

PAPER DE LES MUTACIONS DEL mtDNA EN LA MODULACIÓ DEL SISTEMA ANTIOXIDANT

ESTUDI EN UN MODEL DE CÍBRIDS TRANSMITOCONDRIALS



Cristòfol Vives Bauzá

Departament de Genètica, UB

Març, 2004

TESI DOCTORAL
PROGRAMA DE DOCTORAT DE GENÈTICA
UNIVERSITAT DE BARCELONA
BIENNI 2000-2002

PAPER DE LES MUTACIONS DEL DNA MITOCONDRIAL
EN LA MODULACIÓ DEL SISTEMA ANTIOXIDANT.
ESTUDI EN UN MODEL DE CÍBRIDS
TRANSMITOCONDRIALS

Memòria presentada per Cristòfol Vives Bauzà per optar al grau de
Doctor en Ciències Biològiques

Tesi doctoral realitzada en el Centre d'Investigacions en Bioquímica
i Biologia Molecular de l'Hospital Vall d'Hebron de Barcelona, sota la
co-direcció del Dr. Antoni L. Andreu i de la Dra. Elena García Arumí, i
la tutoria de la Prof. Dra. Roser González, del Departament de
Genètica de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona.

Co-directors
Dr. Antoni L. Andreu i Dra. Elena García Arumí

Tutora
Prof. Roser González

Autor
Cristòfol Vives-Bauzà

1. Introducció

1.1 La Mitocòndria

Les mitocòndries són orgànuls intracel·lulars d'unes 0,5 a 1 micres presents en el citoplasma de les cèl·lules eucariotes. Estàn formades per una doble membrana que defineix dos espais, l'espai intermembrana, comprès entre les dues membranes, i la matriu mitocondrial interna, on hi ha el DNA mitocondrial (mtDNA) i totes les proteïnes necessàries per la seva replicació i transcripció, a més a més dels ribozomes i altres enzims que participen en altres processos metabòlics com el cicle de Krebs o la β -oxidació. La membrana externa és permeable a petites molècules (<10 Kda), i la interna és relativament impermeable, tot i que permet lliurement el pas de l'oxigen i el diòxid de carboni, i és capaç de mantenir un equilibri en el gradient de protons, essencial per la síntesi d'àcid adenosintrifosfat (ATP).

També intervenen en la biosíntesi d'altres components cel·lulars: pirimidines, fosfolípids, nucleòtids, àcid fòlic, hemo, urea una gran varietat de metabòlits (Attardi i col., 1988). Així, la funció principal de les mitocòndries és l'oxidació de substrats energètics (metabolisme oxidatiu), amb la finalitat de produir energia en forma d'ATP.

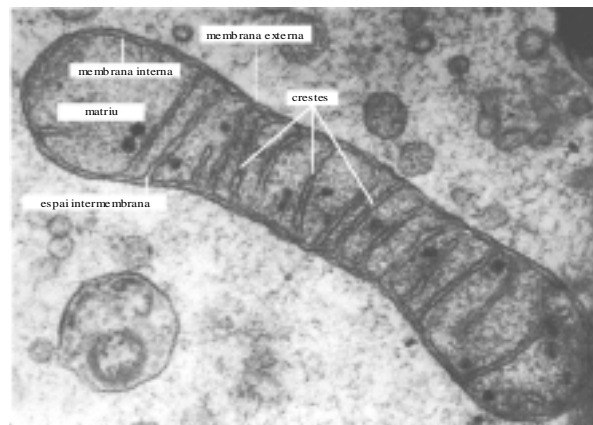


Fig. 1: Imatge d'una mitocòndria per microscòpia electrònica

Les etapes finals d'aquesta generació d'energia es donen mitjançant el sistema de fosforilació oxidativa (OXPHOS), format per cinc complexos multienzimàtics (Complex I-V), localitzats a la membrana mitocondrial interna.

Una de les característiques més peculiars de les mitocòndries és que posseeixen un sistema genètic propi, amb tota la maquinària necessària per la seva expressió en proteïnes funcionals, fet que les hi confereix un alt grau d'autonomia tant genètica com metabòlica. Malgrat això, són altament dependents d'un gran nombre de proteïnes codificades en el nucli, tant per la formació de l'orgànul com per l'expressió del seu genoma.

1.2 El DNA mitocondrial

Tot i tenir un número molt reduït de gens, el sistema genètic mitocondrial és indispensable per a la vida ja que codifica per 13 proteïnes integrants dels complexos de la cadena respiratòria. Les cèl·lules humanes contenen de 1000 a 10000 còpies de mtDNA, dependent dels teixits.

El mtDNA humà és una molècula duplohelicoïdal circular tancada de 16569 parelles de bases (bp), caracteritzada per presentar una organització genètica extremadament compacta, pràcticament saturada de gens (Anderson, 1981) (figura 2). Les dues cadenes posseïxen diferent densitat degut a la seva composició de bases nitrogenades. Així, tenim la cadena H (pesada), rica en guanines i citocines, i la cadena L (lleugera), pobre en dites bases.

El mtDNA conté informació per a 37 gens: A la cadena H hi ha els gens que codifiquen pels 2 rRNAs, 14 tRNAs i 12 polipèptids, mentre que la cadena L conté 9 gens que codifiquen per 8 tRNAs i 1 polipèptid (ND6). En total el mtDNA codifica 13 polipèptids components de la cadena respiratòria: set subunitats del complex I (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 i ND6); una del complex III (citocrom b); tres del complex IV (COXI, COXII, COXIII) i dues del complex V (ATPasa 6 i ATPasa 8). La resta de subunitats polipeptídiques que formen aquests complexos, juntament amb totes les subunitats del complex II, i totes les proteïnes reguladores del metabolisme del mtDNA, estan codificades pel genoma nuclear. Totes elles es tradueixen en el citoplasma i són importades a la mitocondria mitjançant translocases localitzades a les membranes mitocondrials (Hermann i col., 2000).

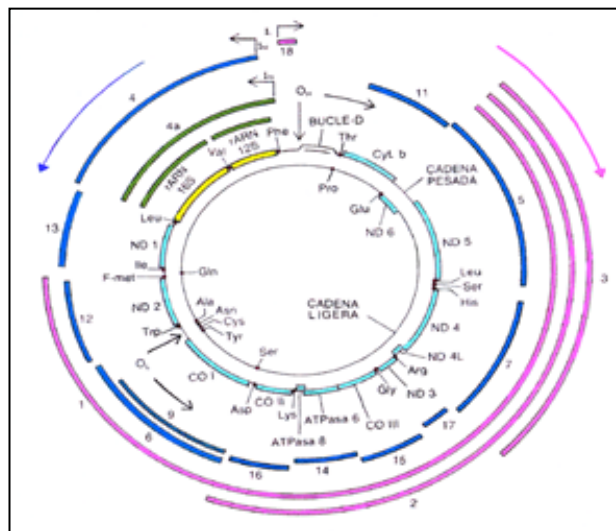


Fig. 2: Mapa Genètic i de Transcripció del mtDNA humà (modificació de Montoya i col., 1981). Els dos cercles interiors representen les dues cadenes del mtDNA amb els gens que codifiquen: RNA ribosòmic (12S i 16S), RNAs de transferència, assenyalats amb l'abreviatura de l'aminoàcid específic que els hi correspon, i seqüències codificadores de proteïnes (en cel).

Les posicions dels productes de transcripció estan indicades en verd (rRNAs i el seu precursor), i en blau (poli(A)-RNAs). Les dels productes de la cadena lleugera s'indiquen en rosa. Les fletxes assenyalen la direcció de la transcripció de la cadena H, en sentit contrari a les agulles del rellotge, i de la cadena L, en el sentit de les agulles del rellotge. IH₁, IH₂ i I_L, indiquen els llocs d'iniciació de la cadena pesada i lleugera, respectivament. Les fletxes a la dreta de O_H i a sota de O_L, indiquen la direcció de síntesi de les cadenes pesada i lleugera, respectivament.

Cal dir que en el mtDNA hi ha una tercera cadena de RNA, coneguda com a 7S DNA, compresa entre l'origen de replicació de la cadena H i el nucleòtid 16106, conferint una estructura de triple cadena coneguda com a D-Loop (Doda i col. , 1981). Tot i que la seva funció no ha estat clarament descrita, està ampliament acceptat que deu jugar un paper crucial en l'inici de la replicació (Doda i col. , 1981).

Cap gen mitocondrial té introns. A la cadena pesada els gens es disposen un rera l'altre, sense trams no codificants intermitjos. A més a més, la major part de gens codificants de proteïnes no tenen codó de terminació. Aquests presenten una T o TA just després del darrer codó amb sentit i aquestes bases precedeixen a l'extrem 5' del gen adjacent. En aquests casos el codó de terminació es forma per poliadenilació de l'extrem 3' (Montoya i col., 1981).

Una altra singularitat de l'organització genètica del mtDNA és la distribució dels gens dels tRNAs. A la cadena pesada se situen separant els gens dels rRNAs i els codificants per proteïnes. Aquesta disposició és molt important pel processament del RNA missatger (mRNA) durant la transcripció.

L'única zona del mtDNA humà que no codifica cap gen és un petit fragment de 1122 nucleòtids, localitzada entre els gens del tRNA^{Pro} i el tRNA^{Phe}, i que conté l'origen de replicació de la cadena H, els promotors de transcripció de les dues cadenes, així com el D-loop, degut a això se l'anomena la regió de control. En aquesta regió també hi ha tres caixes de seqüències altament conservades (CSBs I, II i III), que es pensa que tenen un paper important en el control de la replicació (Chang i Clayton, 1985, Chang i col., 1985) (figura 3).

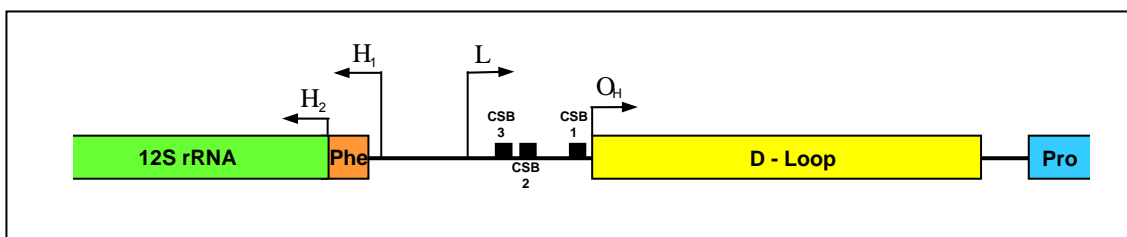


Fig. 3: Representació esquemàtica de la regió no-codificant del mtDNA humà. Conté els promotors de la cadena pesada (H_1 i H_2), el promotor de la cadena lleugera (L), el lloc de iniciació de la replicació de la cadena pesada (O_H representa el lloc principal de iniciació, a la posició 191), el D-loop i les tres caixes de seqüències conservades CSB I, CSB II i CSB III.

1.2.1 Replicació del mtDNA humà

En els últims 20 anys el model unidireccional asimètric de replicació proposat per Clayton ha estat ampliament acceptat (Clayton, 2000). Però estudis recents han qüestionat aquest model (Holt i col. 2000; Yang i col. 2002). Descriurem en detall el

model asimètric, per a posteriorment incloure un comentari sobre els treballs de Holt i col·laboradors i de Yang i col·laboradors.

1.2.1.1 Model unidireccional asimètric

El model requereix dos orígens de replicació diferents, un per la cadena pesada (O_H), localitzat al D-loop, i l'altre per la cadena lleugera (O_L), situat entre els gens dels $tRNA^{Cys}$ i $tRNA^{Asn}$, a dos terços de la longitud total del genoma respecte a O_H . La cadena pesada filla es va sintetitzant unidireccionalment a partir del D-loop, i alhora va desplaçant la cadena pesada motllo, fins que deixa al descobert l'origen de replicació de la cadena lleugera. Tot seguit es van prolongant les dues cadenes filles de mtDNA en sentits oposats fins a la seva separació final (figura 4).

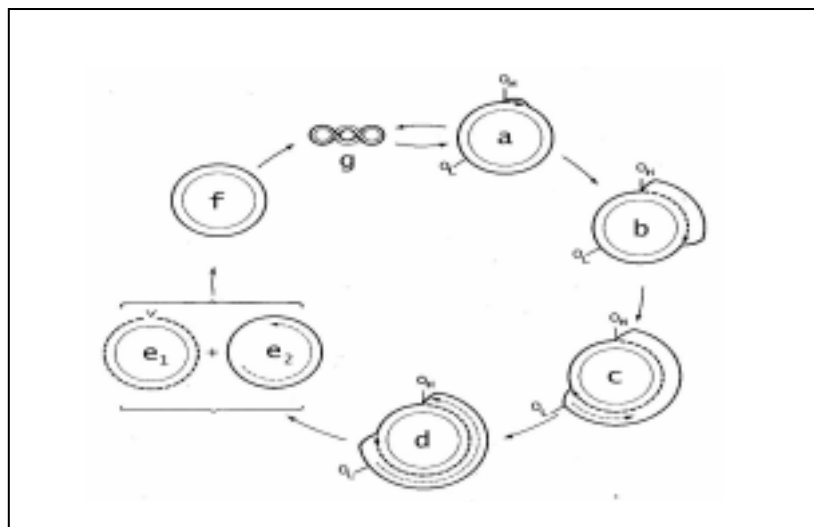


Fig. 4: Model Asimètric de Replicació. Les línies contínues gruixudes representen les cadenes H parentals i les línies contínues fines les cadenes L parentals. Les línies discontinües gruixudes representen les cadenes filles H, i les línies discontinües fines les cadenes L filles. O_H i O_L : orígens de síntesi de les cadenes H i L, respectivament. (a): mtDNA tancat amb el D-loop. (b): Intermediari de la replicació en el qual la síntesi de la cadena H continua passat el D-loop. (c) i (d): intermediaris de la replicació on O_L ha estat exposat, permetent que comenci i continui la síntesi de la cadena L. (e_1) i (e_2): molècules filles, ambdues acabades en cicles tancats (f), que són convertides en mtDNA superhelicals (g) mitjançant un procés de torsió que comprèn aproximadament unes 100 torsions negatives superhelicals. (Obtingut de Clayton, 1982).

La iniciació de la cadena H requereix la síntesi d'un iniciador de RNA, originat per processament d'un RNA transcrit a partir del promotor de la transcripció de la cadena L (LSP), començant el lloc de transcripció a la posició 407 (Chang i Clayton, 1985). Aquest RNA iniciador es troba formant un híbrid estable de cadena triple de RNA-DNA, anomenat R-loop (Lee i Clayton, 1996; Lee i Clayton, 1997). Aquesta estructura (figura 5) consisteix en les dues cadenes parentals de DNA i l'oligonucleòtid

de RNA. La formació de dita estructura requereix la presència dels elements CSB II i CSB I (Scheffler, 1999).

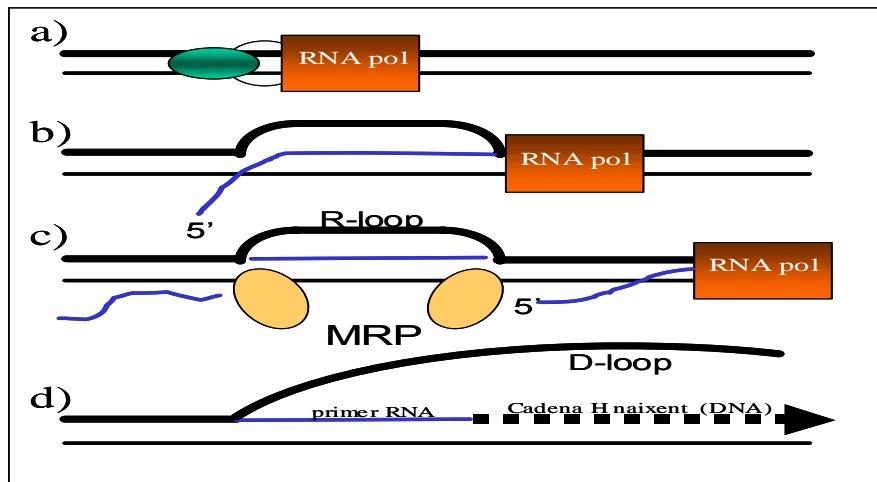


Fig. 5: Representació esquemàtica de la iniciació de la replicació de la cadena H a partir de l'iniciador de RNA. a i b) La RNA polimerasa i factors generen un transcrypt de RNA. b) Aquest transcrypt és tallat per la RNasa MRP, deixant un curt fragment de RNA estretament unit al DNA, creant-se el R-loop. d) Aquest RNA serveix com a iniciador per la síntesi de DNA. (Modificat de Scheffler, 1999).

En humans la transició RNA-DNA succeeix en diferents punts entre les posicions 100 i 320 del mtDNA, però la majoria dels DNA naixents comencen a la posició 191 (Chang i Clayton, 1985; Kang i col. 1997). Per proporcionar-se aquest iniciador, el transcrypt de RNA iniciat al promotor de la cadena L és processat per l'endoribonucleasa mitocondrial RNasa MRP. Aquest enzim només talla estructures en triple hèlix, i també s'ha vist que necessita la caixa CSB I (Clayton, 2000).

En vertebrats només hi ha una DNA polimerasa que sintetitza mtDNA, anomenada DNA polimerasa γ (pol γ), que es diferencia d'altres DNA polimerases per diversos criteris químics, com són elevada activitat de síntesi de DNA emprant motllos de RNA in vitro, inhibició per N-etilmaleimida i dideoxinucleòsids trifosfats, resistència a la afidicolina i estimulació per sal. Pol γ té funció 3'-5' exonucleasa que li aporta una elevada fidelitat (Kunkel, 1985; Wernette i col., 1988), fet que contrasta amb l'elevada taxa de mutació observada en el mtDNA. Pol γ és un heterodímer format per una subunitat catalítica (125-140 kDa) responsable tant de l'activitat polimerasa com de l'activitat exonucleasa, i una subunitat més petita (35-40 kDa) de la qual no es coneix la funció, però degut a que presenta similitats estructurals amb aminoacil-tRNA sintetases s'ha suggerit que podria tenir una funció de reconeixement d'oligonucleòtids semblants a tRNAs (Fan i col. , 1999).

1.2.1.2 Model alternatiu de replicació

El primer treball que va començar a qüestionar el model asimètric aparegué l'any 2000. Emprant gels d'agarosa bidimensionals, els autors descrigueren l'existència de dos intermediaris de replicació (RIs) en el mtDNA de cèl·lules humanes i de ratolí (Holt i col., 2000). Alguns d'aquests RIs no eren sensibles a l'acció de la nucleasa S1, que degrada DNA de cadena sencilla, fet que contradeia el model clàssic. Trobaren fortes evidències de presència de RIs de doble cadena, suggestius d'un mecanisme de replicació de cadena conductora i retardada, anàleg al que es dona al DNA nuclear amb els fragments d'Okazaki. Els autors proposaren que ambdós mecanismes coexisteixen, i que el model asimètric predominava en condicions basals, mentres que el simètric s'activava en situacions d'estrés en les quals el mtDNA necessita replicar-se més d'una vegada per cycle cel·lular, per exemple després de patir deplecció per exposició a bromur d'etidi o a dideoxicitidina.

Recentment, el mateix grup ha anat encara més enllà al concloure que els RIs de cadena sencilla prèviament observats eren atribuïbles a un artefacte, degut a la presència de RNasa H a la preparació de mitocòndries (Yang i col., 2002). D'acord amb aquest estudi, la RNasa H degrada el RNA component de les regions híbrides de RNA:DNA, conegudes en el mtDNA (Grossman, 1973), provocant una mala interpretació d'aquestes cadenes degradades com a RIs de cadena sencilla. Quan analitzaren els intermediaris de la replicació del mtDNA preparats a partir de mitocòndries purificades en gradient de sucrosa, comprovaren que tots eren doble cadena. Aquest fet va portar als autors a concloure que la replicació del mtDNA segueix bàsicament o exclusiva el model simètric de cadena conductora i retardada.

Tot i que encara és una mica aventurat abandonar el model clàssic de Clayton, sembla evident que els treballs de Holt i col·laboradors han fet trontollar un dels paradigmes clàssics de la genètica mitocondrial, i fins i tot han demostrat, almenys parcialment, l'existència del model simètric de replicació.

1.2.2 Transcripció del mtDNA

La transcripció del mtDNA també difereix de la transcripció de gens nuclears. En tots els mamífers, quan el mtDNA comença a transcriure's, les dues cadenes ho fan completament (Aloni i Attardi, 1971a i 1971b; Murphy i Attardi, 1975). La cadena L es transcriu tres vegades més ràpid que la cadena H (Cantatore i Attardi, 1980), tot i que els seus productes de transcripció tenen una vida molt més curta que no els de la cadena H.

La cromatografia d'oligo (dT)-cel·lulosa separa els mtRNAs en dues fraccions: poliadenilats i no-poliadenilats. Els RNAs mitocondrials (mtRNAs) no-poliadenilats

corresponen als dos RNAs ribosomals (12S i 16S) i als 22 tRNAs. Fent electroforesis CH_3HgOH -denaturalitzant amb la fracció poliadenilada s'identifiquen 18 espècies de mtRNAs. Aquests contenen una cua de poli-A d'aproximadament uns 55 nucleòtids al seu extrem 3' (Montoya *i col.*, 1981). Aquestes cues de poli-A són més curtes que les observades en els mRNAs citoplasmàtics i s'afegeixen al mRNA després de la transcripció. Per convenció, a cada espècie li assignen un número d'acord amb el seu pes molecular. Els més grans (1, 2 i 3) i el més petit (18), són codificats per la cadena L. La resta són codificats per la cadena H.

En humans hi ha tres llocs d'inici de la transcripció, dos a la cadena H (H_1 i H_2), i un a la cadena L (figura 2). H_1 està situat al començament del gen del tRNA^{Phe} , i H_2 està localitzat just abans del gen del rRNA 12S (Montoya *i col.*, 1982; Chomyn *i Attardi*, 1992). L'únic lloc de iniciació de la cadena L es localitza a la posició 407, a la regió de control. Ambdós transcrits de la cadena H es solapen a la regió dels rRNAs (Montoya *i col.*, 1983). A partir de H_2 es genera una molècula policistrònica gegant que permet la transcripció de tota la cadena H, mentre que a partir de H_1 tan sols es transcriu la regió que conté els RNAs 12S i 16S, els quals es sintetitzen amb molta més proporció que la resta de mRNAs (entre 20 i 50 vegades més).

La transcripció de la cadena L segueix el mateix patró que H_2 . En aquest cas es genera una única molècula policistrònica que cobreix tota la cadena L, a partir d'un únic lloc de iniciació.

El processament dels transcrits policistrònics primaris es produeix mitjançant talls endonucleotídics precisos just davant i després de les seqüències dels tRNAs (Montoya *i col.*, 1983; Ojala *i col.*, 1981). El processament té lloc en les molècules naixents de RNA unides encara al motllo. Les seqüències de tRNAs van adquirint la configuració en forma de fulla de trèvol mentre formen part de la cadena de RNA en creixement, i serveixen com a senyals de reconeixement per als enzims de processament (Ojala *i col.*, 1981; Montoya *i col.*, 1981), que tallen en els extrems 5' i 3' dels tRNAs amb extraordinària precisió (Manam *i Van Tuyle*, 1987). El tall a l'extrem 5' és anterior al de 3'. No es coneix la endonucleasa que talla a 3', en canvi en cèl·lules Hela es va descriure una activitat RNasa P responsable del tall endonucleotídic dels tRNAs a 5' (Doersen *i col.*, 1985; Puranam *i Attardi*, 2001).

La diferència entre la quantitat de síntesi de rRNA i mRNA depèn de l'acabament de la transcripció a l'extrem 3' de la zona dels rRNAs, en els transcrits originats a partir de H_1 . Aquesta es produeix per unió del factor d'acabament de la transcripció mitocondrial (mTERF) al tRNA^{Leu} , entre les posicions 3273 i 3249 (Kruse *i col.*, 1989). MTERF és capaç de modular la seva activitat en funció de la demanda cel·lular de rRNAs, tRNAs o mRNAs mitocondrials.

Recentment, s'han fet avanços molt significatius en la identificació dels components de la maquinària transcripcional. La fracció purificada de RNA polimerasa mitocondrial, coneguda com a h-mtRPOL (Tiranti i col., 1997) i el factor de transcripció TFAM (també conegut com a mtTFA. Veure Parisi i Clayton, 1991) s'ha vist que eren suficients per a activar la transcripció tant de la cadena H com de la L, *in vitro* (Dairaghi i col., 1995). Però a rel d'estudis infructuosos per a reproduir la transcripció del mtDNA humà amb les proteïnes recombinants h-mtRPOL i TFAM, es va pensar en la necessitat d'altres factors de transcripció. Falkenberg i col·laboradors identificaren dos factors de transcripció, B1 (TFB1M) i B2 (TFB2M) necessaris per a la transcripció basal en mtDNA de mamífers (Falkenberg i col., 2002; Shoubridge, 2002).

1.2.3 Traducció: Síntesi de proteïnes

Els mRNAs mitocondrials es tradueixen en ribosomes específics situats a la matriu mitocondrial, que són codificats pels dos genomes de la cèl·lula. Així, els rRNAs mitocondrials 12S i 16S formen part de les subunitats ribosomals 28 i 39S respectivament, codificades en el nucli.

El codi genètic mitocondrial presenta algunes diferències en la lectura dels codons respecte al codi genètic universal, tal i com es mostra a la taula següent:

	Codi Universal	Codi Mitocondrial Humà
UGA	STOP	TRIPTOFEN
AUA, AUU	ISOLEUCINA	METIONINA
AGG, AGA	ARGININA	STOP

Una altra peculiaritat del sistema genètic mitocondrial és que presenta un sistema de reconeixement de codons inusual, que permet la lectura del codi genètic amb només 22 tRNAs codificats en el mtDNA, enlloc dels 32 requerits d'acord amb la hipòtesi del balanceig de Crick. El sistema mitocondrial es basa en el reconeixement de les dues primeres bases del codó (Lagerkvist, 1978). Per 8 aminoàcids la tercera base no és discriminativa. Així, CUX és traduïda com a leucina, GUX com a valina, UCX com a serina, CCX com a prolina, ACX com a treonina, GCX com a alanina, CGX com a arginina i GGX com a glicina. Per cada un d'aquests aminoàcids només hi ha un tRNA. Per la resta d'aminoàcids, les dues primeres bases són discriminatòries, i depenen de si la tercera base és A-G o U-C, l'aminoàcid varia. Per exemple, AAU-AAC són tots dos traduïts com a asparragina, i AAA-AAG com a lisina. També en aquest cas hi ha un tRNA per cada aminoàcid.

El mtDNA humà només codifica un tRNA^{f-Met} (el seu anticodó és CAU), i és l'únic tRNA per la metionina. De totes formes, tant els codons interns (AUG, AUA i

AUN) com els d'inici (UUG, GUG i GUU), poden ser reconeguts per aquest tRNA, sempre que s'assumeixi que tots els pèptids són iniciats amb formilmetionina.

Tot i que s'ha aconseguit fer síntesi proteica mitocondrial en mitocòndries aïllades, encara no ha estat possible desenvolupar un sistema de traducció mitocondrial *in vitro* a partir d'extractes mitocondrials. En conseqüència, molts dels detalls de la síntesi proteica mitocondrial encara no es coneixen i només s'ha caracteritzat un número limitat de factors auxiliars involucrats en la iniciació i desenvolupament de la traducció en mamífers.

1.3 Importació de proteïnes citosòliques

La gran majoria de proteïnes mitocondrials se sintetitzen en el citosol i són importades a la mitocòndria on són dirigides a la matriu, a l'espai intermembrana, o a les membranes interna o externa. Aquestes proteïnes solen tenir un extrem N-terminal que es talla durant l'import. Dits pèptids senyals no tenen motius reconeixibles en la seqüència aminoacídica, però tenen una càrrega positiva neta i poden formar hèlix- α ambifíl·liques (Hammen i Weiner, 1998).

Tant l'import de proteïnes a la matriu o a l'espai intermembrana com la inserció a la membrana interna requereixen potencial de membrana. Les proteïnes citosòliques abans de ser importades són desplegadas per xaperones. Hi ha canals formats per complexos multiprotèics que s'encarreguen de la translocació de les cadenes polipeptídiques a través de la membrana. Aquests es coneixen com TIM i TOM, o translocases de la membrana interna i externa, respectivament (Schartz, 1998; Koehler i col., 1999). TIM i TOM són dos complexos físicament separats que poden interaccionar de forma dinàmica, com quan s'associen transitòriament per a formar un canal continu per la translocació de proteïnes solubles hidrofíliques fins a la matriu. Es creu que hi ha dos complexos TIM diferents: TIM22, que s'encarregaria de l'import i inserció a la membrana de proteïnes integrants d'aquesta, i TIM23, encarregat d'importar proteïnes solubles a la matriu (Bauer i col., 2000).

1.4 Genètica Mitocondrial

La genètica del mtDNA presenta una sèrie de característiques que la diferencien de la del DNA nuclear (nDNA) i que cal tenir molt en compte a l'hora d'abordar el diagnòstic de malalties mitocondrials:

1.4.1 Herència Materna: El mtDNA s'hereta per via materna. La petita quantitat de genoma mitocondrial contingut en l'espermatozou rarament entra a l'òvul, i quan ho fa és eliminat de forma activa. Així, una mare afecta podrà transmetre la malaltia a tota la

seva descendència, però només les seves filles la transmetran a la següent generació. La quantitat de molècules que porti cada un dels seus òvuls pot ser molt variable, degut a un fenomen de restricció i amplificació conegut com a “Bottle-Neck” (coll d’ampolla). Aquest fenomen fa que el número de molècules de mtDNA que es transmet de mare a fill sigui molt petit (Chinnery, 2000). Per fer-se una idea, en vaca s’ha estimat que tan sols 5 molècules de mtDNA repoblen el mtDNA de la següent generació (Hauswirth i col., 1985).

La concepció clàssica de la transmissió del mtDNA exclusivament via materna ha trontollat recentment amb l’aparició del primer cas d’herència paterna del mtDNA, descrita en un pacient amb intolerància a l’exercici deguda a una mutació restringida al múscul esquelètic. L’únic teixit afectat, el múscul, havia heretat el mtDNA del pare, i la resta de teixits sans tenien el mtDNA de la mare (Schwartz i col., 2002).

1.4.2. Poliplàsmia: En cada cèl·lula hi ha centenars o milers de molècules de mtDNA, depenent dels seus requeriments energètics.

1.4.3 Segregació mitòtica: La divisió de les mitocondries i la replicació del mtDNA són processos independents del cicle cel·lular. Durant la divisió cel·lular, les mitocondries es distribueixen a l’atzar entre les cèl·lules filles. Quan totes les cèl·lules d’un individu tenen el mateix mtDNA hi ha homoplàsmia. Si en una cèl·lula apareixen dues poblacions de mtDNA, normal i mutada, estem davant una situació d’heteroplàsmia. D’aquesta manera, amb la divisió cel·lular, el fenotip d’una línia germinal determinada pot variar i generar tres genotips diferents: homoplàsmics pel mtDNA normal, heteroplàsmics, i homoplàsmics pel mtDNA mutat (figura 6).

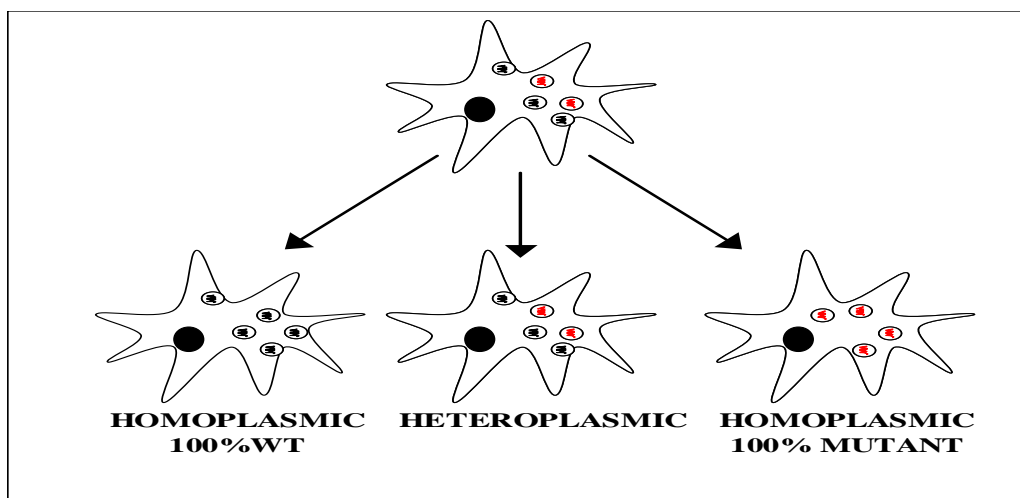


Fig.6: Representació gràfica de la segregació mitòtica. Una cèl·lula que porti dos genomes mitocondrials, salvatge i mutat, pot generar tres possibles fenotips. En negre es representa el mtDNA salvatge, i en vermell el mtDNA mutat.

1.4.4 Efecte umbral: El fenotip d'una cèl·lula amb heteroplàsmia dependrà del percentatge de mtDNA mutat, és a dir, del grau d'heteroplàsmia. Si el número de molècules mutades és petit es produeix una complementació de la funció amb les molècules de DNA normals i no es manifesta el fenotip mutant. En canvi, si el número de molècules mutades sobrepassa un umbral determinat es manifestarà la patologia. Aquest umbral ve regit per les necessitats energètiques de cada teixit; si la producció d'ATP arriba a estar per sota dels mínims necessaris per al funcionament dels teixits, es manifesta la patogenicitat. Els teixits tenen requeriments energètics diferents, així que generalment els més dependents de la producció d'energia mitocondrial (múscul i sistema nerviós central), son els que més s'afecten.

1.4.5 Elevada taxa de mutació: La taxa de mutació espontània del mtDNA és unes 10 vegades superior a la del nDNA (Brown i col., 1979). Degut a això, hi ha una gran variació de seqüències entre espècies i, fins i tot, entre individus d'una mateixa espècie. En l'home s'ha calculat que dos individus agafats a l'atzar tenen de mitja de 50 a 70 nucleòtids de diferència en la seva seqüència. A més a més d'aquestes diferències, en un individu determinat, es produeix constantment al llarg de la vida una heterogeneïtat en el mtDNA com a conseqüència de les mutacions originades en les cèl·lules somàtiques. S'ha proposat que l'acumulació d'aquest dany mitocondrial podria ser la causa de la disminució en la capacitat respiratòria dels teixits en el procés d'envelliment (Ozawa, 1997). La variació existent a la seqüència del mtDNA de diferents individus és molt útil per a estudis antropològics, etnològics i forenses, i ahora és la base de la hipòtesi que postula que l'home actual descendeix d'una dona que va viure a Àfrica fa uns 200.000 anys ("Eva Mitocondrial) (Stoneking i Sodyall, 1996).

1.5 La Cadena Respiratòria. Sistema de Fosforilació Oxidativa (OXPHOS)

La mitocòndria genera la major part de l'energia que requereixen les cèl·lules eucariotes mitjançant l'oxidació aeròbica de substrats. El procés oxidatiu està acoplat a la cadena de transport electrònic, encarregada de transformar els potencials d'oxido-reducció generats en el metabolisme oxidatiu en energia en forma d'ATP (adenosin trifosfat).

La cadena respiratòria està constituïda per cinc complexos multienzimàtics i dues molècules que actuen com a nexes de unió (el coenzim Q i el citocrom C). Els tres primers complexos (complex I, II, III) actuen com a transportadors electrònics. El complex IV utilitza els electrons que li arriben per reduir l'O₂ a H₂O. I el complex V és la ATP sintasa, encarregada de la síntesi d'ATP (figura 7). A més a més, pel perfecte

funcionament del sistema són necessaris tres enzims més: dihidroortat: CoQ oxidorreductasa (DHO-CoQO), flavoproteïna transportadora d'electrons:CoQ oxidorreductasa (ETF-CoQO) i el translocador de nucleòtids d'adenina (ANT), encarregat d'exportar a l'exterior l'ATP sintetitzat, alhora que introdueix a la matriu ADP i P_i .

La glucòlisi i el Cicle de Krebs generen una quantitat relativament baixa d'energia en forma d'ATP. En canvi, aporten el poder reductor necessari per a la síntesi d'ATP mitjançant sis reaccions de deshidrogenació (una a la glucòlisi, una altra a la reacció de la piruvat deshidrogenasa, i quatre al Cicle de Krebs). Aquestes reaccions redueixen 10 mols de NAD^+ a NADH, i dos mols de FAD a $FADH_2$, per mol de glucosa.

