la reacción con el CoQ}_1$$

Actividad de complejo III (actividad sensible a antimicina):

$$\Delta = \text{Abs}/\text{min SIN antimicina} - \text{Abs}/\text{min CON antimicina}$$

Actividad de complejo IV (actividad COX):

$$\Delta = \text{Abs}/\text{min de la reacción con citocromo C reducido}$$

Actividad de complejo I+III:

$$\Delta (\text{Abs}/\text{min}) = \text{Abs}/\text{min con NADH}$$

Actividad de complejo II+III:

$$\Delta (\text{Abs}/\text{min}) = \text{Abs}/\text{min con succinato}$$

Los resultados de actividad enzimática fueron referenciados a la actividad de la citrato sintasa, enzima de matriz mitocondrial utilizado como marcador de contenido mitocondrial celular. Su actividad fue determinada midiendo el incremento de absorbancia a 412 nm por minuto que se produce por la reacción del DTNB (ácido 5-5´ditio bis 2-nitrobenzoico) 100 µM con coenzima A libre, formada por la condensación del acetil-CoA (350 µg/mL) con el oxalacetato 0.5 mM, en una solución con tampón Tris-HCl 75 mM pH=8 y tritón X-100 al 0.1 %.

Para el cálculo de la actividad se empleó la siguiente fórmula:

Actividad de Citrato sintasa:

$$\Delta (\text{Abs/min}) = \text{Abs/min con oxalacetato}$$

Para fibroblastos:

Para la medida de actividad del complejo I en fracción enriquecida en mitocondria, a partir de cultivo de fibroblastos, se siguió el protocolo previamente descrito por (Fischer, et al., 1985; Smeitink, et al., 2001a).

Tanto la actividad del complejo I, como la de la enzima citocromo c oxidasa (utilizada, en este caso, como referencia en lugar de la citrato sintasa, debido a que la actividad de esta última podría verse disminuída artificialmente como consecuencia del procedimiento de enriquecimiento mitocondrial, que conlleva la pérdida de la matriz mitondrial) se midieron a partir de fracción enriquecida en mitocondria proveniente de pellets celulares congelados.

Estos extractos celulares se prepararon acorde a los procedimientos ya descritos por (Attardi, et al., 1969), con ligeras modificaciones.

Primeramente, a partir de una concentración de aproximadamente $10\text{-}15 \times 10^6$ células, se procede a una homogeneización mecánica mediante un homogeneizador tipo vidrio/Teflón, todo ello en medio hipotónico (Tris-HCl 10 mM, pH=7.6) mediante ocho golpes a 1800 rpm, a 0°C.

A continuación, se isotoniza el medio que contiene este homogenado mediante la adición de sacarosa 1,5M y centrifugamos 10 minutos a 600xg y 0°C.

Posteriormente, recogemos el sobrenadante y volvemos a centrifugar 10 minutos a 14000xg y 0°C.

Los pellets así obtenidos, se resuspenden en una solución de Tris-HCl 10 mM (a pH 7,6) guardandose congelados en alicuotas de 70µl.

Una parte del homogenado se conserva para medir la actividad enzimática, con el objetivo de calcular el grado de recuperación de mitocondria, dentro de la fracción mitocondrial.

La medida y el cálculo de las actividades enzimáticas de los distintos complejos se realizó análogamente a lo descrito en el apartado anterior (“Para músculo esquelético”)

3.3.2. Extracción de ADN.

En función del tejido o matriz de partida, se emplearon métodos distintos para la extracción del ADN total. En el caso de músculo se empleó una metodología estándar, descrita a continuación; en los casos de sangre y fibroblastos se utilizó el sistema de extracción “Nucleon Extraction and Purification Kit” (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante, y cuyo fundamento es la precipitación de proteínas con perclorato sódico y su separación del ADN mediante cloroformo y una resina patentada.

El protocolo estándar para la extracción de ADN de músculo esquelético, fue el siguiente: partiendo de una cantidad variable de tejido congelado en nitrógeno líquido, entre 15-40 mg, se tritura en un mortero evitando la descongelación. Se deposita el pulverizado en un tubo de polipropileno estéril, de 2 ml, al que se le añaden 180 µl de tampón TSE (Tris-HCl 100 mM pH=7,4, ClNa 10 mM, EDTA 25 mM) y 20 µl de solución acuosa de proteinasa K (20 mg/ml). Se centrifuga brevemente a 14.000 rpm, se mezcla con la pipeta y se incuba 5 min. A 55 °C. Se añaden otros 180 µl de tampón TSE, 20 µl de proteinasa K y 40 µl de dodecil sulfato sódico (SDS). Se mezcla de nuevo y se incuba a 55 °C otros 60 min. Posteriormente se añaden otros 20 µl de proteinasa K y se incuba de nuevo durante 30 min. Se incorporan 50 µl de ClNa 5M, se mezcla, y se añade 1 ml de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), a pH superior a 8. Se agita y se centrifuga a 14.000 rpm brevemente para separar las fases. Se recoge el sobrenadante y se lava dos veces con 1 ml de éter dietílico. Una vez evaporado el éter, se añaden 1,5 ml de etanol al 98%, obteniendo el precipitado de ADN. Éste, se recoge con un asa estéril en un tubo y se lleva a evaporación del resto de etanol. Por último, se resuspende en 50-100 µl de tampón Tris-EDTA (TE) (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, ph=7.4). La muestra de ADN se puede conservar a -20 °C.

3.3.3. Cribado Mutacional.

El cribado y análisis de las alteraciones moleculares patogénicas más frecuentes a nivel del ADN mitocondrial (ADNmt) se realizó mediante las técnicas de Southern Blot o PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction Restriction Length Polymorphism).

3.3.3.a. Southern Blot.

Para el análisis de delección mediante Southern Blot se partió de 5-10 µg de ADN total de músculo esquelético. Estas alícuotas fueron digeridas con 20 U de la enzima Pvu II en un volumen final de reacción de 40 µl, durante una hora y media a 37 °C.

Los fragmentos fueron separados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% durante toda la noche, a bajo voltaje (35 V), en tampón Tris-acetato-EDTA (TAE) 1X. El ADN fue posteriormente transferido a una membrana Zeta-probe siguiendo las instrucciones del kit DIG DNA Labeling and Detection kit (Roche Diagnostics).

Como sondas se utilizaron dos fragmentos del ADNmt amplificados mediante PCR, utilizando los cebadores siguientes:

- a) 1562F (entre los nucleótidos 5'-1562-1581-3' de la secuencia consenso) y 3717R (5'-3717-3701-3');
- b) 13809F (5'-13809-13828-3') y 16547R (5'-16547-16527-3'),

Dichos fragmentos, una vez purificados mediante el PCR and gel Band Purification kit (Amersham-Pharmacia), fueron marcados con digoxigenina, siguiendo las especificaciones del kit de marcaje y detección. Una vez reveladas las membranas, la señal obtenida fue valorada densitométricamente utilizando un analizador de imágenes SunSoft (Pharmacia).

Para el análisis de depleción del ADNmt se marcó en las mismas condiciones un fragmento de 5.8 kb del gen humano que codifica la subunidad 18S del ARNr. En este caso la cuantificación se realizó siguiendo métodos descritos (Campos, et al., 1998).

El genoma completo del ADNmt se secuenció y analizó acorde a metodología previamente descrita y publicada (Taylor, et al., 2001). De igual manera, el análisis de los productos amplificados de las secuencias codificantes de los genes *NDUFS1*, *NDUFS2*, *NDUFS3*, *NDUFS4*, *NDUFS7*, *NDUFS8*, *NDUFV1*, *NDUFAB1*, y *NDUFAF1* (*CIA30*) se realizó acorde a métodos previamente descritos. (Benit, et al., 2001; Loeffen, et al., 2001; Benit, et al., 2004; van den Heuvel, et al., 1998; Kirby, et

al., 2004; Triepels, et al., 1999b; Loeffen, et al., 1998b; Schuelke, et al., 1999; Benit, et al., 2003; Triepels, et al., 1999a; Janssen, et al., 2002).

3.3.3.b. Etapa de amplificación.

Los cebadores utilizados en la amplificación y secuenciación de los exones de los genes en estudio se muestran en las tablas 2 a 9. Para realizar la PCR, se utilizaron alrededor de 100 a 200 ng de ADN que fueron amplificados en 30 a 35 ciclos (dependiendo de las características del fragmento) consistentes en una desnaturalización a 94 °C, una hibridación y una extensión a 72 °C; las temperaturas de hibridación y el uso de dimetilsulfóxido (porcentaje en el volumen final de reacción) como adyuvante de la reacción de PCR, quedan reflejadas en las tablas.

Se realizó una desnaturalización inicial a 94 °C durante 4 min. y una extensión final a 72 °C durante 10 min. Cada 100 µL de reacción contenía 2,5 U de Taq polimerasa (Cultek Inc.), 200 µM de cada dNTP, 0,5 µM de cada cebador y 1,5 mM de MgCl₂ en el tampón suministrado.

Tabla 2 a Tabla 9.- Secuencia de cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación de los genes de estudio. Nótese que algunos de estos cebadores han sido usados para amplificar simultáneamente dos exones contiguos de los genes correspondientes. Los nombres de los cebadores se corresponden con los exones amplificados más próximos al extremo 3'. Las secuencias se obtuvieron a partir de las depositadas en el GeneBank con el número de acceso correspondiente. X -F: cebador forward (directo); X-R: cebador reverse (reverso); Ta: temperatura de annealing (hibridación).

Nombre	Secuencia	Ta
FS1-2F	5'- TACCAAACAGTTGGTGATTGTT	58 10%DMSO
FS1-2R	5'- AGGTCTAATTACCACGAATGC	
FS1-3F	5'- TGTAGTTAGAGTCAATTCATCCA	57 5%DMSO
FS1-3R	5'- TGATAGCTCACTTTGAAGTGC	
FS1-4F	5'- AGCAGTGAAGTCAGGTTATTC	57
FS1-4R	5'- CTACCTTCTACAGCATGGTGT	
FS1-5F	5'- TATTGAGTTGCTTGTAATCAC	57
FS1-5R	5'- CTGAGCACACCAACTTCTT	
FS1-6F	5'- AGTGCCAGCAGTTAATGTCA	57
FS1-7R	5'- AGAAACAGCATCCCTCTTCT	

Nombre	Secuencia	Ta
FS1-8F	5'- TGCTGGACTTGACCATTGAT	56
FS1-8R	5'- CCCAGGAAGAAAATGAACCT	
FS1-9F	5'- GGTAACCAGGTAACAGAAAC	57
FS1-9R	5'- CAACTCAGATTCCAGTAGTC	
FS1-10F	5'- TTAGCAAGATTCCACAATGGT	58 10%DMSO
FS1-10R	5'- TCATGGCAAAGATGTTTCTTG	
FS1-11F	5'- ACATTCATTGTGGTCTTTGCT	56
FS1-11R	5'- AGCCTAGATCCTAGCTTCAT	
FS1-12F	5'- ATGGATTCTCTGTATGTCTTAA	56
FS1-12R	5'- TACCACTAACACTATTAGGAA	
FS1-13F	5'- GTAAATAGATGTATCACTTAGGA	56
FS1-13R	5'- TCAACAAGAGTAGATACACAT	
FS1-14F	5'- ATATGGTTTGGTGTTCAGCTTA	57 5%DMSO
FS1-14R	5'- AGGAACACATACATATACACAAC	
FS1-15F	5'- TGAGACTCTATCGCCGAGAA	56
FS1-15R	5'- TGGGGGAGGCAAAATTCTCA	
FS1-16F	5'- ACTATCTTCATGTACAGTAGA	56
FS1-16R	5'- TCAAATATGCCTTTAGTAGCA	
FS1-17F	5'- AGTGCTGCATTATTTACCCAT	58 10%DMSO
FS1-18R	5'- TGAGGTGATCTGATTACTTCT	
FS1-19F	5'- TCCTCCTGAATATGTGCACCA	56
FS1-19R	5'- TCACTGCACTACAGTTGTCCA	

Tabla 2.- Cebadores y condiciones de amplificación del gen *NDUFS1*.

Nombre	Secuencia	Ta
FS2 1F	5'- AGGCGCGCTGGAGTTACTT	60
FS2 1R	5'- GAGTAAAGCGTCCCCAACCT	
FS2 2F	5'- CACAGGAACCAAACACTGTTCA	57
FS2 2R	5'- TTTCGCACCACTGCACTCCA	
FS2 3F	5'- GAGAGGCTAACTCCTTGCTA	60
FS2 3R	5'- TTAAGGGCAGCAAACACTGGCA	
FS2 4F	5'- C TTCAGGCAGCCAGACTGT	60
FS2 5R	5'- ACCTTCTCTACTTCTGCACTT	
FS2 6F	5'- AGTACGCCATCATAGGACCT	60
FS2 6R	5'- CAGCGATACAGGTTTGGAGTT	
FS2 7F	5'- TGCTGAGAGGGCTCTCCTTA	56
FS2 8R	5'- GGAGGATGCCAACAAGTCTTCA	
FS2 9F	5'- GGGAGGCTAAGGAAGAAGGA	60
FS2 9R	5'- GAGTGAGGCAGGGGAAACTA	
FS2 10F	5'- TCCTAGCCCCATACCTGCT	60
FS2 10R	5'- A TACTCCTCCCCAGCCACT	
FS2 11F	5'- AGGCCTAGGAGACAGAGTT	58
FS2 12R	5'- ACCTCAACCAAGGTCAGGT	
FS2 13F	5'- TCTCCTCCCACCTTGCAAGT	58
FS2 14R	5'- ACACAGAGGCCAATTTCCAGT	

Tabla 3.- Cebadores y condiciones de amplificación del gen *NDUFS2*.

Nombre	Secuencia	Ta
FS3 1F	5'- GATCTGCTGCACACTTCCGTTT	60 10%DMSO
FS3 2R	5'- GGGCAAGGACAGGCATCTAA	
FS3 3F	5'- TACAAGCCTAAGAGACTGCATGCA	60
FS3 3R	5'- CATGCCCTGCGAACATGGTTCTTT	
FS3 4F	5'- TGACTCCAGCTGAAGTTAGCTGT	60
FS3 4R	5'- CTGCTGTGTTCTATTGTATGTTACAAAC	
FS3 5F	5'- ACAGGGCAGAACTCTCCCAAT	58 5%DMSO
FS3 6R	5'- CAGACCGTATTTCTTGCCATTC	
FS3 7F	5'- TAGGCTCCTGTGTAGCTATA	57 5%DMSO
FS3 7R	5'- ACAAGCACACACAAGGTGGT	

Tabla 4.- Cebadores y condiciones de amplificación del gen *NDUFS3*.

Nombre	Secuencia	Ta
FS4 1F	5'- TGCCTGGCTTGAGAACGAA	55
FS4 1R	5'- GGTCAACAGAGGACGCCTT	
FS4 2F	5'- GTCTGTCTCTCCTCTCATT	55
FS4 2R	5'- AACCTGGAACACCATACTG	
FS4 3F	5'- AGTGTGTATGTAGGCTGTTTGA	55
FS4 3R	5'- ACAGCGTCAAAAAGTACTGTCAT	
FS4 4F	5'- GATTTTGTCTCTCAGCTAAAGCT	55
FS4 4R	5'- ATGAAACCACTGGATTCCAAC	
FS4 5F	5'- AAAAGCTAGCCTCTGCTTGC	55
FS4 5R	5'- CTATAAATACTGCACAGCTGACTT	

Tabla 5.- Cebadores y condiciones de amplificación del gen *NDUFS4*

Nombre	Secuencia	Ta
FS7 1F	5'- AACCCGGAGCGCTAAGGAGA	58
FS7 1R	5'- ACGGCGACCGTTCATCGCAA	
FS7 2F	5'- AGTTGGGATCAGAGCTAGGC	60
FS7 2R	5'- GTTCGTCTGTCGCTGCTGAA	
FS7 3F	5'- ACAGCCACTGACCCGCGTT	60
FS7 4R	5'- TGCCTGTGAGTGTGCAGAGA	
FS7 5F	5'- TGCTCCACGTGGAGTCTCA	57 3%DMSO
FS7 6R	5'- CAGCACTCACGCTACGTCT	
FS7 7F	5'- TCTTCGGCACACTCCCCTCA	62
FS7 7R	5'- TGTCTCCAGCTCCCTCGTG	
FS7 8F	5'- CTGCGGGAAGCGAGACTGA	58
FS7 8R	5'- CACGGGACACAAGCAGGCT	

Tabla 6.- Cebadores y condiciones de amplificación del gen *NDUFS7*.

Nombre	Secuencia	Ta
FS8 2F	5'- TGCCAGTCTCAGAAGAGGAT	58
FS8 3R	5'- ACAAAGCCAGGACTGGAAC	
FS8 4F	5'- AGACAGTGTGTGAGGCCTCTT	58 5%DMSO
FS8 5R	5'- ACTTCCTGGGGACGCACATC	
FS8 6F	5'- CAGCGTGGCAGTGTCTGGT	60
FS8 7R	5'- GTGGGGTCCGAGTGGTTTTATT	

Tabla 7.- Cebadores y condiciones de amplificación del gen *NDUFS8*.

Nombre	Secuencia	Ta
AC 1F	5'- AGTTTAGTTGTGACACCAAGCA	57
AC 1R	5'- CAATCCCTGACCCTTGCCAA	
AC 2F	5'- ACCTATAGGCTTGTGCATTGAT	55
AC 2R	5'- AAAGTGGTAGCGTGGCTAT	
AC 3F	5'- GTGATTAAGTGGCATTGTACCA	55
AC 3R	5'- CAGTGTGTAGATAGAAGACTGA	
AC 4F	5'- GATATACTTGTAGCTGTTGTAGA	55
AC 4R	5'- ACAAATCTATGGGTGAACATCA	

Tabla 8.- Cebadores y condiciones de amplificación del gen *NDUFAB1* (Acyl Carrier protein motif).

