

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	25
INTRODUCCIÓN	29
1. La mitocondria	31
1.1. Estructura, número y distribución de las mitocondrias en células y tejidos.....	32
1.2. Función mitocondrial.....	33
2. Estructura y metabolismo del ADN mitocondrial	35
2.1. Genoma mitocondrial.....	35
2.2. Replicación del ADN mitocondrial.....	36
2.2.1. mtSSB.....	37
2.2.2. Helicasa mitocondrial.....	37
2.2.3. PolG.....	38
2.3. Transcripción del ADNmt.....	39
2.4. Traducción del ADNmt.....	40
3. Enfermedades del sistema de fosforilación oxidativa: Patología mitocondrial	40
3.1. Mutaciones en el ADNmt	41
3.1.1. Genética mitocondrial	41
3.1.1.1. Homoplasmia y heteroplasmia	41
3.1.1.2. Herencia del ADNmt.....	42
3.1.1.3. Transmisión del ADNmt.....	42
3.1.1.4. Segregación mitótica	42
3.1.2. Tipos de mutaciones en el ADNmt	43
3.1.2.1. Deleciones en el ADNmt	43
3.1.2.2. Mutaciones puntuales en el ADNmt	43
3.1.2.3. Mecanismos patogénicos.....	44
3.2. Mutaciones en el ADN nuclear.....	44
3.2.1. Mutaciones en subunidades estructurales de los complejos de la cadena respiratoria.....	45
3.2.2. Mutaciones en proteínas accesorias	45
3.2.3. Mutaciones en proteínas implicadas en el mantenimiento y replicación del ADNmt	46
3.2.4. Mutaciones en genes que alteran de un modo indirecto la función OXPHOS.....	47
3.3. Mitocondria y enfermedades neurodegenerativas.....	47
3.3.1. Enfermedad de Parkinson	48
3.3.2. Enfermedad de Alzheimer	48

3.3.3. Esclerosis lateral amiotrófica (ELA).....	48
3.3.4. Enfermedad de Huntington.....	48
3.4. Modelos animales y celulares en el estudio de las enfermedades mitocondriales.....	49
OBJETIVOS	51
MATERIALES Y MÉTODOS	55
1. Materiales	57
1.1. Reactivos, soluciones y tampones.....	57
1.2. Líneas celulares.....	57
1.3. Oligonucleótidos.....	57
1.3.1. Oligonucleótidos usados en la secuenciación del gen <i>POLG</i>	57
1.3.2. Oligonucleótidos usados en la caracterización de mutaciones en el ARN ^{tLys}	58
1.3.3. Oligonucleótidos usados en la cuantificación del ADN mitocondrial mediante PCR cuantitativa.....	58
1.3.4. Oligonucleótidos usados en la generación de sondas para Southern Blot.....	59
1.4. Anticuerpos.....	59
2. Pacientes	59
2.1. Muestras biológicas.....	60
3. Métodos	60
3.1. Aislamiento de ADN total de células.....	60
3.2. Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa.....	60
3.3. Secuenciación de ácidos nucleicos y análisis de secuencias.....	60
3.4. Detección de mutaciones por PCR-RFLP.....	61
3.4.1. Detección de la mutación M603L en el gen <i>POLG</i>	61
3.4.2. Detección de la mutación R853W en el gen <i>POLG</i>	61
3.4.3. Detección de la mutación R1146C en el gen <i>POLG</i>	61
3.4.4. Detección de la mutación D1184N en el gen <i>POLG</i>	62
3.4.5. Detección de la mutación A8296G del ADNmt.....	62
3.4.6. Detección de la mutación G8363A del ADNmt.....	63
3.4.7. Detección de la mutación A8347G del ADNmt.....	63
3.5. Marcaje de sondas.....	63
3.6. Hibridación de ADN unido a membrana (Southern blot).....	64
3.7. Aislamiento de proteínas totales de células en cultivo.....	64
3.8. Inmunodetección de proteínas unidas a membrana (Western blot).....	64

3.9. Generación de cíbridos transmitocondriales.....	65
3.10. Cultivos celulares.....	66
3.11. Determinación de la actividad enzimática de los complejos de la cadena respiratoria.....	66
3.12. Medida de la actividad citrato sintasa.....	67
3.13. Consumo mitocondrial de oxígeno.....	67
3.14. Medida de la síntesis de ATP mitocondrial en células.....	68
3.15. Medida del potencial de membrana (Ψ_m).....	68
3.16. Medida de la producción de lactato.....	68
3.17. Medida de la masa mitocondrial.....	69
3.18. Medida de la producción de anión superóxido.....	69
3.19. Medida de la producción de especies reactivas de oxígeno.....	69
3.20. Medida de la actividad enzimática de la glutatión peroxidasa.....	69
3.21. Cuantificación relativa del ADNmt mediante PCR cuantitativa a tiempo real.....	70
RESULTADOS.....	71
1. Estudio del gen <i>POLG</i> en pacientes con deleciones múltiples del ADN mitocondrial....	73
1.1. Paciente 1.....	73
1.2. Paciente 2.....	75
1.3. Paciente 3.....	76
1.4. Paciente 4.....	78
1.5. Paciente 5.....	79
1.6. Paciente 6.....	80
2. Caracterización de las mutaciones A8347G y A8296G del gen <i>ARNt^{Lys}</i> mitocondrial ..	83
2.1. Caracterización de la mutación A8347G del ARNt ^{Lys} mitocondrial.....	85
2.1.1. Generación de cíbridos portadores de la mutación A8347G en homoplasmia.....	85
2.1.2. Medida de la masa mitocondrial.....	86
2.1.3. Cuantificación del ADNmt en las diferentes líneas celulares.....	87
2.1.4. Estudio de las actividades de los complejos de la cadena respiratoria.....	88
2.1.5. Estudio funcional de la actividad OXPHOS.....	89
2.1.6. Medida de la producción de lactato y niveles de PDK-1.....	89
2.1.7. Medida de la producción de especies reactivas de oxígeno.....	91
2.2. Estudio de la influencia del haplotipo mitocondrial sobre la expresión de la mutación A8296G del ARNt ^{Lys} mitocondrial.....	92
2.2.1. Generación de cíbridos portadores de los haplotipos A8296G/L1c y A8296G/B.....	93
2.2.2. Medida de la masa mitocondrial.....	93

2.2.3. Cuantificación del ADNmt en las líneas celulares	94
2.2.4. Estudio de las actividades de los complejos de la cadena respiratoria.....	95
2.2.5. Estudio funcional de la actividad OXPHOS	96
2.2.6. Medida de la producción de lactato	96
2.2.7. Medida de la producción de especies reactivas de oxígeno	97
2.3. Estudio de la influencia del fondo nuclear sobre la expresión de la mutación A8296G del ARNt ^{Lys} mitocondrial.....	99
2.3.1. Medida de la masa mitocondrial y cuantificación del ADNmt en las líneas celulares	99
2.3.2. Estudio funcional de la actividad OXPHOS	100
2.3.3. Estudio de las actividades de los complejos de la cadena respiratoria.....	100
DISCUSIÓN.....	103
1. Las mutaciones en el gen <i>POLG</i> provocan defectos en la replicación del mtDNA y presentaciones clínicas muy heterogéneas.	105
1.1. Mutación R853W	107
1.2. Mutaciones P587L y T251I	107
1.3. Mutación M603L.....	108
1.4. Mutaciones N468D y D1184N.....	109
1.5. Mutación G268A	109
1.6. Mutación R1146C	110
1.7. Mutación A467T	110
2. Importancia de la caracterización del fenotipo metabólico de las mutaciones en el ADNmt mediante el uso de híbridos transmitocondriales.	112
2.1. La mutación A8347G produce un claro defecto en la función OXPHOS.....	113
2.2. Existen diferencias en el fenotipo bioquímico que expresan las mutaciones A8347G y G8363A del gen <i>mtRNA^{Lys}</i>	114
2.3. La mutación A8296G del gen <i>mtRNA^{Lys}</i> mitocondrial no produce defectos en el sistema OXPHOS.....	116
CONCLUSIONES.....	119
BIBLIOGRAFÍA	123
ANEXOS.....	135

ABREVIATURAS

ADNmt	ADN mitocondrial
ADNn	ADN nuclear
adPEO	Oftalmoplejía externa progresiva de herencia autosómica dominante
arPEO	Oftalmoplejía externa progresiva de herencia autosómica recesiva
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosómico
ARNt	ARN de transferencia
BrdU	5'-bromo-2'-deoxiuridina
BSA	Albumina de suero bovino
CCCP	Carbonilcianida-3-clorofenilhidrazona
Células ρ^0	Células que carecen de ADNmt
Citb	Citocromo b
CO, COX	Citocromo C oxidasa
CPEO	Oftalmoplejía externa progresiva crónica
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
Drp	dynamamin-related protein
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica
FBS	Suero fetal bovino
GAM	Goat anti-mouse antibody, anticuerpo de cabra anti-ratón
GAR	Goat anti-rabbit antibody, anticuerpo de cabra anti-conejo
HSP	Promotor de la cadena pesada del ADN mitocondrial
JC-1	1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina
LHON	Neuropatía óptica hereditaria de Leber
LS	Síndrome de Leigh
LSP	Promotor de la cadena ligera del ADN mitocondrial
Mfn	Mitofusina
MELAS	Miopatía, Encefalopatía, Acidosis Láctica y accidentes cerebrovasculares
MEM	Medio mínimo esencial
MERRF	Epilepsia mioclónica y fibras rojas rasgadas
MILS	Síndrome de Leigh heredado por vía materna
MNGIE	Síndrome de encefalopatía neurogastrointestinal mitocondrial
mtSSB	Proteína de unión a cadena sencilla mitocondrial
NAO	Naranja de 10-nonil acridina
NARP	Neuropatía, Ataxia y Retinitis Pigmentosa

ND	NADH deshidrogenasa
O _H	Origen de replicación de la cadena pesada
O _L	Origen de replicación de la cadena ligera
OPA1	Gen 1 de la atrofia óptica
OXPHOS	Fosforilación oxidativa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDK	Piruvato deshidrogenasa quinasa
PoIG	ADN polimerasa gamma
RFLP	Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RRF	Fibras rojas rasgadas
SAM	Maquinaria de clasificación y ensamblaje mitocondrial
SDH	Succinato deshidrogenasa
SOD	Superóxido dismutasa
TFAM/mtTFA	Factor de transcripción mitocondrial A
TIM	Translocasa de la membrana mitocondrial interna
TOM	Translocasa de la membrana mitocondrial externa
TP	Timidina fosforilasa
UCP	Proteína desacoplante
WT	Wild-Type. Versión silvestre .
Ψ _m	Potencial de membrana mitocondrial

1. La mitocondria

La composición química de la atmósfera ha variado a lo largo de las diferentes eras geológicas. A partir de la aparición de los primeros organismos con fotosíntesis oxigénica, hace unos 2.000 millones de años, se produjo una disminución del CO₂ y un aumento del O₂, que pasó del 1% al 15% en un periodo aproximado de 200 millones de años (Kurland and Andersson 2000)

En este nuevo escenario, aquellos organismos capaces de evitar los efectos tóxicos del O₂, presentaban una clara ventaja evolutiva. Uno de esos organismos fue el resultado de la endosimbiosis entre una α -proteobacteria, con un metabolismo aerobio, y un organismo huésped anaerobio, posiblemente una célula proeucariota (Kurland and Andersson 2000). Según el modelo Ox-Tox en dicha relación la proteobacteria actuaba retirando el oxígeno del citosol del huésped, que evitaba así sus efectos tóxicos, mientras que éste suministraba nutrientes como lípidos, glicerol o aminoácidos a la proteobacteria (Gabaldon and Huynen 2003) .

La teoría endosimbiótica postulada en los años 70 por F. Taylor y L. Margulis, hoy en día ampliamente aceptada, sitúa el origen de la mitocondria en este fenómeno de endosimbiosis (Margulis 1975). Es aceptado por los distintos autores que dicho evento ocurrió una sola vez a lo largo de la evolución, y por lo tanto se admite un origen único y común del conjunto de mitocondrias presentes en los distintos organismos eucariotas (Scheffler 2001).

La colaboración inicial dio lugar a lo que algunos autores han definido como secuestro de la protomitocondria por parte de la célula huésped. Esta primera fue especializándose paulatinamente en metabolismo energético, perdiendo la mayor parte de su proteoma original que fue sustituido por proteínas procedentes del huésped (Gabaldon and Huynen 2007). Algunos autores sitúan el paso de endosimbionte a orgánulo en el momento en que la proteobacteria adquirió la capacidad de intercambiar ADP y ATP con el citosol de la célula huésped, integrándose en el metabolismo celular (Kurland and Andersson 2000). Es en este pasado como organismo autónomo donde reside la explicación de algunas de las características más llamativas de la mitocondria, entre ellas el hecho de que posea su propio genoma.

Inicialmente, el genoma bacteriano de la protomitocondria contenía todos los genes necesarios para la vida como organismo autónomo. Sin embargo, a lo largo de la evolución muchos de estos genes fueron transferidos al ADN nuclear (ADNn) de tal manera que el ADN de la mitocondria (ADNmt) actual solo retiene un reducido número de los genes del genoma original de la proteobacteria, 37 en la inmensa mayoría de los animales. El resto de los aproximadamente 1500 genes que dan lugar al proteoma mitocondrial están codificados en el núcleo, son traducidos por ribosomas citoplásmicos y transportados a la mitocondria a través de diversos sistemas de importe de proteínas (Wallace 2005). Dado que el genoma mitocondrial posee una capacidad codificante limitada y que necesita coordinarse con el genoma nuclear para su correcta funcionalidad (Garesse and Vallejo 2001) se considera a la mitocondria como un orgánulo semiautónomo.

La mitocondria se encuentra presente en prácticamente todas las células eucariotas y en su interior tienen lugar un gran número de procesos metabólicos esenciales, que incluyen entre otros la oxidación de ácidos grasos, el ciclo de Krebs, y algunas etapas de la biosíntesis de aminoácidos y del grupo hemo. En particular, y debido a su importancia, se ha considerado que la función fundamental de la mitocondria es la de generar energía química en forma de ATP mediante la combustión de los nutrientes obtenidos de la dieta, un proceso conocido como fosforilación oxidativa. Esta visión metabólica es parcial y ha cambiado radicalmente en los últimos 15 años al identificarse varios procesos celulares en los que la mitocondria desempeña un papel central, fundamentalmente la muerte celular programada (apoptosis) (Green 2005), y la señalización intracelular mediada por calcio (Bianchi et al. 2004) y especies reactivas de oxígeno (ROS) (Turrens 2003).

1.1. Estructura, número y distribución de las mitocondrias en células y tejidos

La actividad mitocondrial presenta una gran plasticidad que se traduce en las diferencias en la estructura, número y distribución de las mitocondrias en las distintas células de un organismo, de tal modo que existe una enorme diversidad de mitocondrias estructural y funcionalmente diferentes en función de la demanda energética de los diferentes tejidos.

La mitocondria posee una doble membrana que delimita dos compartimentos en su interior: el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial. La membrana mitocondrial externa, que separa el espacio intermembrana del citoplasma, es fácilmente permeable a pequeñas moléculas e iones, mientras que la membrana mitocondrial interna es mucho menos permeable, necesitando de la presencia de numerosos transportadores específicos (Arco and Satrustegui 2005). En la membrana mitocondrial interna se encuentra insertada la cadena de transporte electrónico y es, por tanto, el lugar físico donde se produce la fosforilación oxidativa y por lo tanto la síntesis de ATP mitocondrial.

En la doble membrana mitocondrial se localiza la maquinaria de importe de proteínas de la mitocondria. Está compuesta por una serie de complejos responsables del transporte al interior de la mitocondria y procesamiento de las proteínas de destino mitocondrial sintetizadas en el citoplasma. Prácticamente todas las proteínas mitocondriales de origen nuclear entran en la mitocondria a través de la translocasa de la membrana externa mitocondrial (TOM), para posteriormente y en función de su destino final pasar a la maquinaria de clasificación y ensamblaje (SAM), responsable del procesamiento de las proteínas de la membrana externa, o a las translocasas de la membrana interna mitocondrial (TIM22 y TIM23) (N. Wiedemann et al. 2004).

La membrana mitocondrial interna presenta invaginaciones lamelares, denominadas crestas, que incrementan en gran medida la superficie de la misma y aumentan su capacidad funcional. Aunque el número de mitocondrias por célula es constante para cada tipo celular, oscilando entre 10^2 - 10^5 , la densidad de las crestas es variable, dependiendo principalmente de la demanda energética. (Scheffler 1999).

Tradicionalmente se ha considerado a la mitocondria como un orgánulo discreto, de forma esférica o alargada, y con unas dimensiones que normalmente están en torno a 3-4µm de largo y 1µm de diámetro. Sin embargo, la morfología mitocondrial dista en numerosos casos de esta visión de la mitocondria como organelas individuales, acercándose más a un sistema reticular donde las mitocondrias interaccionan entre sí mediante un proceso dinámico que implica eventos continuos de fusión y fisión mitocondrial (D. C. Chan 2006). El proceso de fusión mitocondrial no solo implica la fusión coordinada de las membranas externas e internas, sino también la mezcla de los contenidos de la matriz mitocondrial. En estos procesos están implicadas proteínas como las mitofusinas Mfn1 y Mfn2 y las dinaminas OPA1 en el caso de la fusión, y Drp1 en el de la fisión (H. Chen and Chan 2005). Así pues, la morfología mitocondrial es un parámetro altamente dinámico que puede ser regulado ajustando el balance entre los fenómenos de fusión y fisión mitocondrial, en función de las necesidades de la célula y que se ha demostrado esencial en el desarrollo en mamíferos (Detmer and Chan 2007). Un ejemplo de esta relación entre la morfología y función es la concentración de las mitocondrias en los urópodos de los linfocitos activados, fenómeno que requiere la activación del proceso de fisión mitocondrial (Campello et al. 2006).

1.2. Función mitocondrial

Como se ha comentado previamente, la mitocondria es la principal productora de energía celular en forma de ATP. En ella tiene lugar el proceso de fosforilación oxidativa mediante el cual los coenzimas reducidos $\text{NADH} + \text{H}^+$ y FADH_2 , procedentes del catabolismo de los nutrientes celulares, se oxidan y ceden sus electrones a la cadena de transporte electrónico y finalmente al O_2 . La transferencia de electrones de unos transportadores a otros, que se realiza de forma secuencial a favor de potencial oxidorreductor, está acoplada al bombeo de H^+ desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana. El gradiente electroquímico que se establece se manifiesta como un gradiente de pH y una diferencia de potencial a través de la membrana mitocondrial interna. La energía generada por la disipación del gradiente de H^+ a través de la ATP-sintasa es utilizada para fosforilar el ADP, con la consiguiente formación de ATP. Esta reacción es reversible y la ATP-sintasa puede mantener el gradiente de H^+ a expensas de la hidrólisis de ATP (Scheffler 1999).

El correcto funcionamiento del sistema OXPHOS requiere la acción coordinada de una serie de complejos enzimáticos multiheteroméricos localizados en la membrana interna mitocondrial. Estos incluyen los complejos I, III, y IV, responsables de la translocación de los protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana, la ATP sintasa, o complejo V y una serie de complejos accesorios que suministran electrones a la coenzima Q (ubiquinona) que incluyen el complejo II (succinato-ubiquinona oxidoreductasa), la flavoproteína-ubiquinona oxidoreductasa y la dihidroorotato deshidrogenasa (Figura 1) (Smeitink et al. 2006).

Algunos procesos de transporte en la membrana mitocondrial son dependientes del gradiente electroquímico generado por el sistema OXPHOS, e incluyen el transporte no solo de metabolitos sino también de iones inorgánicos como fosfato, sodio, potasio o calcio.

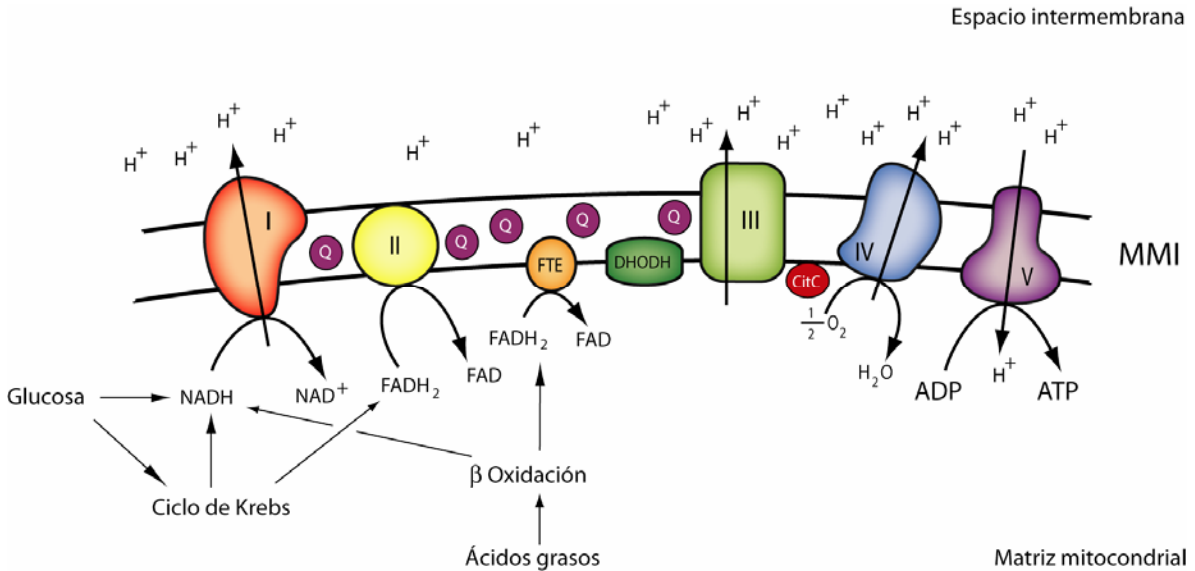


Figura 1. En esta figura se representa el sistema OXPHOS a través del cual los coenzimas reducidos provenientes del catabolismo de los nutrientes celulares, se oxidan y ceden sus electrones a la cadena de transporte electrónico y finalmente al O_2 . El gradiente de protones generado se transforma en energía química que es utilizada por el complejo V, ATP sintasa, para la producción de ATP. FTE: flavoproteína-ubiquinona oxidoreductasa, DHODH: dihidroorotato deshidrogenasa, CitC: Citocromo C, Q: Ubiquinona.

El sistema OXPHOS también juega un papel crucial en el mantenimiento de los balances (equilibrios) redox, ácido-base y metabólico de la célula, y por extensión en los compartimentos extracelulares (Smeitink et al. 2006). Además, el potencial electroquímico generado por el sistema OXPHOS está implicado en el proceso de termogénesis que tiene lugar en el tejido adiposo marrón. Mediante la acción de la proteína desacoplante 1 (UCP1), la energía química generada por el gradiente de protones se disipa en forma de calor (Cannon and Nedergaard 2004). Existen otras proteínas desacoplantes (UCP2 y UCP3) implicadas en la regulación de la producción de ROS como mecanismo de protección ante el estrés oxidativo, así como en la regulación de secreción de insulina por parte de las células β del páncreas (Brand and Esteves 2005).

2. Estructura y metabolismo del ADN mitocondrial

2.1. Genoma mitocondrial

Aunque han pasado más de cuatro décadas desde el descubrimiento del ADNmt (Nass and Nass 1963) y actualmente se ha secuenciado completamente el ADNmt de cientos de especies diferentes, aún se desconocen muchos aspectos sobre los mecanismos implicados en regular su replicación y expresión.

Cada mitocondria contiene su propio genoma en un número de copias que oscila entre uno y diez. El ADNmt es una molécula circular de doble cadena que se encuentra formando parte de complejos nucleoproteicos asociados a la membrana mitocondrial interna denominados, por analogía a los cromosomas bacterianos, nucleoides (Bogehagen et al. 2003). Dichos nucleoides se consideran la unidad de transmisión y herencia del ADNmt. En humanos se han descrito 27 proteínas presentes en los nucleoides junto al ADNmt. De éstas, 11 están directamente implicadas en el metabolismo del ADNmt como la ADN polimerasa mitocondrial γ , una proteína con actividad 5'-3'ADN helicasa (Twinkle), la proteína de unión a cadena sencilla (mtSSB), o el factor de transcripción mitocondrial A (TFAM) (Wang and Bogehagen 2006). Estudios realizados en levadura sobre los mecanismos que controlan la segregación de los nucleoides apuntan a la existencia de una maquinaria dedicada a coordinar dicha segregación con la dinámica mitocondrial y la división celular (X. J. Chen and Butow 2005).

En humanos, la molécula de ADNmt tiene un tamaño de 16549 pares de bases y su secuencia completa fue publicada en 1981 (Anderson et al. 1981). Su capacidad codificante es muy limitada puesto que codifica exclusivamente 37 genes: 13 polipéptidos que forman parte de complejos OXPHOS, 2 ARN ribosómicos (ARNr 12S y 16S) y 22 ARN de transferencia (ARNt). Las trece proteínas codificadas en el genoma mitocondrial son subunidades estructurales de los complejos del sistema OXPHOS: 7 subunidades (ND1, ND2, ND3, ND4L, ND4, ND5 y ND6) de las 46 que forman el complejo I (NADH deshidrogenasa), una (citocromo b, Citb) de las 11 del complejo III (complejo bc₁), tres (COI, COII, COIII) de las 13 del complejo IV (citocromo C oxidasa) y dos (ATP6 y ATP8) de las 16 proteínas que forman el complejo V (ATP sintasa) (Figura 2).

En mamíferos, la composición de nucleótidos de las dos cadenas del ADNmt es diferente: una de ellas es rica en residuos de guanina y timina y se denomina cadena pesada (H), mientras que la otra se denomina cadena ligera (L). Algunas de las características del ADNmt se pueden considerar consecuencias evolutivas de su pasado. Así, los genes estructurales del ADNmt no poseen ni 5' ni 3' UTR; no contiene intrones, y los espacios intergénicos son mínimos, llegando en algunos casos a solapar entre ellos. En la única región no codificante, que se denomina D-loop en mamíferos, se localizan el origen de replicación de la cadena pesada (O_H) y los promotores a partir de los cuales se inicia la transcripción mitocondrial (LSP y HSP).

modelo de replicación asimétrica y asincrónica propuesto por D.A. Clayton (Clayton 1982). En dicho modelo, la replicación comienza en el origen de replicación de la cadena pesada O_H , localizado en la región del D-loop. Cuando el bucle de desplazamiento originado llega al origen de replicación de la cadena ligera O_L , situado a 2/3 del genoma del O_H , comienza la replicación de esta cadena en sentido opuesto. Ambas cadenas se sintetizan de manera continua. Recientemente se ha propuesto por I. Holt y H. Jacobs un modelo alternativo de replicación (Holt et al. 2000). En este modelo, la replicación del ADNmt ocurriría de manera simétrica y simultánea en ambas cadenas, desde múltiples orígenes situados en una región amplia cercana al O_H (Bowmaker et al. 2003). Este modelo ha sido propuesto a partir del estudio de los intermediarios de replicación mediante electroforesis de dos dimensiones en geles de agarosa y del patrón de ribosustitución del ADNmt (Yang et al. 2002). Actualmente no existen evidencias experimentales suficientes que permitan descartar ninguno de los dos modelos, existiendo una gran controversia entre los defensores de ambos (Bogehagen and Clayton 2003b, 2003a; Holt and Jacobs 2003)

Independientemente del mecanismo, el estudio de la maquinaria implicada en la replicación del ADNmt se ha centrado en cuatro proteínas: las dos subunidades que forman parte de la ADN polimerasa mitocondrial o polimerasa γ (Poly o PolG), una helicasa (Twinkle) y la proteína de unión a ADN de cadena sencilla (mtSSB). Recientemente se ha reconstituido *in vitro* el replisoma mínimo necesario para la replicación del ADNmt en mamíferos, con sólo dos componentes: la ADN polimerasa γ y la helicasa twinkle (Korhonen et al. 2004). A su vez, la presencia de mtSSB incrementa la procesividad hasta niveles similares a los observados *in vivo*. Por tanto, la unidad replicativa mínima consta de estos tres factores esenciales: mtSSB, la helicasa mitocondrial y PolG.

2.2.1. mtSSB

Las proteínas de unión a ADN de cadena sencilla (SSB) juegan un papel fundamental en la replicación, reparación y recombinación del ADN. La SSB mitocondrial tiene un tamaño que varía entre 13 y 15 kDa y en solución acuosa forma un tetrámero. Su estructura cristalina muestra semejanzas con la SSB de *E. coli*. Se ha propuesto un modelo según el cual el ADN de cadena sencilla se estabilizaría al enrollarse sobre los canales cargados positivamente que se forman en la estructura del tetrámero (Kaguni 2004). Esto provoca un aumento de la desestabilización de la hélice por parte de la helicasa y estimula la actividad ADN polimerasa, aumentando tanto la procesividad como la fidelidad de la polimerización.

2.2.2. Helicasa mitocondrial

La función de la helicasa es producir la ruptura de los enlaces de hidrógeno que mantienen apareadas las dos cadenas de la molécula de ADNmt permitiendo la acción de la ADN polimerasa. El gen que codifica la helicasa mitocondrial humana, *C10orf2*, se identificó en pacientes con oftalmoplejía externa progresiva y deleciones múltiples del ADNmt (Spelbrink et al. 2001). *C10orf2*

codifica una proteína similar a la helicasa-primasa del bacteriofago T7, presentando los 5 motivos helicasa de la proteína del fago, pero sin los motivos primasa.

2.2.3. PolG

En contraste con la especialización funcional que se observa en las ADN polimerasas nucleares, la polimerasa γ es la única enzima responsable de la síntesis de ADN en procesos de replicación, reparación y recombinación en la mitocondria.

La polimerasa γ fue identificada a principio de los años 70 como una ADN polimerasa dependiente de ARN en células HeLa humanas (Fridlender et al. 1972), y fue posteriormente reconocida como la ADN polimerasa mitocondrial (Bolden et al. 1977). Pertenece a la familia A de las polimerasas, de la que es prototipo la ADN polimerasa I de *Escherichia coli* y a la que pertenecen, entre otras, la ADN polimerasa del bacteriófago T7. Con esta última comparte la característica de estar formada por una subunidad catalítica y una accesoria. Esta asociación confiere una gran eficacia replicativa a una enzima cuya subunidad catalítica está más relacionada estructuralmente con enzimas implicadas en funciones de reparación del ADN (Kaguni 2004). La mayor parte de las polimerasas γ animales están compuestas por una subunidad catalítica, con un tamaño de 120-140 kDa que contiene la actividad polimerasa y 3'-5' exonucleasa (correctora de errores), y una subunidad accesoria, con un tamaño de 35-40 kDa, que confiere procesividad a la enzima y aumenta su eficacia catalítica.

En humanos, la enzima es un heterotrímero formado por una subunidad catalítica (p140, codificada por el gen *POLG*, localizado en el cromosoma 15q25) y dos subunidades accesorias idénticas (p55, codificada por el gen *POLG2*, localizado en el cromosoma 17q) que dimerizan entre sí (Yakubovskaya et al. 2006). La polimerasa γ posee una alta fidelidad ($<2 \times 10^{-6}$ errores por nucleótido) y es relativamente precisa al replicar secuencias con repeticiones cortas. Esta alta fidelidad es en parte responsabilidad de la presencia de una actividad 3'-5' exonucleasa, o correctora de errores, en la subunidad catalítica. Además de las actividades polimerasa y exonucleasa, la subunidad p140 posee una actividad 5' desoxirribosa fosfato liasa (Longley et al. 1998).

La subunidad catalítica posee diversos motivos conservados en las diferentes especies y compartidos con las polimerasas de la familia A. Seis de estos motivos están agrupados en dos dominios que definen las dos actividades principales de la subunidad. Por una parte los motivos I, II y III se localizan en el dominio polimerasa de la proteína mientras que los motivos A, B y C lo hacen en el dominio exonucleasa. Además existen otros seis motivos conservados en las polimerasas γ , cuatro de ellos en la región comprendida entre los dominios polimerasa y exonucleasa, o región espaciadora (Figura 3) (Kaguni 2004).

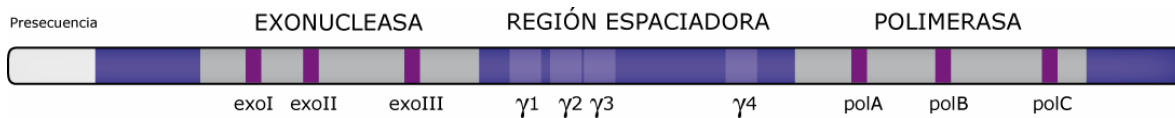


Figura 3. Localización de los diferentes dominios dentro de la proteína PolG. Se señalan los tres motivos conservados en el dominio exonucleasa (exo I, exo II y exo III), los cuatro motivos conservados en la región espaciadora (γ^1 , γ^2 , γ^3 y γ^4) y los tres motivos del dominio polimerasa (polA, polB, y polC)

La subunidad accesoria es un factor de unión a ADN que confiere procesividad a la enzima aumentando la afinidad del trímero por el ADN molde (Lim et al. 1999). Esta subunidad presenta similitudes estructurales y de secuencia con las aminoacil-tRNA sintetasas de la clase IIa presentes en procariontes y se ha sugerido que podría participar en el reconocimiento del cebador de ARN necesario para el inicio de la replicación del ADNmt.

Otros posibles componentes del replisoma mitocondrial incluyen la RNasa H1, que ha sido localizada en la mitocondria y podría estar implicada en el procesamiento de los fragmentos de Okazaki en el modelo simétrico de replicación, la topoisomerasa mitocondrial I (TOPOImt), la topoisomerasa III α (hTOP3 α) y la ADN ligasa III (Hudson and Chinnery 2006).

2.3. Transcripción del ADNmt

A diferencia del genoma nuclear, que se transcribe fundamentalmente por tres ARN polimerasas multiméricas y del bacteriano, que se transcribe por un complejo multiproteico de 6 subunidades, el ADNmt se transcribe por una única ARN-polimerasa monomérica, relacionada evolutivamente con las polimerasas de los bacteriófagos T3 y T7. Los promotores de la transcripción mitocondrial están localizados en la región de control del ADNmt y se denominan LSP, el de la cadena ligera, y HSP1 y HSP2 los de la cadena pesada (Bonawitz et al. 2006). La transcripción del genoma mitocondrial genera un único transcrito policistrónico de cada una de las cadenas de la molécula de ADNmt, además de un transcrito de menor tamaño que codifica los dos ARN ribosómicos. La maduración de los transcritos primarios policistrónicos es un proceso que requiere pocas enzimas y que se realiza de acuerdo con el modelo de puntuación por ARNs de transferencia (Montoya et al. 1981). Según este modelo, la estructura secundaria que adoptan los ARNt en los ARN policistrónicos marca los sitios de procesamiento. Tras el corte endonucleolítico realizado por ARNasas mitocondriales, como la ARNasa tipo P, se generan las moléculas individuales de ARNm, ARNr y ARNt. En mamíferos, el inicio de la transcripción a partir de los promotores mitocondriales requiere la presencia simultánea de la ARN-polimerasa mitocondrial, del factor de transcripción mitocondrial A (Tfam o mtTFA) y, alternativamente, del factor de transcripción mitocondrial B1 o B2 (mtTFB1 y mtTFB2) (Gaspari et al. 2004).

2.4. Traducción del ADNmt

Al contrario que la replicación y transcripción del ADNmt, la traducción mitocondrial es un proceso poco conocido. La función de la maquinaria de traducción mitocondrial, similar a la encontrada en procariontes, es la síntesis de los trece polipéptidos codificados por el genoma mitocondrial y que forman parte del sistema OXPHOS. Este proceso requiere, además de los ARNt codificados en el ADNmt, la acción concertada de factores de traducción y ribosomas mitocondriales. En mamíferos, han sido clonados y secuenciados dos factores de iniciación, IF2 e IF3; cuatro de elongación, EFTu, EFTs, EFG1 y EFG2 (Sprengel et al. 2004); un factor de liberación, RF1; y un factor de reciclado ribosomal, RRF (Zhang and Sprengel 1998). Los ribosomas mitocondriales presentan características diferenciales con respecto a los procariontes y eucariotes. Son partículas 55S compuestas por una subunidad pequeña (28S) y una grande (39S) y la relación proteína : ARN es mayor que en otros ribosomas (O'Brien 2002). A pesar de los estudios realizados, todavía no se ha desarrollado un sistema que reproduzca *in vitro* la síntesis de las proteínas mitocondriales.

3. Enfermedades del sistema de fosforilación oxidativa: patología mitocondrial

Dado el amplio número de procesos celulares en los que participa la mitocondria, no es extraño que los defectos en la fisiología mitocondrial estén asociados a un cada vez más amplio número de enfermedades y síndromes que abarcan prácticamente todas las especialidades médicas. El concepto de enfermedad mitocondrial data de 1962, cuando el grupo de Rolf Luft describió a una paciente con hipermetabolismo severo no debido a enfermedad tiroidea (Luft et al. 1962). Curiosamente, la primera enfermedad mitocondrial descrita puede que sea también la menos frecuente; solo se ha descrito un caso más de síndrome de Luft desde que se describió el primero hace más de 40 años.

A partir de la sistematización de los estudios bioquímicos fue posible una primera clasificación de las enfermedades mitocondriales en función de cuál de las 5 etapas principales del metabolismo mitocondrial estaba afectada: transporte de sustratos, utilización de sustratos, ciclo de Krebs, cadena de transporte electrónico y acoplamiento oxidación/fosforilación (Dimauro 2004). Pronto, el uso del término enfermedad mitocondrial se empezó a restringir a aquellas enfermedades donde el defecto afectaba a la cadena respiratoria.

Las primeras mutaciones en el ADNmt se describieron en 1988. Se trataba de una delección en el ADNmt de pacientes con miopatía mitocondrial (Holt et al. 1988) y una mutación en el gen ND4 en una familia con neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON) (Wallace et al. 1988). En 1989 se describió una familia donde la oftalmoplejía externa progresiva era heredada de manera autosómica dominante asociada a la presencia de delecciones múltiples en el ADNmt (Zeviani et al. 1989). Era la primera evidencia de un nuevo grupo de enfermedades mitocondriales de origen nuclear. Esto hizo volver la mirada al núcleo y la primera mutación en el ADN nuclear asociada a

enfermedad mitocondrial fue descrita en 1995 por el grupo de A. Munnich (Bourgeron et al. 1995). Se trataba de una mutación en una subunidad de la succinato deshidrogenasa en dos hermanas con síndrome de Leigh.

Cada año se describen nuevas mutaciones en ambos genomas y son identificados nuevos genes implicados a su vez en nuevos procesos, como aquellos que afectan a la fusión o fisión mitocondrial o a la composición lipídica de la membrana. Sin embargo aún se desconoce cuales son los mecanismos patogénicos de las mutaciones conocidas, incluso de aquellas identificadas desde hace más tiempo, como son, por ejemplo, las mutaciones que afectan a los ARNt del ADNmt (DiMauro 2004). Además, cada vez se dedica más atención al papel que pueda jugar la mitocondria en el desarrollo de las enfermedades metabólicas y degenerativas asociadas a la edad (Wallace 2005). Desgraciadamente, un campo donde prácticamente no se han producido avances es en el de los tratamientos de estas enfermedades, a día de hoy claramente insuficientes cuando no inexistentes (DiMauro et al. 2006).

La epidemiología de las enfermedades mitocondriales es complicada dado el amplio espectro de presentaciones clínicas y la dificultad de asignar un origen definido a muchos de los fenotipos. Esto ha conducido tradicionalmente a una subestimación de la prevalencia de este grupo de enfermedades (Schapira 2006). En un reciente estudio epidemiológico realizado en el Norte de Inglaterra se ha estimado una prevalencia de 9,2 pacientes con manifestaciones clínicas por cada 100.000 habitantes en edad laboral (entre 16 y 65 años) (Schaefer et al. 2007). Adicionalmente, dos estudios independientes de enfermedades de la cadena respiratoria en niños estimaron unos valores para la prevalencia de 4,7 (Darin et al. 2001) y 5 (Skladal et al. 2003) por cada 100.000 nacimientos. En un estudio realizado en el área urbana de Madrid a lo largo de 10 años se encontró una prevalencia para estas enfermedades de 5,7 por cada 100.000 personas mayores de 14 años (Arpa et al. 2003).

3.1 Mutaciones en el ADNmt

3.1.1. Genética mitocondrial

Para entender la patogénesis de las enfermedades mitocondriales debidas a mutaciones en el ADNmt es necesario en primer lugar discutir aquellos aspectos que diferencian la genética mitocondrial de la mendeliana.

3.1.1.1. Homoplasmia y heteroplasmia

Es la consecuencia de la naturaleza poliploide -de cientos a miles de copias por célula- del genoma mitocondrial. De una manera simplificada, homoplasmia es cuando todas las copias del genoma mitocondrial son idénticas y heteroplasmia cuando coexisten dos o más genotipos distintos. Algunas mutaciones pueden afectar a todas las copias del genoma mitocondrial (mutación homoplásmica) mientras que otras solo estarán presentes en algunas copias del genoma (mutación

heteroplásmica). Esto conduce a otra de las características de la genética mitocondrial, la existencia de un nivel mínimo de mutación para que exista expresión fenotípica o bioquímica del defecto mitocondrial. Es lo que se conoce como efecto umbral (Taylor and Turnbull 2005).

El ADNmt esta sufriendo continuamente mutaciones y deleciones, que en la mayor parte de los casos nunca llegan a alcanzar niveles de heteroplasmia significativos, por lo que resultan normalmente indetectables, siendo el concepto de homoplasmia por lo tanto más aparente que real. (Coller et al. 2001).

3.1.1.2. Herencia del ADNmt

En los últimos años se ha puesto en duda uno de los dogmas principales de la genética mitocondrial; el hecho de que el ADNmt se herede exclusivamente del linaje materno. En el año 2002 se publicó un trabajo donde se mostraban evidencias de herencia paterna en un paciente de miopatía mitocondrial esporádica con una microdelección en el gen ND2. (Schwartz and Vissing 2002). Además, el estudio de este caso permitió demostrar la existencia de recombinación entre las dos poblaciones de ADNmt presentes en el paciente (Kraytsberg et al. 2004). Sin embargo, estudios posteriores no han encontrado evidencias de herencia paterna en pacientes con miopatías mitocondriales esporádicas (Filosto et al. 2003a; Taylor et al. 2003). Así pues, se puede seguir considerando que como regla general el ADNmt se hereda de la madre, siendo los casos de herencia paterna un hecho excepcional debido a un fallo en la eliminación del ADNmt paterno durante la fusión de los gametos.

3.1.1.3. Transmisión del ADNmt

Una mutación homoplásmica se transmite a toda la descendencia materna. Sin embargo, existen factores adicionales que hacen que la expresión del defecto mitocondrial pueda ser diferente entre los portadores de dicha mutación. Por ejemplo, muchos pacientes con LHON tienen mutaciones homoplásmicas en el ADNmt. Aunque toda la descendencia herede la mutación solo algunos, aproximadamente el 50% de los hombres y el 10% de las mujeres desarrollaran la enfermedad, indicando que existen factores de origen nuclear modulando la expresión fenotípica de estas mutaciones (Man et al. 2003).

El caso de las mutaciones heteroplásmicas es aún más complicado. A los factores nucleares y medioambientales se une el hecho de que durante la oogénesis se produce un cuello de botella genético que hace que la cantidad de ADN mutado que hereda la descendencia sea variable (Taylor and Turnbull 2005).