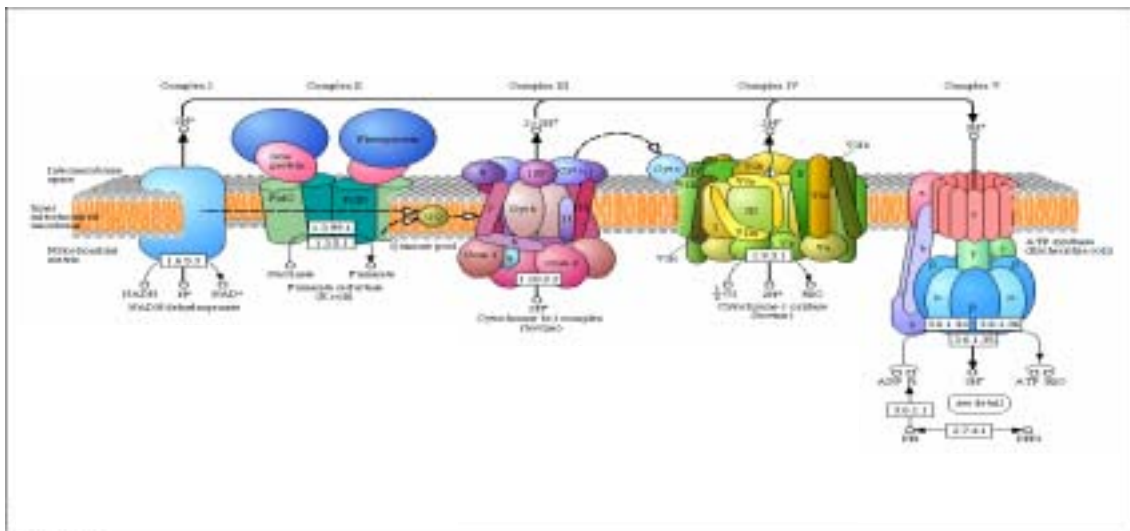


Fig. 7: Representació esquemàtica de la via OXPPOS, on s'il·lustra la hipòtesi quimiostmòtica de Mitchel (modificada de <http://www.rpi.edu>).

La reoxidació d'aquests agents reductors es dona a la membrana mitocondrial interna, gràcies a reaccions acoplades d'oxidació-reducció, i al pas d'electrons a través de transportadors electrònics integrats. El $NADH+H^+$ és oxidat a NAD^+ , i l' H alliberat és captat per l'acceptor d'hidrogen $FAD \rightleftharpoons FADH_2$, que és oxidat pels citocroms (citocrom b, citocrom C, citocrom a, etc.), que són proteïnes amb grups hemo (anells de porfirines) com a cofactors. En el centre d'aquests anells tenen ions ferro que canvien la valència ($Fe^{III} \leftrightarrow Fe^{II}$). Mentre FAD accepta tant electrons com protons, els citocroms només transporten electrons. Els protons són emesos cap a fora. A la cadena respiratòria, el Fe^{III} del citocrom b és el primer que canvia a Fe^{II} al agafar l'electró del $FADH_2$. L'ió ferro del citocrom b torna al seu estat original transferint un electró al citocrom C, que alhora el transfereix al citocrom a. I finalment, el citocrom reduït

transfereix l'electró a l'oxigen, que reacciona immediatament amb protons lliures per a formar aigua. L'energia alliberada en aquests processos s'utilitza per a bombejar protons des de la matriu a l'espai intermembrana. Es crea així un gradient electroquímic ($\Delta\psi$), que és positiu i àcid a l'exterior, i negatiu i alcalí a la matriu mitocondrial. Aquest gradient es despolaritza degut al transport de protons cap a l'interior de la matriu, a través de l'ATP sintasa. El fluxe de protons proporciona l'energia suficient per a la condensació d'ADP (adenosin difosfat) i P_i (fosfat inorgànic), per a generar ATP, que és exportat al citosol a canvi del ADP gastat, pel transportador ANT. Així doncs, el consum d'oxigen de la cadena de transport d'electrons està acoplat amb la fosforilació d'ADP per l'ATP sintasa, aprofitant el gradient electroquímic (Wallace, 1999).

Actualment, i gràcies a estudis de cristal·lografia, es coneixen les estructures tridimensionals amb resolució a nivell atòmic del citocrom bc_1 (complex III), de la citocrom c oxidasa (complex IV) i del component catalític de l'ATP sintasa (complex V).

Hi ha evidències que demostren que els complexos respiratoris no floten a la bicapa lipídica de la membrana interna de forma independent uns dels altres, sinó que s'agrupen formant complexos supramoleculars, els respirosomes (Schagger i Pfeiffer, 2000).

1.5.1 Complex I: NADH-Ubiquinona (CoQ) Oxidorreductasa

El complex I constitueix el primer pas en la cadena de transport electrònic. La seva funció és acceptar dos electrons procedents del NADH i transferir-los, mitjançant els transportadors electrònics que el constitueixen, a la ubiquinona (coenzim Q_{10}). De forma acoplada es produeix la translocació de dos protons des de la matriu a l'espai intermembrana.

S'ha determinat l'estructura primària de les subunitats del complex I de varis grups de bacteris (Cole i col., 1998; Deckert i col., 1998; Dupuis i col., 1998). En general, el complex I procariota conté 14 subunitats diferents que suposen la unitat mínima estructural de la NADH-ubiquinona oxidoreductasa. Sumen una massa molecular d'uns 530 kDa. Set d'elles són proteïnes perifèriques, formen el centre actiu, incluint les subunitats que uneixen tots els grups redox coneguts del complex I, com varis nuclis de ferro-sofre i un flavín mononucleòtid (FMN) (Walker, 1992). Les altres set subunitats són proteïnes hidrofòbiques que es pleguen en 54 α -hèlixs a través de la membrana. Es coneix molt poc de la funció d'aquestes proteïnes, probablement estan relacionades amb la reducció de la ubiquinona i amb la translocació de protons. (Brandt, 1997; Friedrich i col., 1995).

Els complexos I mitocondrials d'eucariotes, a més a més de les 14 subunitats homòlogues a les dels bacteris, contenen fins a 29 proteïnes addicionals, amb lo que el seu pes molecular arriba aproximadament als 900 Kda. Algunes d'elles estan conservades entre fongs i animals, tot i que la majoria són específiques d'espècie. La funció d'aquestes subunitats no està clara, totes estan codificades pel nucli, i es pensa que podrien formar una estructura de suport al voltant de les 14 subunitats essencials, evitant així que els electrons amb elevada energia escapin del complex i formin espècies reactives d'oxigen (Guenebaut i col., 1997).

Les subunitats del complex I mitocondrial de mamífer homòlogues a les set subunitats hidrofòbiques bacterianes estan codificades pel mtDNA, i es coneixen com a ND1-ND6, ND4L (Schneider i col., 1997; Schulte i col., 1999). La subunitat ND1 sembla ser el lloc de unió de la ubiquinona (Earley i col., 1987; Earley i Ragan, 1984).

Per microscòpia electrònica s'ha determinat l'estructura terciària del complex I. Consisteix en dos segments majors que formen una espècie de L, el segment periperà, que surt cap a la matriu mitocondrial, i el segment membrana que, com indica el seu nom, està ancorat a la membrana mitocondrial interna (figura 8). El segment periperà és el domini catalític i està format per 12 subunitats. El segment membrana està constituït principalment per subunitats hidrofòbiques, incloent les set subunitats codificades pel genoma mitocondrial (Ahlers i col., 2000).

Els transportadors d'electrons d'aquest complex inclouen la FMN i sis centres ferro-sofre anomenats N-1a,N-1b (grups binuclears, amb 2 àtoms de Fe i 2 de S) i N-2, N-3, N-4 i N-5 (grups tetranuclears, 4Fe-4S) (Ohnishi, 1998).

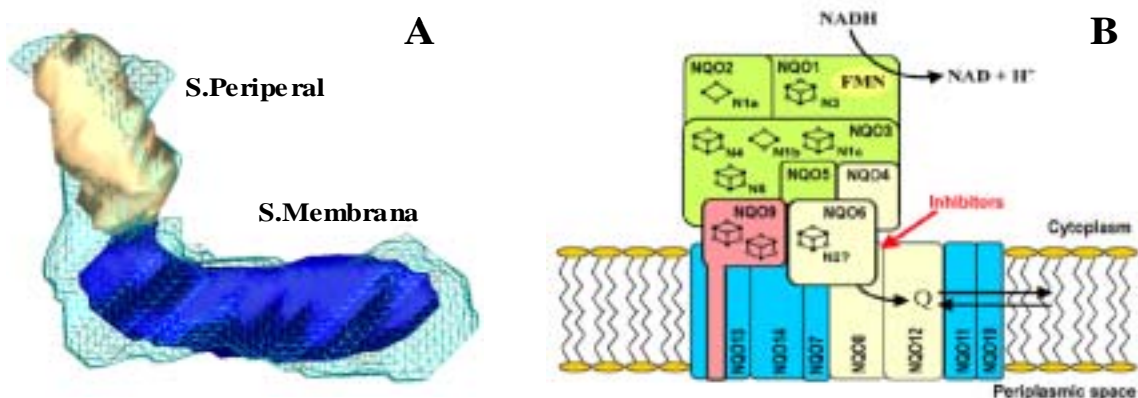


Fig. 8: A) Comparació del model del complex I bacterià (part colorejada de blau i beix) amb el model mitocondrial (línies) generats per reconstrucció d'imatge de microscòpia electrònica. B) Associació dels productes gènics amb l'estructura, i dels centres redox amb cada subunitat. Segons el model proposat per Okun (Okun i col., 1999) sobre el mecanisme de funcionament de la NADH:Ubiquinona Oxidoreductasa, els electrons són transferits del NADH al FMN, i d'aquest als transportadors N1, N3 i N4, per finalment ser N2 qui els cedeix a la ubiquinona.

El mecanisme de funcionament del complex no està molt clar, tot i que la majoria d'autors proposen que és per acoplament induït per la seva pròpia energia. És probable que el centre ferro-sofre N-2 (és el que disposa de la més elevada capacitat redox amb 4Fe i 4S) sigui el donador d'electrons a la ubiquinona. El potencial mig, pH dependent, d'aquest centre podria indicar que ell mateix sigui també l'implicat en el bombeig de protons (Okun i col., 1999).

Existeixen nombrosos composts que inhibeixen el funcionament del complex I, i que s'han emprat per anàlisis funcionals, la majoria d'ells no inhibeixen l'oxidació del NADH, però si la reducció de la ubiquinona (Degli Esposti i col., 1994). Els inhibidors més utilitzats del complex I són la rotenona i la piericidina A, però n'hi ha molts d'altres, entre ells el 1-metil-4 fenilpirimidina (MPTP), que produeix parkinsonisme, tant en rates com en humans.

Els dèficits de complex I es diagnostiquen mesurant les activitats enzimàtiques de la NADH-CoQ reductasa, NADH citocrom C reductasa o NADH deshidrogenasa (Shanske i DiMauro, 1994).

A la pàgina web http://www.life.uiuc.edu/crofts/bioph354/complex_i.html es pot trobar més informació sobre aquest complex.

1.5.2 Complex II: Succinat CoQ Oxidoreductasa

El complex II és un component del cicle de Krebs que participa a la cadena de transport d'electrons catalitzant l'oxidació del succinat a fumarat, transferint els electrons a la ubiquinona (Ackrell i col., 1992), reacció que té lloc a la matriu mitocondrial. A diferència dels complexos I i III, aquest complex no transloca protons des de la matriu a l'espai intermembrana, la seva funció es limita a transferir electrons. Està format per quatre polipèptids, tots ells codificats pel genoma nuclear (Hagerhall, 1997). El complex II pot dividir-se en dues fraccions; una soluble formada per la SDH, i una altra insoluble que inclou a les proteïnes d'ancoratge a la membrana.

La SDH està formada per una subunitat flavoprotèica de 70 kDa, la SDHA, que conté els llocs de unió del succinat i del flavín adenin dinucleòtid (FAD), i una subunitat ferro-sofre, la SDHB de 30 kDa, que conté tres nuclis de dites característiques químiques (Ackrell i col., 1992).

La fracció insoluble la formen dues proteïnes, SDHC (15 kDa) i SDHD (13 kDa), que uneixen la SDH a la membrana. Contenen un grup hemo cada una, els citocroms cybL i cybS, que també col·laboren en la unió de la ubiquinona.

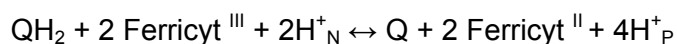
Cal dir que hi ha altres enzims d'altres rutes metabòliques que cedeixen electrons a la ubiquinona. Aquests són:

- La Glicerol 3-Fosfat Deshidrogenasa, que és una flavoproteïna que es troba a la cara externa de la membrana mitocondrial interna, que participa a la llançadora d'equivalents de reducció des del NADH citosòlic a la matriu mitocondrial. Cedeix electrons a la ubiquinona formats a partir de l'oxidació del glicerol 3-fosfat, procedent de la degradació de triglicèrids.
- La ETFP-Ubiquinona Oxidoreductasa: El primer enzim de la β -oxidació dels àcids grassos, l'acil CoA deshidrogenasa, transfereix electrons a la flavoproteïna transferidora d'electrons (ETFP), de la que passen via ETFP-ubiquinona oxidoreductasa a la ubiquinona.
- La Dihidroorotat Deshidrogenasa: enzim de la ruta biosintètica de les pirimidines, que cedeix els electrons a la ubiquinona, procedents de l'oxidació irreversible del dihidroorotat al orotat. Aquest enzim eucariota és una flavoproteïna que conté Fe no unit a un grup hemo, i està localitzada a la superfície exterior de la membrana mitocondrial interna.

El dèficit del complex II es caracteritza per una disminució en l'oxidació de substrats $FADH_2$ depenents, com és el succinat, i una oxidació normal dels NADH depenents, com són el malat i l'aspartat. Enzimàticament es valora mitjançant l'activitat SDH, succinat CoQ reductasa o succinat citocrom C reductasa (Shanske i DiMauro, 1994).

1.5.3. Complex III (bc₁): Ubiquinol-(QH₂) Citocrom c Oxido-reductasa

El complex III és el complex respiratori que es coneix millor. S'encarrega de passar els electrons del ubiquinol al citocrom C, a l'espai intermembrana, i utilitza l'energia alliberada per a bombejar protons des de la matriu cap a l'espai intermembrana. Aquesta és la reacció que produeix:



El complex III es troba de forma estable ancorat a la membrana mitocondrial interna formant dímers. El monòmer conté 11 subunitats (I-IX), amb un pes total de 240 kDa (figura 9). D'aquestes subunitats, només una, el citocrom b (subunitat III), és codificada pel mtDNA. El centre funcional està format per tres subunitats, el citocrom C₁ (subunitat IV), que conté un grup hemo C₁; la proteïna de Rieske (subunitat V), que conté el centre ferro-sofre (Fe_2-S_2); i el citocrom b, que conté dos grups hemo, b₅₆₂ (b_H) i b₅₆₆ (b_L). Aquestes tres subunitats es troben en una proporció 2:1:1.

La resta de subunitats són petites proteïnes que rodegen el nucli metal·loproteic. Dues d'elles, les proteïnes "core" (subunitats I i II), participen en l'ensamblatge del complex.

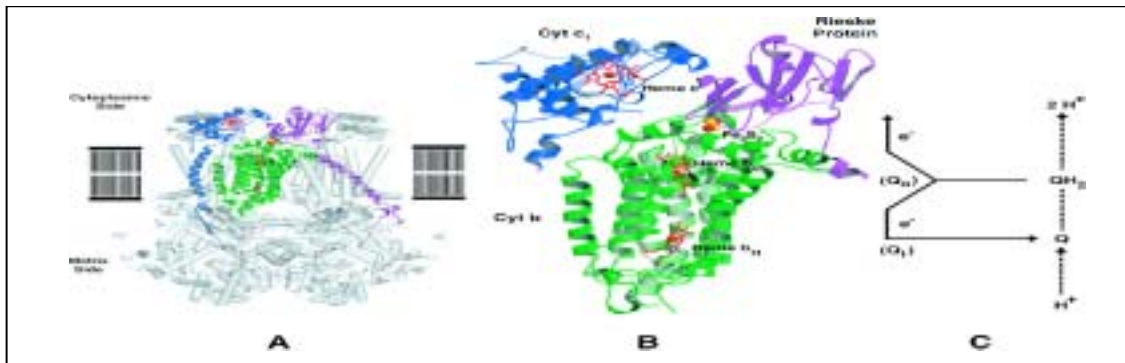


Fig. 9: A) Estructura del complex bc1 boví, deduïda per cristal·lografia de rajos X (Zhang i col., 1998). B) Centre actiu format pel citocrom b (verd), citocrom C₁ (blau) i proteïna de Rieske (lil·la). Els centres Fe-S, en vermell. C) Topologia de la transferència de protons i electrons en el Cicle Q. (Saraste, 1999).

El mecanisme d'acció del complex bc₁ es coneix amb el nom de "cicle Q" (Trumpower, 1990; Mitchell, 1976). L'ubiquinol és una benzoquinona lligada a 10 molècules d'isoprè, altament lipòfila que, gràcies a la seva cua isoprenoide apolar, pot moure's amb facilitat per dins la membrana. Donat que l'oxidació d'aquesta molècula està acoplada a la protonació i desprotonació, aquestes dues reaccions estan organitzades de tal forma que l'oxidació del quinol dona lloc a l'activació del transport d'ions d'hidrogen a través de la membrana. Per a això es requereixen dos llocs actius, un per a l'oxidació del ubiquinol i l'alliberació de protons a la cara externa de la membrana (Q₀), i l'altre per a la reducció de l'ubiquinona, acoplada a la captació de protons des de la cara interna de la membrana interna (Q_i). Aquest mecanisme necessita que els electrons siguin transferits del lloc Q₀ al lloc Q_i.

Les estructures cristal·lines (Crofts i Berry, 1998) han confirmat l'existència d'aquests dos llocs actius. El lloc per a Q₀ es troba localitzat entre la proteïna de Rieske i el citocrom b, pròxim a la cara citoplasmàtica de la membrana mitocondrial interna, mentre que el lloc per a Q_i es troba en el citocrom b a la cara interna de la membrana (Iwata i col., 1998; Xia i col., 1997). Els dos llocs es comuniquen en una fase aquosa mitjançant canals. Els dos grups hemo del citocrom b tenen potencials redox diferents. Així, el Q₀ està devora el b_L, potencial baix, mentre que el Q_i està devora el grup b_H, de potencial elevat.

L'oxidació d'un quinol (a Q₀) dona lloc a dos electrons. Aquests electrons mobilitzats al llarg del complex III són bifurcats, de manera que un d'ells és transferit, mitjançant una cadena d'alt potencial, a la proteïna de Rieske. Des d'aquí al citocrom c₁, per acabar al citocrom C soluble (també anomenat citocrom c₂). El segon electró és transferit al lloc Q_i, via els grups hemo b_H i b_L, del citocrom b. La diferència de potencial entre els dos grups hemo genera l'energia necessària per a promoure la translocació de protons. Així, per a reduir una quinona, després de l'oxidació de dos quinols al

centre Q_0 , es transfereixen dos electrons des del lloc Q_i . Aquest mecanisme dona lloc al pas net de dos protons per cada electró transferit al citocrom C.

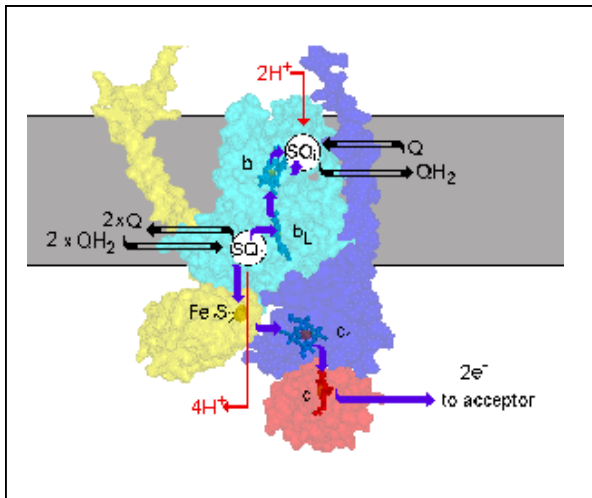


Fig. 10: Representació estructural del Cicle Q. SQ_i : lloc Q_i ; SQ_0 : lloc Q_0 . Les reaccions són catalitzades per tres subunitats: citocrom b (cel); citocrom C_1 (blau); i la proteïna de Rieske (groc), que conté el centre Fe_2S_2 . L'oxidació del quinol genera 2 electrons que es bifurquen. Un va cap al citocrom b, i l'altre cap a la cadena d'elevat potencial, constituïda per la proteïna de Rieske, el cyt C_1 i el cyt C (color vermell), que el transfereixen a la citocrom oxidasa, deixant una semiquinona al lloc Q_0 .

El citocrom c actua de transportador intermediari entre el complex III i el complex IV. Es tracta d'una petita proteïna (13 kDa) associada a la membrana interna, però que solubilitza amb facilitat. Els llocs de unió del citocrom C es troben al citocrom C_1 del complex III i a la subunitat 2 del complex IV, probablement a la interfase situada entre els monòmers del dímer de l'oxidasa (Adams i col., 1994).

Un bloqueig a nivell de complex III altera la utilització de substrats NADH i FADH dependents. L'anàlisi enzimàtic es caracteritza per una alteració de la ubiquinol citocrom c reductasa, o bé de la NADH-citocrom C reductasa i la succinat-citocrom C reductasa.

A l'adreça http://www.life.uiuc.edu/crofts/bc-complex_site/, pot trobar-se més informació sobre aquest complex.

1.5.4 Complex IV: Citocrom C Oxidasa (COX)

El complex IV catalitza la transferència de quatre electrons des del citocrom C a l'oxigen molecular. L'energia generada permet el bombeig de dos protons des de la matriu a l'espai intermembrana. Aquest procés és diferent que en el complex III. El seu substrat és el citocrom C, una hemoproteïna soluble en aigua que dona els electrons a la cara citoplasmàtica de la membrana mitocondrial interna. Aquests electrons són transferits al lloc actiu que conté ferro hemo i una molècula de coure, on s'empren per a reduir O_2 a dues molècules d'aigua.

A diferència del complex bc_1 , que té un comportament dinàmic, la citocrom oxidasa sembla ser estàtica, tant per la seva forma oxidada, com per la forma reduïda o unida a lligam. S'ha determinat l'estructura cristal·lina de la citocrom oxidasa bovina

(Tsukihara i col., 1996; Yoshikawa i col., 1998) (figura 11) que ha permès aclarir l'estructura dels centres metàl·lics i la ruta dels electrons. Es troba ancorada a la membrana interna en forma de dímer. El monòmer (204 kDa) està format per tretze subunitats. Les tres subunitats majors (I, II, i III), són les codificades pel mtDNA i constitueixen el centre funcional. La resta de subunitats (IV, V_a, V_b, VI_a, VI_b, VI_c, VII_a, VII_b, VII_c i VIII), codificades pel genoma nuclear, es disposen rodejant el centre catalític, modulant l'activitat del complex. El complex purificat conté a més a més dos àtoms de ferro, tres de coure, un de zinc i un altre de magnesi.

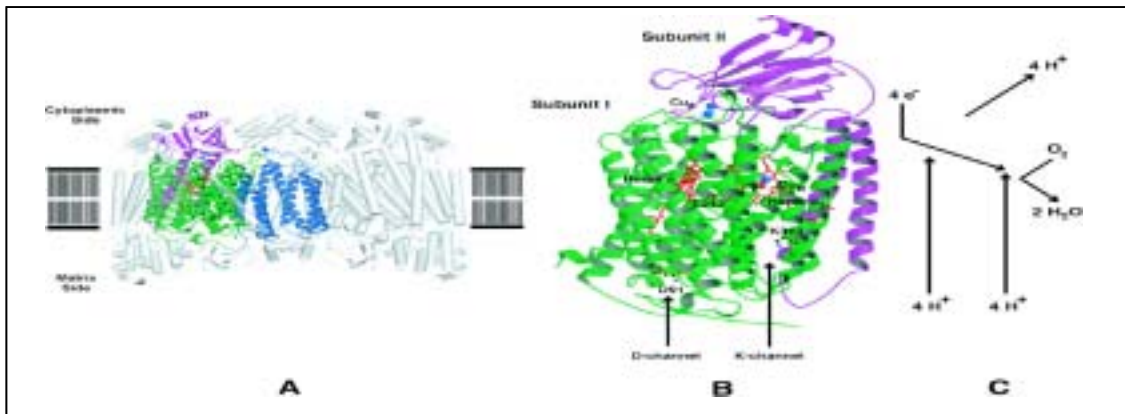


Fig. 11: Citocrom oxidasa bovina. (A) Estructura del complex dimèric, deduida per cristal·lografia de rajos X (Tsukihara i col., 1996). Les subunitats I (verda), II (vermella) i III (blava), estan codificades en el mtDNA, i formen el centre funcional de l'enzim. (B) Subunitats I i II que contenen els centres metàl·lics. El centre actiu (citocrom a₃/Cu_B), es troba a la subunitat I. El citocrom c s'uneix pel costat citoplasmàtic del complex i els electrons són transferits al lloc actiu via Cu_A i citocrom a. (C) Topologia de la transferència d'electrons i protons a la COX. Els protons emprats per a reduir l'O₂ a aigua, o són bombejats al lloc citoplasmàtic de la membrana mitocondrial interna, o són transferits des del lloc de la matriu a través dels canals K i D. Imatge agafada de (Saraste, 1999).

La subunitat I conté el centre actiu. La subunitat II té un centre de coure bimetàl·lic (Cu_A) (Lappalainen i col., 1993; Malmstrom i Aasa, 1993). La transferència dels electrons s'inicia quan el citocrom c s'uneix a la subunitat II, a la cara citosòlica de la membrana, i cedeix els electrons al Cu_A. D'aquí són transferits a un grup hemo de baix spin, el citocrom a de la subunitat I, i d'aquí al centre bimetàl·lic d'aquesta subunitat, el citocrom a₃/Cu_B.

De la subunitat III, que està unida a fosfolípids, es desconeix la funció, tot i que estudis realitzats en cèl·lules derivades de pacients amb mutació en el gen COIII, han indicat que en humans participa en la incorporació i el manteniment de subunitats petites de l'enzim (Tiranti i col., 2000). Dos canals hidròfils connecten el centre actiu a la fase aquosa de la matriu mitocondrial. Aquests canals es coneixen com a D i K perquè contenen un aspartat i una lisina respectivament, que estan molt conservats al

llarg de l'evolució (Wikstrom, 1998). Durant la reducció del O_2 es consumeixen dos protons que són transportats al centre actiu pels canals D i K.

Encara no es coneix el mecanisme pel qual els protons són transportats a través de la barrera hidrofòbica. L'anàlisi estructural ha suggerit que la translocació de protons podria aconseguir-se per interacció del glutamat conservat i els propionats del dos grups hemo (Michel, 1998), tot i que caldrà més estudis estructurals espectroscòpics i biofísics per aclarir el mecanisme del bombeig de protons.

El procés de reducció de l'oxigen inclou varies etapes. A partir de l'enzim oxidat (O) es forma una espècie reduïda (R) en la que els dos metalls del centre actiu són reduïts després d'acceptar dos electrons. L' O_2 s'uniria a R generant-se una espècie intermitja peroxidada (P). L'acceptació d'un tercer electró generaria aigua i un ferril-intermediari (F). Finalment, el quart electró faria recuperar novament la forma O, alliberant una nova molècula d'aigua (Babcock i Wikstrom, 1992).

Els dèficits del complex IV es mesuren valorant l'activitat enzimàtica de la citocrom C oxidasa. A l'adreça <http://www-bioc.rice.edu/~graham/CcO.html> es pot trobar més informació sobre aquest complex.

1.5.5 Complex V: F_0 - F_1 ATP sintasa

L'ATP sintasa té una funció reversible, per una part sintetitza ATP utilitzant l'energia electroquímica produïda durant la translocació de protons a la cadena OXPHOS, i per l'altra hidrolitza dit ATP bombejant protons en contra de gradient.

L'ATP sintasa bovina està formada per 16 subunitats amb un pes molecular d'uns 500 kDa (Lutter i col., 1993). Consta de dues subunitats, la catalítica F_1 , associada a la membrana i soluble en aigua, que té la funció de sintetitzar ATP a partir d'ADP i P_i , i la fracció F_0 , que és integral de membrana i soluble en detergents, que té la funció de canal de protons, transportant-los des de l'espai intermembrana a la matriu mitocondrial, amb la finalitat de generar l'energia necessària per a alliberar l'ATP sintetitzat a la fracció F_1 .

La fracció de membrana F_0 està formada per les subunitats: a (codificada per la ATPasa 6) i ATPasa 8, ambdues codificades pel mtDNA, i les subunitats codificades pel genoma nuclear b, c, d, e, f, g,

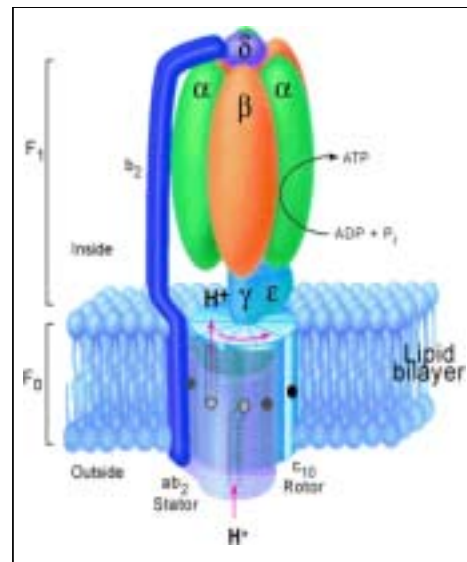


Fig.12: Representació esquemàtica de l'ATP sintasa d'E.coli, on s'esquematitza el model rotatori que condueix a la síntesi d'ATP. La rotació de l'anell d'oligòmers de subunitats c està dirigit per la força protómotriu. Modificat de Fillingame i col., 2002.

F₆, A6L, OSCP (proteïna que confereix sensibilitat a l'oligomicina) i el factor d'acoplament CF₆.

La fracció catalítica F₁, es compon de cinc subunitats: α , β , γ , δ i ϵ , amb una estequiometria 3,3,1,1,1. Les subunitats α i β són homòlogues, les dues uneixen nucleòtids, però només la β té activitat catalítica. Com que hi ha tres β , tenim tres llocs actius dins del component catalític de l'enzim.

L'ATP sintasa des del punt de vista funcional podria comparar-se a un motor compost per un rotor (constituït per les subunitats $\gamma\epsilon$ -F₀-c) i un eix (format per $\alpha_3\beta_3\delta$ -F₀-ab) (Kagawa, 1999). Cada una de les subunitats β conté un centre de unió catalític pels nucleòtids ATP, ADP i P_i. Existeixen evidències de que els centres catalítics β i el canal de protons estàn acoplats mitjançant un mecanisme que implica la rotació simultània de les subunitats $\gamma\epsilon$ amb l'anell de subunitats c, quan els protons atravesen el canal des de la cara citoplasmàtica de la membrana cap a la matriu. Com a conseqüència d'aquestes rotacions, la fracció F₁ sofreix una sèrie de canvis conformacionals que fan que un dels centres catalítics al que està fortament unida una molècula d'ATP, l'alliberi. Seguidament, una molècula de ADP i el P_i, unida dèbilment al següent centre, s'uneix fortament per a formar ATP, ocupant-se el següent per ADP i P_i, i així successivament. D'acord amb aquest model de recanvi proposat per Boyer (Boyer, 1997), cada lloc de unió podria passar per tres estats diferents (obert, intermig i tancat), corresponent a estat buit, estat unit a l'ADP i al fosfat, i estat estretament unit a l'ATP. La formació d'ATP no requereix energia una vegada que els substrats s'han separat de la solució aquosa. El que si requereix energia és la unió dels substrats al centre actiu i l'alliberació de l'ATP (Boyer, 1997).

L'estructura cristal·lina de la subunitat F₁ de l'ATPasa bovina (Abrahams i col., 1994) ha revetllat una simetria intrínseca en l'enzim, recolzant el mecanisme proposat per Boyer, suggerint que l'enzim funciona mitjançant catàlisi rotacional.

S'ha proposat un model pel mecanisme mecànic-químic del motor ATPasa, utilitzant aproximacions hidroquímiques, mecàniques i estructurals (Yasuda i col., 1998; Elston i col., 1998; Wang i Oster, 1998). La torsió estimada indica que el motor funciona amb una eficiència de quasi el 100% (Noji i col., 1997). El model postula que l'ATPasa no funciona com una màquina de calor, sinó que converteix l'energia de la unió dels nucleòtids en una tensió elàstica. L'energia que mou la rotació de la subunitat γ es proposa que està localitzada a la bisagra entre els lòbuls de les subunitats β (Wang i col., 1998).

La qüestió fonamental de com es sintetitza l'ATP per F₀F₁ està per resoldre. La catàlisi rotacional implica que els sectors de membrana han de contenir una estructura

que giri com a resposta a la força motriu. Una candidata és un oligòmer format per la subunitat c, una proteïna de la qual hi ha 12 còpies a F_0 (Jones i col., 1998). Això pot conduir a una translocació de 4 protons per cada molècula d'ATP sintetitzada. Cada molècula conté un residu d'àcid carboxílic conservat en el centre de la bicapa lipídica. La protonació i desprotonació d'aquest residu pot ser la clau del mecanisme de rotació. En canvi, la condició estructural necessària per a aquest mecanisme és que altres components es moguin en direcció oposada o bé es mantenguin fixes, tipus *estator*, durant les interaccions electrostàtiques dinàmiques a la membrana (Elston i col., 1998). Un component clau de l'*estator* pot ser la subunitat a, que conté una arginina conservada que podria contrarestar el moviment del glutamat a la subunitat c. El model actual proposa que el dodecàmer de subunitats c forma el rotor amb les subunitats γ i ϵ , i les subunitats a, b i el complex δ formen el braç de l'*estator*. El moviment de protons entre els oligòmers de les subunitats a i c podria produir la torsió quan el rotor es mou i l'*estator* es manté fixat a la membrana (Elston i col., 1998; Wang i Oster, 1998). El mecanisme de síntesi de l'ATP es podrà desxifrar millor quan es determini l'estructura completa de l'ATP sintasa.

1.5.6 Control de la Fosforilació Oxidativa

Incubant mitocòndries aïllades en un oxígraf es va explicar per primera vegada el mecanisme de control respiratori. S'anomenà estat actiu o estat 3 a l'estimulació del consum d'oxigen al afegir ADP, i estat controlat o estat 4 a la disminució d'aquest consum deguda a la conversió d'ADP a ATP.

La primera explicació raonable del mecanisme de control de la fosforilació oxidativa es va basar en la teoria quimiosmòtica de Mitchel (Mitchel, 1961), on proposà que la força protó motriu a través de la membrana mitocondrial interna (Δp) aportava l'energia requerida per a la fosforilació oxidativa (figura 7). Així, l'entrada d'ADP a la mitocòndria produïa una estimulació de l'ATP sintasa, acompanyada d'una disminució del gradient de protons (Δp), fet que estimulava el bombeig de protons pels diferents complexos de la cadena, i així la respiració mitocondrial.

Aquest model es va veure respaldat amb estudis amb bacteris i cloroplasts, però en alguns estudis amb mitocòndries el model fallà ja que trobaren casos en els quals el Δp i la síntesi d'ATP no es correlacionaven (Kadenbach i Arnol, 1999). Dits autors proposaren un segon model que considera que la relació intramitocondrial de ATP/ADP controla la respiració en eucariotes (Arnol i Kadenbach, 1999), però no en bacteris (Follman, 1998). Aquest mecanisme seria independent del Δp , i proposa que la regulació de la respiració vendria definida per la unió d'ATP o ADP al domini de la

matriu de la subunitat IV de la citocrom C oxidasa, en eucariotes. Dita subunitat té varis llocs d'afinitat per la unió de l'ATP i l'ADP, i s'ha vist que utilitzant anticossos monoclonals contra ella elimina la inhibició de l'activitat a elevades taxes d'ATP/ADP. Així doncs, es produeix una inhibició al·lostèrica de la citocrom C oxidasa per ATP (Arnol i Kadenbach, 1999).

1.6 Les Malalties Mitocondrials

Les malalties mitocondrials són un grup de trastorns relacionats amb defectes en el sistema OXPHOS que condueix a la síntesis d'ATP, producte final del metabolisme energètic mitocondrial. El concepte va ser introduït per Lluft i col. (Lluft i col., 1962), quan varen descriure un pacient amb hipermetabolisme no causat per disfunció tiroidea que presentava un desacoplament de la fosforilació oxidativa en mitocòndries de múscul.