Nombre	Secuencia	Ta
FV1 1F	5'- TCAGCCTCAGTGCTATGAA	56 5%DMSO
FV1 1R	5'- TCCAGAGGCCACTACAGAC	
FV1 2F	5'- AGACCCAAGATTCTGTAGCTT	60
FV1 3R	5'- ACCTCATTCATGCTAAGTTTCT	
FV1 4F	5'- CTGCATGTCTGTCCTTCAGACAT	63 10%DMSO
FV1 4R	5'- CACTTCAGGTCACACAACGCT	
FV1 5F	5'- AGTTATAGGCTGACTCCTGG	62 10%DMSO
FV1 5R	5'- TAGCCAGATCCCGGGTGTCA	
FV1 6F	5'- CCAGCAGGGATAAGAATGATAAG	62
FV1 6R	5'- CCAGGCTCTCTTTGTGGACA	
FV1 7F	5'- TGTCCACAAAGAGAGCCTGG	62
FV1 7R	5'- TGAGTGCTGGCAAGAGGGTT	
FV1 8F	5'- GCTGAGGCCAGGCTTCTGT	63 10%DMSO
FV1 10R	5'- TGTCCAGCATTCCACATGGAT	

Tabla 9.- Cebadores y condiciones de amplificación del gen *NDUFV1*.

Los productos de PCR obtenidos en la etapa de amplificación se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión (Nusieve Low Melting Agarose, FMC Products), y el fragmento de interés se purificó con el sistema “GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification” (Amersham-Pharmacia), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.3.4. Secuenciación de dos genes ligados al cromosoma X y PCR-RFLP de dos nuevas mutaciones en *NDUFA1*.

Se amplificaron las regiones codificantes completas (exones) de los genes *NDUFA1* (*MWFE*) y *NDUFB11* (*ESSS*), empleando para ello cebadores (“primers”) de diseño propio, suministrados por Tib Molbiol Syntheselabor GmbH (Eresburgstr. 22-23, D-12103, Berlin, Germany), según las secuencias consenso descritas en GenBank (números de acceso NM_004541 y NM_019056, respectivamente) (tabla 10)

Cebador	Secuencia
MFw1	5'- TCTTGTGCCCTAGCAGGATTCC- 3'
MRv1	5'- TAGGCAACCGGAAGCAAGTA- 3'
MFw2	5'- CCATTTCTCTGGAATGTCCCT- 3'
MRv2	5'- CATTACCAGAACCCACCTCAA- 3'
MFwmod.2	5'- TAAACTGCAACAATAATTGTCTCTTATTTGAAGGAAAAACG- 3'
MFw3	5'- GATGGGAACAGACTTGTCCACA- 3'
MRv3	5'- ATACAAGCCTCACAGTTGCCT- 3'
ES1 Fw	5'- ATGATTGTCGCGCTCGCACCCA- 3'
ES1 Rw	5'- ATCTGCCGATCCCGACTGA- 3'
ES2 Fw	5'- ACCAAGTTATGCAGGGCCAGAATAA- 3'
ES2 Rw	5'- TGGCAGAATCCCCTTCAACCTCCAT- 3'
ES3 Fw	5'- TGAGATGAGGGATTGGTATCAGTT- 3'
ES3 Rw	5'- AAGGTTGCAGCAGCCCTTTTAA- 3'
ES1UTR Fw	5'- AGCTCAAAATGGCGACGACGAGAA- 3'
ES1UTR Rw	5'- TGGGTGCGAGCGGACAATCAT- 3'

Tabla 10. Cebadores empleados para la amplificación de los genes *NDUFA1* y *NDUFB11*.

Las condiciones de amplificación para los fragmentos fueron las siguientes; para un volumen final de 50µl se emplearon 1µl de ADN molde, 0.3 unidades de Taq DNA polimerasa (Bioline, Randolph, MA), 5µl de buffer 10X, 1.5mM de MgCl₂, 50pmol de primer forward y reverse, y 1mM de dNTPs (desoxirribonucleósidos trifosfato). El programa de PCR consistió en una primera etapa de desnaturalización inicial de 4 minutos a 94°C, 30 ciclos de 45 segundos de desnaturalización a 94°C, 45 segundos de hibridación (“annealing”) a la T_m adecuada, y 45 segundos de elongación a 72°C, todo ello seguido de una etapa de elongación final de 10 minutos a 72°C.

Los productos amplificados se visualizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1-1.5%, purificándose posteriormente los fragmentos de interés mediante el kit comercial “GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (GE Healthcare), según las instrucciones del fabricante.

Para la reacción de secuenciación se utilizó una alícuota de los productos de PCR purificados, provenientes tanto de muestra de ADN de músculo, como de sangre y fibroblastos, usando el kit “ABIDyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit” en un secuenciador “ABI Prism System 310 Genetic Analyzer” (Applied Biosystems, Foster City, CA), acorde a las especificaciones del fabricante. Dicha reacción se realizó en ambas direcciones, directa (“forward”) y reversa (“reverse”) utilizando los mismos cebadores que en la etapa de amplificación, a concentraciones inferiores (de 3.2 pmol)

Para ello, en un volumen final de 5 µl se añadieron entre 75 y 100 ng del producto de PCR purificado, 5% de DMSO, 0,32 µM del cebador correspondiente y 2 µL de “PREMIX” (solución que contiene la ADN polimerasa Taq FS de PE-Applied Biosystems, tampón, dNTPs y didesoxinucleótidos marcados con fluorocromos). El termociclador se programó, en todos los casos, con una desnaturalización a 94 °C durante 3 min. seguida de 25 ciclos compuestos por una desnaturalización a 96 °C durante 30 segundos, una hibridación a 55°C durante 15 segundos y una extensión a 60 °C durante 4 min.

Tras la reacción de secuenciación se eliminaron los didesoxinucleótidos no incorporados por precipitación con etanol y MgCl₂, de forma que a los 5 µL de la

reacción se añadieron a 74 µL de precipitante (etanol 70%, MgCl₂ 0,5 mM), dejando la mezcla a temperatura ambiente durante 15 min. A continuación se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 min., a 4°C. Después de eliminar la solución alcohólica, se añadieron 250 µl de etanol al 75% preenfriado, centrifugándose durante 10 minutos a 10.000 rpm y 4 °C. Se evaporó el etanol en el termociclador a 45 °C y el residuo seco se almacenó a -20 °C hasta su análisis en el secuenciador automático.

El residuo fue reconstituido con 30 µl de TSR (“Template Supression Reagent” - PE-Applied Biosystems), y se dejó a temperatura ambiente 10 min. para hidratarlo. Se agitó en “vortex” y se transfirió la solución a un tubo de secuenciación, que se desnaturalizó en el termociclador durante 3 min. a 95°C, y se mantuvo en hielo hasta su procesamiento en el secuenciador automático.

El secuenciador ABI-PRISM 310 Genetic Analyzer (PE-Applied BioSystems) se programó siguiendo las instrucciones del fabricante. En síntesis su funcionamiento se basa en la separación de los fragmentos mediante una electroforesis capilar, excitación con luz láser de los fluorocromos y análisis de los datos con un programa informático que muestra los resultados en un “electroferograma” cuyos picos representan la posición de cada uno de los nucleótidos de la secuencia de ADN procesada.

Las secuencias así obtenidas se compararon con las depositadas en la base de GenBank, para ambos genes *NDUFA1* y *NDUFB11*.

Además, se secuenciaron los ADNmt completos de ambos pacientes, a partir de ADN obtenido de fibroblastos, identificándose cambios con respecto a la secuencia de referencia de “Cambridge” corregida (<http://www.mitomap.org/mitoseq.html>).

Las dos mutaciones encontradas, ambas en el gen *NDUFA1* (*MWFE*), la c.22G>C y la c.251G>C, se confirmaron mediante la técnica de PCR-RFLP, empleando los cebadores MFw1/MRv1 y MFwmod.2/MRv2 (tabla 10) respectivamente.

Para la mutación c.22G>C, se empleó la enzima de restricción *BcnI*, cuyo sitio de reconocimiento es 5´-CC‡G/CGG-3´; para el caso de la segunda mutación c.251G>C, la enzima de restricción empleada fue *MluI*, que reconoce y corta la secuencia 5´-A‡CGCGT-3´. En éste último caso hubo de crearse el sitio de restricción mediante el diseño del cebador forward mismatch, MFwmod.2. Ambas enzimas se obtuvieron de la casa Fermentas Life Sciences (Opelstrasse 9, D-68789 St. Leon-Rot, Germany).

Para la realización de la técnica de digestión (o PCR-RFLP) se procedió de manera análoga en ambos pacientes: para un volumen final de 30 μ l, se añadieron 5 μ l del producto de PCR previamente obtenido, 2 μ l de la enzima correspondiente en cada caso, 3 μ l del buffer propio de cada enzima, y 20 μ l de H₂O estéril.

La mezcla se incubó a 37°C durante un mínimo de 3 horas, pudiéndose prolongar “overnight” debido a la carencia de actividad inespecífica (actividad “star”) por parte de ambas enzimas.

Los productos de ambas digestiones se visualizaron mediante electroforesis, en gel de agarosa al 3%.

3.3.5. Cultivo de Fibroblastos y Aislamiento de Proteína Mitocondrial.

Los fibroblastos empleados en el estudio, se obtuvieron a partir de biopsias de piel de los pacientes y de controles. Éstos, se cultivaron utilizando medio M199 (Life Technologies, Bethesda, MD) suplementado con suero fetal bovino al 10%, 100UI/ml de penicilina y 100UI/ml de estreptomycin. Las células se crecieron y recogieron en condiciones exponenciales; los extractos proteicos mitocondriales se obtuvieron acorde a metodología previamente descrita (Nijtmans, et al., 2002).

3.3.5.a. Obtención de Extractos Mitocondriales con Digitonina para la realización de “Blue Native”.

Para la obtención de los extractos mitocondriales, se recogieron cultivos de fibroblastos de biopsias de piel de pacientes y controles en un 90% de confluencia, mediante tripsinización y posterior neutralización con suero. A continuación se centrifugaron a 1400 rpm durante 5 minutos y el pellet se lavó dos veces con PBS. El sedimento resultante se resuspendió en una solución 1:1 de 100 μ l de digitonina (4mg/ml) + 100 μ l de PBS.

Una vez homogeneizado, el pellet fue incubado en hielo durante 10 minutos mezclando en vortex la mezcla a intervalos de 2 minutos.

Transcurrido este tiempo, se volvió a añadir 1ml de PBS, y centrifugamos a 10.000 rpm durante 10 minutos y a 4°C.

Finalmente, el precipitado se lavó con PBS frío (4°C), y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones a las anteriormente descritas, conservando el pellet a -80°C hasta su utilización (apartado 3.3.6.b.).

3.3.5.b. Obtención de Extractos Mitocondriales para la realización de Western Blot.

Para la obtención de los extractos mitocondriales para la realización de Western Blot, se siguió el mismo protocolo que el utilizado para la obtención de extractos mitocondriales para “Blue Native”.

En esta ocasión el pellet resultante se almacenó a -80°C hasta su utilización (apartado 3.3.6.g.).

3.3.6. Estudio del ensamblaje y/o estabilidad de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial.

La evaluación del ensamblaje y/o estabilidad de los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM) se llevó a cabo mediante el empleo de las técnicas de Blue Native Gel Electrophoresis (2D-BN- SDS-PAGE) y el ensayo de Actividad En Gel o “In Gel Activity” (IGA), para el complejo I mitocondrial, siguiendo protocolos previamente descritos (Nijtmans, et al., 2002), utilizando para ello mitocondria aislada extraída de los fibroblastos cultivados.

3.3.6.a. Preparación del Gel de “Blue Native” de Primera Dimensión (1D).

La 1D se realizó utilizando un gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes. Para conseguir separar los distintos complejos de la cadena respiratoria de nuestras muestras celulares, el gel se preparó en gradiente de acrilamida del 5 al 15%, eligiéndose éste, por ser el más resolutivo para el peso molecular de nuestras proteínas en estudio. La preparación del gel y del gradiente se realizó a 4°C para ralentizar y optimizar el proceso de polimerización.

La composición de los geles utilizados en esta primera dimensión fue:

Composición	4%	5%	15%
Gradiente	STACKING	SEPARATION	SEPARATION
40% acril/Bis	0,5ml	1,25ml	3,75ml
Gel Buffer I	1,67ml	3,33ml	3,33ml
Glicerol	-	-	2g
Agua bidestilada	2,83ml	5,42ml	hasta 10ml
APS	55 μ l	60 μ l	35 μ l
TEMED	5 μ l	6 μ l	3,5 μ l

Gel buffer (3X): 150mM Bis-Tris, 1.5mM ácido aminocaproico, a pH 7.0 ajustado con HCl a 4°C.

3.3.6.b. Preparación de las muestras para “Blue Native”.

El pellet mitocondrial obtenido en el apartado 3.3.6.b se disolvió en 100 μ l de una mezcla equimolar de ácido aminocapróico 2M y “Gel buffer” (compuesto por ácido aminocapróico 1,5M y Bis-Tris 150mM, pH: 7.0). A continuación, se añadieron 20 μ l de laurilmaltósido al 10%, y la mezcla se agitó con vortex en hielo durante 10-15 minutos.

El homogeneizado se centrifugó a 13.000 rpm durante 30 minutos, a 4°C, y el sobrenadante así obtenido se transfirió a otro tubo al que se añadieron 10 μ l de “Blue Native sample buffer” (compuesto por ácido aminocapróico 750mM, Bis-Tris 50mM, EDTA 0,5mM, pH 7 y 0,02 % Serva Blue G), quedando las muestras preparadas para su carga en el gel de electroforesis. Se cargaron, aproximadamente, 50 μ g de proteína, por calle.

3.3.6.c. Electroforesis.

Una vez cargadas las proteínas, la electroforesis se inicia con 30 V durante 30 min. para facilitar la correcta penetración de las proteínas en el gel (“stacking”). Posteriormente se aumenta la potencia a 80 V para el resto del gel (“running”).

Los tampones utilizados en la electroforesis fueron:

- Ánodo buffer: 50mM Bis-Tris/HCl, pH 7.0, a 4°C.
- Cátodo buffer A: 50mM Tricina, 15mM Bis-Tris/ HCl, pH 7.0, a 4°C.
- Cátodo buffer B: Cátodo buffer A+ 0.02% de Serva Blue G.

Para eliminar el exceso de Serva Blue G y evitar su posible interferencia en etapas posteriores del ensayo, se cambia el Cátodo buffer B por el Cátodo buffer A, tras la

migración del frente a la mitad o dos tercios del gel. Se continúa la electroforesis a 80 V hasta observar el colorante en el extremo inferior del mismo.

Finalizada la electroforesis, el gel fue utilizado bien para la realización del ensayo de actividad en gel (“In Gel Activity”), para la realización de “Blue Native” de Segunda Dimensión (2D), o para su transferencia a una membrana de nitrocelulosa PROTAN (Schleicher & Schuell, Keene, NH) y posterior hibridación con anticuerpos monoclonales de las subunidades representativas de los diferentes complejos.

3.3.6.d. Ensayo de Actividad En Gel ó “In Gel Activity” (IGA).

En la realización del IGA para el complejo I mitocondrial, se siguieron, como se ha mencionado anteriormente, protocolos ya descritos (Nijtmans, et al., 2002).

Los geles de “Blue Native” de primera dimensión, se incubaron a temperatura ambiente, durante al menos 3h, con la siguiente solución:

Solución para IGA de Complejo I: Tris/HCl 2mM a pH7.4, NADH 0.1 mg/ml, y NTB (NitroTetrazolium Blue) 2.5 mg/ml.

3.3.6.e. Preparación del Gel de “Blue Native” de Segunda Dimensión (2D).

A partir de un gel de primera dimensión (BN) se seleccionó una calle para realizar la segunda dimensión. La calle se cortó y se rotó 90° para colocarla sobre uno de los cristales incubándose durante una hora con una solución de disociación (1% SDS y 1% β-mercaptoetanol) a temperatura ambiente. El exceso de solución se eliminó usando un papel de filtro para evitar que impidiera la correcta polimerización del gel, y los dos cristales se ensamblaron para preparar el gel de acrilamida con una fase de separación del 10% y una fase de stacking del 4%.

Composición	4%	10%
Gradiente	STACKING	SEPARATION
40% acril/Bis	1,5ml	10ml
Gel Buffer II	3,7ml	13,3ml
Glicerol		4,2ml
Agua bidestilada	9ml	12,5ml
APS	150 µl	250 µl
TEMED	15 µl	20µl

Gel Buffer II: 3.0M Tris/HCl; 0,3% SDS; pH 8,45

La electroforesis se realizó a 30V durante 30 minutos hasta que el frente avanzó hasta la fase de separación donde el voltaje pasó a ser de 80V. Posteriormente el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (transferencia) para continuar con la hibridación de la membrana con anticuerpos monoclonales.

3.3.6.f. Transferencia.

Una vez completada la electroforesis, se eliminó la fase de stacking del gel, y la fase de running se mantuvo en agitación durante 10 minutos en una solución (blot buffer) que contenía 25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol, 0.02 % SDS (pH 8.2).

Al mismo tiempo, la membrana de nitrocelulosa utilizada para la transferencia se agitó durante 10 minutos primero en metanol y posteriormente en la solución blot buffer.

Preparación del sándwich de transferencia:

Los papeles de filtro se sumergieron en blot buffer y se colocaron sobre uno de los soportes del pad de transferencia, sobre ellos se situó la membrana de nitrocelulosa, el gel, una segunda serie de papeles de filtro embebidos en blot buffer y el otro soporte del pad de transferencia, evitando la formación de burbujas que impedirían la correcta transferencia de las proteínas.