3.1.1.4. Segregación mitótica

Aunque el mecanismo de distribución de las mitocondrias (y el ADNmt) en las células hijas durante el proceso de división celular no se conoce, hoy en día se asume que las mitocondrias se segregan al azar. Como consecuencia, a partir de una condición inicial de heteroplasmia, durante la

proliferación celular (por ejemplo en la embriogénesis) las diferentes células van heredando diferentes proporciones de moléculas con mutación y salvajes. El resultado final es que los diferentes tejidos del organismo constituyen un mosaico y, a priori, el porcentaje de ADNmt mutado presente en un determinado tejido es impredecible, y varía entre los diferentes hermanos de una familia que sufre una enfermedad mitocondrial.

3.1.2. Tipos de mutaciones en el ADNmt

3.1.2.1 Deleciones en el ADNmt

El tamaño de las deleciones varía entre una única base y varias kilobases, y puede afectar en principio a cualquier región del ADNmt. La deleción más frecuente, conocida por ello como deleción común, tiene un tamaño de 5 Kb y abarca la región comprendida entre los genes *CITB* y *COXII*. Las deleciones de gran tamaño están asociadas usualmente a fenotipos que incluyen la oftalmoplejía externa progresiva crónica (CPEO), el síndrome de Kearn-Sayre y el síndrome de Pearson, aunque han sido asociadas ocasionalmente con prácticamente todos los síndromes de encefalopatías mitocondriales. En algunos pacientes aparecen duplicaciones del ADNmt que, aunque no son patogénicas por sí mismas, podrían ser un paso intermedio en la generación de deleciones (Schapira 2006).

3.1.2.2 Mutaciones puntuales en el ADNmt

Hasta la fecha han sido descritas más de 150 mutaciones que afectan a los genes codificados en el ADNmt (Brandon et al. 2005). Estas mutaciones afectan a los ARNt, a los ARNr y a los genes que codifican subunidades estructurales de los complejos OXPHOS (Dimauro 2004).

La presentación clínica es muy variable e incluye fenotipos como el MELAS (Miopatía con Encefalopatía, Acidosis Láctica y accidentes cerebrovasculares), MERRF (Epilepsia Mioclónica y Fibras Rojas Rasgadas), NARP (Neuropatía, Ataxia y Retinitis Pigmentosa), MILS (Síndrome de Leigh heredado por vía materna) y LHON. Además, los síndromes causados por mutaciones en el ADNmt pueden muchas veces acompañarse por diabetes mellitus, cardiomiopatías, sordera neurosensorial y mioglobinuria.

La mayoría de las mutaciones patogénicas son heteroplásmicas, correlacionando el grado de heteroplasmia con la severidad del fenotipo. Esto ha hecho que tradicionalmente la heteroplasmia fuera incluida como uno de los criterios canónicos para la clasificación de una mutación como patogénica a pesar de que existen numerosas mutaciones homoplásmicas asociadas a patología. Ejemplos de mutaciones homoplásmicas son las mutaciones G3460A, G11778A y T14484C asociadas a LHON (Taylor and Turnbull 2005), las mutaciones A1555G (Prezant et al. 1993), A7455G (Sue et al. 1999) y T7511C (Li et al. 2004) asociadas a sordera neurosensorial o la mutación C1624T asociada a síndrome de Leigh (LS) (McFarland et al. 2002).

3.1.2.3 Mecanismos patogénicos

El mecanismo patogénico de muchas de las enfermedades producidas por mutaciones en el ADNmt es actualmente desconocido, especialmente en lo que se refiere a mutaciones en los genes que codifican para los ARNt mitocondriales. Según la explicación convencional estas mutaciones producen un defecto en la biosíntesis de proteínas mitocondriales que a su vez provoca un defecto OXPHOS y por lo tanto la causa de estos síndromes sería un defecto en la producción de energía en forma de ATP. Según esta explicación cabría esperar fenotipos parecidos para estas mutaciones, pero la realidad es que la misma mutación puede causar fenotipos distintos, y a su vez, un mismo fenotipo puede estar causado por distintas mutaciones (Schapira 2006).

Por ejemplo, la mutación A3243G es probablemente la causa más común de MELAS, pero también ha sido encontrada en pacientes con oftalmoplejía externa progresiva crónica, síndrome de Kearns-Sayre o diabetes mellitus aislada. A su vez la causa más frecuente de síndrome de Kearns-Sayre es la delección común del ADNmt, que a su vez se ha encontrado en pacientes con MELAS, diabetes mellitus aislada o cardiomiopatía. Una posible explicación es que los síntomas reflejen el tejido en el que una mutación específica ha sobrepasado el umbral patogénico. Algunos tejidos parecen ser especialmente vulnerables a mutaciones específicas en ciertos ARNt; por ejemplo, el MERRF está asociado casi siempre a mutaciones en el ARNt^{Lys}; la cardiomiopatía a mutaciones en el ARNt^{Leu}; la diabetes mellitus a la mutación T14709C en el ARNt^{Glu}. Pero la razón por la que unos tejidos son más vulnerables a ciertas mutaciones que a otras sigue siendo un completo misterio (Dimauro 2004).

Existen evidencias de que la expresión de las mutaciones patogénicas puede estar modulada por el resto de la secuencia del ADNmt (Dimauro 2004). De una manera más general, ciertos haplotipos podrían afectar a la fosforilación oxidativa, predisponiendo a -o protegiendo de- ciertas enfermedades. Los haplotipos mitocondriales han sido asociados con cardiomiopatías, enfermedad de Alzheimer, o enfermedad de Parkinson (Dimauro 2004). En este sentido, algunos autores defienden que las variantes genéticas que permitieron a nuestros ancestros adaptarse a las distintas condiciones medioambientales, clima y alimentación principalmente, están teniendo una profunda influencia en la disposición a padecer enfermedades de la población actual (Wallace 2005).

Así pues, la patogénesis de las enfermedades mitocondriales causadas por mutaciones en el ADNmt parece ser el resultado de una combinación de la propia mutación, el resto de la molécula de ADNmt, el fondo nuclear, factores medioambientales, la distribución de la mutación en los distintos tejidos, y la dependencia de estos con respecto al sistema de fosforilación oxidativa.

3.2 Mutaciones en el ADN nuclear

Considerando que actualmente la causa genética se desconoce en más del 50% de los pacientes diagnosticados de enfermedad mitocondrial, parece claro que la mayoría de las enfermedades mitocondriales son probablemente debidas a mutaciones en los genes nucleares que codifican

alguna de las 1500 proteínas que forman el proteoma mitocondrial. Actualmente se conocen únicamente la mitad de estos genes, lo que implica una gran dificultad a la hora de diagnosticar correctamente las enfermedades mitocondriales de origen nuclear. Recientemente y mediante una aproximación *in silico* se han identificado un gran número de genes nucleares candidatos a ser responsables de enfermedades de la cadena respiratoria (Calvo et al. 2006).

Las mutaciones en genes nucleares que afectan de una manera directa a la cadena respiratoria pueden ser clasificadas en 3 grupos principales: mutaciones en genes que codifican subunidades de los complejos de la cadena respiratoria, mutaciones en genes que codifican proteínas accesorias necesarias para el correcto ensamblaje y función de los complejos de la cadena y mutaciones que afectan a la estabilidad y replicación del ADNmt. Aparte de estos tres grupos, existiría un cuarto donde se incluirían aquellas mutaciones que afectan de un modo indirecto a la cadena respiratoria.

3.2.1 Mutaciones en subunidades estructurales de los complejos de la cadena respiratoria.

Aunque 72 de las 85 subunidades de los complejos que forman la cadena respiratoria están codificadas en el núcleo, las mutaciones en dichos genes son poco frecuentes. Esto podría ser un reflejo de la naturaleza altamente deletérea de dichas mutaciones, que darían lugar a letalidad durante la embriogénesis.

Hasta la fecha han sido descritas mutaciones en subunidades del complejo I (*NDUFS1, 2, 4, 7 y 8 y NDUFV1*), asociadas a síndrome de Leigh y leucodistrofia, y en las cuatro subunidades del complejo II (*SDHA, B, C y D*) asociadas a síndrome de Leigh y ataxia en el caso de la subunidad A, y más raramente a paraganglioma y feocromocitoma en el caso de las subunidades B, C y D (Zeviani et al. 2003).

3.2.2 Mutaciones en proteínas accesorias

Las enfermedades debidas a defectos en los complejos III, IV y V de origen nuclear no son producidas directamente por mutaciones en las subunidades de estos complejos codificadas en el núcleo, sino por mutaciones en proteínas implicadas en su ensamblaje. Un ejemplo claro lo constituyen las deficiencias de la citocromo oxidasa (COX) debidas a mutaciones en el ADN nuclear. No se ha descrito hasta la fecha ninguna mutación en alguna de las subunidades de este complejo, codificadas en el núcleo, mientras que son numerosas las mutaciones descritas en genes implicados en su ensamblaje y estabilidad, como son *SCO1, SCO2, SURF1, COX10, COX15* y *LRPPRC*. También han sido descritas mutaciones en el gen *BSCL1*, involucrado en el ensamblaje del complejo III, y *ATP12*, implicado en el ensamblaje del complejo V (Schapira 2006). Recientemente se ha descrito una mutación en un gen de ensamblaje del complejo I (*B17.2L*) asociada a un cuadro de leucoencefalopatía (Ogilvie et al. 2005).

3.2.3. Mutaciones en proteínas implicadas en el mantenimiento y replicación del ADNmt

El ADNmt depende para su correcta replicación, reparación y estabilización de numerosas proteínas codificadas en el ADN nuclear. Mutaciones en estas proteínas pueden producir daños cuantitativos (depleción) o cualitativos (deleciones) en el ADNmt.

Entre las enfermedades asociadas a una disminución en la cantidad del ADNmt cabe destacar por su gravedad el síndrome de depleción mitocondrial. Este síndrome suele presentarse con dos cuadros clínicos diferentes: una forma hepatocerebral, con debut neonatal y un grado de depleción de ADNmt severo, y una forma miopática, de debut más tardío y un menor grado de depleción. La forma hepatocerebral está asociada en la práctica totalidad de los casos a mutaciones en el gen que codifica la deoxiguanosina quinasa (*DGUOK*) (Mandel et al. 2001), mientras que la forma miopática lo está con mutaciones en el gen que codifica la timidina quinasa 2 (*TK2*) (Saada et al. 2001). Mutaciones en el gen que codifica la timidina fosforilasa (*TP*) causan el síndrome de encefalopatía mioneurogastrointestinal mitocondrial (MNGIE), asociado normalmente a una depleción menos severa en el ADNmt que la observada en el síndrome de depleción (Nishino et al. 1999). Estos tres genes están implicados en el metabolismo de nucleótidos. Otros genes implicados en depleción mitocondrial son *MPV17* (Spinazzola et al. 2006), que codifica una proteína localizada en la membrana interna mitocondrial de función desconocida, *SUCLA2*, que codifica la subunidad β de la succinil-CoA sintetasa (Elpeleg et al. 2005), *RRM2B* que codifica la ribonucleótido reductasa controlada por p53 (p53R2) (Bourdon et al. 2007), y *SUCLG1* que codifica la subunidad alfa de la succinato-coenzima A ligasa (SUCL) (Ostergaard et al. 2007).

Un apartado especial merece el gen *POLG* que codifica la subunidad catalítica de la polimerasa γ mitocondrial. Cerca de 50 mutaciones patogénicas han sido descritas en este gen asociadas a un amplio número de enfermedades mitocondriales, y acompañadas tanto de depleción como de deleciones en el ADNmt (Longley et al. 2005). Las primeras mutaciones fueron descritas en familias con oftalmoplejía externa progresiva en su forma autosómica dominante (adPEO) asociada a deleciones múltiples del ADNmt (Van Goethem et al. 2001), enfermedad que también ha sido asociada a mutaciones en los genes *C10orf2*, que codifica para la helicasa mitocondrial (Spelbrink et al. 2001) y *ANT1*, que codifica para una isoforma del transportador de nucleótidos de adenina mitocondrial (Kaukonen et al. 2000).

Todas las mutaciones en el gen *POLG* asociadas a adPEO afectan al dominio polimerasa de la proteína. Estudios basados en la caracterización bioquímica de proteínas recombinantes portadoras de mutaciones en dicho dominio, muestran una correlación entre la severidad del fenotipo observado en pacientes y la disminución de la actividad polimerasa y de la procesividad causada por las mutaciones (Graziewicz et al. 2004). También han sido descritas mutaciones heterocigotas compuestas en pacientes con las formas esporádica y la recesiva de PEO (arPEO). Estas mutaciones suelen afectar al dominio exonucleasa o a la región espaciadora de la proteína. Estudios bioquímicos en proteínas recombinantes portadoras de mutaciones en la región

espaciadora muestran una drástica disminución de la eficacia catalítica, así como de la capacidad de interaccionar con la subunidad accesoria (S. S. Chan et al. 2005a).

Durante los últimos años, el espectro clínico ocasionado por mutaciones en el gen *POLG* ha aumentado considerablemente. Se ha descrito una alta incidencia de enfermedad psiquiátrica, síndrome parkinsoniano e insuficiencia gonadal primaria, provocando una menopausia precoz, en familias con mutaciones dominantes en el gen *POLG* (P. Luoma et al. 2004; Pagnamenta et al. 2006). Otras patologías que han sido asociadas a mutaciones recesivas en el gen *POLG* son el síndrome de ataxia mitocondrial de herencia autosómica recesiva (MIRAS) (Winterthun et al. 2005) y la enfermedad de Parkinson asociada a neuropatía periférica (Davidzon et al. 2006). En todos los casos la enfermedad se acompaña de presencia de deleciones múltiples en el ADNmt. Adicionalmente, las mutaciones recesivas en el gen *POLG* son la mayor causa del síndrome de Alpers-Huttenlocher, una forma de hepatoencefalopatía severa infantil, que se acompaña de depleción del ADNmt (Naviaux and Nguyen 2004).

Así pues, existe un gran interés en el estudio de este gen dado el cada vez mayor número de mutaciones descritas, asociadas a un amplio abanico de patologías humanas. Sorprendentemente, hasta hace unos meses no se ha identificado en un paciente con oftalmoplejía externa progresiva de herencia autosómica dominante la primera mutación en el gen *POLG2*, que codifica para la subunidad accesoria de la polimerasa γ y que, como se ha discutido previamente, desempeña una función esencial para la actividad del holoenzima (Longley et al. 2006).

3.2.4. Mutaciones en genes que alteran de un modo indirecto la función OXPHOS

Dentro de este grupo se encontrarían las mutaciones en un número creciente de genes, que codifican proteínas esenciales para diferentes procesos de la fisiología mitocondrial. Por ejemplo, aquellas que afectan a la composición lipídica de la membrana, como es el caso de las mutaciones en el gen *G4.5* que codifica para un grupo de proteínas, las tafazinas, que alteran la biosíntesis de la cardiolipina y provocan el síndrome de Barth, consistente en cardiopatía, miopatía y neutropenia cíclica. También se incluirían las mutaciones en genes implicados en los procesos de fusión mitocondrial, como son las mutaciones en *Mfn2* que causan la neuropatía de Charcot-Marie-Tooth (CMT) subtipo 2A (Zuchner et al. 2004), en *OPA1* que causan el síndrome de atrofia óptica autosómica dominante (DOA), y *GDAP1* asociada a CMT subtipo 4A (Niemann et al. 2005).

3.3. Mitocondria y enfermedades neurodegenerativas

Se han descrito anomalías en el ADNmt o el sistema OXPHOS asociadas a diferentes enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica o la enfermedad de Huntington. Sin embargo hasta la fecha no está claro hasta qué punto estas alteraciones son defectos primarios en la patogénesis de dichas enfermedades o producidas como un efecto secundario en su desarrollo.

3.3.1. Enfermedad de Parkinson

Uno de los vínculos entre la enfermedad de Parkinson y la mitocondria se basa en el déficit del complejo I que se encuentra en estos pacientes (Wallace et al. 1992). El complejo I es además la diana de toxinas que inducen muerte en las neuronas dopaminérgicas y parkinsonismo en humanos y en modelos animales. Existe también una relación entre las causas genéticas de enfermedad de Parkinson familiar y la mitocondria. De los 9 genes nucleares relacionados con esta enfermedad, 6 están relacionados directa o indirectamente con la mitocondria (Petrozzi et al. 2007). Se han realizado varios estudios sobre la influencia de los haplogrupos mitocondriales en el riesgo a desarrollar esta enfermedad. Dos de estos trabajos muestran una menor prevalencia de Parkinson en personas pertenecientes a los haplogrupos J y K, (van der Walt et al. 2003) y el cluster UJKT (Pyle et al. 2005).

3.3.2. Enfermedad de Alzheimer

Una de las formas familiares de la enfermedad de Alzheimer esta asociada a mutaciones en la proteína precursora de la proteína β -amiloide. La proteína β -amiloide ($A\beta$) puede inhibir el sistema OXPHOS en la mitocondria, y se ha observado que interacciona directamente con una alcohol deshidrogenasa mitocondrial (ABAD). Aunque se desconoce la función de ABAD, su inactivación produce letalidad (Torroja et al. 1998).

3.3.3. Esclerosis lateral amiotrófica (ELA)

La ELA es la forma más común de enfermedad de las neuronas motoras en adultos, con una prevalencia de entre 1-2 afectados por cada 100.000 habitantes. En el 90% de los casos no existe causa genética aparente y se tipifica como ELA esporádica. Dentro del 10% de los casos donde sí existe evidencia de herencia familiar (ELA familiar), el 20% presenta mutaciones en el gen *SOD1*, que codifica para la Cu-Zn Superóxido Dismutasa, enzima citosólica implicada en la detoxificación de ROS (Hervias et al. 2006).

Diferentes estudios han demostrado alteraciones en la morfología y el metabolismo mitocondrial tanto en pacientes de ELA como en modelos experimentales con mutantes en *SOD1*. En el caso de pacientes con ELA se han encontrado defectos en las actividades de los complejos I (F. R. Wiedemann et al. 1998) y IV (Vielhaber et al. 2000) en músculo esquelético, mientras que los numerosos estudios realizados en modelos animales y celulares han demostrado que la expresión de la forma mutada de *SOD1* está asociada a disfunción mitocondrial (Petrozzi et al. 2007).

3.3.4. Enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington es una enfermedad genética autosómica dominante asociada a la expansión de las repeticiones CAG en el exón 1 del gen que codifica para la huntingtina, lo que genera una expansión de fragmentos de poliglutamina en la zona N-terminal de esta proteína.

Existen evidencias que apuntan a que una de las consecuencias de la expansión de estos fragmentos podría ser un defecto en el metabolismo energético mitocondrial, que daría lugar a un incremento del daño oxidativo (Browne et al. 1997). Además, existen diversos estudios bioquímicos y por técnicas de imagen en pacientes de la enfermedad de Huntington que demuestran la implicación de una disfunción mitocondrial en la patogénesis de esta enfermedad (Petrozzi et al. 2007).

3.4. Modelos animales y celulares en el estudio de las enfermedades mitocondriales

La limitada disposición de muestras humanas, hacen necesario el uso de organismos modelo para el estudio de la patogénesis de estas enfermedades. Con este objetivo se han usado hasta la fecha diferentes organismos como *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* o *Mus musculus* (Larsson and Rustin 2001). Entre ellos el ratón es el que ofrece más ventajas al ser el más cercano a los humanos tanto a nivel genético como fisiológico y morfológico. Sin embargo, la utilidad de estos modelos se ha restringido hasta el momento al estudio de mutaciones en el ADN nuclear, dada la enorme dificultad, cuando no imposibilidad, de obtener modelos de enfermedad mitocondrial causada por mutaciones en el ADNmt.

En nuestro laboratorio se ha utilizado *Drosophila melanogaster* en estudios que abarcan tanto la investigación básica en el campo de la mitocondria, y en especial en el estudio de la regulación de la expresión de genes mitocondriales (Garesse and Kaguni 2005), como el uso de este modelo animal en el estudio de la patogénesis de enfermedades mitocondriales (Sanchez-Martinez et al. 2006). *Drosophila* presenta unas características que la convierten en un modelo de gran utilidad, como son un ciclo de vida corto, su facilidad de crecimiento y disponibilidad de animales y el elevado número de herramientas genéticas y moleculares disponibles, lo que permite su manipulación y la generación de moscas transgénicas con relativa facilidad.

Sin embargo, en el estudio de los mecanismos patogénicos asociados a mutaciones en ADNmt, el sistema que se ha mostrado más útil hasta el momento es el de los cíbridos transmitocondriales (Taylor and Turnbull 2005). En este sistema, líneas celulares humanas cuyo ADNmt ha sido completamente eliminado (células ρ^0), son repobladas con mitocondrias procedentes de un paciente o donante. Las células ρ^0 no poseen una cadena respiratoria funcional y dependen del piruvato y uridina exógenos para crecer, lo que permite la fácil selección de los transformantes que contienen el ADNmt del paciente (King and Attardi 1989). Este sistema ha permitido el estudio de las consecuencias bioquímicas y fisiológicas de mutaciones en el ADNmt (Pallotti et al. 2004; Vives-Bauza et al. 2006). También ha sido utilizado para estudiar el efecto del fondo genético nuclear sobre la segregación de mutaciones patogénicas (Dunbar et al. 1995), o para demostrar la presencia de recombinación heteróloga en el ADNmt en células humanas (D'Aurelio et al. 2004). En nuestro laboratorio el modelo de cíbridos transmitocondriales ha sido

ampliamente utilizado en la caracterización de mutaciones en el ADNmt (Bornstein et al. 2002; Bornstein et al. 2005).

El hecho de poder disponer de sistemas experimentales que nos ayuden a comprender las consecuencias moleculares y metabólicas de los defectos en el sistema OXPHOS es de vital importancia a la hora de elucidar los mecanismos patogénicos, decidir tratamientos eficaces y desarrollar terapias racionales para estas enfermedades (Smeitink et al. 2006), por lo que desarrollar modelos de estudio que nos permitan aproximarnos a las patologías mitocondriales con facilidad y fiabilidad es una cuestión del máximo interés.

En los últimos años se han dedicado grandes esfuerzos en el campo de la patología mitocondrial encaminados tanto a intentar comprender los mecanismos patogénicos asociados a las mutaciones que causan estas enfermedades, como a la identificación de nuevos genes implicados en ellas.

Sin embargo, y a pesar de este esfuerzo, actualmente se desconoce la causa genética en más de la mitad de los pacientes diagnosticados de enfermedad mitocondrial, y el conocimiento que se posee de los mecanismos patogénicos implicados en el desarrollo de estas enfermedades es aún pobre.

En nuestro laboratorio y dentro de este interés general de avanzar en el conocimiento de las enfermedades mitocondriales se ha trabajado principalmente en dos líneas: la identificación de genes nucleares implicados en patología mitocondrial, con especial interés en aquellos implicados en comunicación intergenómica, y el estudio de los mecanismos patogénicos asociados a mutaciones en el ADN mitocondrial mediante el uso de híbridos transmitocondriales.

Dentro de este interés los objetivos concretos de este trabajo han sido:

- Estudiar la prevalencia de las mutaciones en el gen *POLG* en una población española portadora de deleciones múltiples en el ADN mitocondrial asociado a oftalmoplejia externa progresiva y/o miopatía.
- Caracterizar las consecuencias bioquímicas de la mutación A8347G y compararlas con las producidas por la mutación G8363A, ambas en el gen *mtRNA^{Lys}*.
- Caracterizar el fenotipo bioquímico asociado a la mutación A8296G, y estudiar la influencia de los fondos genéticos mitocondrial y nuclear sobre su expresión.

1. Materiales

1.1. Reactivos, soluciones y tampones

Todos los reactivos utilizados en este trabajo fueron de grado analítico o de grado apto para la biología molecular. La composición de las soluciones y tampones empleados en los distintos experimentos se especifica en la descripción de los métodos o, en su defecto, en la bibliografía correspondiente.

1.2. Líneas celulares

En la generación de cíbridos mitocondriales se utilizaron las líneas: 143B 206 (ρ^0), derivada de la línea de osteosarcoma humano 143B TK, y la línea A549 B2 (ρ^0), derivada de la línea de carcinoma de pulmón humano A549. Estas células fueron amablemente cedidas por la Dra Rosalba Carrozzo (Roma, Italia) y el Dr. Ian Holt (Cambridge, Inglaterra) respectivamente, junto a las líneas parentales de las que derivan.

1.3. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo como cebadores fueron sintetizados por Isogen (Holanda). En la siguiente tabla se especifica el nombre, la secuencia en dirección 5'→3', el tamaño y la aplicación para la que fueron diseñados. Los cambios sobre la secuencia original, en caso de haberlos, se destacan en negrita.

1.3.1. Oligonucleótidos usados en la secuenciación del gen *POLG* (Lamantea et al. 2002)

Nombre	Secuencia	Aplicación	Tm
2AF	5'-CTCCACGTCTTCCAGCCAGTAAAA-3'	Secuencia Exón 2	57 °C
2AR	5'-TTCTGCAGGTGCTCGACGCT-3'		
2BF	5'-GGGCTGCACGAGCAAATCTT-3'	Secuencia Exón 2	57 °C
2BR	5'-AGCACGTAACAGGACCTCAGAAAA-3'		
3F	5'-TAGGTGTGCAGTGGTTGTTG-3'	Secuencia Exón 3	57 °C
3R	5'-AACCCTGAGATTAGGGCTC-3'		
4F	5'-TCCACACCACCAAGCAGTGGT-3'	Secuencia Exón 4	57 °C
4R	5'-AGAGGGGGTCCCAAGCACTAT-3'		
5-6F	5'-ATAGTGCTTGGGACCCCCTCT-3'	Secuencia Exones 5 y 6	57 °C
5-6R	5'-GTACCAGGAACACTGACC-3'		
7-8F	5'-TCAGGGATTGGGCCAGTCTT-3'	Secuencia Exones 7 y 8	57 °C
7-8R	5'-ATGGGCAACTTGCTGGCTGT-3'		
8-9F	5'-TGGAGTGGGACCTGCAAGAA-3'	Secuencia Exones 8 y 9	57 °C
8-9R	5'-CTGAGAATGGAGCAAGGGTA-3'		
10F	5'-GGGACATTGTGAGAGAGAGA-3'	Secuencia Exón 10	57 °C
10R	5'-ACTCTTTCCACTAGCCTGAG-3'		

11-12F	5'-CAGAGTGGGCATCTGGTAAT-3'	Secuencia Exones 11 y 12	57 °C
11-12R	5'-AAGAGGAAGCCCTTTCCACC-3'		
13F	5'-ATGGCCCTTGCTGAATGCAG-3'	Secuencia Exón 13	57 °C
13R	5'-TGGGCCTTGAGCAGAATGAG-3'		
14F	5'-GCAGGTACTCACGTTGGTTC-3'	Secuencia Exón 14	57 °C
14R	5'-CTGTGGGAATCCAGGGTTAG-3'		
15-16F	5'-GGATGTGGGATAGATTCTGCT-3'	Secuencia Exones 15 y 16	57 °C
15-16R	5'-CCTCAGAGCCCAGTTTCTACA-3'		
17-18F	5'-GTAGGAAGAGTCTCATTTGGG-3'	Secuencia Exones 17 y 18	57 °C
17-18R	5'-CCTGGGTGTTAAAGTGGATG-3'		
19-20F	5'-TGAACATTCCTTGCCAAGGC-3'	Secuencia Exones 19 y 20	57 °C
19-20R	5'-TCTGCCCATGCTCCAAAGGTA-3'		
21F	5'-GCTTCTACCCTGGAGTTAATTG-3'	Secuencia Exón 21	57 °C
21R	5'-CAAGGAACGCTCACCCAAAG-3'		
22F	5'-GTCATTGCTCCAGGAGTGAT-3'	Secuencia Exón 22	57 °C
22R	5'-CTGTTCTCCAAGACCCACTT-3'		
23F	5'-GCTCCTTTGCTCACTTCTGA-3'	Secuencia Exón 23	57 °C
23R	5'-CTACTGAAAAATGGCTGGCC-3'		

1.3.2. Oligonucleótidos usados en la caracterización de mutaciones en el gen *mtRNA^{Lys}*

Nombre	Secuencia	Aplicación	Tm
8347CF	5'-ATAGGGCCCGTATTTACCC-3'	RFLP 8347	57°C
8347CR	5'-CGGTAGTATTTAGTTGGGG CATTTCACTGTAAAGAGGCGT-3'		
8160F	5'-ACTACGGTCAATGCTCTGA-3'	RFLP 8296 RFLP 8363	50°C
8387R	5'-CGGTAGTATTTAGTTGAAGCA-3'		

1.3.3. Oligonucleótidos usados en la cuantificación del ADN mitocondrial mediante PCR cuantitativa.

Nombre	Secuencia	Aplicación	Tm
12SF	5'-CCACGGGAAACAGCAGTGATT -3'	Cuantificación ADNmt	50°C
12SR	5'-CTATTGACTTGGGTTAATCGTGTG -3'		

1.3.4. Oligonucleótidos usados en la generación de sondas para Southern Blot.

Nombre	Secuencia	Aplicación	Tm
1562F	5'-GTAACATGGTAAGTGTACT-3'	Sonda ADNmt	50°C
3717R	5'-GGCTACTGCTCGCAGT-3'		
18SF	5'-ATGCATGTCTAAGTACGCA-3'	Sonda ADNn	56°C
18SR	5'-TCACTAAACCATCCAATCG-3'		

1.4. Anticuerpos

- Anti- β -Actina (Sigma). Obtenido en ratón. Utilizado en inmunotransferencias, dilución 1:5000
- Anti-MnSOD (Upstate). Obtenido en conejo. Utilizado en inmunotransferencias, dilución 1:1000
- Anti-HIF-1 α (BD Transduction Laboratories). Obtenido en ratón. Utilizado en inmunotransferencias, dilución 1:1000
- Anti-PDK-1 (Stressgen). Obtenido en conejo. Utilizado en inmunotransferencias, dilución 1:1000
- GAR (Nordic). Anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa. Obtenido en cabra. Utilizado como anticuerpo secundario en inmunotransferencias, dilución 1:5000.
- GAM (Santa Cruz Biotechnology). Anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa. Obtenido en cabra. Utilizado como anticuerpo secundario en inmunotransferencias, dilución 1:5000.

2. Pacientes

Los criterios para la inclusión de los pacientes estudiados en nuestro trabajo fueron la presencia en músculo de delecciones múltiples en el ADNmt asociado a PEO y/o miopatía. En el apartado de resultados se describen los hallazgos clínicos más significativos de aquellos pacientes con mutaciones en el gen *POLG*. Se seleccionaron como sujetos control 100 pacientes para los que no existía evidencia clínica, histológica o bioquímica de sufrir una miopatía mitocondrial. El rango de edad abarca desde la infancia a la edad adulta, con una proporción equivalente de hombres y mujeres. Dichas muestras procedían del servicio de Anatomía Patológica del Hospital 12 de Octubre de Madrid.

La obtención de biopsias musculares, así como su estudio bioquímico, histoquímico y la extracción de ADN del tejido muscular se realizaron en el Hospital Universitario 12 de Octubre utilizando procedimientos previamente descritos (Campos et al. 2001).

2.1. Muestras biológicas

En esta tesis se han utilizado muestras procedentes de distintos tejidos de pacientes y controles: músculo esquelético (deltoides, bíceps brachii y bíceps femoral), sangre, piel y tejido adiposo. La obtención y el procesamiento de las muestras se realizaron de acuerdo a protocolos estándar (Campos et al. 2001) e incluyeron la obtención del consentimiento informado de los pacientes siguiendo normas del comité ético del Hospital 12 de Octubre de Madrid.

3. Métodos

Las técnicas básicas de biología molecular, tales como el clonaje de fragmentos de ADN, las técnicas electroforéticas aplicadas al análisis de ácidos nucleicos y proteínas, los cultivos bacterianos, etc., se realizaron según describen Sambrook y colaboradores (Sambrook and Russell 2001) o de acuerdo con los protocolos especificados en las citas correspondientes.

3.1. Aislamiento de ADN total de células.

Para el aislamiento de ADN total a partir de células en cultivo se utilizó el DNeasy tissue kit (Quiagen) siguiendo las indicaciones del fabricante. La concentración de los ADN obtenidos fue determinada espectrofotométricamente a 260nm o mediante el uso de Quant-it PicoGreen dsDNA Reagent Kit (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADN así obtenido se almacenó a -20°C hasta su uso.

3.2. Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa

La purificación de ADN de geles de agarosa se realizó con el kit QIAEX II Gel Extraction (QIAGEN) siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.3. Secuenciación de ácidos nucleicos y análisis de secuencias

La secuenciación de los distintos fragmentos de ADN se realizó utilizando el método de secuenciación automática en geles desnaturizantes de acrilamida/bis en el Servicio de Secuenciación del Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" (CSIC-UAM, Madrid). El análisis de las secuencias, la generación de mapas de restricción, el procesamiento de los resultados de secuenciación y el alineamiento de secuencias se realizaron con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor versión 5.0.9 (Hall 1999).

3.4. Detección de mutaciones por PCR-RFLP

3.4.1. Detección de la mutación M603L en el gen *POLG*

Para la amplificación del fragmento de ADN se usaron los oligonucleótidos 10F y 10R (apartado 1.3.1, página 57).

Esta mutación elimina un sitio de corte para la enzima *Nla* III. El patrón de bandas resultante se muestra en la siguiente figura para los casos de una muestra portadora de la versión salvaje (WT) y una muestra con la mutación en homocigosis:

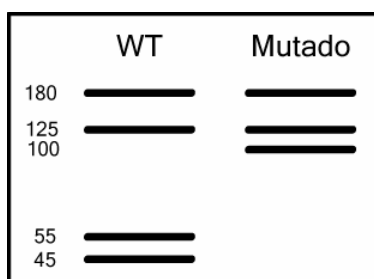


Fig 4. Patrón de bandas de la digestión con *Nla* III para la detección de la mutación M603L

3.4.2. Detección de la mutación R853W en el gen *POLG*

Para la amplificación del fragmento de ADN se usaron los oligonucleótidos 15-16F y 15-16R (apartado 1.3.1, página 58). Esta mutación elimina un sitio de corte para la enzima *Ncl* I. El patrón de bandas resultante se muestra en la siguiente figura para los casos de una muestra WT y una muestra con la mutación en homocigosis:

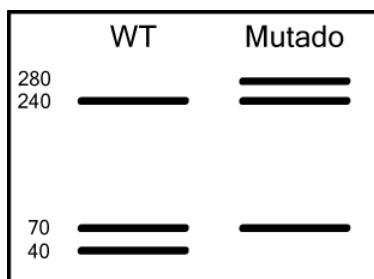


Fig 5. Patrón de bandas de la digestión con *Ncl* I para la detección de la mutación R853W

3.4.3. Detección de la mutación R1146C en el gen *POLG*

Para la amplificación del fragmento de ADN se usaron los oligonucleótidos 21F y 21R (apartado 1.3.1, página 58). Esta mutación elimina un sitio de corte para la enzima *Cfr*13 I. El patrón de bandas resultante se muestra en la siguiente figura para los casos de una muestra WT y una muestra con la mutación en homocigosis:

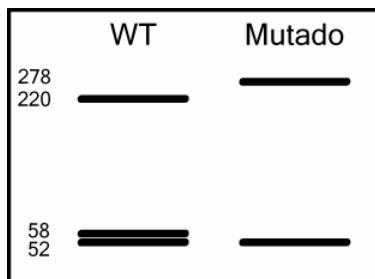


Fig 6. Patrón de bandas de la digestión con Cfr13 I para la detección de la mutación R1146C

3.4.4. Detección de la mutación D1184N en el gen *POLG*

Para la amplificación del fragmento de ADN se usaron los oligonucleótidos 22F y 22R (apartado 1.3.1, página 58). Esta mutación elimina un sitio de corte para la enzima Taq I. El patrón de bandas resultante se muestra en la siguiente figura para los casos de una muestra WT y una muestra con la mutación en homocigosis:

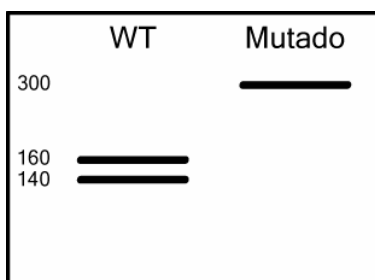


Fig 7. Patrón de bandas de la digestión con Taq I para la detección de la mutación D1184N

3.4.5. Detección de la mutación A8296G del ADNmt

Para la amplificación del fragmento de ADN se usaron los oligonucleótidos 8160F y 8387R (apartado 1.3.2, página 58). Esta mutación genera un sitio de corte para la enzima Aci I. El patrón de bandas resultante se muestra en la siguiente figura para los casos de una muestra WT y una muestra con la mutación en homoplasmia:

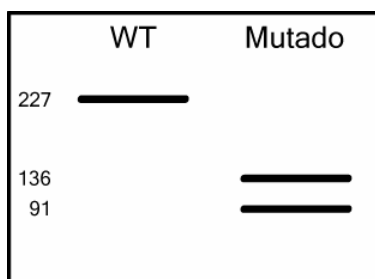


Fig 8. Patrón de bandas de la digestión con Aci I para la detección de la mutación A8296G

3.4.6. Detección de la mutación G8363A del ADNmt

Para la amplificación del fragmento de ADN se usaron los oligonucleótidos 8160F y 8387R (apartado 1.3.2, página 58). El oligonucleótido 8387R contiene dos cambios que, junto a la mutación, eliminan un sitio de corte para la enzima Asp 700. El patrón de bandas resultante se muestra en la siguiente figura para los casos de una muestra WT y una muestra con la mutación en homoplasmia:

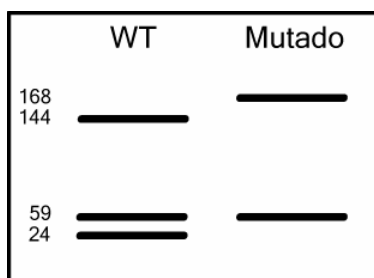


Fig 9. Patrón de bandas de la digestión con Asp 700 para la detección de la mutación G8363A

3.4.7. Detección de la mutación A8347G del ADNmt

Para la amplificación del fragmento de ADN se usaron los oligonucleótidos 8347F y 8347R (apartado 1.3.2, página 58). El oligonucleótido 8347R contiene un cambio que, junto a la mutación, genera un sitio de corte para la enzima Hga I. El patrón de bandas resultante se muestra en la siguiente figura para los casos de una muestra WT y una muestra con la mutación en homoplasmia:

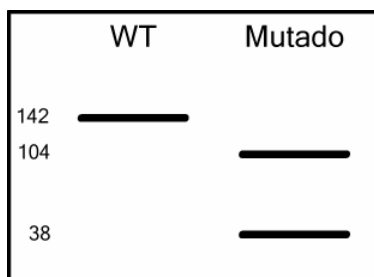


Fig 10. Patrón de bandas de la digestión con Hga I para la detección de la mutación A8347G

3.5. Marcaje de sondas

Las sondas se marcaron con 25µCi [α-32P]dCTP utilizando el kit Rediprime II Random Prime Labelling System (Amersham) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para purificar las

sondas y eliminar los nucleótidos radiactivos no incorporados se emplearon columnas de Sephadex G-50 NICK (Amersham).

3.6. Hibridación de ADN unidos a membrana (Southern blot)

3µg de ADN de cada muestra se digirieron con la enzima XhoI (Invitrogen) y los fragmentos genómicos resultantes se resolvieron en geles de agarosa/TAE al 0.8%. Antes de transferirlos, los geles se lavaron con H₂O, se incubaron en 0.25N HCl 15 minutos y finalmente realizaron dos lavados de 30 minutos, el primero con 0.5N NaOH, 1,5M NaCl y posteriormente con una solución 0,5N Tris-HCl pH=7,5, 1,5M NaCl. A continuación y siguiendo protocolos rutinarios (Sambrook and Russell 2001), se transfirieron mediante transferencia alcalina (NaOH 0,4M) a membranas de nylon Zeta-Probe (Bio-Rad) y se fijaron a las mismas mediante cross-linking con luz UV. Las membranas se prehibridaron durante al menos 2 horas a 65°C en tampón Z (170mM Na₂HPO₄, 79mM NaH₂PO₄, 7% SDS) y se hibridaron con la sonda correspondiente en las mismas condiciones durante al menos 14 horas. Las membranas se lavaron dos veces en condiciones de baja astringencia (1X SSC, 0,1%SDS a 65°C 10 min) y una en condiciones de alta astringencia (0,1X SSC, 0.1% SDS a 65°C 10min) y, finalmente, se autorradiografiaron.

3.7. Aislamiento de proteínas totales de células en cultivo.

Las células crecidas en las condiciones experimentales adecuadas fueron tripsinizadas y lavadas con PBS 1X. Posteriormente fueron resuspendidas en el volumen adecuado (100-200µL) de tampón RIPA (1% Nonidet P40, 0,5% Deoxicolato de sodio, 0,1% SDS, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH=8) al que se habían añadido previamente inhibidores de proteasas (Protease Inhibitor Cocktail ,SIGMA). Tras 15 minutos en hielo, se centrifugaron a 16000xg durante 3 minutos a 4°C. La concentración de proteínas en el sobrenadante se determinó utilizando el kit DC Protein Assay (Bio-Rad).

3.8. Inmunodetección de proteínas unidas a membrana (Western blot)

De acuerdo con protocolos rutinarios (Sambrook and Russell 2001), 20µg de proteína de cada muestra se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10% o al 12% y posteriormente fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa (Millipore). Las membranas se preincubaron durante 1 hora en solución de bloqueo (1X TBS, 0.1% Tween 20, 5% leche desnatada en polvo) y se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente en las condiciones de dilución y tiempo preestablecidas para cada uno de ellos. Las membranas se lavaron tres veces con 1X TBS, 0.1% Tween 20 y se incubaron con el anticuerpo secundario pertinente durante 1 hora a temperatura ambiente en solución de bloqueo usando una dilución 1/5000. La membrana se lavó tres veces con 1x TBS, 0.1% Tween 20, y otras tres con 1X TBS. Como reactivo de revelado se utilizó el kit ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham). Los geles fueron cuantificados usando el software Image J 1.36b (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

3.9. Generación de cíbridos transmitocondriales

Para la generación de cíbridos transmitocondriales se siguió la técnica descrita por M.P. King y G. Attardi (King and Attardi 1996) con ligeras modificaciones. Se partió de fibroblastos o mioblastos de los pacientes portadores de las mutaciones a estudiar. Como líneas celulares carentes de ADNmt se usaron la línea 143B TK- ρ^0 resistente a puromicina, y la línea A549 B2 ρ^0 .

24 horas antes de la enucleación se sembraron 0.5×10^6 células en una placa de cultivo de 35 mm. Las células fueron enucleadas mediante centrifugación en presencia de citocalasina B (10 $\mu\text{g/mL}$). Posteriormente, sobre las células enucleadas, se añadieron 1×10^6 de células ρ^0 y el conjunto fue incubado durante 3 horas en estufa a 37°C en medio ρ^0 . Para la fusión las células fueron lavadas dos veces con medio mínimo esencial (MEM) y expuestas durante 1 minuto a polietilenglicol (PEG) 50%, dimetil sulfóxido (DMSO) 10%. Se realizaron 3 lavados con MEM-DMSO 10% y las células fueron incubadas 24 horas en el medio adecuado para células ρ^0 .