Com que les proteïnes que componen els complexos multienzimàtics de la cadena respiratòria estan codificades tant pel nDNA com pel mtDNA, aquestes malalties poden ser degudes a mutacions en gens d'ambdós genomes.

Els primers estudis publicats que establiren una relació causal entre mutacions en el genoma mitocondrial i patologia humana són de 1988, quan Wallace i els seus col·laboradors trobaren les primeres mutacions puntuals del mtDNA en un pacient amb LHON (Neuropatia Òptica Hereditària de Leber) i en un pacient amb MERRF (encefalopatia mitocondrial amb fibres vermell-rasgades) (Wallace i col., 1988a, 1988b), i Holt i col.laboradors identificaren les grans deleccions en pacients amb miopatia mitocondrial (Holt i col., 1988).

Des de les hores, s'han descrit més de 100 mutacions patogèniques en el mtDNA, que presenten una gran heterogeneïtat genètica, bioquímica i clínica, ([MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database. http://www.mitomap.org](http://www.mitomap.org), 2003.).

Les manifestacions clíniques d'aquestes malalties són molt variades (Shanke i DiMauro, 1994), entre les més comuns trobem: demència, trastorns motors, intolerància a l'exercici, accidents cerebrovasculars, convulsions, ptosis, oftalmoplegia, retinopatia pigmentària, atròfia òptica, ceguesa, sordesa, cardiomiopatia, disfuncions pancreàtiques i hepàtiques, diabetis, etc. En general són trastorns multisistèmics que afecten als teixits i òrgans que més depenen de l'energia mitocondrial (sistema nerviós central, múscul esquelètic i cardíac, ronyons i sistema endocrí), tot i que qualsevol altre teixit pot estar afectat. A nivell radiològic aquestes encefalopaties es poden manifestar amb calcificacions dels gànglis de la base, necrosi estriatal bilateral, hipoplàsia cerebel·losa, infarts cerebrals o cerebel·lars i leucoencefalopatia. Els

indicadors típics de laboratori que es relacionen amb aquestes patologies són un augment de proteïnes en el líquid cefalorraquidi, augment de la creatina quinasa (CK), acidosi làctica i mioglobinúria. Altres característiques que solen relacionar-se amb les malalties mitocondrials són la presència de fibres vermelles-esquinçades (RRFs), que són acúmuls subsarcolèmics de mitocòndries anormals a la perifèria de la fibra muscular, la presència de fibres no reactives a la tinció histoquímica de citocrom C oxidasa (COX), o el defecte bioquímic d'un o varis complexos de la cadena respiratòria. Tot i així, algunes malalties mitocondrials poden no presentar cap d'aquestes característiques típiques, especialment en pacients en edat pediàtrica.

1.6.1 Classificació de les Malalties Mitocondrials

Les malalties mitocondrials poden presentar herència materna, mendeliana o una combinació de les dues. Fins i tot, podem trobar-nos amb casos esporàdics. A aquesta complexitat en el patró d'herència, s'ha de sumar l'heterogeneïtat de les manifestacions clíniques, morfològiques i bioquímiques. Per tant, la seva classificació es basa en les característiques moleculars i genètiques de les mutacions. Depenent del genoma mutat que origina la malaltia mitocondrial distingim: 1.4.1.1) Malalties mitocondrials degudes a mutacions en el mtDNA i 1.4.1.2) Malalties mitocondrials degudes a mutacions en gens nuclears.

1.6.1.1 Malalties mitocondrials degudes a mutacions en el mtDNA

Es poden dividir en dos grans grups: a) Malalties associades a mutacions puntuals, i b) Malalties degudes a reorganitzacions del mtDNA per insercions i/o delecions.

1.6.1.1.A Malalties associades a mutacions puntuals

Per considerar una mutació patogènica hi ha una sèrie de criteris que es consideren bàsics dins la genètica mitocondrial: 1.- S'ha de trobar en famílies afectades de poblacions ètniques diferents; 2.- Hi ha d'haver correlació entre el percentatge de la mutació i el fenotip; 3.- Ha de co-segregar juntament amb el fenotip; 4.- Ha d'afectar a una base molt conservada evolutivament.

Trobem les següents malalties:

- **Neuropatia Òptica Hereditària de Leber (LHON):** Es caracteritza per ceguesa bilateral aguda o subaguda, deguda a atrofia del nervi òptic, que es manifesta a la segona o tercera dècada de vida i és més prevalent en homes que en dones, fet que fa pensar en el paper modulador d'algun factor nuclear codificat en el cromosoma X (Vilkki i col., 1991). Normalment els pacients només tenen afectada la vista, però

poden haver-hi casos on també hi hagi afectació cardíaca, neuropatia perifèrica i ataxia cervel·letosa (DiMauro i Bonilla, 1997). Moltes són les mutacions que s'han associades a aquesta patologia (taula 1), però només tres són considerades primàries o patogèniques per si soles, les que afecten als nucleòtids 11778 (la més freqüent), 3460 i 14484. La resta de mutacions es consideren secundàries, es presenten sempre en forma homoplàsmica, i es desconeix la seva relació directa amb la malaltia. Totes aquestes mutacions afecten a gens estructurals.

- **Síndrome de Neuropatia, Ataxia i Retinitis Pigmentària (NARP):** Descrit per Holt i col·laboradors al 1990 (Holt i col., 1990), es tracta d'un síndrome multisistèmic, caracteritzat per debilitat muscular neurogènica, retràs en el desenvolupament, neuropatia sensorial, convulsions, atàxia, demència i retinopatia pigmentària. S'ha associat amb la transversió T a G i la transició T a C en el nucleòtid 8993 del gen de la subunitat 6 de l'ATPasa.

- **Síndrome de Leigh d'herència materna:** És una malaltia molt heterogènia amb trastorns degeneratius multisistèmics que apareixen en el primer any de vida. Es tracta d'una entitat devastadora que es caracteritza per disfuncions del tall cerebral i dels ganglis basals, desmielinització, regressió psicomotora, retràs en el desenvolupament, convulsions, ataxia i neuropatia perifèrica. L'origen d'aquest síndrome és la mutació T8993G, la mateixa que en NARP, però amb un percentatge de la mutació sempre superior al 90%. També hi ha casos de Leigh deguts a mutacions en gens nuclears (taula 2).

- **Síndrome de MELAS (Encefalopatia Mitocondrial amb Acidosis Làctica i Episodis d'Accidents Cerebrovasculars):** En el 90% dels casos s'ha associat a la transició A a G en el nucleòtid 3243 del gen tRNA^{Leu(UUR)} del mtDNA (Goto i col., 1990). Es caracteritza per accidents cerebrovasculars de repetició, que provoquen disfunció cerebral subaguda i canvis en l'estructura cerebral, acidosis làctica i/o RRFs. Aquestes característiques poden anar acompanyades també d'encefalopatia amb convulsions generalitzades, cefàlees, sordesa, demència i diabetis. Altres mutacions poden estar implicades en aquest síndrome (taula 1). En cultiu de cibrils transmitocondrials amb la mutació A3243G s'ha trobat disminució dels nivells de síntesi protèica mitocondrial i activitats reduïdes dels complexos I i IV de la cadena respiratòria (Chomyn i col., 1992; King i col., 1992). També provoca una reducció de l'aminoacilació del tRNA^{Leu(UUR)} del 70-75% (Chomyn i col., 2000).

La mutació A3243G també s'ha associada amb altres malalties mitocondrials (taula 1).

- **Síndrome de MERRF (Epilèpsia mioclònica amb fibres vermell-esquinçades):** Es caracteritza per epilèpsia mioclònica, ataxia cerebel·losa i miopatia. En alguns casos

pot anar acompanyat de demència, sordesa, atròfia òptica, neuropatia perifèrica, retinopatia i oftalmoparesis (DiMauro i Bonilla, 1997). Segueix un patró d'herència materna, i la mutació més freqüent és la transició A a G a la posició 8344 del tRNA^{Lys} (Shoffner i col., 1990). Altres mutacions, com la T8356C (Silvestri i col., 1992) i la G8363A (Ozawa i col., 1998), també localitzades en el tRNA^{Lys}, s'associen a aquest síndrome. La mutació A8344G sempre es presenta en forma heteroplàsmica i requereix un 95% dels genomes mutats per a manifestar la patologia. Estudis amb cíbrids han demostrat que la mutació causa una severa reducció dels nivells de proteïnes mitocondrials (Chomyn i col., 1991; Enriquez i col., 1995; Masucci i col., 1995). Aquesta reducció és deguda a un defecte en l'aminoacilació del tRNA^{Lys}, que origina una terminació prematura de la traducció (Enriquez i col., 1995). Aquesta mutació es troba també associada a altres fenotips clínics com són el síndrome de Leigh, miopatia, CPEO (Silvestri i col., 1993) i lipomatosi simètrica múltiple (MSL) (Holme i col., 1993).

- **Síndrome d'intolerància a l'exercici:** és una miopatia mitocondrial esporàdica en la qual la intolerància severa a l'exercici és la característica fonamental. Associat a aquest símptoma principal, alguns pacients poden presentar també mioglobinúria i acidosi làctica. Generalment la biòpsia muscular presenta RRFs. S'ha associada a mutacions restringides al múscul esquelètic, l'únic teixit afectat (Andreu i col., 1999a; Dumoulin i col., 1996; Keightley i col., 2000; Andreu i col., 1999b; Andreu i col., 1998). Andreu i col·laboradors suggeriren que dites mutacions podien tenir un origen somàtic, generant-se a les primeres fases del desenvolupament embrionari (Andreu i col., 1999a).

Taula 1: Mutacions puntuals en el mtDNA i malalties associades

Malaltia	Mutació	Gen	Referència
LHON			
Mutacions primàries	G3460A	ND1	Houponen i col., 1991
	G11778A	ND4	Wallace i col., 1988
	T14484C	ND6	Johns i col., 1992
Mutacions Intermitges	G5244A	ND2	Brown i col., 1992
	G15257A	Cyt b	Brown i col., 1992
Mutacions Secundàries	T3394C	ND1	Johns i col., 1992
	T4160C	ND1	Howell i col., 1991
	T4216C	ND1	Johns i Berman, 1991
	A4917G	ND2	Johns i Berman, 1991
	G7444A	COXI	Brown i col., 1992
	G9438A	COXIII	Johns i Neufeld, 1993
	G9804A	COXIII	Johns i Neufeld, 1993
	G13708A	ND5	Johns i Berman, 1991
	G13730A	ND5	Johns i Berman, 1991
	G15812A	Cyt b	Brown i col., 1992
	LHON i Distonia	G14459A	ND6
NARP	T8993G	ATPasa 6	Holt i col., 1990
Síndrome de Leigh (MILS)	T8993G	ATPasa 6	Santorelli i col., 1993
	T8993C	ATPasa 6	Chakrapani i col., 1998

Necrosi bilateral de l'estriat	T9176C	ATPasa 6	Thyagarajan i col., 1995	
	T8851C	ATPasa 6	Demeirleir i col., 1995	
LIMM	A15923G	tRNA ^{Thr}	Yoon i col., 1991	
MELAS	A3243G	tRNA ^{Leu(UUR)}	Goto i col., 1990	
	C3256T	tRNA ^{Leu(UUR)}	Sato i col., 1994	
	T3271C	tRNA ^{Leu(UUR)}	Goto i col., 1991	
	T3291C	tRNA ^{Leu(UUR)}	Goto i col., 1994	
	T9957C	COXIII	Manfredi col., 1995	
Miopatia mitocondrial	T3250C	tRNA ^{Leu(UUR)}	Goto i col., 1992	
	A3302G	tRNA ^{Leu(UUR)}	Bindoff i col., 1993	
	C15990T	tRNA ^{Pro}	Moraes i col., 1993	
MERRF	A8344G	tRNA ^{Lys}	Shoffner i col., 1990	
	T8356C	tRNA ^{Lys}	Silvestri i col., 1992	
	G8356A	tRNA ^{Lys}	Ozawa i col., 1997	
Lipomatosi múltiple	A8344G	tRNA ^{Lys}	Gámez i col., 1998	
Anèmia sideroblàstica	G12301A	tRNA ^{Leu(CUN)}	Gatterman i col., 1996	
Cardiomiopatia	A3260G	tRNA ^{Leu(UUR)}	Zeviani i col., 1991	
	C3303T	tRNA ^{Leu(UUR)}	Silvestri i col., 1992	
	A4269G	tRNA ^{Ile}	Taniike i col., 1992	
	A4300G	tRNA ^{Ile}	Casali i col., 1995	
	A4317G	tRNA ^{Ile}	Tanaka i col., 1990	
	C4320T	tRNA ^{Ile}	Santorelli i col., 1995	
	G8363A	tRNA ^{Lys}	Santorelli i col., 1996	
	T9997C	tRNA ^{Gly}	Merante i col., 1994	
	Diabetes + Miopatia	T14709	tRNA ^{Glu}	Hao i col., 1995
	Diabetes + Sordesa	A3243G	tRNA ^{Leu(UUR)}	Van den Ouweland I col., 1992
Sordesa neurosensorial	T7445C	tRNA ^{Ser(UCN)}	Reid i col., 1994	
	T7510C	tRNA ^{Ser(UCN)}	Hutchin i col., 2000	
	T7511C	tRNA ^{Ser(UCN)}	Sue i col., 1999	
	Sordesa induïda per aminoglucòsids	A1555G	12S rRNA	Prezant i col., 1993
	T1095C	12S rRNA	Thyagarajan i col., 2000	
Kearns-Sayre	G3249A	tRNA ^{Leu(UUR)}	Seneca i col., 2001	
CPEO	A3243G	tRNA ^{Leu(UUR)}	Hammans i col., 1995	
	C3256T	tRNA ^{Leu(UUR)}	Moraes i col., 1993	
	A5692G	tRNA ^{Asn}	Seibel i col., 1994	
	G5703A	tRNA ^{Asn}	Moraes i col., 1993	
	Mort subtada	A3251G	tRNA ^{Leu(UUR)}	Sweeney i col., 1993
	Multisistèmiques	A3251G	tRNA ^{Leu(UUR)}	Sweeney i col., 1993
A3252G		tRNA ^{Leu(UUR)}	Morten i col., 1993	
C3256T		tRNA ^{Leu(UUR)}	Moraes i col., 1993	
Intolerància a l'exercici		G15084A	Cyt b	Andreu i col., 1999
	G15168A	Cyt b	Andreu i col., 1999	
	G15723A	Cyt b	Andreu i col., 1999	
	G14846A	Cyt b	Andreu i col., 1999	
	G15615A	Cyt b	Dumoulin i col., 1996	
	G15242A	Cyt b	Keightley i col., 2000	
	G11832A	ND4	Andreu i col., 1999	
	G12334A	tRNA ^{Leu(CUN)}	Vives-Bauza i col., 2001	
	Corea i demència	G5549A	tRNA ^{TP}	Yoon i col., 1991

LHON: Neuropatia Òptica Hereditària de Leber; ND: subunitats de la NADH deshidrogenasa; COX: Subunitats de la citocrom C oxidasa; NARP: Síndrome de Neuropatia, ataxia i retinitis pigmentosa; MELAS: Encefalomiopatia mitocondrial amb acidosi làctica i episodis d'accidents cerebrovasculars; MERRF: Epilèpsia mioclònica amb fibres vermell-esquinçades; CPEO: Oftalmoplegia crònica externa progressiva; LIMM: Miopatia mitocondrial infantil letal

1.6.1.1.B Malalties associades a reorganitzacions del mtDNA: Al contrari del que succeeix amb les mutacions puntuals, les deleccions i/o les insercions solen ser espontànies, tot i que també s'han publicat alguns casos d'herència materna. S'han descrit varis centenars de reorganitzacions del mtDNA. Es presenten en forma

heteroplàsmica i poden augmentar la gravetat amb l'edat. Alguns dels síndromes clínics descrits són els següents:

- **Síndrome d'Oftalmoplegia Crònica Externa Progressiva (CPEO):** Es caracteritza per oftalmoplegia, ptosi bilateral de parpelles i miopatia. Sol anar acompanyat de intolerància a l'exercici i debilitat muscular. La biòpsia muscular sol presentar RRFs i fibres COX negatives. En general és una malaltia benigna que acostuma a aparèixer a l'adolescència o en adults joves, i s'inicia de manera esporàdica, sense història familiar. S'ha associada fonamentalment a deleccions grans i úniques en el mtDNA. Però també s'han trobades altres formes d'aquest síndrome associades a mutacions puntuals d'herència materna (taula 1) o amb deleccions múltiples d'herència autosòmica dominant.

- **Síndrome de Kearns-Sayre:** Malaltia progressiva multisistèmica que apareix abans dels 20 anys, i es caracteritza per oftalmoplegia externa progressiva i retinopatia pigmentària. A més a més, sol anar acompanyada d'ataxia, miopatia mitocondrial, bloqueig de la conducció cardíaca, nivells de proteïna CFS (fluid cerebrovascular) superior a 100 mg/dl, sordesa i demència, així com fallides renals i endocrines. Biòpsia muscular amb RRFs que no es tenyeixen per l'activitat COX. Els pacients rarament superen els 40 anys de vida. La malaltia es relaciona amb deleccions grans en el mtDNA d'origen esporàdic.

- **Síndrome de Pearson:** El síndrome de medul·la òssia-pàncrees de Pearson és una malaltia dels primers anys de vida que afecta a la hematopoiesi i a la funció pancreàtica exocrina. Les característiques clíniques més comuns solen ser anèmia sideroblàstica amb vacuolització de precursors de la medul·la òssia, associada a disfunció pancreàtica exocrina. A més a més, acostumen a desenvolupar fallida hepàtica progressiva, atròfia de les vellositats intestinals, diabetis mellitus i disfunció tubular renal (Leonard, 2000). Els nens afectats desenvolupen més tard un fenotip Kearns-Sayre. Aquests pacients presenten deleccions grans úniques, que en general són esporàdiques, tot i que s'ha descrit algun cas d'herència materna.

- **Duplicacions en el mtDNA:** Poden ser esporàdiques o d'herència materna (DiMauro i col., 1998). La majoria dels fenotips que originen no es diferencien dels que provoquen les deleccions. S'han trobat duplicacions amb pacients amb síndrome de Kearns-Sayre, de Pearson, en Diabetis mellitus, tubulopatia renal i miopatia mitocondrial (Poulton i col., 1989). També s'han trobat duplicacions i fins i tot triplicacions en individus normals, però sempre en baixa proporció (Kajander i col., 2000).

1.6.1.2 Malalties mitocondrials degudes a mutacions en gens nuclears:

Presenten patrons d'herència mendeliana, però comparteixen moltes característiques clíniques amb les malalties mitocondrials degudes a mutacions en el mtDNA, fins al punt que alguns síndromes que hem vist associats a mutacions en el mtDNA també poden ser deguts a aquestes mutacions nuclears. En els darrers anys s'han trobat nombrosos gens nuclears implicats en malalties mitocondrials (taula 2), i cal esperar que en els propers anys n'apareixin molts més.

Taula 2: Malalties mitocondrials degudes a mutacions en gens nuclears

GEN	FENOTIP	REFERÈNCIA
I. Mutacions en gens codificants de proteïnes de la via OXPHOS		
I.1 Proteïnes del Complex I		
NDUFV1	Leigh+Epilèpsia+Leucodistrofia	Benit i col., 2001
NDUFV2	Cardiomiopatia+Encefalopatia	Loeffen i col., 2001
NDUFV4	Síndrome de Leigh	Petruzzella i col., 2001
NDUFV7	Síndrome de Leigh	Triepels i col., 1999
NDUFV8	Síndrome de Leigh	Loeffen i col., 1998
AQDQ	Leigh-semblant	VandenHeuvel i col., 1998
I.2 Proteïnes del Complex II		
SDHA (Fp)	Síndrome de Leigh	Bourgeron i col., 1995
SDHC	Paranglioma hereditari	Niemann i col., 2000
SDHD	Paranglioma hereditari	Baysal i col., 2000
II. Mutacions en gens implicats en la comunicació intergenòmica		
II.1.- Deleccions múltiples en el mtDNA:		
II.1.1 Esporàdiques		
ANT1	CPEO	Kaukonen i col., 2000
Twinkle	CPEO	Spelbrink i col., 2001
II.1.2 Autosòmiques Recessives		
TP	MNGIE	Nishino i col., 1999
Poly	CPEO	Van Goethem, 2001
WFS1	Malaltia de Wolfram	Strom i col., 1998
II.3.- Deplecció del mtDNA		
TK-2	Miopatia infantil fatal	Saada i col., 2001
DGUK	I. Hepàtica+encefalopatia	Mandel i col., 2001
III. Mutacions implicades en l'ensamblatge de les subunitats OXPHOS		
SURF1	Síndrome de Leigh+leucodistrofia	Zhu i col., 1998
SCO2	Encefalocardiomiopatia	Papadopoulou i col., 1999
COX10	Leucodistrofia+tubulopatia	Valnot i col., 2000a
SCO1	Encefalopatia+hepatopatia	Valnot i col., 2000b
BCS1L	Encefalopatia+hepatopatia	De Lonlay i col., 2001
IV. Mutacions en gens implicats en l'homeòstasi i la importació		
FRDA	Ataxia de Friedreich	Priller i col., 1997
SPG7	Paraplègia espàstica familiar	Casari i col., 1998
DPP1	Síndrome de Mohr-Tranebjaerg	Roesch i col., 2002
ATP7B	Síndrome de Wilson	Lutsenko i col., 1998

TP: Timidin fosforilasa; WFS1: Wolframina; TK-2: Timidin kinasa 2; DGUK: deoguanosina quinasa; FRDA: Gen de la frataxina; SPG7: Gen de la paraplegina; DPP1: diacilglicerol pirofosfat fosfatasa

1.7 Models Cel·lulars d'Estudi de les Malalties Mitocondrials

Les investigacions dels desordres associats a mutacions en el mtDNA s'han retrassat degut a les dificultats de treballar amb material derivat de pacients. La majoria de les mutacions són heteroplàsmiques en els teixits disponibles, i algunes

d'aquestes poden no expressar el fenotip de la malaltia. Més encara, les cèl·lules obtingudes de pacients (fibroblastes o mioblastes), normalment ofereixen pobres característiques de creixement i fins i tot poden perdre la mutació d'interès. Quan s'analitzen els efectes de mutacions en el mtDNA, la validació dels resultats al comparar-los amb teixits controls de diferents individus es veu dificultada per la influència de gens nuclears.

El sistema dels híbrids mitocondrials permet superar la majoria dels problemes anteriorment comentats. És possible repopular cèl·lules humanes depleccionades de mtDNA (cèl·lules ρ^0) amb mtDNA exogen obtingut de cèl·lules de pacients enucleades (King i Attardi, 1989). Gràcies a que aporten un transoms nuclear idèntic, la utilització dels híbrids ha permès caracteritzar els efectes bioquímics i moleculars d'un ampli nombre de mutacions patogèniques en el mtDNA.

1.8 Espècies Reactives d'Oxigen (ROS)

En les reaccions de transferència d'electrons, com ara les de la via OXPHOS, es poden formar metabòlits d' O_2 parcialment reduïts i altament reactius. Són coneguts com a "espècies reactives d'oxigen" (ROS) degut a la seva elevada capacitat reactiva en comparació amb l' O_2 .

ROS s'han classificat generalment com a radicals lliures, però això és incorrecte ja que no tots els ROS són radicals lliures. Un radical lliure és definit com a qualsevol espècie molecular o atòmica que conté un o més electrons desaparellats en un dels seus orbitals moleculars (Halliwell, 1989). L' O_2 molecular es pot considerar un radical lliure perquè té dos electrons desaparellats amb spin paral·lel en els diferents orbitals π -lliures, fet que li permet tenir una certa estabilitat i propietats paramagnètiques. L' O_2 és capaç d'acceptar electrons cap als seus orbitals lliures, començant el procés com a "reduït", per a funcionar després com a un potent agent oxidant. La reducció del O_2 amb un electró resulta en la generació de l'anió superòxid (O_2^-), ja sigui mitjançant catàlisi enzimàtica, o bé alliberació d'un electró per diverses reaccions de transferència d'electrons. En solvents orgànics el O_2^- és molt estable, en canvi quan està en solució aquosa té una vida mitja molt curta. Aquesta inestabilitat és deguda a que ràpidament és dismutat a peròxid d'hidrogen (H_2O_2), reacció facilitada en condicions de pH més acidificants, perquè en el medi aquós hi ha elevades concentracions de la forma protonada del O_2^- , l'hidroperòxid ($HO_2\cdot$). Tot i que la dismutació del O_2^- és la font principal de producció de H_2O_2 en les cèl·lules eucariotes, cal dir que el H_2O_2 també es pot formar per la reducció directa del O_2 en acceptar dos electrons, mecanisme de reducció compartit per diverses flavoproteïnes oxidases (Massey, 1994). El H_2O_2 no és un radical lliure, és una molècula molt més estable que

el $O_2^{\cdot-}$, i al contrari que aquest, és capaç de difondre lliurement a través de les membranes biològiques. El H_2O_2 és un agent oxidant menys potent que el $O_2^{\cdot-}$. Però en presència de metalls de transició, com són el coure o el ferro, el H_2O_2 pot donar lloc a un radical lliure altament reactiu i tòxic, el radical hidroxil ($OH\cdot$), mitjançant la reacció de Fenton (Halliwell i Gutteridge, 1992).

ROS produïts a la mitocòndria i d'altres fonts cel·lulars s'han considerat tradicionalment com a productes tòxics del metabolisme amb potencial per a generar dany sobre lípids, proteïnes i DNA (Freeman i Crapo, 1982). Però estudis recents suggereixen que les ROS no només tenen un paper perjudicial per al metabolisme cel·lular, sino que també són essencials en processos de senyalització intracel·lular i regulació (Finkel, 1998; Rhee, 1999).

1.8.1 Fonts de Generació de ROS

Una de les fonts més importants de generació de ROS és la cadena respiratòria. El potencial de reducció estàndard per la conversió de l'oxigen molecular a $O_2^{\cdot-}$ és de -0.160 V (Wood, 1987). La cadena respiratòria inclou tota una sèrie de centres redox amb potencials de reducció estàndards entre -0.32 V (NAD(P)H) fins a $+0.39$ V (citocrom a_3 al complex IV). Degut a l'ambient altament reductor que hi ha dins la mitocòndria, varis components respiratoris, incluint flavoproteïnes, grups ferro-sofre i la ubisemiquinona, són termodinàmicament capaços de transferir un electró a l'oxigen. Més encara, la majoria de reaccions de la via OXPHOS són transferències d'un únic electró, fet que afavoreix la reducció monovalent de l'oxigen.

La primera evidència de producció de ROS per la mitocòndria data de 1973, quan Boveris i Chance reportaren que l'addició d'oxigen a la mitocòndria anaeròbica provocava una transitòria reducció del citocrom b, enlloc de l'esperada oxidació. A aquest fenomen l'anomenaren "reducció del citocrom b induïda per oxidants". Tal i com s'explica en detall a l'apartat 1.5.3, el coenzim Q és totalment reduït a la part interna de la membrana mitocondrial (ubiquinol, QH_2) i després migra cap a la cara externa de la membrana interna portant $2H^+$, que entren a formar part del "pool" necessari per a mantenir la fosforilació de l'ADP. Mentrestant, a la cara externa de la membrana un electró és transferit al citocrom c_1 (via la proteïna de Rieske), resultant en la formació de la ubisemiquinona ($Q\cdot$). El segon electró és necessari per a reduir el citocrom b, però eventualment algun electró pot escapar cap a l'oxigen i generar $O_2^{\cdot-}$. Sota condicions normals es necessita un oxidant per la reducció del citocrom b, a no ser que un electró sigui transferit a l'oxigen. L'inhibidor antimicina A s'uneix al citocrom b, provocant un augment en els nivells de $Q\cdot$, i subseqüentment incrementant també la formació de $O_2^{\cdot-}$ (Boveris i Chance, 1973) (figura 13). Altres inhibidors com són el

NoHOQnO (Van Ark i Berden, 1977) o funiculosin (Nelson i col., 1977) poden produir el mateix efecte. En canvi, el mixotiazol (mitjançant inhibició de la proteïna de Rieske Fe-S), la cianida i la deplecció del citocrom C (prevenint que els electrons arribin a l'oxigen) són capaços d'inhibir la sobre-producció observada d'anió superòxid en presència d'antimicina A (Turrens i col., 1985). Degut a que la inhibició per mixotiazol no és completa, es va suggerir que hi podien haver llocs addicionals de producció de ROS al complex III (Starkov i Fiskum, 2001; Young i col., 2002).

A valors elevats de potencial de membrana mitocondrial interna (entorn a 200 mV) també es bloqueja el citocrom b, produïnt-se el mateix efecte que l'observat per l'antimicina A (Cadenas i Boveris, 1980).

El complex III sembla ser responsable de la majoria del $O_2^{\cdot-}$ produït en les mitocòndries del cor i dels pulmons (Turrens i Boveris, 1980; Turrens i col., 1982; Chen i col., 2003). En canvi, sota condicions normals, sembla que la font de producció majoritària de ROS en les mitocòndries del cervell és el complex I (Barja i Herrero, 1998; Barja 1999).

Així doncs, la segona font de producció de ROS a la mitocòndria s'ha atribuïda al complex I (Turrens i Boveris, 1980). Diferents grups observaren que en presència de substrats que uneixen NAD^+ , la generació de ROS era molt petita, però incrementava molt en activar la respiració via el succinat. Dit augment era degut a un flux invers d'electrons del succinat cap al NAD^+ , aportant equivalents de reducció a un transportador redox del complex I que serveix de lloc de producció de ROS (Cino i Del Maestro, 1989; Kwong i Sohal, 1998). El procés era inhibit per la rotenona, que boquejava el flux d'electrons entre la ubiquinona i el centre Fe-S de N-2 (Turrens i Boveris, 1980; Hansford i col., 1997; Liu i col., 2002). Un estudi recent, depleccionant les mitocòndries de citocrom C, ha demostrat que la producció de ROS al complex I està acoplada a l'alliberació del citocrom C i a la reducció del $NAD(P)^+$ a nivells quasi màxims (Kushnareva i col., 2002).

El lloc de producció de ROS (*ROS) en el complex I encara no està molt clar. Moltes evidències apunten a que deu estar situat molt a prop del lloc de unió de la rotenona. Liu i col·laboradors, emprant difenileneiodum, un agent modificador de flavins amb certa especificitat pel FMN del complex I, han demostrat inhibició de la producció de ROS mediada per rotenona, suggerint que *ROS ha d'estar localitzat o al flavin, o bé a 3' d'aquest (Liu i col., 2002). La producció de ROS en el lloc proximal a la unió de la rotenona és completament inhibida pel p-cloromercuriobenzolat (Genova i col., 2001), un reactiu tiol que bloqueja els centres Fe-S del complex I, suggerint que el *ROS deu ser un acceptor d'un sol electró altament negatiu, probablement un centre Fe-S lligat al flavín.

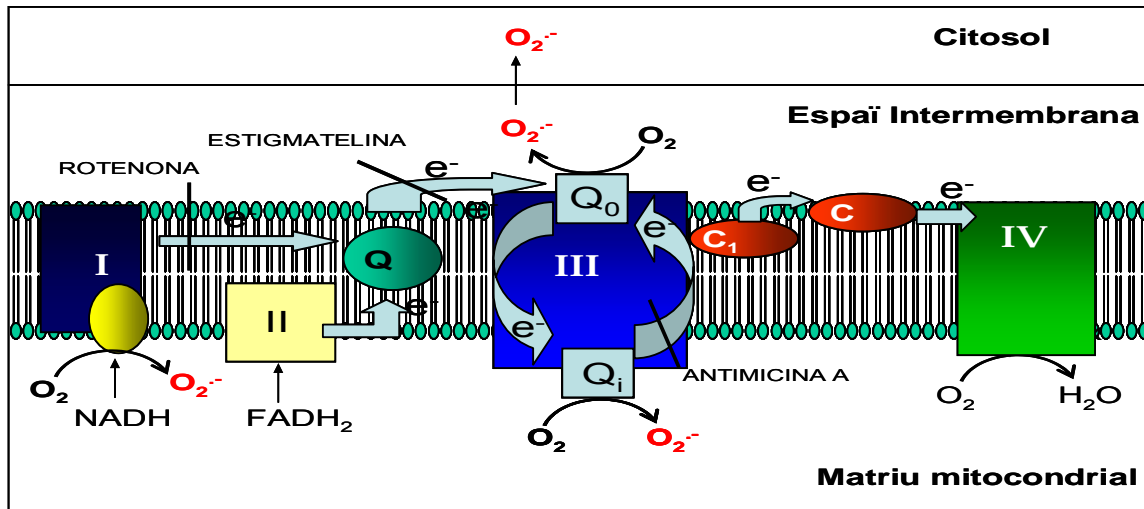


Fig.13: Fonts de generació de ROS a la mitocondria. El complex I i el lloc Q_i del complex III alliberen el O_2^- produït directament a la matriu. En canvi, el lloc Q_0 l'allibera a l'espai intermembrana, d'on pot ser exportat al citosol via canals voltatge-dependents (Han i col., 2003). Amb una línia vertical s'indiquen els llocs d'inhibició de l'antimicina A, la rotenona i l'estigmatelina. Modificat de Chen i col., 2003.

En general, només un 2-6% de l'oxigen consumit és parcialment reduït a O_2^- (Chance i col., 1979; Lippman, 1981), i el rendiment diari de producció de O_2^- pot arribar a 3×10^7 molècules per mitocondria (Ribier i col., 1994). Sota condicions fisiològiques normals, el O_2^- produït a la mitocondria pot ser metabolitzat per l'enzim superòxid dismutasa Mn^{2+} (Mn-SOD) i altres enzims scavenger, convertint-lo a peròxid d'hidrogen (H_2O_2), fet que manté els nivells de O_2^- i de H_2O_2 a una concentració constant de $10^{-10}M$ i $5 \times 10^{-9}M$, respectivament (Cadenas i Davies, 2000).

Cal afegir que en l'estadi 4 de la respiració, o sigui en absència d'ADP, el moviment de H^+ cap a l'ATP sintetasa s'atura i el gradient de H^+ es concentra provocant que el fluxe d'electrons minvi i la cadena respiratòria torni més reduïda. Com a conseqüència, els nivells fisiològics de O_2^- augmenten.

Hi ha altres fonts de producció de ROS a les cèl·lules eucariotes. El reticle endoplasmàtic conté enzims que catalitzen una sèrie de reaccions per detoxificar drogues lípid solubles i altres productes nocius del metabolisme. Els més estudiats d'aquests enzims són el citocrom P-450 i la família b_5 , que poden oxidar àcids grassos no saturats i xenobiòtics i reduir l' O_2 molecular, formant O_2^- i H_2O_2 (Aust i col., 1972; Capdevila i col., 1981; Freeman i Crapo, 1982).

Els peroxisomes són una font important de producció cel·lular total de H_2O_2 (Boveris i col., 1972). Contenen una sèrie d'enzims generadors de H_2O_2 com són el glicolat oxidasa, el D-amino acid oxidasa, l'urat oxidasa, l'L- α -hidroxiàcid oxidasa i l'acil-CoA oxidasa. Però només una ínfima fracció del H_2O_2 produït als peroxisomes escapa de l'acció de la catalasa peroxisomal (Boveris, 1977).

Hi ha altres oxidases intracel·lulars membrana-associades capaces de generar ROS durant els seus cicles catalítics, com són la xantina oxidasa, l'aldehid oxidasa, la dihidroorotat dehidrogenasa, la flavoproteïna dehidrogenasa i el triptofen dioxigenasa.

L'autooxidació de petites molècules com són la dopamina, l'epinefrina, flavins i hidroquinones poden ser una important font intracel·lular de producció de ROS (Freeman i Crapo, 1982).

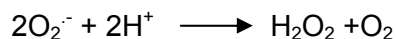
Una altra font important de producció de ROS són les oxidases plasmàtiques associades a membrana. La més ben caracteritzada és la NADPH oxidasa, que té una funció específica en la defensa de l'organisme contra infeccions per microorganismes (Segal i Shatwell, 1997; Babior, 1999).

1.9 Enzims Antioxidants

Els sistemes de defensa antioxidant són essencials per a detoxificar ROS a les cèl·lules aeròbiques. La definició clàssica d'antioxidant és aquella substància que es presenta a baixa concentració, comparant-la amb els substrats oxidables, i que és capaç de prevenir o minvar significativament l'oxidació de dits substrats (Halliwell i Gutteridge, 1992). Els enzims antioxidants més importants són els superòxids dismutases, la catalasa i els glutatons peroxidases (Fridovich i Freeman, 1986).