El sándwich se cerró y se colocó en la cubeta de transferencia de manera que la membrana de nitrocelulosa fuera la más próxima al polo positivo para que las proteínas pasaran del gel a la membrana.

La transferencia se realizó en 2 horas a 15 voltios para el “Blue Native” de segunda dimensión y a 20V toda la noche para el “Blue Native” de primera dimensión.

Posteriormente, las membranas se hibridaron con anticuerpos monoclonales específicos de las proteínas de interés.

3.3.6.g. Western Blot.

50 µg de proteínas mitocondriales se separaron en un gel de poliacrilamida al 8% y posteriormente fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa.

La membrana fue bloqueada durante toda la noche con una solución al 5% de leche desnatada en PBS-Tween20 al 0.05%, a 4°C. Posteriormente, la membrana se incubó con anticuerpos específicos contra diferentes subunidades de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, en una dilución 1:2000, durante 2 horas. Después de tres lavados de 7 minutos cada uno con PBS-Tween20 al 0.05%, la membrana se incubó durante 1 hora con el anticuerpo secundario apropiado en una dilución 1:5000. Tras tres lavados con PBS-Tween20 al 0.05%, la membrana se incubó a temperatura ambiente

con un Kit de quimioluminiscencia (Pierce, Rockford, Illinois) y se expuso a autoradiografía.

Los anticuerpos utilizados en los diferentes ensayos, fueron anticuerpos monoclonales contra las siguientes subunidades de los complejos enzimáticos mitocondriales: las subunidades de 39 (NDUFA9), 30 (NDUFS3) y 20kDa (ND6), todas ellas pertenecientes al complejo I; la subunidad de 70 kDa perteneciente al complejo II; la proteína core 2 del complejo III; y la subunidad COX 2 contenida dentro del complejo IV (Molecular Probes, Eugene, OR).

Para el reconocimiento y estudio de la subunidad NDUFA1 se empleó un anticuerpo policlonal, donado amablemente por el Dr. I.E. Scheffler, según lo descrito por Yadava y col. (Yadava, et al., 2002).

Como anticuerpos secundarios para todos ellos, se utilizaron IgGs anti-ratón o anti-conejo conjugados con peroxidasa.

Las señales se detectaron empleando el sistema “Enzyme Chemiluminescence Plus” (ECL plus), (GE Healthcare).

RESULTADOS

IV. RESULTADOS.

4.1. ANÁLISIS BIOQUÍMICO.

Los 26 pacientes estudiados en este trabajo, incluidos los 2 (pacientes A y B) con mutaciones en el gen *NDUFA1 (MWFE)*, presentaron una marcada deficiencia de actividad enzimática de complejo I a nivel de músculo esquelético.

En el caso del Paciente A, los niveles de actividad de complejo I medidos tanto en músculo, como en fibroblastos, fueron de un 20% y un 17% respectivamente, con respecto al valor de referencia más bajo, mientras que en el caso del Paciente B, la actividad del complejo I, medida igualmente en músculo y fibroblastos, fue de un 30% y un 70% respectivamente, con respecto al valor de referencia más bajo (Tabla 11 y Figura 7).

<i>Actividades enzimáticas de la Cadena Respiratoria</i>	<i>Fibroblastos^a</i>			<i>Músculo^b</i>		
	<i>Paciente A</i>	<i>Paciente B</i>	<i>Control</i>	<i>Paciente A</i>	<i>Paciente B</i>	<i>Control</i>
<i>Complejo I</i>	19	77	(110-260)	3.0	4.5	(15-30)
<i>Complejo II</i>	1339	1102	(536-1027)	8.5	8.0	(5.8-17.4)
<i>Complejo I+III</i>	nd	nd		4.6	7.4	(7-17.5)
<i>Complejo II+III</i>	nd	344	(160-440)	6.3	7.7	(3.4-15)
<i>Complejo III</i>	1835	1596	(1.270-2.620)	69.6	nd	(38-98)
<i>Complejo IV (COX)</i>	781	670	(470-860) ^b	26.8	18.5	(22-80)
<i>Citrato sintasa (CS)^c</i>	118	345	(144-257)	190	320	(78-250)

Tabla 11. Actividades enzimáticas de los distintos complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, medidas tanto en músculo como fibroblastos, de los pacientes A y B.

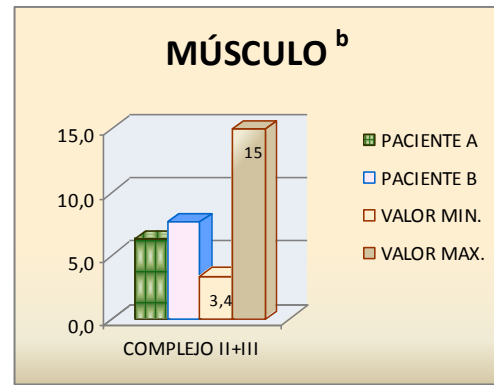
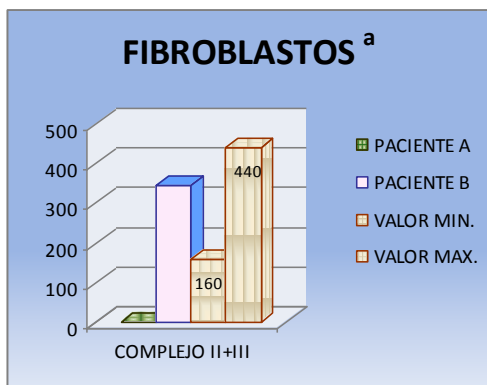
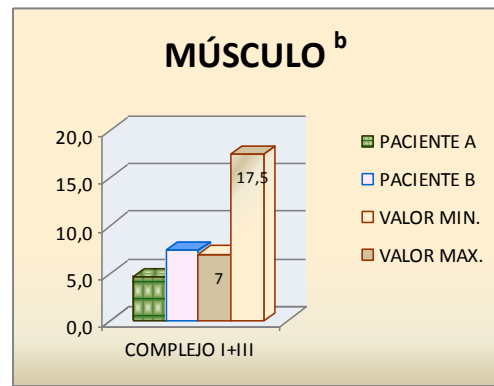
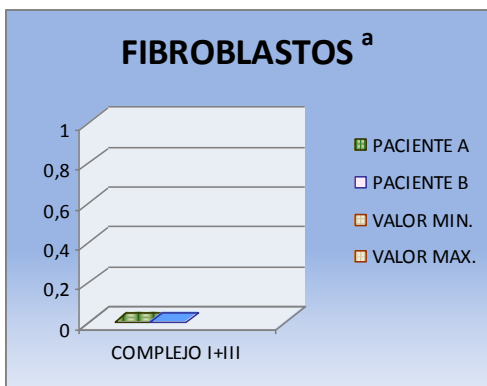
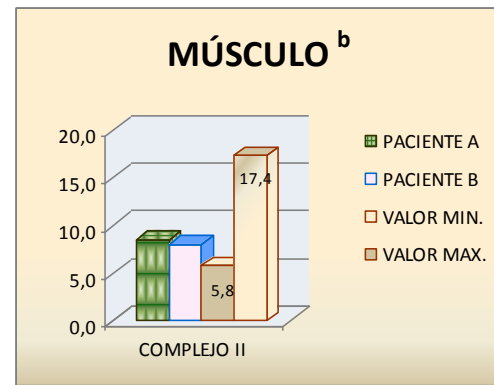
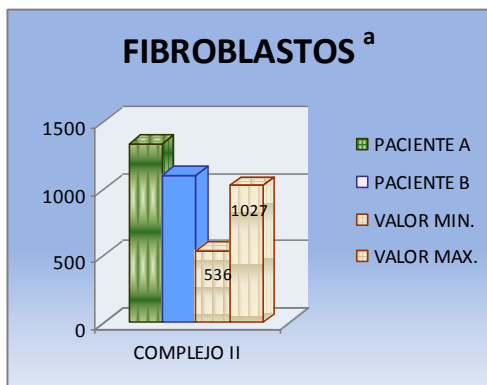
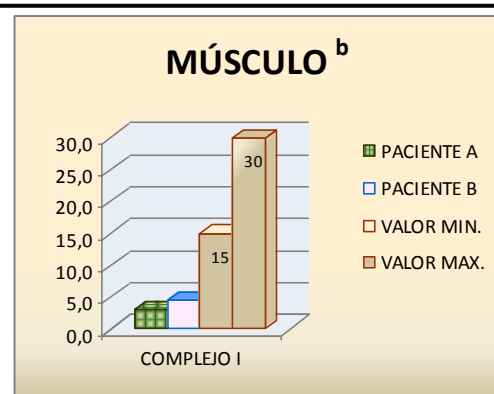
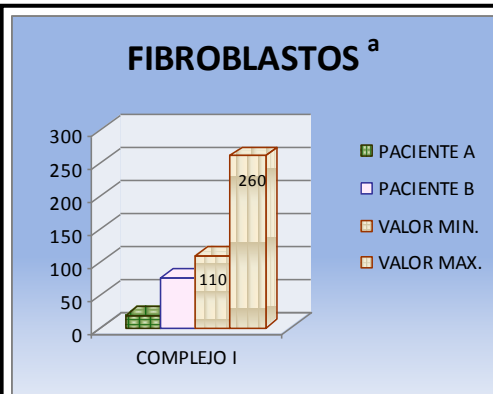
Los valores anormales aparecen resaltados en negrita.

^a Actividades enzimáticas expresadas en mU/mU de citocromo c oxidasa (COX).

^b Actividades enzimáticas expresadas en U/cU de citrato sintasa.

^c Actividad de citrato sintasa expresada como mU/mg de proteína.

nd= no determinado



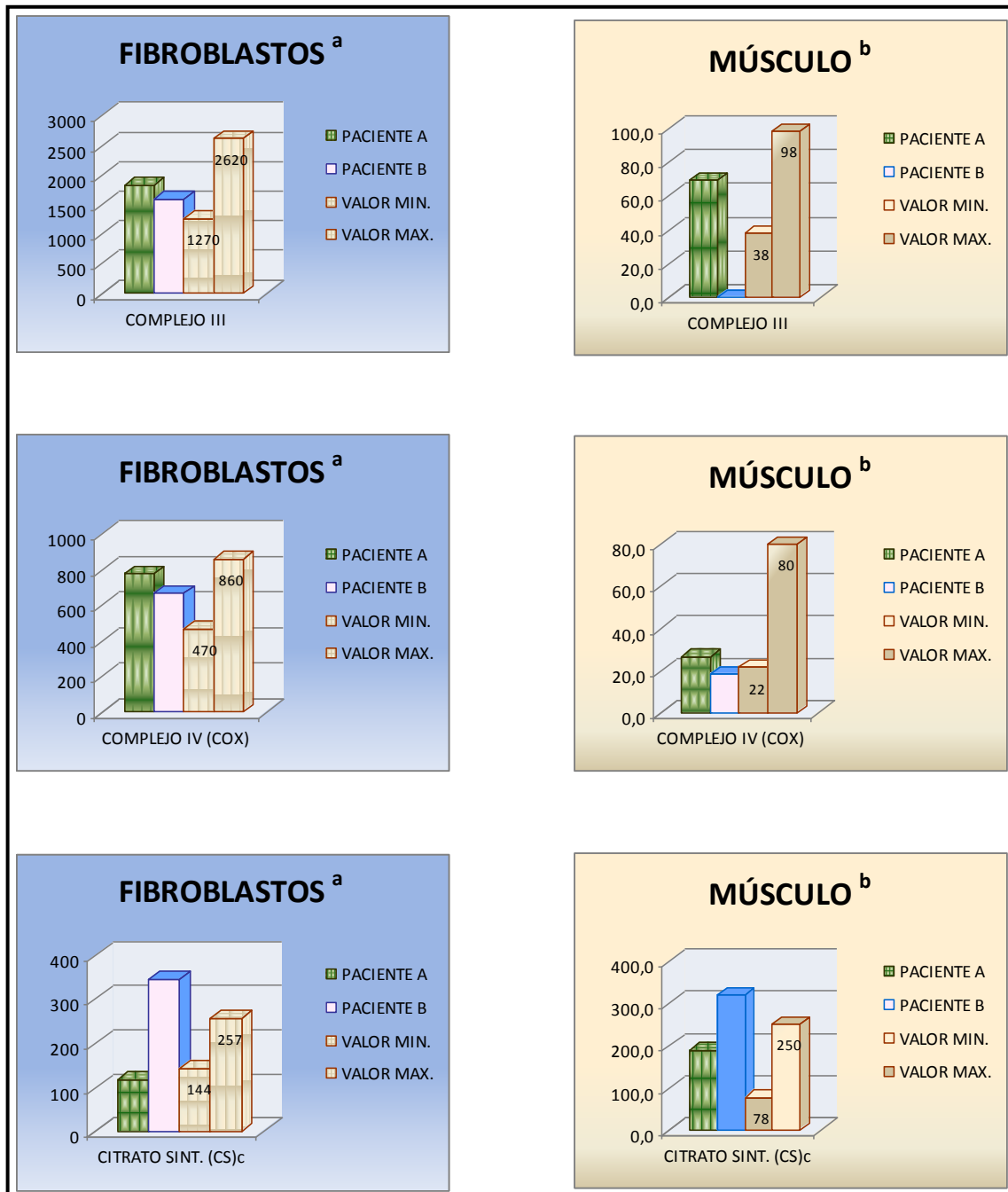


Figura 7. Representación gráfica de las actividades enzimáticas de los distintos complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, medidas tanto en músculo como fibroblastos, de los pacientes A y B. Los valores de intervalo de control aparecen representados por las columnas de Valor Mínimo- Valor Máximo.

4.2. ANÁLISIS DE LAS NUEVAS MUTACIONES ENCONTRADAS EN EL GEN *NDUFA1*.

Los estudios moleculares llevados a cabo, demostraron para el Paciente A, la presencia de una transversión de una G por una C en la posición 22 (c.22G>C) en el exón 1 del gen *NDUFA1* (Figura 1A), con la consiguiente sustitución aminoacídica de una glicina, altamente conservada, por una arginina, en la posición 8 de la proteína (p.Gly8Arg). El estudio realizado sobre la madre demostró que ésta era portadora heterocigota asintomática para la mutación p.Gly8Arg (Figuras 8B, C).

En el caso del Paciente B, la secuenciación del gen *NDUFA1* puso de manifiesto una sustitución nucleotídica de una G por una C en la posición 251 (c.251G>C) en el exón 2 del susodicho gen, con el consecuente cambio de aminoácido de una arginina, evolutivamente conservada, por una serina en la posición 37 (p.Arg37Ser) (Figura 9A). Estudios moleculares realizados sobre el material genético de distintos miembros de la familia del probando, a los que se pudo tener acceso, demostraron que la madre era, al igual que en el caso del Paciente A, portadora heterocigota para la mutación, encontrándose ésta ausente en el caso de la abuela y del tío materno.

La presencia de ambas mutaciones se confirmó en los pacientes mediante análisis de restricción (PCR-RFLP) (Figuras 8B y 9B).

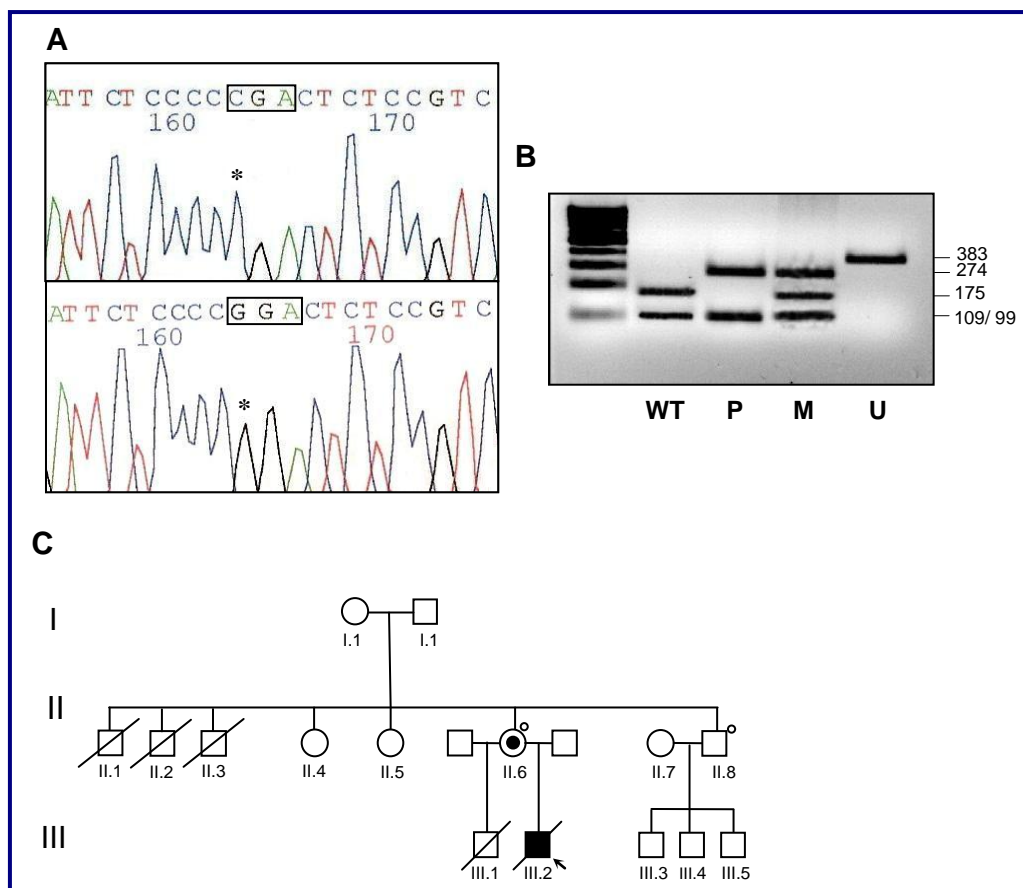


Figura 8. Análisis genético-molecular de la mutación p.Gly8Arg.