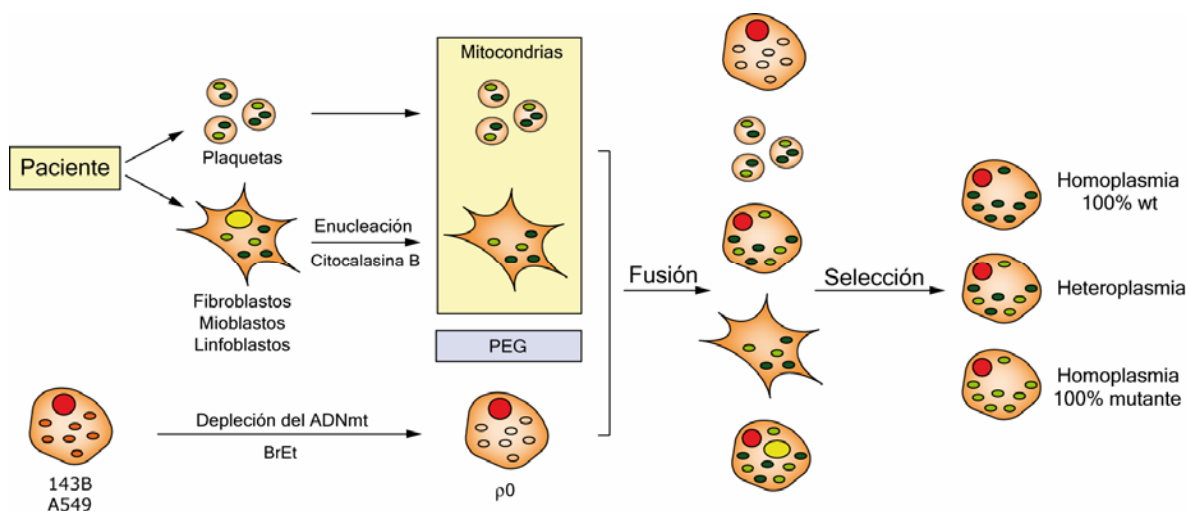


Figura 11. Esquema de la técnica de generación de cíbridos transmitocondriales. En nuestro caso como fuente origen de las mitocondrias portadoras de las mutaciones en estudio se utilizaron mioblastos y fibroblastos. La enucleación de estas, seguida por la fusión con las células ρ^0 correspondientes mediante el uso de polietilenglicol y la selección de clones permitió la obtención de líneas de células portadoras del haplotipo mitocondrial en estudio en homoplasmia.

Para la selección de los cíbridos, las células fueron mantenidas durante 15 días en medio selectivo. El medio selectivo correspondiente a los cíbridos obtenidos sobre el fondo nuclear 143B TK- resistente a puromicina estaba compuesto por: DMEM, 5% FBS, bromodeoxiuridina 100 $\mu\text{g/mL}$, puromicina 0,4 $\mu\text{g/mL}$, penicilina 100 U/mL y estreptomycin 100 $\mu\text{g/mL}$. El medio selectivo de los

cíbridos sobre fondo nuclear A549 era DMEM, 5% FBS, penicilina 100 U/mL y estreptomycinina 100 µg/mL.

La selección de clones a partir de célula aislada se realizó mediante la dilución de las células en placas de 96 pocillos a una concentración de una célula por pocillo. Los clones así seleccionados se estudiaron mediante Southern blot y PCR-RFLP para confirmar que eran portadores del ADNmt en estudio.

3.10. Cultivos celulares

Las células se cultivaron siguiendo protocolos estándar a 37°C y 5% CO₂. Se pasaron cada 2-3 días por tripsinización, mediante diluciones 1/5-1/10. Los medios usados para cada tipo de células fueron los siguientes:

- Medio Fibroblastos
DMEM, 10% FBS, penicilina 100 U/mL y estreptomycinina 100 µg/mL
- Medio Mioblastos
DMEM-F12, 10% FBS, penicilina 100 U/mL y estreptomycinina 100 µg/mL
- Medio 143B TK- ρ⁰ resistente a puromicina
DMEM, 5% FBS, uridina 50 µg/mL, bromodeoxiuridina 100 µg/mL, puromicina 0,4 µg/mL, penicilina 100 U/mL y estreptomycinina 100 µg/mL
- Medio A549 B2 ρ⁰
DMEM, 5% FBS, uridina 50 µg/mL, penicilina 100 U/mL y estreptomycinina 100 µg/mL
- Medio cíbridos fondo nuclear 143B
DMEM, 5% FBS, uridina 50 µg/mL, puromicina 0,4 µg/mL, penicilina 100 U/mL y estreptomycinina 100 µg/mL
- Medio cíbridos fondo nuclear A549
DMEM, 5% FBS, uridina 50 µg/mL, penicilina 100 U/mL y estreptomycinina 100 µg/mL
- Medio glucosa/galactosa
DMEM, 5% FBS, glucosa 2 gr/L, galactosa 2,5 gr/L, penicilina 100 U/mL y estreptomycinina 100 µg/mL. Este medio se uso en experimentos de caracterización metabólica tanto en cíbridos con fondo nuclear 143B como A549.

3.11. Determinación de actividad enzimática de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial.

Todas las medidas se realizaron en un extracto celular total. Se partió de células a una concentración de 15 millones de células/mL en tampón SETH (250mM Sacarosa, 2mM EDTA, 10mM Tris-HCl pH=8, 100 U/L Heparina pH=7.4). A continuación se lisaron mediante sonicación (3 ciclos de 10 segundos a una amplitud de 15 micrones) y se congelaron a -80 °C hasta su

procesamiento. La cantidad de proteínas del extracto celular se determinó utilizando el kit DC Protein Assay (Bio-Rad).

La actividad de las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial fue estudiada mediante espectrofotometría, según técnicas descritas previamente (DiMauro et al 1987) con ligeras modificaciones, usando un espectrofotómetro uv1603 (Shimadzu).

El complejo I (NADH CoQ oxidoreductasa) se determinó midiendo la oxidación del NADH a 340 nm. El medio de reacción contenía tampón fosfato 20 mM pH=8, NADH 0.2 mM, NaN_3 1 mM, BSA-EDTA 0.1 % y CoQ 200 μM . La reacción fue inhibida al 90% tras añadir rotenona 5 μM .

El complejo II (Succinato deshidrogenasa) se determinó monitorizando la reducción del aceptor artificial de electrones 2,6-Diclorofenol-indofenol (DCPIP) a 600 nm. El medio de reacción contenía: succinato 32 mM, tampón fosfato 50 mM pH=7, KCN 1.5 mM, CoQ_1 50 μM y DCPIP 0.1 mM.

El complejo III (ubiquinona-citocromoC oxidorreductasa) fue valorado según la aparición de citocromo c reducido a 550 nm, en una mezcla de reacción que contenía tampón fosfato 50 mM pH=7.5, NaN_3 2 mM, BSA-EDTA 0.1 %, citocromo C 1 mM y decilubiquinol (DBH_2) 50 μM .

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

Todas las reacciones se llevaron a cabo a 30°C excepto la del complejo IV que se incubó a 38°C. Los resultados fueron normalizados frente a la concentración de proteínas del extracto celular.

3.12. Medida de la actividad citrato sintasa

La actividad de este enzima se cuantificó en función del cambio en la absorbancia a 412 nm producida por la reacción de DNTB (ácido 5-5' ditio bis 2-nitrobenzoico) 100 μM con el coenzima A libre formada por la reacción del acetil-CoA (350 $\mu\text{g/mL}$) con el 0.5 mM oxalacetato, en una solución con tampón 75 mM Tris-HCl pH=8 y 0,1% Tritón X-100. Los resultados fueron normalizados frente a la concentración de proteínas del extracto celular.

3.13. Consumo mitocondrial de oxígeno

El consumo de oxígeno se determinó usando técnicas previamente descritas (Hofhaus et al. 1996) con ligeras modificaciones. Las células (1×10^6) fueron sembradas 48 horas antes del experimento en el medio glucosa/galactosa. Fueron tripsinizadas y resuspendidas en 2 mL de medio completo hasta su procesado. Se recogió una alícuota correspondiente a $1,5 \times 10^6$ células, que fue centrifugada a 200xg y las células resuspendidas en 300 μL de medio de respiración compuesto por DMEM sin glucosa, glutamina 2 mM, piruvato sódico 1 mM. El consumo de oxígeno fue medido durante 4 minutos usando un electrodo Oxygraph System (Hansatech). Posteriormente, se añadió

el desacoplante carbonilcianida-3-clorofenilhidrazona (CCCP) 15 μM , continuándose con la medida durante 3 minutos más. Finalmente, para comprobar que el consumo de oxígeno se debía a la respiración celular, se añadió KCN 25 μM .

3.14. Medida de la síntesis de ATP mitocondrial en células

La medida de síntesis mitocondrial de ATP se realizó según la técnica descrita previamente (Manfredi et al. 2001) con ligeras modificaciones. Se sembraron 1×10^6 células 48 horas antes del experimento en el medio glucosa/galactosa. Las células fueron tripsinizadas y resuspendidas en el medio A (150 mM KCl, 25 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, digitonina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0,1% BSA, 10 mM fosfato potásico, 0,1 mM MgCl, 0,15 mM P₁,P₅-diadenosina pentafosfato, pH=7,75) a una concentración de $0,75 \times 10^6$ células/mL. Para cada ensayo dos alícuotas de 250 μL de la suspensión de células se pasaron a dos tubos de 1,5 mL donde se añadieron 750 μL de malato 10 mM, piruvato 10 mM, ADP 1 mM en medio A. Uno de los tubos fue procesado inmediatamente como tiempo 0. El otro fue incubado durante 5 minutos a 37 °C. 50 μL de cada muestra se añadieron a 450 μL de tampón de extracción (100 mM Tris, 4 mM EDTA, pH 7.75) e incubados 2 minutos a 100 °C. Las muestras se enfriaron en hielo y se centrifugaron a 1000xg durante 1 minuto. El sobrenadante se mantuvo en hielo hasta su procesamiento. Para el ensayo de síntesis de ATP se realizó una dilución 1/50 del sobrenadante en tampón de extracción frío. La concentración de ATP se determinó con el kit ATP Bioluminiscent Assay (Sigma) según instrucciones del fabricante.

3.15. Medida del potencial de membrana (Ψ_m)

El potencial de membrana se midió mediante el uso del fluoróforo yoduro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1). JC-1 es un colorante catiónico que atraviesa la membrana interna mitocondrial a favor de gradiente electroquímico, acumulándose en la matriz mitocondrial. Al aumentar la concentración, la emisión pasa del verde (≈ 525 nm) al rojo (≈ 590 nm), siendo la relación fluorescencia roja /fluorescencia verde proporcional al Ψ_m (Reers et al. 1995).

Se sembraron 1×10^6 células 48 horas antes del experimento en medio glucosa/galactosa. El día de la medida las células fueron tripsinizadas y lavadas con PBS 1X. Se incubaron $0,5 \times 10^6$ células con JC-1 2 μM en PBS 1X durante 30 minutos a 37°C, en oscuridad. Como control negativo se realizó en paralelo el experimento en muestras con CCCP 50 μM . Las células fueron lavadas, para eliminar los restos de fluoróforo, y resuspendidas en 500 μL de PBS 1X. Esta muestra fue analizada mediante citometría de flujo en un FacScan (Becton Dickinson). Mediante el uso del software Cell Quest (Becton Dickinson) fueron analizadas 10000 células por muestra.

3.16. Medida de la producción de lactato

Se sembraron 1×10^6 células 48 horas antes del experimento en medio glucosa/galactosa. Se recogió una alícuota de 1 mL del medio que fue desproteínizada con 73 μL de ácido perclórico 60%. La muestra fue centrifugada (14000xg 5 minutos), neutralizada con KOH y centrifugada de nuevo

en las mismas condiciones. La concentración de lactato se determinó usando el kit Lactate Assay Kit (Enzychrom) según instrucciones del fabricante.

3.17. Medida de la masa mitocondrial

La masa mitocondrial fue cuantificada mediante el uso del fluoróforo bromuro de 10-nonil acridina (Naranja de nonil acridina, NAO). Este reactivo se une específicamente a las cardiolipinas presentes en la membrana mitocondrial interna. Se sembraron 1×10^6 células 48 horas antes del experimento en medio glucosa/galactosa. El día de la medida las células fueron tripsinizadas y lavadas con PBS 1X. Se incubaron $0,5 \times 10^6$ células con NAO 40 nM en PBS 1X durante 20 minutos a 37°C en oscuridad. Las células fueron lavadas, resuspendidas en 500 μ L de PBS 1X y se mantuvieron en hielo hasta su procesado (Hoffmann et al. 2004). Esta muestra fue analizada mediante citometría de flujo en un FacScan (Becton Dickinson). Mediante el uso del software Cell Quest (Becton Dickinson) fueron analizadas 10000 células por muestra.

3.18. Medida de la producción de anión superóxido

Para la medida de la producción de anión superóxido mitocondrial se utilizó el reactivo MitoSOX (Molecular Probes) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se sembraron 1×10^6 células 48 horas antes del experimento en medio glucosa/galactosa. El día de la medida las células fueron tripsinizadas y lavadas con PBS 1X. Se incubaron $0,5 \times 10^6$ células con MitoSOX 5 μ M en PBS 1X durante 10 minutos a 37°C en oscuridad. Las células fueron lavadas y resuspendidas en 500 μ L de PBS 1X. Esta muestra fue analizada mediante citometría de flujo en un FacScan (Becton Dickinson). Mediante el uso del software Cell Quest (Becton Dickinson) fueron analizadas 10000 células por muestra.

3.19. Medida de la producción de especies reactivas de oxígeno

Para la medida de la presencia de especies reactivas de oxígeno se usó el reactivo diacetato de 5-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína (Carboxi-H₂DCFDA, Molecular Probes) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se sembraron 1×10^6 células 48 horas antes del experimento en medio glucosa/galactosa. El día de la medida las células fueron tripsinizadas y lavadas con PBS 1X. Se incubaron $0,5 \times 10^6$ células con Carboxi-H₂DCFDA 10 μ M en PBS 1X durante 30 minutos a 37°C en oscuridad. Las células fueron lavadas y resuspendidas en 500 μ L de PBS 1X. Esta muestra fue analizada mediante citometría de flujo en un FacScan (Becton Dickinson). Mediante el uso del software Cell Quest (Becton Dickinson) fueron analizadas 10000 células por muestra.

3.20. Medida de la actividad enzimática de la glutatión peroxidasa

Las células fueron crecidas durante 48 horas en medio glucosa/galactosa antes de ser tripsinizadas, lavadas y resuspendidas a una concentración de 40×10^6 células/mL en PBS 1X. A

continuación se lisaron mediante sonicación (3 ciclos de 10 segundos a una amplitud de 15 micrones) y se congelaron a -80 °C hasta su procesamiento. La cantidad de proteínas del extracto celular se determinó utilizando el kit DC Protein Assay (Bio-Rad).

Para la determinación de la actividad glutatión peroxidasa se utilizó el kit Glutathione Peroxidase Cellular Activity Assay Kit (Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro uv1603 (Shimadzu).

3.21. Cuantificación relativa del ADNmt mediante PCR cuantitativa a tiempo real

La cuantificación relativa del ADNmt frente al ADNn se realizó por PCR a tiempo real usando un equipo 7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). El ADN de las células fue extraído y cuantificado según protocolos descritos con anterioridad. Los oligonucleótidos 12SF y 12SR descritos en el apartado de materiales y la sonda Taqman marcada con FAM (6FAM-5'TGCCAGCCACCGCG3'-MGB) fueron diseñados para el gen 12S del ADNmt mediante el uso del software Primer Express (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). Para la detección del ADNn se usaron una pareja de oligonucleótidos y una sonda marcada con VIC contra el gen nuclear de la RNAsa P (TaqMan RNaseP Control Reagent Kit, Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). Las condiciones de la reacción de amplificación fueron: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. Las curvas de calibración utilizadas para cuantificar el número de copias de ADNmt y ADNn se basaron en la relación lineal entre los puntos de corte de los ciclos y el logaritmo del número de copias inicial.

1. Estudio del gen *POLG* en pacientes con deleciones múltiples del ADN mitocondrial

Una de las líneas de trabajo de nuestro grupo se centra en el estudio de la fisiopatogenia de las enfermedades mitocondriales mediante la identificación y caracterización de mutaciones, tanto en el ADNmt como en genes nucleares, que causan una disfunción de la cadena respiratoria mitocondrial. Dentro de esta línea de trabajo y en colaboración con el grupo del Dr. Arenas del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid, nos planteamos como objetivo la identificación de mutaciones en el gen *POLG* en pacientes con deleciones múltiples en el ADNmt y que no presentan mutaciones en los genes *ANT1* y *C10orf2*.

Para ello se llevó a cabo la secuenciación completa de la zona codificante del gen *POLG* en una serie de 32 pacientes, 23 hombres y 9 mujeres. Tal y como se ha descrito en el apartado de Materiales y Métodos, los criterios para su inclusión en el estudio han sido la presencia en músculo esquelético de deleciones múltiples en el ADNmt, detectadas mediante Southern Blot, asociado a PEO y/o miopatía, incluyéndose también dos casos en los que las deleciones múltiples en el ADNmt estaban asociadas a un cuadro parkinsoniano. En estos pacientes habían sido descartadas previamente mutaciones en los genes *ANT1* y *C10orf2*.

Los criterios que hemos utilizado para definir la patogenicidad de una mutación han sido: i) que la mutación afecte a un sitio conservado en una región funcionalmente relevante, ii) la presencia de mutaciones de patogenicidad establecida cerca de la mutación, y iii) la no presencia de la mutación en un grupo de 100 controles sanos. Como controles sanos se seleccionaron 100 individuos para los que no existía evidencia clínica, histológica o bioquímica de sufrir una miopatía mitocondrial, y con unas características demográficas en cuanto a edad y sexo similares a la de los pacientes incluidos en estudio.

A continuación se detallan los signos clínicos más significativos del fenotipo de los pacientes en los que se identificaron mutaciones en el gen *POLG*, así como las mutaciones halladas en los mismos.

1.1. Paciente 1

La paciente 1 es una mujer de 53 años que desarrolló una ptosis progresiva con debut a los 49 años. El examen neurológico reveló la presencia de ptosis y PEO. Tanto el estudio por resonancia magnética como el electromiograma no mostraron ninguna anomalía. Todos los resultados del estudio bioquímico, incluyendo los valores de creatín quinasa en suero y lactato basal, fueron normales. La histoquímica de la biopsia muscular reveló la presencia de algunas fibras RRF-COX negativas, así como fibras COX negativas aisladas no RRF. El análisis de las actividades de los complejos de la cadena respiratoria reveló un déficit en la actividad del complejo IV. El estudio de

los antecedentes familiares mostró la existencia de una hermana de la paciente diagnosticada de epilepsia mioclónica.

En esta paciente se identificaron dos mutaciones en heterocigosis compuesta. Por un lado, la mutación P587L (c.1760C>T) en la región espaciadora de la proteína, ya descrita previamente, y una nueva mutación c2557C>T en el exón 16 que resulta en el cambio de una arginina por un triptófano en el residuo 853 (R853W) del dominio polimerasa. Este último cambio no fue encontrado en el grupo de 100 controles.

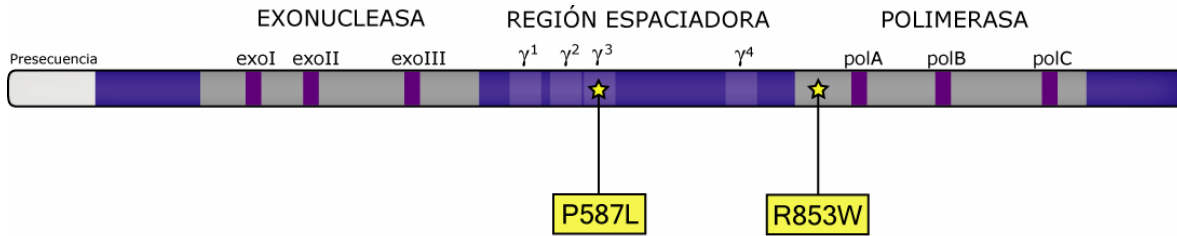


Fig 12. Localización de las dos mutaciones encontradas en la paciente 1. La mutación P587L, ya descrita con anterioridad, afecta al bloque $\gamma 3$ de la región espaciadora, mientras que la mutación R853W se sitúa en el dominio polimerasa de la proteína.

La mutación R853W, afecta a un residuo muy conservado dentro del dominio polimerasa de la proteína, situado a 36 aa del motivo Pol A (Kaguni 2004). Anteriormente se habían descrito mutaciones en dos residuos contiguos a la mutación R853W asociadas a síndrome de Alpers. En uno de los casos se identificó la mutación R852C en *trans* con la mutación A467T (Nguyen et al. 2006), y en el otro la mutación T851A en *trans* con la mutación R1047 (Human DNA Polymerase Gamma Database, <http://dir-apps.niehs.nih.gov/polgl/>). Estos tres residuos están muy conservados en la escala evolutiva, lo que junto a la patogenicidad de las mutaciones parece confirmar su importante papel en la funcionalidad de la enzima.

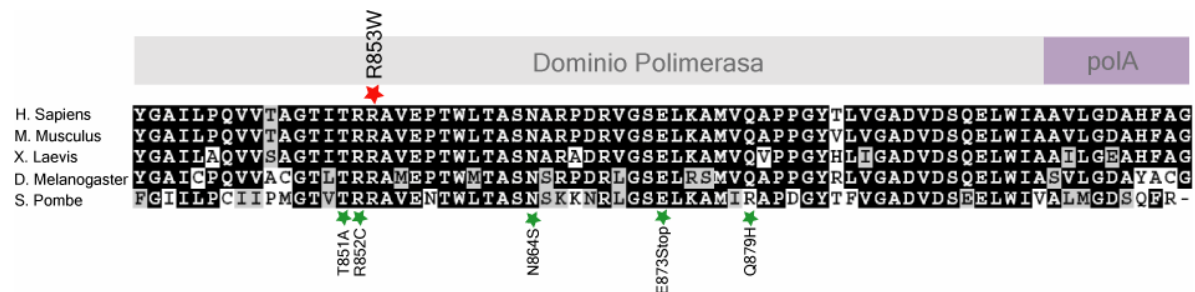


Fig 13. Alineamiento de la subunidad catalítica de la polimerasa gamma en diferentes especies donde se aprecia que la mutación R853W afecta a un residuo muy conservado, así como la presencia de otras mutaciones en posiciones cercanas a la mutación en estudio.

Con posterioridad a este trabajo, la mutación R853W ha sido descrita en heterocigosis con la mutación G737R, en dos hermanas que presentaban un cuadro de enfermedad de Parkinson

precoz (Davidzon et al. 2006). Las pacientes habían heredado la mutación R853W de su madre, que era portadora en heterocigosis pero no presentaba ningún signo patológico, lo que indica un patrón de herencia recesiva.

La mutación P587L, se localiza en la región espaciadora de la subunidad catalítica de la polimerasa γ , dentro del bloque conservado γ^3 , y con anterioridad a este trabajo siempre había sido descrita en *cis* con la mutación T251I (Horvath et al. 2006). Así pues, esta es la primera vez que aparece sin estar asociada a la mutación T251I, lo que permite analizar su papel individual. El hecho de que la mutación R853W haya sido descrita con anterioridad asociada a un patrón de herencia recesivo indica claramente que la mutación P587L es necesaria para el desarrollo de la enfermedad, y por tanto sugiere que se trata de una mutación patogénica.

1.2. Paciente 2

El paciente es un varón de 65 años que fue diagnosticado de ptosis a la edad de 61. El examen clínico mostró ptosis bilateral y PEO. No se observó ningún tipo de anomalía ni en el estudio por resonancia magnética, ni en el estudio de parámetros bioquímicos, que incluía los valores de creatín quinasa y lactato basal. En el estudio ecocardiográfico se apreció una leve hipertrofia auricular. La histoquímica de la biopsia muscular mostró la presencia de fibras RRF-COX negativas, y el estudio de las actividades de los complejos de la cadena respiratoria mostró un déficit único en la actividad del complejo IV.

El paciente es heterocigoto compuesto para las mutaciones alélicas T251I (c.752C>T) y P587L (c.1760C>T), y para la mutación no descrita previamente c.1807A>T en el exón 10, que provoca un cambio de leucina por metionina en la posición 603 (M603L) (Figura 14).

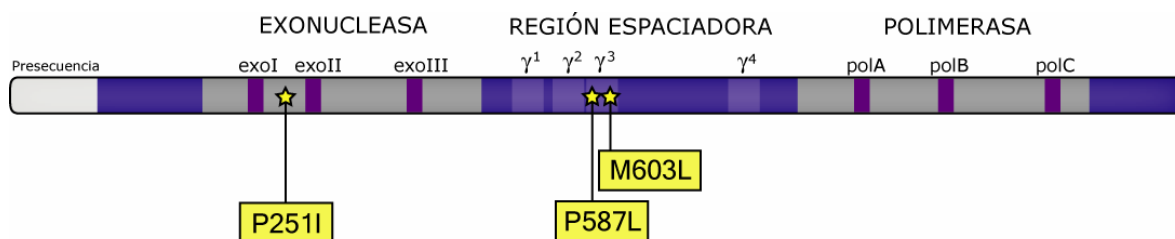


Fig 14. Localización de las tres mutaciones encontradas en la paciente 2. La mutación P587L, ya descrita con anterioridad, afecta al bloque γ^3 de la región espaciadora y es alélica con la mutación P251I, en el dominio polimerasa. La mutación M603L, descrita por primera vez en este trabajo, afecta al bloque γ^3 de la región espaciadora.

La mutación T251I afecta al dominio exonucleasa de la proteína, situándose entre los motivos exo I y exo II. La presentación alélica de las mutaciones T251I y P587L es muy frecuente, encontrándose

en el 1,1% de la población italiana (Horvath et al. 2006). Aunque no está claro cual es el papel relativo de estas mutaciones en la patogenidad del alelo, los datos del paciente 1 indican que la mutación P587L es, muy probablemente, la patogénica primaria. El alelo T251/P587L ha sido encontrado en la gran mayoría de los casos asociado a un patrón de herencia recesiva, y solo en dos casos en la literatura aparece con un posible patrón dominante al ser el único alelo identificado en un paciente con miopatía, bloqueo cardíaco y dolor muscular (Horvath et al. 2006) y en un paciente con PEO e hipoacusia (Di Fonzo et al. 2003).

La mutación M603L ha sido identificada por primera vez en este trabajo y afecta al bloque γ^3 de la región espaciadora. El residuo afectado está conservado en humanos, ratón, pez fugu y *Xenopus*, pero en *Drosophila* y *Saccharomyces* esa posición está ocupada por una leucina, el mismo aminoácido que aparece en el paciente (Figura 15). Este dato podría cuestionar su patogenidad, sin embargo la mutación M603L cumple con todos los criterios comentados con anterioridad. La mutación afecta a una posición conservada en una región funcionalmente relevante de la proteína, ya que se ha descrito que el bloque γ^3 contribuye sustancialmente a la función polimerasa y podría jugar un papel en la unión estable del ADN durante la replicación (Luo and Kaguni 2005). Otras mutaciones descritas en esta región son la ya comentada mutación P587L, la mutación R579W (Filosto et al. 2003b) y la mutación R574W (Kollberg et al. 2006), todas ellas con un patrón de herencia recesivo. Además, la mutación M603L no ha sido identificada en controles. Todos estos datos confirman la implicación de la misma en el desarrollo de la enfermedad de este paciente, y sugieren que se trata de una mutación patogénica.

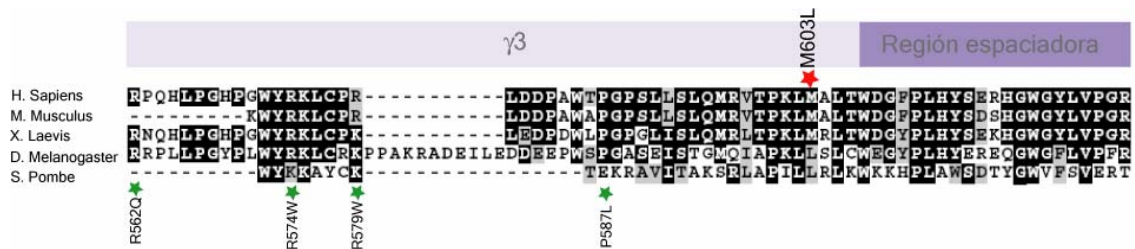


Fig 15. Alineamiento de la subunidad catalítica de la polimerasa gamma en diferentes especies donde se aprecia que la mutación M603L afecta a un residuo conservado, así como la presencia de otras mutaciones que afectan también al bloque γ^3 de la región espaciadora.

1.3. Paciente 3.

La paciente 3 es una mujer de 54 años que padecía un síndrome neurológico caracterizado por ptosis bilateral, PEO y debilidad muscular. A los 36 años el examen neurológico mostraba ptosis bilateral, PEO, y debilidad proximal y distal que afectaba a brazos y piernas. A esa edad la paciente comenzó a tener problemas para caminar, que le han conducido en la actualidad a un estado de semiinvalidez. Los resultados del electromiograma mostraban un perfil miopático, encontrándose

en el estudio bioquímico unos niveles de creatín quinasa elevados, con unos niveles basales de lactato normales. En el análisis histoquímico de la biopsia muscular se identificaron fibras RRF-COX negativas y RRF no COX negativas aisladas. El estudio de las actividades de los complejos de la cadena respiratoria reveló un defecto combinado de los complejos I y III.

La secuenciación del gen *POLG* en la paciente 3 reveló la presencia de las mutaciones c.1402A>G en el exón 7, que produce el cambio N468D, y la mutación no descrita c.3550G>A, que conduce al cambio de un ácido aspártico por una asparragina en la posición 1184 (D1184N), en heterocigosis compuesta (Figura 16). No se encontró esta mutación en la serie de controles.

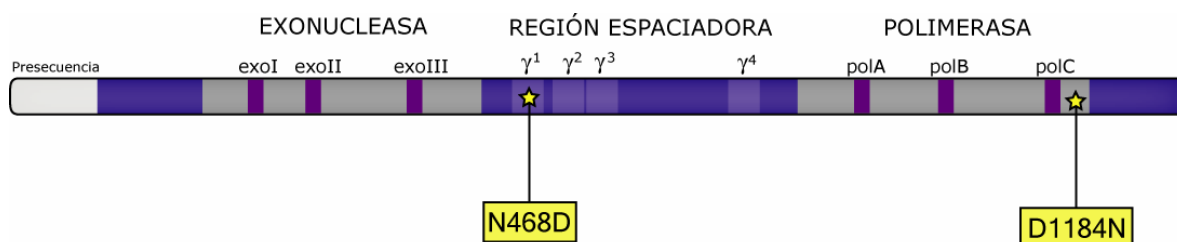


Fig 16. Localización de las dos mutaciones encontradas en la paciente 3. La mutación N468D, ya descrita con anterioridad, afecta al bloque γ^1 de la región espaciadora. La mutación D1184N, descrita por primera vez en este trabajo, afecta al dominio polimerasa de la proteína.

La mutación N468D afecta a un residuo conservado del bloque γ^1 de la región espaciadora de la proteína. Afecta al residuo adyacente a la mutación A467T, una de las más frecuentes y estudiadas del gen *POLG*. En un estudio previo, esta mutación había sido descrita en una familia que presentaba PEO, parkinsonismo y menopausia precoz (P. Luoma et al. 2004). La mutación N468D aparecía en heterocigosis compuesta con la mutación A1105T en el dominio polimerasa, en una presentación genotípica similar a la encontrada en nuestro caso. En este trabajo se describe cómo los miembros de esta familia portadores únicamente de la mutación N468D no presentaban fenotipo. En el mismo estudio, la mutación A1105T se identificó en otra familia con un patrón de herencia dominante, lo cual ponía en duda el papel de la mutación N468D en la patogénesis de la enfermedad.

Sin embargo, el fenotipo encontrado en la familia heterocigota compuesta N468D/A1105T se manifiesta con mayor severidad clínica que el encontrado en la familia portadora únicamente de la mutación A1105T. En este último caso no existe menopausia precoz y la aparición del cuadro de parkinsonismo aparece en la séptima década de edad, mientras que en la familia anterior este cuadro se manifestaba en la tercera década. Estos datos sugieren que la mutación N468D podría estar actuando como modificador fenotípico en la expresión de la mutación A1105T.

En nuestro caso la mutación N468D está acompañada por la mutación D1184N. Esta mutación se ha identificado por primera vez en este paciente y afecta a un residuo muy conservado

del dominio polimerasa de la proteína, localizado a 43 residuos del motivo PolC (Figura 17). Con posterioridad a nuestro estudio, la mutación D1184N ha sido identificada en heterocigosis compuesta con la mutación R227W en dos hermanos, que murieron a los 26 y a los 43 meses de vida, asociada a un cuadro clínico muy severo de disfagia, hipotonía, retraso psicomotor y afección gastrointestinal (de Vries et al. 2007). Curiosamente una mutación muy cercana a la D1184N, la S1176L, también ha sido descrita en heterocigosis con la mutación R227W, pero en este caso asociada a un fenotipo mucho menos severo de PEO (Lamantea et al. 2002). Otra mutación cercana a la D1184N, la K1191N, ha sido descrita asociada a la mutación A467T en un cuadro de síndrome de Alpers (Horvath et al. 2006).

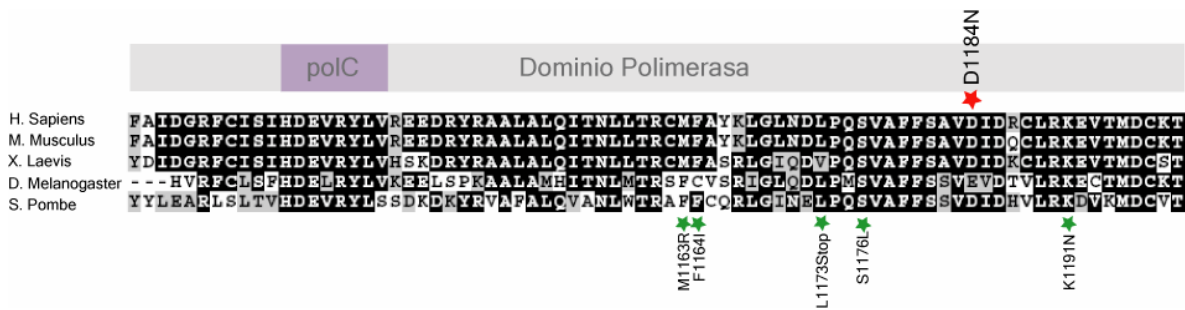


Fig 17. Alineamiento de la subunidad catalítica de la polimerasa gamma en diferentes especies donde se aprecia que la mutación D1184N afecta a un residuo muy conservado, así como la presencia de otras mutaciones que afectan a posiciones cercanas a esta mutación.

1.4. Paciente 4

El paciente 4 es un varón de 24 años cuya enfermedad debutó a los 17 con ptosis y PEO. El resultado del examen neurológico señalaba la presencia de ptosis bilateral, PEO, parestesia e insensibilidad en las piernas y ausencia de reflejos tendinosos. El electromiograma mostró un perfil combinado con signos de afección miogénica y neurogénica. Los niveles de creatín quinasa estaban elevados, mientras que los niveles basales de lactato eran normales. En el análisis histoquímico de la biopsia muscular se identificaron fibras RRF-COX negativas.

En este paciente se identificó una única mutación en el gen *POLG*, la mutación c.803G>C (G268A), que afecta a un residuo muy conservado del motivo Exo II en el dominio exonucleasa de la proteína. Esta mutación ha sido descrita con anterioridad asociada a la mutación A467T en un paciente con PEO y en homocigosis en una paciente con PEO, ptosis, retinopatía pigmentaria y debilidad muscular (Di Fonzo et al. 2003), en ambos casos con un patrón de herencia recesiva.

Estos datos, junto al hecho de que no hayan sido descritas hasta la fecha mutaciones dominantes en el dominio exonucleasa de la proteína parece poner en duda que esta mutación sea la única causa del fenotipo encontrado en este paciente.

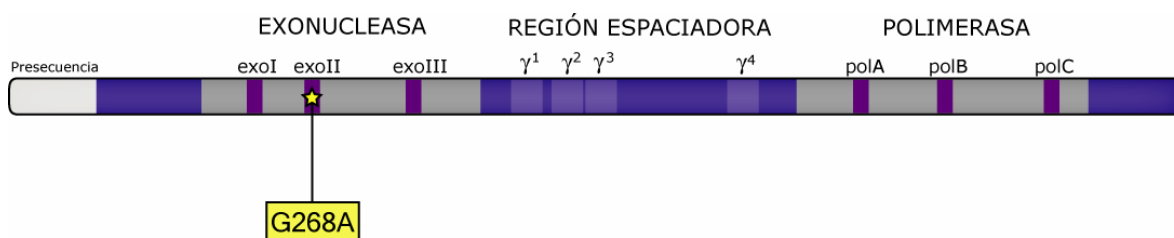


Fig 18. Localización de la mutación encontrada en el paciente 4. La mutación G268A, ya descrita con anterioridad, afecta al motivo exo II del dominio exonucleasa.

1.5. Paciente 5.

El paciente es un varón de 22 años que refiere un adelgazamiento progresivo del gemelo de la pierna izquierda con inicio a la edad de 18 años. El único hallazgo significativo encontrado en la exploración clínica es la disminución de la masa muscular del gemelo izquierdo. La histoquímica de la biopsia muscular es normal, encontrándose en el estudio por microscopía electrónica la presencia de mitocondrias de mayor tamaño del normal, pero morfológicamente normales. El estudio de los complejos de la cadena respiratoria reveló un déficit del complejo I y un aumento de la actividad citrato sintasa, indicando un posible aumento de la masa mitocondrial.

En este paciente se identificó la mutación c.3436C>T que se traduce en el cambio de una arginina por una cisteína en la posición 1146 (R1146C), en el dominio polimerasa de la proteína, muy próximo al motivo Pol C (Figura 19). Esta mutación aparece en las bases de datos clasificada como polimorfismo, indicándose que está presente en el 1% de la población de los EEUU (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>). Sin embargo, no fue encontrada en nuestro grupo control y, como posteriormente se comentará en la discusión, su clasificación como polimorfismo es bastante dudosa.

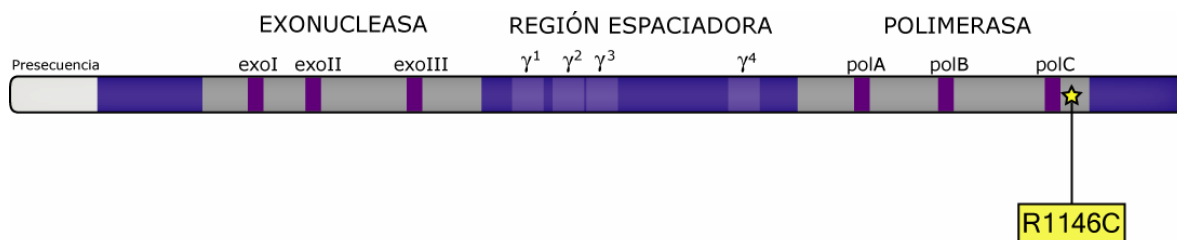


Fig 19. Localización de la mutación encontrada en el paciente 5. La mutación R1146C afecta al motivo al dominio polimerasa de la proteína, en una región muy cercana al motivo polC.

La mutación R1146C está muy próxima a la E1143G que, a pesar de ser considerada un polimorfismo presente en el 3% de la población en EEUU (Horvath et al. 2006), se encuentra con frecuencia en pacientes con enfermedades mitocondriales, ha sido señalada como modificador fenotípico de otras mutaciones de *POLG* y demostrada su no neutralidad sobre las propiedades de la enzima (S. S. Chan et al. 2006).

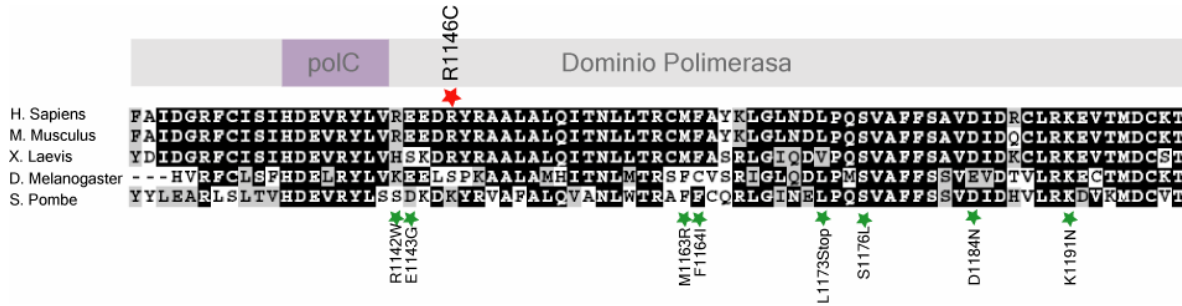


Fig 20. Alineamiento de la subunidad catalítica de la polimerasa gamma en diferentes especies donde se aprecia la conservación del residuo afectado por la mutación R1146C, así como la presencia de otras mutaciones que afectan a posiciones cercanas a este residuo.

1.6. Paciente 6.

El paciente 6, un varón de 55 años, presentó un cuadro de ptosis bilateral, debilidad muscular generalizada e hipoacusia desde la edad de 33 años. El examen clínico del paciente muestra ptosis bilateral y oftalmoparesis, debilidad muscular generalizada acompañada de atrofia, más predominante en los músculos distales, y disminución de la sensibilidad en ambas manos. El paciente presentaba ausencia de reflejos tendinosos profundos. El estudio electrofisiológico revelaba una polineuropatía sensitivomotora axonal periférica severa. La histoquímica de la biopsia muscular mostró la presencia de fibras RRF-COX negativas. No se encontraron valores anormales en el estudio de las actividades de los complejos de la cadena respiratoria, ni en el perfil bioquímico. Una hermana del paciente presentaba un cuadro de PEO, debilidad muscular y convulsiones, muriendo a la edad de 38 años. La necropsia mostró hallazgos consistentes con una miopatía mitocondrial.

El paciente 6 es homocigoto para la mutación A467T (c.1396G>A). Se ha encontrado que esta mutación está presente en un 0,6 % de la población en Bélgica, y en un 0,69%, 0,17% y 0,19% de los alelos estudiados en Gran Bretaña, Finlandia y Alemania respectivamente, siendo una de las causas más frecuentes de enfermedad mitocondrial (Horvath et al. 2006). La gran variedad de fenotipos clínicos asociados a esta mutación, con frecuencia muy severos, han hecho que sea una de las más estudiadas, y se ha caracterizado con cierto detalle su efecto sobre las propiedades de la enzima, una evidencia experimental que ha demostrado claramente su patogenicidad (S. S. Chan et al. 2005a; P. T. Luoma et al. 2005) .

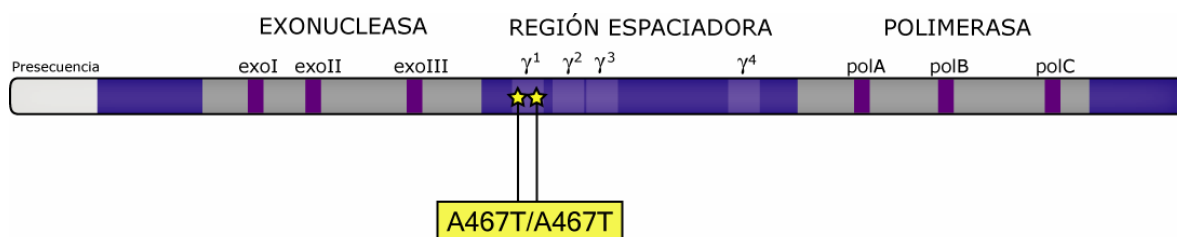


Fig 21. Localización de la mutación A467T en la proteína. El paciente resultó homocigoto para la mutación A467T, que afecta al bloque γ^1 de la región espaciadora de la proteína.

El fenotipo asociado a esta mutación en su presentación homocigótica es muy variado, tanto en relación a los tejidos afectados como en la gravedad del cuadro clínico, que puede variar entre el síndrome de Alpers en las primeras semanas de vida o PEO con debut en la edad adulta (Hudson and Chinnery 2006).

En resumen, en este trabajo y dentro del objetivo centrado en la identificación y caracterización de nuevas mutaciones en genes implicados en patología mitocondrial, se ha secuenciado el gen que codifica para la subunidad catalítica de la polimerasa y mitocondrial en 32 pacientes con signos compatibles con enfermedad mitocondrial asociada a la presencia de deleciones múltiples en el ADNmt.