1.9.1 Superòxid dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1)

És el primer enzim que actua en la defensa de l'organisme davant la producció d'espècies reactives d'oxigen. Catalitza la reacció de dismutació de l'anió superòxid a oxigen molecular i peròxid d'hidrogen:



Una altra funció de la SOD és protegir les dehidratases (àcid dihidroxidehidratasa, aconitasa 6-fosfogluconat dehidratasa i fumarasa de la seva inactivació per l'anió superòxid (Benov i Fridovich, 1998).

En humans hi ha tres formes de SOD: La citosòlica SOD-CuZn (SOD1), la mitocondrial Mn-SOD (SOD2), i l'extracel·lular (EC-SOD) que també és SOD-CuZn (SOD3).

1.9.1.1 SOD1 o SOD-CuZn

Localitzada en espais citoplasmàtics intracel·lulars (citoplasma, compartiments nuclears i lisosomes) (Keller i col., 1991; Crapo i col., 1992; Liou i col., 1993), tot i que estudis recents també l'han localitzada a la mitocondria, concretament a l'espai intermembrana (Takeuchi i col., 2002; Ilieva i col., 2002; Higgins i col., 2002).

És un homodímer de 32 kDa. Cada monòmer consta de 151 aminoàcids plegats en vuit “ β -barrels”, connectats entre si per bucles externs (figura 13a). El centre actiu de la SOD1 bovina consisteix en un ió coure (Cu^{2+} oxidat) i un zinc (Zn) units per un anell imidazol de His61 (Banci i col., 1998). El Cu està coordinat per tres lligams histidina i una molècula d'aigua, mentre que el Zn està lligat a dues histidines addicionals i un àcid aspàrtic (figura 13b).

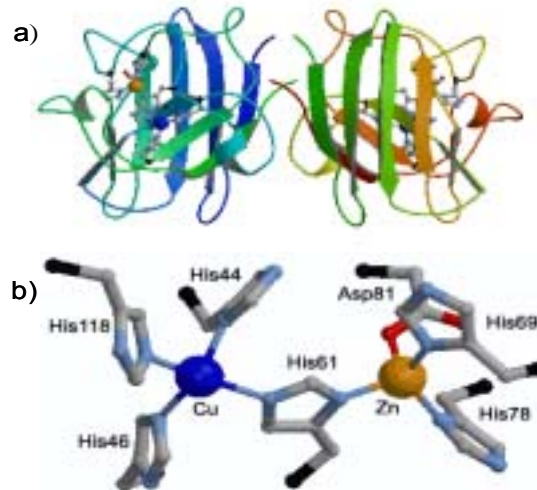


Fig. 13: a) Esquema de l'estructura homodimèrica de la SOD1. b) Detall esquemàtic del centre actiu del enzim. (Modificat de <http://srs.dl.ac.uk/mbg/sod.html>).

El mecanisme d'activació de l'enzim està regulat pel seu producte. SOD-CuZn és actiu quan el Cu està oxidat a Cu^{2+} . La seva inactivació pel H_2O_2 és la conseqüència de varies reaccions: primer, el lloc actiu Cu^{2+} és oxidat a Cu^{1+} pel H_2O_2 ; llavors es produeix l'oxidació del Cu^{1+} per una altra molècula de H_2O_2 , generant-se un oxidant molt potent, que deu ser Cu^{1+}O , Cu^{2+}OH o Cu^{3+} ; i finalment es produeix l'oxidació de la His61, causant la pèrdua de l'activitat SOD (Liochev i Fridovich, 1998).

El gen que codifica per SOD1 s'ha localitzat en el cromosoma 21 en humans (21q22) (Levanon i col., 1985), fet que va suggerir que podria tenir relació amb la síndrome de Down, però aquests pacients presenten un 50% d'augment d'activitat SOD degut a que tenen més proteïna. Aquest augment de dosi s'ha associat a alguns símptomes com anormalitats patològiques de les unions neuromusculars amb la llengua (Avraham i col., 1988), però no té cap implicació amb els símptomes més importants (De la Torre i col., 1996). En canvi, s'han trobat més de 90 mutacions en SOD1 responsables del 15-20% dels casos d'esclerosi lateral amiotròfica familiar (FALS) (<http://www.alsod.org>).

L'expressió de SOD1 citosòlica és estable i la seva activitat ha estat normalment considerada com un control intern de l'expressió del seu gen. Tot i que la seva expressió és constitutiva, els nivells de mRNA de SOD1 poden variar dramàticament en resposta a diferents condicions fisiològiques. S'han vist augmentats després d'exposició a peròxid d'hidrogen (Yoo i col., 1999a), xoc tèrmic (Hass i Massaro, 1988), estrés (Inoue i col., 1996), llum ultraviolada i radiació X (Isoherranen i col., 1997; Leccia i col., 2001; Yamaoka i col., 1994), metalls pesats (Yoo i col., 1999b), i varis missatgers químics com per exemple el t-butil-hidroquinona, el β -naptoflavon o

la iodeacetamida (Yoo i col., 1999c). Anàlisi de la regió proximal del promotor va demostrar l'existència de llocs de unió Sp1/Egr-1/WT-1, involucrats en expressió basal i induïda per TPA de SOD1 (Minc i col., 1999). Els nivells de mRNA de SOD1 s'han trobat disminuïts en cèl·lules epitelials i en fibroblastes després de ser sotmeses a hipòxia (Jackson i col., 1996). La droga anticancerígena mitomicina C també reprimeix la transcripció del gen de la SOD1 en cèl·lules d'hepatoma humà (Cho i col., 1997).

1.9.1.2 SOD2 o SOD-Mn

Localitzada a la mitocòndria de les cèl·lules anaeròbies. Proteïna codificada per un gen nuclear localitzat a 6q25 (Church i col., 1992), que se sintetitza en el citoplasma i gràcies a un pèptid senyal és direccionalitzada cap a la mitocòndria (Weisiger i Fridovich, 1973).

S'ha identificada l'estructura cristal·lina humana (Borgstahl i col., 1992). És un homotetràmer de 96 kDa (figura 14a). El monòmer (23 kDa) consta de dos dominis. El domini N-terminal es compon dels residus 1-84 i està format primàriament per dues cadenes d'hèlix α antiparal·leles separades per una mitja volta d'hèlix, formant una espècie d'estructura helical amb forma de forqueta, que és essencial per al plegament i la formació del tetràmer. El domini C-terminal (residus 85-198) conté una làmina β central formada per tres cadenes anti-paral·leles, rodejades de 7 hèlixs- α . En el lloc actiu de cada subunitat, situat entre els dos dominis, hi ha un àtom de manganés lligat pels residus His-26 de α_1 i la His-74 de α_2 de N-terminal, i l'Asp-159 de β_3 i la His-163 de la regió H (residus 161-167) del domini C-terminal, i una molècula d'aigua (figura 14). El tetràmer es forma per associació de les forquetes helicals dels dominis N-terminals, generant-se una estructura compacta.

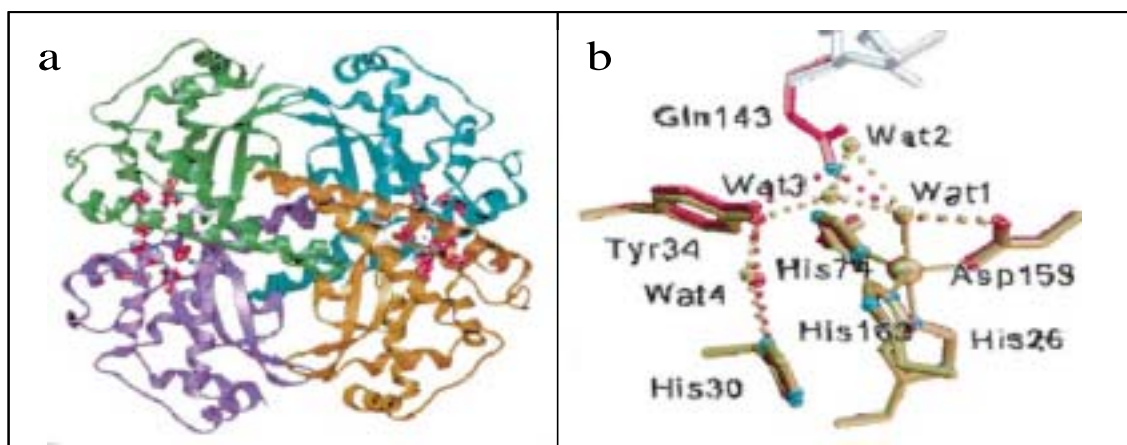
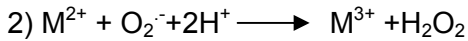
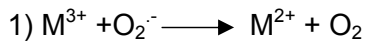


Fig.14: Estructura cristal·lina de la SOD2 humana. A) Tetràmer amb cada subunitat pintada amb un color diferent. El lloc actiu, amb l'àtom de manganés es mostra en color fúcsia. B) Detall estructural del lloc actiu, envoltat dels residus asparragina (Asp) i histidina (His), igual que les molècules d'aigua (Wat). (Modificat de Leveque i col., 2000).

El mecanisme d'acció és comú per totes les SOD. L'ió metàl·lic (M) catalitza la reacció de dismutació de l'anió superòxid gràcies a un mecanisme cíclic d'oxidació-reducció:



En el cas de la SOD-Mn, l'àtom Mn de cada subunitat va canviant de Mn^{3+} a Mn^{2+} , i torna a Mn^{3+} durant les dues etapes del procés de dismutació del O_2^- .

SOD2 s'expressa en la majoria de tipus cel·lulars i teixits amb elevats nivells. Tot i així, la seva expressió és altament regulada per un ampli ventall de senyals intracel·lulars i ambientals. La caracterització de la regió flanquejant 5' del gen SOD2 ha desvetllat que el promotor no conté ni seqüència TATA ni seqüència CAAT, però té zones riques en GC immediatament a 5' del lloc d'inici de la transcripció (Wan i col., 1994; Zhang, 1996; Yeh i col., 1998). Anàlisis computacionals i assajos de footprinting han trobat un nombre putatiu de llocs de unió pels factors de transcripció Sp1 i AP2, en el promotor proximal del gen SOD2 humà. Les dues proteïnes tenen efectes oposats en l'expressió de SOD2: mentres Sp1 promou la transcripció, la proteïna AP2 significativament reprimeix l'activitat del promotor (Zhu i col., 2001).

Un ampli ventall de components indueixen la transcripció de SOD2. Citoquines com les interleukines (IL)-1 (Masuda i col., 1988; Visner i col., 1992), IL-4 i IL-6 (Dougall i col., 1991), el TNF- α (Visner i col., 1992; Wong i Goeddel, 1988), el lipopolisacàrid (LPS) (Visner i col., 1990) i el IFN- γ (Harris i col., 1991) són potents activadors de SOD2 en diferents teixits i tipus cel·lulars. S'ha caracteritzat el cebador induïble per citoquines en el gen SOD2 humà (Rogers i col., 2000). Conté llocs de unió pels factors de creixement NF-kB, C/EBP i NF-1.

L'expressió de SOD2 no només és regulada a nivell de la transcripció, també a nivell de la translació, per proteïnes de unió a RNA. A la regió 3' no traduïda del seu mRNA, s'hi uneix una proteïna específica que augmenta l'eficiència de la traducció (Chung i col., 1998). Encara no es coneix la identitat d'aquesta proteïna de unió, però s'ha vist que és regulada per una tirosina quinasa. La seva forma activa és la defosforilada (Knirsch i col., 2001).

1.9.1.3 SOD3 o SOD-EC

El gen que codifica per SOD3 en humans es localitza a la regió 4p-q21 (Hendrickson i col., 1990). SOD extracel·lular és una proteïna de secreció tetramèrica amb un grup core-zinc, que conté una glicoproteïna que presenta elevada afinitat per certs glicosaminglicans com són l'heparina i l'heparan sulfat (Adachi i col., 1998). És un homotetràmer de 135 kDa que es localitza en els espais intersticials dels teixits i

també en fluids intracel·lulars, essent la responsable de la major activitat SOD en plasma, limfa, i fluid sinovial (Marklund i col., 1982; Marklund i col., 1986). EC-SOD no és induïble pel seu substrat o altres oxidants, i la seva regulació en mamífers es deu a una coordinació entre citoquines, enlloc d'una resposta individual de les cèl·lules als oxidants (Buschfort i col., 1997). EC-SOD controla la disponibilitat d'anió superòxid extracel·lular, la qual cosa és molt important per a la regulació d'un ampli ventall de vies metabòliques, incluint la via de inactivació de l'àcid nítric (Levin i col., 1998).

1.9.2 Catalasa (E.C 1.11.1.6)

La catalasa és un enzim peroxisomal present en quasi tots els organismes aeròbics, i que té la funció de protegir la cèl·lula dels efectes tòxics dels peròxids d'hidrogen, catalitzant la descomposició de dues molècules d' H_2O_2 en dues molècules d'aigua i una d'oxigen (Von Ossowski i col., 1993). També reacciona amb donadors de grups H, com són el metanol, l'etanol, l'àcid fòrmic, el fenol, etc. És l'enzim més eficient que es coneix, fins al punt que no se satura per H_2O_2 a cap concentració (Lledías i col., 1998).

És un hemo-enzim tetramèric format per quatre monòmers idèntics de 60 kDa. L'estructura cristal·lina de la catalasa de fetge boví (Murthy i col., 1981) revela que l'estructura primària del monòmer consisteix en una cadena polipeptídica de 506 aminoàcids, més un grup hemo, més una molècula de NADPH (figura 15). Cada monòmer té quatre dominis. El primer domini es compon dels 75 residus de la part amino-terminal. Aquests formen un braç amb dues hèlix α i un llarg bucle que s'extén des de la subunitat globular. El segon i més gran domini conté el grup hemo. Està compost pels residus 76 al 320 i mereix ser classificat com un domini $\alpha+\beta$. Inclou el " *β -barrel*" i diversos segments helicals de tres o quatre voltes cada una, amb varis loops. El " *β -barrel*" consisteix en vuit fulles β laminars antiparal·leles, que giren formant una superfície tancada cilíndrica. El tercer domini comprèn els residus 321 al 436, i se l'anomena el domini d'envoltura. Aquest domini consta del lligand hemo fenòlic, Tyr357. I el quart domini és la porció carboxi-terminal, que comprèn des del residu 437 al 506, i està doblegada en quatre voltes d'hèlix, similar al plegament de la globina. L'ensamblatge del complex multimèric es fa mitjançant els dominis terminals i els dominis d'envoltura de cada monòmer.

L'estructura quaternària mostra els NADPHs exposats a la superfície, i els motius hemo insertats en el mig de cada monòmer, comunicats amb la superfície mitjançant una espècie de canal altament hidrofòbic que s'anomena la cavitat hemo. La cara proximal (la que mira al cor del tetràmer) i la distal (la que mira a la superfície) del grup hemo són de naturalesa bastant diferent. A la cara proximal hi ha l'hèlix

essencial del domini d'envoltura, que aporta tres residus claus, Arg353, Ala356 i Tyr357. La part fenòlica de la Tyr357 actua com el quint lligam de l'àtom de ferro central (Fe) de l'anell hemo, els altres 4 lligams d'aquest ferro són nítrogens del mateix anell hemo.

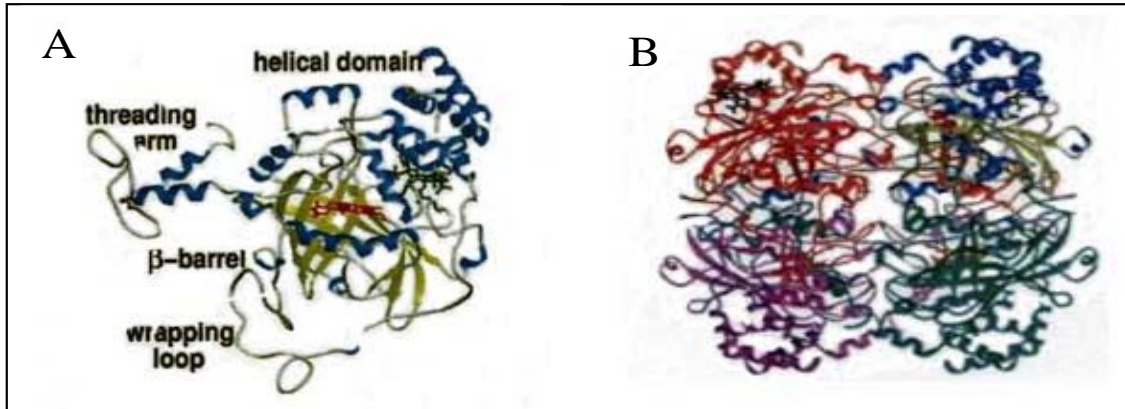
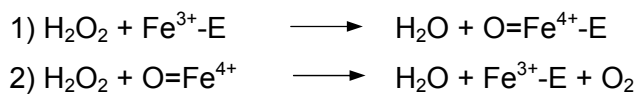


Fig. 15: Estructura de la catalasa humana. a) Monòmer, on s'aprecia el lloc actiu hemo (vermell) envoltat del "β-barrel" (groc), "α-hèlixs" (blau) i "loops" (gris). Al fons el NADPH (verd obscur); b) El tetràmer (Modificat de Putnam i col., 2000).

El mecanisme catalític encara no es coneix amb precisió, però el més acceptat comprèn una reacció en dues etapes (Deisseroth, i col., 1970):



On Fe-E representa el centre de Fe de l'anell hemo unit a la resta de l'enzim. A la primera etapa (1), una molècula de peròxid d'hidrogen entra a la cavitat hemo, on queda retinguda en interaccionar amb els residus His75 i Asn148. És en aquesta posició on es dona el primer pas de la catàlisi. L'hemo Fe^{3+} redueix la molècula de peròxid d'hidrogen a aigua i genera una espècie oxiferril covalent $\text{O}=\text{Fe}^{4+}$ (component I), més un radical hemo (Ivancich i col., 1997). El radical ràpidament es degrada en una altra reacció de transferència d'electró, deixant novament l'anell hemo inalterat. Durant la segona etapa (2), el component I oxida la segona molècula de peròxid d'hidrogen per a donar lloc a l'enzim original ($\text{Fe}^{3+}\text{-E}$), una altra molècula d'aigua, i un mol d'oxigen molecular. La reactivitat del grup hemo és exacerbada pel lligam felonat de la Tyr357 a la quinta posició del Fe, la qual cosa ha d'ajudar a l'oxidació del Fe^{3+} a Fe^{4+} , i a llevar l'electró de l'anell hemo. Evidències experimentals demostren que l'eficiència de la catalasa deu ser, en part, deguda a la interacció de la His75 i l'Asn148 amb el substrat, ja que la modificació de la His75 amb 3-amino-1,2,4-triazol inhibeix l'enzim, impedit la unió del substrat (Putnam i col., 2000).

L'acció del NADPH encara no està molt clara, tot i que activitats baixes de catalasa en fibroblastes de *Xeroderma pigmentosum* i de línies cel·lulars humanes SV-40 transformades s'han associades a baixes concentracions intracel·lulars de NADPH (Hoffschir i col., 1998). Estudis més recents suggereixen que el NADPH protegeix l'enzim de l'oxidació mediada pel seu propi substrat (Kirkman i col., 1999).

1.9.3 Glutatió Peroxidasa (E.C 1.11.1.19)

La glutatió peroxidasa té la funció de reduir el H_2O_2 i els àcids grassos hidroperòxids (ROOH), emprant el glutatió (GSH) com a font reductora. Hi ha almenys cinc isoenzims glutatió peroxidasa (GSH-Px) en mamífers. Tot i que la seva expressió és ubiqüa, els nivells de cada isoforma varien depenent del tipus de teixit. La GSH-Px citosòlica i mitocondrial (GSH-Px1), codificada per un gen localitzat en el cromosoma 3 (Gladyshev i col., 1999), es localitza a la majoria de teixits, tot i que predomina en eritròcits, renyó i fetge. La isoforma gastrointestinal o GSH-Px2 és molt semblant a GSH-Px1. El seu gen es localitza en el cromosoma 14 (Gladyshev i col., 1999), i la seva funció encara és motiu de debat, tot i que se la relaciona amb el metabolisme xenobiòtic (Brigelius-Flohé, 1999). La GSH-Px plasmàtica (GSH-Px3) es va descobrir en plasma sanguini (Takahashi i col., 1987) a on té una funció antioxidant extracel·lular i de sistema de defensa contra hostes externs (Brigelius-Flohé, 1999). La fosfolípid hidroperòxid GSH-Px4, s'expressa majoritàriament en cèl·lula epitelial renal i testicle. GSH-Px5, la isoforma més recent que s'ha trobada, és seleno-independent i s'expressa en epidídim (De Haan i col., 1998).

Tot i que la GSH-Px comparteix substrat amb la catalasa, s'ha constatat que el cicle redox del glutatió és la font més important contra nivells baixos d'estrés oxidatiu, mentre que la catalasa és més efectiva protegint d'estrés sever (Izawa i col., 1996).

GSH-Px1 humana (Ren i col., 1997) és un tetràmer de 80 kDa que conté en el seu centre actiu un residu selenocisteïna en cada una de les quatre subunitats idèntiques. El monòmer té la típica estructura de tioredoxina, que consisteix bàsicament en una làmina β central flanquejada per vàries hèlix α (figura 16). La làmina β central es compon de cinc cadenes β ($\beta 1$ - $\beta 5$), compostes majoritàriament per residus hidrofòbics, amb només

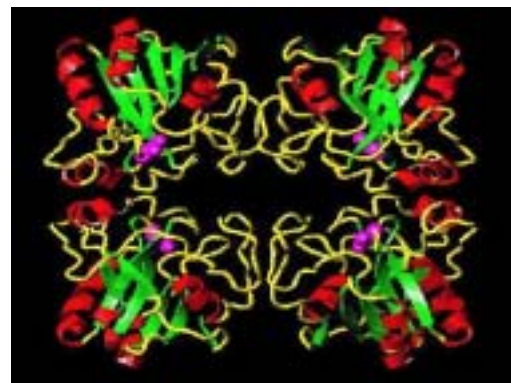


Fig. 16: Estructura del tetràmer de la GSH-Px1. Làmina β central (verd); hèlix α (vermell); residu cisteïna (lila).

dos residus amb càrrega, (una Arg i una Lys). Flanquejant aquesta làmina β hi ha quatre hèlix α ($\alpha 1$ - $\alpha 4$). El residu seleno-cisteïna (Cso45) està ubicat en el bucle que uneix la cadena $\beta 1$ amb l'hèlix $\alpha 1$.

El mecanisme de catàlisi encara no es coneix amb precisió. Estudis en l'enzim boví suggereixen que la reducció de l'hidroperòxid per la GSH-Px és un procés cíclic i que el residu cisteïna està implicat en la catàlisi. S'ha suggerit que l'àtom de seleni experimenta dos canvis de valència en el cicle, passant d'anió selenolat ($R-Se^-$) a àcid selenènic ($R-Se-OH$). Per a reduir els hidroperòxids, el $R-Se^-$ és oxidat per l'hidroperòxid a $R-Se-OH$, la qual cosa fa que sigui subseqüentment reduït de nou a $R-Se^-$ pel GSH (Epp i col., 1983; Maiorino i col., 1995).

2. Objectius

2.1 Objectiu General

L'objectiu principal d'aquesta tesis és determinar si les mutacions en el mtDNA indueixen sobre-producció d'espècies reactives d'oxigen. La nostra hipòtesi de treball és que mutacions en el mtDNA bloquegen la cadena de transport d'electrons, generant més producció de ROS. Per contrarrestar aquesta hipòtesi seguirem una via indirecta, estudiant en els models de cíbrids transmitocondrials la resposta antioxidant com a indicadora de generació d'espècies reactives d'oxigen, i de la capacitat detoxificadora cel·lular.

Per a assolir aquest objectiu general, ens marquem els següents objectius específics:

2.2 Objectius Específics

- 1.- Diagnosticar molecularment els pacients susceptibles de patir malaltia mitocondrial, que constituirà la base per generar els nostres models d'estudi.
- 2.- En el cas de trobar noves mutacions, estudiar la seva possible patogenicitat.
- 3.- Generar cíbrids transmitocondrials dels pacients diagnosticats.
- 4.- Validar, en el model cel·lular generat, la reproductibilitat dels símptomes bioquímics observats prèviament en els pacients.
- 5.- Estudiar l'activitat i l'expressió dels enzims antioxidants en els cíbrids transmitocondrials.
- 6.- Assegurar-nos de que paràmetres independents a la mutació en el mtDNA, com per exemple l'edat de la línia cel·lular, no afectin a les determinacions de l'activitat antioxidant.

3. Material i Mètodes

3.1 Diagnòstic de pacients

3.1.1 Pacients d'Estudi

3.1.1.1 Pacient 1: Dona diabètica de 39 anys, que va acudir a la Unitat de Malalties Neuromusculars per a valoració d'un quadre de debilitat muscular i intolerància a l'exercici, que l'estava afectant en els últims 6 anys. Havia estat diagnosticada de Diabetis mellitus als 30 anys, després d'haver patit durant els dos anys anteriors astenia, polinúria i polidipsia.

En l'anamnesi, la pacient referí cansanci en determinades activitats quotidianes, com a pujar escales, aixecar-se de la cadira o aixecar objectes. Si s'esforçava apareixien palpitations i dificultats respiratòries. El quadre clínic havia empitjorat en els darrers dos anys. Últimament la pacient havia començat a desenvolupar una progressiva disminució de la percepció auditiva.

En l'exploració neurològica es va observar debilitat muscular simètrica afectant als músculs proximals, tant de la cintura escapular com de la pèlvica. No s'observaren atrofies musculars. Els reflexes musculars estaven hipoactivats. No es detectaren alteracions en les sensibilitats. L'examinació dels parells cranials va desvetllar sordesa bilateral de característiques neurosensorials, confirmant per audiometria hipoacusia neurosensorial bilateral.

En les determinacions analítiques en sang la glucèmia basal en dijuni era de 229 mg/dL (valors normals 71-110 mg/dL), i la creatina quinasa (CK) de 1.47 mg/dL (valors normals <1.1 mg/dL). Les concentracions plasmàtiques tant de CK com de lactat, foren normals.

En l'examinació neurofisiològica, l'electromiograma (EMG) paradòxicament fou normal, sense evidència electrofisiològica de miopatia. La tomografia axial computeritzada (TAC) cerebral no va mostrar ni lesions ni calcificacions anòmales.

Investigant els antecedents familiars desvetllàrem que tant l'àvia materna com la mare havien patit Diabetis mellitus, i aquesta darrera també estava afectada d'hipoacusia bilateral.

3.1.1.2 Pacient 2: Dona de 34 anys amb història de progressiva fatigabilitat muscular. Als 20 anys va començar a desenvolupar lipomes confluents simètrics al voltant del coll i a la part superior del tronc, sense deformitats a l'esquelet, que han estat tractats amb tres intervencions quirúrgiques en el darrer any. L'examinació neurològica va mostrar hipoacusia neurosensorial bilateral, mioclonus, ataxia i afectació dels nervis cranials. L'examinació oftalmoscòpica fou normal, sense afectació dels músculs oculars. Poc temps després, la pacient va desenvolupar severa intolerància a

l'exercici, fins al punt que no era capaç ni de caminar distàncies molt curtes. L'EMG va mostrar patró miopàtic amb polineuropatia axonal sensitiva. Seguidament va debutar amb disartria, disfàgia i ptosi palpebral, suggerint una apoplèxia. Sumat a aquests símptomes, va presentar insuficiència ventilatòria, fallida multiorgànica i acidosi làctica. La història familiar de la pacient mostrà lipomatosi múltiple simètrica (MSL) sense evidències neuromusculars en cinc relatius materns. Cap de les característiques clíniques freqüentment associades al síndrome de MERRF fou constatada en cap d'aquests cinc familiars materns estudiats.

3.1.1.3 Pacient 3: Noia caucàsica de 21 anys, fruit d'un embaràs i part normals, amb desenvolupament cognitiu i motor normal fins als 3 anys, edat en la qual li detectaren una cataracta bilateral que requerí tractament quirúrgic. Als 7 anys va començar a desenvolupar una progressiva pèrdua auditiva neurosensorial. Durant els anys següents la pacient va debutar amb símptomes d'epil·lèpsia mioclònica amb evidències electroencefalogràfiques d'ones lentes i impulsos aïllats, atàxia cerebral, fatigabilitat muscular i progressiva pèrdua visual. L'àcid làctic basal als 12 anys fou elevat, 5,8 mmol/L (normal<1.8), i la CK en sèrum fou de 1000UI/L (normal<150). L'examinació clínica als 21 anys va mostrar atròfia muscular difusa, fatigabilitat muscular generalitzada, atàxia d'extremitats, severa deficiència visual amb atròfia òptica, i sordesa total. L'EMG desvetllà un clar patró miopàtic. Els estudis de conducció motora mostraren neuropatia sensorimotora severa a les cames. Les imatges de ressonància magnètica del cervell desvetllaren atròfia cerebel·lar difusa amb hiperintensitats nodulars simètriques a les gànglies basals. La història familiar és negativa per malalties neuromusculars.

3.1.1.4 Pacient 4: Noia de 16 anys, caucàsica sense antecedents familiars per malalties neuromusculars. La família havia notat una lenta i progressiva ptosi i empitjorament de la motilitat ocular des de que tenia 4 anys. L'examinació física als 12 anys va desvetllar una ptosi bilateral i oftalmoplegia, sense fatigabilitat muscular. L'EMG fou miogènic, amb dèbils símptomes de polineuropatia motor-sensitiva. Els nivells de CK i els d'àcid làctic basal foren normals, però aquests darrers amb el test de sobrecàrrega de glucosa foren una mica elevats, 2,3 mmol/L (normal<1.8). L'estudi cardiològic fou normal. Darrerament, a l'edat de 17 anys, a més a més de la progressió moderada de la seva ptosi i oftalmoplegia, ha començat a desenvolupar fatigabilitat i, comparant amb la seva primera examinació física, mostra una marcada pèrdua de teixit gras subcutani.

3.1.1.5 Pacient 5: Una dona de 32 anys, caucàsica, amb pares sans i no consanguinis, patia de intolerància a l'exercici des de que tenia 20 anys. Al principi les fatigues apareixien després de practicar activitats esportives, però subseqüentment amb activitats quotidianes, com pujar escales, caminar més de 400 metres o mastegar menjar. Als 30 anys li diagnosticaren síndrome de fatiga crònica. No presentava ni rampes ni miàlgies ni pigmentinuria. L'exploració neurològica fou normal. Tant la resistència muscular, com els reflexes dels tendons, el "test cerebel·lar", l'examinació sensorial i les funcions cognitives foren normals, així com la fundoscòpia i la creatina kinasa (CK) (141 U./L; normal<150). Els nivells d'àcid làctic en sang en estat de repòs foren una mica elevats, 3.48 mmol/L (normal<1.8). Els estudis de conducció motora i sensorial, EMG, EKG i l'ecocardiograma foren normals. El MRI en cervell no va mostrar anormalitats.

3.1.1.6 Pacient 6: Adolescent caucàsic de 15 anys d'edat, fruit d'un embarç i part normals. Als primers anys de la infància no desenvolupà cap irregularitat, fins que als 4 anys va acudir al nostre hospital afectat de molèsties subagudes al caminar, després d'haver superat una pneumònia. L'examinació neurològica evidencià hipotonia generalitzada amb clonus al tendó d'Aquiles esquerra i efecte Babinski. Evidencià moviments típics de distònia espàstica al caminar. Les imatges de MRI del cervell mostraren la presència de necrosi bilateral de l'estriat (BSN). No tenia augmentats els nivells d'àcid làctic ni en el plasma ni en el fluïd cervell-espinal.

El pacient ha estat seguit pel servei de Neurologia Infantil del Hospital Vall d'Hebrón des del seu primer episodi, evidenciant que la malaltia ha progressat cap a una distònia asimètrica generalitzada. Als 13 anys, una nova MRI mostrà noves lesions necròtiques dels ganglis basals. Actuant el pacient presenta un quadre sever de disàrtria i retràs mental moderat amb distònia generalitzada. La història familiar pels desordres neurològics era negativa.

3.1.2 Estudi Bioquímic de la Cadena Respiratòria

L'activitat dels enzims de la cadena respiratòria es determina sobre homogeneïtzats de teixit muscular o de cèl·lules en cultiu per espectrofotometria. En el cas de la biòpsia muscular, s'homogeneïtzaren 40 mg de teixit en 450 µl de medi SETH (sacarosa 250 mM, EDTA 2 mM, Tris-HCl 10 mM, heparina 50 U/ml, pH 7.4). Posteriorment es centrifugà a 800g durant 10 minuts a 4°C. Es va transferir el sobranadant a un tub nou. Totes les determinacions es realitzaren sobre aquest sobranadant.

Pel que respecte als cultius cel·lulars, creixérem 10^7 cèl·lules/ml, i les recollírem per escrapeig amb medi SETH. Sonicàrem les cèl·lules durant 3 minuts al 50%, “duty-cycle”, i férem les determinacions directament.

3.1.2.1 Activitat NADH Citocrom C Oxidoreductasa: Complex I+III

Mesuràrem l'activitat NADH citocrom C oxidoreductasa sensible a la rotenona (CI+CoQ+Complex III).

- Procediment: en una cubeta posàrem 12.5 µl de sobranadant i 1000 µl d'aigua miliQ prèviament escalfada a 37°C. Deixàrem preincubar durant 1 minut a 37°C dins l'espectre per a que es rompessin les membranes mitocondrials. Tot seguit afegírem:

- 250 µl de tampó Tris 50 mM a pH 8 (amb BSA al 5%), prèviament escalfat a 37°C
- 3.75 µl de KCN 80 mM
- 25 µl de Citocrom C 2 mM

Després d'agitar la cubeta lleugerament, llegírem l'absorbència durant 1 minut a 550 nm a 37°C. Passat aquest temps, afegírem 12.5 µl de NADH 40 mM, tornàrem a agitar i llegírem a 550 nm durant 3 minuts a 37°C. I passat aquest temps, afegírem 2.5 µl de rotenona 2 mM, per seguir llegint l'absorbència a 550 nm durant 3 minuts a 37°C.

Calculàrem la pendent abans i després de l'addició de rotenona i calculàrem la diferència de pendents entre ambdues ($\Delta A/\text{min}$) segons la fórmula:

$$\frac{[\Delta A/\text{min} * V_f * 1000]}{[21.1 * V_m] \text{ml} * \text{SN}}$$

On SN és contingut proteic del sobranadant donat en mg de proteïna/ml; V_f = volum final en ml (=1.306); V_m = volum de la mostra en ml (0.0125); 21.1= coeficient d'extinció molar del citocrom C.

3.1.2.2 Activitat Succinat DCPIP Oxidoreductasa: Complex II (SQ)

Mesuràrem l'activitat diclorofenol indofenol oxidoreductasa (Complex II+CoQ) i succinat deshidrogenasa (SP).

En aquest cas per a rompre les membranes cel·lulars descongelàrem i tornàrem a congelar 3 vegades una alíquota del sobranadant.

- Procediment: Mesclàrem en una cubeta:

- 900 µl de Tampó fosfat potàssic 62.5 mM pH 7.4
- 45 µl de sobranadant + 67.5µl de SETH
- 22.5 µl de DCPIP 0.5 mM, prèviament atemperat a temperatura ambient

Preincubàrem durant 20 minuts a 30°C, i després afegírem:

- 55.5 µl acida sòdica 100 mM
- 4.5 µl rotenona 2mM
- 108 µl DCPIP 0.5 mM

Acte seguit, agitarem lleugerament la cubeta amb un vòrtex i llegirem de 3 a 5 minuts a 600 nm a 25°C. Passat aquest temps, afegirem 55.5 µl de metasulfat de fenacina (PMS) 24 mM i llegirem durant 4 minuts més.

Calcularem la pendent, mesurant els increments d'absorbència ($\Delta A/\text{min}$) abans (SQ) i després (SP) d'afegir PMS. Les fórmules foren les següents:

$$SQ = 1504.3 \cdot \Delta A_{\text{min}}/P$$

$$[\Delta A_{\text{min}}/\text{min} \cdot V_f(\text{ml}) \cdot 1000] / [19.1 \cdot V_m(\text{ml}) \cdot \text{SN}]$$

$$SP = 1568.9 \cdot \Delta A_{\text{min}}/P$$

On $V_f = 1.293$ ml per a SQ i 1.3485 ml per a SP. El coeficient d'extinció milimolar del DCPIP és 19.1. El V_m (volum de la mostra) en ml és 0.045. SN és el contingut proteic en mg de proteïna/ml del sobranadant.