(A) Electroferograma correspondiente al análisis de secuenciación, del ADN extraído de músculo, del gen *NDUFA1*; se resalta el cambio de nucleótido para el triplete de bases, del paciente (secuencia superior) con respecto a la secuencia salvaje (“wildtype”). El asterisco indica la sustitución nucleotídica.

(B) Análisis mediante PCR-RFLP de *NDUFA1*. El fragmento de ADN sin cortar presenta un tamaño de 383pb, el cual tras digerirlo con *BcnI*, da lugar a 3 fragmentos de 175, 109 y 99pb. La secuencia mutante pierde un sitio de restricción, dando lugar a un patrón de 2 bandas de 274 y 109pb tras la digestión. El paciente resultó hemisigoto, mientras que la madre, heterocigota portadora para esta mutación.

Se utilizó un marcador estándar de 100pb de peso molecular como referencia, observable en el margen izquierdo del gel. M= madre del probando; P= probando; U= control sin cortar (“uncut”); WT= fenotipo salvaje (“wildtype”).

(C) Pedigrí de la Familia A: el paciente (C.III:2) es hemisigoto, mientras que su madre heterocigota para la mutación p.Gly8Arg. Los círculos pequeños representan los individuos sobre los que se ha podido hacer cribado genético.

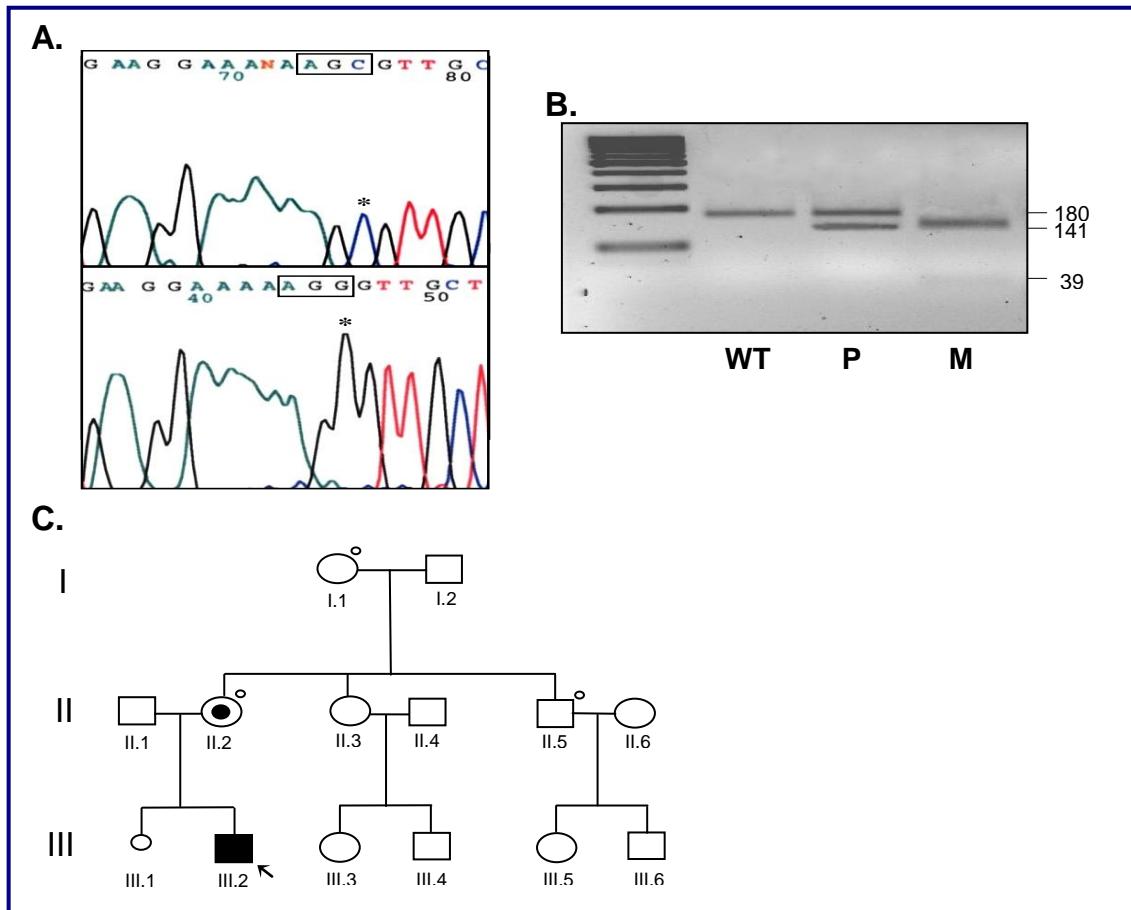


Figura 9. Análisis genético-molecular de la mutación p.Arg37Ser.

(A) Electroferogramas correspondientes al análisis de secuenciación, del ADN extraído de fibroblastos, del gen *NDUFA1*, mostrándose el cambio de nucleótido en el paciente (arriba) con respecto a un sujeto control (abajo). El asterisco indica la sustitución nucleotídica.

(B) Análisis mediante PCR-RFLP del gen *NDUFA1*. El fragmento de ADN sin cortar (“wildtype”) presenta un tamaño de 180pb. La presencia de la mutación en la región amplificada y posteriormente digerida con la enzima *MluI*, induce un sitio de restricción, cuyo resultado es la aparición de 2 fragmentos de 141 y 39pb. Se utilizó un marcador estándar de 100pb de peso molecular como referencia, observable en el margen izquierdo del gel. M= madre del probando; P= probando; WT= control “wildtype”.

(C) Pedigrí de la Familia B: el paciente (C.III:2) es hemisigoto, mientras que la madre resulta heterocigota para la mutación p.Arg37Ser. Los círculos pequeños representan los individuos sobre los que se ha podido hacer cribado genético.

La secuenciación del ADNmt completo de ambos pacientes llevó a la identificación de algunas variaciones respecto a la secuencia de referencia de Cambrigde modificada (GenBank: NC 012920), todas ellas de naturaleza homoplásmica, teniendo en cuenta que técnicamente no fue posible descartar la presencia de cambios en la secuencia con niveles de heteroplasmia inferiores al 30%.

Para el Paciente A:

MT-RNR1:	m.750A>G m.961T>C m.1438A>G
MT-ND2:	m.4769A>G (Met100Met)
MT-CO1:	m.6284>G (Thr127Thr)
MT-ATP6:	m.8860A>G (Thr112Ala)
MT-ND4:	m.12127G>A (Gly456Gly)
MT-CYB:	m.15326A>G (Thr194Ala)
MT-DLOOP:	m.456C>T m.513del(CA) m.302insC m.310insC

Para el paciente B

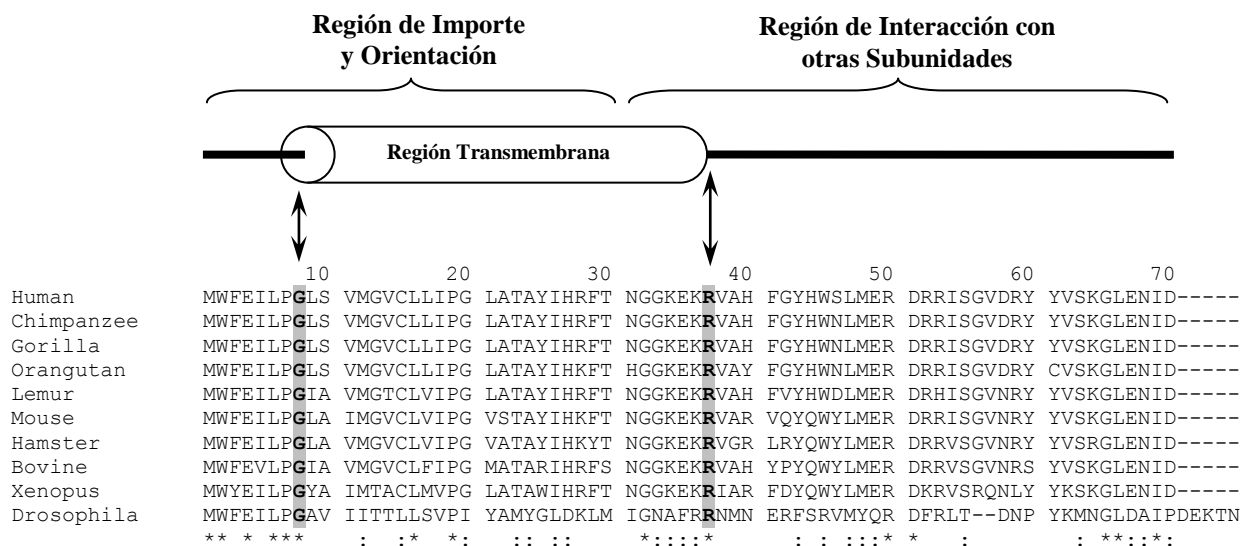
MT-RNR2:	m.1888G>A
MT-DLOOP:	m.93A>G m.302insC m.310insC

4.3. LAS MUTACIONES p.Gly8Arg Y p.Arg37Ser ALTERAN DISTINTOS DOMINIOS FUNCIONALES DE LA SUBUNIDAD NDUFA1.

La proteína MWFE, que se halla muy conservada en la escala filogenética, está formada por 70 aminoácidos (10kDa) y dos dominios funcionales bien diferenciados (Figura 10). Los primeros 25 aminoácidos que conforman la región hidrofóbica N-terminal, constituyendo un único dominio transmembrana, que se continua con un dominio hidrófilico de 45 aminoácidos, que probablemente se disponga hacia el espacio intermembrana. Este dominio contiene 12 residuos cargados positivamente y 5 negativos relacionados con la interacción con otras subunidades del complejo I (Yadava and Scheffler, 2004). Además, en este dominio encontramos un residuo de serina, en la posición 55, susceptible de ser fosforilado, cuya relevancia funcional comienza a ser dilucidada (Chen, et al., 2004; Yadava, et al., 2008).

La proteína se sintetiza en el citosol, y posteriormente es importada a la mitocondria sin procesamiento proteolítico adicional. La secuencia proteica mínima necesaria, observada en MWFE, engloba los 28 primeros aminoácidos pertenecientes a la región N-terminal. Es muy probable que esta región N-terminal sea la que se inserta dentro de la membrana interna, quedando inmediatamente bloqueada su transferencia/internalización, de manera que entre 4 a 8 aminoácidos quedarían expuestos sobre la cara de la matriz mitocondrial, y el dominio hidrófilico se orientaría hacia el espacio intermembrana (Yadava and Scheffler, 2004).

Ambas mutaciones van a afectar a residuos aminoacídicos muy conservados en la evolución, en especies que van desde los humanos hasta los invertebrados (tales como *Drosophila melanogaster*) (Figura 10). En el caso de la primera mutación descrita, p.Gly8Arg, localizada en el dominio hidrofóbico N-terminal, parece afectar a la región responsable de la orientación e importe de MWFE en la membrana interna mitocondrial; por otro lado, la segunda mutación, p.Arg37Ser, alteraría la polaridad de una carga positiva de uno de los residuos aminoacídicos, pudiendo por ello afectar, bien a la fosforilación de la proteína, o bien a la interacción de ésta con otras subunidades del brazo de membrana del complejo.



* Aminoácidos conservados entre metazoos
 : Aminoácidos conservados entre vertebrados

Figura 10. Estructura secundaria predicha para la proteína NDUFA1 humana y alineamiento de las secuencias aminoacídicas entre distintas especies. Las posiciones G8 y R37, correspondientes a los aminoácidos mutados, aparecen subrayadas.

Para apoyar las suposiciones anteriormente mencionadas, con respecto a la alteración de ambas mutaciones sobre la hidrofobicidad en la proteína MWFE, se realizó un “plot de Kyte-Doolittle” (Figura 11). Su análisis indica que la mutación p.Gly8Arg provoca una clara caída de la hidrofobicidad, mientras que la mutación p.Arg37Ser induce un aumento de ésta.

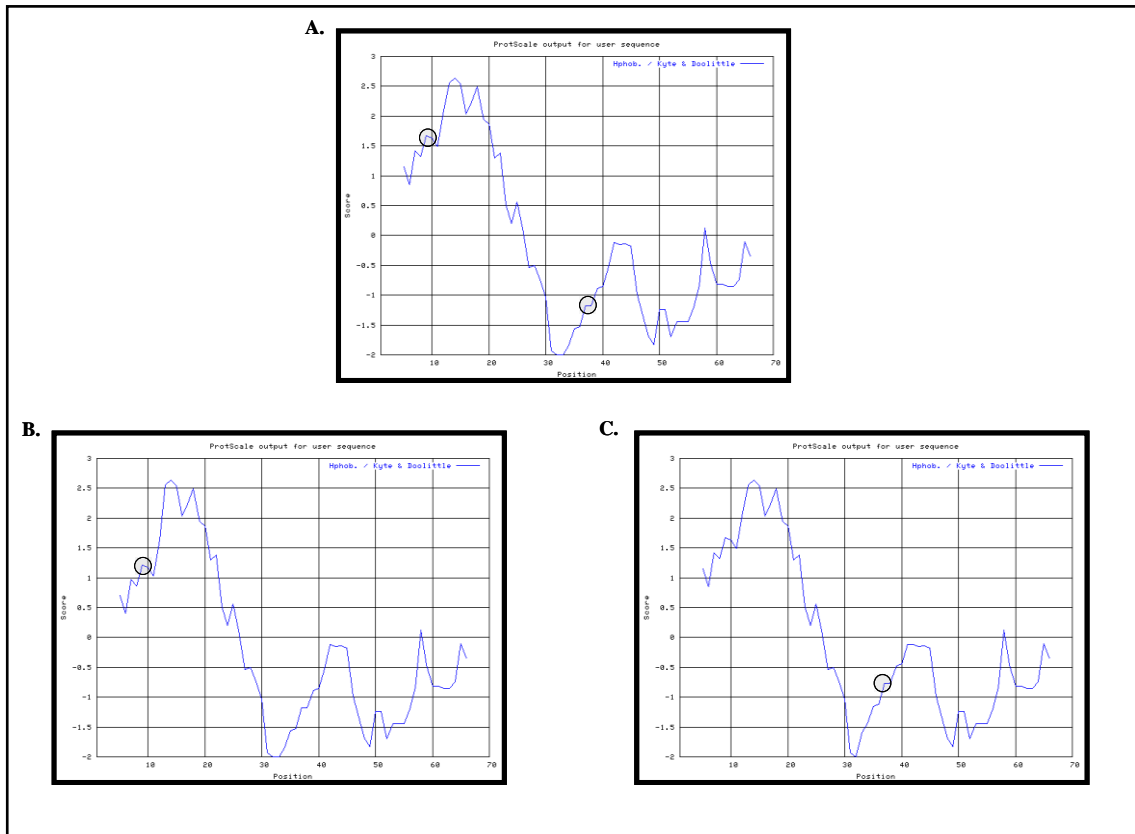


Figura 11. Plots Kyte-Doolittle.

Eje de abscisas: posición del aminoácido dentro de la proteína MWFE. Eje de ordenadas: grado de hidrofobicidad.

A: Proteína MWFE wild-type. Los círculos sombreados indican el grado de hidrofobicidad para las posiciones Gly-8 y Arg-37.

B: La mutación Gly8Arg provoca una evidente caída de la hidrofobicidad

C: La mutación Arg37Ser causa un aumento significativo de la hidrofobicidad.

Este análisis se realizó online, en el sitio <http://www.expasy.ch/tools/protscale.html>

4.4. LA INTEGRIDAD DEL COMPLEJO I MITOCONDRIAL HUMANO SE ALTERA POR LAS MUTACIONES EN *NDUFA1*.

Para el estudio del efecto sobre la integridad del complejo I de la cadena respiratoria, por parte de las mutaciones descritas, se utilizó la técnica 2D-BN-SDS-PAGE, a partir de mitocondria aislada de cultivo de fibroblastos de piel procedentes de nuestros dos pacientes (Figura 12). Se realizó un Ensayo de Actividad en Gel (IGA) para el complejo I, tras correr un gel de acrilamida de 1D Blue Native (1D BN-PAGE) (Figura 12A). Mediante este análisis se confirmaron en ambos pacientes los niveles disminuidos de actividad enzimática de complejo I obtenidos en su medida espectrofotométrica, con respecto a los niveles observados en muestras control. Un duplicado del gel anterior se marcó e incubó con un anticuerpo frente a la subunidad *NDUFA9* del complejo I (Figura 12B, primer panel). La disminución de niveles de complejo totalmente ensamblado, correlacionó con los bajos niveles de actividad de complejo I observados en los pacientes, siendo más pronunciado para el paciente portador de la mutación c.22G>C (Paciente A). Un hecho reseñable en este caso fue la presencia de 2 bandas por encima del complejo I, las cuales mostraron actividad NADH deshidrogenasa y contienen la subunidad *NDUFA9* perteneciente a dicho complejo. En este paciente, estas 2 bandas presentaron una mayor intensidad que la obtenida para la banda del complejo totalmente ensamblado (ratio aprox. 3:1). Las mismas bandas pudieron ser observadas cuando se utilizó un anticuerpo frente al complejo III. Es muy probable que éstas representen complejo I estabilizado dentro de los llamados supercomplejos mitocondriales I_1III_2 ó $I_1III_2IV_1$ (Schagger and Pfeiffer, 2000; Schafer, et al., 2006). Sin embargo, el anticuerpo utilizado frente al complejo IV dio una señal difusa que no se definió correctamente en bandas (“smear”) en la zona electroforética de alto peso molecular (por encima del complejo I). Se han descrito resultados similares en pacientes con déficit de complejo I, como en el caso de un paciente con la mutación p.Pro229Gln en *NDUFS2*, si bien no así en otro paciente con la mutación p.Arg228Gln para el mismo gen (Ugalde, et al., 2004a).