En la tabla 1 se resume el genotipo de los 6 pacientes con mutaciones en el gen *POLG*.

Genotipo		
Paciente	Alelo 1	Alelo2
1	P587L	R853W
2	T251I + P587L	M603L
3	D1184N	N648D
4	G268A	
5	R1146C	
6	A467T	A467T

Tabla 1. Genotipo de los pacientes positivos para mutaciones en *POLG*

En la tabla 2 se resumen las características clínicas más destacables de estos 6 pacientes, cuyo rasgo más significativo es la presencia de PEO como diagnóstico principal en todos, menos en el paciente 5, que presenta exclusivamente una atrofia muscular en el gemelo izquierdo.

Paciente/ Sexo	Edad debut	Clínica	Cadena respiratoria	Bioquímica	Histoquímica
1/F	49	PEO, ptosis	Déficit C IV	Normal	RRF-COX negativas
2/M	61	PEO, ptosis e hipertrofia auricular	Déficit C IV	Normal	RRF-COX negativas
3/F	32	PEO, tetraparesis	Déficit CI y CIII	CK elevada	RRF-COX negativas, RRF no COX negativas
4/M	17	PEO, neuropatía sensitivomotora	Sin datos	CK elevada	RRF-COX negativas
5/M	18	Atrofia muscular en gemelo izquierdo	Aumento CS	Normal	
6/M	33	PEO, ptosis, debilidad muscular, neuropatía sensitivomotora y sordera	Normal	Normal	RRF-COX negativas

Tabla 2. Tabla resumen de los hallazgos clínicos encontrados en los pacientes con mutaciones en el gen *POLG*.

Hemos identificado mutaciones en 6 pacientes de los 32 estudiados, lo que supone un 19%. Prácticamente todas las mutaciones se identificaron en pacientes con PEO, siendo el porcentaje de pacientes con mutaciones en el gen *POLG* en este último grupo del 38,5% (5 de un total de 13 pacientes con PEO). Estos porcentajes están en consonancia con los encontrados en otros estudios similares publicados simultáneamente a este estudio (Tabla 3). En el trabajo publicado por Di Fonzo y colaboradores, sobre un total de 31 pacientes, de los cuales 23 presentaban un cuadro clínico de PEO aislado o PEO y miopatía, se identificaron mutaciones en 8 pacientes (25,8%), todos ellos del grupo de pacientes con PEO (34,8%, 8 de 23) (Di Fonzo et al. 2003). En otro trabajo similar Agostino y colaboradores describen la presencia de mutaciones en *POLG* en un 25% de pacientes con PEO esporádica (Agostino et al. 2003)

En el estudio realizado en el presente trabajo, hemos identificado 4 mutaciones que no habían sido descritas previamente: la mutación c2557C>T en el exón 16 que resulta en el cambio de una arginina por un triptófano en el residuo 853 (R853W), la mutación c.1807A>T en el exón 10, que resulta en un cambio de leucina por metionina en la posición 603 (M603L), la mutación

c.3550G>A, que conduce al cambio de un ácido aspártico por una asparagina en la posición 1184 (D1184N) y la mutación c.3436C>T que se traduce en el cambio de una arginina por una cisteína en la posición 1146 (R1146C).

	Nuestro estudio	Agostino et al	Di Fonzo et al
Numero de pacientes	32	27	31
PEO	13	27	23
Miopatía aislada	9		7
Otros	10		1
Pacientes POLG +	6	7	8
PEO	5	7	8
Miopatía aislada	1		
Otros			
% POLG +	19,3	25,9	25,8
% POLG + en PEO	38,5	25,9	34,8

Tabla 3. En esta tabla se muestra la comparación de los resultados obtenidos en el presente trabajo con los obtenidos en dos trabajos con diseño y objetivos similares. POLG +: pacientes con mutaciones en el gen *POLG*

2. Caracterización de las mutaciones A8347G y A8296G del gen *mtARNt^{Lys}* mitocondrial

El estudio del mecanismo patogénico de las enfermedades producidas por mutaciones en el ADNmt y en particular en los genes que codifican los ARNt mitocondriales (Zifa et al. 2007), es uno de los campos dentro de la patología mitocondrial dónde más esfuerzos se han realizado en los últimos años. Estos estudios ilustran la dificultad para establecer relaciones entre el genotipo y el fenotipo en pacientes con enfermedad mitocondrial, así como para conocer los mecanismos moleculares y bioquímicos subyacentes a estas patologías (Schapira 2006). En particular, es fundamental poder establecer con claridad la patogenicidad de los diferentes cambios en el ADNmt que se encuentran en familias que padecen una enfermedad mitocondrial, y distinguirlos de polimorfismos, a veces privados, y posiblemente o no relacionados, o relacionados indirectamente con la misma.

En este contexto, y como se ha comentado previamente, una de las líneas de trabajo de nuestro laboratorio se centra en la caracterización de mutaciones en el ADNmt causantes de enfermedad mitocondrial. Dentro de esta línea, nos planteamos dos objetivos diferentes. En primer

En segundo lugar nos planteamos profundizar en el estudio de los efectos de la mutación A8296G sobre la función mitocondrial. Para ello hemos analizado la posible influencia de los fondos mitocondrial y nuclear en la expresión de esta mutación. Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio estudiando cíbridos homoplásmicos para el cambio A8296G habían cuestionado su patogenicidad (Bornstein et al. 2002). Dichos estudios se realizaron a partir de fibroblastos de un paciente con fenotipo MERRF que portaba las mutaciones G8363A y A8296G en el ARN^{t^{Lys}} sobre un fondo mitocondrial L1c. El estudio demostró con claridad la patogenicidad de la mutación A8363G (L1c), pero no se encontró ningún defecto en el sistema OXPHOS en los cíbridos portadores de la mutación A8296G (L1c) (Arenas et al. 1999; Bornstein et al. 2005).

2.1. Caracterización de la mutación A8347G del gen *mtRNA^{Lys}*

La mutación A8347G fue identificada en un paciente japonés que presentaba un cuadro de posible encefalomiopatía mitocondrial. Mioblastos obtenidos a partir de una biopsia muscular de este paciente por el grupo del profesor Goto, nos fueron amablemente cedidos para el estudio y caracterización de dicha mutación. Simultáneamente a la realización de este trabajo se publicó por un grupo diferente la presencia de esta mutación en un paciente con ptosis palpebral y miopatía, aunque en dicho trabajo no se han realizado estudios que demuestren la implicación directa de la mutación A8347G en la enfermedad (Brinckmann et al. 2007).

En nuestro estudio, como control positivo de patogenicidad hemos utilizado una línea de cíbridos portadora de la mutación G8363A del *mtRNA^{Lys}*. Esta línea había sido generada y extensamente caracterizada con anterioridad en nuestro laboratorio. Dicha mutación produce un severo defecto en la biosíntesis de proteínas que conduce a una casi completa ausencia de actividad OXPHOS (Bornstein et al. 2005). Como control negativo hemos utilizado una línea portadora de un ADN_{mt} control de un individuo sano perteneciente al mismo haplogrupo mitocondrial que el paciente (haplogrupo B). Estas tres líneas se generaron sobre el fondo nuclear 143B y fueron comparadas a su vez con la línea parental 143B y con la línea ρ^0 143B 206.

2.1.1. Generación de cíbridos portadores de la mutación A8347G en homoplasmia

Para la generación de cíbridos, tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos, se partió de los mioblastos del paciente portador de la mutación A8347G, que una vez enucleados mediante el uso de citocalasina, fueron fusionados con la línea 143B ρ^0 . La selección se basó en la auxotrofia por uridina de las células carentes de ADN_{mt}, ausente en el medio de selección, así como la resistencia de las líneas portadoras del núcleo 143B TK- a la presencia de bromodeoxiuridina en el medio, tóxica para cualquier célula no portadora de dicho núcleo.

Tras un periodo de selección de 15 días, se seleccionaron 30 clones a partir de célula única y se comprobó la presencia de ADN_{mt} mediante Southern Blot y la presencia de la mutación A8347G mediante PCR-RFLP tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. Se obtuvieron

12 clones homoplásmicos para la mutación A8347G. Se realizaron medidas de las actividades de la cadena respiratoria y consumo de oxígeno de dos clones seleccionados al azar comprobándose que no existían diferencias entre ellos, por lo que se decidió usar un único clon para este estudio.

Este proceso se repitió en el caso de la línea control, a partir de mioblastos de un paciente sin evidencia clínica, histológica o bioquímica de sufrir una miopatía mitocondrial, portador de un ADNmt perteneciente al mismo haplogrupo mitocondrial que la línea A8347G (B). En este caso además de comprobar la presencia de ADNmt por Southern Blot, se secuenció la región hipervariable HVS-1 y se comparó con la de los mioblastos originales para comprobar que los híbridos eran portadores del mismo ADNmt. Adicionalmente se secuenciaron completamente todos los ADNmt, en el grupo del Dr. Goto (control y A8347G) o en el nuestro (A8363G y parental, perteneciente al haplogrupo H) con objeto de descartar la presencia de mutaciones adicionales. En todos los casos los cambios detectados fueron polimorfismos previamente descritos o cambios silenciosos.

2.1.2. Medida de la masa mitocondrial

El primer paso en la caracterización de la línea portadora de la mutación A8347G fue comprobar que no existían diferencias en la cantidad total de mitocondrias por célula (masa mitocondrial), entre la línea A8347G y los controles, que pudieran posteriormente afectar a la interpretación del resto de los parámetros funcionales.

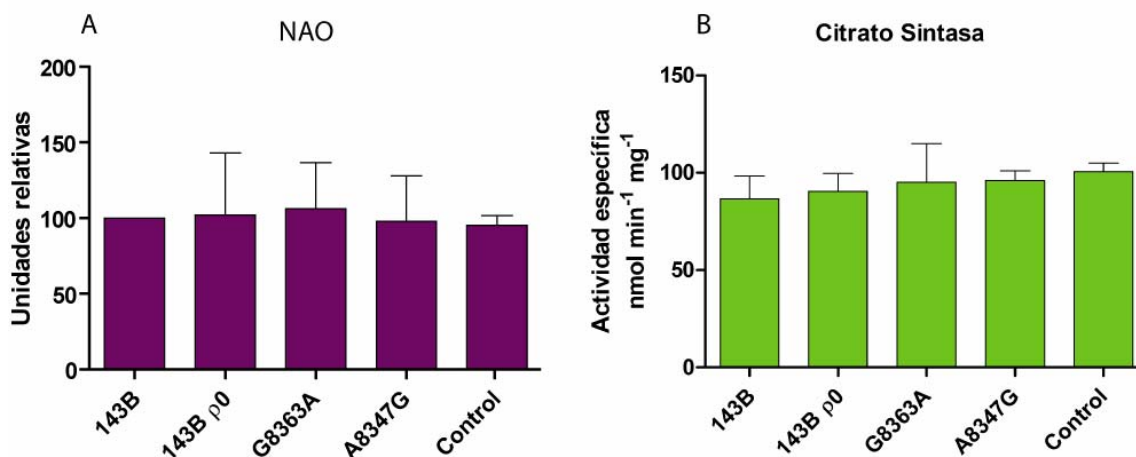


Figura 24. La gráfica representa los resultados obtenidos mediante el uso de NAO (A), los resultados se expresan en unidades relativas normalizadas frente al valor obtenido para 143B en tres medidas independientes. En B se muestran los resultados de la medida de la actividad citrato sintasa en las cinco líneas analizadas.

Para valorar la masa mitocondrial se emplearon dos técnicas distintas. Por una parte se empleó la sonda fluorescente NAO. Esta sonda se une específicamente a las cardiolipinas de la membrana interna mitocondrial de una manera independiente del estado energético de la mitocondria, siendo un marcador de la superficie de membrana mitocondrial por célula (Maftah et

al. 1989). Además se midió la actividad citrato sintasa. La actividad de esta enzima del ciclo de Krebs localizada en la matriz mitocondrial es considerada por la mayoría de los autores un buen marcador de la masa mitocondrial (DiDonato et al. 1993)

Como se puede observar en la figura 24, no se encontraron diferencias significativas en la masa mitocondrial por ninguno de los dos métodos empleados, entre las tres líneas de cíbridos, ni entre estas y las líneas parental y ρ^0 . Por tanto, todas las líneas utilizadas en este estudio contienen una cantidad equivalente de mitocondrias.

2.1.3. Cuantificación del ADNmt en las diferentes líneas celulares

Continuando con la caracterización de las diferentes líneas celulares se valoró mediante PCR cuantitativa a tiempo real la cantidad de ADN mitocondrial presente en cada una de ellas.

La cuantificación del ADNmt reveló diferencias significativas entre las diferentes líneas celulares. En primer lugar las tres líneas de cíbridos presentan una menor cantidad de ADNmt que la línea parental, apuntando que en el proceso de repoblación que se produce durante la generación de los cíbridos no se alcanzan los niveles iniciales de ADNmt. En la comparación de la cantidad de ADNmt entre las tres líneas de cíbridos, se encontró que la línea A8347G presenta una cantidad de ADNmt similar a la encontrada en la línea control, que contiene un ADNmt del mismo haplogrupo B. Este dato valida el uso de esta línea como un control adecuado para estudiar la posible patogenicidad de la mutación A8347G.

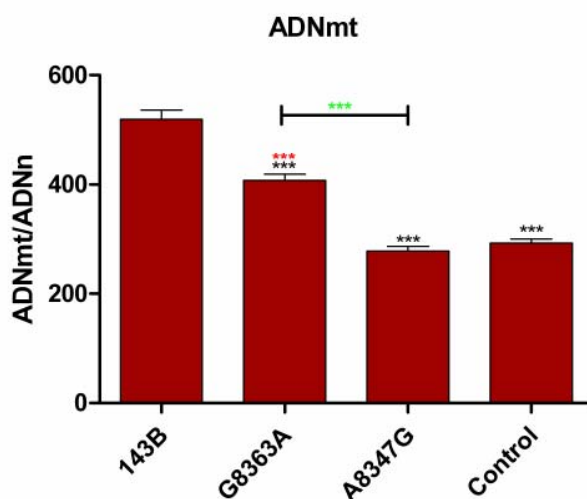


Fig 25. Resultados de la cuantificación de la cantidad de ADNmt. En negro se muestra la significación de las diferencias en la cantidad de ADNmt con respecto a la línea parental 143B ($p < 0.01$), en rojo las diferencias entre las dos líneas portadoras de mutación y la línea control ($p < 0.01$), y en verde las diferencias entre las dos líneas portadoras de mutaciones ($p < 0.01$)

Por otra parte los resultados muestran que la línea G8363A, usada como control de patogenicidad, posee una cantidad significativamente mayor de ADNmt que las otras dos líneas de

cíbridos. Dado que esta línea es portadora de un ADNmt de un haplogrupo diferente, además de una mutación de patogenicidad demostrada, esta diferencia podría ser explicada en función del diferente fenotipo bioquímico asociado a los diferentes ADNmt que portan cada una de las líneas.

2.1.4. Estudio de las actividades de los complejos de la cadena respiratoria

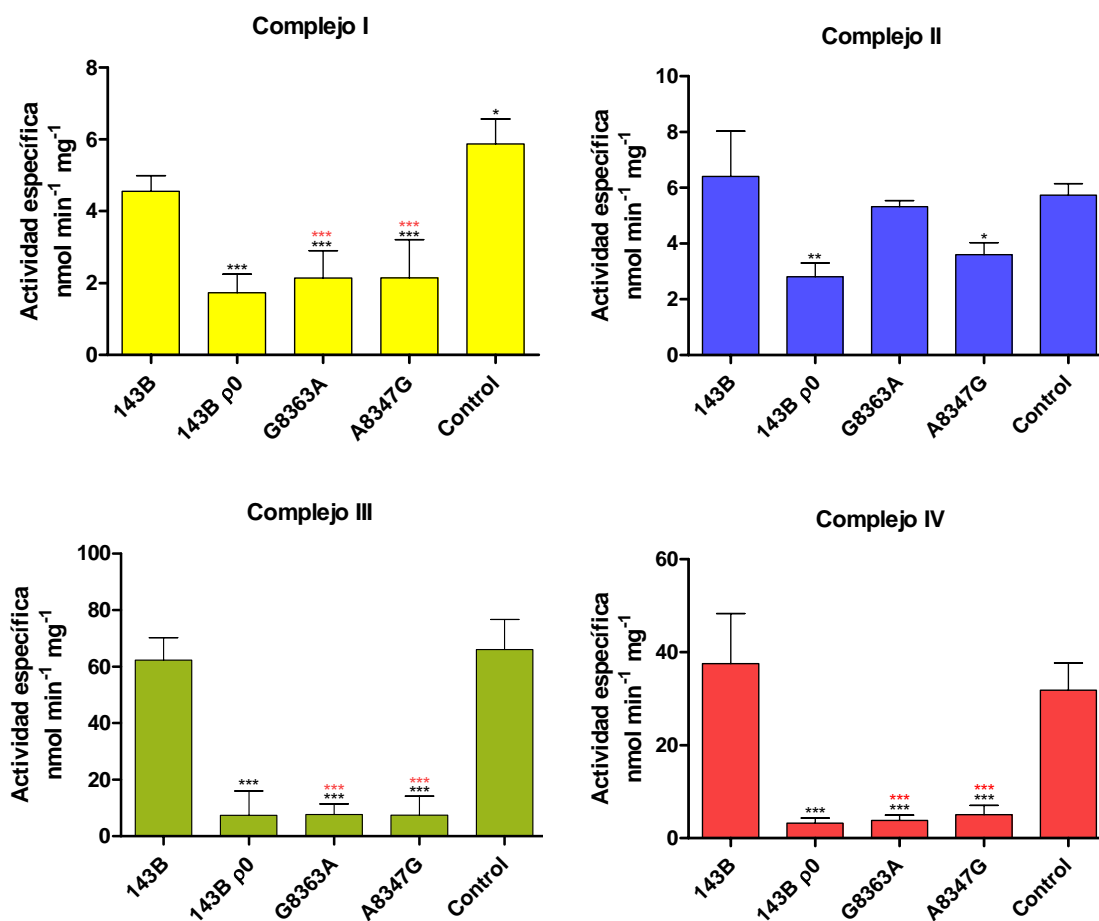


Fig 26. Las gráficas representan las actividades específicas de los complejos I, II, III y IV de la cadena respiratoria en las líneas en estudio. El grado de significación estadística se muestra como *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$. En negro cuando se comparan con la línea parental 143B y en rojo comparadas con la línea control.

La medida de los complejos de la cadena respiratoria reveló un claro defecto en la actividad de los complejos I, III y IV en la línea A8347G. Estos datos, muy similares a los encontrados en el control patogénico G8363A y la línea ρ^0 demuestran claramente que la mutación A8347G produce un defecto en el sistema OXPHOS. El hecho de que en el complejo I se observe actividad en las líneas ρ^0 , G8363A y A8347G, parece deberse más a un defecto en la actividad inhibitora de la rotenona utilizada, que a la presencia de actividad del complejo I en estas líneas. Por tanto, es muy

probable que la actividad observada en estas tres líneas corresponda con el fondo para esta técnica.

Los valores de la actividad del complejo II en las líneas ρ^0 y A8347G son significativamente más bajos que los observados en las líneas 143B, G8363A y control, a pesar de que sus cuatro subunidades están codificadas en el ADNn. Este comportamiento podría reflejar diferencias en el metabolismo de estas líneas, dado que la succinato deshidrogenasa además de formar parte de la cadena de transporte electrónico forma parte del ciclo de ácidos tricarbóxicos o ciclo de Krebs.

2.1.5. Estudio funcional de la actividad OXPHOS

Como complemento a los datos obtenidos en la medida de los complejos de la cadena respiratoria se realizó una valoración funcional de la actividad OXPHOS midiendo la capacidad de síntesis mitocondrial de ATP y el consumo de oxígeno, tanto acoplado como desacoplado. Dado que el mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial requiere una correcta función OXPHOS, y por lo tanto es una medida indirecta de la función mitocondrial, se midió mediante el uso de la sonda JC-1.

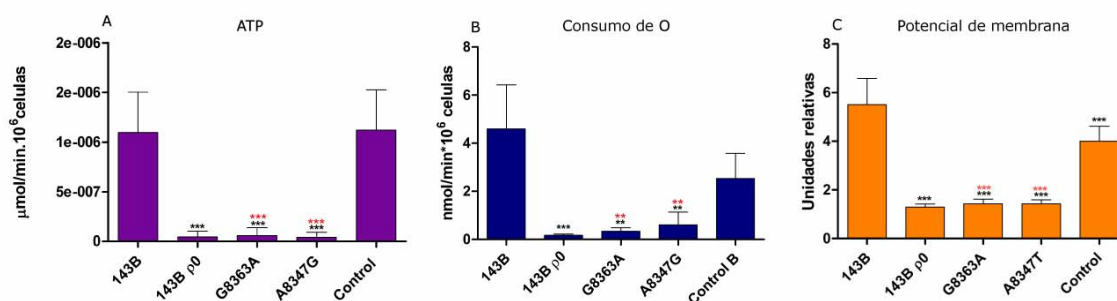


Fig 27. Resultados de la medida de la síntesis mitocondrial de ATP (A), el consumo de O_2 acoplado (B), y la medida del potencial de membrana (C). En los tres casos el grado de significación estadística se muestra como *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$. En negro cuando se comparan con la línea parental 143B y en rojo comparadas con la línea control.

Los datos mostraron claramente que la capacidad de síntesis de ATP mitocondrial, así como el consumo de oxígeno acoplado y el potencial de membrana mitocondrial estaban muy disminuidos en la línea portadora de la mutación A8247G, alcanzando niveles muy semejantes a la línea G8363A e incluso a la línea 143B ρ^0 . Estos resultados demuestran que los cíbridos portadores de la mutación A8347G son incapaces de desarrollar una correcta función OXPHOS, confirmando la patogenicidad de dicha mutación.

2.1.6. Medida de la producción de lactato y niveles de PDK-1

Nuestro siguiente objetivo fue determinar si la ausencia de un sistema OXPHOS funcional y por lo tanto la incapacidad de obtener ATP mediante esta vía, activaba la obtención de ATP a través de la glicólisis y de la transformación final de piruvato en lactato. Para ello en un primer paso se

determinó la producción de lactato en las diferentes líneas celulares. En la figura 28 se puede apreciar claramente que la línea A8347G presenta un aumento significativo en la producción de lactato, tanto si se compara con la línea parental ($p < 0.05$) como con el control ($p < 0.001$). Este aumento del flujo glucolítico es incluso superior al encontrado en la línea G8363A, que presenta también mayor actividad que las líneas 143B y control, pero sin alcanzar valores estadísticamente significativos.

Es interesante señalar que la presencia de un metabolismo glucolítico más activo en las líneas ρ^0 y A8347G frente a las líneas G8363G y control, correlaciona con la menor actividad del complejo II observada en estas líneas, sugiriendo que poseen una menor cantidad de las enzimas del ciclo de Krebs, y por lo tanto de la succinato deshidrogenasa.

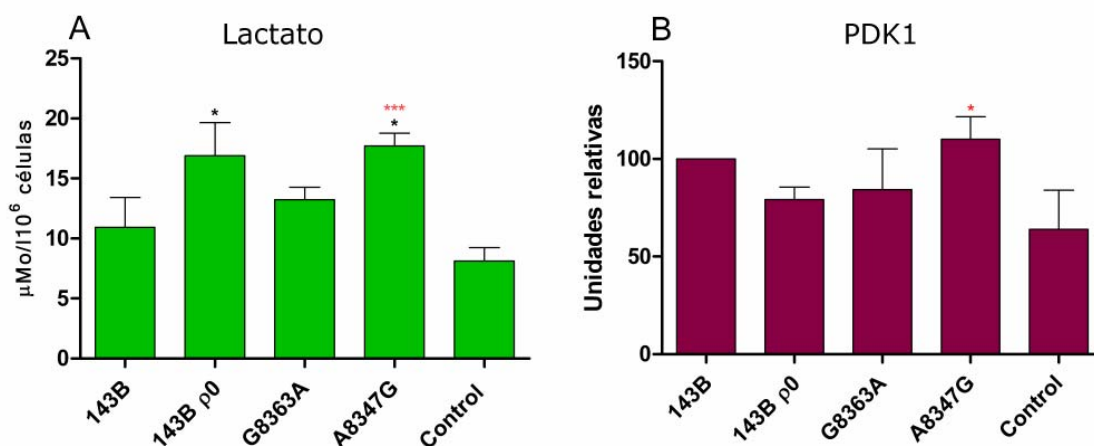


Fig 28. La gráfica A muestra los resultados de la medida de la producción de lactato en las diferentes líneas. La gráfica B los resultados de los niveles de PDK-1, en unidades relativas frente al nivel de la línea parental 143B. El grado de significación estadística se muestra como *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$. En negro cuando se comparan con la línea parental 143B y en rojo comparadas con la línea control.

Para profundizar en el análisis del cambio metabólico hacia glicólisis se evaluaron los niveles de piruvato deshidrogenasa quinasa 1 (PDK1) en las diferentes líneas celulares. La piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK) regula el cambio de metabolismo aerobio a anaerobio mediante la fosforilación e inactivación de la piruvato deshidrogenasa, impidiendo la transformación del piruvato en acetil-CoA y por lo tanto su entrada en el ciclo de Krebs (Sugden and Holness 2003). Los niveles de PDK1 en la línea A8347G fueron significativamente más altos que los encontrados en la línea control. Estos niveles también fueron mayores que los encontrados en la línea G8363A. Por tanto existe una concordancia entre los niveles de lactato y de PDK1 en las líneas A8347G comparado con las líneas G8363A y control.

Estos resultados sugieren que a pesar de que ambas mutaciones producen un defecto similar en la capacidad OXPHOS de producción de ATP, la respuesta celular a ese defecto es

diferente en ambas líneas, siendo el cambio a metabolismo glucolítico observado mayor en la línea A8347G que en la línea G8363A.

2.1.7. Medida de la producción de especies reactivas de oxígeno

Diversas evidencias experimentales sugieren que las mutaciones en el ADNmt pueden inducir un incremento en la producción ROS, jugando este incremento un importante papel en la patogénesis de las enfermedades mitocondriales. Así mismo existen evidencias de que el aumento de ROS es un fenómeno que depende en gran medida del gen afectado (Vives-Bauza et al. 2006).

Con objeto de estudiar los niveles de ROS en estas líneas, así como la respuesta celular a los posibles aumentos en su producción, se determinaron la producción de anión superóxido mediante el uso de la sonda MitoSox, los niveles celulares de H_2O_2 mediante el uso de la sonda carboxi- H_2DCFDA , los niveles de superóxido dismutasa mitocondrial (MnSOD,SOD) mediante Western Blot y la actividad enzimática de la enzima glutatión peroxidasa.

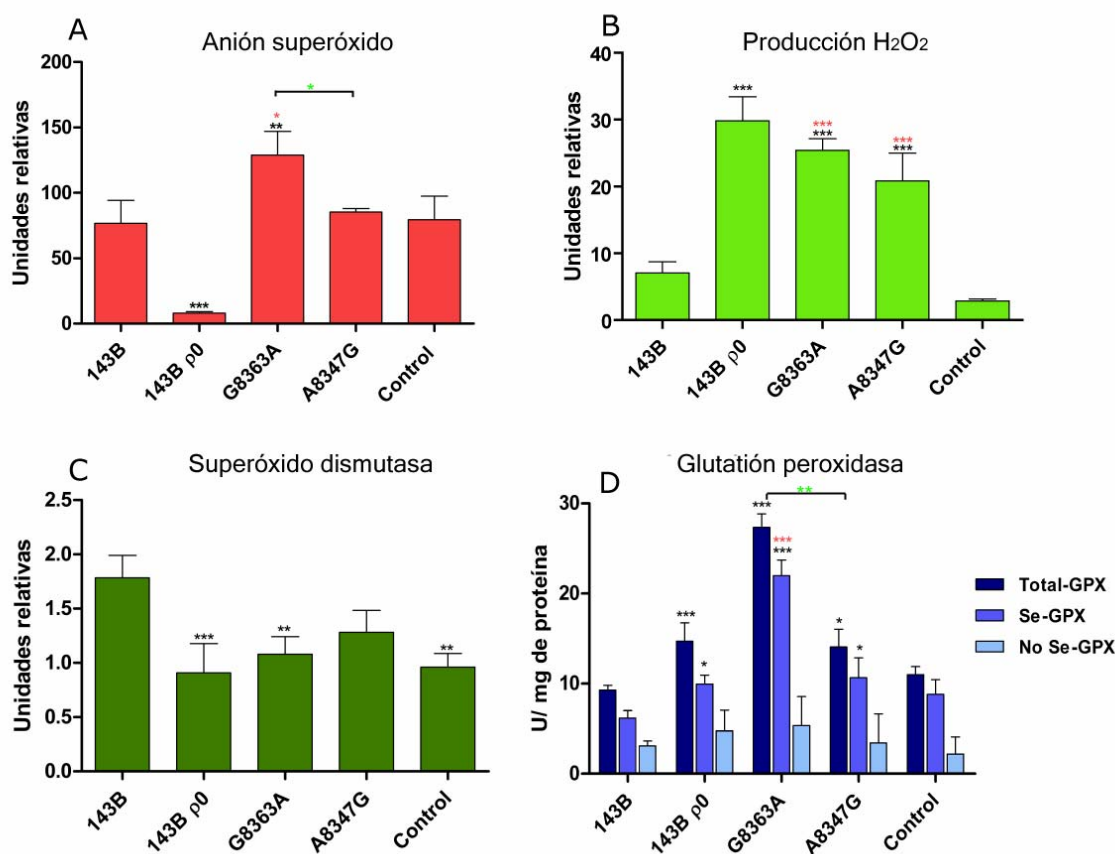


Fig 29 Las gráficas muestran los resultados de las medidas de anión superóxido (A), H_2O_2 (B), superóxido dismutasa (C) y glutatión peroxidasa (D). El grado de significación estadística se muestra como *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$. En negro cuando se comparan con la línea parental 143B, en rojo comparadas con la línea control y en verde cuando se comparan G8363A y A8347G.

En la figura 29 se puede apreciar que niveles de anión superóxido en la línea A8347G son similares a los del control, e inferiores a los encontrados en los híbridos G8363A. El anión superóxido es el principal precursor de la mayoría de las especies reactivas de oxígeno y la cadena de transporte electrónico constituye la fuente primaria de esta especie en la mayoría de los tejidos (Turrens 2003). Este menor nivel de anión superóxido en la línea A8347G frente a la línea G8363A de nuevo podría estar indicando diferencias metabólicas y adaptativas entre estas dos líneas, a pesar de producir ambas un defecto severo en la capacidad OXPHOS mitocondrial.

Por otro lado, los niveles de producción de H_2O_2 , que reflejan un estrés oxidativo general a nivel celular, están muy aumentados en ambas líneas con respecto a la línea control, situándose en niveles parecidos a los observados en la línea p^0 . También existen diferencias significativas entre ambas líneas en la respuesta celular al estrés oxidativo. Mientras que no se observan diferencias en los niveles de superóxido dismutasa entre las dos líneas portadoras de mutación y la línea control, los niveles de glutatión peroxidasa son muy superiores en la línea G8363A frente a A8347G, siendo en esta última muy parecidos a los de la línea control.

Por tanto, existen importantes diferencias en el fenotipo celular ocasionado por estas dos mutaciones patogénicas, tanto en los niveles de anión superóxido, como en la respuesta celular mediada por la glutatión peroxidasa.

En resumen, los resultados obtenidos demuestran claramente la patogenicidad de la mutación A8347G. Esta mutación induce un claro defecto en el sistema OXPHOS comparable al producido por la mutación G8363A. Sin embargo, y a pesar de esta similitud en el fenotipo bioquímico causado por ambas mutaciones, existen diferencias significativas entre ambas. Estas diferencias en los niveles de ADNmt, en el cambio a un metabolismo anaerobio o en la producción de ROS, indican que a pesar de ser mutaciones patogénicas que afectan al mismo ARNt, los mecanismos celulares desencadenados por ambas no son idénticos.

2.2. Estudio de la influencia del haplotipo mitocondrial sobre la expresión de la mutación A8296G del gen *mtRNA^{lys}*

Como se ha comentado anteriormente, trabajos previos de nuestro laboratorio sugieren que la mutación A8296G no produce ningún defecto en el sistema OXPHOS (Bornstein et al. 2002), y que por lo tanto se trata de un polimorfismo no causante de patología. Sin embargo, esta mutación continúa apareciendo en las bases de datos mitocondriales (MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database; <http://www.mitomap.org>) (Ruiz-Pesini et al. 2007), y se han publicado diversos trabajos donde se asocia a diferentes enfermedades entre las que se incluyen diabetes (Kameoka et al. 1998a; Kameoka et al. 1998b), cardiomiopatía hipertrófica (Akita et al. 2000) o MELAS (Sakuta et al. 2002).

Dado que estos casos se han encontrado siempre en pacientes de origen étnico japonés, nos propusimos comparar la expresión fenotípica de dicha mutación en dos fondos mitocondriales

distintos, uno perteneciente al haplogrupo B, de origen japonés y proveniente de un paciente con anemia de Fanconi, y el del caso original estudiado en nuestro laboratorio, en un fondo genético del haplogrupo L1c y perteneciente a un paciente con MERRF. Al igual que en el caso de la mutación A8347G se usaron como controles una línea portadora de un ADNmt del haplogrupo B y las líneas parentales 143B y 143B ρ^0 . Desafortunadamente no conseguimos aislar cíbridos que contuvieran el ADNmt isogénico del haplogrupo L1c en más de 250 clones analizados. Todos los ADNmt incluidos en el estudio fueron secuenciados en su totalidad y la posible presencia de mutaciones adicionales descartada.

2.2.1. Generación de cíbridos portadores de los haplotipos A8296G/L1c y A8296G/B.

Para la generación de cíbridos portadores de la mutación A8296G se utilizó un procedimiento similar al descrito para el caso de la mutación A8347G. En este caso se partió de fibroblastos que contenían ADNmt con las mutaciones A8296G (virtualmente en homoplasmia) y G8363A (en heteroplasmia) sobre un fondo genético perteneciente al haplogrupo L1c y de mioblastos portadores de la mutación A8296G homoplásmica sobre un ADNmt perteneciente al haplogrupo B.

Estas células fueron enucleadas y fusionadas con la línea 143B ρ^0 según se describe en el apartado de Materiales y Métodos. Una vez transcurrido el periodo de selección de 15 días, se seleccionaron 30 clones a partir de célula única de cada fondo genético mitocondrial, se comprobó la presencia de ADNmt mediante Southern Blot y la presencia de la mutación A8296G mediante PCR-RFLP tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. En el caso de los cíbridos A8296G/L1c se comprobó además, mediante PCR-RFLP, que las líneas generadas no portaran la mutación G8363A según el protocolo descrito en el apartado de Materiales y Métodos. Se obtuvieron 6 clones homoplásmicos para el haplotipo A8296G/L1c y 16 del haplotipo A8296G/B. De esta forma se dispuso de líneas celulares homoplásmicas para la misma mutación (A8296G) en dos fondos genéticos mitocondriales diferentes (L1c y B), pero un fondo genético nuclear único, el presente en la línea 143B.

Como controles no patológicos se utilizaron la línea parental 143B y la misma línea incluida en el estudio de la mutación A8347G que, como se ha explicado anteriormente, se obtuvo a partir de mioblastos de un paciente sin evidencia clínica, histológica o bioquímica de sufrir una miopatía mitocondrial y portador de un ADNmt perteneciente al haplogrupo mitocondrial B

2.2.2. Medida de la masa mitocondrial

Se estudió la cantidad de mitocondrias presente en las diferentes líneas celulares mediante el uso de NAO y la medida de la actividad citrato sintasa. No se observó ninguna diferencia entre las líneas analizadas en ninguno de los dos parámetros, lo cual indica que la masa mitocondrial es similar en todas ellas. (Figura 30)

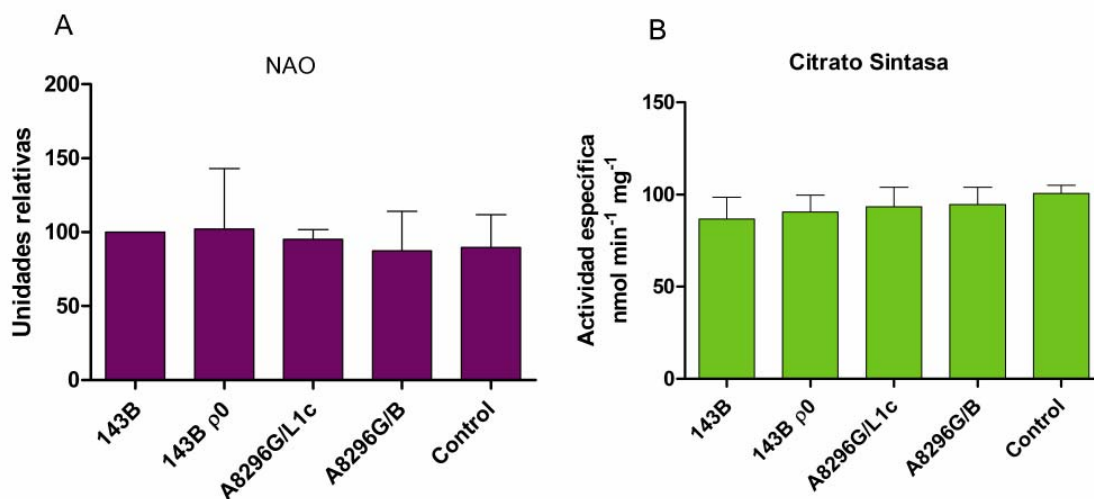


Fig 30. En la figura A se muestran los resultados de las medidas usando NAO expresados en unidades relativas normalizadas frente al valor obtenido para 143B. En la figura B se muestran los resultados de la medida de la actividad citrato sintasa en las cinco líneas analizadas.

2.2.3 Cuantificación del ADNmt en las líneas celulares

A continuación se valoró la cantidad de ADNmt presente en las líneas celulares mediante el uso de PCR cuantitativa a tiempo real (Figura 31).

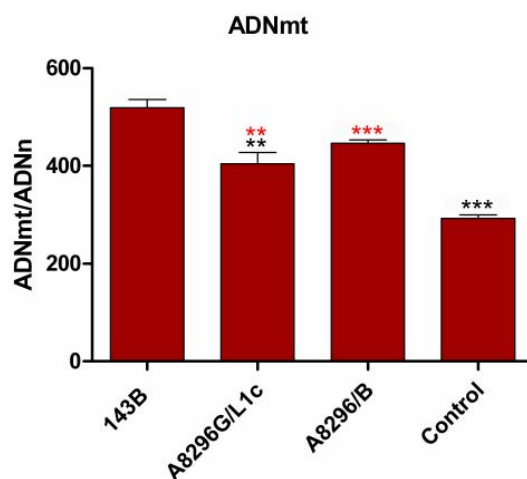


Fig 31. Resultados de la cuantificación de la cantidad de ADNmt. El grado de significación estadística se muestra como *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$. En negro cuando se comparan con la línea parental 143B y en rojo comparadas con la línea control.

Al igual que lo observado en el estudio de la mutación A8347G, se detectaron variaciones significativas en la cantidad de ADNmt entre las diferentes líneas celulares. Por un lado, las tres

líneas de cíbridos poseen un menor número de copias de ADNmt que la línea parental 143B, lo cual puede deberse al proceso de cibrización. Por otro lado, se encontró que las dos líneas portadoras de la mutación A8296G tenían un mayor número de copias de ADNmt que la línea control. Esta diferencia podría ser explicada, como se ha comentado anteriormente, en función del fenotipo bioquímico asociado a los diferentes ADNmt. Puesto que las dos líneas que portan la mutación A8296G tienen una cantidad de ADNmt muy similar y distinta a su vez a la del control, estos resultados podrían sugerir que esta mutación induce un aumento en el número de copias del ADNmt.

2.2.4. Estudio de las actividades de los complejos de la cadena respiratoria

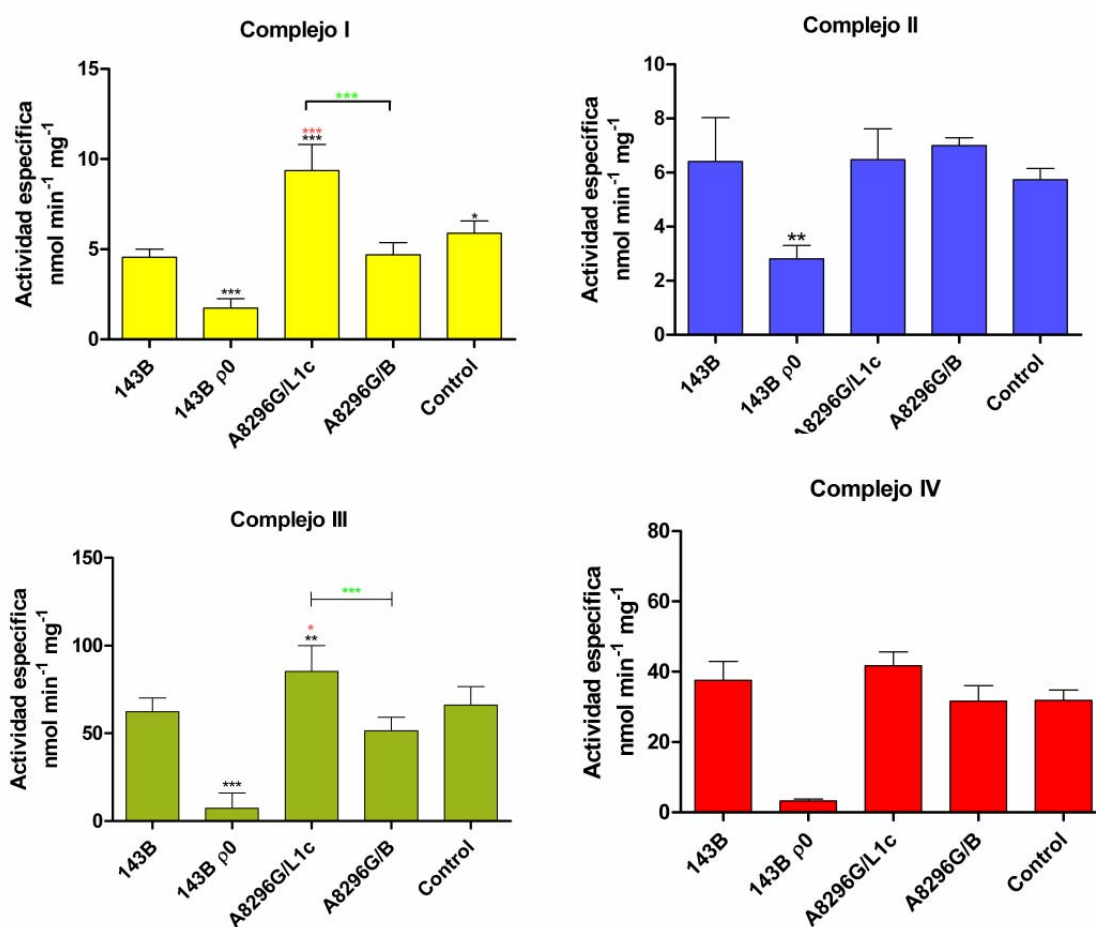


Fig 32. Las gráficas representan las actividades específicas de los complejos I, II, III y IV de la cadena respiratoria en las líneas en estudio. El grado de significación estadística se muestra como *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$. En negro cuando se comparan con la línea parental 143B, en rojo comparadas con la línea control y en verde cuando lo que se compara son las dos líneas portadoras de la mutación A8296G.