3.1.2.3 Activitat Succinat Citocrom C Oxidoreductasa: Complex II+III

Rompèrem les membranes cel·lulars descongelant i tornant a congelar 3 vegades una alíquota del sobranadant.

- Procediment: Mesclarem en una cubeta:

- 900 µl de Tampó fosfat potàssic 62.5 mM pH 7.4
- 45 µl de sobranadant + 67.5 µl de SETH
- 90 µl de succinat 250 mM
- 22.5 µl d'aigua mili Q

Preincubarem 30 minuts a 30°C, i després afegirem:

- 55.5 µl d'acida sòdica 100 mM
- 4.5 µl de rotenona 2 mM
- 168 µl de citocrom C 0.5%

Tot seguit, agitarem la cubeta amb un vòrtex i llegirem l'absorbència a 550 nm durant 5 minuts a 25°C. Calcularem la pendent amb la fórmula:

$$[\Delta A/\text{min} \cdot V_f \cdot 1000] / [21.1 \cdot V_m \cdot \text{SN}]$$

On V_f és 1.353 ml; el coeficient d'extinció mM del citocrom C és 21.1; el V_m és 0.045 ml; SN és el contingut proteic en mg de proteïna/ml del sobranadant.

3.1.2.4 Activitat del Complex IV (Citocrom C oxidasa)

L'activitat COX normalment és més elevada que la resta d'activitats. Degut a això, dil·luïrem la mostra 1/5.

- Procediment: en una cubeta mesclàrem:

- 1116 µl de tampó fosfat 10 mM pH 7, prèviament atemperat a 25°C
- 84 µl Citocrom C 1% (10 mg/ml), prèviament reduït amb uns pocs grams de ditionita i posteriorment centrifugant a 6500 g durant 5 min.
- 6 µl lauril maltòsid 125 mM
- 30 µl de sobranadant

Tot seguit agitarem la cubeta suament amb un vòrtex i llegirem l'absorbència durant 10 minuts a 550 nm i a 25 °C. Per calcular la pendent, agafarem el $\Delta A/\text{min}$ entre el minut 5 i 10. La fórmula fou la següent:

$$[\Delta A/\text{min} * V_f(\text{ml}) * 1000 * 5 \text{ ml mostra dil·luïda/ml SN}] / [21.1 * V_m * \text{SN}]$$

On $V_f = 1.236$; el coeficient d'extinció mM del citocrom C és 21.1; V_m és el volum de mostra dil·luïda afegida a la cubeta (0.030 ml); SN és el contingut proteic en mg de proteïna/ml del sobranadant.

3.1.2.5 Activitat Citrat Sintasa

Per aquesta activitat també dil·luïrem 1/5 el sobranadant.

- Procediment: en una cubeta mesclàrem:

- 120 µl de 5, 5'-ditibis(àcid 2-nitrobenzòic) 1mM (DTNB) *
- 36 µl d'acetil CoA 10 mM
- 12 µl de titró X-100 10%
- 912 µl d'aigua milliQ atemperada a 25°C
- 30 µl de sobranadant dil·luït en SETH

Tot seguit agitarem la cubeta amb vòrtex i llegirem durant 3 min. a 412 nm i 25°C. Passat aquest temps, afegirem 60 µl d'oxalacetat 10 mM* en tris-HCl 0.1 M pH 8, i continuarem la lectura de l'absorbència durant 3 minuts més. Calcularem la pendent abans i després de l'addició d'oxalacetat, i mesurarem la diferència entre ambdues ($\Delta A/\text{min}$). La fórmula fou la següent:

$$[\Delta A/\text{min} * V_f(\text{ml}) * 1000 * 5 \text{ ml mostra dil·luïda/ml SN}] / [13.6 * V_m * \text{SN}]$$

En aquest cas $V_f = 1.170$ ml; el coeficient d'extinció mM del DTNB és 13.6; el volum de mostra dil·luïda afegida a la cubeta (V_m) és 0.030 ml; SN és el contingut proteic en mg de proteïna/ml del sobranadant.

^(*)La solució de DTNB 1mM es va preparar en una solució 1M Tris-HCl pH 8.1. L'oxalacetat es va preparar en fresc per a impedir la seva degradació.

3.1.3 Estudi Morfològic. Citoquímica Mitocondrial en seccions de teixits

Per a visualitzar la presència de mitocondries patològiques i normals en seccions tissulars hi ha diversos procediments histoquímics, dels quals el més emprat és el tricròmic de Gomori modificat per Engel (Engel i Cunningham, 1963). En aquest treball vàrem optar per la detecció citoquímica de l'activitat succinat deshidrogenasa (SDH), marcador mitocondrial específic de la fibra muscular que reflecteix la presència de proliferació mitocondrial (Sciacco i col., 1996), i la citocrom oxidasa (COX), marcador del complex IV de la cadena respiratòria (Sciacco i col., 1996).

3.1.3.1 Succinat Deshidrogenasa (SDH)

Aquest mètode es basa en la utilització del nitroblau de tetrazoli com a acceptor dels electrons, combinat amb metilsulfat de fenazina, que serveix com a donador intermig de l'electró al nitroblau de tetrazoli. L'especificitat del mètode pot estudiar-se fent seccions control, afegint un inhibidor de la SDH al medi de incubació, en aquest cas malonat sòdic 10 mM.

- Procediment: S'utilitzaren seccions de criostat de 8 µm que es dipositaren a sobre de cobrir-objectes recoberts de polilisina (0,1%). La solució d'incubació es componia de tampó fosfat 5 mM pH 7.4, EDTA 5 mM, metilsulfat de fenazina 0.2 mM, cianur potàssic 1 mM, àcid succínic 50 mM i nitroblau de tetrazoli 1.5 mM.

S'ajustà el pH a 7.6 i es filtrà la solució amb paper Whatman número 1. Les seccions s'incubaren durant 20 minuts a 37 °C. Després es feren tres rentats de 5 minuts cada un amb aigua destil·lada a temperatura ambient. Les seccions es muntaren sobre portaobjectes de vidre amb gel de glicerina i s'observaren al microscopi.

3.1.3.2 Citocrom Oxidasa (COX)

El mètode es basa en la utilització de la 3,3'-diaminobenzidina (DAB) com a donant d'electrons pel citocrom C. El producte de la reacció de l'oxidació de la DAB apareix com una pigmentació marró que correspon a la distribució de les mitocondries en el teixit. L'especificitat del mètode pot estudiar-se afegint un inhibidor de la COX (cianida potàssica 10 mM) al medi de incubació.

- Procediment: S'empraren seccions de criostat de 8 µm que es col·locaren sobre cobrir-objectes recoberts amb polilisina (0.1%). La solució d'incubació estava composta de tampó fosfat 5 mM pH 7.4, 3,3' DAB 0.1%, citocrom C (de cor de cavall) 0.1% i catalasa al 0.02%.

S'ajustà el pH a 7.4 i es filtrà la solució amb paper Whatman 1. Les seccions s'incubaren durant 1 hora a 37 °C. Després es feren tres rentats amb aigua destil·lada

de 5 minuts cada un a temperatura ambient. Les seccions es muntaren sobre portaobjectes de vidre amb gel de glicerina i s'observaren al microscopi.

3.1.4 Estudi Molecular

3.1.4.1 Extracció de DNA

-Protocol per a biòpsia de Múscul, Pell i Greix Subcutani: Es matxucaren aproximadament 50 mg de teixit muscular congelat en nitrogen líquid amb l'ajuda d'un martell. Es col·locà el teixit matxucat en un tub Eppendorf de 1.5 ml que contenia 0.5 ml de solució de proteïnasa K (1 mg/ml de proteïnasa K, 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM NaCl; 25 mM EDTA, 1% SDS). S'incubà a 50°C durant 2 hores, o bé a 37 °C durant tota la nit. Seguidament, es va centrifugar a 10000 g durant 5 minuts per a eliminar el material insoluble. Es va transferir el sobranadant a un tub nou i s'afegiren 50 µl de NaCl 5M.

Es va procedir a l'extracció amb fenol afegint un volum de fenol-Tris saturat. Es sacsejà el tub suaument durant 15 segons. Es centrifugà 10 minuts a 10000 g i es recuperà el sobranadant, que es va transferir a un tub nou. S'afegiren 250 µl de isoamilalcohol:cloroform (1:24) i 250 µl de fenol. Es tornà a sacsejar suaument durant 15 segons i es va centrifugar 5 minuts a 10000 g. Es va recuperar el sobranadant, que es va transferir a un tub nou, on s'afegiren 500 µl de la mescla d'isoamilalcohol:cloroform. Es sacsejà suaument durant 15 segons i es centrifugà a 10000 g durant 5 minuts. Recuperarem el sobranadant i el transferirem a un tub nou.

Es va precipitar el DNA afegint dos volums d'isopropanol fred. Centrifugarem a 10000 g durant 20 minuts i deixarem secar el pellet. Es va resuspendre el pellet en 20 µl de tampó TE (Tris 10 mM pH 8.5, EDTA 1mM).

- Protocol per Sang: Procedirem de la mateixa manera, però el material de partida fou un pellet de cèl·lules obtingut a partir de centrifugar 15 ml de sang total a 5000 g durant 20 minuts.

- Protocol per Cultiu de Fibroblastes i Cíbrids Transmitocondrials: Es va procedir de la mateixa manera, però el material de partida fou un pellet de cèl·lules obtingut a partir de centrifugar 2.5 milions de cèl·lules tripsinitzades, a 1000 g durant 5 minuts.

3.1.4.2 Quantificació del DNA total extret

La concentració del DNA es va determinar per espectrofotometria, llegint a la longitud d'ona (λ) de 260 nm. A dita λ , una unitat d'absorbència és equivalent a 50

µg/ml de DNA de doble hebra. Fent una dil·lució de la mostra de 1/50, la concentració de DNA es calcula seguint la fórmula:

$$[\text{ng DNA}/\mu\text{l}] = \text{O.D}_{260} \times 50 \times 50$$

Per a determinar la puresa de la mostra, llegirem a la λ de 280 nm i férem el quocient $\text{O.D}_{260} / \text{O.D}_{280}$. Es considera que la mostra està neta de proteïnes i altres contaminants quan dit quocient està entre 1.8 i 2.

3.1.4.3 Reaccions de PCR

Les amplificacions dels productes de PCR es varen realitzar a partir de DNA purificat extret de múscul, sang, cultiu de fibroblastes, pell i greix. Les reaccions es varen fer en un volum final de 50 µl, i les concentracions dels diferents components de les mescles foren les següents:

Oligonucleòtids (5 µM)	0.1 µM
dNTPs (2.5 mM)	0.05 µM
(*)Taq Buffer (10x)	1x
(*)Taq DNA Polimerasa (5u/µl)	0.1 u/µl
DNA	100 ng/µl

(*) Suministrats per Takara® (Takara Shuzo, Shifo, Japan). El buffer conté Tris-HCl 50 mM, Tritón X-100 0.1% , MgCl₂ 25 mM

Les condicions de les reaccions de PCR pels 24 parells de primers que poden amplificar tot el mtDNA sencer (Kogelnik i col., 1998), foren les següents:

Desnaturalització inicial a 94 °C durant 1 minut
 30 cicles de: Desnaturalització a 94 °C durant 30 segons
 Hibridació a 61°C durant 45 segons
 Elongació a 72°C durant 1 minut
 Temps d'extensió final a 72°C durant 5 minuts

Les condicions de PCR pels primers dels tRNA mitocondrials (Kogelnik i col., 1998) també estan estandarditzades i foren les següents:

Desnaturalització inicial a 94°C durant 1 minut
 25 cicles de: Desnaturalització 94 °C durant 15 segons
 Hibridació a 50°C durant 30 segons
 Elongació a 72°C durant 1 minut
 Temps d'extensió final: 72°C durant 5 minuts

Per a amplificar fragments superiors a 3 Kb emprarem l'enzim Takara LA Taq™ (Takara, Shufo, Shiga, Japan). Seguïrem el protocol per PCR llarga (Long-PCR). La mescla de la reacció es va fer de la següent manera:

<i>TaKaRa LA Taq</i> (5 unitats/ μ l)	0.5 μ l
LA PCR Buffer II 10x (sense Mg^{2+})	5 μ l
25 mM $MgCl_2$	5 μ l
dNTP Mixture (2.5 mM each)	8 μ l
DNA motllo	< 1 μ g
Primer F	0.2-1.0 μ M
Primer R	0.2-1.0 μ M
Aigua bidestil·lada	Fins a 50 μ l

I les condicions de la PCR foren:

Desnaturalització inicial a 95 °C durant 1 minut

30 cicles de: Desnaturalització a 98 °C durant 5 segons

Hibridació i elongació a 68°C durant 15 minuts

Temps d'Extensió Final: 72 °C durant 10 minuts

3.1.4.4 Electroforesi en Gels d'Agarosa

Els productes de PCR es separaren per electroforesi en gels d'agarosa horitzontals per a comprovar els amplificats obtinguts. Els gels es feren al 1%, dissolvent 0.5 gr d'agarosa en 50 ml de TBE 1X (Tris-base 50 mM, àcid bòric 1mM, EDTA 1mM). Les mostres es carregaren mesclades amb 1/3 de volum de tampó de càrrega (dissolució de ficoll al 33% i blau de bromofenol al 0.2%).

L'electroforesi es realitzà en tampó TBE 1X, aplicant un voltatge de 100 V durant uns 20-40 minuts (depenent del tamany de les bandes amplificades). Les bandes es comprovaren exposant-les a una font de llum ultraviolada de 302 nm.

3.1.4.5 Seqüenciació Automàtica

Els fragments amplificats per PCR, prèviament es purificaren utilitzant el kit comercial de purificació QiAquick® (Qiagen, Hilden) i s'empraren en la següent reacció de seqüenciació, que es composà de:

Big Dye Terminator Kit® (Perkin Elmer, CA)	2 - 4 μ l*
Producte de PCR purificat	2 μ l (a 100 ng/ μ l)
Primer de seqüenciació (5 μ M)	1 μ l
Aigua fins a volum final de 10 μ l	

* 2 μ l per fragments < 500pb i 4 μ l per fragments > 500pb.

Les condicions de la reacció de seqüència foren les següents:

25 cicles de:

- Desnaturalització a 96°C durant 10 segons
- Hibridació a 50°C durant 5 segons
- 60°C durant 4 minuts.

Els productes de la reacció de seqüència es purificaren mitjançant centrifugació per columna Autoseq™ (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ):

- Es centrifugaren les columnes durant 1 minut a 3000 r.p.m, per a eliminar el tampó de preservació.
- Es va carregar la mostra de la reacció de seqüenciació en la columna i es centrifugà durant 1 minut a 3000 r.p.m per el·luir el DNA.
- S'agafaren 8 µl del producte el·luit i s'hi afegiren 12 µl de TSR (Template Suppressor Reagent) (Perkin Elmer, CA).
- Es desnaturalitzaren les mostres a 95°C durant 3 minuts abans de carregar-les al seqüenciador automàtic (Model 310; Perkin-Elmer, Foster City, CA).

3.1.4.6 Anàlisi de Fragments de Restricció (RFLP)

Vàrem procedir a realitzar anàlisi de fragments de restricció amb l'objectiu de quantificar el grau d'heteroplàsmia de les mutacions descrites (Veure apartat resultats). Les amplificacions de PCR es varen realitzar a partir de DNA purificat extret de múscul, sang, pell, fibroblastes i greix, seguint el protocol explicat a l'apartat 2.4.1. Al final de la PCR convencional, es va procedir a fer un cicle calent (Hot Cycle PCR), afegint 0,1µl de α -P³² deoxiadenosina trifosfat (dATP) (a 3000 Ci/mmol) a cada tub de PCR, amb la finalitat d'evitar infraestimació dels nivells de mtDNA mutant, produïda per la formació d'heteroduplexes entre les molècules de mtDNA mutades i salvatges. El producte amplificat, fou digerit per l'enzim de restricció pertinent (taula 3.1) a 37°C de temperatura durant tota la nit. La barreja de la reacció de digestió fou la següent en tots els casos: 26 µl de producte amplificat; 3 µl de buffer de l'enzim de restricció 10X; 1µl d'enzim.

Enzim	Mutació	Primer F	Primer R	Casa Comercial
<i>Dde I</i>	G5703A	(nt 5651-5670)	(nt 5798-5776)	New England
<i>Afa I</i>	G12334A	(nt 12237-12259)	(nt 12364-12333)	New England
<i>Hae III</i>	A3243G	(nt 3116-3134)	(nt 3353-3333)	Takara
<i>Bgl I</i>	A8344G	(nt 1009-10032)	(nt 1575-1556)	Takara
<i>Alu I</i>	G6930A	(nt 6744-6771)	(nt 7018-6988)	New England
<i>Gsu I</i>	T14487C	(nt 14287-14309)	(nt 14465-14489)	New England

Taula 3.1: Llistat d'enzims de restricció utilitzats per quantificar per RFLP les mutacions. S'indiquen els primers que es varen utilitzar per a amplificar les regions que contenen les mutacions. Numeració dels primers segons la seqüència d'Anderson (Anderson i col., 1981).

3.1.4.7 Haplotipatge del mtDNA per Enzims de Restricció

Quatre polimorfismes (T4216C, C7028T, G12308A, G13708A) defineixen els diferents haplotips del mtDNA (taula 3.3). A la taula 3.2 es mostren els iniciadors i els enzims emprats per a amplificar i digerir els fragments que contenen els polimorfismes:

Iniciador	Seqüència 5' → 3'	Tamany	Enzim
L4216	CTACTTCTAACCTCCCTGTT	313 bp	Nla III
H4216	CTTACTTTAGGATGGGGTGT		
L7028	TCGCCACACTCCACGGAAG	261 bp	Alu I
H7028	TGGCGTAGGTTTGGTCTAGG		
L12308	CTCAACCCCGACATCATTACC	235 bp	Hinf I
H12308	ATTACTTTTATTTGGAGTTGCACCAAGATT		
L13708	TCTTCTCACCCCTAACAGGTC	248 bp	Mva I
H13708	GTTGGTTAGGTAGTTGAGGT		

Taula 3.2: Primers i enzims emprats per a amplificar i digerir els fragments que contenen els polimorfismes. L indica el primer de la cadena lleugera i H, el de la cadena pesada. Tamany, indica el tamany del fragment amplificat.

Els quatre fragments es poden amplificar amb les mateixes condicions de PCR:

Desnaturalització inicial a 95°C durant 5 minut

35 cicles de: Desnaturalització a 95 °C durant 30 segons

Hibridació a 57°C durant 30 segons

Elongació a 72°C durant 1 minut

Temps d'extensió final a 72°C durant 5 minuts

Totes les digestions es feren a 37°C durant una hora seguint el protocol explicat a l'apartat 3.1.4.6.

Polimorfisme →	7028	4216	12308	13708
Haplotip	Alu I	Nla I	Hinf I	Mva I
H	-	-	-	+
T	+	+	-	+
J	+	+	-	-
UK	+	-	+	+
Y	+	-	-	+

Taula 3.3: Haplotips definits pels quatre polimorfismes. + és quan l'enzim talla i – quan l'enzim no talla.

3.1.4.8 Electroforesi en Gels d'Acrilamida

Per a separar els productes de les digestions, es feren gels d'acrilamida verticals a diferents concentracions, depenent dels tamanys dels fragments que ens interessava separar, tal i com es mostra a la taula següent:

CONCENTRACIÓ	5%	12%	20%
Tamanys dels Fragments a Separar	80-500 bp	40-200 bp	6-100 bp
Bisacrilamida 30%	8,3 ml	20 ml	33,3 ml
TBE 5X	10 ml	10 ml	10 ml
Aigua Destil·lada	31,35 ml	19,65 ml	6,35 ml
APS 10X	0,35 ml	0,35 ml	0,35 ml
TEMED	20 µl	20 µl	20 µl

L'electroforesi es va realitzar en tampó TBE 1X, aplicant un voltatge de 300 V durant unes 2-4 hores, depenent del percentatge d'acrilamida del gel, i dels tamanys dels fragments a separar. Un cop corregut el gel, el protegírem amb Saram Wrap[®] i l'exposàrem a la pantalla del Phosphorimager durant una hora. Revelàrem amb el Phosphorimager (BioRad, Hercules, CA). Per a quantificar els percentatges dels productes de la digestió es va utilitzar el programa informàtic Quantity One[®] (BioRad, Hercules, CA).

3.1.4.9 PCR de Fibra Aïllada (Single Fiber PCR)

Aquesta tècnica permet quantificar el percentatge de mtDNA mutat a partir de DNA d'una fibra muscular aïllada. Amb l'ajuda d'un microscopi invertit, es microdisseccionen i s'aïllen les fibres, prèviament caracteritzades citoquímicament (fibres RRFs i NON-RRFs). S'extreu el DNA d'aquesta fibra aïllada i s'amplifica per PCR. La quantificació de les molècules mutades envers les silvestres es fa per RFLP, tal i com s'explica a l'apartat 3.4.6. La correlació entre nivells de mutació més elevats en fibres RRFs versus NON-RRFs és una de les evidències més clares de patogenicitat de la mutació que s'estudia.

- Procediment: La microdissecció es va fer amb l'ajuda d'un microcapil·lar de vidre, que es pot fer flamejant pipetes de vidre tipus Pasteur.

Es prepararen les seccions musculars fent talls de criostat de 30 µm i es tenyiren amb els procediments citoquímics esmenats en l'apartat 3.3. Els portaobjectes es tractaren amb polilisina per a impedir el moviment durant la microdissecció. Les seccions es submergiren en plaques de cultiu de 100 mm² que contenien 50 ml d'etanol al 50%, per a evitar que s'assequessin. Les fibres s'aïllaren amb el microcapil·lar siliconat sota control visual en un microscopi invertit. Un cop aïllades, es

“pescaren” amb el mateix microcapil·lar per capilaritat. Es dipositaren en un tub Eppendorf de 0,2 ml que contenia 50 µl d'aigua destil·lada.

Un cop aïllades les fibres, es centrifugaren a 14000 r.p.m durant 5 minuts. S'eliminà el sobranadant i es tractà la fibra per a lisar-la i extreure el DNA. Per realitzar la lisi s'afegiren 5 µl de mescla alcalina (200 mM KOH, 50mM DTT) al tub Eppendorf que contenia la fibra, i s'incubà a 65°C durant 30 minuts. La solució es neutralitzà mitjançant l'addició de 5 µl de solució neutralitzant (900 mM Tris-HCl, pH 8.3; 200 mM HCl). A partir de les aliqüotes resultants ja es pot realitzar la PCR i, posteriorment el RFLP i la quantificació dels nivells d'heteroplàsmia, seguint els procediments descrits anteriorment.

3.2 Línies cel·lulars

3.2.1 Generació dels cíbrids transmitocondrials

Els cíbrids transmitocondrials humans són línies cel·lulars carents de DNA mitocondrial (cèl·lules ρ^0 (ρ^0)) que són repoblades amb DNA mitocondrial exogen mitjançant la fusió de plaquetes de pacients. Utilitzarem cèl·lules ρ^0 derivades d'una línia cel·lular deficient en timidina kinasa (143B.TK⁻). El medi emprat per a mantenir la línia cel·lular ρ^0 i per a seleccionar les línies cel·lulars transmitocondrials conté 5-bromodeoxiuridina (BrdU). Les cèl·lules nucleades que puguin haver quedat en la fracció plaquetària, com ara els glòbuls blancs, i els híbrids que s'hagin pogut formar amb aquestes cèl·lules, sintetitzaran timidina kinasa, incorporaran BrdU dins el seu DNA i moriran.

Solucions i Medis:

- Solució Fisiològica salina per a aïllar plaquetes: 0,15 M NaCl, 15mM Tris-HCl, pH 7,4 (25°C)
- Medi de Fusió: 0,1 M Citrat Sòdic ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 0,15 M NaCl
- DMEM minus Ca^{2+} : DMEM sense calci
- Solució PEG al 42%: Aquesta solució sempre s'ha d'emprar fresca, es prepara un parell d'hores abans d'usar-se. Primer s'autoclaven 8,4 g de polietilè glicol (PEG) 1500 (BDH Laboratory Supplies, Poole, England) en un flascó Erlenmeyer de 50 ml, durant 15 minuts. Abans que el PEG refredi lo suficient per a solidificar, s'afegeixen 2 ml de DMSO i 9,6 ml de DMEM minus Ca^{2+} . La solució es guarda a 37°C fins al seu ús.
- Medi ρ^0 : DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementat amb 10% SFB (sèrum fetal boví), 100 µg/ml de BrdU, 50 µg/ml uridina i 0,5% antibiòtics (penicilina-estreptomicina).

- Medi Selectiu: DMEM suplementat amb 10% SFB dialitzat, 100 µg/ml de BrdU i 0,5% d'antibiòtics.
- Solució TD: 0,137 M NaCl, 10mM KCl, 0,7 mM Na₂HPO₄, 25 mM Tris- HCl, pH 7,4-7,5
- Solució TD plus EDTA: TD + 1mM EDTA disòdica.
- Solució stock de tripsina (10X): 0,5% (w/v) tripsina (1-300 pancrees de porcí, ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA) en aigua. Es guarda a 4°C. Per utilitzar, es dilueix 10 vegades en TD plus EDTA.
- Medi de congelació: 17,5 ml DMEM, 5 ml SFB i 2,5 ml dimetil sulfòxid (DMSO).

3.2.1.1 Aïllament de les plaquetes

Es recolliren 15-20 ml de sang del pacient en tubs amb heparina per a evitar la seva coagulació. Després de determinar el volum de la sang, es va transferir a un tub Falcon de 50 ml i s'afegiren 1:9 volums de solució salina fisiològica. Es va mesclar bé per inversió i es centrifugà a 200 g durant 20 minuts a 12°C.

Es varen recollir tres quartes parts del sobranadant (plasma) i es contaren les plaquetes amb un hemocitòmetre, en un microscopi de contrast de fase. Seguidament es centrifugà el plasma en un tub Falcon estèril de 15 ml a 1500 g durant 20 minuts a 15°C. Es va eliminar el sobranadant i es va resuspendre el pellet en 11 ml de solució salina fisiològica.

3.2.1.2 Fusió de les plaquetes amb les cèl·lules Rho 0

Transferírem 7 ml de la suspensió de plaquetes en solució salina fisiològica a un tub Falcon estèril de 15 ml i centrifugàrem a 1500 g durant 15 minuts a 15°C.

Mentrestant, recollírem almenys 10⁶ cèl·lules per tripsinització. Desenganxàrem les cèl·lules de la capsa de Petri, rentant-les primer amb PBS 1X i seguidament incubant-les amb tripsina durant un parell de minuts a 37°C.

Transferírem les cèl·lules desenganxades a un tub Falcon de 15 ml que contenia medi DMEM suplementat amb 10% de SFB, per inactivar la tripsina. Centrifugàrem les cèl·lules a 180 g durant 5 minuts. Resuspenguérem el pellet en medi DMEM minus Ca²⁺ a una concentració de 5 x 10⁵ cèl·lules/ml.

Un cop acabada la centrifugació a 1500 g de la suspensió de plaquetes, aspiràrem el sobranadant deixant uns 100 µl a sobre del pellet.

Amb molta cura per a no desenganxar el pellet de plaquetes, afegírem 2 ml de la suspensió de cèl·lules ρ⁰ (10⁶ cèl·lules). Centrifugàrem les cèl·lules a damunt el pellet de plaquetes a 180 g durant 10 minuts. Aspiràrem el sobranadant.

Amb una pipeta Pasteur, afegirem 0,1 ml de la solució de PEG al 42% i resuspenguérem el pellet. Quan el pellet estava quasi resuspès, contàrem 1 minut, afegirem 10 ml de medi Rho^0 , i resuspenguérem durant 20-30 segons més.

Un cop ben mesclat, férem una dil·lució 1:10 amb el mateix medi. Es sembraren les cèl·lules en plats de 96 pous, fent almenys tres noves dil·lucions de la següent manera:

- A 10 ml de la dil·lució 1:10 afegirem uns altres 10 ml de medi Rho^0 i sembràrem en el plat de 96 pous 0,2 ml per cada pou.
- A 2,5 ml de la dil·lució 1:10 afegirem 7,5 ml de medi Rho^0 i sembràrem en el plat de 96 pous 0,1 ml per pou.
- A 1 ml de la dil·lució de 1:10 afegirem 9 ml de medi Rho^0 i sembràrem en el plat de 96 pous 0,1 ml per pou.

Les cèl·lules sembrades en els plats de 96 pous s'incubaren en un incubador que manté la temperatura constant a $37^{\circ}C$ i una atmósfera de CO_2 al 5% i 95% d'aire.

Totes les cèl·lules que no es sembraren, es recolliren per centrifugació (180 g durant 5 minuts), es resuspengueren en medi de congelació i es dividiren en vials de congelació a 1 ml/vial per congelar-les de manera progressiva i posteriorment guardar-les en N_2 líquid.

Dos o tres dies després d'haver sembrat les cèl·lules en els plats, es canviava el medi Rho^0 per medi selectiu (sense uridina). El medi es canviava cada 3 dies. Passats uns 10-12 dies d'haver començat la selecció, les colònies ja eren visibles i estaven a punt de ser transferides a plaques de Petri.

Els plats que tenen una elevada proporció de pous "negatius" (preferentment > 70-80%) són els més recomanables per a aïllar els clons, ja que es redueix la possibilitat de tenir més d'una colònia per pou.

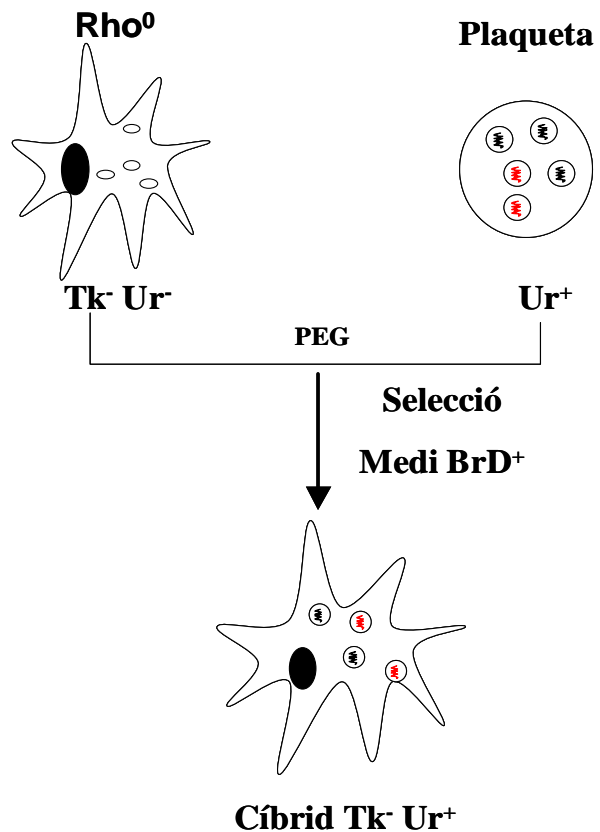


Fig. 3.1: Esquema del procés de generació dels Cíbrids Transmitocondrials a partir de plaquetes de pacients.

Per a transferir cada colònia, primer es rentava el pou amb 0,2 ml de TD. Es decantava el TD i s'afegien 0,1 ml de solució de tripsina. Quan les cèl·lules començaven a desenganxar-se, es transferien directament amb una pipeta Pasteur a una càpsula de Petri de 35 mm que contenia 2 ml de medi selectiu.

3.2.2 Bioquímica dels Enzims OXPHOS en Cíbrids Transmitocondrials

Férem créixer 5×10^6 cèl·lules en subconfluència. Les rentàrem dues vegades amb PBS 1X, i els hi afegírem solució de tripsina-EDTA 1X. Deixàrem incubant uns 3 minuts a l'estufa a 37°C i 5% CO₂, i quan les cèl·lules ja s'havien desenganxades, afegírem medi de cultiu amb SFB per a neutralitzar l'efecte de la tripsina, i les passàrem a un tub Falcon de 15 ml per a centrifugar-les a 1300 r.p.m durant 5 minuts. Retiràrem el sobranadant i férem dos rentats amb PBS1X, sempre centrifugant a 1300 r.p.m durant 5 minuts. El pellet final es resuspengué en medi SETH (sacarosa 250 mM, EDTA 2 mM, Tris-HCl 10 mM, heparina 50 U/ml). Seguidament, rompérem les cèl·lules per ultrasonicació al 50% "duty-cycle" (Ultrasonic Inc, Farmington, N.Y.) durant 3 minuts. Les mostres es podien guardar a -80°C fins al moment de fer les determinacions.

Per fer les determinacions enzimàtiques dels enzims de la cadena respiratòria, procedírem igual que en l'apartat 3.1.2. El contingut proteic de les mostres es va determinar amb el kit Coomassie Plus Protein Assay (Pierce, Rockford, IL, USA), basat en el mètode de Bradford.

3.2.3 Activitats Enzimàtiques dels Enzims Antioxidants

El procés d'obtenció de la mostra sempre fou el mateix per tots els enzims estudiats. Es feren créixer fins a la subconfluència 40×10^6 cèl·lules. Es recolliren per tripsinització (veure apartat 3.2.2), es rentaren dues vegades amb PBS1X i es resuspengueren en PBS 1X a una concentració de 40×10^6 cèl·lules/ml. Seguidament, rompérem les cèl·lules per ultra-sonicació durant 6 minuts al 50%, "duty-cycle" (Ultrasonic Inc, Farmington, N.Y.). Centrifugàrem les cèl·lules a 14000 r.p.m durant 15 minuts per descartar el material insoluble que quedava retingut en el pellet. A partir del sobranadant férem les determinacions enzimàtiques.

Com en el cas de les determinacions enzimàtiques de la via OXPHOS, el contingut proteic de totes les mostres es va mesurar amb el kit comercial Coomassie Plus Protein Assay (Pierce, Rockford, IL, USA).

3.2.3.1 Activitat Superòxid dismutasa (SOD)

L'activitat SOD total es mesura espectofotomètricament seguint el mètode de Mc Cord i Fridovich (Mc Cord i Fridovich, 1969). Consisteix en una mesura indirecta: La reducció del citocrom C (equació c) és deguda a la producció d'anió superòxid (O_2^-) per la xantina oxidasa (XOD) en presència d'un donador d'electrons (xantina, hipoxantina, acetaldehid, etc.) (equació a). Aquesta reacció és inhibida per la superòxid dismutasa que competeix pel mateix substracte, l'anió superòxid (equació b):



Es mesura la producció de citocrom C reduït Total (sense presència de SOD), i llavors es calcula el percentatge de inhibició de la mostra (amb SOD), que és proporcional a la quantitat d'anió superòxid que s'ha convertit en $H_2O_2 + O_2$, efecte de l'activitat SOD.

$$\% \text{ INHIBICIÓ} = [(\Delta A \text{ total} - \Delta A \text{ mostra}) / \Delta A \text{ total}]$$

L'activitat SOD-Mn es pot calcular de manera independent afegint a la reacció 1 mM de cianida potàssica (KCN), que és un inhibidor de la SOD-CuZn (Oberley i col., 1984). Fent la diferència amb la SOD total, sabem l'activitat SOD-CuZn.

Solucions:

- Solució A: (Tampó Fosfat 0,216 M, pH 7,8): 7,3489 g de KH_2PO_4 en 250 ml de H_2O .
- Solució B: (EDTA- Na_2 10,7 mM): 99,57 mg en 25 ml d'aigua bidestil·lada.
- Solució C: (Citocrom C 1.1 mM): 13,62 mg en 1 litre d'aigua bidestil·lada. Es prepara en fresc.
- Solució D: (Xantina 0,108 mM): 18,8 mg en 1 litre d'aigua bidestil·lada.
- Solució E: (NaN_3 10 mM): 65,01 mg en 100 ml d'aigua bidestil·lada.
- Solució F: Cocktail de reacció: 25 ml sol·lució A, 1 ml de B, 1 ml de C, 50 ml de D, 10,7 ml de E i 1,6 ml d'aigua bidestil·lada.
- Solució G: (KCN 10mM): 65,12 mg de KCN en 100 ml d'aigua bidestil·lada.
- Solució H: (Xantinoxidasa): 25 μ l en 7 ml d'aigua bidestil·lada.