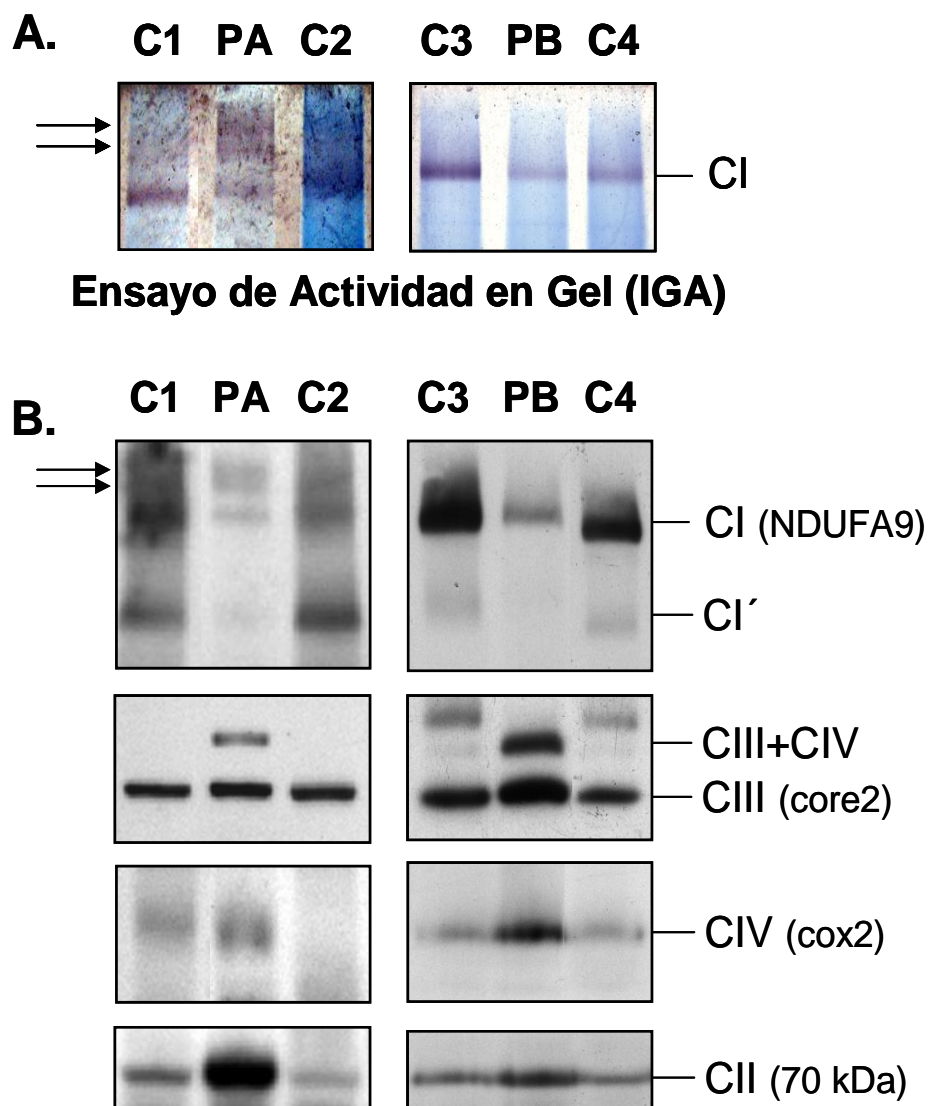


Figura 12. Ensayo de Blue Native (BN-PAGE) para el análisis de los distintos complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, en fibroblastos de los pacientes portadores de las mutaciones en el gen *NDUFA1*.

Se utilizaron en cada caso, 30 μ g de proteína para el análisis de las distintas subunidades de los complejos, empleando geles de poliacrilamida en gradiente (del 5 al 15%) para la separación de los mismos.

A. Ensayo de Actividad en Gel (IGA) para el complejo I. Se confirma un descenso en las actividades de ambos pacientes, con respecto a las muestras control. Las flechas indican la presencia de 2 bandas de alto peso molecular, las cuales presentan actividad NADH deshidrogenasa.

B. Ensayo de Western Blot. Se utilizaron anticuerpos frente a la subunidad del complejo I, NDUFA9 (primer panel), la subunidad core 2 del complejo III (segundo panel), la subunidad COX 2 del complejo IV (tercer panel), o la subunidad de 70kDa perteneciente al complejo II (cuarto panel). Mediante flechas, se indican 2 bandas de alto peso molecular que contienen a la subunidad NDUFA9 (primer panel). La banda nombrada como CI', detectada en los controles utilizando el anticuerpo frente a NDUFA9, corresponde al intermediario "D" del ensamblaje del complejo I (descrito por Ugalde et al. (Ugalde, et al., 2004b). Las 2 bandas superiores que pueden observarse en los controles C3 y C4 (segundo panel) aparecen como señal residual proveniente de una deshibridación o "stripping" incompleto, tras la incubación previa con el anticuerpo anti-NDUFA9.

CI: complejo I totalmente ensamblado (980kDa aprox.); CIII: dímero de complejo III (600kDa aprox.); CIV: complejo IV (250kDa aprox.); CIII+CIV: supercomplejo constituido por ambos complejos, frecuente observado en ensayos de BN-PAGE; C1-C4: sujetos control; PA: paciente A; PB: paciente B.

4.5. MUTACIONES EN LA SUBUNIDAD NDUFA1 AFECTAN A LA EXPRESIÓN DE LOS COMPLEJOS RESPIRATORIOS MITOCONDRIALES.

Para el estudio en ambos pacientes, de los niveles de expresión de los complejos II, III, y IV de la cadena respiratoria, se incubó el mismo blot anteriormente descrito frente a anticuerpos como el core 2 (complejo III), COX 2 (complejo IV), y la subunidad de 70kDa para el complejo II (Figura 12B, segundo, tercer, y cuarto panel, respectivamente).

Se observó un aumento de COX totalmente ensamblada para ambos pacientes, siendo este efecto mayor en el Paciente B, si bien, estos valores de expresión no correlacionaron con las medidas de actividad enzimática obtenidas para COX (Tabla 11 y Figura 12B). Dado que todos los pacientes mostraron actividades de COX normales, y que la actividad de los complejos de la cadena respiratoria en fibroblastos se normalizó frente a complejo IV (Tabla 11), estas actividades se utilizaron igualmente para normalizar los niveles de expresión de los distintos complejos (Tabla 12). Por ello, se cuantificaron las señales obtenidas en los blots, y los ratios de los complejos I, II, III, III+IV, y IV, normalizados frente a la actividad del complejo IV, se utilizaron para relativizar la expresión de los complejos totalmente ensamblados (Tabla 12).

Como era de esperar, los niveles de expresión para el complejo I de ambos pacientes, resultaron disminuidos, siendo este descenso más acusado para el Paciente A.

Los niveles de complejo II mostraron una sobreexpresión significativa para el Paciente A, en comparación con los sujetos control, lo cual correlacionó con un marcado aumento de actividad enzimática medida para este complejo en los fibroblastos de este paciente (Tabla 11).

En el caso de los niveles del dímero de complejo III totalmente ensamblado (600 kDa aprox.) no se observó una alteración significativa (Tabla 12 y Figura 12).

Sin embargo, en los dos pacientes, se pudo comprobar un fuerte incremento para los niveles en estado estacionario (“steady state”) de una banda de aproximadamente 750kDa, la cual fue descrita previamente como el supercomplejo o estructura supramolecular III₂IV₁ formada por los complejos mitocondriales III y IV (Schagger and Pfeiffer, 2000).

Estos resultados quedaron confirmados con la realización de un ensayo de 2D-SDS-PAGE, donde se pudo observar respecto a controles un aumento de señal asociada a la proteína core2 perteneciente al complejo III, así como una mayor señal para la subunidad COX2 perteneciente al complejo IV.

	CI	CII	CIII	CIV	CIII+IV	CI/CIV	CII/CIV	CIII/CIV	CIV/CIV	CIII+IV/CIV
Control	100	100	100	100	100	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Patient A	15±7	407±45	137±42	144±15	785±166	0.13	3.48	1.16	1.23	6.64
Patient B	34±10	156±32	120±13	233±22	688±87	0.33	1.56	1.19	2.31	6.82

Tabla 12. Valores numéricos de los niveles de expresión para los distintos complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, en los pacientes con mutaciones en *NDUFA1*.

Para el cálculo de los niveles de expresión de los complejos I, II y III, se cuantificaron un mínimo de tres ensayos de Blue Native, normalizándose los valores obtenidos frente a la actividad de complejo IV. Los niveles anómalos aparecen resaltados en negrita.

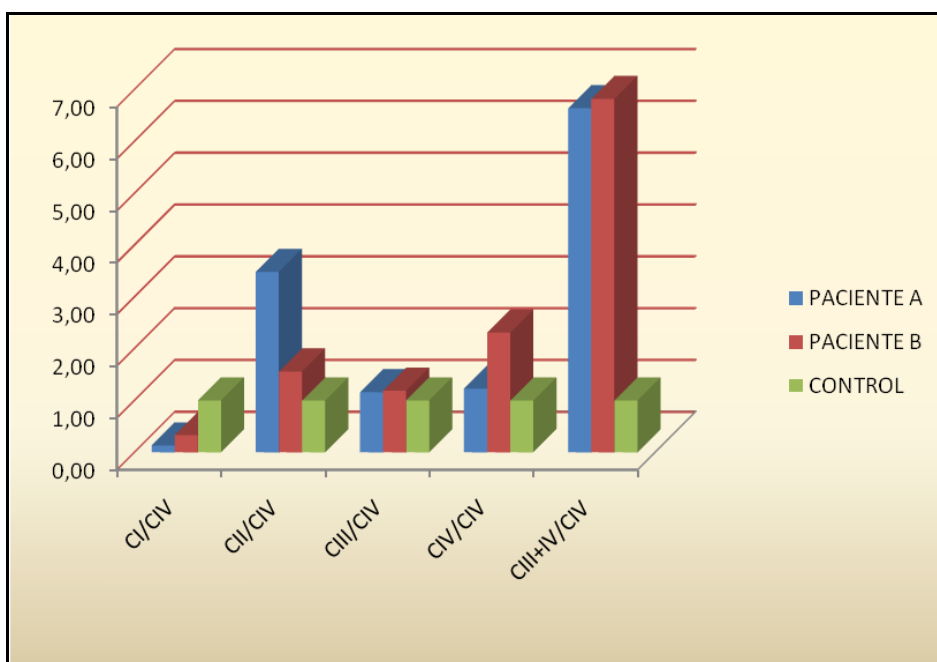


Figura 13. Representación gráfica de los niveles de expresión para los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, en los pacientes con mutaciones en *NDUFA1*, normalizados frente a los niveles de complejo IV

4.6. LAS MUTACIONES EN *NDUFA1* PROVOCAN EFECTOS DIFERENTES SOBRE EL ENSAMBLAJE/ ESTABILIZACIÓN DEL COMPLEJO I MITOCONDRIAL.

Con el objeto de profundizar en el estudio de cómo pueden afectar las mutaciones en *NDUFA1*, al ensamblaje y/o estabilidad del complejo I, separamos los distintos complejos mitocondriales nativos mediante la técnica de electroforesis de 2ª dimensión, 2D-SDS-PAGE. Para ello, se transfirieron y se incubaron con anticuerpos frente a 4 subunidades del complejo I: *NDUFS3*, localizada en el brazo periférico; *NDUFA9*, localizada en el límite del brazo periférico de membrana; la subunidad de 20kDa (ver Material y Métodos); y la subunidad *NDUFA1*, localizada en el brazo periférico (Carroll, et al., 2003) (Figura 14).

Se pudieron observar los siguientes resultados en ambos pacientes:

- 1.- Disminución de la cantidad de complejo I totalmente ensamblado respecto a los sujetos control.
- 2.- Ausencia de acúmulo significativo de subcomplejos de bajo peso molecular, o de intermediarios del ensamblaje, que contuvieran alguna de las subunidades de complejo I analizadas.

La alteración más acusada se observó en el Paciente A, portador de la mutación en hemicigosis pGly8Arg (Figura 14A), en el cuál todas las subunidades del complejo I fracasan en su incorporación a niveles normales dentro del complejo, en comparación con los controles. Además, en este paciente, la mayor parte de la señal correspondiente a las subunidades *NDUFA9* y *NDUFS3* se localizó en un único “spot” de peso molecular superior al del complejo I totalmente ensamblado. Este representaría las dos bandas observadas en el gel nativo de 1D que se localizaban por encima del complejo I, las cuales corresponderían a los supercomplejos I_1III_2 ó $I_1III_2IV_1$, que a su vez se observan como una única mancha en la segunda dimensión (2D). Tan sólo una pequeña cantidad de estas dos subunidades (aproximadamente el 20% de la señal), estaría presente en la banda correspondiente al complejo I totalmente ensamblado.

Por otro lado, la señal correspondiente al anticuerpo frente a *NDUFA1* humana, colocaliza de manera equitativa en los dos “spots” observados en la 2D, como ocurre

con el anticuerpo frente a la subunidad de 20kDa, lo cual indicaría la segregación conjunta de ambas subunidades.

En el Paciente B, portador de la mutación p.Arg37Ser, la subunidad NDUFA1 parece estar presente dentro del complejo I a niveles ligeramente inferiores a los observados en los sujetos control (Figura 14B). Asimismo, se obtuvieron resultados similares para las subunidades NDUFA9 y NDUF3, lo que correlaciona, en gran medida, con la mayor actividad enzimática de complejo I de este paciente.

Sin embargo, apenas pudo detectarse señal para la subunidad de 20 kDa en el complejo totalmente ensamblado, ni en ninguno de los subcomplejos portadores de ésta, lo cual indicaría que la estabilidad de esta subunidad estaría comprometida dentro del complejo I.

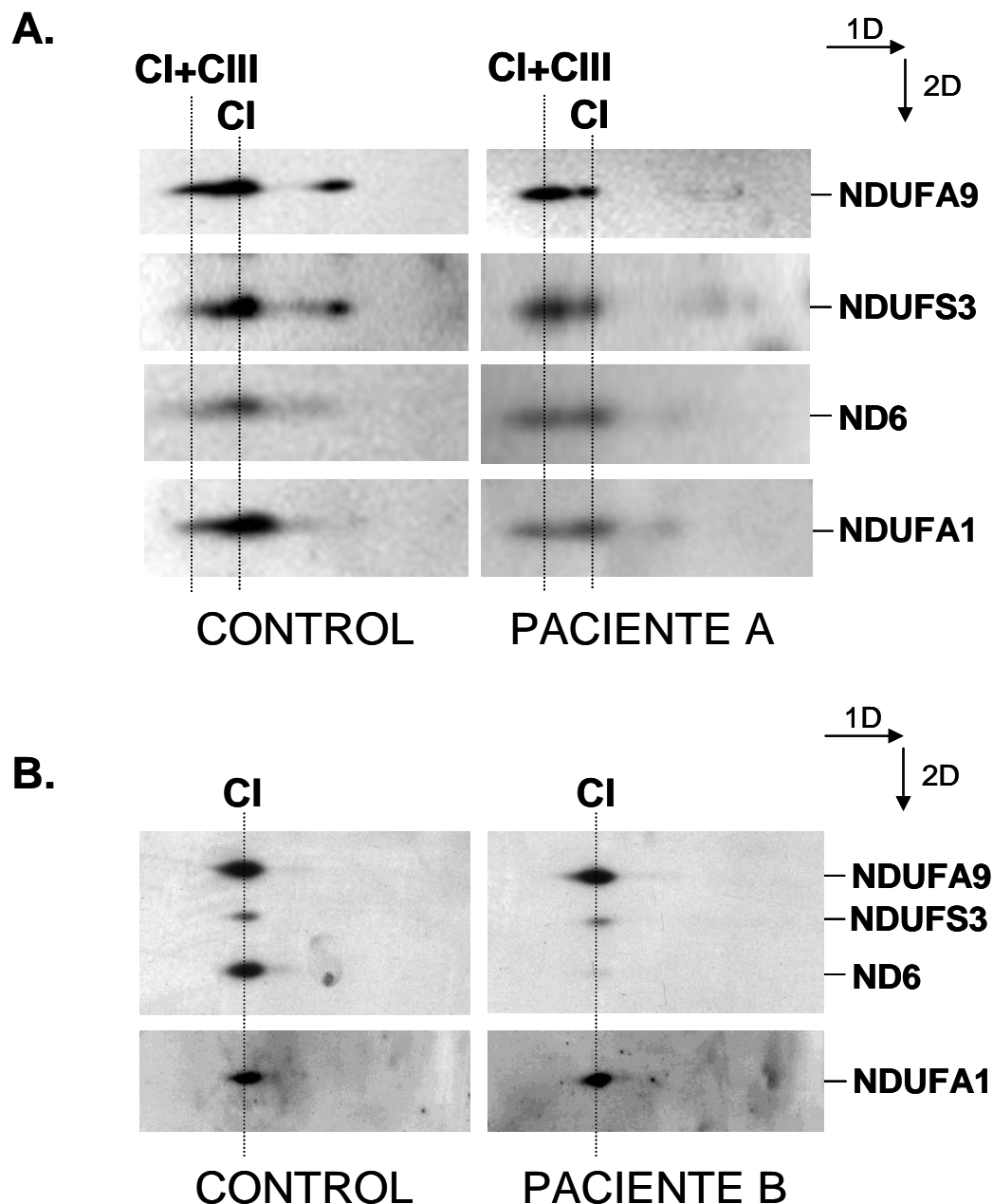


Figura 14. Ensayo de 2D-Blue Native/SDS-PAGE para el análisis del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, a partir de las células mutantes en NDUFA1.