Los resultados de la medida de las actividades de los complejos de la cadena respiratoria indicaron que las líneas portadoras de la mutación A8296G no presentan, en comparación con la línea control y la parental 143B, ningún déficit enzimático en los complejos de la cadena respiratoria. Por tanto, esta mutación no provoca defectos en el sistema OXPHOS en ninguno de los dos fondos mitocondriales estudiados. En el caso de la línea A8296G/B los valores son muy similares a los de la línea control, perteneciente al mismo haplogrupo mitocondrial. Los resultados de la línea A8296G/L1c son interesantes, ya que incluso posee valores mayores en las actividades de los complejo I, III y, en menor medida, del complejo IV, si se compara con los de la otra línea portadora de la mutación A8296G y el control. Es importante recordar que no disponemos de un control de referencia para el haplogrupo L1c y por tanto lo más probable es que se trate de los valores normales de actividad enzimática de los complejos en células con ADNmt L1c.

2.2.5. Estudio funcional de la actividad OXPHOS

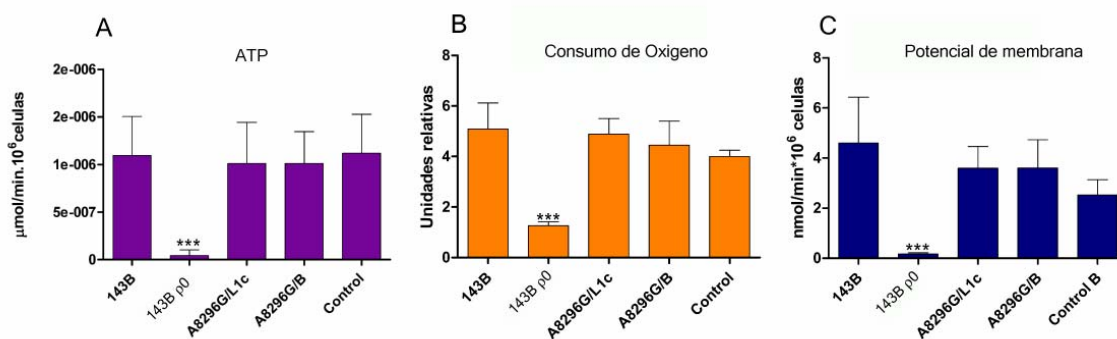


Fig 33. Resultados de la medida de la síntesis mitocondrial de ATP (A), el consumo de O₂ acoplado (B) y la medida del potencial de membrana (C). E grado de significación estadística se muestra como *** p<0.001, ** p<0.01 y * p<0.05. En negro cuando se comparan con la línea parental 143B y en rojo comparadas con la línea control.

No se observaron diferencias significativas en ninguna de las tres medidas funcionales de la actividad OXPHOS, ni entre las dos líneas portadoras de la mutación A8296G, ni entre éstas y la línea control o la línea parental (Figura 33). Así pues, estos resultados confirman la observación de las medidas de las actividades de los complejos de la cadena respiratoria e indican que la mutación A8296G no tiene ningún efecto negativo sobre la funcionalidad OXPHOS mitocondrial.

2.2.6. Medida de la producción de lactato

A diferencia de lo que ocurría en el caso de las líneas portadoras de las mutaciones G8363A y A8347G y dado que la mutación A8296G no produce ningún defecto en el sistema OXPHOS, no era de esperar ningún cambio metabólico hacia rutas anaerobias como el observado en las líneas

portadoras de mutaciones patogénicas. La medida de la concentración de lactato confirmó este punto, no existiendo diferencias en la producción de lactato entre las líneas portadoras de la mutación A8296G y la línea control (Figura 34). Este dato confirma nuevamente que esta mutación no produce ningún defecto en la capacidad de producción de ATP por el sistema OXPHOS, y por lo tanto las líneas portadoras de dicha mutación no necesitan incrementar el flujo glicolítico.

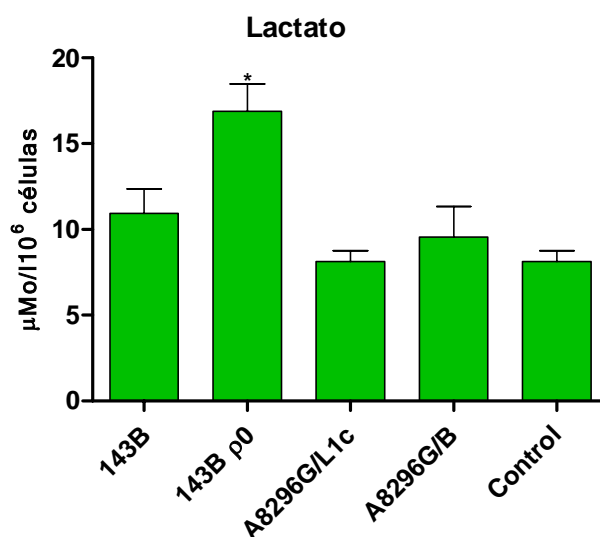


Fig 34. Resultados de la medida de la producción de lactato en las diferentes líneas. El grado de significación estadística se muestra como *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$. En negro cuando se comparan con la línea parental 143B.

2.2.7. Medida de la producción de especies reactivas de oxígeno

Como se ha comentado anteriormente, se ha propuesto que el aumento en la producción de ROS asociado a mutaciones en el ADNmt contribuye a la patogénesis de las enfermedades mitocondriales. Además, utilizando híbridos de ratón, se ha propuesto recientemente que la producción de ROS puede actuar modulando la respuesta celular a pequeños cambios funcionales asociados a los haplogrupos mitocondriales (Moreno-Loshuertos et al. 2006). En este sentido es importante resaltar que, aunque la mutación A8296G no produce ningún defecto en la capacidad OXPHOS, si que se aprecian diferencias entre la línea A8296G y la línea control en el número de copias de ADNmt. Este hecho nos animó a medir la producción de radicales libres y la posible respuesta celular al estrés oxidativo.

Los resultados (Figura 35) muestran un ligero aumento en los valores de anión superóxido de la línea A8296G/L1c frente a la línea A8296G/B, la línea control y la línea parental. Este aumento podría estar en relación con la mayor actividad encontrada en los complejos de la cadena respiratoria en esta línea, dado que el sistema OXPHOS es el mayor productor de anión superóxido en la célula.

Por otra parte, también se encontró un aumento significativo en la producción de H_2O_2 en las líneas portadoras de la mutación A8296G frente a la línea control. Estas diferencias, del 68% y del 73% respectivamente en las líneas A8296G/L1c y A8296G/B frente al control, sugieren que a pesar de no producir un defecto en el sistema OXPHOS, la mutación A8296G podría no resultar completamente neutra para la fisiología mitocondrial.

La medida de los niveles de SOD mostró un ligero aumento en la línea A8296G/L1c frente a la línea A8296G/B y el control, que es coherente con el aumento observado en los niveles de anión superóxido. Más difícil de explicar es la menor actividad de la glutatión peroxidasa encontrada en la línea A8296G/L1c si se compara con el resto de las líneas celulares analizadas.

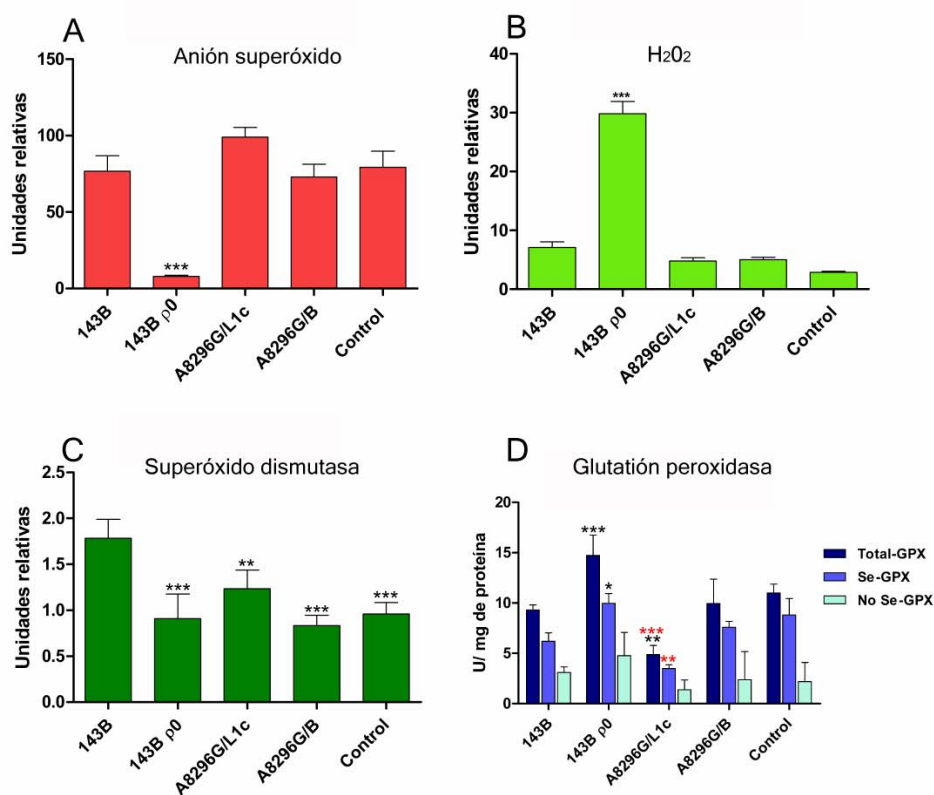


Fig 35 Las graficas muestran los resultados de las medidas de anión superóxido (A), H_2O_2 (B), superóxido dismutasa (C) y glutatión peroxidasa (D). El grado de significación estadística se muestra como *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$. En negro cuando se comparan con la línea parental 143B y en rojo comparadas con la línea control.

En resumen, los resultados indican que la mutación A8296G no produce defecto OXPHOS en ninguno de los dos fondos genéticos mitocondriales estudiados, siendo por lo tanto muy dudosa su patogenicidad. Sin embargo, también sugieren que el fenotipo bioquímico producido por esta mutación difiere del de la línea control, siendo difícil determinar si estos pequeños cambios pueden

estar contribuyendo de alguna manera a la fisiopatología de las enfermedades encontradas en los pacientes con la mutación A8296G o si son el reflejo de la propia variabilidad biológica y de la flexibilidad de la fisiología mitocondrial.

2.3. Estudio de la influencia del fondo nuclear sobre la expresión de la mutación A8296G del gen *mtRNA*^{Lys}

Estudios previos realizados en cíbridos han puesto en evidencia la influencia del fondo genético nuclear en la expresión de las mutaciones en el ADNmt. En un estudio clásico que utilizó cíbridos portadores de la mutación A3243G sobre los fondos nucleares 143B y A549 se encontró que un 90% de la mutación patológica A3243G sobre el fondo 143B producía una disminución únicamente del 30% en la actividad COX, mientras que con un 55% en el fondo nuclear A549 la disminución alcanzaba el 50% (Dunbar et al. 1995).

Con estos antecedentes nos planteamos la posibilidad de que el efecto de la mutación A8286G fuera inapreciable sobre el fondo nuclear 143B pero no sobre otros fondos nucleares. En una primera aproximación hemos generado dos nuevas líneas de cíbridos y hemos analizado el efecto de los dos haplotipos A8296G (L1c y B) sobre el fondo nuclear A549, proveniente de una línea de carcinoma de pulmón. En esta tesis se presenta un resumen de los resultados preliminares de este estudio, donde se compara el fenotipo bioquímico de estas dos líneas de cíbridos con las líneas parentales A549 y A549 B2 ρ^0 .

2.3.1 Medida de la masa mitocondrial y cuantificación del ADNmt en las líneas celulares

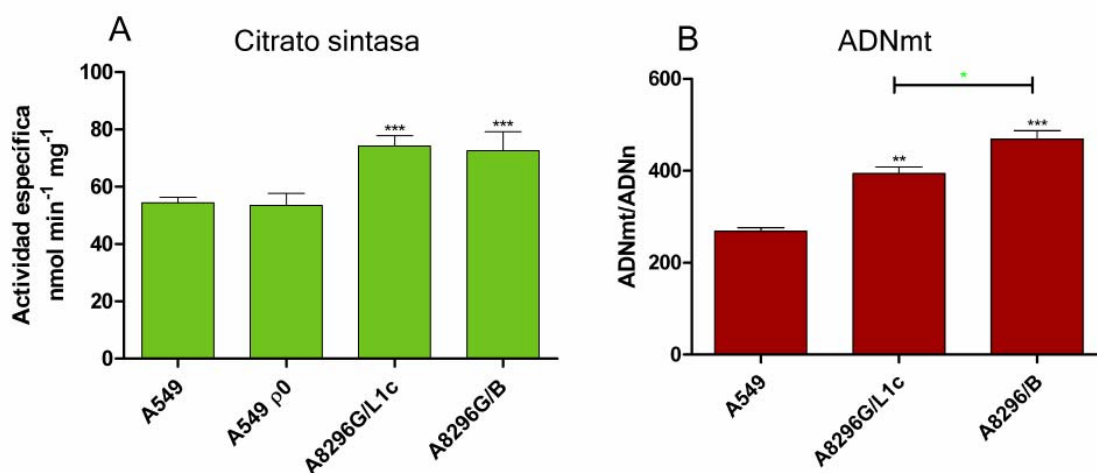


Fig 36 En la figura A se muestran los resultados de la medida de la actividad citrato sintasa en las cuatro líneas. La significación estadística se indica como *** $p < 0,001$ comparado con la línea parental A549. En la figura B se muestran los valores de ADNmt. El grado de significación estadística se muestra como *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ y * $p < 0,05$. En negro cuando se comparan con la línea parental A549 y en verde comparadas entre sí las dos líneas portadoras de la mutación A8296G.

La medida de citrato sintasa reveló un aumento significativo entre las dos líneas de cíbridos A8296G y la línea parental A549 lo cual indica un aumento en la masa mitocondrial. En consonancia con este resultado, la cuantificación del ADNmt detectó una mayor cantidad en las dos líneas de cíbridos A8296G en comparación con la línea parental A549. Así mismo se observó una ligera diferencia en la cantidad de ADNmt entre las dos líneas portadoras de la mutación A8296G (Figura 36).

Por tanto, a diferencia de lo que sucede en el caso de los cíbridos generados sobre el fondo nuclear 143B, en este caso el proceso de cibridización y la repoblación mitocondrial conduce a que haya una mayor cantidad de mitocondrias por célula.

2.3.2. Estudio funcional de la actividad OXPPOS

No se encontraron diferencias significativas entre las dos líneas de cíbridos portadores de la mutación A8296G y la línea parental en la capacidad de síntesis mitocondrial de ATP. Sin embargo, si presentaban ambas un consumo de oxígeno disminuido, y la línea A8296G/B un aumento en su potencial de membrana mitocondrial.

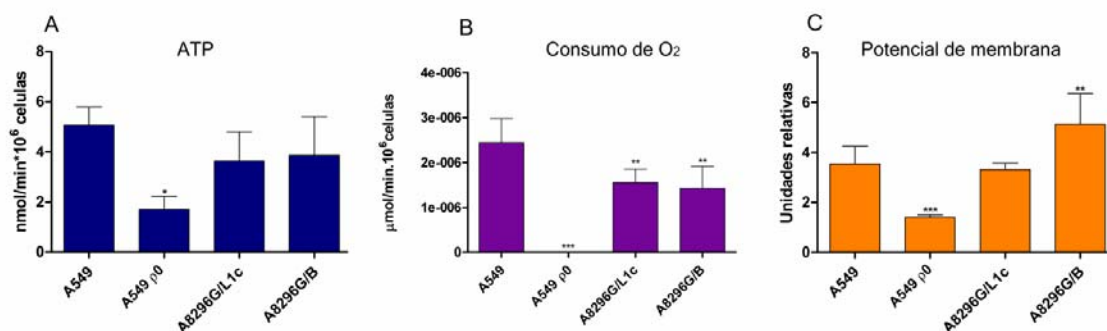


Fig 37. Resultados de la medida de la síntesis mitocondrial de ATP (A), el consumo de O₂ acoplado (B) y la medida del potencial de membrana (C). El grado de significación estadística se muestra como *** p<0.001, ** p<0.01 y * p<0.05.

Estos resultados muestran que, a pesar de existir pequeñas diferencias entre ellas, ninguna de las líneas portadoras de la mutación A8296G presenta defectos en su capacidad OXPPOS, un hecho que queda claramente demostrado si se comparan estos valores con los detectados en la línea A549 p⁰, que presenta una importante disminución en el potencial de membrana, una clara disminución en la capacidad mitocondrial de sintetizar ATP y un consumo de oxígeno despreciable.

2.3.3. Estudio de las actividades de los complejos de la cadena respiratoria

Se realizaron medidas de la actividad del complejo I, II, III y IV de la cadena de transporte electrónico en las cuatro líneas.

Los resultados mostraron que, excepto para el complejo I, hay una mayor actividad de los complejos de la cadena respiratoria, incluyendo el complejo II, cuyas 4 subunidades están codificadas en el núcleo. Este aumento estaría en relación con la mayor actividad citrato sintasa así como la mayor cantidad de ADNmt observada en las líneas portadoras de la mutación frente a la línea parental. De nuevo estos resultados descartan que la mutación A8296G produzca un defecto en la actividad del sistema OXPHOS en los híbridos generados con el fondo genético nuclear A549.

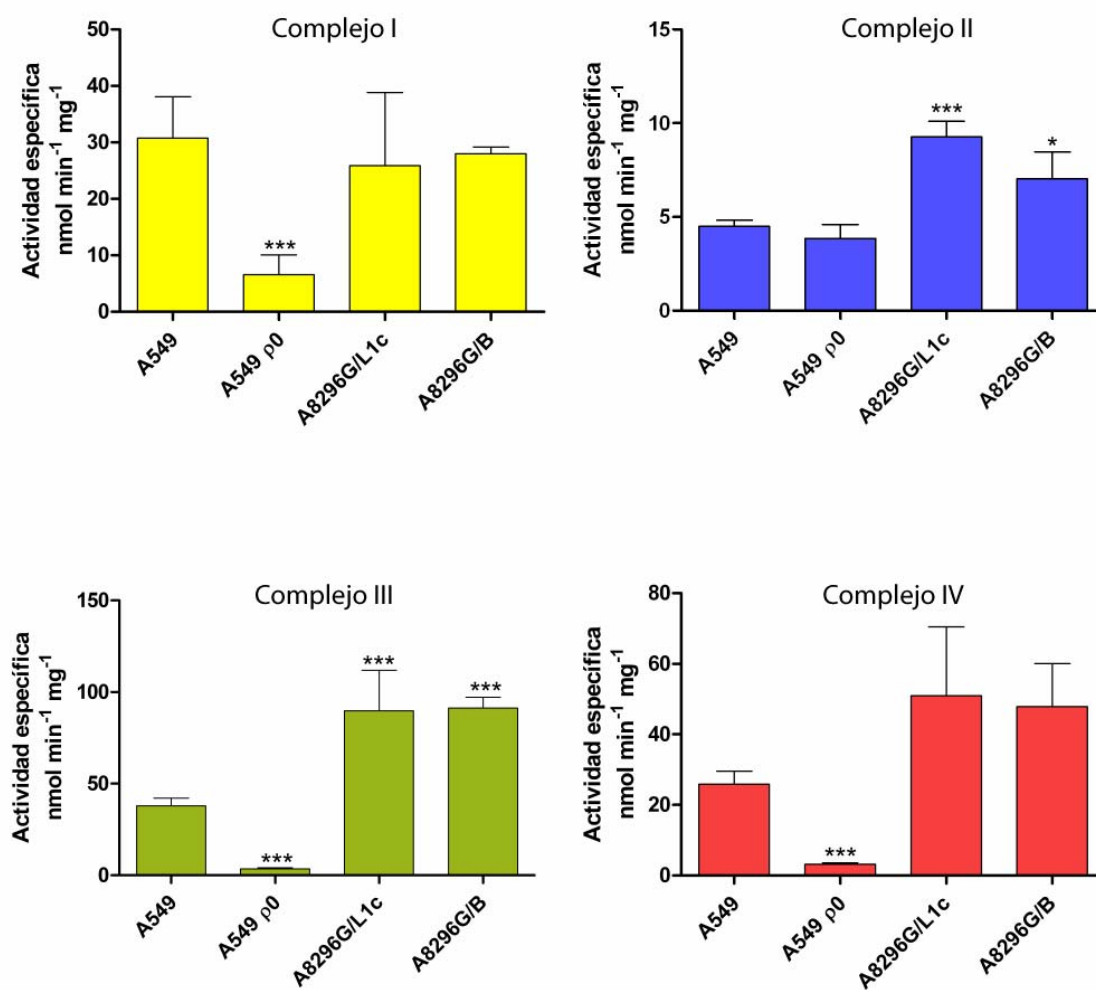


Fig 38. Las gráficas representan las actividades específicas de los complejos I, II, III y IV de la cadena respiratoria en las líneas en estudio. El grado de significación estadística se muestra como *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$, comparadas con la línea parental A549.

1. Las mutaciones en el gen *POLG* provocan defectos en la replicación del mtDNA y presentaciones clínicas muy heterogéneas.

A diferencia de las enfermedades causadas por mutaciones en el ADNmt, caracterizadas por lo heterogéneo de sus presentaciones clínicas, en las enfermedades producidas por mutaciones en el ADN nuclear es muy frecuente encontrar fenotipos mucho más homogéneos y característicos para cada gen. Sin embargo, existe una excepción: las mutaciones en el gen *POLG* que codifica la subunidad catalítica de la ADN polimerasa mitocondrial, que provocan un abanico de fenotipos más propio de las enfermedades producidas por mutaciones en el ADNmt, tanto por lo heterogéneo de sus presentaciones como por la variedad de tejidos afectados. Este fenómeno se podría explicar por el hecho de que el defecto molecular que causa el fenotipo de los pacientes es el daño producido en el ADNmt debido a su incorrecta replicación, estando sujeto por tanto a las características propias de la genética mitocondrial.

Los cuadros clínicos debidos a mutaciones en el gen *POLG* han sido clasificados en cuatro grupos, aunque su separación no es demasiado clara y existe cierto solapamiento entre ellos (Horvath et al. 2006). Un primer grupo (I) caracterizado por afectación hepática y encefalopatía, un segundo grupo (II) donde la encefalopatía se presenta sin afectación hepática, un tercer grupo (III) caracterizado por la presencia de PEO, como signo único o acompañado de otros hallazgos clínicos, y finalmente un cuarto grupo (IV) donde se incluirían el resto de presentaciones clínicas. Los intentos de establecer una relación entre el genotipo (tipo de mutación) y el fenotipo (presentación clínica) no han tenido éxito, aunque se pueden apreciar ciertas tendencias como que la mayoría de las presentaciones severas infantiles se asocian a la presencia de una mutación en la región espaciadora en heterocigosis con una mutación en el dominio polimerasa, que la presencia de dos mutaciones en la región espaciadora suelen asociarse a presentaciones clínicas en adultos o que todas las mutaciones dominantes afecten a residuos del dominio polimerasa (Hudson and Chinnery 2006).

El daño producido sobre el ADNmt por mutaciones en el gen *POLG* se puede clasificar en dos grandes grupos: alteraciones cualitativas, en forma de deleciones múltiples, o cuantitativas, en forma de depleción (Hudson and Chinnery 2006), que son mucho menos frecuentes. Inicialmente se propuso como modelo para la formación de deleciones en el ADNmt que la actividad defectuosa de la enzima mutada provocaba la acumulación de mutaciones puntuales en el ADNmt, y esta acumulación promovía a su vez la formación y acumulación de deleciones entre repeticiones en el ADNmt (Ponamarev et al. 2002). En este sentido, en dos estudios independientes que han utilizado como modelo de envejecimiento un ratón que expresa la subunidad catalítica de la polimerasa y mutada en su dominio exonucleasa, y por lo tanto carente de capacidad correctora, se ha demostrado la acumulación de mutaciones puntuales y deleciones múltiples en el ADNmt (Kujoth et al. 2005; Trifunovic et al. 2004). Sin embargo, trabajos posteriores han demostrado que la

presencia de una mutación en el gen *POLG* no provoca necesariamente la acumulación de mutaciones en el ADNmt y se ha propuesto la expansión clonal de las deleciones para explicar el fenotipo en estos pacientes (Kollberg et al. 2005). También se ha demostrado que la acumulación de mutaciones puntuales solo se produce en la región control del ADNmt, al ser el ADN de cadena sencilla 1000 veces más sensible al daño por ROS que el de doble cadena, y que esta acumulación también se encuentra en pacientes portadores de la deleción común en el ADNmt, apuntando a que es la presencia de deleciones en el ADNmt y la disfunción que produce la responsable de la acumulación de mutaciones (Wanrooij et al. 2004).

Como mecanismo de formación de las deleciones se han propuesto las pausas de la replicación, que en bacterias se ha demostrado que conducen a rupturas de la doble cadena de ADN (Michel et al. 1997). Esta hipótesis se basa en la observación de cómo, con mucha frecuencia, los sitios de ruptura que llevan a la formación de deleciones corresponden con zonas que presentan dificultad para la actividad polimerasa, como pueden ser repeticiones homopoliméricas y repeticiones de tipo microsatélite. La repetición de un mismo nucleótido puede resultar en una depleción local del mismo y, por tanto, dificultar a la polimerasa la incorporación del siguiente nucleótido. Es interesante señalar que la composición del pool de nucleótidos en la mitocondria no es equimolar, presentando unas proporciones dGTP:dATP de 30:1 y dCTP:dTTP de 19:1 (Song et al. 2005). Las alteraciones en su homeostasis están implicadas en la formación de deleciones, al menos en el caso del MNGIE (Nishino et al. 1999). En este sentido cabe destacar que el aumento del pool de nucleótidos en levaduras portadoras de las mutaciones equivalentes a las mutaciones asociadas a patología humana Y955C y G268A en el gen *MIP1*, homólogo de *POLG*, revierte el fenotipo, contribuyendo este aumento del pool de dNTPs al mantenimiento de la integridad y estabilidad del ADNmt (Baruffini et al. 2006).

Por lo tanto, las mutaciones en la subunidad catalítica de la polimerasa y parecen promover la formación de deleciones al aumentar el riesgo de parada de la replicación, al generar estas mutaciones enzimas más ineficaces a la hora de replicar el ADNmt. La generación de estas deleciones durante la embriogénesis y su posterior expansión clonal, explicarían la variabilidad en los fenotipos asociados a las mutaciones del gen *POLG*. Un caso distinto es cuando las mutaciones en el gen *POLG* están asociadas a depleción del ADNmt, donde se encuentra un fenotipo mucho más homogéneo: el síndrome de Alpers. A día de hoy se desconoce como la misma mutación puede causar depleción del ADNmt en unos casos y acumulación de deleciones múltiples en otros, siendo necesario profundizar en los mecanismos moleculares responsables de este fenómeno.

Desde que se describieron las primeras mutaciones en el gen *POLG* en el año 2001 (Van Goethem et al. 2001) se han identificado más de 90 cambios en su secuencia que se encuentran recogidos en el “Human DNA polymerase gamma mutation databe” (<http://dir-apps.niehs.nih.gov/polg/>). Durante el desarrollo del trabajo de la presente tesis doctoral hemos identificado diversas mutaciones en el gen *POLG*, que han contribuido a situarlo en un lugar central dentro de las enfermedades mitocondriales provocadas por mutaciones en genes nucleares.

1.1. Mutación R853W

La mutación R853W, descrita por primera vez en este trabajo, fue identificada en una paciente (paciente 1) en *trans* junto a la mutación P587L. Afecta al dominio polimerasa de la proteína, situándose a 36 aa del motivo Pol A (Kaguni 2004). Aunque se han realizado caracterizaciones bioquímicas de mutaciones que se localizan en el dominio polimerasa, éstas se han centrado en el estudio de mutaciones que afectan al motivo pol B, como es el caso de las mutaciones R943H, Y955C y A957S, o están muy próximas a él como en el caso de la G923D (Graziewicz et al. 2004). Estas cuatro mutaciones están asociadas a PEO en su forma autosómica dominante y producen graves defectos sobre la funcionalidad de la enzima.

La comparación de la expresión fenotípica de los dos casos donde ha sido descrita la mutación R853W, nuestro trabajo y el realizado por el grupo del Dr. Salvatore DiMauro (Davidzon et al. 2006), permite identificar dos de las principales características de las enfermedades debidas a mutaciones en el gen *POLG*: la gran heterogeneidad de las presentaciones clínicas y la dificultad para establecer asociaciones genotipo-fenotipo. En ambos casos se encuentra la mutación R853W asociada con otra mutación localizada en la región espaciadora de la proteína: la mutación P587L en el bloque γ^3 en nuestro trabajo, o la mutación G737R localizada en el bloque γ^4 en el trabajo de Di Mauro. Los bloques γ^3 y γ^4 de la región espaciadora han sido relacionados con la función polimerasa y con la interacción con la subunidad accesoria (Luo and Kaguni 2005). Sin embargo, y a pesar de la similitud de los genotipos, las presentaciones clínicas son muy diferentes, PEO con debut en la edad adulta en nuestro caso y Parkinson precoz en el caso descrito por el grupo del Dr. DiMauro. Adicionalmente, la mutación R852C, que afecta al residuo adyacente a la mutación R853W, ha sido descrita en heterocigosis compuesta con la mutación A467T, también localizada en la región espaciadora, en el bloque γ^1 , y asociada a un síndrome de Alpers. Así pues, tres genotipos muy parecidos se asocian a tres presentaciones clínicas completamente distintas, un aspecto que, en los últimos años, se ha demostrado que es muy frecuente en las enfermedades causadas por mutaciones en el gen *POLG*.

1.2. Mutaciones P587L y T251I

La segunda mutación encontrada en la paciente 1, la mutación P587L, se localiza en la región espaciadora de la subunidad catalítica de la polimerasa γ , dentro del bloque conservado γ^3 . Es la primera vez que se encuentra la mutación P587L en ausencia de la T251I. El hecho de que la mutación R853W se haya identificado asociada a un patrón de herencia recesivo en dos hermanas con Parkinson precoz (Davidzon et al. 2006) parece confirmar la patogenicidad de la mutación P587L, al no ser la presencia de la mutación R853W suficiente para explicar el fenotipo de las pacientes. La mutación P587L afecta a un residuo muy conservado y mutaciones que afectan a residuos contiguos han sido asociados a enfermedad mitocondrial, también con herencia recesiva.

Estos datos parecen confirmar que la mutación P587L es patogénica, quedando por aclarar el papel que juega la mutación T251I, que solo ha sido encontrada en dos casos en heterocigosis

compuesta sin la mutación P587L (Di Fonzo et al. 2003; Lamantea et al. 2002). Una de las posibilidades es que la mutación T251I actúe modulando el efecto de la mutación P587L de una forma similar al descrito para las mutaciones W748S y E1143G. Éstas se encuentran frecuentemente en *cis* y, basándose en el estudio de las propiedades enzimáticas de proteínas portadoras de ambas mutaciones, se ha descrito que el cambio E1143G actúa modificando el fenotipo bioquímico de la mutación W748S (S. S. Chan et al. 2006). Sin embargo, en ausencia de estudios funcionales comparativos de proteínas portadoras de las mutaciones T251I y P587L, y dado que no se ha identificado en pacientes o controles en homocigosis, no es posible asegurar con completa certeza cuál es el papel de cada mutación en el desarrollo de la enfermedad.

Un segundo paciente incluido en nuestro estudio (paciente 2) es heterocigoto compuesto para las mutaciones T251I, P587L y M603L. Como se ha comentado con anterioridad la presentación alélica de las mutaciones T251I y P587L es muy frecuente, encontrándose de hecho en el 1,1% de la población italiana (Horvath et al. 2006). El alelo T251I/P587L se encuentra mayoritariamente asociado a un patrón de herencia recesiva y solo en dos casos en la literatura aparece con un posible patrón dominante al ser el único alelo identificado en un paciente con miopatía, bloqueo cardíaco y dolor muscular (Horvath et al. 2006) y en un paciente con PEO e hipoacusia (Di Fonzo et al. 2003).

1.3. Mutación M603L

Esta mutación ha sido identificada por primera vez en este trabajo y afecta al bloque γ^3 de la región espaciadora. Como se ha comentado previamente, el bloque γ^3 contribuye sustancialmente a la función polimerasa y se ha propuesto que juega un papel en la unión estable del ADN a la enzima durante la replicación (Luo and Kaguni 2005). En esta región además han sido descritas otras mutaciones como la ya comentada mutación P587L, la mutación R579W (Filosto et al. 2003b) y la mutación R574W (Kollberg et al. 2006), todas ellas asociadas a un patrón de herencia recesivo. Estos datos, junto con la ausencia de la mutación en el grupo control, parecen confirmar la patogenicidad de la mutación M603L.

La presentación clínica de la enfermedad en el paciente 2 es poco severa, como por otra parte es frecuente encontrar en portadores del alelo T251I/P587L, normalmente asociado a PEO autosómica recesiva (Horvath et al. 2006; Lamantea et al. 2002). No parece existir una relación entre la región afectada por la mutación que acompaña al alelo T251I/P587L y la gravedad del fenotipo de los pacientes. Excepcionalmente se ha encontrado en pacientes con cuadros clínicos de mayor severidad, como una encefalopatía neurogastrointestinal similar a MNGIE donde el alelo T251I/P587L se acompañaba por la mutación N846S (Van Goethem et al. 2003a), y un caso de síndrome hepatocerebral donde se acompañaba de la mutación R232G (Ferrari et al. 2005).

1.4. Mutaciones N468D y D1184N

Un tercer paciente de nuestra serie presentaba las mutaciones N468D y D1184N en heterocigocis compuesta. La mutación N468D afecta a un residuo conservado del bloque γ^1 de la región espaciadora de la proteína. Afecta al residuo adyacente a la mutación A467T, una de las mutaciones más frecuentes y mejor caracterizadas del gen *POLG*.

Como se comentó en el apartado de resultados, en base a los resultados obtenidos en el estudio de una familia portadora de las mutaciones N468D y A1105T, la posible patogénesis de la mutación N468D ha sido cuestionada (P. Luoma et al. 2004). Sin embargo, el fenotipo encontrado en la familia heterocigota compuesta N468D/A1105T se manifiesta con una mayor severidad clínica que el encontrado en una familia portadora únicamente de la mutación A1105T con herencia autosómica dominante, lo cual podría sugerir que la mutación N468D actúa como modificador fenotípico.

En la paciente 3, la mutación N468D aparece acompañada por la mutación D1184N, descrita por primera vez en nuestro estudio, y que afecta a un residuo muy conservado del dominio polimerasa de la proteína, localizado a 43 residuos del motivo PolC. Con posterioridad esta mutación ha sido descrita en heterocigosis compuesta con la mutación R227W asociada a una presentación clínica muy severa en dos hermanos con un cuadro de disfagia, hipotonía, retraso psicomotor y afección gastrointestinal, que murieron a los 26 y a los 43 meses de vida (de Vries et al. 2007). Una mutación muy cercana a la D1184N, la S1176L, también ha sido descrita en heterocigosis con la R227W, pero en este caso asociada a un fenotipo mucho menos severo de PEO (Lamantea et al. 2002). Adicionalmente, la mutación K1191N, ha sido descrita asociada a la mutación A467T en un cuadro de síndrome de Alpers (Horvath et al. 2006).

Ninguna de estas mutaciones, que afectan a residuos muy conservados evolutivamente de la región polimerasa, aunque fuera de los motivos A, B y C, han sido encontradas asociadas a un patrón de herencia dominante, apareciendo siempre en heterocigosis compuesta con mutaciones en el dominio exonucleasa o en la región espaciadora.

1.5. Mutación G268A

Esta mutación fue el único cambio detectado en el gen *POLG* del paciente 4. Afecta a un residuo muy conservado del motivo Exo II localizado en el dominio exonucleasa de la proteína, sugiriendo su posible carácter dominante. Sin embargo, esta mutación ha sido descrita con anterioridad asociada a la mutación A467T en un paciente con PEO y en homocigosis en una paciente con PEO, ptosis, retinopatía pigmentaria y debilidad muscular (Di Fonzo et al. 2003), en ambos casos con un patrón de herencia recesiva. Adicionalmente, en un estudio realizado en *Saccharomyces cerevisiae*, en el que se caracterizaron levaduras portadoras del cambio equivalente a la mutación G268A en el gen *MIP1*, que codifica el homólogo en levadura de *POLG*, se demostró tanto la patogenicidad de esta mutación, como su carácter recesivo, al menos en levaduras (Baruffini et al. 2006). Estos datos, junto con el hecho de que no hayan sido descritas hasta la fecha mutaciones

dominantes en el dominio exonucleasa de la proteína, sugieren que la mutación G268A no es la única causa del fenotipo del paciente, poniendo en duda el carácter dominante de su herencia y abriendo la posibilidad a un origen digénico o a la presencia de algún factor adicional desconocido implicado en el desarrollo de la enfermedad.

1.6. Mutación R1146C

Esta mutación fue identificada en el paciente 5 de nuestra serie y afecta al dominio polimerasa de la proteína, muy próximo al motivo Pol C. Este cambio aparece en las bases de datos descrito como polimorfismo (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>). La validación de su clasificación como tal se basa en el hecho de que dos grupos independientes han informado sobre él. Sin embargo, un análisis más detallado indica que ambos grupos han usado el mismo banco de muestras en sus trabajos de identificación de polimorfismos en genes humanos, el NIH Polymorphism Discovery Resource (NIHPDR). En este banco las muestras están identificadas individualmente, lo que nos ha permitido comprobar que ambos grupos han detectado el cambio en la misma muestra, lo que pone en duda su asignación como polimorfismo.

La mutación R1146C afecta a una posición muy cercana a la afectada por la mutación E1143G. Como ya hemos comentado anteriormente, este cambio, un polimorfismo que se encuentra con una frecuencia de entre el 2 y el 3 % en las poblaciones de Gran Bretaña, Bélgica, Finlandia y Norte América (Horvath et al. 2006), no presenta un efecto neutro en la actividad de la enzima, actuando en muchos casos como modificador fenotípico de otras mutaciones (S. S. Chan et al. 2006). Estudios *in silico* mediante la generación de modelos estructurales predicen un efecto deletéreo sobre la actividad de la enzima para el cambio R1146C (SNPs3D, www.snps3d.org) (Yue and Moulton 2006).

Es muy intrigante que esta mutación pueda estar causando el fenotipo del paciente, que presenta un cuadro clínico atípico y poco severo cuyo rasgo más significativo es una atrofia del gemelo de su pierna izquierda.

1.7. Mutación A467T

El paciente 6 es homocigoto para la mutación A467T. Se ha encontrado que esta mutación está presente en un 0,6 % de la población en Bélgica, y en un 0,69%, 0,17% y 0,19% de los alelos estudiados en Gran Bretaña, Finlandia y Alemania respectivamente, siendo, como ya se ha comentado con anterioridad, una de las causas más frecuentes de enfermedad mitocondrial (Horvath et al. 2006). Esta mutación se localiza en la región espaciadora de la subunidad catalítica de la polimerasa mitocondrial.

El amplio espectro clínico asociado a la mutación A467T, así como su localización en una región de la enzima en principio no asociada a ninguna de sus actividades enzimáticas la han convertido en objeto de gran interés y sus efectos sobre la enzima han sido estudiados y caracterizados extensamente en diferentes trabajos (S. S. Chan et al. 2005a; P. T. Luoma et al.

2005). En dichos estudios se ha demostrado que la mutación A467T reduce la actividad polimerasa aumentando la K_m para el dNTP cinco veces, y disminuyendo 6 veces la K_{cat} para la síntesis de ADN. Esto se traduce en que la eficiencia de síntesis de ADN de la proteína portadora de la mutación A467T es solo del 4% con respecto a la versión salvaje (S. S. Chan et al. 2005a). Desgraciadamente, al no existir información estructural de la región espaciadora es difícil conocer el mecanismo concreto a través del cual dicha mutación afecta a la actividad polimerasa. La mutación afecta además a la interacción entre la subunidad catalítica y la accesoria, impidiendo el aumento de la procesividad debida a esta interacción.

La mutación A467T ha sido asociada a un amplio número de fenotipos, siendo el síndrome de Alpers uno de los más característicos por su gravedad y por la frecuencia en que se encuentra el alelo mutado en estos pacientes, más del 50% de los casos estudiados (Nguyen et al. 2006). En estos casos, se suele presentar en heterocigosis compuesta con una mutación en el dominio polimerasa de la enzima, mientras que, cuando está implicada en un fenotipo distinto a Alpers, normalmente aparece asociada con una mutación en el dominio exonucleasa o en los dos primeros tercios de la región espaciadora (Nguyen et al. 2006).

Dado que la proteína mutada solo retiene el 4% de la capacidad de la enzima salvaje se podría esperar que los pacientes homocigotos para la mutación presentaran fenotipos de mayor gravedad que los heterocigotos. Aunque el fenotipo asociado a la mutación A467T en su presentación homocigótica es muy variado, tanto en relación a los tejidos afectados como en la gravedad del cuadro clínico, desde síndrome de Alpers en las primeras semanas de vida a PEO con debut en la edad adulta, en general los pacientes suelen tener una presentación clínica menos agresiva que aquellos en los que la mutación se presenta en heterocigosis compuesta (Horvath et al. 2006; Hudson and Chinnery 2006). Curiosamente en un caso donde se demostró la expresión monoalélica de la A467T en un paciente que era portador en el otro alelo de la mutación E873X, cuya expresión produce un péptido truncado, el fenotipo encontrado era un Alpers clásico con inicio antes de los dos años de edad (S. S. Chan et al. 2005b).

Otra de las características relevantes de los pacientes portadores de la mutación A467T es su frecuente asociación con hepatotoxicidad por tratamiento con ácido valproico. Esta hepatotoxicidad es muy frecuente en pacientes de síndrome de Alpers, pero también se ha encontrado en pacientes con otras presentaciones clínicas asociadas a la mutación A467T, como la epilepsia mioclónica asociada con neuropatía atáxica encontrada en un paciente homocigoto para la mutación A467T (Van Goethem et al. 2003b).

En nuestro caso, la mutación A467T en homocigosis ocasionó un fenotipo caracterizado por PEO, ptosis, debilidad muscular, neuropatía sensitivomotora y pérdida de audición. Siguiendo la clasificación descrita por Chinnery para las enfermedades ocasionadas por mutaciones en *POLG* (Horvath et al. 2006) estaría incluido en el grupo III, caracterizado por la presencia de PEO acompañada por otros hallazgos como miopatías o afecciones neurológicas. Cabe destacar en este caso que una hermana del paciente falleció a la edad de 38 años, presentando un cuadro clínico

similar al del paciente, agravado por la presencia de accidentes cerebro-vasculares. No existen datos moleculares de la hermana del paciente, pero no es arriesgado suponer que la causa de su enfermedad también fuera la presencia en homocigosis de la mutación A467T.

En resumen, una de las características más relevantes de las enfermedades asociadas a mutaciones en el gen *POLG* es el hecho de que pacientes portadores de la misma mutación, incluso pacientes portadores de una misma mutación en homocigosis, pueden presentar fenotipos muy diferentes. En ese sentido, el caso de la mutación A467T es paradigmático pero no único. Un caso semejante es el encontrado en pacientes portadores de la doble mutación alélica W748S/E1143G en homocigosis, que se ha encontrado en pacientes con síndrome de ataxia recesiva mitocondrial (MIRAS) (Hakonen et al. 2005) y en pacientes de síndrome de Alpers (Davidzon et al. 2005). En ambos casos la gravedad de la presentación clínica era menos severa en los pacientes homocigotos para el alelo W748S/E1143G que para aquellos heterocigotos compuestos. Como posibles causas de las diferencias individuales se pueden señalar los mecanismos celulares de defensa a estrés celular, los haplotipos mitocondriales o la presencia de variantes polimórficas en genes que codifican proteínas que interaccionan directa o indirectamente con la DNA polimerasa mitocondrial.

2. Importancia de la caracterización del fenotipo metabólico de las mutaciones en el ADNmt mediante el uso de cíbridos transmitocondriales.