Les condicions de les reaccions foren les següents:

	Total	SOD total	SOD-Mn
Solució F	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Solució G (KCN)	---	---	0,3 ml
Aigua Destil·lada	0,4 ml	0,3 ml	
Mostra o Standard		0,1 ml	0,1 ml
Xantina Oxidasa	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Es llegia a 550 nm durant 5 minuts a 25 °C			

Férem una corba de referència a partir d'al·lqüotes de 13,5 U/ml de SOD (Stock). Prepararem les següents dil·lucions:

U/ml	Stock (µl)	H₂O (µl)
Solució 10	200	200
Solució 8	160	240
Solució 6	120	280
Solució 5	100	300
Solució 4	80	320
Solució 3	60	340
Solució 2	40	360

La corba de referència es va representar gràficament en forma exponencial. La variable dependent eren les unitats teòriques i la variable independent el percentatge de inhibició. La mostra havia de tenir un % de inhibició entre el 30 i el 60%, en cas d'activitats superiors havíem de dil·luir la mostra.

3.2.3.2 Activitat Catalasa

Es basa en determinar directament la descomposició del peròxid d'hidrogen (H₂O₂) en presència de catalasa. Es mesura espectofotomètricament la disminució d'absorbència a 240 nm ($E_{240} = 0,00394 \pm 0,0002 \text{ l} \times \text{mm}^{-1}$). La diferència d'absorbència (ΔA^{240}) és la mesura de l'activitat catalasa a 20°C i pH 7, en cuvetes de 10 mm. La reacció és la següent:



Solucions:

- Tampó Fosfat (50 mmol/l; pH 7):
 - a) 6,81 g KH₂PO₄ en 1 litre d'aigua,
 - b) 7,9 g de Na₂HPO₄ en 1 litre d'aigua
 Es mesclaren les solucions a) i b) en una proporció de 1:1.5
- Solució de Peròxid d'Hidrogen (10 mmol/l): Es dil·luïren 0,075 ml de peròxid d'hidrogen 30% (Sigma) en 50 ml de tampó fosfat.

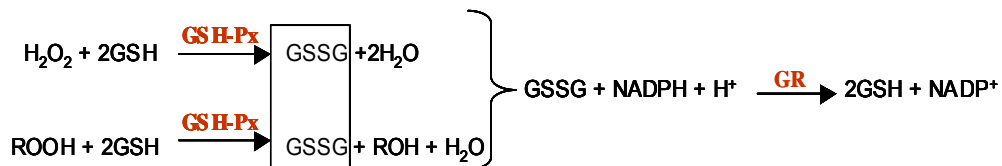
Condicions de la reacció: es va llegir en front d'un blanc que contenia la solució d'enzim, però no substrate. Pipetejàrem successivament en la cubeta:

	Blanc	Mostra
Tampó Fosfat	2,90 ml	-----
Mostra	0,10 ml	0,10 ml
Solució de H ₂ O ₂	-----	2,90 ml

La reacció va començar en afegir el H₂O₂. L'absorbència inicial havia de ser aproximadament A= 0,500. Monitoritzàrem la caiguda de l'absorbència durant 2 minuts.

3.2.3.3 Activitat Glutatió peroxidasa (GSH-Px)

L'activitat GSH-Px fou mesurada pel mètode de Lawrence i Burk (Lawrence i Burk, 1976) (modificació del mètode de Paglia i Valentine, 1967), en el qual l'activitat GSH-Px va acoplada a l'oxidació de la nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat (NADPH) per la glutatió reductasa (GR). L'oxidació del NADPH es mesura espectrofotomètricament a 340 nm a 37°C. Utilitzant t-butilhidroperòxid o H₂O₂ com a substrate es determina l'activitat glutatió peroxidasa seleno-dependen (Se-GPx), i amb l'hidroperòxid de cumé es determinen conjuntament tant l'activitat seleno-dependen, com la no-seleno-dependen. Les reaccions són les següents:



Solucions:

- Tampó Fosfat Potàssic 50mM pH 7:
 - a) Es dissolgueren 6,8045 g de KH₂PO₄ en 1 litre d'aigua bidestil·lada
 - b) Es dissolgueren 8,710 g de K₂HPO₄ en 1 litre d'aigua bidestil·lada
 Mesclàrem 615 ml de la solució a) amb 385 ml de b), i dissolguérem 292,25 mg d'EDTA. Ajustàrem el pH a 7.
- Solució NaN₃ 5mM: Dissolguérem 32.5 mg de NaN₃ en 100 ml de la solució tampó fosfat.
- Solució NADPH 1mM: Dissolguérem 8,33 mg de NADPH en 10 ml de solució tampó fosfat.
- Solució de GSH-Reductasa: Dil·luírem 24 µl de GSH-reductasa en 135,8 µl de tampó fosfat.

- Solució de GSH 5mM: Dissolguérem diàriament 15,36 mg de GSH en 10 ml de tampó fosfat.
- Hidroperòxid de Cumé 7,5 mM: Dil·luïrem 35,7 µl en 25 ml de tampó fosfat.
- t-butilhidroperòxid 1,5 mM: Dil·luïrem 19,3 µl en 100 ml de tampó fosfat.

Les condicions de la reacció foren les següents:

- Tampó Fosfat Potàssic	50 mM
- EDTA Na ₂	1 mM
- NaN ₃	0,2 mM
- NADPH	1 mM
- GSSG Reductasa	2 Unitats
- GSH	1 mM
- Hidroperòxid de Cumé	1,5 mM
- t-Butilhidroperòxid	10 mM

Es va procedir de la següent manera:

NaN ₃ 5 mM	0,2 ml
NADPH 1mM	0,2 ml
GSH 5 mM	0,2 ml
GSSG Reductasa (0,312 U/µl)	6,4 µl
Mostra o Tampó Fosfat (Blanc)	0,1 ml
Tampó Fosfat Potàssic	0,1 ml
Agitàrem i deixàrem incubant 5 minuts a 37°C. Tot seguit afegírem el substracte:	
Hidroperòxid de Cumé o	0,2 ml
t-Butilhidroperòxid	0,2 ml

Calculàrem la disminució d'absorbència per minut i es restà a la lectura de la mostra el blanc:

$$U/mg \text{ proteïna} = \Delta A / \text{minut} * (VF/VM) * (1/6,22) * (1/mg \text{ prot})$$

Si el VM (volum de la mostra) és 0,1 ml i el VF (volum final) és 1 ml:

$$U/mg \text{ proteïna} [(\Delta A / \text{minut}) / 0,622 * mg \text{ proteïna}]$$

3.2.4 Anàlisi de Western Blot

- Extracció de proteïnes a partir de cultiu cel·lular de cíbrids transmitocondrials:

Cultivàrem fins a la confluència 10x10⁶ cèl·lules. Les desenganxàrem de la placa amb l'ajuda d'un "scraper" i en PBS 1X. Les dipositàrem en un tub Falcon de 15 ml. Seguidament centrifugàrem a 1300 r.p.m durant 5 minuts. Per lisar les cèl·lules i

eliminar la fracció lipídica, el pellet es resuspengué en 500 ml de medi RIPA (PBS 1X; 1% Nonidet P-40; 0,1% Deoxicolat Sòdic; 0,1% SDS) i s'afegiren els inhibidors de proteases aprotinina (1µg/ml), leupeptina (5µg/ml), Na₃VO₄ (100µM), i fenilmetilsulfonilfluorida (0,3 mM). S'incubà en gel durant 30 minuts. Passat aquest temps es centrifugà a 14000 r.p.m durant 20 minuts a 4°C, per a eliminar el material insoluble. El sobranadant és el lisat cel·lular total.

La concentració de proteïnes de les mostres van ser mesurades utilitzant el kit Coomassie Plus Protein Assay (Pierce, Rockford, IL, USA).

El Western Blot es va realitzar seguint les passes següents:

- 1.- Electroforesi. 10 µg de proteïna de cada mostra es varen escalfar a 95°C durant 5 minuts i es varen carregar en un gel 10% SDS-poliacrilamida per separar les proteïnes en condicions reductores aproximadament a 40-50 mA durant 1 hora. En el cas de la SOD-Mn, i amb l'objectiu de poder quantificar millor, es carregaren 5-10 i 20 µg de cada mostra.
- 2.- Transferència: Tot seguit les proteïnes es transferiren del gel de poliactilamida a una membrana de PVDF (Schleicher&Schuell, Dassel, Germany) a 400 mA durant 75 minuts.
- 3.- Bloqueig d'unions inespecífiques: La membrana es va incubar en solució de bloqueig (5% de llet descremada, 0,01% Tween-20 en PBS 1X) durant 2 hores a temperatura ambient i en agitació.
- 4.- Incubació amb l'anticòs primari: La membrana s'incubà a 4°C durant tota la nit en solució de bloqueig que contenia l'anticòs primari. En el cas de l'anticòs anti-catalasa, es va utilitzar un anticòs monoclonal de l'isotip IgG1 de ratolí a una concentració de 0,5 µg/ml (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri). Pel que fa a l'anticòs anti-SOD-Mn, es va utilitzar un anticòs monoclonal de l'isotip IgG d'ovella a una concentració de 1µg/ml (Research Diagnostics, Flanders, NJ), i pel que fa a l'anticòs anti-SOD-CuZn es va emprar un policlonal d'ovella a una concentració de 1µg/ml (Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden, Germany).
- 5.- Rentats: Després de deixar atemperar la membrana a temperatura ambient, es feren tres rentats amb PBS 1X de 15 minuts cadascun i en agitació.
- 6.- Incubació amb l'anticòs secundari. Les membranes van ser incubades a temperatura ambient durant 1 hora i en agitació amb la solució de bloqueig que contenia l'anticòs secundari, que era un anticòs policlonal de conill peroxidasa conjugat (1/10000) pel que fa a la catalasa, i un anticòs d'ase peroxidasa conjugat (1/10000) en el casos de SOD-Mn i SOD-CuZn.

7.- Rentats: Es van fer cinc rentats amb la solució de rentat (0,01 % Tween-20 en PBS 1X) de 10 minuts cadascun i amb agitació.

8.- Detecció del marcatge: Les bandes immunoreactives es varen visualitzar amb el kit quèmiluminiscent ECL+Plus[®] (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK). Les membranes s'exposaren amb el film Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK).

9.- Quantificació: El film fou escanejat i quantificat amb el programa Quantity One[®] (BioRad, Hercules, CA). Mesuràrem el volum de la taca observada per cada mostra (contes/mm²) i es feu el quocient amb el volum observat per la taca de l'actina.

3.2.4.1 Re-hibridació de la membrana de PVDF amb l'anticòs anti-actina

Amb la finalitat de normalitzar els Westerns per a poder quantificar amb exactitud la quantitat de proteïna, es va deshibridar la membrana de PVDF i es va procedir a fer un nou Western amb un anticòs contra la proteïna actina, que és d'expressió ubiqüa. Per a deshibridar la membrana procedírem de la següent manera:

1.- Preservàrem la membrana a 4°C en la solució de rentat (PBS 1X, 0,1% Tween-20) fins al moment de la deshibridació.

2.- Es va rentar la membrana en solució de rentat durant 20 minuts a temperatura ambient.

3.- Es va deshibridar la membrana incubant-la en Immuno-Blot Strip Buffer (2% SDS, 62,5 mM Tris-HCl pH 6.8, 100 mM 2-mercaptoetanol) durant 20 minuts a 58°C en un forn d'hibridació.

4.- Es feren cinc rentats de cinc minuts cadascun en 50 ml de solució de rentat.

5.- A partir d'aquí es va procedir a fer el western blot, tal i com s'explica en l'apartat 3.2.4. Cal dir que l'anticòs primari utilitzat fou un anti-actina policlonal de conill (1/500) (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri), i l'anticòs secundari un anticòs policlonal de ratolí peroxidasa conjugat (1/10000).

4. Resultats

4.1. Diagnòstic de pacients

4.1.1 Pacient 1: La pacient 1 presentava severa miopatia associada a diabetis mellitus i sordesa d'herència materna (veure figura 4.1.2A). La combinació de Diabetis mellitus més sordesa d'herència materna s'ha associada a mutacions restringides bàsicament a tres gens mitocondrials: el tRNA^{Leu (UUR)}, el tRNA^{Ser (UCN)} i el tRNA^{Ser (AGU/C)} (DiMauro i col., 1998). Vàrem procedir a seqüenciar directament aquests tres gens, trobant la transició A a G a la posició 3243 del tRNA^{Leu (UUR)} (figura 4.1.1).

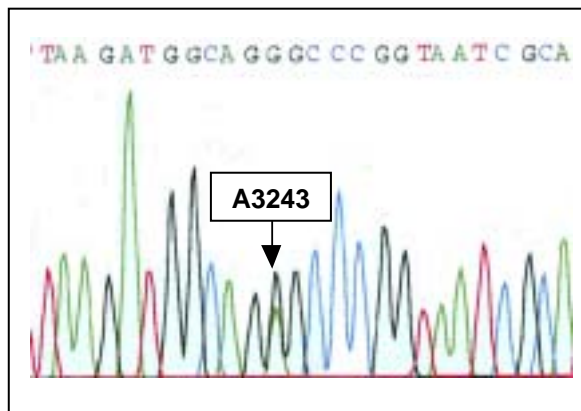


Fig.4.1.1: Electroferograma del gen tRNA^{Leu(UUR)} de la pacient 1, on es pot apreciar la mutació A3243G en heteroplàsmia.

La RFLP amb els membres de la família descrits en el *pedigree* (figura 4.1.2), va mostrar que la pacient tenia el 80% del mtDNA mutat en el múscul i el 53% en la sang. Els membres de la família que actualment són asimptomàtics, també presentaven la mutació en sang, en alguns casos en percentatges molt elevats, com és el cas del fill de la pacient (84% del mtDNA mutat) (figura 4.1.2B).

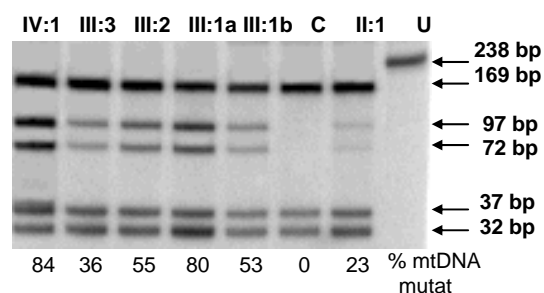
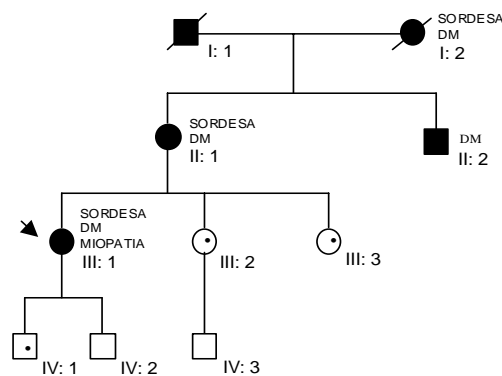


Fig.4.1.2: A) *Pedigree* amb els membres de la família de la pacient 1 (indicada amb la fletxa). Els individus colorejats de negre presenten afectació o bé de diabetes o bé de sordesa o ambdues, tal i com s'indica (DM= Diabetes mellitus). • indica que l'individu porta la mutació causal de la patologia, però no la manifesta fenotípicament.

B) Anàlisi de RFLP amb els membres de la família descrits a la figura 2a. En absència de la mutació, *Hae III* talla el fragment original de 238 bp en tres fragments de 169, 34 i 32 bp. La mutació genera una nova diana per l'enzim, que talla el fragment de 169 bp en dos fragments de 97 i 72 bp. III:1a= Múscul de la pacient; III:1b= Sang pacient 1; U= Fragment sense tallar; C= Múscul control.

4.1.2 Pacient 2: La pacient 2 estava afectada de lipomes múltiples i el pedigree familiar suggeria que podien ser d'herència materna (fig. 4.1.4A).

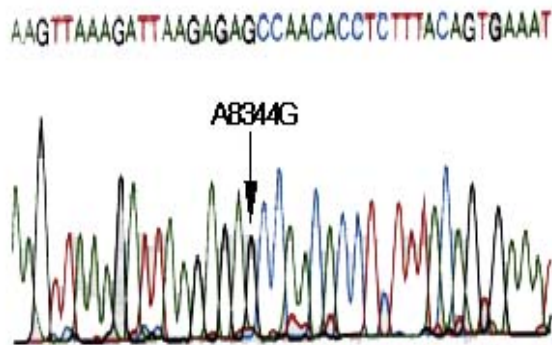


Fig. 4.1.3: Electroferograma de la seqüència del tRNA^{Lys} de la pacient 2, on s'aprecia la mutació A8344G.

Seqüenciàrem el gen del tRNA^{Lys} i trobàrem la mutació A8344G en el mtDNA procedent de biòpsia de lipoma (figura 4.1.3).

La RFLP, amb els membres de la família de la pacient 2 descrits en el pedigree (fig.4.1.4A), va demostrar que la mutació també estava present en la sang de tots els individus afectes (figura 4.1.4B). La pacient 2 (III:2, en el pedigree) tenia un 91% de genomes mutats en el lipoma, un 78% en el múscul i un 87% en sang. També estudiàrem tres teixits de la seva mare (II:2, en el pedigree); en el lipoma tenia el 99% dels genomes mutats, el 78% en el múscul, i en la sang el 87%.

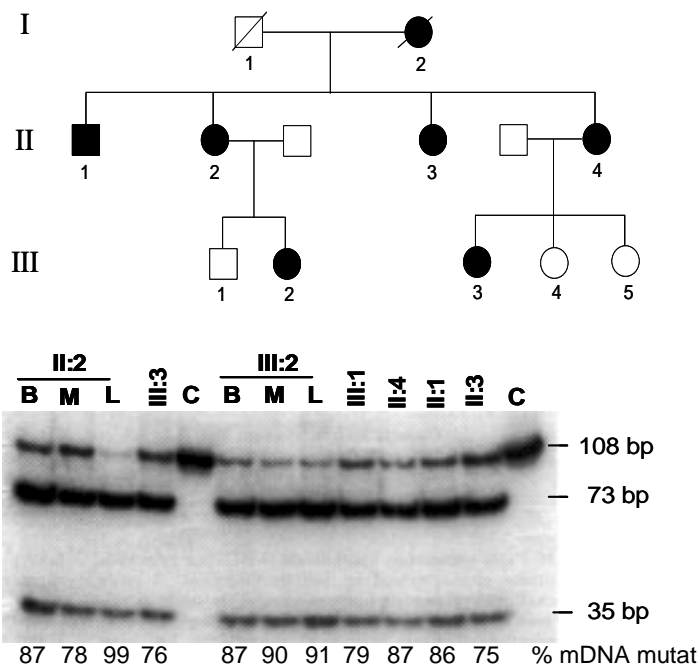


Fig. 4.1.4: A) Pedigree de la família de la pacient 2 (III:2). Els individus afectes estan colorejats en negre, i els no afectes en blanc. B) Anàlisi de RFLP de la família de la pacient 2. La mutació genera una diana de tall per l'enzim de restricció *Bgl I*, que digereix el fragment original de 108 bp en dos fragments de 73 i 35 bp, respectivament. En la pacient 2 (III:2), i en la seva mare (II:2), B= sang; M= múscul i L= lipoma. C= mtDNA extret de sang de controls. En la resta de pacients estudiats en el pedigree, el mtDNA fou extret de sang.

4.1.3 Pacient 3: La pacient 3 presentava un quadre multisistèmic que s'havia anat complicant amb l'edat, amb afectació de molts òrgans i teixits, incluint el SNC (veure apartat 3.1.1.3).

L'estudi de la biòpsia muscular va mostrar una activitat SDH normal, sense RRFs, però amb un marcat dèficit de COX, només el 10% de les fibres tenien activitat citocrom oxidasa (figura 4.1.5).

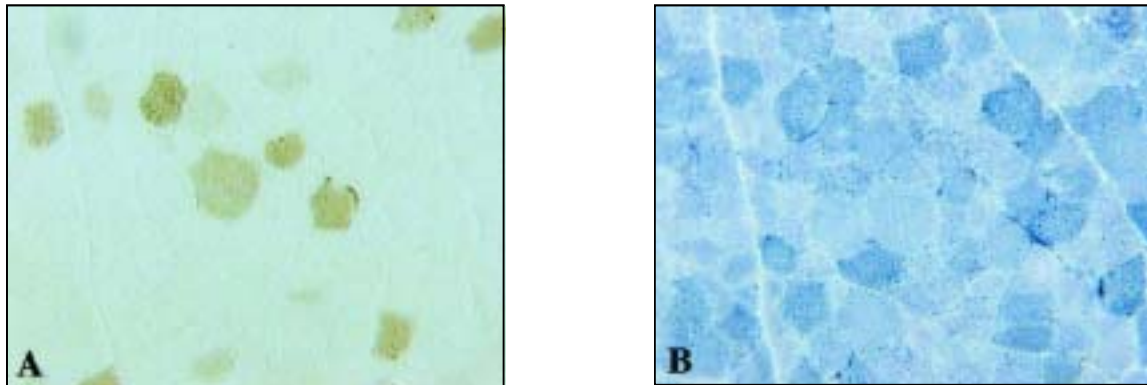
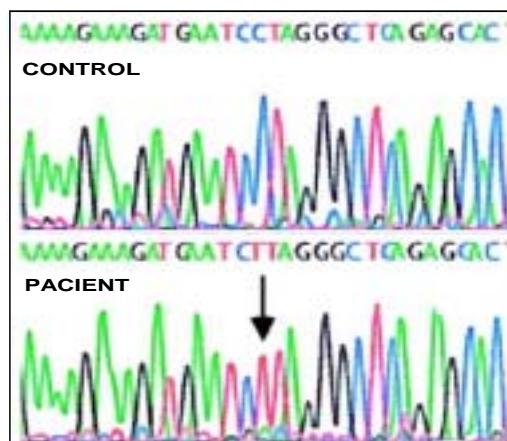


Fig. 4.1.5: Histoquímica del múscul de la pacient 3. A) Tinció per l'activitat COX, on s'aprecia una marcada reducció de fibres COX positives. B) Tinció per l'activitat SDH normal

L'anàlisi bioquímic dels enzims de la cadena respiratòria va mostrar un descens del 90% en l'activitat del complex IV de la cadena respiratòria, al compararlo amb valors control ($0.22 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ teixit; valors normals 2.8 ± 0.52). Aquest dèficit era aïllat per COX, la resta de complexos de la cadena respiratòria presentaven activitats normals.



Es va decidir seqüenciar les tres subunitats codificades pel mtDNA del complex IV (COX I, II i III), trobant la transició G6930A en el gen de la subunitat I de la COX (figura 4.1.6). La mutació canviava una glicina (GGA) per un codó de terminació (AGA), provocant la pèrdua dels darrers 170 aminoàcids de la regió C-terminal de COX I.

Fig. 4.1.6: Electroferograma del gen COX I, mostrant la seqüència de DNA provinent de múscul d'un control i de múscul de la pacient 3. La seqüència es va fer emprant un primer revers, així la transició G a A a la posició 6930, apareix com C a T en la seqüència reversa (indicada amb una fletxa).

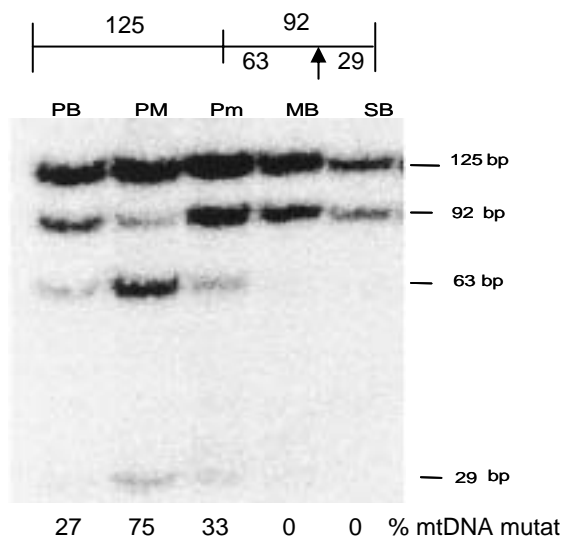


Fig. 4.1.7: Anàlisi de RFLP de la mutació G6930A a la pacient 3. La mutació genera una diània de tall per l'enzim *Alu I* que talla el fragment de 92 bp en dos fragments de 63 i 29 bp, respectivament (veure esquema).

4.1.4 Pacient 4: L'oftalmoplegia externa progressiva (CPEO) esporàdica típicament s'associa a deleccions simples i múltiples en el mtDNA. Férem un Southern blot per a poder detectar dites deleccions, però aquest fou negatiu (dades no mostrades). La biòpsia muscular va desvetllar unes poques RRFs que es no es tenyien per l'activitat COX (figura 4.1.8).

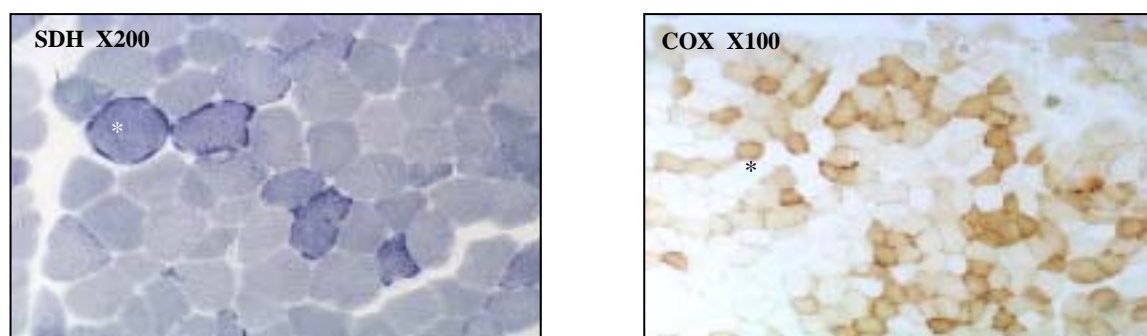
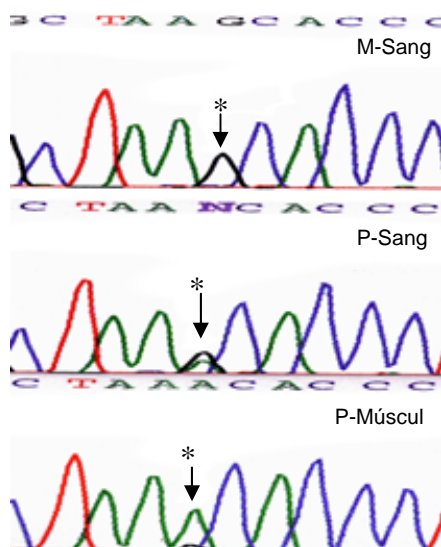


Fig.4.1.8: Morfologia de la biòpsia muscular de la Pacient 4. La tinció per l'activitat SDH (succinat deshidrogenasa) reflexa l'acúmulo de mitocòndries anormals a la perifèria de les fibres musculars (RRFs), indicades amb un asterisc. Les RRF no es tenyiren per l'activitat COX (citocrom c oxidasa). X200 i X100= imatge a 200 i a 100 augments, respectivament.

La clínica de la pacient, quadre multisistèmic amb ptosis palpebral i fatigabilitat muscular, ens va suggerir que el defecte molecular podia estar en un tRNA.



Després de seqüenciar els 22 tRNAs del mtDNA a partir de DNA extret de la biòpsia muscular, vàrem trobar la transició G a A a la posició 5703 del tRNA^{Asn} (figura 4.1.9). Paral·lelament seqüenciàrem la sang de la mare com a control negatiu. Com es pot apreciar a la figura 4.1.9, la mutació G5703A s'expandeix i s'acumula en el teixit post-mitòtic, el múscul, de la pacient.

Fig. 4.1.9: Seqüència del tRNA^{Asn} del mtDNA provinent de sang de la mare de la pacient 4 (M- Sang), de sang de la pacient 4 (P-Sang) i del múscul de la pacient 3 (P-Múscul). La fletxa indica la mutació G5703A.

El RFLP, amb tots els membres de la família, va desvetllar que es tracta d'un cas esporàdic, ja que la mutació només es troba a la pacient (fig. 4.1.10). En el múscul presentà un 95% de genomes mutats i en sang un 48% .

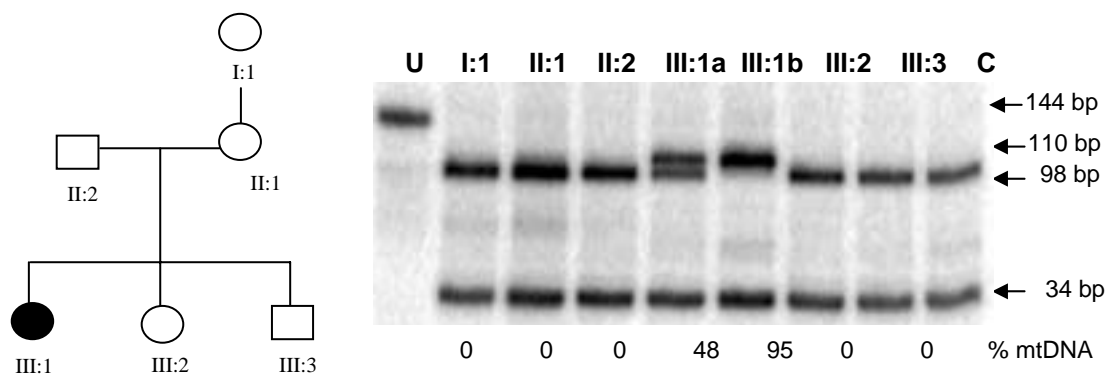


Fig.4.1.10: Anàlisi de RFLP de la mutació G5703A a la família de la pacient 4. *DdeI*, en absència de la mutació, talla el fragment original (144 bp) en tres fragments de 98, 34 y 12 bp. La mutació romp una diana per a *DdeI*, que llavors només talla el fragment original de 144 bp en dos fragments de 110 i 34 bp, respectivament. U= fragment sense tallar; C= mtDNA de múscul control; III:1a: sang pacient; III:1b: múscul pacient.

4.1.5 Pacient 5: Aquesta pacient presentava un quadre de severa intolerància a l'exercici, afectació restringida al múscul esquelètic, sense cap altre tipus de símptomatologia. Només un discret augment dels nivells de lactat en sang, que eren

més evidents després de realitzar exercici aeròbic, va suggerir afectació mitocondrial i decidir fer una biòpsia. La biòpsia muscular va desvetllar moltes RRFs que no es tenyien per l'activitat COX (COX-negatives) (figura 4.1.11).

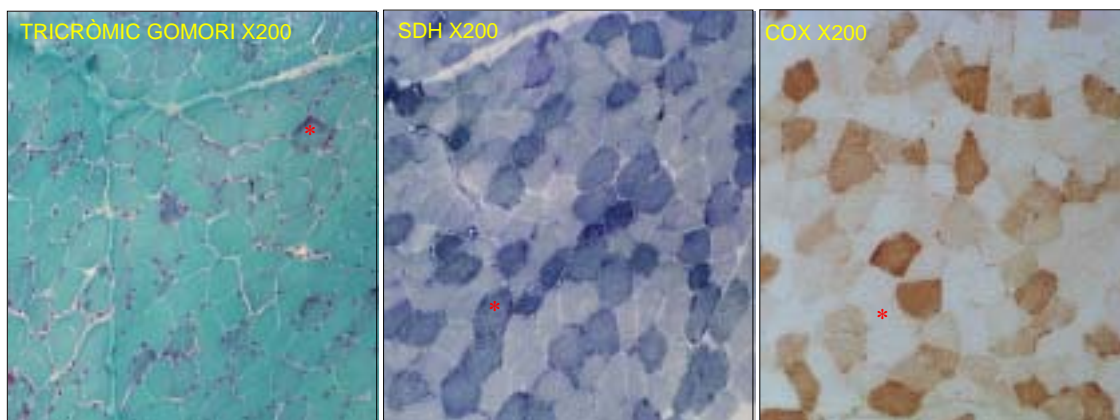


Fig. 4.1.11: Morfologia muscular de la pacient 5. Amb les tincions amb tricròmic de Gomori i amb SDH s'apreciaren les RRFs (exemples marcats amb asterisc). La tinció per la citocrom oxidasa fou negativa per les RRFs.

L'anàlisi bioquímic de la cadena respiratòria va mostrar un marcat dèficit de les activitats dels complexos III i IV (taula 4. 1.1). L'activitat citrat sintasa, indicadora del contingut mitocondrial, va estar augmentada, amb el que va quedar patent que en el múscul de la pacient hi havia hagut proliferació mitocondrial.

	Controls	Pacient 5
NADH-citocrom c reductasa (I+III)	12-56	4,5*
Succinat- citocrom c reductasa (II+III)	2-15	5,2
Succinat deshidrogenasa (II)	10-25	11,5
Decilubiquinol citocrom c oxidoreductasa (III)	55-259	16,26*
Citocrom c oxidasa (IV)	59-170	14,3*
Citrat sintasa (CS)	7-20	39,8*

Taula 4.1.1: Activitats dels enzims de la cadena respiratòria al múscul de la pacient 5. Els valors estan expressats com a nanomol·min/mg prot. Les diferències significatives estan assenyalades amb un asterisc.

Tant les dades bioquímiques obtingudes, amb dèficit combinat de dos complexos, com les dades histoquímiques, que desvetllaven que no hi havia activitat COX en les RRFs, suggerien que el defecte molecular podia estar en algun tRNA.

Després de seqüenciar els 22 tRNAs del mtDNA provinent de la biòpsia muscular, es va trobar la mutació G12334A en el tRNA^{Leu(CUN)}.

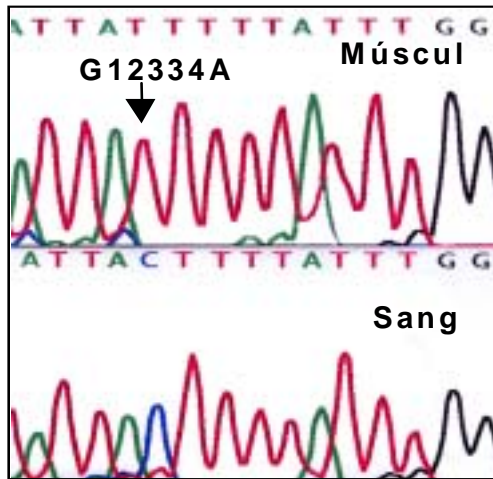


Fig. 4.1.12: Electroferograma del gen tRNA^{Leu(CUN)} mostrant la mutació G12334A en el mtDNA del múscul de la pacient 5. La seqüència es va realitzar emprant un primer invers, d'aquí que la transició G a A en la posició 12334 apareixi com C a T a la seqüència inversa.

Per a estudiar la patogenicitat de la mutació, es va fer anàlisi de RFLP amb DNA procedent de varis teixits de la pacient 5 (sang, fibroblastes, fol·licle pilós, greix subcutani i múscul) (figura 4.1.13).

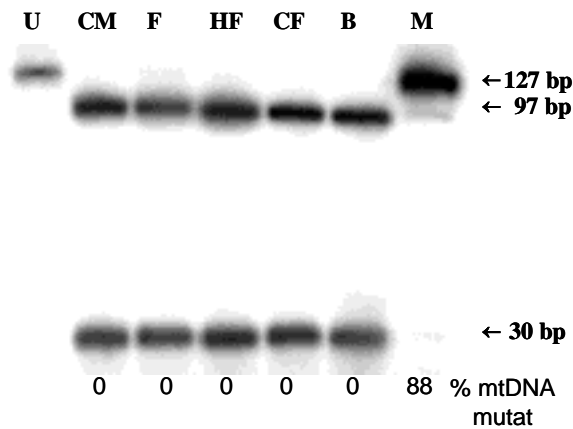


Fig. 4.1.13: Anàlisi de RFLP. *Afa I*, en absència de la mutació, talla el fragment original amplificat (127 bp) en dos fragments de 97 i 30 bp. U= fragment sense tallar; CM= múscul control; F, HF, CF, B, M= greix, fol·licles pilosos, fibroblastes, sang i múscul de la pacient.

L'anàlisi de PCR de fibra aïllada (single fiber PCR), va constatar que el percentage de la mutació era més elevat en RRFs (65%) que en non-RRFs (15%) (figura 4.1.14).

Aquesta substitució no apareixia en el mtDNA leucocitari (figura 4.1.12).

Per constatar que no es tractava de cap polimorfisme, es varen revisar 100 seqüències del banc de DNA control, sense trobar-se presència de la mutació.

Com que la mutació no creava ni destruïa cap diana per cap enzim de restricció, vàrem dissenyar un primer *mismatch* (5'-GGGTGGTTATAGTAGTGTGCATGGT TAGTA-3'), que generava una diana de tall per l'enzim *Afa I* en la seqüència salvatge. La mutació només va estar present en el múscul esquelètic, l'únic teixit afectat, i apareixia en estat heteroplàsmic. La pacient presentava el 88% de genomes mutats en el múscul.