A. Paciente A, portador de la mutación p.Gly8Arg.

B. Paciente B, portador de la mutación p.Arg37Ser.

Tras la extracción de los mitoplastos, se separaron 40µg de proteína en un gel de poliacrilamida en gradiente del 5 al 15%. Para la diferenciación de cada una de las subunidades individualmente, se corrió un gel al 10% de tricina dodecil sulfato sódico (SDS) en la segunda dimensión. Se hibridaron con anticuerpos frente al complejo I (NDUFA9 (39kDa); NDUFS3 (30kDa); Subunidad de 20kDa; y NDUFA1 (8kDa) tanto las proteínas extraídas de los fibroblastos de los pacientes como de los controles. CI indica la posición relativa del complejo I totalmente ensamblado; CI+CIII hace referencia a la posición relativa del supercomplejo de alto peso molecular. Las flechas indican el desplazamiento electroforético tanto en la 1ª Dimensión (1D), como en la 2ª Dimensión (2D).

DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN.

Las mutaciones en genes nucleares estructurales del complejo I, son la causa más frecuente de déficit aislado de complejo I, encontrándose asociadas a una amplia variedad de signos y síntomas clínicos. Sin embargo, las consecuencias fisiopatológicas de estas mutaciones siguen siendo, aún hoy en día, unas grandes desconocidas.

Previamente al trabajo aquí presentado, analizamos una serie de genes estructurales autosómicos, de codificación nuclear, pertenecientes al complejo I mitocondrial, en 12 pacientes pediátricos con déficit aislado de complejo I, encontrando tan sólo una mutación en el gen *NDUFS1*, en un paciente diagnosticado con síndrome de Leigh (Martin, et al., 2005).

El análisis molecular de estos genes, junto con el estudio del factor de ensamblaje del complejo I *NDUFAF1* (*CIA30*) en otros 14 pacientes, resultó infructuoso, datos que sugieren que la causa molecular de la enfermedad podría deberse a mutaciones en otras subunidades o factores implicados en la regulación funcional del complejo I.

La sospecha de un patrón de herencia ligado al cromosoma X en, al menos, una de las familias de nuestra cohorte de pacientes, junto con los resultados previamente publicados referentes al papel esencial del gen de complejo I, ligado al cromosoma X, *NDUFA1* en cuanto a la actividad, ensamblaje y fosforilación del complejo I (Au, et al., 1999; Yadava, et al., 2002; Yadava, et al., 2004; Marques, et al., 2003; Chen, et al., 2004) nos impulsó a buscar mutaciones en este gen.

Como consecuencia de ello, pudimos llegar a identificar por primera vez, un déficit de complejo I ligado al cromosoma X, en 2 familias españolas, atribuibles a mutaciones en *NDUFA1*.

El Paciente A mostró un claro patrón fenotípico concordante con un síndrome de Leigh: regresión psicomotora, signos clínicos y neuroradiológicos de disfunción a nivel del tallo cerebral y afectación de los ganglios basales, así como un pariente varón fallecido, con un fenotipo similar al del paciente.

El Paciente B mostró una sintomatología caracterizada por retraso en el desarrollo, hipotonía, epilepsia mioclónica, y una evolución clínica más estable que el caso anterior, estando actualmente vivo (10 años). En ambos pacientes, los estudios bioquímicos realizados pusieron en evidencia defectos únicos de complejo I de cadena

respiratoria mitocondrial, tanto en músculo como en fibroblastos, siendo este déficit mucho más acusado en el paciente caracterizado con síndrome de Leigh (Paciente A).

Las sospechas de un patrón de herencia ligado al cromosoma X, llegaron a partir de la historia familiar del Paciente A. Observamos una mayor prevalencia en varones, dentro de los miembros afectados: tanto el probando como su hermano mayor, fallecieron de síndrome de Leigh; por otra parte, tres tíos maternos fallecieron en la infancia a causa de una enfermedad desconocida. Además, otro dato de especial relevancia en este contexto, resultó ser el hecho de que, mientras la concepción del Paciente A fue llevada a cabo mediante técnicas de fertilización *in vitro* (a partir de espermatozoides de un donante anónimo), la de su hermano afecto e igualmente fallecido, fue el resultado de una fecundación a partir de un padre biológico distinto.

Si se tiene en cuenta que las mutaciones descritas en subunidades del complejo I codificadas nuclearmente, suelen estar asociadas a fenotipos tipo Leigh o encefalomiopatía mitocondrial, nuestros resultados concordarían y apoyarían los datos previamente publicados.

Curiosamente, el patrón clínico descrito en el Paciente B, presenta una mayor analogía con los anteriormente observados en pacientes con mutaciones en otro de los genes de complejo I, el gen *NDUFV1* (Schuelke, et al., 1999). Por el contrario, la evolución clínica de los enfermos portadores de mutaciones en *NDUFV1*, empeoraba paulatinamente, mientras que la del Paciente B se ha mantenido más estable. Otra diferencia reseñable con respecto al Paciente A fue el patrón neuroradiológico observado, el cual resultó ser algo diferente entre ambos. Mientras que para el Paciente A se observaron lesiones a niveles del tálamo, pedúnculos y tallo cerebral, en el caso del Paciente B, la Resonancia Magnética sí puso en evidencia signos de atrofia cerebelosa, acompañados de alteraciones a nivel de los núcleos dentados, pero no se observaron alteraciones ni de estructuras supratentoriales, ni del tronco encefálico.

El análisis de PCR-RFLP y posterior secuenciación realizado en el Paciente A evidenció la presencia de la mutación- transversión c.22G>C, en el gen *NDUFA1*. El hecho de que la madre de éste, fuera una portadora asintomática de esta mutación, enfatizó la posibilidad de una alteración o patología ligada al cromosoma X.

Al analizar el mismo gen en el Paciente B, se encontró otra mutación, en este caso sustitución, la c.251G>C. En este caso, dado que la madre resultó ser portadora de la mutación, pero no así la abuela materna, se podría hipotetizar que esta mutación podría haber aparecido de novo en la línea germinal de la abuela. En este sentido, se ha escrito mucho acerca de la amplia variabilidad fenotípica dentro de las enfermedades ligadas al cromosoma X. Los genes que escapan al proceso de silenciamiento del cromosoma X, se reparten por todo el cromosoma, aunque la mayoría de ellos se localizan en el brazo corto del mismo (Orstavik, 2009). El gen *NDUFA1* se localiza en el brazo largo del cromosoma (Xq24), con lo cual es candidato a sufrir el fenómeno de inactivación o silenciamiento.

Considerando todos estos resultados en su conjunto, encontramos que el 11,5% (3 de 26) de nuestra serie de 26 pacientes pediátricos, portaban mutaciones en alguno de los genes estructurales del complejo I mitocondrial. A pesar de que esta frecuencia corrobora los datos previamente descritos por otros (Benit, et al., 2001; Hinttala, et al., 2005; Bugiani, et al., 2004; Loeffen, et al., 2000), en nuestro caso, su distribución es más bien diferente, dado que 2 de nuestros pacientes presentaron mutaciones en el gen *NDUFA1*, mientras que tan sólo 1 lo hizo en otro, como fue el caso de la mutación descrita en *NDUFS1* (Martin, et al., 2005). En este sentido, nuestros resultados contravendrían lo descrito por Loeffen y col. (Loeffen, et al., 1998a) que, analizando el gen *NDUFA1* en 17 pacientes con encefalomiopatía mitocondrial y déficit de complejo I, no encontraron una sola mutación.

Nuestros resultados podrían indicar que las mutaciones en el gen *NDUFA1* aparecerían, con una relativa frecuencia, como alteraciones genéticas subyacentes en la población española con deficiencia de complejo I y encefalomiopatía mitocondrial.

Los residuos 8 y 37 de la subunidad *NDUFA1* se localizan en regiones muy conservadas desde el punto de vista evolutivo sugiriendo que son relevantes desde el punto de vista funcional.

Mediante el análisis de 2D-BN-SDS-PAGE se observaron que los niveles de complejo I totalmente ensamblado, disminuían en ambos pacientes, lo cual correlaciona con los bajos niveles observados de actividad enzimática del complejo I.

Estos resultados parecerían sugerir que, alteraciones en la importación de la proteína MWFE, en la ruta de ensamblaje del complejo I, o a nivel de la estabilidad del complejo I, podrían ser la causa directa del descenso en los niveles de actividad. Corroborando esta última observación, encontraríamos los experimentos realizados sobre mutantes de *Neurospora crassa* defectivos en MWFE, los cuales mostraron que eran incapaces de llevar a cabo el proceso de ensamblaje del complejo I, tanto del brazo periférico como el de membrana (Marques, et al., 2003). Igualmente, se ha comprobado en células mutantes de ovario de hamster chino que, alteraciones específicas a nivel de aminoácido, o que formas truncadas de la proteína MWFE, interfieren en la formación del complejo I, haciendo de ésta una enzima inactiva (Au, et al., 1999; Yadava, et al., 2002).

Además, en el caso de los fibroblastos de nuestros dos pacientes, no se detectó un acumulo significativo ni de subcomplejos de bajo peso molecular, ni de intermediarios del ensamblaje que contuvieran ninguna de las subunidades de complejo I analizadas, en contraposición a los resultados descrito en otros pacientes con déficit de complejo I (Ugalde, et al., 2004a; Antonicka, et al., 2003).

Así, estos resultados parecerían indicar que, más que los procesos de ensamblaje del complejo I mitocondrial, sería la estabilidad de éste la que estaría gravemente comprometida, a consecuencia de las mutaciones en la subunidad NDUFA1. Una posible explicación alternativa podría ser que las proteínas mutadas no se incorporaran eficientemente dentro del primer subcomplejo o intermediario del ensamblaje, conllevando esto, una disminución de la proteína totalmente ensamblada pero sin acúmulo de intermediarios.

Estos efectos mencionados, resultaron más marcados en el Paciente A, el cual presentaba un fenotipo clínico mucho más severo. De manera interesante, la Gly8, se localiza dentro del dominio N-terminal de la proteína NDUFA1, el cual parece formar un dominio funcional implicado en el “targeting” mitocondrial, importe, y orientación de esta proteína dentro del complejo I. (Yadava and Scheffler, 2004).

La sustitución por Arg podría conducir a un fallo en el importe mitocondrial de la proteína; lo cual podría alterar tanto el anclaje del complejo I en la membrana interna, como la inestabilidad del complejo. En este sentido, Yadava y col. (Yadava, et al., 2002), han descrito, en células de hámster, que el bloqueo del mecanismo de importe en

la proteína MWFE, conlleva a la formación de un complejo I inmaduro o parcialmente ensamblado.

Nuestros resultados indican que, al menos parcialmente, sí ocurre el importe de MWFE, dado que una pequeña cantidad de la proteína se incorpora dentro del complejo I (Figura 14).

Por otro lado, estos resultados sugieren que la mutación p.Gly8Arg pudiera estar afectando la conformación funcional de los complejos de la cadena respiratoria, los cuales estarían estabilizados en las estructuras supramoleculares I_1III_2 y $I_1III_2IV_1$, que conservan actividad NADH deshidrogenasa; si esta actividad es rotenona dependiente o no, es algo que sigue sin estar claro.

En el caso del Paciente B, la sustitución de Ser por Arg en el residuo 37 de MWFE provoca la supresión de una carga positiva en la región central de la proteína, la cual parece estar implicada en la interacción de ésta con otras subunidades del complejo I, (Yadava, et al., 2002; Scheffler, et al., 2004). Además, es destacable que este residuo está próximo al, hasta hoy, único sitio de fosforilación de la proteína, la posición aminoacídica 55 (Chen, et al., 2004). Recientemente, se ha estudiado la relevancia del proceso de fosforilación, tanto en MWFE como en ESSS. En el caso de MWFE, se substituyó, mediante técnicas de mutagénesis dirigida, la serina de la posición 55, por otra serie de aminoácidos, observándose en prácticamente todos los casos, el bloqueo total del proceso de ensamblaje y funcionalidad del complejo I (Yadava, et al., 2008).

De igual manera que, como ya ha sido previamente documentado, para una mutación en la posición aminoacídica conservada 50, p.Arg50Lys, la cual causa también una alteración en el dominio hidrófilo de MWFE, haciendo completamente inactivo al complejo I (Yadava, et al., 2002), se podría pensar que nuestra mutación p.Arg37Ser podría alterar la estructura terciaria de NDUFA1, provocando por ello la marcada disminución de actividad del complejo I, como la observada en el Paciente B.

Aunque en este paciente mostró niveles mayores de complejo I totalmente ensamblado, en comparación con el Paciente A, la estabilización dentro del complejo de la subunidad de 20kDa del brazo de membrana se encontró severamente comprometida (Figura 14B). Con respecto a esto, es conocido que la proteína MWFE bovina se encuentra localizada en el subcomplejo $I\alpha$ ($I\gamma$) del brazo de membrana, donde posiblemente interaccione con otras subunidades (Carroll, et al., 2003; Sazanov, et al., 2000). Por

consiguiente, mutantes en alguna subunidad ND, o bien con una síntesis de proteína mitocondrial alterada, darían lugar a una proteína MWFE inestable (Yadava, et al., 2004; Potluri, et al., 2009).

Nuestros resultados apoyan observaciones previas en líneas celulares (Yadava, et al., 2004) que sugieren que tanto el destino de la proteína MWFE, como la estabilidad de los mutantes en complejo I, se encuentran muy ligados a la síntesis de proteínas mitocondriales, así como al mecanismo de ensamblaje de las subunidades del brazo de membrana (Yadava, et al., 2004).

Recientemente, en el año 2009, Potluri y colaboradores, describieron una nueva mutación en *NDUFA1* (Gly32Arg) en dos pacientes cuyas madres eran portadoras heterocigotas de la mutación. En este mismo trabajo, se modelizaron en líneas celulares de hamster, tanto esta mutación, como las descritas en esta tesis (Gly8Arg, Arg37Ser).

Los hallazgos funcionales estudiando la actividad de los complejos, el ensamblaje de los mismos y la cinética de crecimiento celular, apoyan el efecto patogénico de estas mutaciones. Por otra parte en ese trabajo estudiaron las variantes polimórficas del ADNmt en el paciente con la mutación Gly32Arg sugiriendo que ciertas variantes presentes en determinadas subunidades mitocondriales podrían ejercer un papel sinérgico junto a *NDUFA1* en la severidad de las manifestaciones clínicas (Potluri, et al., 2009).

CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES.

Varias evidencias sugieren que estas mutaciones pudieran ser la causa subyacente en ambos pacientes del déficit de complejo I, y por tanto, responsables del fenotipo clínico:

1. Son las únicas alteraciones nucleotídicas encontradas en todos los genes estructurales y de ensamblaje codificados por los genes nucleares analizados.
2. No se encontraron evidencias de mutaciones patógenas tras secuenciación del ADN mitocondrial.
3. Ambas mutaciones afectan a residuos aminoacídicos muy conservados evolutivamente, los cuales pudieran jugar un papel importante tanto en la función como en la estabilidad de la proteína MWFE.
4. No se encontraron ninguna de las dos mutaciones, en 200 sujetos control sanos del mismo origen étnico.
5. Los fibroblastos de piel cultivados de ambos pacientes mostraron alteraciones a nivel de ensamblaje o estabilidad del complejo I mediante análisis de 2D-Blue Native/SDS-PAGE.

En este trabajo se describe por primera vez, mutaciones en un gen estructural del complejo I mitocondrial ligado al cromosoma X, asociadas a un defecto enzimático del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial.

Los resultados de esta tesis sugieren que mutaciones que afectan a residuos muy conservados en la proteína NDUFA1 humana puedan ser causa de encefalomiopatías mitocondriales, y que esta proteína tenga un papel esencial en la función del complejo I.

BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Acin-Perez R, Bayona-Bafaluy MP, Fernandez-Silva P, Moreno-Loshuertos R, Perez-Martos A, Bruno C, Moraes CT, Enriquez JA. 2004. Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria. *Mol Cell* 13(6):805-15.
- Ackrell BAC. 1992. Structure and function of succinate dehydrogenase and fumarate reductase. In *Chemistry and biochemistry of flavoenzymes*. p. 229-97.
- Amati-Bonneau P, Valentino ML, Reynier P, Gallardo ME, Bornstein B, Boissiere A, Campos Y, Rivera H, de la Aleja JG, Carroccia R and others. 2008. OPA1 mutations induce mitochondrial DNA instability and optic atrophy 'plus' phenotypes. *Brain* 131(Pt 2):338-51.
- Anderson L. 1981. Identification of mitochondrial proteins and some of their precursors in two-dimensional electrophoretic maps of human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(4):2407-11.
- Andreu AL, DiMauro S. 2003. Current classification of mitochondrial disorders. *J Neurol* 250(12):1403-6.
- Antonicka H, Ogilvie I, Taivassalo T, Anitori RP, Haller RG, Vissing J, Kennaway NG, Shoubridge EA. 2003. Identification and characterization of a common set of complex I assembly intermediates in mitochondria from patients with complex I deficiency. *J Biol Chem* 278(44):43081-8.
- Attardi B, Cravioto B, Attardi G. 1969. Membrane-bound ribosomes in HeLa cells. I. Their proportion to total cell ribosomes and their association with messenger RNA. *J Mol Biol* 44(1):47-70.
- Attardi G. 1987. Evidence for translational control of mitochondrial gene expression in rat muscle and brain synaptosome mitochondrial
- Advances in Myochemistry*. London: John Libbey Eurotext. p v.
- Attardi G, Chomyn A, King MP, Kruse B, Polosa PL, Murdter NN. 1990. Regulation of mitochondrial gene expression in mammalian cells. *Biochem Soc Trans* 18(4):509-13.
- Attardi G, Schatz G. 1988. Biogenesis of mitochondria. *Annu Rev Cell Biol* 4:289-333.
- Au HC, Seo BB, Matsuno-Yagi A, Yagi T, Scheffler IE. 1999. The NDUFA1 gene product (MWFE protein) is essential for activity of complex I in mammalian mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(8):4354-9.
- Benit P, Beugnot R, Chretien D, Giurgea I, De Lonlay-Debeney P, Issartel JP, Corral-Debrinski M, Kerscher S, Rustin P, Rotig A and others. 2003. Mutant NDUFV2 subunit of mitochondrial complex I causes early onset hypertrophic cardiomyopathy and encephalopathy. *Hum Mutat* 21(6):582-6.
- Benit P, Chretien D, Kadhon N, de Lonlay-Debeney P, Cormier-Daire V, Cabral A, Peudenier S, Rustin P, Munnich A, Rotig A. 2001. Large-scale deletion and point mutations of the nuclear NDUFV1 and NDUFS1 genes in mitochondrial complex I deficiency. *Am J Hum Genet* 68(6):1344-52.
- Benit P, Slama A, Cartault F, Giurgea I, Chretien D, Lebon S, Marsac C, Munnich A, Rotig A, Rustin P. 2004. Mutant NDUFS3 subunit of mitochondrial complex I causes Leigh syndrome. *J Med Genet* 41(1):14-7.
- Bogenhagen D, Clayton DA. 1977. Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle. *Cell* 11(4):719-27.
- Bourgeron T, Rustin P, Chretien D, Birch-Machin M, Bourgeois M, Viegas-Pequignot E, Munnich A, Rotig A. 1995. Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase

- gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nat Genet* 11(2):144-9.
- Bowmaker M, Yang MY, Yasukawa T, Reyes A, Jacobs HT, Huberman JA, Holt IJ. 2003. Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone. *J Biol Chem* 278(51):50961-9.
- Brown TA, Cecconi C, Tkachuk AN, Bustamante C, Clayton DA. 2005. Replication of mitochondrial DNA occurs by strand displacement with alternative light-strand origins, not via a strand-coupled mechanism. *Genes Dev* 19(20):2466-76.
- Brown TA, Clayton DA. 2006. Genesis and wanderings: origins and migrations in asymmetrically replicating mitochondrial DNA. *Cell Cycle* 5(9):917-21.
- Brustovetsky N, Klingenberg M. 1996. Mitochondrial ADP/ATP carrier can be reversibly converted into a large channel by Ca²⁺. *Biochemistry* 35(26):8483-8.
- Bugiani M, Invernizzi F, Alberio S, Briem E, Lamantea E, Carrara F, Moroni I, Farina L, Spada M, Donati MA and others. 2004. Clinical and molecular findings in children with complex I deficiency. *Biochim Biophys Acta* 1659(2-3):136-47.
- Campos Y, Martin MA, Garcia-Silva T, del Hoyo P, Rubio JC, Castro-Gago M, Garcia-Penas J, Casas J, Cabello A, Ricoy JR and others. 1998. Clinical heterogeneity associated with mitochondrial DNA depletion in muscle. *Neuromuscul Disord* 8(8):568-73.
- Carroll J, Fearnley IM, Shannon RJ, Hirst J, Walker JE. 2003. Analysis of the subunit composition of complex I from bovine heart mitochondria. *Mol Cell Proteomics* 2(2):117-26.
- Carroll J, Shannon RJ, Fearnley IM, Walker JE, Hirst J. 2002. Definition of the nuclear encoded protein composition of bovine heart mitochondrial complex I. Identification of two new subunits. *J Biol Chem* 277(52):50311-7.
- Clayton DA. 1982. Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* 28(4):693-705.
- Cree LM, Samuels DC, de Sousa Lopes SC, Rajasimha HK, Wonnapijit P, Mann JR, Dahl HH, Chinnery PF. 2008. A reduction of mitochondrial DNA molecules during embryogenesis explains the rapid segregation of genotypes. *Nat Genet* 40(2):249-54.
- Chen R, Fearnley IM, Peak-Chew SY, Walker JE. 2004. The phosphorylation of subunits of complex I from bovine heart mitochondria. *J Biol Chem* 279(25):26036-45.
- Chen S, Guillory RJ. 1981. Studies on the interaction of arylazido-beta-alanyl NAD⁺ with the mitochondrial NADH dehydrogenase. *J Biol Chem* 256(16):8318-23.
- Chen X, Prosser R, Simonetti S, Sadlock J, Jagiello G, Schon EA. 1995. Rearranged mitochondrial genomes are present in human oocytes. *Am J Hum Genet* 57(2):239-47.
- Chinnery PF. 2007. Mutations in SUCLA2: a tandem ride back to the Krebs cycle. *Brain* 130(Pt 3):606-9.
- Chinnery PF, Turnbull DM. 2000. Mitochondrial DNA mutations in the pathogenesis of human disease. *Mol Med Today* 6(11):425-32.
- Chomyn A, Cleeter MW, Ragan CI, Riley M, Doolittle RF, Attardi G. 1986. URF6, last unidentified reading frame of human mtDNA, codes for an NADH dehydrogenase subunit. *Science* 234(4776):614-8.
- Christianson TW, Clayton DA. 1988. A tridecamer DNA sequence supports human mitochondrial RNA 3'-end formation in vitro. *Mol Cell Biol* 8(10):4502-9.
- Debray FG, Lambert M, Mitchell GA. 2008. Disorders of mitochondrial function. *Curr Opin Pediatr* 20(4):471-82.

- Diffley JF, Stillman B. 1991. A close relative of the nuclear, chromosomal high-mobility group protein HMG1 in yeast mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(17):7864-8.
- DiMauro S. 2004. Mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta* 1658(1-2):80-8.
- DiMauro S. 2006. Mitochondrial myopathies. *Curr Opin Rheumatol* 18(6):636-41.
- DiMauro S, Schon EA. 2003. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med* 348(26):2656-68.
- DiMauro S, Servidei S, Zeviani M, DiRocco M, DeVivo DC, DiDonato S, Uziel G, Berry K, Hoganson G, Johnsen SD and others. 1987. Cytochrome c oxidase deficiency in Leigh syndrome. *Ann Neurol* 22(4):498-506.
- Dubin DT, Montoya J, Timko KD, Attardi G. 1982. Sequence analysis and precise mapping of the 3' ends of HeLa cell mitochondrial ribosomal RNAs. *J Mol Biol* 157(1):1-19.
- Dunning CJ, McKenzie M, Sugiana C, Lazarou M, Silke J, Connelly A, Fletcher JM, Kirby DM, Thorburn DR, Ryan MT. 2007. Human CIA30 is involved in the early assembly of mitochondrial complex I and mutations in its gene cause disease. *Embo J* 26(13):3227-37.
- Dyall SD, Yan W, Delgadillo-Correa MG, Lunceford A, Loo JA, Clarke CF, Johnson PJ. 2004. Non-mitochondrial complex I proteins in a hydrogenosomal oxidoreductase complex. *Nature* 431(7012):1103-7.
- Enriquez JA, Martinez-Azorin F, Garesse R, Lopez-Perez MJ, Perez-Martos A, Bornstein B, Montoya J. 1998. [Human mitochondrial genetic system]. *Rev Neurol* 26 Suppl 1:S21-6.
- Evans MJ, Scarpulla RC. 1990. NRF-1: a trans-activator of nuclear-encoded respiratory genes in animal cells. *Genes Dev* 4(6):1023-34.
- Filosto M, Mancuso M. 2007. Mitochondrial diseases: a nosological update. *Acta Neurol Scand* 115(4):211-21.
- Fischer JC, Ruitenbeek W, Stadhouders AM, Trijbels JM, Sengers RC, Janssen AJ, Veerkamp JH. 1985. Investigation of mitochondrial metabolism in small human skeletal muscle biopsy specimens. Improvement of preparation procedure. *Clin Chim Acta* 145(1):89-99.
- Gabalton T, Rainey D, Huynen MA. 2005. Tracing the evolution of a large protein complex in the eukaryotes, NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I). *J Mol Biol* 348(4):857-70.
- Gaines G, Rossi C, Attardi G. 1987. Markedly different ATP requirements for rRNA synthesis and mtDNA light strand transcription versus mRNA synthesis in isolated human mitochondria. *J Biol Chem* 262(4):1907-15.
- Gelfand R, Attardi G. 1981. Synthesis and turnover of mitochondrial ribonucleic acid in HeLa cells: the mature ribosomal and messenger ribonucleic acid species are metabolically unstable. *Mol Cell Biol* 1(6):497-511.
- Gray H, Wong TW. 1992. Purification and identification of subunit structure of the human mitochondrial DNA polymerase. *J Biol Chem* 267(9):5835-41.
- Herrmann JM, Neupert W. 2000. Protein transport into mitochondria. *Curr Opin Microbiol* 3(2):210-4.
- Hinttala R, Uusimaa J, Remes AM, Rantala H, Hassinen IE, Majamaa K. 2005. Sequence analysis of nuclear genes encoding functionally important complex I subunits in children with encephalomyopathy. *J Mol Med* 83(10):786-94.
- Hirano M, DiMauro S. 2001. ANT1, Twinkle, POLG, and TP: new genes open our eyes to ophthalmoplegia. *Neurology* 57(12):2163-5.

- Hirano M, Nishigaki Y, Marti R. 2004. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): a disease of two genomes. *Neurologist* 10(1):8-17.
- Hirst J, Carroll J, Fearnley IM, Shannon RJ, Walker JE. 2003. The nuclear encoded subunits of complex I from bovine heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1604(3):135-50.
- Hoefs SJ, Dieteren CE, Distelmaier F, Janssen RJ, Epplen A, Swarts HG, Forkink M, Rodenburg RJ, Nijtmans LG, Willems PH and others. 2008. NDUFA2 complex I mutation leads to Leigh disease. *Am J Hum Genet* 82(6):1306-15.
- Holt IJ, Jacobs HT. 2003. Response: The mitochondrial DNA replication bubble has not burst. *Trends Biochem Sci* 28(7):355-6.
- Holt IJ, Lorimer HE, Jacobs HT. 2000. Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell* 100(5):515-24.
- Hudson G, Amati-Bonneau P, Blakely EL, Stewart JD, He L, Schaefer AM, Griffiths PG, Ahlqvist K, Suomalainen A, Reynier P and others. 2008. Mutation of OPA1 causes dominant optic atrophy with external ophthalmoplegia, ataxia, deafness and multiple mitochondrial DNA deletions: a novel disorder of mtDNA maintenance. *Brain* 131(Pt 2):329-37.
- Hudson G, Deschauer M, Taylor RW, Hanna MG, Fialho D, Schaefer AM, He LP, Blakely E, Turnbull DM, Chinnery PF. 2006. POLG1, C10ORF2, and ANT1 mutations are uncommon in sporadic progressive external ophthalmoplegia with multiple mitochondrial DNA deletions. *Neurology* 66(9):1439-41.
- Janssen R, Smeitink J, Smeets R, van Den Heuvel L. 2002. CIA30 complex I assembly factor: a candidate for human complex I deficiency? *Hum Genet* 110(3):264-70.
- Janssen RJ, Nijtmans LG, van den Heuvel LP, Smeitink JA. 2006. Mitochondrial complex I: structure, function and pathology. *J Inher Metab Dis* 29(4):499-515.
- Johansson M, Karlsson A. 1996. Cloning and expression of human deoxyguanosine kinase cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(14):7258-62.
- Jorgensen R, Sogaard TM, Rossing AB, Martensen PM, Justesen J. 2000. Identification and characterization of human mitochondrial tryptophanyl-tRNA synthetase. *J Biol Chem* 275(22):16820-6.
- Kaguni LS, Olson MW. 1989. Mismatch-specific 3'----5' exonuclease associated with the mitochondrial DNA polymerase from *Drosophila* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(17):6469-73.
- Kasamatsu H, Vinograd J. 1973. Unidirectionality of replication in mouse mitochondrial DNA. *Nat New Biol* 241(108):103-5.
- Kaukonen J, Juselius JK, Tiranti V, Kyttala A, Zeviani M, Comi GP, Keranen S, Peltonen L, Suomalainen A. 2000. Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance. *Science* 289(5480):782-5.
- Kennelly PJ, Krebs EG. 1991. Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J Biol Chem* 266(24):15555-8.
- Kirby DM, Crawford M, Cleary MA, Dahl HH, Dennett X, Thorburn DR. 1999. Respiratory chain complex I deficiency: an underdiagnosed energy generation disorder. *Neurology* 52(6):1255-64.
- Kirby DM, Salemi R, Sugiana C, Ohtake A, Parry L, Bell KM, Kirk EP, Boneh A, Taylor RW, Dahl HH and others. 2004. NDUFS6 mutations are a novel cause of lethal neonatal mitochondrial complex I deficiency. *J Clin Invest* 114(6):837-45.

- Kruse B, Narasimhan N, Attardi G. 1989. Termination of transcription in human mitochondria: identification and purification of a DNA binding protein factor that promotes termination. *Cell* 58(2):391-7.
- Larsson NG, Wang J, Wilhelmsson H, Oldfors A, Rustin P, Lewandoski M, Barsh GS, Clayton DA. 1998. Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet* 18(3):231-6.
- Lefai E, Calleja M, Ruiz de Mena I, Lagina AT, 3rd, Kaguni LS, Garesse R. 2000. Overexpression of the catalytic subunit of DNA polymerase gamma results in depletion of mitochondrial DNA in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet* 264(1-2):37-46.
- Loeffen J, Elpeleg O, Smeitink J, Smeets R, Stockler-Ipsiroglu S, Mandel H, Sengers R, Trijbels F, van den Heuvel L. 2001. Mutations in the complex I NDUFS2 gene of patients with cardiomyopathy and encephalomyopathy. *Ann Neurol* 49(2):195-201.
- Loeffen J, Smeets R, Smeitink J, Ruitenbeek W, Janssen A, Mariman E, Sengers R, Trijbels F, van den Heuvel L. 1998a. The X-chromosomal NDUFA1 gene of complex I in mitochondrial encephalomyopathies: tissue expression and mutation detection. *J Inher Metab Dis* 21(3):210-5.
- Loeffen J, Smeitink J, Triepels R, Smeets R, Schuelke M, Sengers R, Trijbels F, Hamel B, Mullaart R, van den Heuvel L. 1998b. The first nuclear-encoded complex I mutation in a patient with Leigh syndrome. *Am J Hum Genet* 63(6):1598-608.
- Loeffen JL, Smeitink JA, Trijbels JM, Janssen AJ, Triepels RH, Sengers RC, van den Heuvel LP. 2000. Isolated complex I deficiency in children: clinical, biochemical and genetic aspects. *Hum Mutat* 15(2):123-34.
- Loiseau D, Chevrollier A, Verny C, Guillet V, Gueguen N, Pou de Crescenzo MA, Ferre M, Malinge MC, Guichet A, Nicolas G and others. 2007. Mitochondrial coupling defect in Charcot-Marie-Tooth type 2A disease. *Ann Neurol* 61(4):315-23.
- Longley MJ, Clark S, Yu Wai Man C, Hudson G, Durham SE, Taylor RW, Nightingale S, Turnbull DM, Copeland WC, Chinnery PF. 2006. Mutant POLG2 disrupts DNA polymerase gamma subunits and causes progressive external ophthalmoplegia. *Am J Hum Genet* 78(6):1026-34.
- Marques I, Duarte M, Videira A. 2003. The 9.8 kDa subunit of complex I, related to bacterial Na(+)-translocating NADH dehydrogenases, is required for enzyme assembly and function in *Neurospora crassa*. *J Mol Biol* 329(2):283-90.
- Martin MA, Blazquez A, Gutierrez-Solana LG, Fernandez-Moreira D, Briones P, Andreu AL, Garesse R, Campos Y, Arenas J. 2005. Leigh syndrome associated with mitochondrial complex I deficiency due to a novel mutation in the NDUFS1 gene. *Arch Neurol* 62(4):659-61.
- Martinez B, del Hoyo P, Martin MA, Arenas J, Perez-Castillo A, Santos A. 2001. Thyroid hormone regulates oxidative phosphorylation in the cerebral cortex and striatum of neonatal rats. *J Neurochem* 78(5):1054-63.
- Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jurgensmeier JM, Susin SA, Vieira HL, Prevost MC, Xie Z, Matsuyama S, Reed JC and others. 1998. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* 281(5385):2027-31.
- McShane MA, Hammans SR, Sweeney M, Holt IJ, Beattie TJ, Brett EM, Harding AE. 1991. Pearson syndrome and mitochondrial encephalomyopathy in a patient with a deletion of mtDNA. *Am J Hum Genet* 48(1):39-42.