Dentro del amplio espectro de las enfermedades mitocondriales, aquellas causadas por mutaciones en los ARNt codificados en el ADNmt presentan algunas características que las convierten en paradigmas de los retos a los que se enfrenta la investigación de los mecanismos implicados en la fisiopatogenia de estas complejas enfermedades. Ejemplo de estos problemas son la dificultad de establecer relaciones genotipo-fenotipo o las dificultades para establecer con seguridad la patogenicidad de una mutación dada (Jacobs 2003). A pesar de que las primeras mutaciones en un ARNt fueron descritas en 1990 (Goto et al. 1990; Kobayashi et al. 1990; Shoffner et al. 1990), aún existen numerosos aspectos desconocidos de los mecanismos patogénicos asociados a las mismas.

El considerable número de procesos fisiológicos en los que la mitocondria esta implicada y el papel central que desempeña en cascadas de señalización celular, han hecho necesario un cambio en la visión clásica de los defectos de la cadena respiratoria. En los últimos años se ha situado a la mitocondria en un nuevo escenario, donde distintas vías de regulación como las mediadas por NO (Moncada 2006), HIF1- α (Simon 2006), PGC1- α (Green 2005; Puigserver 2005) o Ca²⁺ (Bianchi et al. 2004), juegan un papel fundamental en la regulación del metabolismo mitocondrial. Es fácil

suponer por tanto, que las mutaciones en el ADNmt puedan estar alterando no solo la capacidad de sintetizar ATP, sino procesos celulares muy variados, y que existan mecanismos adaptativos mediados por los mismos que puedan estar modificando la expresión fenotípica de dichas mutaciones. Todos estos aspectos han de ser considerados para comprender los procesos celulares que se desencadenan por mutaciones en el ADNmt.

La complejidad de la fisiología mitocondrial convierte el problema de definir a una mutación sobre el ADNmt como patogénica, es decir, como responsable del fenotipo clínico encontrado en el paciente, en una cuestión difícil de responder en muchos casos (Bandelt et al. 2006), incluso cuando solo se hace referencia a su efecto sobre el sistema OXPHOS. En este contexto, el uso de cíbridos transmitocondriales ha demostrado ser de gran utilidad en la caracterización de las consecuencias bioquímicas y moleculares de mutaciones en el ADNmt (Swerdlow 2007), y en nuestro laboratorio se ha usado con anterioridad para estudiar mutaciones en el ARNt^{Lys} del ADNmt (Arenas et al. 1999; Bornstein et al. 2002; Bornstein et al. 2005)

En este trabajo hemos abordado la caracterización de las mutaciones A8347G y A8296G en el ARNt^{Lys} mitocondrial, ambas asociadas a patología humana, pero con consecuencias muy diferentes sobre la funcionalidad OXPHOS. Una ventaja muy importante que posee el sistema de cíbridos transmitocondriales es que permite caracterizar diferentes mutaciones en un fondo genético nuclear homogéneo. Sin embargo, el hecho de que existan diferencias específicas de tejido en las vías metabólicas y en su regulación, (Kunz 2003; Rossignol et al. 2000), hace que el fondo genético nuclear empleado en la generación de los cíbridos pueda influir de un modo importante en la expresión bioquímica y molecular de los defectos asociados a las mutaciones en el ADNmt (Dunbar et al. 1995). Por otro lado, las líneas celulares utilizadas están transformadas y por tanto poseen ya fondos nucleares genéticamente modificados. Esto plantea la necesidad de estudiar las mutaciones en diferentes fondos genéticos nucleares y, en cualquier caso, analizar los resultados en el contexto del sistema celular utilizado.

2.1. La mutación A8347G produce un claro defecto en la función OXPHOS.

La mutación A8347G en el gen *mtRNA^{Lys}* ha sido identificada por primera vez recientemente y existe únicamente un caso descrito en la literatura (Brinckmann et al. 2007) en el que no se ha demostrado su patogenicidad. Por ello, y a partir de un segundo caso identificado por el Prof. Goto en Japón, estudiamos diferentes parámetros de la funcionalidad mitocondrial en cíbridos homoplásmicos para un ADNmt portador de esta mutación y los comparamos con cíbridos control, que contenían un ADNmt salvaje perteneciente al mismo haplogrupo (B) que el ADNmt de la línea A8347G. En ausencia de un control isogénico, se trata del control más adecuado para realizar el estudio, y su idoneidad se encuentra validada al no encontrar diferencias entre las dos líneas, control y A8347G, ni en la masa mitocondrial ni en la cantidad de ADNmt.

Nuestro estudio ha demostrado claramente la patogenicidad de este cambio en el ARNt^{Lys}, ocasionando dicha mutación un defecto muy severo en la capacidad mitocondrial de síntesis de

ATP. Esto se confirmó en todas las medidas funcionales del sistema OXPHOS realizadas, que han incluido consumo de oxígeno y potencial de membrana mitocondrial. Así mismo, los niveles de actividad de los complejos de la cadena respiratoria se encuentran muy disminuidos en la línea A8347G, siendo los resultados en conjunto muy similares a los obtenidos en la línea G8363A, que aunque contiene un ADNmt perteneciente a otro haplogrupo, fue utilizada como control positivo de patogenicidad (Bornstein et al. 2005).

2.2. Existen diferencias en el fenotipo bioquímico que expresan las mutaciones A8347G y G8363A del gen *mtRNA*^{Lys}.

La obtención de cíbridos con un fondo genético nuclear único, obtenidos y cultivados en condiciones experimentales idénticas, nos ha permitido realizar un estudio comparativo de los efectos que provocan ADNmt diferentes, con y sin mutaciones, sobre la fisiología celular. Tanto la línea A8347G como la línea control, ambas pertenecientes al haplogrupo mitocondrial B, poseen una menor cantidad de ADNmt que la línea G8363A, perteneciente al haplogrupo U y que la línea parental, perteneciente al haplogrupo H. La diferencia con la línea parental, una línea que deriva de un osteosarcoma, podría deberse a los procesos de generación de células ρ^0 y de cibridización, ya que se ha demostrado que estos procesos inducen cambios a nivel transcripcional (Danielson et al. 2005), y que ambos tipos celulares, cíbridos y osteosarcoma 143B, no pueden ser comparados en este caso. Sin embargo, las diferencias entre las tres líneas de cíbridos sí son significativas y requieren un análisis más detallado.

La línea G8363A posee un aumento del 50% en la cantidad de ADNmt con respecto a las líneas A8347G y control. Se ha propuesto que las especies reactivas de oxígeno y los radicales libres generados en la cadena respiratoria están implicados en mecanismos de comunicación núcleo-mitocondria y que en condiciones fisiológicas un incremento del estrés oxidativo puede inducir un aumento del número de copias de ADNmt, con el fin de aumentar el metabolismo energético de la célula (Lee and Wei 2005). Así mismo, en un elegante estudio, realizado en cíbridos de ratón, se ha demostrado que un aumento de la producción de ROS conduce a un aumento del número de copias de ADNmt y se sugiere que el cambio de metabolismo anaerobio a aerobio, que se produce al crecer las células en galactosa, está mediado por ROS (Moreno-Loshuertos et al. 2006).

En coherencia con estos datos, los niveles de anión superóxido son mayores en la línea G8363A que en las líneas A8347G y control, que a su vez se comportan de manera muy similar. El anión superóxido es el precursor más importante de las especies reactivas de oxígeno, y la cadena de transporte electrónico constituye la fuente primaria del mismo en la mayoría de los tejidos (Turrens 2003). La especificidad de la producción de anión superóxido por parte de la cadena respiratoria queda reflejada en la nula producción de esta especie por parte de la línea 143B ρ^0 . Por lo tanto, el aumento en la producción de anión superóxido, podría estar indicando una menor actividad OXPHOS en la línea A8347G frente a la línea G8363A, y podría ser el responsable del

aumento de ADNmt en la línea G8363A. Otros datos de la caracterización de esta mutación también apuntan en este sentido.

En la medida de los complejos de la cadena respiratoria se observa una disminución en la actividad del complejo II en la línea A8347G frente a la línea G8363A, que al estar sus cuatro subunidades codificadas en el ADNn, no puede ser explicada de manera directa por el defecto en la capacidad de síntesis de proteínas mitocondriales que producen las mutaciones en el ARNt. Dado que la succinato deshidrogenasa además de formar parte de la cadena de transporte electrónico forma parte del ciclo de ácidos tricarboxílicos o ciclo de Krebs, esta disminución que también se observa en la línea 143B ρ^0 podría estar indicando que el cambio a un metabolismo anaerobio es más acusado en la línea A8347G que en la G8363A, en concordancia con los datos de producción de anión superóxido. En este sentido es interesante resaltar que la succinato deshidrogenasa a su vez es una de las enzimas mitocondriales responsables de la producción de anión superóxido (Andreyev et al. 2005). La diferencia metabólica entre las dos líneas de cíbridos se confirma con las medidas de producción de lactato, que está más aumentada en la línea A8347G.

Con el objeto de confirmar este cambio hacia un metabolismo más glicolítico hemos cuantificado la expresión de la enzima PDK1. La piruvato deshidrogenasa quinasa regula el cambio de metabolismo aerobio a anaerobio mediante la fosforilación e inactivación de la piruvato deshidrogenasa, impidiendo la transformación del piruvato en acetil-CoA y por lo tanto su entrada en el ciclo de Krebs (Sugden and Holness 2003). Aunque los datos no son concluyentes, se puede apreciar claramente un aumento en la expresión de esta enzima reguladora en la línea A8347G frente a la línea control y, en menor medida, frente a la línea G8363A. Adicionalmente, y dado el papel central que desempeña el factor de respuesta a hipoxia HIF-1 en los mecanismos de adaptación metabólica mediados por la producción de ROS (Brunelle et al. 2005) y por la activación de PDK (Kim et al. 2006), y a pesar de no estar ante una situación de hipoxia, nos planteamos si podría estar mediando la respuesta de estas células y el cambio a un metabolismo anaerobio. Sin embargo, no se observó activación de HIF-1- α en ninguna de las líneas en estudio (datos no mostrados)

A pesar de que la producción de peróxido de hidrógeno está muy aumentada en las dos líneas de cíbridos que contienen mutaciones patogénicas, la respuesta antioxidante celular, medida como cantidad de Mn-SOD y actividad de la glutatión peroxidasa, solo aumenta significativamente en la línea G8363A, y exclusivamente en el caso de la glutatión peroxidasa. Esta diferencia en la respuesta celular al estrés oxidativo contrasta con los resultados obtenidos en trabajos previos al estudiar la mutación A8344G en el ARNt^{Lys}, así como la mutación A3243G del ARNt^{Leu}, donde el aumento del estrés oxidativo sí se veía acompañado de un aumento de la respuesta antioxidante celular (Vives-Bauza et al. 2006).

En resumen, la mutación A8347G produce un claro defecto en la capacidad de síntesis de ATP mitocondrial, al igual que la mutación patogénica G8363A en el mismo ARNt, pero, sin

embargo, presenta diferencias significativas en la respuesta metabólica celular. Esta diferencia en los mecanismos adaptativos celulares a un defecto en el sistema OXPHOS podría ser uno de los factores que estuvieran influyendo en la gran variabilidad de fenotipos asociados a las enfermedades mitocondriales, dado que en función de esta respuesta y dependiendo del tejido afectado, se podrían generar un amplio abanico de fenotipos bioquímicos. Dado que ambos ADNmt pertenecen a haplogrupos diferentes, el efecto que inducen a nivel celular puede deberse a la variabilidad genética de las moléculas, a la presencia de mutaciones diferentes, o lo que es más probable, a una combinación de ambos factores.

2.3. La mutación A8296G del gen *mtRNA*^{Lys} mitocondrial no produce defectos en el sistema OXPHOS

Resultados previos de nuestro laboratorio habían puesto en duda la patogenicidad de la mutación A8296G (Bornstein et al. 2002) que, sin embargo, durante los últimos años ha sido asociada a diversas patologías (Akita et al. 2000; Kameoka et al. 1998b; Sakuta et al. 2002). El hecho de que en la mayoría de las ocasiones los pacientes fueran japoneses, donde la distribución de haplogrupos mitocondriales es muy diferente a Europa, nos animó a generar y caracterizar cíbridos repoblados con mitocondrias portadoras de la mutación A8296G obtenidas de un paciente japonés de haplogrupo B. En paralelo hemos generado y caracterizado cíbridos repoblados con mitocondrias de un paciente español, portadoras de la misma mutación pero en este caso en un fondo genético mitocondrial L1c, con los que habíamos realizado nuestros estudios previos (Bornstein et al. 2005). El haplogrupo L1c es de origen africano y está muy poco representado en la población española, lo que nos ha impedido poder disponer de cíbridos controles que contuvieran una versión salvaje de ADNmt L1c.

El estudio demuestra de una manera concluyente que la mutación A8296G no produce ningún defecto sobre el sistema OXPHOS en ninguno de los dos fondos genéticos mitocondriales en el contexto del sistema celular utilizado. Las actividades de los complejos de la cadena respiratoria, el consumo de oxígeno, la síntesis mitocondrial de ATP o el potencial de membrana, no muestran ningún déficit en los cíbridos portadores de la mutación A8296G. La producción de lactato indica también la presencia de un sistema OXPHOS normal, dado que los cíbridos mutantes presentan unos niveles muy similares a los de la línea control y claramente inferiores a los de la línea ρ^0 y a los niveles de lactato presentes en cíbridos portadores de mutaciones patogénicas del tipo de las mutaciones G8363A y A8347G.

Sin embargo, se observan algunas diferencias entre los cíbridos portadores de la mutación A8296G/B frente a los controles del mismo haplogrupo B, y entre los cíbridos portadores de la mutación en los dos fondos genéticos mitocondriales analizados. En primer lugar, el potencial de membrana mitocondrial es superior en los cíbridos portadores de la mutación A8296G/B en comparación con el control que contiene un ADNmt de haplogrupo B. Otro aspecto intrigante es el aumento en la actividad de los complejos I, III, y en menor medida el IV, de la línea A8296G/L1c

comparados con la de la línea A8296G/B, la línea control de haplogrupo B y la propia línea parental de células de osteosarcoma 143B. Estas diferencias, aunque pequeñas, son significativas, y no es fácil interpretarlas ya que el consumo de oxígeno y la producción mitocondrial de ATP son muy parecidos en todas las líneas celulares analizadas.

El aspecto sin duda más interesante lo hemos detectado al cuantificar los niveles de ADNmt: los híbridos A8296G/B y A8296G/L1c tienen un número de copias de ADNmt muy similar, pero significativamente superior al de los híbridos controles. Como ya se ha comentado al discutir los resultados de la caracterización de la mutación A8347G, algunos autores han propuesto que el aumento del número de copias de ADNmt es un mecanismo adaptativo mediado por ROS que permite aumentar el metabolismo energético de células ligeramente deficientes en actividad OXPHOS (Moreno-Loshuertos et al. 2006). En nuestro estudio, la producción de anión superóxido no mostró diferencias significativas entre los tres híbridos analizados, presentando únicamente la línea A8296G/L1c un valor ligeramente superior, quizás debido al ligero aumento en la actividad de sus complejos respiratorios comentado previamente. Sin embargo, los niveles de peróxido de hidrógeno son superiores en las dos líneas que contienen la mutación A8296G frente a la línea control. Estas diferencias, del 68% y del 73% respectivamente para las líneas A8296G/L1c y A8296G/B, son muy inferiores a las encontradas en las líneas portadoras de mutaciones patogénicas, pero del mismo rango que las encontradas en híbridos de ratón con diferentes versiones de ADNmt (Moreno-Loshuertos et al. 2006) y que explican, según dicho trabajo, las diferencias en la cantidad de ADNmt. No se observa en las líneas de híbridos A8296G un aumento de la respuesta celular al estrés oxidativo, siendo incluso los valores de glutatión peroxidasa en la línea A8296G/L1c inferiores a los encontrados tanto en el control como en la línea A8296G/B.

Estos resultados sugieren que la presencia de la mutación A8296G podría inducir un pequeño aumento del estrés oxidativo, en un rango en el que no se induce un aumento de las defensas antioxidantes celulares, pero suficiente para mediar una respuesta celular que aumentaría el contenido de ADNmt.

El estudio realizado descarta que la mutación A8296G produzca algún tipo de defecto sobre el sistema OXPHOS en ninguno de los fondos genéticos mitocondriales analizados, pero sugiere que la expresión del fenotipo bioquímico en las líneas portadoras de la mutación A8296G difiere del control. Por ello, nos planteamos la posibilidad de que estas diferencias pudieran ser mayores en otros fondos genéticos nucleares diferentes al 143B. Actualmente se sabe que existen diferencias muy importantes en el proteoma mitocondrial (Forner et al. 2006) y en las vías metabólicas que son específicas de tejido (Kunz 2003; Rossignol et al. 2000), lo cual puede indicar que la expresión fenotípica de una mutación en un sistema de híbridos probablemente varía en función del fondo nuclear usado en la generación de los mismos (Dunbar et al. 1995). Con esta idea hemos generado híbridos utilizando líneas de carcinoma de pulmón (A549) repobladas con mitocondrias que contienen ADNmt de los haplotipos A8296G/L1c y A8296G/B. El estudio comparativo de los mismos indica claramente que la mutación A8296G tampoco produce ningún defecto en el sistema

OXPHOS en el fondo genético nuclear A549. Sin embargo, comparadas con la línea celular parental, las líneas híbridas A8296G poseen una mayor cantidad de ADNmt, generan más anión superóxido y producen más lactato. Será por tanto muy interesante realizar un estudio más detallado de los mismos y compararlo con híbridos repoblados con ADNmt de los haplogrupos correspondientes.

En resumen, en el presente trabajo hemos utilizado el sistema de híbridos transmitocondriales para estudiar dos mutaciones diferentes del tRNA^{Lys}, A8347G y A8296G, ambas asociadas en familias independientes a diversas enfermedades mitocondriales. Hemos podido demostrar que la primera de ellas (A8347G) provoca un claro defecto en el sistema OXPHOS y en la síntesis de ATP mitocondrial, mientras que la segunda (A8296G) no altera el funcionamiento de la cadena respiratoria. El estudio detallado de los híbridos nos ha permitido detectar que, en unas condiciones experimentales idénticas y con un fondo genético nuclear homogéneo, las diferentes versiones genéticas mitocondriales analizadas provocan cambios a nivel celular que modifican de un modo diferencial la regulación del número de copias de ADNmt, la generación de ROS o la producción de lactato. En este sentido es interesante resaltar que el grupo de los Dres. Mayte Montero y Javier Álvarez (Universidad de Valladolid), en colaboración con nuestro grupo, han estudiado la homeostasis del calcio en los diferentes híbridos discutidos en la presente tesis doctoral. Aunque los resultados son preliminares, han detectado diferencias significativas entre ellos en la capacidad de almacenamiento de calcio mitocondrial. Todos estos datos refuerzan la idea, cada vez más sólida en la literatura científica, de que la variabilidad del genoma mitocondrial tiene un importante impacto en la fisiología celular y por tanto podría ser uno de los principales responsables de la variabilidad clínica característica de las enfermedades mitocondriales.

1. Las mutaciones en el gen *POLG* son una causa frecuente de oftalmoplejía externa progresiva asociada a deleciones multiples en el ADN mitocondrial en la población española, con un porcentaje del 38,5% pacientes con PEO portadores de mutaciones en este gen.
2. Se han identificado cuatro mutaciones nuevas en este gen: las mutaciones M603L, R853W, R1146C y D1184N asociadas a enfermedad mitocondrial.
3. La mutación A8347G del tRNA^{Lys} codificado en el ADN mitocondrial es patogénica, causando un defecto muy severo sobre la función OXPHOS.
4. La expresión del fenotipo bioquímico de la mutación A8347G difiere del encontrado en la mutación G8363A, a pesar de afectar al mismo gen y ser también causante de un defecto severo sobre la función OXPHOS.
5. La mutación A8296G del tRNA^{Lys}, que se ha descrito asociada a diferentes enfermedades mitocondriales, no produce ningún defecto sobre la función OXPHOS en ninguno de los dos haplogrupos mitocondriales estudiados, L1c y B, e independientemente del fondo nuclear utilizado, 143B y A549. Estos resultados indican que no afecta de un modo importante a la capacidad de síntesis de ATP celular y sugieren que se trata de un polimorfismo poco frecuente y, probablemente, no patogénico.

- Agostino, A., et al. (2003)**, 'Mutations of ANT1, Twinkle, and POLG1 in sporadic progressive external ophthalmoplegia (PEO)', *Neurology*, 60 (8), 1354-6.
- Akita, Y., et al. (2000)**, 'Fatal hypertrophic cardiomyopathy associated with an A8296G mutation in the mitochondrial tRNA(Lys) gene', *Hum Mutat*, 15 (4), 382.
- Anderson, S., et al. (1981)**, 'Sequence and organization of the human mitochondrial genome', *Nature*, 290 (5806), 457-65.
- Andreyev, A. Y., Kushnareva, Y. E., and Starkov, A. A. (2005)**, 'Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species', *Biochemistry (Mosc)*, 70 (2), 200-14.
- Arco, A. D. and Satrustegui, J. (2005)**, 'New mitochondrial carriers: an overview', *Cell Mol Life Sci*, 62 (19-20), 2204-27.
- Arenas, J., et al. (1999)**, 'A double mutation (A8296G and G8363A) in the mitochondrial DNA tRNA (Lys) gene associated with myoclonus epilepsy with ragged-red fibers', *Neurology*, 52 (2), 377-82.
- Arpa, J., et al. (2003)**, 'Prevalence and progression of mitochondrial diseases: a study of 50 patients', *Muscle Nerve*, 28 (6), 690-5.
- Bandelt, H. J., Salas, A., and Bravi, C. M. (2006)**, 'What is a 'novel' mtDNA mutation--and does 'novelty' really matter?' *J Hum Genet*, 51 (12), 1073-82.
- Baruffini, E., et al. (2006)**, 'Genetic and chemical rescue of the *Saccharomyces cerevisiae* phenotype induced by mitochondrial DNA polymerase mutations associated with progressive external ophthalmoplegia in humans', *Hum Mol Genet*, 15 (19), 2846-55.
- Bianchi, K., et al. (2004)**, 'Calcium and mitochondria: mechanisms and functions of a troubled relationship', *Biochim Biophys Acta*, 1742 (1-3), 119-31.
- Bogenhagen, D. F. and Clayton, D. A. (2003a)**, 'The mitochondrial DNA replication bubble has not burst', *Trends Biochem Sci*, 28 (7), 357-60.
- Bogenhagen, D. F. and Clayton, D. A. (2003b)**, 'Concluding remarks: The mitochondrial DNA replication bubble has not burst', *Trends Biochem Sci*, 28 (8), 404-5.
- Bogenhagen, D. F., et al. (2003)**, 'Protein components of mitochondrial DNA nucleoids in higher eukaryotes', *Mol Cell Proteomics*, 2 (11), 1205-16.
- Bolden, A., Noy, G. P., and Weissbach, A. (1977)**, 'DNA polymerase of mitochondria is a gamma-polymerase', *J Biol Chem*, 252 (10), 3351-6.
- Bonawitz, N. D., Clayton, D. A., and Shadel, G. S. (2006)**, 'Initiation and beyond: multiple functions of the human mitochondrial transcription machinery', *Mol Cell*, 24 (6), 813-25.
- Bornstein, B., et al. (2002)**, 'The A8296G mtDNA mutation associated with several mitochondrial diseases does not cause mitochondrial dysfunction in cybrid cell lines', *Hum Mutat*, 19 (3), 234-9.
- Bornstein, B., et al. (2005)**, 'Comparative analysis of the pathogenic mechanisms associated with the G8363A and A8296G mutations in the mitochondrial tRNA(Lys) gene', *Biochem J*, 387 (Pt 3), 773-8.
- Bourdon, A., et al. (2007)**, 'Mutation of RRM2B, encoding p53-controlled ribonucleotide reductase (p53R2), causes severe mitochondrial DNA depletion', *Nat Genet*, 39 (6), 776-80.

- Bourgeron, T., et al. (1995)**, 'Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency', *Nat Genet*, 11 (2), 144-9.
- Bowmaker, M., et al. (2003)**, 'Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone', *J Biol Chem*, 278 (51), 50961-9.
- Brand, M. D. and Esteves, T. C. (2005)**, 'Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3', *Cell Metab*, 2 (2), 85-93.
- Brandon, M. C., et al. (2005)**, 'MITOMAP: a human mitochondrial genome database--2004 update', *Nucleic Acids Res*, 33 (Database issue), D611-3.
- Brinckmann, A., et al. (2007)**, 'De novo double mutation in PAX6 and mtDNA tRNA(Lys) associated with atypical aniridia and mitochondrial disease', *J Mol Med*, 85 (2), 163-8.
- Browne, S. E., et al. (1997)**, 'Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia', *Ann Neurol*, 41 (5), 646-53.
- Brunelle, J. K., et al. (2005)**, 'Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation', *Cell Metab*, 1 (6), 409-14.
- Calvo, S., et al. (2006)**, 'Systematic identification of human mitochondrial disease genes through integrative genomics', *Nat Genet*, 38 (5), 576-82.
- Campello, S., et al. (2006)**, 'Orchestration of lymphocyte chemotaxis by mitochondrial dynamics', *J Exp Med*, 203 (13), 2879-86.
- Campos, Y., et al. (2001)**, 'A new mtDNA mutation in the tRNA(Leu(UUR)) gene associated with ocular myopathy', *Neuromuscul Disord*, 11 (5), 477-80.
- Cannon, B. and Nedergaard, J. (2004)**, 'Brown adipose tissue: function and physiological significance', *Physiol Rev*, 84 (1), 277-359.
- Clayton, D. A. (1982)**, 'Replication of animal mitochondrial DNA', *Cell*, 28 (4), 693-705.
- Coller, H. A., et al. (2001)**, 'High frequency of homoplasmic mitochondrial DNA mutations in human tumors can be explained without selection', *Nat Genet*, 28 (2), 147-50.
- Chan, D. C. (2006)**, 'Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development', *Cell*, 125 (7), 1241-52.
- Chan, S. S., Longley, M. J., and Copeland, W. C. (2005a)**, 'The common A467T mutation in the human mitochondrial DNA polymerase (POLG) compromises catalytic efficiency and interaction with the accessory subunit', *J Biol Chem*, 280 (36), 31341-6.
- Chan, S. S., Longley, M. J., and Copeland, W. C. (2006)**, 'Modulation of the W748S mutation in DNA polymerase gamma by the E1143G polymorphism in mitochondrial disorders', *Hum Mol Genet*, 15 (23), 3473-83.
- Chan, S. S., et al. (2005b)**, 'Mono-allelic POLG expression resulting from nonsense-mediated decay and alternative splicing in a patient with Alpers syndrome', *DNA Repair (Amst)*, 4 (12), 1381-9.
- Chen, H. and Chan, D. C. (2005)**, 'Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission', *Hum Mol Genet*, 14 Spec No. 2, R283-9.
- Chen, X. J. and Butow, R. A. (2005)**, 'The organization and inheritance of the mitochondrial genome', *Nat Rev Genet*, 6 (11), 815-25.

- D'Aurelio, M., et al. (2004)**, 'Heterologous mitochondrial DNA recombination in human cells', *Hum Mol Genet*, 13 (24), 3171-9.
- Danielson, S. R., et al. (2005)**, 'Isolation of transcriptomal changes attributable to LHON mutations and the hybridization process', *Brain*, 128 (Pt 5), 1026-37.
- Darin, N., et al. (2001)**, 'The incidence of mitochondrial encephalomyopathies in childhood: clinical features and morphological, biochemical, and DNA abnormalities', *Ann Neurol*, 49 (3), 377-83.
- Davidzon, G., et al. (2006)**, 'Early-onset familial parkinsonism due to POLG mutations', *Ann Neurol*, 59 (5), 859-62.
- Davidzon, G., et al. (2005)**, 'POLG mutations and Alpers syndrome', *Ann Neurol*, 57 (6), 921-3.
- de Vries, M. C., et al. (2007)**, 'Multiple oxidative phosphorylation deficiencies in severe childhood multi-system disorders due to polymerase gamma (POLG1) mutations', *Eur J Pediatr*, 166 (3), 229-34.
- Detmer, S. A. and Chan, D. C. (2007)**, 'Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8 (11), 870-9.
- Di Fonzo, A., et al. (2003)**, 'POLG mutations in sporadic mitochondrial disorders with multiple mtDNA deletions', *Hum Mutat*, 22 (6), 498-9.
- DiDonato, S., et al. (1993)**, 'Respiratory chain and mitochondrial DNA in muscle and brain in Parkinson's disease patients', *Neurology*, 43 (11), 2262-8.
- Dimauro, S. (2004)**, 'Mitochondrial medicine', *Biochim Biophys Acta*, 1659 (2-3), 107-14.
- DiMauro, S., Hirano, M., and Schon, E. A. (2006)**, 'Approaches to the treatment of mitochondrial diseases', *Muscle Nerve*, 34 (3), 265-83.
- Dunbar, D. R., et al. (1995)**, 'Different cellular backgrounds confer a marked advantage to either mutant or wild-type mitochondrial genomes', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92 (14), 6562-6.
- Elpeleg, O., et al. (2005)**, 'Deficiency of the ADP-forming succinyl-CoA synthase activity is associated with encephalomyopathy and mitochondrial DNA depletion', *Am J Hum Genet*, 76 (6), 1081-6.
- Ferrari, G., et al. (2005)**, 'Infantile hepatocerebral syndromes associated with mutations in the mitochondrial DNA polymerase-gammaA', *Brain*, 128 (Pt 4), 723-31.
- Filosto, M., et al. (2003a)**, 'Lack of paternal inheritance of muscle mitochondrial DNA in sporadic mitochondrial myopathies', *Ann Neurol*, 54 (4), 524-6.
- Filosto, M., et al. (2003b)**, 'Clinical and genetic heterogeneity in progressive external ophthalmoplegia due to mutations in polymerase gamma', *Arch Neurol*, 60 (9), 1279-84.
- Fornier, F., et al. (2006)**, 'Quantitative proteomic comparison of rat mitochondria from muscle, heart, and liver', *Mol Cell Proteomics*, 5 (4), 608-19.
- Fridlender, B., et al. (1972)**, 'A new synthetic RNA-dependent DNA polymerase from human tissue culture cells (HeLa-fibroblast-synthetic oligonucleotides-template-purified enzymes)', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 69 (2), 452-5.
- Gabaldon, T. and Huynen, M. A. (2003)**, 'Reconstruction of the proto-mitochondrial metabolism', *Science*, 301 (5633), 609.

- Gabaldon, T. and Huynen, M. A. (2007)**, 'From Endosymbiont to Host-Controlled Organelle: The Hijacking of Mitochondrial Protein Synthesis and Metabolism', *PLoS Comput Biol*, 3 (11), e219.
- Garesse, R. and Vallejo, C. G. (2001)**, 'Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes', *Gene*, 263 (1-2), 1-16.
- Garesse, R. and Kaguni, L. S. (2005)**, 'A Drosophila model of mitochondrial DNA replication: proteins, genes and regulation', *IUBMB Life*, 57 (8), 555-61
- Gaspari, M., et al. (2004)**, 'The mitochondrial RNA polymerase contributes critically to promoter specificity in mammalian cells', *Embo J*, 23 (23), 4606-14.
- Goto, Y., Nonaka, I., and Horai, S. (1990)**, 'A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies', *Nature*, 348 (6302), 651-3.
- Graziewicz, M. A., et al. (2004)**, 'Structure-function defects of human mitochondrial DNA polymerase in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia', *Nat Struct Mol Biol*, 11 (8), 770-6.
- Green, D. R. (2005)**, 'Apoptotic pathways: ten minutes to dead', *Cell*, 121 (5), 671-4.
- Hakonen, A. H., et al. (2005)**, 'Mitochondrial DNA polymerase W748S mutation: a common cause of autosomal recessive ataxia with ancient European origin', *Am J Hum Genet*, 77 (3), 430-41.
- Hervias, I., Beal, M. F., and Manfredi, G. (2006)**, 'Mitochondrial dysfunction and amyotrophic lateral sclerosis', *Muscle Nerve*, 33 (5), 598-608.
- Hoffmann, S., et al. (2004)**, 'Reactive oxygen species derived from the mitochondrial respiratory chain are not responsible for the basal levels of oxidative base modifications observed in nuclear DNA of Mammalian cells', *Free Radic Biol Med*, 36 (6), 765-73.
- Hofhaus, G., Shakeley, R. M., and Attardi, G. (1996)**, 'Use of polarography to detect respiration defects in cell cultures', *Methods Enzymol*, 264, 476-83.
- Holt, I. J. and Jacobs, H. T. (2003)**, 'Response: The mitochondrial DNA replication bubble has not burst', *Trends Biochem Sci*, 28 (7), 355-6.
- Holt, I. J., Harding, A. E., and Morgan-Hughes, J. A. (1988)**, 'Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies', *Nature*, 331 (6158), 717-9.
- Holt, I. J., Lorimer, H. E., and Jacobs, H. T. (2000)**, 'Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA', *Cell*, 100 (5), 515-24.
- Horvath, R., et al. (2006)**, 'Phenotypic spectrum associated with mutations of the mitochondrial polymerase gamma gene', *Brain*, 129 (Pt 7), 1674-84.
- Hudson, G. and Chinnery, P. F. (2006)**, 'Mitochondrial DNA polymerase-gamma and human disease', *Hum Mol Genet*, 15 Spec No 2, R244-52.
- Jacobs, H. T. (2003)**, 'Disorders of mitochondrial protein synthesis', *Hum Mol Genet*, 12 Spec No 2, R293-301.
- Kaguni, L. S. (2004)**, 'DNA polymerase gamma, the mitochondrial replicase', *Annu Rev Biochem*, 73, 293-320.

- Kameoka, K., et al. (1998a), 'Impaired insulin secretion in Japanese diabetic subjects with an A-to-G mutation at nucleotide 8296 of the mitochondrial DNA in tRNA(Lys)', *Diabetes Care*, 21 (11), 2034-5.
- Kameoka, K., et al. (1998b), 'Novel mitochondrial DNA mutation in tRNA(Lys) (8296A-->G) associated with diabetes', *Biochem Biophys Res Commun*, 245 (2), 523-7.
- Kaukonen, J., et al. (2000), 'Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance', *Science*, 289 (5480), 782-5.
- Kim, J. W., et al. (2006), 'HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia', *Cell Metab*, 3 (3), 177-85.
- King, M. P. and Attardi, G. (1989), 'Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation', *Science*, 246 (4929), 500-3.
- King, M. P. and Attadi, G. (1996), 'Mitochondria-mediated transformation of human rho(0) cells', *Methods Enzymol*, 264, 313-34.
- Kobayashi, Y., et al. (1990), 'A point mutation in the mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) gene in MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes)', *Biochem Biophys Res Commun*, 173 (3), 816-22.
- Kollberg, G., et al. (2005), 'Low frequency of mtDNA point mutations in patients with PEO associated with POLG1 mutations', *Eur J Hum Genet*, 13 (4), 463-9.
- Kollberg, G., et al. (2006), 'POLG1 mutations associated with progressive encephalopathy in childhood', *J Neuropathol Exp Neurol*, 65 (8), 758-68.
- Korhonen, J. A., et al. (2004), 'Reconstitution of a minimal mtDNA replisome in vitro', *Embo J*, 23 (12), 2423-9.
- Kraysberg, Y., et al. (2004), 'Recombination of human mitochondrial DNA', *Science*, 304 (5673), 981.
- Kujoth, G. C., et al. (2005), 'Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging', *Science*, 309 (5733), 481-4.
- Kunz, W. S. (2003), 'Different metabolic properties of mitochondrial oxidative phosphorylation in different cell types--important implications for mitochondrial cytopathies', *Exp Physiol*, 88 (1), 149-54.
- Kurland, C. G. and Andersson, S. G. (2000), 'Origin and evolution of the mitochondrial proteome', *Microbiol Mol Biol Rev*, 64 (4), 786-820.
- Lamantea, E., et al. (2002), 'Mutations of mitochondrial DNA polymerase gammaA are a frequent cause of autosomal dominant or recessive progressive external ophthalmoplegia', *Ann Neurol*, 52 (2), 211-9.
- Larsson, N. G. and Rustin, P. (2001), 'Animal models for respiratory chain disease', *Trends Mol Med*, 7 (12), 578-81.
- Lee, H. C. and Wei, Y. H. (2005), 'Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress', *Int J Biochem Cell Biol*, 37 (4), 822-34.
- Li, X., et al. (2004), 'Biochemical characterization of the mitochondrial tRNA^{Ser}(UCN) T7511C mutation associated with nonsyndromic deafness', *Nucleic Acids Res*, 32 (3), 867-77.

Lim, S. E., Longley, M. J., and Copeland, W. C. (1999), 'The mitochondrial p55 accessory subunit of human DNA polymerase gamma enhances DNA binding, promotes processive DNA synthesis, and confers N-ethylmaleimide resistance', *J Biol Chem*, 274 (53), 38197-203.

Longley, M. J., et al. (2005), 'Consequences of mutations in human DNA polymerase gamma', *Gene*, 354, 125-31.

Longley, M. J., et al. (1998), 'Identification of 5'-deoxyribose phosphate lyase activity in human DNA polymerase gamma and its role in mitochondrial base excision repair in vitro', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (21), 12244-8.

Longley, M. J., et al. (2006), 'Mutant POLG2 disrupts DNA polymerase gamma subunits and causes progressive external ophthalmoplegia', *Am J Hum Genet*, 78 (6), 1026-34.

Luft, R., et al. (1962), 'A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study', *J Clin Invest*, 41, 1776-804.

Luo, N. and Kaguni, L. S. (2005), 'Mutations in the spacer region of Drosophila mitochondrial DNA polymerase affect DNA binding, processivity, and the balance between Pol and Exo function', *J Biol Chem*, 280 (4), 2491-7.

Luoma, P., et al. (2004), 'Parkinsonism, premature menopause, and mitochondrial DNA polymerase gamma mutations: clinical and molecular genetic study', *Lancet*, 364 (9437), 875-82.

Luoma, P. T., et al. (2005), 'Functional defects due to spacer-region mutations of human mitochondrial DNA polymerase in a family with an ataxia-myopathy syndrome', *Hum Mol Genet*, 14 (14), 1907-20.

Maftah, A., et al. (1989), '10-N nonyl-acridine orange: a fluorescent probe which stains mitochondria independently of their energetic state', *Biochem Biophys Res Commun*, 164 (1), 185-90.

Man, P. Y., et al. (2003), 'The epidemiology of Leber hereditary optic neuropathy in the North East of England', *Am J Hum Genet*, 72 (2), 333-9.

Mandel, H., et al. (2001), 'The deoxyguanosine kinase gene is mutated in individuals with depleted hepatocerebral mitochondrial DNA', *Nat Genet*, 29 (3), 337-41.

Manfredi, G., et al. (2001), 'Assay of mitochondrial ATP synthesis in animal cells', *Methods Cell Biol*, 65, 133-45.

Margulis, L. (1975), 'Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof', *Symp Soc Exp Biol*, 21-38.

McFarland, R., et al. (2002), 'Multiple neonatal deaths due to a homoplasmic mitochondrial DNA mutation', *Nat Genet*, 30 (2), 145-6.

Michel, B., Ehrlich, S. D., and Uzest, M. (1997), 'DNA double-strand breaks caused by replication arrest', *Embo J*, 16 (2), 430-8.

Moncada, S. (2006), 'Adventures in vascular biology: a tale of two mediators', *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 361 (1469), 735-59.

Montoya, J., Ojala, D., and Attardi, G. (1981), 'Distinctive features of the 5'-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs', *Nature*, 290 (5806), 465-70.

- Moreno-Loshuertos, R., et al. (2006)**, 'Differences in reactive oxygen species production explain the phenotypes associated with common mouse mitochondrial DNA variants', *Nat Genet*, 38 (11), 1261-8.
- Nass, M. M. and Nass, S. (1963)**, 'Intramitochondrial Fibers With Dna Characteristics. I. Fixation And Electron Staining Reactions', *J Cell Biol*, 19, 593-611.
- Naviaux, R. K. and Nguyen, K. V. (2004)**, 'POLG mutations associated with Alpers' syndrome and mitochondrial DNA depletion', *Ann Neurol*, 55 (5), 706-12.
- Nguyen, K. V., et al. (2006)**, 'Molecular diagnosis of Alpers syndrome', *J Hepatol*, 45 (1), 108-16.
- Niemann, A., et al. (2005)**, 'Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease', *J Cell Biol*, 170 (7), 1067-78.
- Nishino, I., Spinazzola, A., and Hirano, M. (1999)**, 'Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder', *Science*, 283 (5402), 689-92.
- O'Brien, T. W. (2002)**, 'Evolution of a protein-rich mitochondrial ribosome: implications for human genetic disease', *Gene*, 286 (1), 73-9.
- Ogilvie, I., Kennaway, N. G., and Shoubridge, E. A. (2005)**, 'A molecular chaperone for mitochondrial complex I assembly is mutated in a progressive encephalopathy', *J Clin Invest*, 115 (10), 2784-92.
- Ostergaard, E., et al. (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.
- Pagnamenta, A. T., et al. (2006)**, 'Dominant inheritance of premature ovarian failure associated with mutant mitochondrial DNA polymerase gamma', *Hum Reprod*, 21 (10), 2467-73.
- Pallotti, F., et al. (2004)**, 'Biochemical analysis of respiratory function in cybrid cell lines harbouring mitochondrial DNA mutations', *Biochem J*, 384 (Pt 2), 287-93.
- Petrozzi, L., et al. (2007)**, 'Mitochondria and neurodegeneration', *Biosci Rep*, 27 (1-3), 87-104.
- Ponamarev, M. V., et al. (2002)**, 'Active site mutation in DNA polymerase gamma associated with progressive external ophthalmoplegia causes error-prone DNA synthesis', *J Biol Chem*, 277 (18), 15225-8.
- Poulton, J. and Marchington, D. R. (2002)**, 'Segregation of mitochondrial DNA (mtDNA) in human oocytes and in animal models of mtDNA disease: clinical implications', *Reproduction*, 123 (6), 751-5.
- Prezant, T. R., et al. (1993)**, 'Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness', *Nat Genet*, 4 (3), 289-94.
- Puigserver, P. (2005)**, 'Tissue-specific regulation of metabolic pathways through the transcriptional coactivator PGC1-alpha', *Int J Obes (Lond)*, 29 Suppl 1, S5-9.
- Pyle, A., et al. (2005)**, 'Mitochondrial DNA haplogroup cluster UKJT reduces the risk of PD', *Ann Neurol*, 57 (4), 564-7.
- Reers, M., et al. (1995)**, 'Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 dye', *Methods Enzymol*, 260, 406-17.