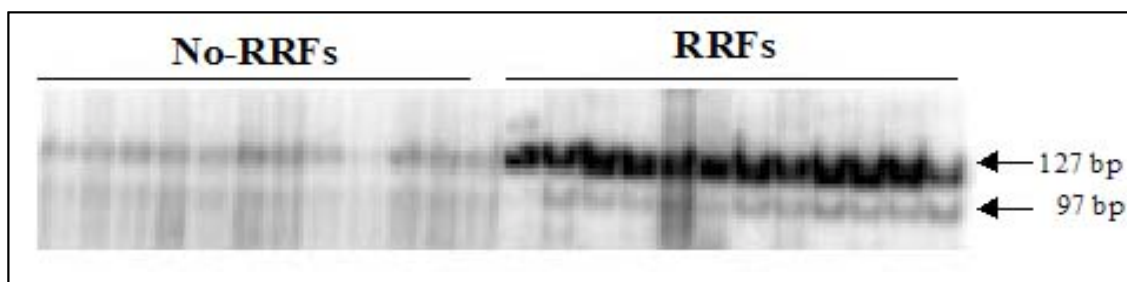


Fig. 4.1.14: Anàlisi de PCR de fibra aïllada en el múscul de la pacient 4. S'aïllaren fibres positives (RRFs) i fibres negatives (No-RRFs) per la tinció SDH.

Degut a la publicació del primer cas descrit d'herència paterna del mtDNA, associat a un pacient amb una mutació esporàdica restringida al múscul esquelètic (Schwartz i col., 2002), decidírem analitzar dita possibilitat en la pacient 5. Vàrem haplotipar-la mitjançant anàlisi de restricció enzimàtica i seqüenciació (pacient 5 anomenada 1 a la figura 4.1.15). L'haplotipatge per digestió enzimàtica va mostrar que tant el mtDNA de la sang com el del múscul eren haplotip H (fig.4.1.14).

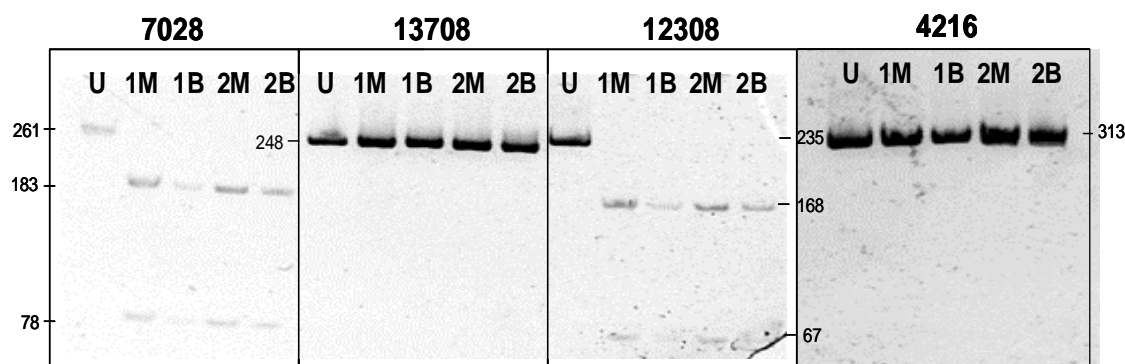


Fig.4.1.15: Haplotipatge per enzims de restricció a la pacient 5 (1, a la figura). Quatre polimorfismes (C7028T; G13708A; A12308G i T4216C) defineixen els diferents haplotips del mtDNA (Derbeneva i col., 2002). M= múscul, B= sang. 2= pacient amb la mutació G15084A en el citocrom b, també pacient 2 a la taula 4.2.

Per a descartar que algun dels dos mtDNAs no pertanyés a un subgrup diferent dins H, seqüenciàrem les regions hipervariables 1 i 2 del D-loop, trobant un únic canvi que diferia entre el mtDNA del múscul i el de la sang, el polimorfisme T72C, només present en el mtDNA del múscul (taula 4.1.2), però que no definia cap subgrup dins H (Derbeneva i col., 2002).

Férem extensiu dit anàlisi a 9 pacients més amb miopatia deguda a mutacions restringides a múscul esquelètic. Quatre pacients amb mutacions puntuals en gens estructurals, i cinc pacients amb deleccions úniques. En alguns casos disposàrem de mtDNA provinent de la mare i del pare (veure taula 4.1.2). En cap cas trobàrem evidències d'herència paterna (taula 4.1.2). Però en 4 dels 9

pacients estudiats, trobarem un únic polimorfisme diferencial entre múscul i sang (assenyalat en vermell a la taula 4.1.2). I dues reorganitzacions per delecció d'una base en múscul, en altres dos pacients amb deleccions simples.

Pacient	Mutació	Haplotip múscul	Haplotip sang	Haplotip mare	Haplotip pare	D-loop en múscul	D-loop en sang	D-loop en sang mare	D-loop en sang pare
1	G12334A	H	H	n.d.	n.d.	T72C A263G InsC309 InsC315 G16244A C16278T	/ A263G InsC309 InsC315 G16244A C16278T	n.d.	n.d.
2	G15084A	H	H	n.d.	T	T57C G185A InsC309 T16172C / /	T57C / InsC309 T16172C / /	n.d.	/ / / T16126C C16294T
3	G15168A	T	T	T	n.d.	A73G T146C G185A A183G	A73G T146C G185A /	A73G T146C G185A /	n.d.
4	G5920A	H	H	n.d.	Non H	G16129A /	G16129A /	n.d.	/ C16134T
5	G14846A	T	T	n.d.	n.a.	C16069T T16126C	C16069T T16126C	n..d.	n.d.
6	Delecció simple	H	H	n.d.	n.d.	T72C A263G InsC309 InsC315 InsG477 DelC522 DelA523 T16297C	T72C A263G InsC309 InsC315 / DelC522 DelA523 T16297C	n.d.	n.d.
7	Delecció simple	H	H	n.d.	n.d.	A73G T195C A263G C16548T (he) A16182C C16179T T16189C	A73G T195C A263G / A16182C C16179T T16189C	n.d.	n.d.
8	Delecció simple	H	H	n.d.	n.d.	C64T A73G T146C C16111T A16284G DelC309 InsC315	C64T A73G T146C C16111T A16284G / InsC315	n.d.	n.d.
9	Delecció simple	H	H	n.d.	n.d.	C16111T C16218T C16223T	C16111T C16218T C16223T	n.d.	n.d.
10	Delecció simple	H	H	n.d.	n.d.	C16223T C16234T T16249C C16278T	C16223T C16234T T16249C C16278T	n.d.	n.d.

Taula 4.1.2: Haplotips i polimorfismes en el D-Loop dels pacients amb mutacions restringides a múscul esquelètic. n.d= no disponible.

Analitzàrem, mitjançant primers “back-to-back”, la possible presència de duplicacions en el D-loop d'aquests pacients. Trobarem una duplicació de 652 bp, que corresponia a la duplicació tipus IV, segons Wei i col·laboradors (Wei i col., 1996). Dita duplicació només era present en el mtDNA del múscul, i no en la sang

(fig 4.1.16B). Seqüenciarem dita duplicació i constatarem que comprenia des del nucleòtid 314 fins al 965, englobant les caixes CSBII i CSBIII (fig.4.1.16A).

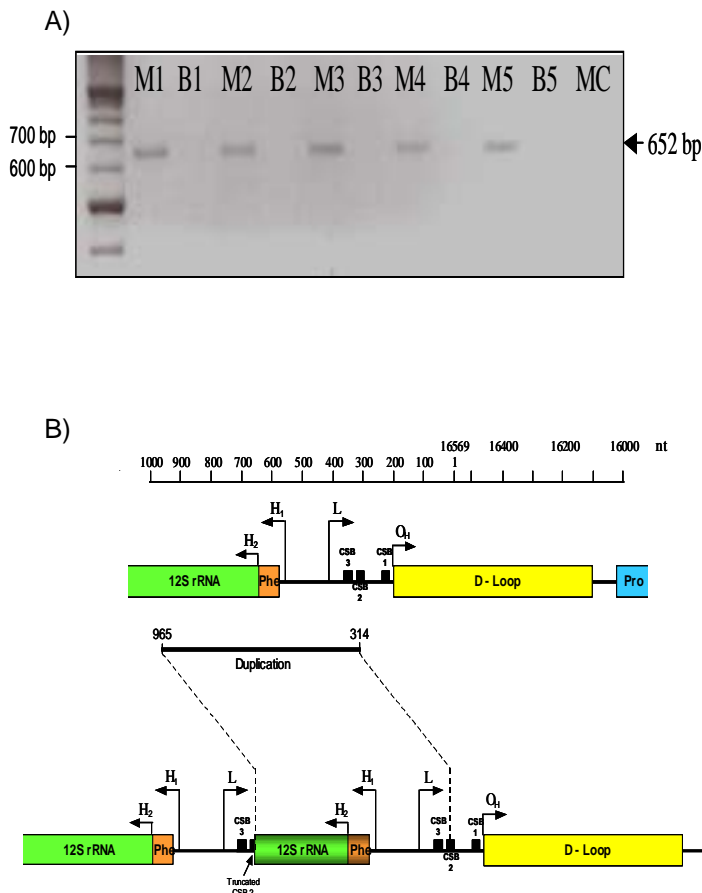


Fig.4.1.16: A) Back-to-back PCR amb els cinc pacients amb mutacions puntuals. La pacient 5 és 1. M= múscul; B= sang; MC= control de múscul. B) Estructura de la regió duplicada. H1, promotor majoritari de la cadena pesada; H2, promotor minoritari de la cadena pesada; L, promotor de la cadena lleugera; OH, origen de replicació de la cadena pesada; CSB 1, 2, i 3, caixes conservades 1, 2, i 3. El reordenament genera duplicació dels promotors de les cadenes H i L, on el major origen de replicació és conservat. També es produeix una duplicació completa del gen del tRNA^{Phe} i una duplicació parcial del gen rRNA 12S.

Per a estudiar la co-linealitat de la duplicació amb la mutació, férem PCR llarga amb primers externs a la duplicació i a la mutació. No obtinguérem diferències entre els fragments de mtDNA de múscul i de sang. El tamany de les bandes obtingudes en els dos casos corresponia al fragment sense duplicar (dades no mostrades).

4.1.6 Pacient 6: El pacient 6 estava afectat de necrosi bilateral de l'estriat, però no presentava història familiar de malalties neurodegeneratives. S'han descrit casos de BSN associats a mutacions en gens del mtDNA, bàsicament en polipèptids del complex I (ND6 i ND4) i de l'ATPasa (ATPasa 6 i ATPasa 8). Amb la finalitat de discernir si la BSN podia ser d'origen mitocondrial, decidírem estudiar la biòpsia muscular. La immunohistoquímica va desvetllar unes poques RRFs, suggestives de disfunció mitocondrial. Interessantment, la tinció per la COX va desvetllar una mena d'incursions al interior de la fibra muscular, que suggerien poder ser de naturalesa lipídica.

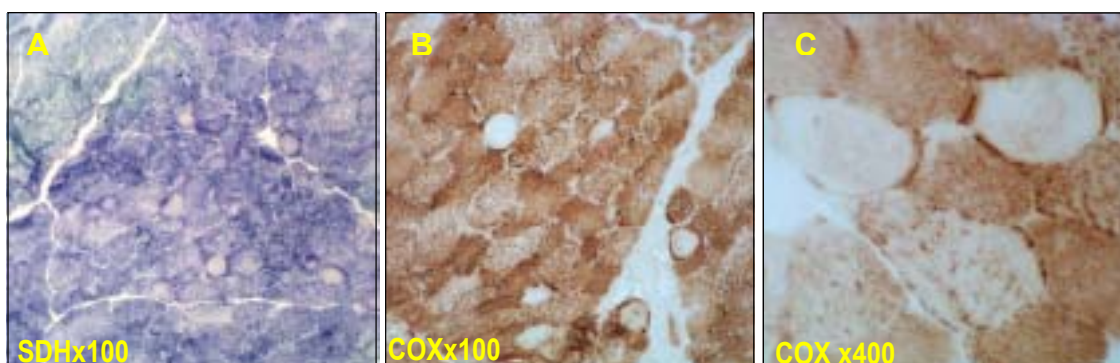


Fig. 4.1.17: Morfologia muscular del pacient 6. A) La tinció histoquímica per l'activitat SDH desvetllà unes poques RRFs. B) La tinció per l'activitat COX fou positiva, però va permetre observar amb més detall les poques fibres que només presentaven activitat oxidativa a la perifèria. C) Detall a més augment de les fibres sense activitat oxidativa en el citoplasma. x100= 100 augments; x400= 400 augments.

L'anàlisi bioquímic dels enzims de la cadena respiratòria va mostrar dèficit aïllat del complex I (taula 4.1.3), suggerint que el defecte molecular podia estar en algun gen del mtDNA codificant d'algun polipèptid component de la NADH-deshidrogenasa. Els valors de citrat sintasa foren elevats, però dins el rang de la normalitat.

	Controls	Pacient 6
NADH-citocrom C reductasa (I+III)	12-56	4,93*
Succinat deshidrogenasa (II)	10-25	9,33
Decilubiquinol citocrom C oxidoreductasa (III)	55-259	73,79
Citocrom C oxidasa (IV)	59-170	99,9
Citrat sintasa (CS)	7-20	19,8

Taula 4.1.3: Activitats dels enzims de la cadena respiratòria al múscul del pacient 6. Els valors estan expressats com a nanomol·min/mg prot. Les diferències significatives estan assenyalades amb un asterisc.

Després de seqüenciar els gens del mtDNA codificants pels polipèptids del complex I de la cadena respiratòria, es va trobar la transició T a C a la posició 14487 en el gen que codifica per la subunitat ND6 (figura 4.1.18).

La mutació apareixia en estat d'heteroplàsmia tant en el múscul del pacient com en la sang de la mare (figura 4.1.18), i era un canvi no reportat a la literatura. Es seqüenciaren 150 mtDNAs control d'individus sans i no es va detectar base mutada en cap d'ells.

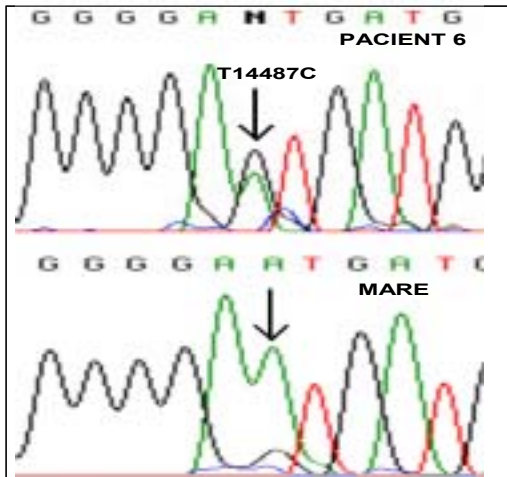


Fig. 4.1.18: Electroferograma de la seqüenciació automàtica del gen ND6 (cadena H). Es va emprar un iniciador revers, d'aquí que la mutació T14487C apareix a la seqüència com un canvi de A a G.

La seqüència superior correspon al mtDNA del múscul del pacient 6, i la seqüència inferior al mtDNA de la sang de la mare, on s'aprecia més quantitat de genomes normals.

Per estudiar la patogenicitat de la mutació es va fer anàlisi de RFLP. Com que la mutació no creava ni destruïa cap lloc de tall per un enzim de restricció, vàrem dissenyar un iniciador *mismatch* revers (5'-GTTTTTTTAATTTATTTAGCTGGA-3'), que, en presència de la mutació, genera un punt de tall per l'enzim *Gsu I*. La mutació T14487C era heteroplàsmica, presentant-se amb una elevada proporció de genomes mutats en el múscul (93%).

Es mesurà el percentatge de mutació en dues mostres de sang del pacient, una extreta l'any 1995 (77% de mtDNA mutat) i l'altra l'any 2001 (67% de mtDNA mutat). La mutació també era present en la sang de la mare (26% del mtDNA mutat) (figura 4.1.19). L'estudi d'aquest pacient es va fer en estreta col·laboració amb el grup del Dr. Montoya, de la Universitat de Saragossa. Alhora que estudiàvem el pacient 6, identificaren la mateixa mutació T14487C en un altre pacient afectat de BSN (pacient 2 en l'anàlisi de RFLP, figura 4.1.19).

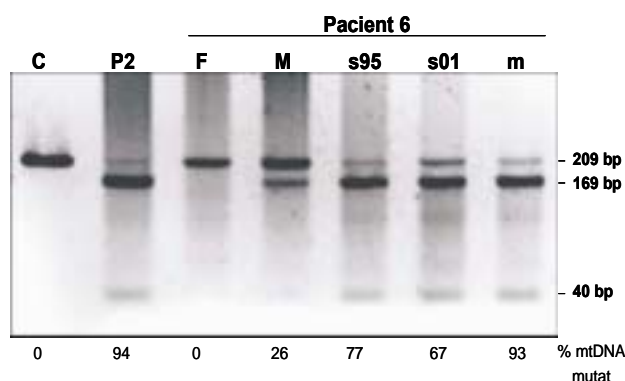


Fig. 4.1.19: Anàlisi de RFLP de la mutació T14487C en la pacient 6. En presència de la mutació el fragment de 209 bp és digerit per l'enzim *Gsu I* en dos fragments de 169 i 40 bp, respectivament. C= mtDNA control provinent de múscul; F= pare del pacient 6 (sang); M= Mare de la pacient 6; S95 i S01= sang del pacient 6, extreta al 1995 i al 2001, respectivament; m= múscul del pacient 6. P2= sang d'un segon pacient afectat de BSL, portador de la mutació T14487C (estudiat pel grup del Dr. Montoya).

4.2 Estudi dels mecanismes de patogenicitat. Generació de cíbrids transmitocondrials.

S'aïllaren plaquetes dels pacients 1, 2, 3, 4 i 6, i es fusionaren amb cèl·lules ρ^0 , tal i com s'explica en detall a l'apartat 3.2.1. Després de la fusió les cèl·lules es feren créixer en medi selectiu, per a posteriorment mesurar el percentatge de mutació de cada clon per RFLP. Com a exemple s'il·lustra a continuació l'anàlisi per RFLP dels clons generats de la pacient 4 (fig.4.2.1).

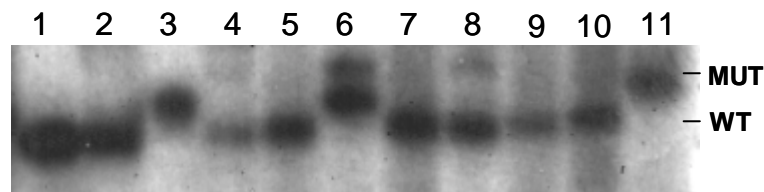


Fig. 4.2.1: Anàlisi de RFLP per la mutació G5703A dels clons de la pacient 4. La mutació trenca una diana per l'enzim *DdeI* (veure fig.4.10). La banda mutant (MUT) correspon a 110 bp, i la banda salvatge (WT) és de 98 bp. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 i 11: Clons analitzats. El clon que es va triar com a 100% mutant fou l'11, i el clon 0% mutant fou el 5.

Pel pacient 1, obtinguérem un clon amb 0% de mutació (MERRF0%) i un clon amb 100% de mutació (MERRF100%), respectivament. Del pacient 2 només es va aconseguir el 100% mutat (MELAS100%). No es va poder obtenir cap clon amb 0% de mutació, ni amb cap tant per cent de mutació suficientment baix com per a poder funcionar com a control. Del pacient 3 es va obtenir el 0% (COX0%) i el 100% (COX100%) de mutació. També de pacient 4 es va obtenir el 0% (tRNA^{Asn}0%) i el 100% de mutació (tRNA^{Asn}100%), al igual que del pacient 6 (ND6 0%, i ND6 100%).

4.2.1 Anàlisi dels enzims de la cadena respiratòria

Amb la finalitat de saber si els cíbrids generats reproduïen els fenotips mutants, férem anàlisi bioquímic de la via OXPHOS. Els resultats es presenten a les taules 4.2.1 i 4.2.2.

	MERRF 0%		MERRF 100%		MELAS 100%	
	Activitat	Normalitzat per cs	Activitat	Normalitzat per cs	Activitat	Normalitzat per cs
NADH-citocrom c reductasa (I+III)	15.23	0.247	6.89*	0.105*	3.08*	0.053*
Succinat-citocrom c reductasa (II+III)	13.2	0.188	2.18*	0.032*	7.21*	0.108
Succinat deshidrogenasa (SP) (II)	15.58	0.238	12.39	0.183	15.63	0.236
Succinat DCPIP oxidoreductasa (II+CoQ)	5.27	0.075	2.65*	0.039*	3.5	0.053*
Citocrom c oxidasa (IV)	53.9	0.774	3.53*	0.054	8.91*	0.141
Citrat sintasa		76,37		66,27		64,26

Taula 4.2.1: Activitats enzimàtiques de la via OXPHOS a les línies MERRF i MELAS. Valors expressats com a mmol/min*mg prot. Valors normalitzats per citrat sintasa (Cs) expressats en U/U Cs.

Tant la línia MERRF com la línia MELAS, presentaren marcats dèficits dels complexos I, III i IV de la cadena respiratòria, al comparar-los amb el control isogènic de MERRF (taula 4.2.1).

	COX 0%		COX 100%	
	Activitat	Normalitzat per cs	Activitat	Normalitzat per cs
NADH-citocrom c reductasa (I+III)	26.03	451.09	20.97	288.45
Succinat deshidrogenasa (SP) (II)	14.74	70.58	10.70	138.77
Succinat DCPIP oxidoreductasa (II+CoQ)	4.60	231.77	4.39	57.58
Citocrom c oxidasa (IV)	18.26	290.78	1.22*	16.83*
Citrate sintasa		64.46		75.37

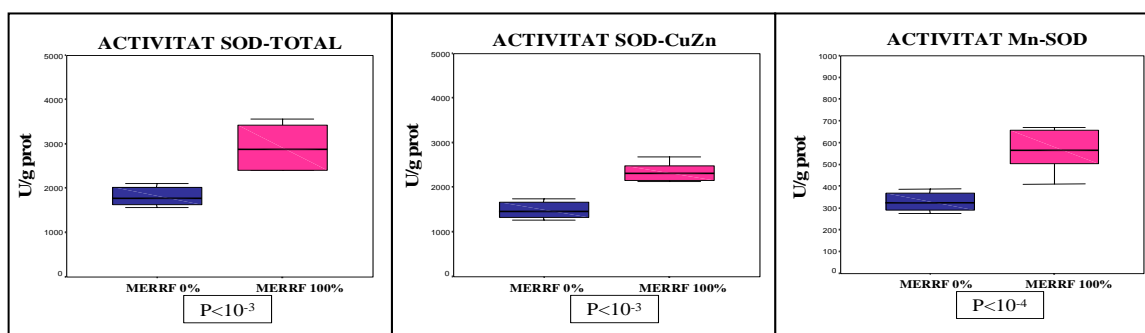
Taula 4.2.2: Activitats enzimàtiques de la via OXPPOS a la línia COX. Valors expressats com a mmol/min*mg prot. Valors normalitzats per citrat sintasa (Cs) expressats en U/U Cs.

La línia COX mutada va presentar dèficit aïllat del complex IV (taula 4.2.2), tal i com ja havia presentat el pacient 3 (veure apartat 4.1.3).

4.2.2 Anàlisi de les activitats enzimàtiques antioxidants

4.2.2.1 Línia MERRF

4.2.2.1.1 Activitat Superòxid dismutasa a la línia MERRF



L'activitat superòxid dismutasa augmentà significativament a la línia MERRF mutada (100% mutació) respecte al seu control isogènic (0% mutació). Aquest augment d'activitat es donà tant en l'activitat superòxid dismutasa coure-zinc (SOD-CuZn) com en l'activitat superòxid manganés (SOD-Mn).

Aplicant el test no paramètric de Wilcoxon (W) per a comparar les medianes de la línia control (0% mutació) amb la línia MERRF (100% mutació), observàrem diferències clarament significatives ($p < 0,01$) en totes les activitats SOD. Comparant les distribucions de les dues mostres amb el test de Kolmogorov-Smirnov (K-S), també obtinguérem diferències significatives ($p < 0,01$) entre la línia control i la mutada (taula 4.2.3).

Com es pot apreciar de la comparació entre mitjanes, l'activitat SOD-Mn va augmentar un 69,5% en la línia mutada respecte a la control, mentres que l'activitat SOD-CuZn ho va fer un 50,45% (taula 4.2.3).

	SOD-TOTAL		SOD-CuZn		SOD-Mn	
	0%	100%	0%	100%	0%	100%
N	13	10	13	10	17	10
Mitjana	1998,3	3071,58	1,67286	2,51693	327,212	554,657
Mediana	2019,64	3040,71	1,65949	2,476	328,86	564,715
Desv. St.	0,36325	0,34059	0,372679	0,287101	0,043896	0,096592
Mínim	1562,2	2601,84	1,27153	2,12808	224,088	410,128
Màxim	2687,79	3638,11	2,4637	2,96829	390,36	669,82
P-Value (W)	1,06 x10 ⁻⁴		4,58 x10 ⁻⁴		2,209x10 ⁻⁵	
P-Value (K-S)	2,11 x10 ⁻⁴		6,11 x10 ⁻⁴		6,79 x10 ⁻⁶	

Taula 4.2.3. Resum estadístic de l'Activitat Superòxid dismutasa a la línia MERRF

L'anàlisi de western blot va demostrar que l'augment d'activitat es correlacionava amb un increment en els nivells de proteïna, tant pel que fa a SOD-CuZn (figura 4.2.1), que experimentà un augment del 48%, com pel que respecta a SOD-Mn, que augmentà un 25%, aproximadament (figura 4.2.1).

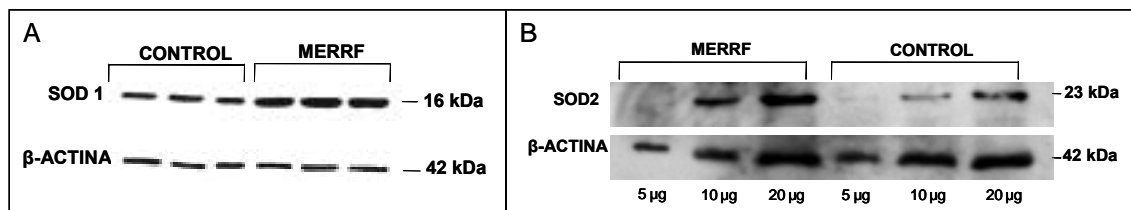
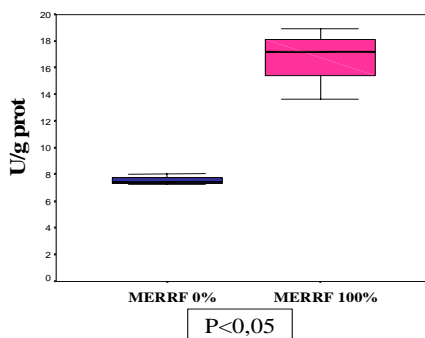


Fig.4.2.1: Anàlisi de Western Blot per la Superòxid dismutasa. A) Expressió de la proteïna SOD1 en MERRF i el seu control isogènic. B) Expressió de la proteïna SOD2 en MERRF comparada amb el seu control isogènic. Ambdues proteïnes es miraren en homogenat total de cultiu cel·lular. Normalitzats per β -actina.

4.2.2.1.2 Activitat Catalasa a la línia MERRF



	0%	100%
N	4	5
Mitjana	7,535	16,4
Mediana	7,441	17,14
Desv. St.	0,00034	0,00207
Mínim	7,242	13,63
Màxim	8,016	18,9
P-Value (W)	0,01996	
P-Value (K-S)	0,02348	

Taula 4.2.4: Resum estadístic de l'activitat catalasa a MERRF.

La línia 100% mutada de MERRF presentà una activitat catalasa molt augmentada respecte al seu control isogènic (117%). L'anàlisi estadístic, aplicant els

tests no paramètrics de Wilcoxon i de Kolmogorov-Smirnov, confirmaren que les diferències eren significatives ($p < 0,05$) (taula 4.2.4).

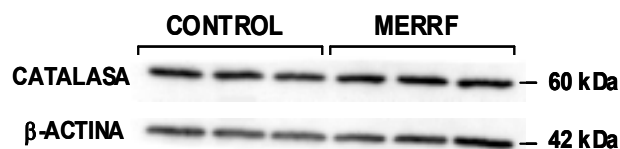
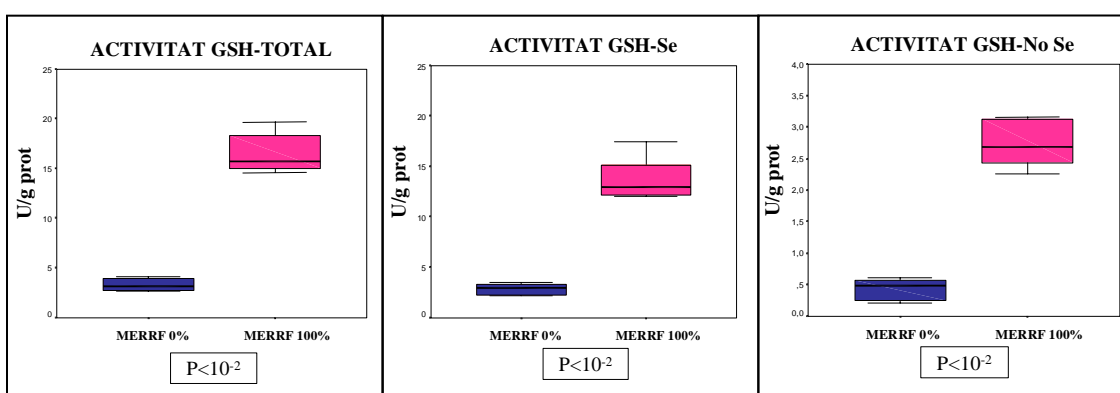


Fig. 4.2.2: Expressió de la proteïna catalasa a la línia MERRF

L'augment d'activitat catalasa observat en MERRF, no es devia a un augment de síntesi enzimàtica, tal i com va desvetllar l'anàlisi per western blot (figura 4.2.2).

4.2.1.3 Activitat Glutatió peroxidasa a la línia MERRF



L'activitat Glutatió peroxidasa (GSH-Px) augmentà per cinc en la línia MERRF mutada (100% mutació) respecte al seu control isogènic (0 % mutació).

	GSH-TOTAL		GSH-Se		GSH-No Se	
	0%	100%	0%	100%	0%	100%
N	7	6	7	6	6	6
Mitjana	3,0469	16,495	2,3256	13,772	0,4737	2,7227
Mediana	3,2462	15,714	2,2423	12,934	0,5017	2,6854
Desv. St.	0,0011	0,0020	0,0010	0,0021	0,0001	0,0004
Mínim	0,8972	14,564	0,3312	12,045	0,2448	2,2485
Màxim	4,1128	19,668	3,5046	17,42	0,6082	3,1577
P-Value (W)	0,0034		0,0034		0,00507	
P-Value (K-S)	0,0031		0,0031		0,00495	

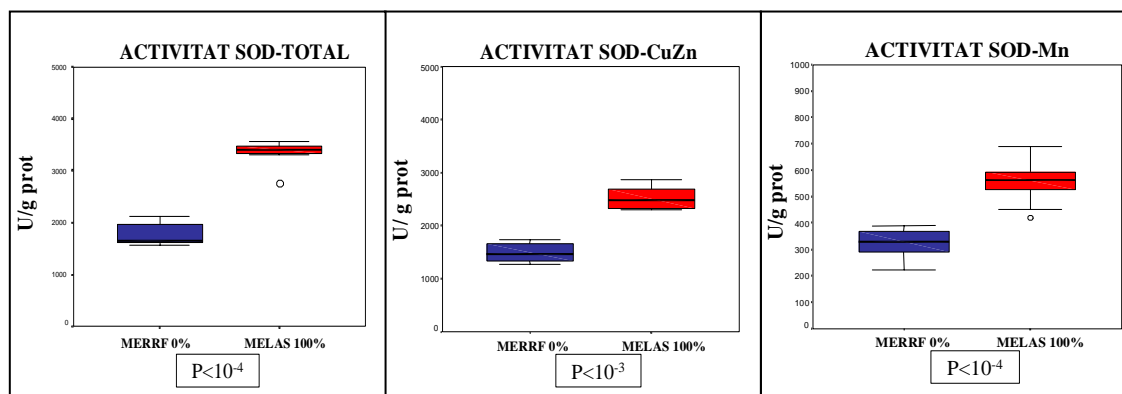
Taula 4.2.5: Resum estadístic de l'activitat Glutatió peroxidasa a la línia MERRF

L'anàlisi estadístic, aplicant els tests no paramètrics de Wilcoxon i de Kolmogorov-Smirnov, va confirmar diferències significatives ($p < 0,05$) al comparar l'activitat de la línia mutada de MERRF amb el seu control isogènic, per totes les activitats GSH-Px. El comportament de les dues activitats GSH peroxidasa fou molt similar, observant-se un augment de l'activitat GSH-Se del 492% i de l'activitat GSH-

No Se del 479%, en la línia 100% mutada respecte al seu control (MERRF 0%) (taula 4.2.5).

4.2.2.2 Línia MELAS

4.2.2.2.1 Activitat Superòxid dismutasa a la línia MELAS



L'activitat SOD incrementà significativament a la línia MELAS portadora del 100% de mutació, respecte al control de MERRF (0% mutació). Aquest increment d'activitat es donà tant en la SOD mitocondrial (SOD-Mn) com en la SOD citoplasmàtica (SOD-CuZn). Tal i com s'aprecia a la gràfica, la tendència fou la mateixa pels dos enzims.

	SOD-TOTAL		SOD-CuZn		SOD-Mn	
	0%	100%	0%	100%	0%	100%
N	13	8	13	8	17	13
Mitjana	1998,3	3297,02	1672,86	2724,76	327,212	558,539
Mediana	2019,64	3406,35	1659,49	2762,87	328,86	562,421
Desv. St.	0,363256	0,27504	0,372679	0,208257	0,043896	0,077431
Mínim	1562,2	2803,47	1271,53	2321,54	224,088	418,504
Màxim	2687,79	3558	2463,7	2954,82	390,36	689,765
P-Value (W)	1,91 x10 ⁻⁴		2,55x10 ⁻⁴		4,154x10 ⁻⁶	
P-Value (K-S)	9,98 x10 ⁻⁴		4,32x x10 ⁻⁴		7,987x10 ⁻⁷	

Taula 4.2.6: Resum estadístic de l'activitat superòxid dismutasa a la línia MELAS

Comparant la línia control (0% MERRF) amb la línia MELAS (100% mutació), i aplicant els tests no paramètrics de Wilcoxon i de Kolmogorov-Smirnov, s'observaren diferències clàrament significatives ($p < 0,01$) en totes les activitats SOD. L'activitat SOD-CuZn incrementà un 63%, i l'activitat SOD-Mn un 70,7% en MELAS, respecte al control de MERRF (taula 4.2.6).

A l'igual que en MERRF, l'augment de les activitats superòxid dismutasa a MELAS fou correlacionat amb un augment de producció d'enzim (figura 4.2.3), però en aquest cas, en la SOD-CuZn només s'aprecià un increment del 20%, i en la SOD-Mn del 15%.

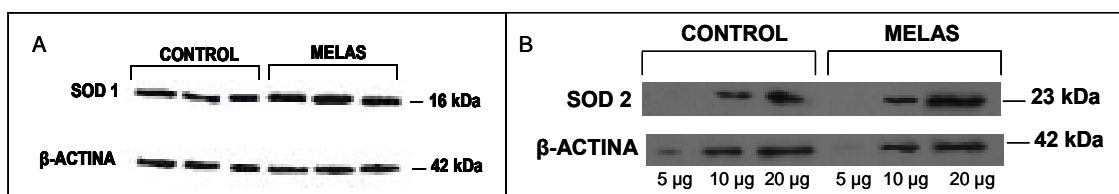
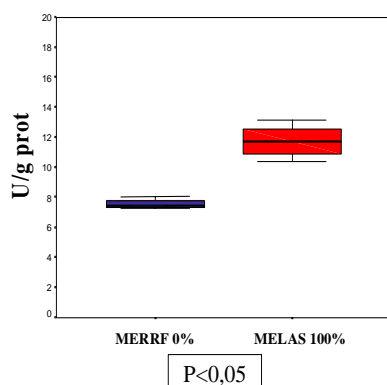


Fig.4.2.3: Anàlisi de Western Blot per la Superòxid dismutasa. A) Expressió de la proteïna SOD1 en MELAS i el seu control isogènic. B) Expressió de la proteïna SOD2 en MELAS comparada amb el seu control isogènic. Ambdues proteïnes es miraren en homogenat total de cultiu cel·lular. Normalitzats per β -actina.