- Montoya J, Christianson T, Levens D, Rabinowitz M, Attardi G. 1982. Identification of initiation sites for heavy-strand and light-strand transcription in human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(23):7195-9.
- Montoya J, Gaines GL, Attardi G. 1983. The pattern of transcription of the human mitochondrial rRNA genes reveals two overlapping transcription units. *Cell* 34(1):151-9.
- Montoya J, Ojala D, Attardi G. 1981. Distinctive features of the 5'-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs. *Nature* 290(5806):465-70.
- Moraes CT ea. 1993. Quantitative defects of mitochondrial DNA. DiMauro S, Wallace DC, eds. *Mitochondrial DNA in human pathology*. p. 97-108. New York: Raven Press.
- Morris AA, Leonard JV, Brown GK, Bidouki SK, Bindoff LA, Woodward CE, Harding AE, Lake BD, Harding BN, Farrell MA and others. 1996. Deficiency of respiratory chain complex I is a common cause of Leigh disease. *Ann Neurol* 40(1):25-30.
- Murray J, Zhang B, Taylor SW, Oglesbee D, Fahy E, Marusich MF, Ghosh SS, Capaldi RA. 2003. The subunit composition of the human NADH dehydrogenase obtained by rapid one-step immunopurification. *J Biol Chem* 278(16):13619-22.
- Neupert W. 1997. Protein import into mitochondria. *Annu Rev Biochem* 66:863-917.
- Nijtmans LG, Henderson NS, Holt IJ. 2002. Blue Native electrophoresis to study mitochondrial and other protein complexes. *Methods* 26(4):327-34.
- Nishino I, Spinazzola A, Hirano M. 1999. Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science* 283(5402):689-92.
- Ogilvie I, Kennaway NG, Shoubridge EA. 2005. A molecular chaperone for mitochondrial complex I assembly is mutated in a progressive encephalopathy. *J Clin Invest* 115(10):2784-92.
- Ohnishi T. 1998. Iron-sulfur clusters/semiquinones in complex I. *Biochim Biophys Acta* 1364(2):186-206.
- Ojala D, Merkel C, Gelfand R, Attardi G. 1980. The tRNA genes punctuate the reading of genetic information in human mitochondrial DNA. *Cell* 22(2 Pt 2):393-403.
- Orstavik KH. 2009. X chromosome inactivation in clinical practice. *Hum Genet* 126(3):363-73.
- Ostergaard E, Christensen E, Kristensen E, Mogensen B, Duno M, Shoubridge EA, Wibrand F. 2007. Deficiency of the alpha subunit of succinate-coenzyme A ligase causes fatal infantile lactic acidosis with mitochondrial DNA depletion. *Am J Hum Genet* 81(2):383-7.
- Ostronoff LK, Izquierdo JM, Cuezva JM. 1995. mt-mRNA stability regulates the expression of the mitochondrial genome during liver development. *Biochem Biophys Res Commun* 217(3):1094-8.
- Pagliarini DJ, Calvo SE, Chang B, Sheth SA, Vafai SB, Ong SE, Walford GA, Sugiana C, Boneh A, Chen WK and others. 2008. A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell* 134(1):112-23.
- Papadopoulou LC, Sue CM, Davidson MM, Tanji K, Nishino I, Sadlock JE, Krishna S, Walker W, Selby J, Glerum DM and others. 1999. Fatal infantile cardioencephalomyopathy with COX deficiency and mutations in SCO2, a COX assembly gene. *Nat Genet* 23(3):333-7.
- Parisi MA, Clayton DA. 1991. Similarity of human mitochondrial transcription factor 1 to high mobility group proteins. *Science* 252(5008):965-9.
- Potluri P, Davila A, Ruiz-Pesini E, Mishmar D, O'Hearn S, Hancock S, Simon M, Scheffler IE, Wallace DC, Procaccio V. 2009. A novel NDUFA1 mutation leads

- to a progressive mitochondrial complex I-specific neurodegenerative disease. *Mol Genet Metab* 96(4):189-95.
- Potluri P, Yadava N, Scheffler IE. 2004. The role of the ESSS protein in the assembly of a functional and stable mammalian mitochondrial complex I (NADH-ubiquinone oxidoreductase). *Eur J Biochem* 271(15):3265-73.
- Quinzii C, Naini A, Salviati L, Trevisson E, Navas P, Dimauro S, Hirano M. 2006. A mutation in para-hydroxybenzoate-polyprenyl transferase (COQ2) causes primary coenzyme Q10 deficiency. *Am J Hum Genet* 78(2):345-9.
- Ragan C. 1987. Structure of NADH-ubiquinone reductase (Complex I). *Current topics in bioenergetics*. p 1-36.
- Rahman S, Blok RB, Dahl HH, Danks DM, Kirby DM, Chow CW, Christodoulou J, Thorburn DR. 1996. Leigh syndrome: clinical features and biochemical and DNA abnormalities. *Ann Neurol* 39(3):343-51.
- Robinson BH. 1998. Human complex I deficiency: clinical spectrum and involvement of oxygen free radicals in the pathogenicity of the defect. *Biochim Biophys Acta* 1364(2):271-86.
- Ruiz De Mena I, Lefai E, Garesse R, Kaguni LS. 2000. Regulation of mitochondrial single-stranded DNA-binding protein gene expression links nuclear and mitochondrial DNA replication in drosophila. *J Biol Chem* 275(18):13628-36.
- Saada A, Edvardson S, Rapoport M, Shaag A, Amry K, Miller C, Lorberboum-Galski H, Elpeleg O. 2008. C6ORF66 is an assembly factor of mitochondrial complex I. *Am J Hum Genet* 82(1):32-8.
- Saada A, Shaag A, Elpeleg O. 2003. mtDNA depletion myopathy: elucidation of the tissue specificity in the mitochondrial thymidine kinase (TK2) deficiency. *Mol Genet Metab* 79(1):1-5.
- Saada A, Vogel RO, Hoefs SJ, van den Brand MA, Wessels HJ, Willems PH, Venselaar H, Shaag A, Barghuti F, Reish O and others. 2009. Mutations in NDUFAF3 (C3ORF60), encoding an NDUFAF4 (C6ORF66)-interacting complex I assembly protein, cause fatal neonatal mitochondrial disease. *Am J Hum Genet* 84(6):718-27.
- Sazanov LA, Peak-Chew SY, Fearnley IM, Walker JE. 2000. Resolution of the membrane domain of bovine complex I into subcomplexes: implications for the structural organization of the enzyme. *Biochemistry* 39(24):7229-35.
- Scarpulla RC. 1997. Nuclear control of respiratory chain expression in mammalian cells. *J Bioenerg Biomembr* 29(2):109-19.
- Schafer E, Seelert H, Reifschneider NH, Krause F, Dencher NA, Vonck J. 2006. Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem* 281(22):15370-5.
- Schagger H, de Coo R, Bauer MF, Hofmann S, Godinot C, Brandt U. 2004. Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I. *J Biol Chem* 279(35):36349-53.
- Schagger H, Pfeiffer K. 2000. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *Embo J* 19(8):1777-83.
- Scheffler IE, Yadava N, Potluri P. 2004. Molecular genetics of complex I-deficient Chinese hamster cell lines. *Biochim Biophys Acta* 1659(2-3):160-71.
- Schilling B, Aggeler R, Schulenberg B, Murray J, Row RH, Capaldi RA, Gibson BW. 2005. Mass spectrometric identification of a novel phosphorylation site in subunit NDUFA10 of bovine mitochondrial complex I. *FEBS Lett* 579(11):2485-90.

- Schuelke M, Smeitink J, Mariman E, Loeffen J, Plecko B, Trijbels F, Stockler-Ipsiroglu S, van den Heuvel L. 1999. Mutant NDUFV1 subunit of mitochondrial complex I causes leukodystrophy and myoclonic epilepsy. *Nat Genet* 21(3):260-1.
- Schulenberg B, Aggeler R, Beechem JM, Capaldi RA, Patton WF. 2003. Analysis of steady-state protein phosphorylation in mitochondria using a novel fluorescent phosphosensor dye. *J Biol Chem* 278(29):27251-5.
- Schwartz M, Vissing J. 2002. Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N Engl J Med* 347(8):576-80.
- Schwartz M, Vissing J. 2004. No evidence for paternal inheritance of mtDNA in patients with sporadic mtDNA mutations. *J Neurol Sci* 218(1-2):99-101.
- Servidei S. 1999. Mitochondrial encephalomyopathies: gene mutation. *Neuromuscul Disord* 9(6-7):IX-XIII.
- Shadel GS, Clayton DA. 1997. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu Rev Biochem* 66:409-35.
- Sharpley MS, Shannon RJ, Draghi F, Hirst J. 2006. Interactions between phospholipids and NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine mitochondria. *Biochemistry* 45(1):241-8.
- Singh G, Lott MT, Wallace DC. 1989. A mitochondrial DNA mutation as a cause of Leber's hereditary optic neuropathy. *N Engl J Med* 320(20):1300-5.
- Smeitink J, Sengers R, Trijbels F, van den Heuvel L. 2001a. Human NADH:ubiquinone oxidoreductase. *J Bioenerg Biomembr* 33(3):259-66.
- Smeitink J, van den Heuvel L, DiMauro S. 2001b. The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. *Nat Rev Genet* 2(5):342-52.
- Spelbrink JN, Li FY, Tiranti V, Nikali K, Yuan QP, Tariq M, Wanrooij S, Garrido N, Comi G, Morandi L and others. 2001. Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nat Genet* 28(3):223-31.
- Spinazzola A, Viscomi C, Fernandez-Vizarra E, Carrara F, D'Adamo P, Calvo S, Marsano RM, Donnini C, Weiher H, Strisciuglio P and others. 2006. MPV17 encodes an inner mitochondrial membrane protein and is mutated in infantile hepatic mitochondrial DNA depletion. *Nat Genet* 38(5):570-5.
- Stuart RA, Cyr DM, Craig EA, Neupert W. 1994. Mitochondrial molecular chaperones: their role in protein translocation. *Trends Biochem Sci* 19(2):87-92.
- Sugiana C, Pagliarini DJ, McKenzie M, Kirby DM, Salemi R, Abu-Amero KK, Dahl HH, Hutchison WM, Vascotto KA, Smith SM and others. 2008. Mutation of C20orf7 disrupts complex I assembly and causes lethal neonatal mitochondrial disease. *Am J Hum Genet* 83(4):468-78.
- Taanman JW. 1999. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta* 1410(2):103-23.
- Taylor RW, Taylor GA, Durham SE, Turnbull DM. 2001. The determination of complete human mitochondrial DNA sequences in single cells: implications for the study of somatic mitochondrial DNA point mutations. *Nucleic Acids Res* 29(15):E74-4.
- Thommes P, Farr CL, Marton RF, Kaguni LS, Cotterill S. 1995. Mitochondrial single-stranded DNA-binding protein from *Drosophila* embryos. Physical and biochemical characterization. *J Biol Chem* 270(36):21137-43.
- Tracy RL, Stern DB. 1995. Mitochondrial transcription initiation: promoter structures and RNA polymerases. *Curr Genet* 28(3):205-16.

- Triepels R, Smeitink J, Loeffen J, Smeets R, Buskens C, Trijbels F, van den Heuvel L. 1999a. The human nuclear-encoded acyl carrier subunit (NDUFAB1) of the mitochondrial complex I in human pathology. *J Inher Metab Dis* 22(2):163-73.
- Triepels RH, van den Heuvel LP, Loeffen JL, Buskens CA, Smeets RJ, Rubio Gozalbo ME, Budde SM, Mariman EC, Wijburg FA, Barth PG and others. 1999b. Leigh syndrome associated with a mutation in the NDUF57 (PSST) nuclear encoded subunit of complex I. *Ann Neurol* 45(6):787-90.
- Ugalde C, Janssen RJ, van den Heuvel LP, Smeitink JA, Nijtmans LG. 2004a. Differences in assembly or stability of complex I and other mitochondrial OXPHOS complexes in inherited complex I deficiency. *Hum Mol Genet* 13(6):659-67.
- Ugalde C, Vogel R, Huijbens R, Van Den Heuvel B, Smeitink J, Nijtmans L. 2004b. Human mitochondrial complex I assembles through the combination of evolutionary conserved modules: a framework to interpret complex I deficiencies. *Hum Mol Genet* 13(20):2461-72.
- van den Heuvel L, Ruitenbeek W, Smeets R, Gelman-Kohan Z, Elpeleg O, Loeffen J, Trijbels F, Mariman E, de Bruijn D, Smeitink J. 1998. Demonstration of a new pathogenic mutation in human complex I deficiency: a 5-bp duplication in the nuclear gene encoding the 18-kD (AQDQ) subunit. *Am J Hum Genet* 62(2):262-8.
- Van Goethem G, Dermaut B, Lofgren A, Martin JJ, Van Broeckhoven C. 2001. Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nat Genet* 28(3):211-2.
- Van Tuyle GC, Pavco PA. 1985. The rat liver mitochondrial DNA-protein complex: displaced single strands of replicative intermediates are protein coated. *J Cell Biol* 100(1):251-7.
- Videira A, Duarte M. 2002. From NADH to ubiquinone in *Neurospora* mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1555(1-3):187-91.
- Virbasius CA, Virbasius JV, Scarpulla RC. 1993. NRF-1, an activator involved in nuclear-mitochondrial interactions, utilizes a new DNA-binding domain conserved in a family of developmental regulators. *Genes Dev* 7(12A):2431-45.
- Virbasius JV, Scarpulla RC. 1991. Transcriptional activation through ETS domain binding sites in the cytochrome c oxidase subunit IV gene. *Mol Cell Biol* 11(11):5631-8.
- von Kleist-Retzow JC, Cormier-Daire V, de Lonlay P, Parfait B, Chretien D, Rustin P, Feingold J, Rotig A, Munnich A. 1998. A high rate (20%-30%) of parental consanguinity in cytochrome-oxidase deficiency. *Am J Hum Genet* 63(2):428-35.
- Vonck J, Schafer E. 2009. Supramolecular organization of protein complexes in the mitochondrial inner membrane. *Biochim Biophys Acta* 1793(1):117-24.
- Walker JE. 1995. Determination of the structures of respiratory enzyme complexes from mammalian mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1271(1):221-7.
- Weidner U, Geier S, Ptock A, Friedrich T, Leif H, Weiss H. 1993. The gene locus of the proton-translocating NADH: ubiquinone oxidoreductase in *Escherichia coli*. Organization of the 14 genes and relationship between the derived proteins and subunits of mitochondrial complex I. *J Mol Biol* 233(1):109-22.
- Williams RS. 1986. Mitochondrial gene expression in mammalian striated muscle. Evidence that variation in gene dosage is the major regulatory event. *J Biol Chem* 261(26):12390-4.

- Wittig I, Augstein P, Brown GK, Fujii T, Rotig A, Rustin P, Munnich A, Seibel P, Thorburn D, Wissinger B and others. 2001. Sequence variations in the NDUFA1 gene encoding a subunit of complex I of the respiratory chain. *J Inher Metab Dis* 24(1):15-27.
- Yadava N, Houchens T, Potluri P, Scheffler IE. 2004. Development and characterization of a conditional mitochondrial complex I assembly system. *J Biol Chem* 279(13):12406-13.
- Yadava N, Potluri P, Scheffler IE. 2008. Investigations of the potential effects of phosphorylation of the MWFE and ESSS subunits on complex I activity and assembly. *Int J Biochem Cell Biol* 40(3):447-60.
- Yadava N, Potluri P, Smith EN, Bisevac A, Scheffler IE. 2002. Species-specific and mutant MWFE proteins. Their effect on the assembly of a functional mammalian mitochondrial complex I. *J Biol Chem* 277(24):21221-30.
- Yadava N, Scheffler IE. 2004. Import and orientation of the MWFE protein in mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase. *Mitochondrion* 4(1):1-12.
- Yakubovskaya E, Chen Z, Carrodeguas JA, Kisker C, Bogenhagen DF. 2006. Functional human mitochondrial DNA polymerase gamma forms a heterotrimer. *J Biol Chem* 281(1):374-82.
- Yasukawa T, Yang MY, Jacobs HT, Holt IJ. 2005. A bidirectional origin of replication maps to the major noncoding region of human mitochondrial DNA. *Mol Cell* 18(6):651-62.
- Zeviani M, Carelli V. 2007. Mitochondrial disorders. *Curr Opin Neurol* 20(5):564-71.
- Zeviani M, Di Donato S. 2004. Mitochondrial disorders. *Brain* 127(Pt 10):2153-72.
- Zeviani M, Spinazzola A, Carelli V. 2003. Nuclear genes in mitochondrial disorders. *Curr Opin Genet Dev* 13(3):262-70.
- Zhu Z, Yao J, Johns T, Fu K, De Bie I, Macmillan C, Cuthbert AP, Newbold RF, Wang J, Chevrette M and others. 1998. SURF1, encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome c oxidase, is mutated in Leigh syndrome. *Nat Genet* 20(4):337-43.
- Zhuchenko O, Wehnert M, Bailey J, Sun ZS, Lee CC. 1996. Isolation, mapping, and genomic structure of an X-linked gene for a subunit of human mitochondrial complex I. *Genomics* 37(3):281-8.

ANEXO

X-Linked *NDUFA1* Gene Mutations Associated with Mitochondrial Encephalomyopathy

Daniel Fernandez-Moreira, PharmB,¹ Cristina Ugalde, PhD,¹ Roel Smeets,² Richard J. T. Rodenburg, PhD,² Eduardo Lopez-Laso, MD,³ Maria L. Ruiz-Falco, MD,⁴ Paz Briones, PhD,⁵ Miguel A. Martin, PhD,¹ Jan A. M. Smeitink, MD, PhD,² and Joaquín Arenas, PhD¹

Objective: Mitochondrial complex I deficiency is the commonest diagnosed respiratory chain defect, being genetically heterogeneous.

The male preponderance of previous patient cohorts suggested an X-linked underlying genetic defect. We investigated mutations in the X-chromosomal complex I structural genes, *NDUFA1* and *NDUFB11*, as a novel cause of mitochondrial encephalomyopathy.

Methods: We sequenced 12 nuclear genes and the mitochondrial DNA-encoded complex I genes in 26 patients with respiratory chain complex I defect. Novel mutations were confirmed by polymerase chain reaction restriction length polymorphism. Assembly/stability studies in fibroblasts were performed using two-dimensional blue native gel electrophoresis.

Results: Two novel p.Gly8Arg and p.Arg37Ser hemizygous mutations in *NDUFA1* were identified in two unrelated male patients presenting with Leigh's syndrome and with myoclonic epilepsy and developmental delay, respectively. Two-dimensional blue native gel electrophoresis showed decreased levels of intact complex I with no accumulation of lower molecular weight subcomplexes, indicating that assembly, stability, or both are compromised.

Interpretation: Mutations in the X-linked *NDUFA1* gene result in complex I defect and encephalomyopathy. Assembly/stability analysis might give an explanation for the different clinical phenotypes and become useful for future diagnostic purposes.

Ann Neurol 2007;61:73–83