- Rossignol, R., et al. (2000)**, 'Tissue variation in the control of oxidative phosphorylation: implication for mitochondrial diseases', *Biochem J*, 347 Pt 1, 45-53.
- Ruiz-Pesini, E., et al. (2007)**, 'An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny', *Nucleic Acids Res*, 35 (Database issue), D823-8.
- Saada, A., et al. (2001)**, 'Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy', *Nat Genet*, 29 (3), 342-4.
- Sakuta, R., et al. (2002)**, 'Atypical MELAS associated with mitochondrial tRNA(Lys) gene A8296G mutation', *Pediatr Neurol*, 27 (5), 397-400.
- Sambrook, J. and Russell, DW (2001)**, *Molecular cloning, a laboratory manual* (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sanchez-Martinez, A., et al. (2006)**, 'Modeling human mitochondrial diseases in flies', *Biochim Biophys Acta*, 1757 (9-10), 1190-8.
- Schaefer, A. M., et al. (2007)**, 'Prevalence of mitochondrial DNA disease in adults', *Ann Neurol*.
- Schapira, A. H. (2006)**, 'Mitochondrial disease', *Lancet*, 368 (9529), 70-82.
- Scheffler, I. E. (1999)**, 'Mitochondria' New York, John Wiley&Sons, Inc.
- Scheffler, I. E. (2001)**, 'Mitochondria make a come back', *Adv Drug Deliv Rev*, 49 (1-2), 3-26.
- Schwartz, M. and Vissing, J. (2002)**, 'Paternal inheritance of mitochondrial DNA', *N Engl J Med*, 347 (8), 576-80.
- Shoffner, J. M., et al. (1990)**, 'Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation', *Cell*, 61 (6), 931-7.
- Simon, M. C. (2006)**, 'Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypoxic HIF alpha stabilization', *Adv Exp Med Biol*, 588, 165-70.
- Skladal, D., Halliday, J., and Thorburn, D. R. (2003)**, 'Minimum birth prevalence of mitochondrial respiratory chain disorders in children', *Brain*, 126 (Pt 8), 1905-12.
- Smeitink, J. A., et al. (2006)**, 'Mitochondrial medicine: a metabolic perspective on the pathology of oxidative phosphorylation disorders', *Cell Metab*, 3 (1), 9-13.
- Song, S., et al. (2005)**, 'DNA precursor asymmetries in mammalian tissue mitochondria and possible contribution to mutagenesis through reduced replication fidelity', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (14), 4990-5.
- Spelbrink, J. N., et al. (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., et al. (2006)**, 'MPV17 encodes an inner mitochondrial membrane protein and is mutated in infantile hepatic mitochondrial DNA depletion', *Nat Genet*, 38 (5), 570-5.
- Spremulli, L. L., et al. (2004)**, 'Initiation and elongation factors in mammalian mitochondrial protein biosynthesis', *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 77, 211-61.
- Sue, C. M., et al. (1999)**, 'Maternally inherited hearing loss in a large kindred with a novel T7511C mutation in the mitochondrial DNA tRNA(Ser(UCN)) gene', *Neurology*, 52 (9), 1905-8.

- Sugden, M. C. and Holness, M. J. (2003)**, 'Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs', *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 284 (5), E855-62.
- Swerdlow, R. H. (2007)**, 'Mitochondria in cybrids containing mtDNA from persons with mitochondriopathies', *J Neurosci Res*.
- Taylor, R. W. and Turnbull, D. M. (2005)**, 'Mitochondrial DNA mutations in human disease', *Nat Rev Genet*, 6 (5), 389-402.
- Taylor, R. W., et al. (2003)**, 'Genotypes from patients indicate no paternal mitochondrial DNA contribution', *Ann Neurol*, 54 (4), 521-4.
- Torroja, L., et al. (1998)**, 'scully, an essential gene of Drosophila, is homologous to mammalian mitochondrial type II L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/amyloid-beta peptide-binding protein', *J Cell Biol*, 141 (4), 1009-17.
- Trifunovic, A., et al. (2004)**, 'Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase', *Nature*, 429 (6990), 417-23.
- Turrens, J. F. (2003)**, 'Mitochondrial formation of reactive oxygen species', *J Physiol*, 552 (Pt 2), 335-44.
- van der Walt, J. M., et al. (2003)**, 'Mitochondrial polymorphisms significantly reduce the risk of Parkinson disease', *Am J Hum Genet*, 72 (4), 804-11.
- Van Goethem, G., et al. (2001)**, 'Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions', *Nat Genet*, 28 (3), 211-2.
- Van Goethem, G., et al (2003a)**, 'Novel POLG mutations in progressive external ophthalmoplegia mimicking mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy', *Eur J Hum Genet*, 11 (7), 547-9.
- Van Goethem, G., et al (2003b)**, 'Patient homozygous for a recessive POLG mutation presents with features of MERRF', *Neurology*, 61 (12), 1811-3.
- Vielhaber, S., et al. (2000)**, 'Mitochondrial DNA abnormalities in skeletal muscle of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis', *Brain*, 123 (Pt 7), 1339-48.
- Vives-Bauza, C., et al. (2006)**, 'Enhanced ROS production and antioxidant defenses in cybrids harbouring mutations in mtDNA', *Neurosci Lett*, 391 (3), 136-41.
- Wallace, D. C. (2005)**, 'A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine', *Annu Rev Genet*, 39, 359-407.
- Wallace, D. C., et al. (1992)**, 'Mitochondrial oxidative phosphorylation defects in Parkinson's disease', *Ann Neurol*, 32 (1), 113-4.
- Wallace, D. C., et al. (1988)**, 'Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy', *Science*, 242 (4884), 1427-30.
- Wang, Y. and Bogenhagen, D. F. (2006)**, 'Human mitochondrial DNA nucleoids are linked to protein folding machinery and metabolic enzymes at the mitochondrial inner membrane', *J Biol Chem*, 281 (35), 25791-802.
- Wanrooij, S., et al. (2004)**, 'Twinkle and POLG defects enhance age-dependent accumulation of mutations in the control region of mtDNA', *Nucleic Acids Res*, 32 (10), 3053-64.

- Wiedemann, F. R., et al. (1998)**, 'Impairment of mitochondrial function in skeletal muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis', *J Neurol Sci*, 156 (1), 65-72.
- Wiedemann, N., Frazier, A. E., and Pfanner, N. (2004)**, 'The protein import machinery of mitochondria', *J Biol Chem*, 279 (15), 14473-6.
- Winterthun, S., et al. (2005)**, 'Autosomal recessive mitochondrial ataxic syndrome due to mitochondrial polymerase gamma mutations', *Neurology*, 64 (7), 1204-8.
- Yakovovskaya, E., et al. (2006)**, 'Functional human mitochondrial DNA polymerase gamma forms a heterotrimer', *J Biol Chem*, 281 (1), 374-82.
- Yang, M. Y., et al. (2002)**, 'Biased incorporation of ribonucleotides on the mitochondrial L-strand accounts for apparent strand-asymmetric DNA replication', *Cell*, 111 (4), 495-505.
- Yue, P. and Moul, J. (2006)**, 'Identification and analysis of deleterious human SNPs', *J Mol Biol*, 356 (5), 1263-74.
- Zeviani, M., Spinazzola, A., and Carelli, V. (2003)**, 'Nuclear genes in mitochondrial disorders', *Curr Opin Genet Dev*, 13 (3), 262-70.
- Zeviani, M., et al. (1989)**, 'An autosomal dominant disorder with multiple deletions of mitochondrial DNA starting at the D-loop region', *Nature*, 339 (6222), 309-11.
- Zhang, Y. and Spremulli, L. L. (1998)**, 'Identification and cloning of human mitochondrial translational release factor 1 and the ribosome recycling factor', *Biochim Biophys Acta*, 1443 (1-2), 245-50.
- Zifa, E., et al. (2007)**, 'Mitochondrial tRNA mutations: clinical and functional perturbations', *RNA Biol*, 4 (1), 38-66.
- Zuchner, S., et al. (2004)**, 'Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A', *Nat Genet*, 36 (5), 449-51.

El trabajo presentado en esta Tesis ha dado lugar a la publicación del siguiente artículo:

Gonzalez-Vioque, E., et al. (2006), 'Association of novel POLG mutations and multiple mitochondrial DNA deletions with variable clinical phenotypes in a Spanish population', *Arch Neurol*, 63 (1), 107-11.

Además, el doctorando ha participado en los trabajos recogidos en las siguientes publicaciones:

Bornstein, B., et al. (2005), 'Comparative analysis of the pathogenic mechanisms associated with the G8363A and A8296G mutations in the mitochondrial tRNA(Lys) gene', *Biochem J*, 387 (Pt 3), 773-8.

Rivera, H., et al. (2007), 'Mild ocular myopathy associated with a novel mutation in mitochondrial twinkle helicase', *Neuromuscul Disord*, 17 (9-10), 677-80.

C. Adán, Y. Matsushima, R. Hernández-Sierra, R. Marco-Ferreres, M.A. Fernández-Moreno, E. González-Vioque, M. Calleja, J.J. Aragón, L.S. Kaguni and R. Garesse "Mitochondrial transcription factor B2 is essential for metabolic function in *Drosophila* development" (en segunda revisión en *J. Biol. Chem.*).

ORIGINAL CONTRIBUTION

Association of Novel *POLG* Mutations and Multiple Mitochondrial DNA Deletions With Variable Clinical Phenotypes in a Spanish Population

Emiliano González-Vioque, BSc; Alberto Blázquez, BSc; Daniel Fernández-Moreira, PharmB; Belén Bornstein, MD, PhD; Juan Bautista, MD; Javier Arpa, MD; Carmen Navarro, MD, PhD; Yolanda Campos, PhD; Miguel A. Fernández-Moreno, PhD; Rafael Garesse, PhD; Joaquín Arenas, PhD; Miguel A. Martín, PhD

Background: Both dominant and recessive mutations were reported in the gene encoding the mitochondrial (mt) DNA polymerase γ (*POLG*) in patients with progressive external ophthalmoplegia (PEO). Phenotypes other than PEO were recently documented in patients with mutations in the *POLG* gene.

Objective: To screen patients with mitochondrial disease and multiple mtDNA deletions in muscle for mutations in the coding regions of the *POLG*, *PEO1*, and *SLC25A4* genes.

Design: To identify the underlying molecular defect in a group of patients with multiple mtDNA deletions comparing their molecular genetic findings with those of healthy controls.

Patients: Twenty-four patients (16 men and 8 women) diagnosed with mitochondrial disease and having multiple mtDNA deletions in muscle by Southern blot analysis. Thirteen patients had PEO; 2 had PEO alone, 4 had PEO and myopathy, and 5 had PEO and multisystem involvement. Four patients had multisystem disease without PEO. The remaining 9 patients had

isolated myopathy. DNA from 100 healthy individuals was also studied.

Results: No mutation was identified in the *PEO1* or *SLC25A4* genes. Nine *POLG* mutations were observed in 6 of 24 patients. Four novel mutations were detected and mapped in the linker region (M603L) and in the *pol* domain of the enzyme (R853W; D1184N; R1146C). Five patients with PEO had mutations: 2 were compound heterozygotes, 1 was homozygous, and another showed a mutation in a single allele. The remaining patient also showed a sole mutation and had an unusual phenotype lacking ocular involvement.

Conclusions: *POLG* molecular defects were found in 25% of our patients with multiple mtDNA deletions and mitochondrial disease. The uncommon phenotype found in 1 of these patients stresses the clinical variability of patients harboring *POLG* mutations. Molecular studies in the *POLG* gene should be addressed in patients with mitochondrial disease, particularly in those with PEO, and multiple mtDNA deletions.

Arch Neurol. 2006;63:107-111

MUTATIONS IN THE nuclear genes adenine nucleotide translocator 1 (*SLC25A4*), *twinkle* mitochondrial helicase (*PEO1*), and mitochondrial catalytic subunit of DNA polymerase γ (*POLG*) result in dominant progressive external ophthalmoplegia (PEO).^{1,3} *POLG* mutations can also cause autosomal recessive PEO and are frequently associated with severe and multisystem clinical disease.² These forms of PEO are associated with secondary accumulation of multiple deletions in mitochondrial DNA (mtDNA). Recently, mutations in the *POLG* gene have been documented in patients with clinical phenotypes other than PEO, such as myoclonic epilepsy and ragged red fibers–like phenotype,⁴ Alpers syndrome,⁵ parkinsonism,⁶ and ataxia.⁷

In this study, we screened 24 patients with mitochondrial disease and multiple mtDNA deletions in muscle for mutations in the coding regions of the *POLG*, *PEO1*, and *SLC25A4* genes.

METHODS

PATIENTS AND CONTROLS

We studied 24 patients (16 men and 8 women) diagnosed with mitochondrial disease by clinical, morphological, and biochemical criteria. All 24 patients displayed multiple mtDNA deletions in muscle by Southern blot analysis. The clinical picture of these patients was heterogeneous. Thirteen patients had PEO. Of them, 2 had PEO alone, 4 had PEO and myopathy, and 5 had PEO and multisystem involvement. Four patients had multisystem disease without PEO. The remaining 9 patients had isolated myopathy. These patients were not

Author Affiliations are listed at the end of this article.

Table 1. Main Clinical and Morphological Features in Patients With *POLG* Mutations

Patient/ Sex	Age at Onset, y	Age at Diagnosis, y	Clinical Findings	Family History	Serum CK Level	Serum Lactate Level	Muscle Morphological Features
1/F	49	53	PEO, ptosis	Yes*	N	N	RRF-COX negative
2/M	61	65	PEO, ptosis, mild atrial hypertrophy	Yes†	N	N	RRF-COX negative
3/F	32	54	PEO, tetraparesis	No	E	N	RRF-COX negative, COX negative non-RRF
4/M	17	24	PEO, sensorimotor neuropathy	No	E	N	RRF-COX negative
5/M	18	22	Muscle atrophy in calf muscle	No	N	N	Enlarged mitochondria by electron microscopy
6/M	33	55	PEO, ptosis, muscle weakness, sensorimotor neuropathy, hearing loss	Yes‡	N	N	RRF-COX negative

Abbreviations: CK, creatine kinase; COX, cytochrome-c oxidase; E, elevated; N, normal; PEO, progressive external ophthalmoplegia; RRF, ragged red fibers.

*Patient's sister was diagnosed with myoclonic epilepsy.

†Proband's sister had PEO.

‡Proband's sister (died at age 38 y) had PEO, muscle weakness, and seizures.

Table 2. Muscle Mitochondrial Respiratory Chain Enzyme Activities in Patients With *POLG* Mutations*

	Patient†					Controls
	1	2	3	5	6	Mean (Range)‡
Complex I, NADH-CoQ1 oxidoreductase	Not tested	Not tested	Not tested	Not tested	18.0	20.0 (15.0-30.0)
Complex II, succinate dehydrogenase	6.3	9.8	8.2	6.0	9.3	10.5 (5.8-17.4)
Complexes I + III, rotenone-sensitive NADH cytochrome-c reductase	11.5	9.1	6.7	8.1	Not tested	11.0 (7.0-17.5)
Complexes II + III, succinate cytochrome-c reductase	3.5	5.7	2.6	11.0	Not tested	6.5 (3.4-15.0)
Complex III, decylubiquinol cytochrome-c reductase	Not tested	Not tested	Not tested	Not tested	49.4	57.0 (38.0-98.0)
Complex IV, cytochrome-c oxidase	18.6	9.0	33.7	23.0	36.5	42.0 (22.0-80.0)
Citrate synthase§	106	185	204	375	284	145 (78-250)

Abbreviations: CoQ1, coenzyme Q1; NADH, nicotinamide adenine dinucleotide hydrogenase.

*Enzyme activities expressed as percentage of citrate synthase activity in nanomoles minute⁻¹milligram protein⁻¹.

†Muscle biopsy specimen from patient 4 was not available for biochemical analysis.

‡Control range denotes the 2.5th and 97.5th percentile (n = 50).

§Citrate synthase activity indicated as nanomoles minute⁻¹milligram protein⁻¹.

Table 3. Genotype of Patients With Mutant Alleles in the *POLG* Gene

Patient	Genotype	
	Allele 1	Allele 2
1	P587L	R853W*
2	T251I+P587L	M603L*
3	D1184N*	N468D
4	G268A	
5	R1146C*	
6	A467T	A467T

*Novel mutations described in this study.

obtained by a population-based genetic survey. In addition, we studied DNA from 100 healthy individuals.

An appropriate institutional review board approved this work, and informed consent was obtained from the patients and controls included in this study. A summary of clinical, biochemical, and morphological findings of the 6 patients carrying *POLG* mutations is given in **Table 1** and **Table 2**.

METHODS

DNA from skeletal muscle or blood was isolated by standard methods. The entire coding region for the *POLG*, *SLC25A4*, and *PEO1* genes was amplified and sequenced as reported.²

Muscle histochemical and biochemical tests were performed as previously reported.⁸ Southern blot analysis of mtDNA was carried out as described.⁹ Polymerase chain reactions and restriction fragment length polymorphism were used to confirm the mutations.

RESULTS

Sequencing of the *SLC25A4* and *PEO1* genes failed to detect the presence of mutations in all patients. We found 9 *POLG* mutations in 6 (25%) of 24 patients, in agreement with previous reports (**Table 3**).^{2,10} The proportion of patients with PEO and mutations in the *POLG* gene (5 [45%] of 11) was significantly higher than in those without PEO (1 [8%] of 13) ($P < .001$, χ^2 test). Four of the *POLG* mutations are novel (**Figure, A**) and were not detected in 100 healthy control subjects.

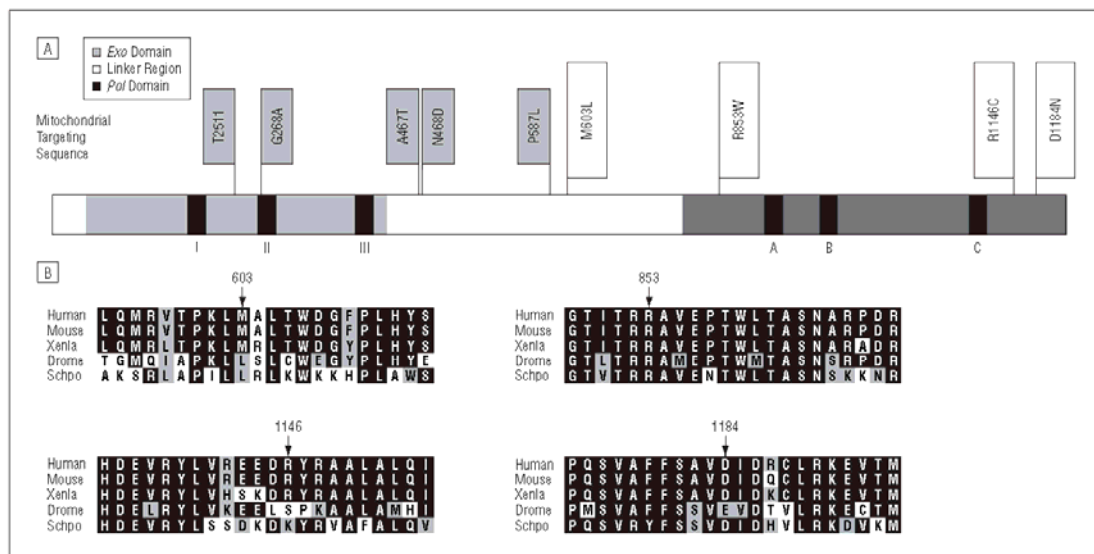


Figure. *POLG* mutations in our patients (A) and multiple alignments of the protein regions containing the novel mutations in different species (B). A, Novel mutations (open boxes) and reported mutations (shaded boxes) are indicated on the *exo*, linker, and *pol* domains of the protein. B, Protein sequences aligned on ClustalW Multiple Sequence Alignment (European Bioinformatics Institute, Cambridge, England) for DNA or proteins (version 1.8). Black shading shows amino acid identity; gray shading, similarity. Arrows indicate the position of the amino acid changes. Human indicates *Homo sapiens*; Mouse, *Mus musculus*; Xenla, *Xenopus laevis*; Drome, *Drosophila melanogaster*; Schpo, *Schizosaccharomyces pombe*.

Patient 1 was compound heterozygous for an already described P587L (c.1760C>T)¹¹ mutation and for a novel c.2557C>T mutation in exon 16, which results in a R853W missense change. This mutation abolishes an *Nci* I recognition site (not shown).

Patient 2 was compound heterozygous for the previously described mutations T2511 (c.752C>T) and P587L and for a novel c.1807A>T mutation in exon 10, which yields an M603L amino acid change. This mutation eliminates an *Nla* III recognition site (not shown). The T2511 and P587L mutations were found in *cis* in 3 previous reports.¹¹⁻¹³

Patient 3 was compound heterozygous for a previously reported c.1402A>G mutation in exon 7, yielding an N468D change, and for a novel c.3550G>A mutation in exon 22, which gives rise to a D1184N amino acid substitution. This mutation abolishes a *TaqI* recognition site (not shown).

Patient 4 was heterozygous for the already described G268A mutation (c.803G>C).¹²

Patient 5 was heterozygous for a novel c.3436C>T mutation in exon 21, which results in a missense R1146C change. This mutation abolishes a *Cfr*13 I restriction sequence (not shown).

Patient 6 was homozygous for the well-known A467T (c.1398G>A) mutation in exon 7.

We also found the following polymorphisms in the *POLG* gene: the neutral polymorphism c.2256C>T (L752L) in 1 patient, the change c.3428 C>G (E1143G) in exon 21 (National Center for Biotechnology Information single-nucleotide polymorphism E1143G cluster ID rs2307441) in 1 patient, and a novel nonsynonymous change c.391C>T (Y131H) in another patient; the microdeletion 3770delG in the 3' untranslated region² and

several CAG repeats in exon 2¹⁴ in 3 patients; and the substitution c.3708G>T (Q1236H) in exon 23 (National Center for Biotechnology Information single-nucleotide polymorphism Q1236H cluster ID rs3087374) in 5 patients.²

COMMENT

We studied 24 patients whose clinical findings varied from PEO alone or in combination with other symptoms and signs of mitochondrial myopathy to limb muscle myopathy with no ocular muscle involvement. All patients showed morphological or biochemical findings, or both, of mitochondrial dysfunction. Moreover, Southern blot analysis of mtDNA revealed multiple mtDNA deletions. All these data prompted us to look for alterations in the *SLC25A4*, *PEO1*, and *POLG* genes as the underlying cause of mtDNA rearrangements.

Molecular analysis of the *SLC25A4* and *PEO1* genes failed to reveal mutations, but we found alterations in the *POLG* gene in 25% (6/24) of the patients, accounting for 20.8% (10/48) of alleles. These data are consistent with those documented by other authors. Indirect evidence for the pathogenicity of these mutations comes from the following criteria: (1) They were associated with mitochondrial dysfunction and multiple mtDNA deletions. (2) They were the only significant nucleotide alterations in the *POLG* gene (besides polymorphisms), as well as in the *SLC25A4* and *PEO1* genes. (3) The mutations cause substitution in conserved amino acid residues of the *POLG* protein (Figure B). (4) They were absent in more than 100 healthy controls from the same ethnic background.

Three of our patients had allelic mutations, and 1 had the same mutation in both alleles, suggesting a recessive mode of inheritance. We were able to identify mutations in a single allele in the remaining 2 patients. The novel mutations described herein map in the linker region (M603L) and in the *pol* domain of the enzyme (R853W; D1184N; R1146C).

We found the already-documented P587L mutation in 2 patients. Although the P587L change is usually associated with the T251I substitution within the same allele,¹¹⁻¹³ we observed that 1 of our patients had the P587L mutation alone, whereas another showed the usual association of both mutations.

The clinical phenotypes of our patients with *POLG* mutations were heterogeneous, expanding the spectrum of mitochondrial disorders associated with *POLG* mutations. The 3 patients who were compound heterozygous for *POLG* mutations had adult-onset PEO, cytochrome-c oxidase-negative ragged red fibers, and mitochondrial respiratory chain defects. Of the 2 patients with mutations in a single allele, 1 had early-onset PEO, sensorimotor neuropathy, and ragged red fibers, and another showed an unusual phenotype with lack of ocular muscle involvement. Given the early onset, PEO and other symptoms and signs usually associated with *POLG* mutations may develop later. The only mutation we have detected (c.3718C>T, which produces the amino acid change R1146C) has been reported as a single-nucleotide polymorphism. However, the only data available, to our knowledge, come from studies using the National Institutes of Health Polymorphism Discovery Resource, and the c.3718C>T nucleotide change has been found by 2 independent groups in the same sample (rs2307440¹⁷). It is tempting to propose that the R1146C mutation may alter moderately the biochemical behavior of the enzyme, resulting in the mild clinical phenotype observed in our patient. In this context, the biochemical defects associated with several *POLG* mutations have been recently characterized in vitro,¹⁶ and there is a good correlation between biochemical and clinical findings.

The clinical picture of the patient homozygous for the A467T mutation was consistent with those documented by others^{1,3,4,11,12} and associated with the same mutation, namely PEO, sensorimotor polyneuropathy, and deafness. We did not find the substitution in Spanish controls, but Van Goethem et al¹ reported that 0.6% of a Belgian population harbored this change.

Of the 6 patients with *POLG* mutations, 5 had PEO and other clinical features such as muscle weakness, neuropathy, atrial hypertrophy, or hearing loss. Remarkably, 1 patient had a less typical phenotype characterized by early-onset thinness of the left calf muscle. This point bolsters the clinical variability of patients with *POLG* mutations.

Moreover, 45% of patients with PEO (with or without multisystem involvement) and multiple mtDNA deletions showed mutations in the *POLG* gene. By contrast, only 8% of patients with no ocular paresis had mutations in the *POLG* gene. Our data indicate that in patients with multiple mtDNA deletions in muscle those with PEO are more likely to harbor *POLG* mutations than those without PEO.

Although we did not observe parkinsonism, we were not able to perform positron emission tomographic studies, and it is therefore possible, as already suggested,⁶ that muscle weakness and neuropathy might have masked symptoms of parkinsonism in our patients. In addition, we failed to demonstrate early menopause in our female patients, which is not consistent with recent findings by Luoma et al.⁶

CONCLUSIONS

The phenotype of our patients stresses the clinical variability of patients harboring *POLG* mutations and indicates that molecular studies in the *POLG* gene should be addressed in patients with mitochondrial disease, particularly in those with ocular myopathy and multiple mtDNA deletions.

Accepted for Publication: May 24, 2005.

Authors Affiliations: Departamento de Bioquímica, Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" CSIC-UAM, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid (Mr González-Vioque and Drs Bornstein, Fernández-Moreno, and Garesse), Centro de Investigación, Hospital Universitario 12 de Octubre (Messrs Blázquez and Fernández-Moreira and Drs Campos, Arenas, and Martín), and Servicio de Neurología, Hospital Universitario La Paz (Dr Arpa), Madrid, Spain; Servicio de Neurología, Hospital Virgen del Rocío, Sevilla, Spain (Dr Bautista); Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Do Meixoeiro, Vigo, Spain (Dr Navarro). **Correspondence:** Miguel A. Martín, PhD, Centro de Investigación, Hospital Universitario 12 de Octubre, Avda de Córdoba s/n, 28041 Madrid, Spain (mamcasanueva@h12o.es).

Author Contributions: Messrs González-Vioque and Blázquez contributed equally to this work. **Study concept and design:** González-Vioque, Blázquez, Bornstein, Garesse, Arenas, and Martín. **Acquisition of data:** González-Vioque, Blázquez, Fernández-Moreira, Bornstein, Bautista, Arpa, Navarro, Campos, Fernández-Moreno, and Martín. **Analysis and interpretation of data:** González-Vioque, Blázquez, Fernández-Moreira, Garesse, Arenas, and Martín. **Drafting of the manuscript:** González-Vioque, Blázquez, Fernández-Moreira, Garesse, Arenas, and Martín. **Critical revision of the manuscript for important intellectual content:** González-Vioque, Blázquez, Bornstein, Bautista, Arpa, Navarro, Campos, Fernández-Moreno, Garesse, Arenas, and Martín. **Statistical analysis:** Arenas. **Obtained funding:** Garesse, Arenas, and Martín. **Administrative, technical, and material support:** González-Vioque and Blázquez. **Study supervision:** Garesse, Arenas, and Martín.

Funding/Support: This study was supported by grant PI030224 from Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), Ministerio de Sanidad y Consumo, grant BMC01-1525 from Ministerio de Ciencia y Tecnología, grant GR/SAL/0333/2004 from Consejería de Educación, Comunidad de Madrid, and Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Redes de centros (grant C03/08, Metabolism and Nutrition Network Coordination Center, Barcelona, Spain) and

Temáticas (grant G03/011, Spanish Mitochondrial Diseases Network Coordination Center, Madrid, Spain), Madrid. Mr Blázquez was supported by Post-Medico Interno Residente Contract CM0300007 from FIS; Mr González-Vioque, by FIS fellowship BEFI 02/9311; Mr Fernández-Moreira, by grant PI030224 from FIS; and Dr Campos, by research contract ISC III 98/3166 from Instituto de Salud Carlos III.

Acknowledgment: We are grateful to Pilar del Hoyo, PharmB, and Sara Jiménez, BSc, the technicians working on the respiratory chain activities.

REFERENCES

1. Van Goethem G, Dermaut B, Lofgren A, Martin JJ, Van Broeckhoven C. Mutation of *POLG* is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nat Genet*. 2001;28:211-212.
2. Lamantea E, Tiranti V, Bordoni A, et al. Mutations of mitochondrial DNA polymerase gammaA are a frequent cause of autosomal dominant or recessive progressive external ophthalmoplegia. *Ann Neurol*. 2002;52:211-219.
3. Agostino A, Valletta L, Chinnery PF, et al. Mutations of *SLC25A4*, *Twinkle*, and *POLG1* in sporadic progressive external ophthalmoplegia (PEO). *Neurology*. 2003;60:1354-1356.
4. Van Goethem G, Mercelis R, Lofgren A, et al. Patient homozygous for a recessive *POLG* mutation presents with features of MERRF. *Neurology*. 2003;61:1811-1813.
5. Naviaux RK, Nguyen KV. *POLG* mutations associated with Alpers' syndrome and mitochondrial DNA depletion. *Ann Neurol*. 2004;55:706-712.
6. Luoma P, Melberg A, Rinne JO, et al. Parkinsonism, premature menopause, and mitochondrial DNA polymerase gamma mutations: clinical and molecular genetic study. *Lancet*. 2004;364:875-882.
7. Van Goethem G, Luoma P, Rantamaki M, et al. *POLG* mutations in neurodegenerative disorders with ataxia but no muscle involvement. *Neurology*. 2004;63:1251-1257.
8. Martinez B, del Hoyo P, Martin MA, Arenas J, Perez-Castillo A, Santos A. Thyroid hormone regulates oxidative phosphorylation in the cerebral cortex and striatum of neonatal rats. *J Neurochem*. 2001;78:1054-1063.
9. Campos Y, Martin MA, Garcia-Silva T, et al. Clinical heterogeneity associated with mitochondrial DNA depletion in muscle. *Neuromuscul Disord*. 1998;8:568-573.
10. Filosto M, Mancuso M, Nishigaki Y, et al. Clinical and genetic heterogeneity in progressive external ophthalmoplegia due to mutations in polymerase gamma. *Arch Neurol*. 2003;60:1279-1284.
11. Van Goethem G, Schwartz M, Lofgren A, Dermaut B, Van Broeckhoven C, Vissing J. Novel *POLG* mutations in progressive external ophthalmoplegia mimicking mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Eur J Hum Genet*. 2003;11:547-549.
12. Di Fonzo A, Bordoni A, Crimi M, et al. *POLG* mutations in sporadic mitochondrial disorders with multiple mtDNA deletions. *Hum Mutat*. 2003;22:498-499.
13. Lamantea E, Zeviani M. Sequence analysis of familial PEO shows additional mutations associated with the 752C→T and 3527C→T changes in the *POLG1* gene. *Ann Neurol*. 2004;56:454-455.
14. Rovio AT, Marchington DR, Dorat S, et al. Mutations at the mitochondrial polymerase (*PoiG*) locus associated with male infertility. *Nat Genet*. 2001;29:261-262.
15. National Center for Biotechnology Information Web site. Single nucleotide polymorphism. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Accessed November 5, 2004.
16. Grazioplene MA, Longley MJ, Bienstock RJ, Zeviani M, Copeland WC. Structure-function defects of human mitochondrial DNA polymerase in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia. *Nat Struct Mol Biol*. 2004;11:770-776.

Announcement

Calendar of Events: A New Web Feature

On the new Calendar of Events site, available at <http://pubs.ama-assn.org/cgi/calendarcontent> and linked off the home page of the *Archives of Neurology*, individuals can now submit meetings to be listed. Just go to <http://pubs.ama-assn.org/cgi/cal-submit/> (also linked off the Calendar of Events home page). The meetings are reviewed internally for suitability prior to posting. This feature also includes a search function that allows searching by journal as well as by date and/or location. Meetings that have already taken place are removed automatically.

Comparative analysis of the pathogenic mechanisms associated with the G8363A and A8296G mutations in the mitochondrial tRNA^{Lys} gene

Belén BORNSTEIN*†, José Antonio MAS*, Clarice PATRONO*‡, Miguel Angel FERNÁNDEZ-MORENO*, Emiliano GONZÁLEZ-VIOQUE*, Yolanda CAMPOS§, Rosalba CARROZZO‡, Miguel Angel MARTÍN§, Pilar del HOYO§, Filippo M. SANTORELLI‡, Joaquín ARENAS§ and Rafael GARESSE*¹

*Departamento de Bioquímica, Instituto de Investigaciones Biomédicas 'Alberto Sols', CSIC-UAM, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, 28029 Madrid, Spain, †Servicio de Bioquímica, Hospital Severo Ochoa, Leganés, Madrid, Spain, ‡Unit of Molecular Medicine, Children's Hospital 'Bambino Gesù', Rome, Italy, and §Centro de Investigación, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

Two mutations (G8363A and A8296G) in the mtDNA (mitochondrial DNA) tRNA^{Lys} gene have been associated with severe mitochondrial diseases in a number of reports. Their functional significance, however, remains unknown. We have already shown that homoplasmic cybrids harbouring the A8296G mutation display normal oxidative phosphorylation, although the possibility of a subtle change in mitochondrial respiratory capacity remains an open issue. We have now investigated the pathogenic mechanism of another mutation in the tRNA^{Lys} gene (G8363A) by repopulating an mtDNA-less human osteosarcoma cell line with mitochondria harbouring either this genetic variant alone or an unusual combination of the two mutations (A8296G + G8363A). Cybrids homoplasmic for the single G8363A or the A8296G + G8363A mutations have defective respiratory-chain enzyme activities and low oxygen consumption, indicating a severe impairment of the oxidative phosphorylation system. Generation of G8363A cybrids within a wild-type or the A8296G mtDNA genetic backgrounds

resulted in an important alteration in the conformation of the tRNA^{Lys}, not affecting tRNA steady-state levels. Moreover, mutant cybrids have an important decrease in the proportion of aminoacylated tRNA^{Lys} and, consequently, mitochondrial protein synthesis is greatly decreased. Our results demonstrate that the pathogenicity of the G8363A mutation is due to a change in the conformation of the tRNA that severely impairs aminoacylation in the absence of changes in tRNA stability. The only effect detected in the A8296G mutation is a moderate decrease in the aminoacylation capacity, which does not affect mitochondrial protein biosynthesis.

Key words: aminoacylation, mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS), myoclonic epilepsy with ragged-red fibres (MERRF), mitochondrial DNA (mtDNA) mutation, mitochondrial tRNA^{Lys} gene.

INTRODUCTION

Mitochondria generate most of the cellular ATP by OXPHOS (oxidative phosphorylation). The OXPHOS system is composed of five different complexes embedded in the inner mitochondrial membrane (complexes I–V) and two small electron carriers, namely ubiquinone and cytochrome *c* [1,2]. Mammalian mitochondria are endowed with their own semi-autonomous genetic system [mtDNA (mitochondrial DNA)] that encodes a limited number of essential genes for OXPHOS biogenesis: 13 polypeptides of complex I [ND1–ND6 and ND4L (subunits 1–6 and 4L of NADH:ubiquinone oxidoreductase), complex III (cytochrome *b*), complex IV (cytochrome *c* oxidase subunits I–III) and complex V (ATPases 6–8), as well as the RNA components of the translational apparatus, two rRNAs (12 and 16 S) and 22 tRNAs. The rest of the structural subunits of the OXPHOS system and all the factors involved in OXPHOS assembly and regulation, mtDNA expression and mtDNA maintenance are encoded in the nucleus, translated into cytoplasmic ribosomes and imported to their final mitochondrial location [3]. Therefore OXPHOS defects can be produced by mutations in mitochondrially encoded genes, nuclear genes encoding OXPHOS subunits or in nuclear genes encoding factors directly or indirectly involved in OXPHOS regulation [4–6].

To date, more than 200 mtDNA mutations have been implicated in the pathogenesis of mitochondrial diseases with defec-

tive OXPHOS, including large mtDNA rearrangements and point mutations in tRNA, rRNA and protein-coding genes [7]. Mitochondrial diseases are usually multisystemic disorders and produce devastating encephalomyopathies since they affect predominantly high energy-demanding tissues such as the nervous system and skeletal and cardiac muscles [8]. Mutations in protein-coding genes affect a single complex of the OXPHOS system. In contrast, mutations in tRNA genes impair the mitochondrial translation system and therefore affect four of the five OXPHOS complexes, producing combined enzyme deficits of the respiratory chain [9]. Two point mutations, A3243G in the tRNA^{Leu(UUR)} gene and A8344G in the tRNA^{Lys} gene, associated with two well-defined clinical syndromes, MELAS (mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes) and MERRF (myoclonic epilepsy with ragged-red fibres) respectively, are relatively frequent and have been extensively characterized [10–13]. However, the relationship between genotype (mutation) and phenotype (clinical symptoms) has not been understood so far [8]. Heterogeneity is paramount: the same mutation can be associated with diverse clinical manifestations and different mutations can produce the same symptoms. Dosage and distribution of the altered tRNAs in the different tissues of the organism cannot simply account for these phenomena. In addition, the pathogenic mechanisms of the different mtDNA mutations are not fully understood and have not been studied in detail for most of the mutations described so far.

Abbreviations used: FBS, fetal bovine serum; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; MELAS, mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes; MERRF, myoclonic epilepsy with ragged-red fibres; mtDNA, mitochondrial DNA; OXPHOS, oxidative phosphorylation.

¹ To whom correspondence should be addressed (email rafael.garesse@uam.es).

We were the first to report on a family segregating the MERRF syndrome in association with a double mutation, A8296G and G8363A, in the tRNA^{lys} gene [14]. The A8296G mutation was practically homoplasmic in all the investigated family members, whereas the proportion of the G8363A mutation correlated with the severity of the phenotype. Both mutations disrupt highly conserved base pairs in the aminoacyl stem of the tRNA^{lys}. The A8296G mutation has also been independently described in association with Type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus [15,16], hypertrophic cardiomyopathy [17] and the MELAS syndrome [18]. On the other hand, the G8363A mutation had already been associated with MERRF [19], maternally inherited cardiomyopathy and hearing loss in two pedigrees [20], and with spinocerebellar ataxia and multiple symmetric lipomatosis [21]. More recently, we reported that transmittochondrial hybrids homoplasmic for the A8296G mutation had a normal OXPHOS function [22], a finding which challenges a clear-cut pathogenic role. In the present study, we have generated and extensively characterized transmittochondrial hybrids homoplasmic for the single G8363A mutation and the A8296G/G8363A double mutation. We have found that the A8296G mutation decreases moderately the aminoacylation capacity of the tRNA^{lys}, although it does not have consequences for mitochondrial protein biosynthesis. In contrast, biochemical and molecular results demonstrate that the G8363A mutation impairs mitochondrial protein synthesis and compromises severely the function of OXPHOS by altering the conformation of the tRNA^{lys} and decreasing drastically its aminoacylation capacity. This phenotype is not modified by the presence of the A8296G mutation.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and media

Two fibroblast cell lines were established from diagnostic skin biopsies obtained from the mother of an MERRF patient harbouring the A8296G-G8363A double mutation [14] and from a patient suffering from cerebellar ataxia and lipomatosis harbouring approx. 80% of the G8363A mutation in the mtDNA tRNA^{lys} gene [21]. Cells were grown in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), supplemented with 10% FBS (fetal bovine serum) and 50 µg/ml uridine. The human osteosarcoma cell line 143 B (TK⁻) was grown in DMEM supplemented with 10% FBS, 100 µg/ml bromodeoxyuridine and 50 µg/ml uridine. Its mtDNA-less derived 206 cell line (ρ^0) was grown in DMEM supplemented with 5% FBS and 50 µg/ml uridine.

Establishment of transmittochondrial hybrids

The patients' derived enucleated fibroblasts (0.5×10^6 cells) were fused to 10^5 ρ^0 -206 cells as described previously [23]. Transmittochondrial hybrid clones (cybrids) were grown in DMEM supplemented with 10% dialysed FBS and 100 µg/ml bromodeoxyuridine. Individual clones were isolated and the mtDNA was analysed for both A8296G and G8363A transitions by the Acil/Asp700 RFLP (restriction-fragment-length polymorphism) method as described in [14].

Respiratory function assays

The rate of oxygen consumption was measured as described previously [22] at 37 °C using a Clark-type platinum polarographic electrode using $3\text{--}5 \times 10^6$ exponentially intact cells growing in 2 ml of complete DMEM without glucose. To assess respiratory chain enzymes in cells, approx. 5×10^6 cells were harvested by trypsinization, washed twice with phosphate buffer and resus-

pended in 2 ml of Mops/sucrose buffer. Digitonin (200 µg) was added and incubation was performed on ice for 5 min. After centrifugation at 5000 g for 3 min, the pellet was resuspended in 0.5 ml of 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) and freeze-thawed twice just before evaluating the enzyme complexes. The activities of rotenone-sensitive NADH-coenzyme Q1 reductase (complex I), succinate dehydrogenase (part of complex II), antimycin-sensitive ubiquinol cytochrome *c* reductase (complex III), cytochrome *c* oxidase (complex IV) and citrate synthase were measured in duplicate in each assay, and expressed in terms of nmol of substrate \cdot min⁻¹ \cdot (mg of protein)⁻¹. We did not normalize the respiratory chain activities for the activity of citrate synthase since this matrix enzyme is also expressed at high levels in the ρ^0 mitochondria of the host cells. Protein concentration was measured by the method of Lowry as described in [22].

Quantification of mitochondrial DNA

To extract total DNA, cells were pooled, washed with PBS, resuspended in 1 ml of lysis buffer (100 mM NaCl, 0.5% SDS, 10 mM Tris and 25 mM EDTA, pH 8.0) and incubated in the presence of 0.2 mg/ml proteinase K at 42 °C for 24 h. DNA was extracted by standard methods [24]. Quantification of mtDNA in fibroblasts, cybrid cell lines and ρ^0 cells was performed by slot-blot and Southern-blot analyses. As a probe, we used an [α -³²P]dCTP-labelled long mtDNA PCR-amplified fragment (using an oligonucleotide from nucleotide positions 13420–13443 as forward primer and an oligonucleotide from nt 8200–8225 as reverse primer). As loading control, the same membranes were incubated with an [α -³²P]dCTP-labelled 18 S rRNA probe. Quantitative analysis was performed by phosphorimager detection.

Quantification of mitochondrial tRNAs

Total RNA (5 µg) extracted from cybrid cell lines was incubated at 90 °C for 5 min, electrophoresed through a 12% polyacrylamide–7 M urea gel in 1 \times TBE (Tris/borate/EDTA) buffer and electroblotted on to a Zeta-probe membrane at 300 mA for 30 min in 1 \times TAE (Tris/acetate/EDTA) buffer. Hybridization was performed at 42 °C for 24 h in 6 \times SSC (1 \times SSC = 0.15 M NaCl/0.015 M sodium citrate), 1 \times Denhardt's solution, 0.5% SDS, 0.05% sodium pyrophosphate and 100 µg/ml denatured salmon sperm DNA.

The tRNA^{lys} was detected using a synthetic 20-mer oligonucleotide (spanning mtDNA nucleotide positions 8361–8342), which had been labelled with [γ -³²P]ATP at its 5'-end. After hybridization, the blot was washed twice for 30 min with 6 \times SSC, 0.1% SDS and 0.05% sodium pyrophosphate at 42 °C. The membrane was stripped out and rehybridized under the same conditions with a [γ -³²P] 5'-end-labelled 21-mer oligonucleotide corresponding to mtDNA positions 597–577 of the tRNA^{phe} gene. The ratio of tRNA^{lys} to tRNA^{phe} was calculated by quantification of the respective signals either by densitometry or phosphorimager analysis.

Single-strand conformational analysis of mitochondrial tRNAs

Total RNA (8 µg) extracted from cybrid cell lines was electrophoresed through a 6% non-denaturing polyacrylamide (60:1) gel in 1 \times TBE buffer as described previously [25]. To detect the tRNA^{lys} and tRNA^{phe}, we used the same labelled probes and hybridization conditions described above.

Analysis of the aminoacylation of mitochondrial tRNAs

Total RNA from cells was extracted under acidic conditions to preserve aminoacylated tRNAs using a previously described

Table 1 Respiratory function assays in cybrid cell lines

Results are expressed as means \pm S.D.; each individual clone was analysed twice. * $P < 0.001$ and ** $P < 0.01$ indicate statistical significance with respect to wild-type (wt) and 100% A8296G cell lines respectively, and *** $P < 0.05$ indicates statistical significance with respect to 100% A8296G cell lines, by the two-tailed, Mann-Whitney U test for unpaired samples. Oxygen consumption is expressed in terms of $\text{fmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$ and mean specific enzyme activity is expressed in terms of $(\text{nmol of substrate}) \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg of protein})^{-1}$.

Cell line	Oxygen consumption	Mean specific enzyme activity				
		Complex I	Complex II	Complex III	Complex IV	Citrate synthase
Wt ($n=6$)	4.6 ± 0.9	14.3 ± 1.2	10.8 ± 3.5	104.0 ± 25	54 ± 8	200 ± 26
8363 ($n=2$)	0	$5.6 \pm 0.8^*$, ***	10.2 ± 1.6	$15.0 \pm 4.5^{**}$	$5.1 \pm 2.8^*$	188 ± 22
8296 ($n=9$)	4.5 ± 0.8	11.8 ± 3.4	9.1 ± 4.0	93.1 ± 24	57 ± 3	183 ± 22
8296/8363 ($n=6$)	$0.1 \pm 0.1^*$	$3.9 \pm 1.0^*$	11.1 ± 3.0	$5.5 \pm 4.5^*$	$6.4 \pm 2.6^*$	188 ± 22
143B ($n=3$)	4.4 ± 0.5	18.1 ± 3.5	14.1 ± 3.7	102 ± 23	70 ± 20	189 ± 30
143B/206 (ρ^0) ($n=3$)	0	1.5 ± 0.4	11.1 ± 0.8	2 ± 1.8	1 ± 0.8	167 ± 15

method [26] with minor modifications. Total RNA ($3 \mu\text{g}$) was electrophoresed through an 8% non-denaturing polyacrylamide (29:1) gel in 0.1 M sodium acetate (pH 5.0) buffer at 100–200 V for 18–20 h, with the buffer being continuously recirculated at 4°C. To deacylate tRNAs, an aliquot of total RNA was boiled for 10 min (pH 8.0) before electrophoresis. Then, the gel was electroblotted on to a Zeta-probe membrane and hybridized with specific tRNA^{Lys} and tRNA^{Phe} probes.

Mitochondrial protein synthesis

To analyse the translation products of mitochondrial genes in the different cybrid cell lines, subconfluent cultures were labelled with [³⁵S]methionine in the presence of 100 μg of emetine \cdot (ml of medium)⁻¹ by the method of Chomyn [27] with minor modifications. Cells were labelled with 125 μCi of [³⁵S]methionine for 2 h, washed with phosphate buffer and harvested. After centrifugation at 400 g, cells were resuspended in lysis buffer [20 mM Tris/HCl (pH 7.5), 0.1% SDS, 5 mM MgCl₂ and 1 mM PMSF]. Total protein (100 μg) was electrophoresed and detected by autoradiography.

RESULTS

Generation of transmitochondrial cybrids

In a previous study, we generated transmitochondrial cybrids by fusing the human mtDNA-less ρ^0 -206 cell line with fibroblasts obtained from an MERRF patient containing >95% of the A8296G combined with 50% G8363A mutations in mtDNA, as described in the Materials and methods section. More than 60 clones were isolated, most of them being homoplasmic for the A8296G mutation and the remainder containing different proportions of the A8296G-G8363A double mutation. Several clones were selected for further biochemical and molecular characterization, essentially homoplasmic (>99%) for the single A8296G mutation [22] or homoplasmic (>99%) for both A8296G and G8363A mutations (the present study). Since the A8296G mutation is virtually homoplasmic in the patient's derived skin fibroblasts, it was impractical to continue the isolation of clones to obtain cybrids homoplasmic for the G8363A mutation alone. To achieve this, we generated additional transmitochondrial cybrids fusing the human mtDNA-less ρ^0 -206 cell line with fibroblasts obtained from a patient suffering from spinocerebellar ataxia and multiple lipomas, containing approx. 80% of the G8363A mutation. We isolated several independent clones homoplasmic for the G8363A mutation. We used as control a cybrid cell line obtained by the fusion of the ρ^0 -206 cell line with fibroblasts homoplasmic for wild-type mtDNA. The genetic characterization

of the different cybrid cell lines was performed by PCR-RFLP as described previously [14] (results not shown). All the clones contained similar amounts of mtDNA as clones containing wild-type mtDNA, suggesting that there is no negative selection against the mutation.

The G8363A mutation produces severe biochemical defects of the respiratory chain in cybrid cell lines

We investigated the respiratory capacity of at least two independent clones harbouring either wild-type mtDNA or the specific kind of mutations by measuring the specific activities of the mitochondrial respiratory chain complexes I–IV and the rate of oxygen consumption in intact cells. We have reported previously that homoplasmic single A8296G mutant clones showed normal values in the respiratory chain activities and oxygen consumption, comparable with those of homoplasmic wild-type mtDNA clones [22]. In contrast, cybrid clones homoplasmic for the G8363A single mutant or A8296G-G8363A double mutant showed a clear defect of the mitochondrial respiratory chain complexes I, III and IV, with a mean residual activity of 36% (complex I) and 10% (complexes III and IV) in mutant clones when compared with wild-type lines or homoplasmic >95% A8296G clones (Table 1). Oxygen consumption was severely impaired in these clones (Table 1; mean decrease was 95%, $P < 0.001$).

Mitochondrial tRNA^{Lys} steady-state levels and conformation analysis

The potential effect of the G8363A mutation on the steady-state level of the tRNA^{Lys} was investigated by Northern-blot analysis. Total RNA was extracted from mutants and wild-type cybrids, electrophoresed on agarose-formaldehyde gels and probed with a DNA fragment containing the tRNA^{Lys} gene labelled with [α -³²P]-dCTP. As control, we have quantified the steady-state level of the tRNA^{Phe} using a specific tRNA^{Phe} probe (Figure 1). The ratios between the signals obtained with a tRNA^{Lys} gene probe and a tRNA^{Phe} gene probe used as control were similar in all cases, indicating that neither the G8363A mutation alone nor the A8296G-G8363A double mutations significantly decrease the stability of the tRNA^{Lys}. To find out whether the mutations introduce changes in the conformation of the tRNA, we performed non-denaturing single-strand analysis as described in the Materials and methods section. In contrast with the lack of effect observed in tRNA stability, the G8363A mutation produces a drastic shift in the mobility of the tRNA^{Lys}, and practically the entire tRNA shows a delayed migration (Figure 2). Interestingly, the tRNA^{Lys} harbouring the A8296G-G8363A double mutations showed a slightly increased delay in the electrophoretic migration compared

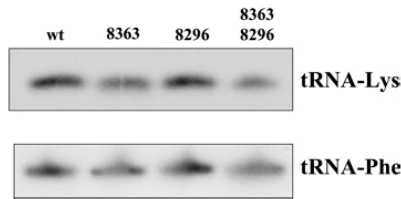


Figure 1 Steady-state levels of tRNA^{Lys} in transmitochondrial wild-type and mutant cybrid cell lines

Total RNA extracted from various cybrid cell lines was analysed by Northern blotting using specific tRNA^{Lys} and tRNA^{Phe} probes. Equal amounts of RNA (5 µg) were fractionated on 12% polyacrylamide–7 M urea gels, transferred on to a nylon membrane, hybridized with the tRNA^{Lys} and tRNA^{Phe} radiolabelled probes and autoradiographed. Signals from at least four independent experiments from each cybrid cell line were quantified by densitometric and/or phosphorimager analyses. No statistically significant differences were detected (the Kruskal–Wallis method).

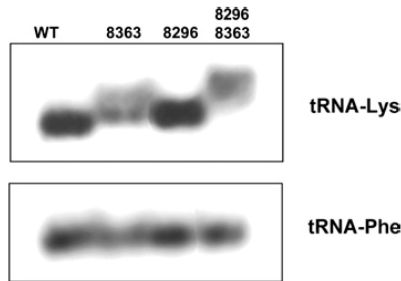


Figure 2 tRNA conformational analysis

Total RNA (8 µg) extracted from the various cybrid cell lines was electrophoresed on a 6% polyacrylamide gel under non-denaturing conditions, transferred on to a nylon membrane, hybridized with the tRNA^{Lys} radiolabelled probe and autoradiographed. The same filter was rehybridized with the tRNA^{Phe} probe and analysed as described above.

with the tRNA^{Lys} harbouring the single G8363A mutation. This result clearly demonstrated that the conformation of the tRNA^{Lys} is not changed by the A8296G mutation and its alteration is due to the G8363A mutation. Furthermore, the A8296G mutation has some synergistic role in the change induced by the G8363A mutation.

Synthesis of mitochondrial proteins

Figure 3 shows a representative experiment to investigate the effect of the mutations on the mitochondrial translation capacity. In contrast with homoplasmic A8296G cybrids [22], homoplasmic G8363A and double mutant A8296G–G8363A cybrids showed a marked decrease in the incorporation of [³⁵S]methionine into the mitochondrially encoded polypeptides. A landmark of previously characterized tRNA^{Lys} mutations is the presence of abnormal polypeptides generated by premature termination of translation. In particular, one of them, designated pMERRF, is derived from premature termination of COI (subunit I of cytochrome *c* oxidase) and migrates below the ND4 polypeptide [10]. Although we have not detected a prominent truncated product in mutant cells, in the mitochondrial translation pattern of G8363A and A8296G–G8363A cybrids there are relative increases in the radioactive signal in the region that migrates below the ND4 polypeptide (indicated by an asterisk in Figure 3), suggesting that, in the mutant cybrids, there are some accumulations of truncated polypeptides. These results confirm that the behaviour of the mtDNA harbouring the A8296G mutation is similar to wild-type and

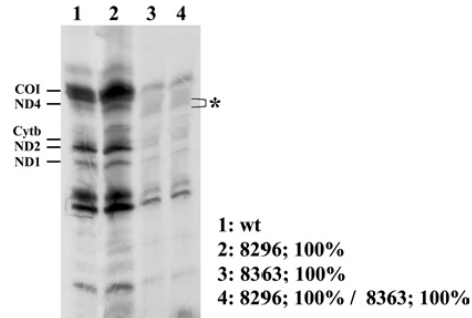


Figure 3 Mitochondrial protein synthesis in transmitochondrial wild-type and mutant cybrid cell lines

Cells were labelled with [³⁵S]methionine in the presence of emetine as described in the Materials and methods section. A fluorogram of the mitochondrial translation products after fractionation on an SDS 15–20% polyacrylamide gel is shown. The position of different mitochondrial polypeptides is indicated; *, presence of potential abnormal translation products in mutant cybrid cells.

indicate that the G8363A mutation has a profound effect on mitochondrial protein synthesis.

tRNA^{Lys} aminoacylation

To determine whether the G8363A mutation impairs the aminoacylation capacity of the tRNA^{Lys}, we isolated, from purified mitochondria, total RNA under conditions that preserved the aminoacylated tRNAs. Total RNAs were electrophoresed on 6.5% polyacrylamide–8 M urea gels, electroblotted on to nylon membranes and hybridized with specific tRNA^{Lys} and tRNA^{Phe} probes as described in the Materials and methods section. Aminoacylated and non-aminoacylated tRNA^{Lys} can clearly be observed under these conditions in both wild-type and mutant cybrids, although the mobility of the wild-type tRNA^{Lys} and Lys-tRNA^{Lys} is somewhat slower compared with the mutant ones (Figure 4A). When the RNA samples were heated and electrophoresed under the same conditions, a total conversion of the aminoacylated-tRNA^{Lys} in its deacylated form was observed (results not shown). As a control of the loading of the gel, we rehybridized the filters with a tRNA^{Phe}-specific probe. Under these conditions, the acylated and deacylated tRNA^{Phe} forms were not resolved (results not shown).

Quantitative densitometric analysis of the autoradiograms showed a moderate but significant decrease in the percentage of the aminoacylated form of the tRNA^{Lys} harbouring the A8296G mutation (61%; Figure 4B) when compared with tRNA^{Lys} wild-type (76%). The tRNA^{Lys} harbouring the G8363A mutation had a drastic reduction in the amount of its aminoacylated form (18%), indicating that a change in the conformation of the tRNA produced by the G8363A mutation impairs drastically its aminoacylation capacity. The presence of the A8296G mutation did not act synergistically, since the same percentage of aminoacylated forms was present in the tRNA^{Lys} containing the two mutations (A8296G + G8363A).

DISCUSSION

To date, 12 different mutations in the mtDNA tRNA^{Lys} gene have been described in association with an array of mitochondrial diseases [7]. We first documented a A8296G–G8363A double mutant in the mtDNA tRNA^{Lys} gene in a family with MERRF [14]. Both mutations have been reported in isolation in independent

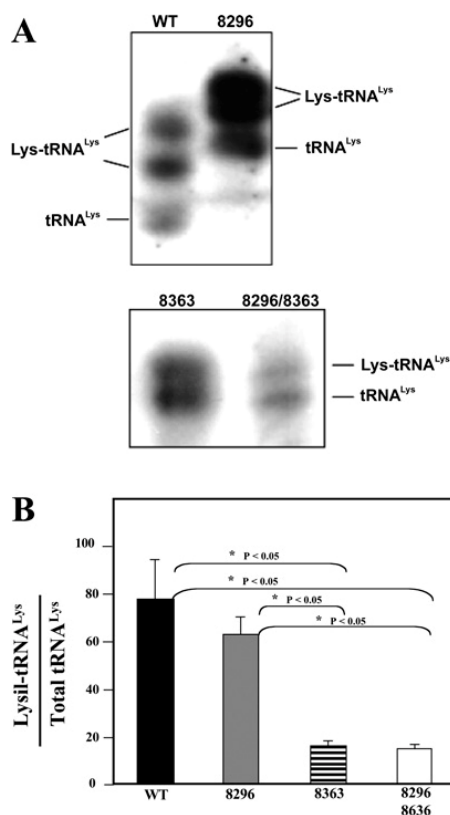


Figure 4 Aminoacylation of tRNA^{Lys} in transmitochondrial wild-type and mutant cybrid cell lines

(A) Total mitochondrial RNA was extracted under acidic conditions and electrophoresed on an 8% non-denaturing polyacrylamide gel as described in the Materials and methods section. RNAs were transferred onto a nylon membrane, hybridized with a specific tRNA^{Lys}-radiolabelled probe and autoradiographed. (B) Signals corresponding to the aminoacylated and deacylated forms of the tRNA^{Lys} obtained in at least three independent experiments were densitometrically quantified. Results are expressed as a percentage of the aminoacylated form \pm S.D.; * $P < 0.05$, protected least significant difference test.

pedigrees [15–21]. Interestingly, we have recently reported that homoplasmic A8296G cybrid clones have normal respiratory chain function, as shown by oxygen consumption, lactate production and respiratory chain enzyme activities [22]. However, the possibility that the mutation might cause subtle defects of oxidative phosphorylation or a defect depending on the nuclear background was not fully excluded.

To investigate the pathogenic role of the G8363A mutation, we have generated and extensively characterized cybrid clones harbouring homoplasmic levels of mutant mtDNAs in two different mtDNA tRNA^{Lys} genetic backgrounds, i.e. wild-type and A8296G. Homoplasmic G8363A as well as G8363A + A8296G mutants caused a drastic decrease in the activities of the respiratory-chain complexes I, III and IV, which contain mtDNA-encoded subunits, whereas the activity of complex II (containing only nuclear DNA-encoded subunits) remained normal. Consistently, we observed a marked decrease in oxygen consumption and in mitochondrial protein synthesis in clones harbouring homoplasmic G8363A and A8296G-G8363A mutations, whereas oxygen consumption and the mitochondrial synthetic capacity in

clones homoplasmic for the single A8296G mutation were similar to wild-type. The G8363A mutation produced a drastic conformational change in the tRNA^{Lys} that is slightly increased by the presence of the A8296G mutation. Furthermore, there was evidence of a significant decrease (57–59%) in the aminoacylation capacity of the tRNA^{Lys} harbouring the G8363A mutation, of the same range as detected in the tRNA^{Lys} harbouring the A8296G-G8363A double mutant. In contrast, the presence of the A8296G mutation decreases only moderately (15–17%) the aminoacylation capacity of the tRNA^{Lys}.

These results indicate that a decrease in the aminoacylation capacity is, at least in part, the pathogenic molecular mechanism causing the collapse in mitochondrial protein synthesis and OXPHOS defects of the G8363A mutation. This pathogenic mechanism is not significantly modified by the presence of the A8296G mutation. Aminoacylation defects have been found in other tRNA^{Lys} point mutations analysed in transmitochondrial cybrids. The well-established pathogenic A8344G mutation in the tRNA^{Lys} gene produces a mild decrease in tRNA stability and tRNA aminoacylation, decreasing tRNA^{Lys} lysine charging capacity in mitochondria [10]. In addition, the G8313A mutation in the tRNA^{Lys} produces a strong decrease in the tRNA stability and decreases its aminoacylation capacity [28]. In contrast, neither the G8363A mutation nor the A8296G-G8363A mutation alters the steady-state level of the tRNA^{Lys}, indicating that the stability of the tRNA^{Lys} is not altered by the presence of the mutations. In addition, the steady-state levels of the flanking mRNAs (COII and ATPases 6–8) are similar in wild-type and mutant cybrids (results not shown), suggesting that the processing of the heavy-strand pre-mRNA is correct at the tRNA^{Lys} site.

If our results demonstrate unequivocally that the G8363A mutation is pathogenic, the potential pathogenicity of the A8296G mutation is still puzzling. The high degree of conservation of this specific nucleotide in the tRNA^{Lys} gene during evolution, together with the fact that several pedigrees are found in which the mutation segregates with the affected phenotype and the absence of the mutation in a large number of ethnically matched normal controls contrast with the apparent lack of a disease-causative role in a commonly used experimental cell system. The modest decrease in the aminoacylation capacity of the tRNA^{Lys} that we observed does not suffice to affect the respiratory function. It is possible that the mutation achieves its pathogenic effects when present within a specific nuclear background or, alternatively, that it impairs mitochondrial physiology by a mechanism not related to the OXPHOS function. In this regard, it has been observed that cells with the A3243G mutation, a well-known pathogenic mutation in the mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} gene, produced an impaired mitochondrial translation machinery that depends heavily on the specific nuclear background (reviewed in [29]). The A3243G mutation is related to a profound decrease in the steady-state level and aminoacylation capacity of the tRNA^{Leu(UUR)} in some cases [11,30], whereas it decreases the association of mRNA with mitoribosomes in other cases [31]. However, aminoacylation is practically unaffected in some other cell lines and impaired mitochondrial protein synthesis occurs because of misreading of the phenylalanine codon due to a decrease in the modification of the U present in the wobble position of the anti-codon [32]. Moreover, it has been described in a different cell system that a defect in processing of the pre-mRNA at the tRNA^{Leu(UUR)} site leads to the accumulation of an intermediary transcript that might contribute to the impairment of mitochondrial protein synthesis [13,33]. Finally, and most interestingly, an RNA circularization technique has demonstrated that the decrease in total and/or aminoacylated tRNA^{Leu(UUR)} levels also varies considerably *in vivo* when muscle biopsied samples

from MELAS patients are used [34]. This does not apply to biopsied material from MERRF patients harbouring mutations in the tRNA^{Lys} gene [34]. These results suggest that *trans*-acting factors and/or compensatory mechanisms that depend on the nuclear background modulate the expression of the mtDNA mutations. In this regard, established cybrid cell lines with defined molecular pathogenic mechanisms may be critical for identifying these factors in the near future [29].

This work was supported by grants from Ministerio de Educación y Ciencia of Spain, Comunidad de Madrid and Instituto de Salud Carlos III, Redes de centros RCMN (C03/08) and Temáticas (G03/011). The work in F.M.S.'s laboratory was partially supported by the Italian Ministry of Health. We thank M. Zeviani for his kind collaboration during the first stage of this work.

REFERENCES

- Scheffler, I. E. (1999) *Mitochondria*, Wiley-Liss, New York
- Garesse, R. and Vallejo, C. G. (2001) Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. *Gene* **263**, 1–16
- Attardi, G. and Schatz, G. (1988) Biogenesis of mitochondria. *Annu. Rev. Cell Biol.* **4**, 289–333
- Fernandez-Moreno, M. A., Bornstein, B., Campos, Y., Arenas, J. and Garesse, R. (2000) The pathogenic role of point mutations affecting the translational initiation codon of mitochondrial genes. *Mol. Genet. Metab.* **70**, 238–240
- Smeitink, J. A. (2003) Mitochondrial disorders: clinical presentation and diagnostic dilemmas. *J. Inher. Metab. Dis.* **26**, 199–207
- Zeviani, M. and Spinazzola, A. (2003) Mitochondrial disorders. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **3**, 423–432
- Servidei, S. (2003) Mitochondrial encephalomyopathies: gene mutation. *Neuromuscul. Disord.* **13**, 848–853
- DiMauro, S. and Schon, E. A. (2003) Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N. Engl. J. Med.* **348**, 2656–2668
- Leonard, J. V. and Schapira, A. H. (2000) Mitochondrial respiratory chain disorders I: mitochondrial DNA defects. *Lancet* **355**, 299–304
- Enriquez, J. A., Chomyn, A. and Attardi, G. (1995) MtDNA mutation in MERRF syndrome causes defective aminoacylation of tRNA(Lys) and premature translation termination. *Nat. Genet.* **10**, 47–55
- El Meziane, A., Lehtinen, S. K., Holt, I. J. and Jacobs, H. T. (1998) Mitochondrial tRNA^{Leu} isoforms in lung carcinoma cybrid cells containing the np 3243 mtDNA mutation. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 2141–2147
- Helm, M., Florentz, C., Chomyn, A. and Attardi, G. (1999) Search for differences in post-transcriptional modification patterns of mitochondrial DNA-encoded wild-type and mutant human tRNA^{Lys} and tRNA^{Leu}(UUR). *Nucleic Acids Res.* **27**, 756–763
- Kaufmann, P., Koga, Y., Shanske, S., Hirano, M., DiMauro, S., King, M. P. and Schon, E. A. (1996) Mitochondrial DNA and RNA processing in MELAS. *Ann. Neurol.* **40**, 172–180
- Arenas, J., Campos, Y., Bornstein, B., Ribacoba, R., Martin, M. A., Rubio, J. C., Santorelli, F. M., Zeviani, M., DiMauro, S. and Garesse, R. (1999) A double mutation (A8296G and G8363A) in the mitochondrial DNA tRNA(Lys) gene associated with myoclonus epilepsy with ragged-red fibers. *Neurology* **52**, 377–382
- Kameoka, K., Isotani, H., Tanaka, K., Kitaoka, H. and Ohsawa, N. (1998) Impaired insulin secretion in Japanese diabetic subjects with an A-to-G mutation at nucleotide 8296 of the mitochondrial DNA in tRNA(Lys). *Diabetes Care* **21**, 2034–2035
- Kameoka, K., Isotani, H., Tanaka, K., Azukari, K., Fujimura, Y., Shiota, Y., Sasaki, E., Majima, M., Furukawa, K., Haginomoroi, S. et al. (1998) Novel mitochondrial DNA mutation in tRNA(Lys) (8296A → G) associated with diabetes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **245**, 523–527
- Akita, Y., Koga, Y., Iwanaga, R., Wada, N., Tsubone, J., Fukuda, S., Nakamura, Y. and Kato, H. (2000) Fatal hypertrophic cardiomyopathy associated with an A8296G mutation in the mitochondrial tRNA(Lys) gene. *Hum. Mutat.* **15**, 382
- Sakuta, R., Horzawa, S., Murakami, N., Goto, Y. and Nagai, T. (2002) Atypical MELAS associated with mitochondrial tRNA(Lys) gene A8296G mutation. *Pediatr. Neurol.* **27**, 397–400
- Ozawa, M., Nishino, I., Horai, S., Nonaka, I. and Goto, Y. I. (1997) Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers: a G-to-A mutation at nucleotide pair 8363 in mitochondrial tRNA(Lys) in two families. *Muscle Nerve* **20**, 271–278
- Santorelli, F. M., Mak, S. C., El-Schahawi, M., Casali, C., Shanske, S., Baram, T. Z., Madrid, R. E. and DiMauro, S. (1996) Maternally inherited cardiomyopathy and hearing loss associated with a novel mutation in the mitochondrial tRNA(Lys) gene (G8363A). *Am. J. Hum. Genet.* **58**, 933–939
- Casali, C., Fabrizi, G. M., Santorelli, F. M., Colazza, G., Villanova, M., Dotti, M. T., Cavallaro, T., Cardaioli, E., Battisti, C., Manneschi, L. et al. (1999) Mitochondrial G8363A mutation presenting as cerebellar ataxia and lipomas in an Italian family. *Neurology* **52**, 1103–1104
- Bornstein, B., Mas, J. A., Fernandez-Moreno, M. A., Campos, Y., Martin, M. A., del Hoyo, P., Rubio, J. C., Arenas, J. and Garesse, R. (2002) The A8296G mtDNA mutation associated with several mitochondrial diseases does not cause mitochondrial dysfunction in cybrid cell lines. *Hum. Mutat.* **19**, 234–239
- King, M. P. and Attardi, G. (1989) Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* **246**, 500–503
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY
- Hao, H. and Moraes, C. T. (1997) A disease-associated G5703A mutation in human mitochondrial DNA causes a conformational change and a marked decrease in steady-state levels of mitochondrial tRNA(Asn). *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6831–6837
- Enriquez, J. A. and Attardi, G. (1996) Analysis of aminoacylation of human mitochondrial tRNAs. *Methods Enzymol.* **264**, 183–196
- Chomyn, A. (1996) *In vivo* labeling and analysis of human mitochondrial translation products. *Methods Enzymol.* **264**, 197–211
- Bacman, S. R., Atencio, D. P. and Moraes, C. T. (2003) Decreased mitochondrial tRNA^{Lys} steady-state levels and aminoacylation are associated with the pathogenic G8313A mitochondrial DNA mutation. *Biochem. J.* **374**, 131–136
- Jacobs, H. T. and Holt, I. J. (2000) The np 3243 MELAS mutation: damned if you aminoacylate, damned if you don't. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 463–465
- Janssen, G. M., Maassen, J. A. and van Den Ouweland, J. M. (1999) The diabetes-associated 3243 mutation in the mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) gene causes severe mitochondrial dysfunction without a strong decrease in protein synthesis rate. *J. Biol. Chem.* **274**, 29744–29748
- Chomyn, A., Enriquez, J. A., Micol, V., Fernandez-Silva, P. and Attardi, G. (2000) The mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episode syndrome-associated human mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) mutation causes aminoacylation deficiency and concomitant reduced association of mRNA with ribosomes. *J. Biol. Chem.* **275**, 19198–19209
- Yasukawa, T., Suzuki, T., Ueda, T., Ohta, S. and Watanabe, K. (2000) Modification defect at anticodon wobble nucleotide of mitochondrial tRNA^{Ser}(Leu)(UUR) with pathogenic mutations of mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes. *J. Biol. Chem.* **275**, 4251–4257
- Schon, E. A., Koga, Y., Davidson, M., Moraes, C. T. and King, M. P. (1992) The mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) mutation in MELAS: a model for pathogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1101**, 206–209
- Bömer, G. V., Zeviani, M., Tiranti, V., Carrara, F., Hoffmann, S., Gerbitz, K. D., Lochmüller, H., Pongratz, D., Klopstock, T., Melberg, A. et al. (2000) Decreased aminoacylation of mutant tRNAs in MELAS but not in MERRF patients. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 467–475

Received 7 June 2004/28 October 2004; accepted 22 November 2004
Published as BJ Immediate Publication 22 November 2004, DOI 10.1042/BJ20040949



Case report

Mild ocular myopathy associated with a novel mutation in mitochondrial twinkle helicase

Henry Rivera^{a,d}, Alberto Blázquez^{a,d}, Julián Carretero^a, José C. Alvarez-Cermeño^b,
Y. Campos^{a,d}, Ana Cabello^{c,d}, Emiliano Gonzalez-Vioque^{e,d}, Belén Borstein^{e,d},
Rafael Garesse^{e,d}, Joaquín Arenas^{a,d}, Miguel A. Martín^{a,d,*}

^a Centro de Investigación, Hospital Universitario 12 de Octubre, Av. de Córdoba s/n, 28041 Madrid, Spain

^b Servicio de Neurología, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain

^c Servicio de Neuropatología, (Dra. Cabello), Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

^d Center for Biomedical Research in Rare Disorders (CIBERER), Madrid, Spain

^e Departamento de Bioquímica, Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" CSIC-UAM, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Center for Biomedical Research in Rare Disorders (CIBERER), Madrid, Spain

Received 11 April 2007; received in revised form 8 May 2007; accepted 16 May 2007

Abstract

Autosomal dominant PEO is associated with mutations in a number of nuclear genes affecting the intergenomic communication with mitochondrial DNA. We report a Spanish family showing a mild phenotype characterized by autosomal dominant ocular myopathy and morphological signs of mitochondrial dysfunction, that harboured a novel c.1071G > C (p.R357P) mutation in the hot-spot linker region of the twinkle protein.

© 2007 Published by Elsevier B.V.

Keywords: PEO1; Twinkle; adPEO; Mitochondrial disorders; mtDNA multiple deletions

1. Introduction

Autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia (adPEO) is characterized by ptosis and weakness of the extraocular muscles, and the presence in muscle biopsy of ragged-red (RRF) and cytochrome *c* oxidase (COX) deficient fibers, and multiple mitochondrial DNA (mtDNA) deletions [1]. At least three different nuclear genes are known to cause the disease: *POLG* (DNA polymerase γ), *ANTI* (adenine nucleotide translocator 1), and *PEO1* (twinkle helicase) [2,3]. Although most of patients reported with mutations in the *PEO1* gene have adPEO [4], more complex neurological phenotypes have been documented [5]. Recently, transgenic mice carrying twinkle

mutations were shown to develop a late-onset mitochondrial disease [6].

Here, we describe a Spanish family showing a mild phenotype characterized by autosomal dominant ocular myopathy and muscle morphological mitochondrial abnormalities, in whom we identified a novel mutation in the primase/helicase linker region.

2. Case report and methods

The index patient, a 78-year-old woman (III-2, Fig. 1) presented with progressive ocular myopathy at age of 50 years. Neurological examination showed bilateral ptosis, mild ophthalmoparesis, and proximal limb weakness. No other neurological or psychiatric features were observed. Electromyography revealed a myopathic pattern. Muscle histochemistry showed the presence of some

* Corresponding author. Tel.: +34 913908001; fax: +34 913908544.
E-mail address: mamcasanueva@h12o.es (M.A. Martín).

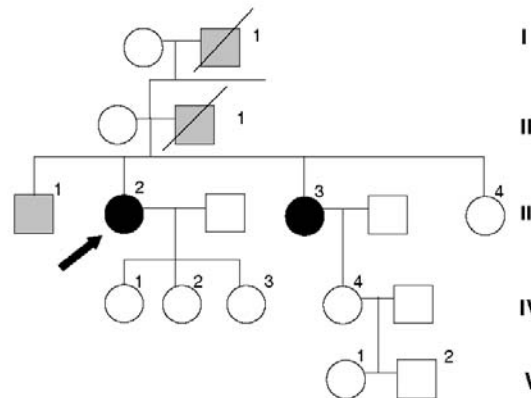


Fig. 1. Pedigree of a Spanish family with ocular myopathy. The index patient is indicated by an arrow. Affected family members who were clinically evaluated are shown in black. Relatives who referred to be symptomatic are shown in grey. Open and numbered symbols are asymptomatic relatives.

COX-positive RRF and various COX-negative non-RRF. Laboratory tests, including s-creatinine kinase and s-lactate, were within normal values.

Her 77-year-old sister (III-3, Fig. 1) had ptosis predominantly in the left eyelid since age of 73, and mild ophthalmoparesis. Her 56-year-old daughter (IV-4, Fig. 1), as well as two other relatives (31-year-old, V-1, and 33-year-old, V-2, Fig. 1) were asymptomatic.

Her 79-year-old brother (III-1, Fig. 1), her father (II-1, Fig. 1), and her grandfather (I-1 in Fig. 1) were not clinically evaluated, although they reportedly had ocular myopathy. Her younger sister (III-4, Fig. 1), and her three daughters do not have at present signs of ocular myopathy or skeletal muscle weakness at ages 62, 53, 51, and 45 years, respectively.

Mitochondrial respiratory chain complexes and citrate synthase enzyme activities (a marker for mitochondrial volume) measured in muscle homogenate from the index patient were both in the normal range. Southern-blot analysis of the muscle DNA from the index case showed a single band corresponding to wild-type mtDNA. Long range PCR (LR-PCR) (LA Taq, Takara Bio Inc.), however, revealed mtDNA deletions (Fig. 2c). Quantitation of mtDNA levels by real-time PCR (LightCycler, Roche Diagnostics) in the index patient muscle (III-2, Fig. 1) and in blood DNA of the symptomatic proband's sister (III-3, Fig. 1) did not reveal mtDNA depletion as demonstrated by mtDNA/nDNA ratios of 5.1 and 3.4, respectively [controls 2.5th percentile, 1.5 ($n = 45$)]. Sequencing analysis with the Rhodamine Terminator kit in an ABI-Prism 310 Genetic Analyzer (Roche Diagnostics) showed no mutation in *ANT1*, and *POLG* genes [7]. By contrast, sequencing of the entire coding region and exon/intron boundaries of the *PEO1* (twinkle) gene [7] revealed a novel heterozygous G to C nucleotide change at 1071 bp (c.1071G > C), predicting a missense mutation at codon

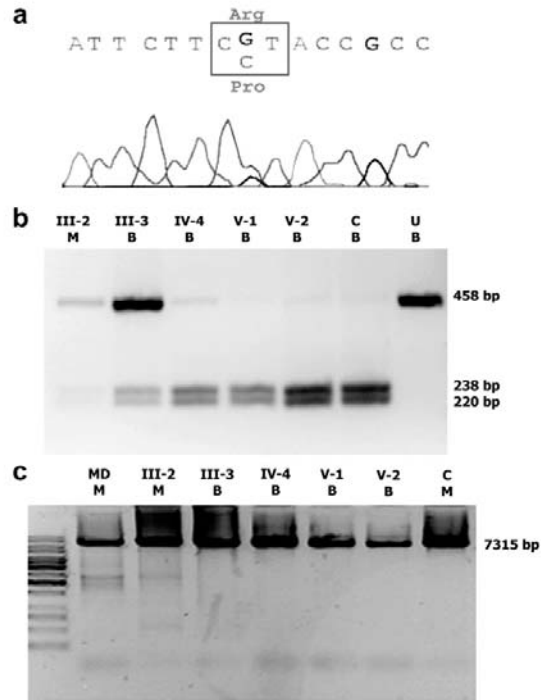


Fig. 2. Sequencing, PCR-RFLP, and LR-PCR analysis. Panel a, *PEO1* gene sequence where the c.1071G > C heterozygous change and the amino acid substitution is indicated in a box. Panel b, PCR-RFLP analysis showing the family members studied (see text for details). *AfaI* digestion of a 458-bp product encompassing the mutation site yields two fragments of 238 and 220 bp in the wild-type allele, while it remained undigested in the mutant one. Panel c, LR-PCR using primers F 8285–8314 and R 15,574–15,600 yields a 7315-bp fragment corresponding to wild-type mtDNA. MD, control muscle with mtDNA deletions proven by Southern-blot analysis; M, muscle DNA; B, blood DNA; C, healthy control muscle; U, uncut PCR fragment.

357 where an arginine is replaced by a proline residue (p.R357P) (Fig. 2a). The mutation was confirmed by PCR-RFLP analysis, amplifying a 458-bp fragment using the forward primer (5'-CCGAGGAACGACCTGCTT A-3') and the reverse primer (5'-CCCCTGCTTTTGTC ACCTG-3'), which subsequently was digested with *AfaI* (Fig. 2b). The p.R357P mutation was not found by PCR-RFLP in 150 healthy control subjects (300 alleles) of the same ethnic background. The mutation was heterozygous in one symptomatic proband's sister (III-3, Fig. 1) and was absent in three asymptomatic relatives (IV-4, V-1, and V-2, Fig. 1) (Fig. 2b). Patients III-1, III-4, IV-1, IV-2, and IV-3 refused to undergo further investigations.

3. Discussion

Autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia (adPEO, MIM# 157640) is usually associated with mutations in the genes *ANT1*, encoding the heart-muscle isoform of the adenine nucleotide translocator, *PEO1*,

AA nº	347	357															375
Human Mutant	N G G F N	L S R I L P T	A L P A W H K S	I V S F R	- - Q L												
Human	N G G F N	L S R I L R T	A L P A W H K S	I V S F R	- - Q L												
M. musculus	N Q G L S	L P R I L R T	A L P A W H K S	I V S F R	- - Q L												
D. melanogaster	R R R L N	L R H I L A K	A T P V Q H K A	I T T F G	- - A M												
P. chabaudi	K N N I D	V Q F F I K N	S E K V K H S Q	I L N F N	- - D L												
C. elegans	D H R L I	R N S L S N S	V V R M R E R	G F R S M	T D L D M												
Phage T7 gp4	G H D R E	I M E Q V W N	A G P W I P D	G V V S A	L S - - L												

Fig. 3. Sequence alignment of wild-type and mutant twinkle protein with T7gp4 and eukaryotic homologues. The linker domain of twinkle protein is displayed. Black shaded amino acids indicate identity, and grey shaded residues show similarity. Mutant residue at 357 position is dark grey colored.

encoding the mitochondrial helicase twinkle, and *POLG*, encoding the catalytic subunit of mitochondrial DNA polymerase [2–4]. We studied a family with autosomal dominant ocular myopathy, whose proband had histochemical evidence of mitochondrial disease. The inheritance of the trait, as well as the morphological and clinical findings led us to suspect of an alteration in any of the genes involved in mtDNA maintenance [2]. Although Southern-blot analysis of mtDNA failed to demonstrate significant amounts of large-scale rearrangements that were subsequently evidenced by the most sensitive LR-PCR method, and real-time PCR did not display mtDNA depletion, sequencing analysis revealed a novel heterozygous missense mutation, R357P, in the *PEO1* gene. In addition, the mutation cosegregated with the disease, because in the family members in whom we were able to conduct further studies, it was present in the two clinically affected patients, but was absent in the three asymptomatic relatives.

The following reasons suggest that the R357P mutation is likely pathogenic: (i) it was the only genetic variation identified in the two patients after sequencing *POLG*, *ANTI*, and *PEO1* genes; (ii) it was not found in 150 healthy controls; (iii) it was heterozygous in two symptomatic patients and was absent in three unaffected proband's relatives; (iv) it is evolutionary conserved in vertebrates (Fig. 3); (v) it is localized in the primase/helicase region where most of twinkle pathogenic mutations have been reported (8 out of 18, 44%, mutations described so far); and (vi) the linker domain of the protein is implicated in subunit interactions and seems to be important for the oligomerization of the enzyme, although neither of disease mutations tested in this region affects multimerization *in vitro* [4].

Our patients showed a mild clinical phenotype characterized by late-onset ocular myopathy, and the proband also developed limb muscle weakness. Consistently, a twinkle knock-in mouse with the human homologue mutation p.A359T, which is localized two amino acids apart from the R357P mutation and also lies within the linker region of the protein [6], showed a mild muscle phenotype. Interestingly, in the knock-in mouse muscle morphology revealed similar findings to those observed in our patient's

muscle (i.e. some COX-negative fibers and various RRF COX-positive fibers). We did not observe significant amounts (i.e. proportion of deleted mtDNA molecules above 1%) of large-scale mtDNA deletions in muscle of the index patient by Southern-blot analysis, but a more detailed search by using LR-PCR showed a pattern consistent with the presence of various mtDNA species (Fig. 2c). The presence of low amounts of deleted mtDNA could be consistent with both the mild phenotype observed and the normal respiratory chain values in muscle. Although there were some fibers in muscle with signs of mitochondrial dysfunction (i.e. RRF or COX-negative fibers) the whole muscle homogenate showed normal oxidative phosphorylation function, as documented before [8]. In agreement with this observation, cell lines from patients with the A359T, nearby R357P change described here, and the dup359_364 mutations in twinkle did not show mtDNA deletions by Southern-blot [4], suggesting that twinkle mutations may have only minimal, and short term effects on mtDNA integrity in cell culture [4]. Furthermore, the presence of low amounts of deleted mtDNA could be related to aging [9,10] rather than to effects of mutant twinkle protein itself.

We suggest to look for mutations in the *PEO1* gene in patients with autosomal dominant mild ocular myopathy, particularly if associated with morphological findings of mitochondrial disease, irrespective of the presence in muscle of large-scale mtDNA deletions or mtDNA depletion.

Acknowledgements

We thank Pilar del Hoyo, Sara Jimenez, and Juan Carlos Rubio for their excellent technical support. This study was supported by grants from Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (Fondo de Investigación Sanitaria) PI030224, and PI060547 to M.A.M., and PI030283 to Y.C., and from Fundación Mutua Madrileña FMM 2005-069 to M.A.M. Henry Rivera is supported by Grants from FIS, PI030224, and PI060547. M.A.M. is supported by Programa de Intensificación de la Actividad Investigadora, ISCIII (MSC) and Agencia Lain Entralgo (CSC, Comunidad de Madrid).

References

- [1] Zeviani M, Servidei S, Gellera C, Bertini E, DiMauro S, DiDonato S. An autosomal dominant disorder with multiple deletions of mitochondrial DNA starting at the D-loop region. *Nature* 1989;339:309–11.
- [2] Hirano M, DiMauro S. ANT1, twinkle, POLG, and TP: new genes open our eyes to ophthalmoplegia. *Neurology* 2001;57:2163–5.
- [3] Agostino A, Valletta L, Chinnery PF, et al. Mutations of ANT1, twinkle, and POLG1 in sporadic progressive external ophthalmoplegia (PEO). *Neurology* 2003;60:1354–6.
- [4] Spellbrink JN, Li FY, Tiranti V, et al. Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nat Genet* 2001;28:223–31.
- [5] Hudson G, Deschauer M, Busse K, Zierz S, Chinnery PF. Sensory ataxic neuropathy due to a novel C10orf2 mutation with probable germline mosaicism. *Neurology* 2005;64:371–3.
- [6] Tyynismaa H, Mjosund KP, Wanrooij S, et al. Mutant mitochondrial helicase twinkle causes multiple mtDNA deletions and a late-onset mitochondrial disease in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:17687–92.
- [7] Gonzalez-Vioque E, Blazquez A, Fernandez-Moreira D, et al. Association of novel POLG mutations and multiple mitochondrial DNA deletions with variable clinical phenotypes in a Spanish population. *Arch Neurol* 2006;63:107–11.
- [8] DiMauro S, Bonilla E. Mitochondrial encephalomyopathies. In: Rosenberg RN, Prusiner SB, DiMauro S, Barchi RL, editors. *The molecular and genetic basis of neurological diseases*. Boston, MA: Butterworth-Heinemann; 1997. p. 201–35.
- [9] Brierley EJ, Johnson MA, Lightowers RN, James OF, Turnbull DM. Role of mitochondrial DNA mutations in human aging: implications for the central nervous system and muscle. *Ann Neurol* 1998;43:217–23.
- [10] Deschauer M, Kiefer R, Blakely EL, et al. A novel twinkle gene mutation in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia. *Neuromuscul Disord* 2003;13:568–72.