4.2.2.2 Activitat Catalasa a la línia MELAS



	0%	100%
N	4	4
Mitjana	7,535	11,725
Mediana	7,441	11,686
Dev. St.	0,00034	0,00117
Mínim	7,242	10,36
Màxim	8,016	13,17
P-Value (W)	0,0303	
P-Value (K-S)	0,0366	

Taula 4.2.7: Resum estadístic de l'activitat catalasa a MELAS

La línia MELAS va presentar un augment significatiu de l'activitat catalasa en comparar-la amb la línia control (55,6%). L'anàlisi estadístic, aplicant els tests no paramètrics de Wilcoxon i de Kolmogorov-Smirnov així ho va reflectir ($p < 0,05$) (taula 4.2.7).

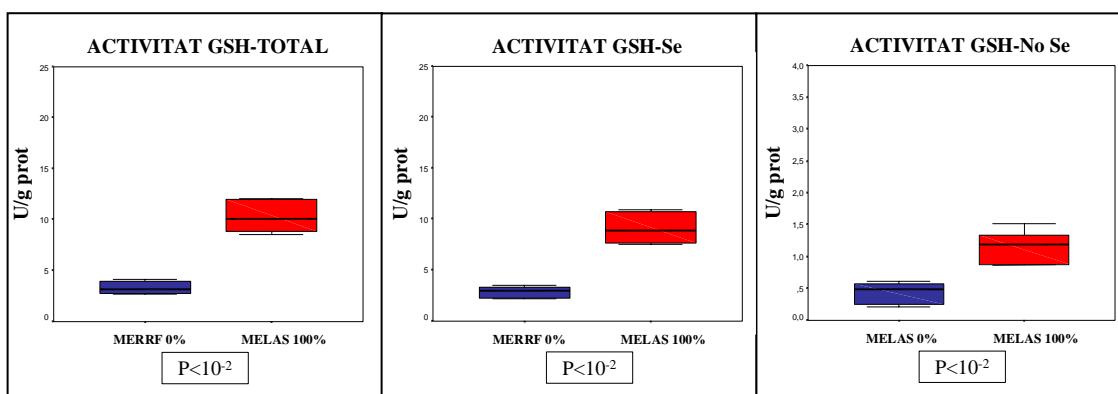
A l'igual que en MERRF, l'increment d'activitat catalasa no es corresponia a un augment en els nivells de proteïna (fig.4.2.4).



Fig.4.2.4: Nivells de proteïna catalasa en MELAS comparada amb el control de MERRF, en homogenat total de cultiu cel·lular. Normalització per β -actina.

4.2.2.2.3 Activitat Glutatió peroxidasa a la línia MELAS

L'activitat Glutatió peroxidasa (GSH-Px) a la línia MELAS respecte a la línia control de MERRF també mostrarà un augment significatiu, tant pel que fa a l'activitat GSH-Px total, com les activitats GSH-Se, i la GSH-No Se.



Aplicant els tests no paramètrics de Wilcoxon (W) i de Kolgomogorov-Smirnov (K-S), observàrem diferències significatives entre la línia MELAS i la línia control de MERRF en totes les activitats GSH-Px. L'activitat GSH-Se augmentà un 290%, mentres que l'activitat GSH-No Se ho va fer un 144,24%, en la línia MELAS 100% mutada respecte al control de MERRF (taula 4.2.8).

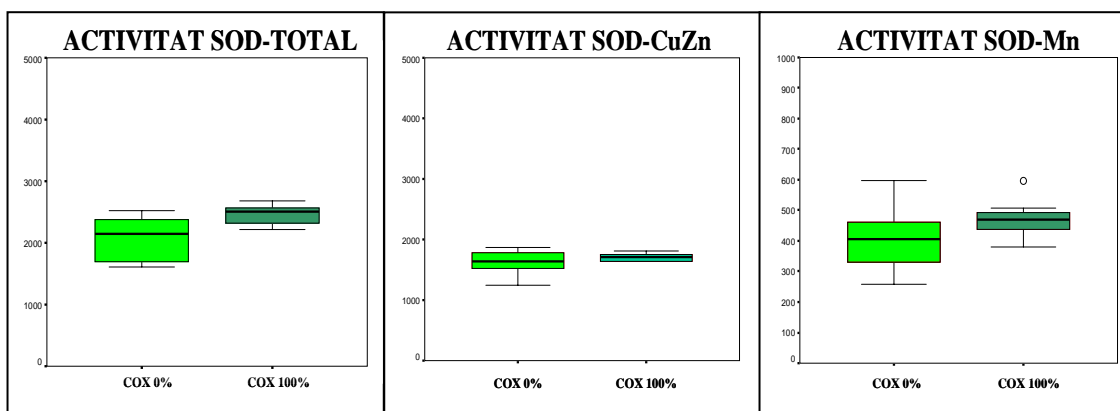
	GSH-TOTAL		GSH-Se		GSH-No Se	
	0%	100%	0%	100%	0%	100%
N	7	6	7	6	6	6
Mitjana	3,0469	10,223	2,3256	9,0659	0,4737	1,1570
Mediana	3,2466	10,009	2,2423	8,8181	0,5017	1,1815
Desv. St.	0,00111	0,0015	0,00106	0,0014	0,00013	0,0002
Mínim	0,8972	8,4945	0,3312	7,4862	0,2448	0,8662
Màxim	4,112	12,049	3,5046	10,926	0,6082	1,5087
P-Value (W)	0,0034		0,0034		0,00507	
P-Value (K-S)	0,0031		0,0031		0,00495	

Taula 4.2.8: Resum estadístic de l'activitat glutatió peroxidasa a MELAS

4.2.2.3 Línia COX

4.2.2.3.1 Activitat Superòxid dismutasa a la línia COX

L'activitat SOD no va mostrar diferències significatives en la línia COX al comparar-la amb el seu control isogènic tant pel que fa a l'activitat SOD total, com pel que respecte a les activitats SOD-CuZn i SOD-Mn (taula 4.2.9).



Aplicant els tests no paramètrics de Wilcoxon i de Kolmogorov-Smirnov, confirmarem que no hi havien diferències significatives en cap de les activitats superòxid dismutasa entre la línia COX i el seu control isogènic (taula 4.2.9).

	SOD-TOTAL		SOD-CuZn		SOD-Mn	
	0%	100%	0%	100%	0%	100%
N	7	6	7	6	7	6
Mitjana	2377	2886	1701,7	2067	730,47	818,7
Mediana	2370	2540	1537	1776	747	759
Desv. St.	0,557	0,756	0,533	0,8179	0,124	0,204
Mínim	1605,5	2218	1027	1239	578	573
Màxim	3134	3850	2386	3120	924	1135
P-Value (M)	0,155		0,350		0,617	
P-Value (W)	0,376		0,628		0,357	
P-Value (K-S)	0,818		0,865		0,865	

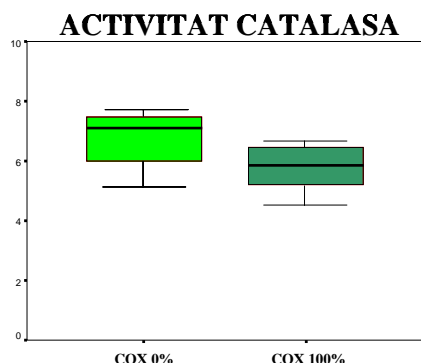
Taula 4.2.9: Resum estadístic de l'Activitat Superòxid dismutasa a la línia COX

A l'estudiar l'expressió de les proteïnes SOD1 i SOD2, no trobarem diferències entre COX 100% mutada i el seu control isogènic (figura 4.2.5).



Fig.4.2.5: Anàlisi de Western Blot per la Superòxid dismutasa. A) Expressió de la proteïna SOD1 a COX i el seu control isogènic. B) Expressió de la proteïna SOD2 a la línia COX comparada amb el seu control isogènic. Ambdues proteïnes es miraren en homogenat total de cultiu cel·lular. Normalitzats per β -actina.

4.2.2.3.2 Activitat Catalasa a la línia COX

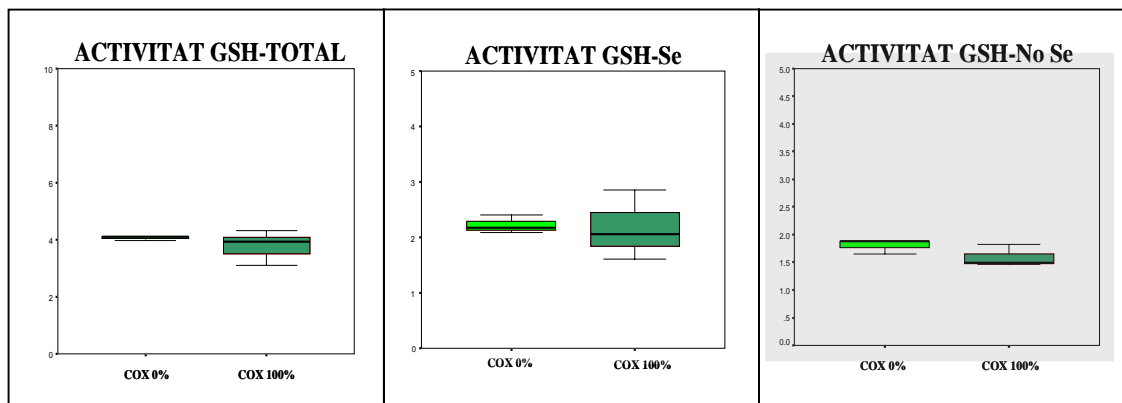


	0%	100%
N	4	3
Mitjana	6,93	6,037
Mediana	6,705	6,04
Desv. St.	0,2845	0,201
Mínim	3,8	4,026
Màxim	10,5	8,045
P-Value (M)	0,85	
P-Value (W)	0,99	
P-Value (K-S)	0,66	

Taula 4.2.10: Resum Estadístic de l'Activitat Catalasa

L'activitat catalasa tampoc no mostrà diferències significatives entre la línia COX mutada i el seu control. L'anàlisi estadístic, comparant les mitjanes (M), les medianes (W) i les distribucions (K-S) així ho evidencià (taula 4.2.10).

4.2.2.3.3 Activitat Glutatió peroxidasa a la línia COX



Tal i com calia esperar després d'haver analitzat les activitats superòxid dismutasa i catalasa, tampoc no apreciem diferències significatives en cap de les dues activitats glutatió peroxidasa (taula 4.2.11).

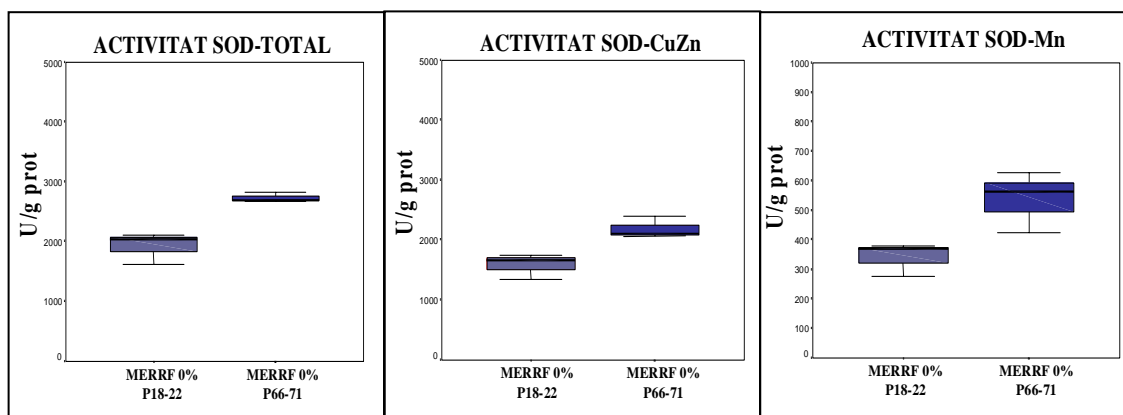
	GSH-TOTAL		GSH-Se		GSH-No Se	
	0%	100%	0%	100%	0%	100%
N	3	3	3	3	3	3
Mitjana	4,02	3,76	2,217	2,174	1,805	1,592
Mediana	4,05	3,84	2,17	2,06	1,88	1,486
Desv. St.	0,055	0,617	0,166	0,626	0,137	0,206
Mínim	3,96	3,1	2,08	1,614	1,647	1,462
Màxim	4,06	4,312	2,40	2,85	1,89	1,83
P-Value (M)	0,512		0,914		0,210	
P-Value (W)	0,662		0,662		0,532	
P-Value (K-S)	0,532		0,532		0,190	

Taula 4.2.11: Resum estadístic de l'Activitat Glutatió peroxidasa a la línia COX.

4.2.2.4 Comparació entre la línia MERRF 0% jove (P18-22) i MERRF 0% vella (P66-71)

Amb la finalitat de determinar quina influència tenien els números de passis en les activitats antioxidants, férem créixer la línia control de MERRF (MERRF 0%) fins a 18-22 passis (MERRF 0% Jove), i fins a 66-71 passis (MERRF 0% vella), i en cada cas mesuràrem l'activitat de tots els enzims antioxidants.

4.2.2.4.1 Comparació de l'Activitat Superòxid dismutasa



Totes les activitats superòxid dismutasa varen augmentar amb els passis de manera significativa.

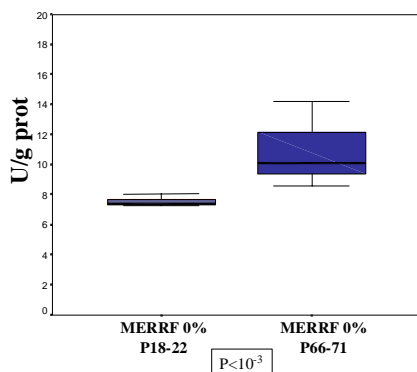
	SOD-TOTAL		SOD-CuZn		SOD-Mn	
	JOVE	VELLA	JOVE	VELLA	JOVE	VELLA
N	13	4	13	4	17	4
Mitjana	1998,3	2895,3	1672,8	2326,9	327,21	568,3
Mediana	2019,64	2752,04	1659,5	2245,2	328,86	594,2
Desv. St.	0,36325	0,35321	0,3726	0,3206	0,0439	0,104
Mínim	1562,2	2661,45	1271,5	2062,3	224,1	424,3
Màxim	2687,78	3415,61	2463,7	2754,8	390,36	660,8
P-Value (W)	0,0055		0,0202		0,0027	
P-Value (K-S)	0,0109		0,0250		0,0030	

Taula 4.2.12: Resum estadístic comparatiu entre l'activitat SOD en la línia MERRF 0% jove i MERRF % vella

L'anàlisi estadístic, aplicant els tests no paramètrics de Wilcoxon i de Kolmogorov-Smirnov, confirmà que totes les activitats SOD augmentaven de manera significativa ($P < 0,01$) amb el número de passis. L'activitat SOD-CuZn augmentà un 45% en la línia Vella respecte a la Jove, i l'activitat SOD-Mn un 73,7% (taula 4.2.12).

4.2.2.4.2 Comparació de l'Activitat Catalasa

L'activitat catalasa també augmentà amb els passis en la línia MERRF 0%.

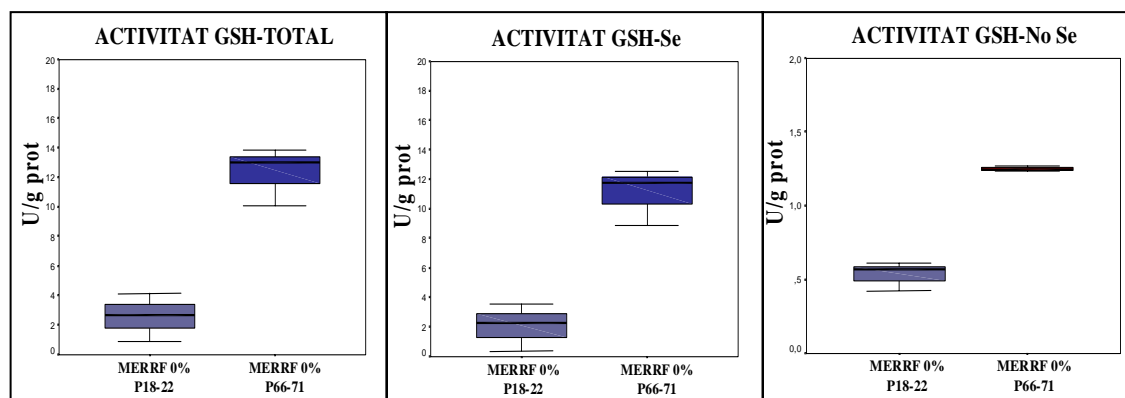


	JOVE	VELLA
N	4	4
Mitjana	7,535	10,24
Mediana	7,441	9,357
Desv. St.	0,00034	0,0027
Mínim	7,2421	8,077
Màxim	8,016	14,17
P-Value (W)	0,0304	
P-Value (K-S)	0,0366	

Taula 4.2.13: Resum estadístic de l'Activitat Catalasa.

L'anàlisi estadístic, aplicant els tests no paramètrics de W i de K-S, va confirmar diferències significatives en l'activitat catalasa ($p < 0,05$), augmentant un 36% en MERRF 0% Vella respecte a MERRF 0% Jove. La dispersió de les mostres, al agafar un grup reduït de passes, i amb només 4 observacions (N) replicades, fou molt estret en MERRF 0% Jove. En canvi, en MERRF 0% Vella és més pronunciat (desv.st=0,0027), evidenciant el continu augment de l'activitat catalasa en funció dels passis.

4.2.2.4.3 Comparació de l'Activitat Glutatió peroxidasa



A l'igual que amb les activitats superòxid dismutasa i catalasa, totes les activitats GSH-Px augmentaren amb el número de passis a la línia control de MERRF (0% MERRF).

	GSH-TOTAL		GSH-Se		GSH-No Se	
	JOVE	VELLA	JOVE	VELLA	JOVE	VELLA
N	7	4	7	4	6	4
Mitjana	3,047	13,432	2,325	12,167	0,473	1,264
Mediana	3,246	13,416	2,242	12,156	0,502	1,260
Desv. St.	0,0011	0,0027	0,0010	0,0027	0,00013	0,00003
Mínim	0,8972	10,093	0,331	8,86	0,245	1,235
Màxim	4,113	16,80	3,504	15,5	0,61	1,30
P-Value (W)	0,0107		0,0107		0,0142	
P-Value (K-S)	0,0123		0,0123		0,0164	

Taula 4.2.14: Resum estadístic comparatiu entre l'activitat Glutatió peroxidasa en MERRF 0% Jove i MERRF 0% Vella.

L'anàlisi estadístic va confirmar diferències significatives ($P(W) < 0,05$; $P(K-S) < 0,05$) entre MERRF 0% Jove i MERRF 0% Vella en totes les activitats GSH-Px. L'activitat GSH-Se va incrementar un 423%, efecte de l'augment del número de passis. L'activitat GSH-No Se també va augmentar en MERRF 0% Vella, però en aquest cas un 167% respecte a MERRF 0% Jove.

5. Discussió

5.1. Diagnòstic de pacients

Les encefalomiopaties mitocondrials causades per mutacions en el mtDNA són desordres molt heterogenis tant a nivell genotípic com fenotípic. És intuïtiu pensar que la disfunció de la cadena respiratòria, la maquinària final del metabolisme oxidatiu i la font principal de l'ATP cel·lular, sigui patogènica. El que resulta més difícil d'entendre és la relació genotip-fenotip en les malalties relacionades amb mutacions en el mtDNA. En un raonament simplista, un es demana per què una mateixa mancança que afecta a la mateixa via metabòlica, presumiblement generant una "crisi energètica", és capaç de causar tal desconcertant varietat de símptomes clínics. Algunes explicacions són aportades per les peculiars característiques de la genètica mitocondrial, particularment l'heteroplasmia i l'efecte umbral. Ambdós fenòmens ens permeten explicar, per exemple, perquè dins un mateix pedigree una mateixa mutació és capaç de manifestar-se amb un quadre molt sever tipus MELAS, o pel contrari mantenir-se silenciosa en altres membres del pedigree, que poden portar dita mutació en nivells molt elevats en sang. Però dites regles no són molt útils a l'hora d'adreçar la qüestió de les mutacions "teixit-específic", per exemple per què certs gens en tRNAs estàn predominantment associats a una manifestació clínica específica, que no es dona amb altres tRNAs. És el cas del tRNA^{Lys} amb la lipomatosis múltiple (aportem l'exemple de la pacient 2), o el tRNA^{Ile} associat a cardiomiopatia.

El nostre grup de pacients diagnosticats formen un clar exemple de la variada heterogeneïtat fenotípica de les mutacions en el mtDNA, i ens ajuden a discutir aquest fenomen per mirar d'entendre millor la relació genotip-fenotip en les malalties mitocondrials degudes a mutacions en el mtDNA.

5.1.1 Pacient 1

La pacient 1 presentava un quadre clínic multisistèmic amb sordesa, diabetis i miopatia, i el defecte molecular va ser la clàssica mutació de la síndrome de MELAS, la A3243G en el tRNA^{Leu(UUR)} (Goto i col., 1990). La seva patogenicitat ha estat àmpliament estudiada en el model cel·lular del cíbrid transmitocondrial, observant-se disminució en l'índex de creixement cel·lular al igual que en el consum d'oxigen, reducció en l'activitat citocrom C oxidasa i en la síntesi d'ATP, disfunció en la síntesi proteica mitocondrial i disminució dels nivells dels 13 polipèptids codificats pel mtDNA (Chomyn i col., 1992; King, 1992; El Meziane i col., 1998b; Chomyn i col., 2000).

En la família de la pacient 1, en tres generacions diferents la mutació co-segrega amb el mateix patró fenotípic (figura 4.1.2), sempre afectant als mateixos teixits. Segons la segregació mitòtica, que postula que el mtDNA es reparteix a l'atzar durant l'embriogènesi entre les cèl·lules totipotents que donaràn lloc a les diferents estirps cel·lulars, caldria esperar trobar distintes manifestacions fenotípiques de la mutació en els membres de les diferents generacions. Però quan veiem casos com els de la família de la pacient 1, resulta un tant incongruent poder concloure que dit fenomen només és efecte de l'atzar. Altres factors poden estar-hi implicats. De fet, Battersby i col·laboradors recentment han demostrat en el model murí que la segregació del mtDNA és un procés controlat genèticament pel genoma nuclear (Battersby i col., 2003). El mateix grup anteriorment havia demostrat que la selecció d'una mutació mitocondrial era teixit i edat-depenent (Jenuth i col., 1997). Lehtinen i col·laboradors, estudiant l'estabilitat de la mutació 3243 en estat d'heteroplàsmia en híbrids derivats de la línia 143B d'osteosarcoma i la A549 derivada de carcinoma de pulmó, observaren que dita mutació tendia a expandir-se (en 143B) o a disminuir (en A549), depenent de la línia cel·lular (Lehtinen i col., 2000).

Tant les germanes de la pacient (III.2 i III.3, *pedigree* figura 4.1.2A), com el seu fill (IV.1, en el *pedigree* figura 4.1.2A), amb percentatges molt elevats de la mutació en sang, no tenien cap simptomatologia manifesta (fig 4.1.2B). Estudis amb híbrids amb els anteriorment comentats transfons nuclears diferents (la línia 143B i la A549) demostraren l'efecte umbral de la mutació 3243 en relació a la funció respiratòria i biogenètica (Chomyn i col., 1992; King i col., 1992; El Meziane i col., 1998). Per sota del 70% de genomes mutats les cèl·lules eren aparentment normals. Entre el 70 i el 90% de molècules de mtDNA mutades, s'evidenciava dèficit de complex I de la cadena respiratòria. I per sobre del 90% de mtDNA mutat es produïa una disfunció generalitzada de la cadena respiratòria. Però només a partir del 98% de genomes mutats hi havia una severa reducció de la síntesi proteica mitocondrial. Així doncs, la mutació A3243G s'ha d'expandir entorn al 90% de molècules de mtDNA per a manifestar la seva patologia. El número total de molècules de mtDNA també influeix en el fenotip final, en el sentit que les cèl·lules amb menys número de còpies creuen més aviat l'umbral (Bentlage i col., 1996). Al no poder quantificar la mutació en altres teixits en els parents de la pacient 1, resulta impossible aventurar quina serà la seva evolució. Tot dependrà de si la mutació arriba a assolir el nivell umbral en algun teixit.

5.1.2 Pacient 2

La pacient 2 estava afectada de lipomes múltiples associats a un quadre miopàtic pur, sense afectació neurosensorial. La història familiar va mostrar MSL en cinc parents materns, i cap d'ells presentava problemes a nivell de SNC (fig.4.1.4).

Només deleccions grans i úniques (Campos i col., 1996), deleccions múltiples (Ciafaloni i col., 1991; Klopstock i col., 1994) i mutacions puntuals en el gen del tRNA^{Lys} (Berkovic i col., 1991; Holme i col., 1993; Silvestri i col., 1993; Larsson i col., 1995; Naumann i col., 1997; Austin i col., 1998; Gámez i col., 1998), s'han relacionat amb lipomatosi múltiple simètrica d'herència materna. MSL també s'ha associada a un tret clínic més en alguns pedigrees de MERRF (Berkovic i col., 1989). La raó per la qual es produeix aquesta selectiva deposició de teixit adipós al voltant del coll, espatlles i altres parts del tronc, encara no es coneix. Alguns autors apunten a que la mutació en el mtDNA deu induir l'expressió d'algun gen nuclear que condueix a la proliferació d'adipòcits (Larsson i col., 1995). Altres creuen que aquest creixement de teixit adipós ha de deure's a canvis en el metabolisme intermediari (Muñoz-Málaga i col., 2000). Els lipomes sembla que estàn constituïts de teixit adipós marró (Klopstock i col., 1994), teixit que té un elevat metabolisme oxidatiu mitocondrial acoplat a lipòlisi, raó per la qual s'ha proposat que l'acúmulo de greix deu ser degut a una disfunció oxidativa, via desequilibri en la generació d'ATP (Berkovic i col., 1991; Campos i col., 1996). Aquest desequilibri podria resultar en una lipòlisi reduïda, fet que derivaria en creixement adipocitari (Klopstock i col., 1994). Vila i col·laboradors confirmaren la implicació del teixit adipós marró en el desenvolupament de la MSL, al observar expressió de la proteïna UCP1, marcador de teixit adipós marró, en lipomes de pacients (Vila i col., 2000).

El que sembla evident és que el tRNA^{Lys} deu jugar un paper clau en l'homeostasi del teixit adipós en la MSL.

La mutació que portava la nostra pacient, la A8344G (figura 4.1.3), és la clàssica mutació de la síndrome de MERRF (Shofnerr i col., 1990). A l'igual que la A3243G de MELAS, la patogenicitat d'aquesta mutació ha estat àmpliament estudiada en híbrids (Chomyn i col., 1991; Enriquez i col., 1995; Villani i col., 1997), generant les mateixes disfuncions que la mutació 3243, anteriorment comentades.

5.1.3 Pacient 3

Estudiarem aquesta pacient en col·laboració amb el grup del Dr. Giovanni Manfredi. La pacient 3 presentava un quadre molt sever d'afectació neuromuscular (veure apartat 2.1.1.3, material i mètodes). Les dades histoquímiques, mostrant fibres COX negatives sense RRFs (figura 4.1.5, resultats), sumades a les

bioquímiques que reflectiren dèficit aïllat del complex IV, suggerien que el defecte molecular havia d'estar en el complex IV de la cadena respiratòria. Es varen seqüenciar les tres subunitats codificades pel mtDNA de dit complex (COX I, COX II i COX III), trobant la mutació G6930A a la subunitat I de la COX (figura 4.1.6, resultats). Aquesta mutació canvia una glicina per un codó d'aturada, provocant la pèrdua dels darrers 170 aminoàcids, aproximadament un terç del polipèptid.

Bruno i col·laboradors caracteritzaren aquesta mutació en el model del híbrid mitocondrial. Obtingueren clons al 35% i 65% de mutació que pogueren comparar amb el seu control isogènic (0%). Observaren que el dèficit de COX era directament proporcional al tant per cent de mutació, i que el factor umbral era inferior al que normalment s'observa a les mutacions en tRNAs, perquè el clon amb 35% de mutació ja evidenciava dèficit de COX. La mutació també afectava el consum d'oxigen i l'ensamblatge de la subunitat I i d'altres subunitats de la citocrom oxidasa, com la COX II i la COX Ivc (Bruno i col., 1999). D'Aurelio i col·laboradors demostraren que quan la mutació G6930A assoleix percentatges entorn al 65% hi ha un desacoplament total del complex IV. No detectaren producte de translació corresponent a COX I mutada ni en gel d'electroforesi marcat radiocativament, ni en *immunoblot*. Aquest fet va suggerir als autors que la porció truncada del polipèptid, corresponent a la part c-terminal i que possiblement permet la inserció del polipèptid a la membrana mitocondrial interna i l'ensamblatge amb les altres subunitats COX, devia ser ràpidament degradada (D'Aurelio i col., 2001). Això explicaria que en el múscul del pacient, que tenia un 75% de genomes mutats (figura 4.1.7, resultats), no hi hagués pràcticament activitat citocrom oxidasa.

Mutacions a les subunitats mitocondrials de la COX constitueixen el més clar exemple de la variabilitat fenotípica de les malalties mitocondrials. A la subunitat I s'han descrit altres cinc mutacions; dues, la T6742C i la T6721C, en pacients amb anèmia sideroblàstica idiopàtica (Gattermann i col., 1997), la C6489A, relacionada amb epil·lèpsia parcial (Varlamov i col., 2002), la G5920A en un quadre de mioglobinúria associada a intolerància a l'exercici (Karadimas i col., 2000) i una microdelecció que rompia la pauta de lectura en un pacient amb desordre de motoneurons (Comi i col., 1998). A la subunitat II s'han descrit les mutacions T7671A en un pacient amb miopatia proximal (Rahman i col., 1999), la G7896A en un desordre multisistèmic (Campos i col., 2001) i la G7706A en un pacient afectat de síndrome semblant a Alpers-Huttenlocher (Uusimaa i col., 2003). I a la subunitat III es va trobar la mutació T9957C en un MELAS (Manfredi i col., 1995), una microdelecció de 15 bp en un cas de mioglobinúria recurrent (Keightley i col., 1996),

la mutació G9952A en un pacient amb miopatia (Hanna i col., 1998), i la inserció d'una C a la posició 9537 en una síndrome de Leigh (Tiranti i col., 2000).

5.1.4 Pacient 4

La pacient 4 va començar a mostrar símptomes de ptosis i miopatia als 4 anys, i als 12 li diagnosticaren oftalmoplegia externa progressiva (PEO). PEO esporàdica típicament s'ha associada amb delecions simples o múltiples en el mtDNA (Bohlega, 1996; Moraes, 1989), i en canvi la PEO d'herència materna s'ha associada a varies mutacions puntuals (<http://www.mitomap.org>, 2003). PEO és molt poc freqüent en pacients pediàtrics. En aquesta edat, quan la miastènia s'exclou com a causa de PEO, els desordres mitocondrials han de ser considerats, i les delecions són la causa més probable. De totes formes, algunes mutacions puntuals, com la T4285C i la G8342A, s'han associades a PEO en edat pediàtrica (Naviaux, 2000).

El southern blot per detectar delecions fou negatiu en la nostra pacient (dades no mostrades). Les dades clíniques i morfològiques (RRFs COX negatives, figura 4.1.8), ens suggeriren que la mutació podia afectar a algun gen de tRNA mitocondrial. Trobàrem la transició G a A al nucleòtid 5703 del gen que codifica pel tRNA^{Asn} (fig.4.1.9), mutació prèviament reportada per Moraes i col·laboradors (Moraes i col., 1993). L'anàlisi de RFLP amb els familiars directes de la pacient 4 confirmà que es tractava d'un cas esporàdic. La mutació només es presentà en la pacient amb un 80% de genomes mutats en múscul i un 48% en sang (fig.4.1.10). Tot i no trobar la mutació ni en la sang de la mare ni en la sang de l'àvia, el fet que la pacient la tingués tant en la sang com en el múscul, suggereix que dita mutació es va originar a la línia germinal materna, portadora de molts baixos nivells de mtDNA mutat. La hipòtesi de la "*bottle-neck*" (coll de botella) postula que el número de molècules de mtDNA que es transmet de mare a fill és molt petit (Schon, 1997). Per fer-se una idea, en la vaca s'ha estimat que tan sols 5 molècules de mtDNA repoblen el mtDNA de la següent generació (Hauswirth i Laipis, 1985). Aquest fenomen explicaria que una mutació que es genera a la línia germinal materna, pugui transmetre's a la següent generació i expandir-se fins poder manifestar la patologia.

La patogenicitat de la mutació G5703A ha estat demostrada per Hao i col·laboradors en estudis amb híbrids transmitocondrials. La mutació provoca disfunció de la fosforilació oxidativa i disminució de la síntesi proteica mitocondrial (Hao i col., 1997). També mostraren que afectava a l'estructura secundària del tRNA, podent provocar un descens en l'índex d'aminoacilació del tRNA^{Asn}.

La descripció clínica de l'únic cas reportat a la literatura amb aquesta mutació (Moraes i col.,1993), amb l'excepció de la seva ètnia, és pràcticament idèntica a la nostra pacient (edat de presentació clínica temprana, PEO, fatigabilitat i "extrema apariència prima"). Cal ressaltar la progressiva pèrdua de teixit gras subcutani que ambdues pacients experimentaren en els primers estadis de la malaltia, no associada a problemes d'absorció intestinal. Aquest fet és molt poc freqüent en les malalties mitocondrials, menys encara en els casos d'edat pediàtrica.

Les mutacions puntuals en el mtDNA tendeixen a presentar-se amb un ampli ventall de manifestacions clíniques. Tal i com eren els casos de la pacient 1, amb la mutació 3243, la típica mutació de MELAS que en aquell cas es manifestava amb sordesa, diabetis mellitus i miopatia, o les anteriorment comentades mutacions en la COX. En canvi, la pacient 4 i la identificada anteriorment per Moraes i col·laboradors, es presenten amb un fenotip virtualment idèntic. Casos com els d'aquests dos pacients plantegen la hipòtesi de com és que algunes mutacions puntuals en el mtDNA poden presentar-se fenotípicament com a teixit-específic. L'exemple més il·lustratiu l'hem vist anteriorment amb la pacient 2, amb la MSL sempre associada a mutacions en el gen del tRNA^{Lys}. Un fenomen semblant succeeix amb les mutacions en el gen del tRNA^{Leu}, les quals es manifesten amb cardiomiopatia hipertròfica, i amb les mutacions en el gen del citocrom b, que es manifesten amb miopatia aïllada (Di Mauro i Andreu, 2000).

L'observació que algunes mutacions puntuals en el mtDNA poden produir fenotips clínics quasi calcats, suggereix que hi ha d'haver altres factors, a més del grau d'heteroplàsmia o la demanda energètica tissular, jugant un paper important en la determinació fenotípica dels pacients.

5.1.5 Pacient 5

El patró d'herència materna i el caràcter multisistèmic de les malalties mitocondrials han constituït el dogma central de la genètica mitocondrial. Però aquesta concepció clàssica de caracteritzar les malalties mitocondrials ha estat revisada en aquests darrers anys. A l'any 1999, es va descriure una forma esporàdica de miopatia mitocondrial (Andreu i col., 1999a), que no segueix les premisses bàsiques que, fins aleshores, es consideraven indispensables per a parlar de patologia mitocondrial.

Andreu i col·laboradors estudiaren un grup de pacients que presentaven un quadre de intolerància a l'exercici de llarga evolució, sense cap evidència d'herència materna. Alguns d'ells havien estat diagnosticats de síndrome de fatiga crònica degut a que no presentaven cap senyal de malaltia neuromuscular. L'estudi de la

biòpsia muscular va desvetllar en tots els pacients dèficit bioquímic del complex III de la cadena respiratòria i RRFs, així com mutacions patogèniques en el citocrom b. Dites mutacions estaven restringides a l'únic teixit afectat, el múscul esquelètic, fet que els va suggerir que es tractaven de mutacions somàtiques (Andreu i col., 1999a). No apareixien en la línia germinal, per tant no s'hereten. El fet més consistent que reforça dita hipòtesi és que no trobaren la mutació en cultiu de mioblastes derivats de cèl·lules satèl·lit procedents de les biòpsies musculars dels pacients. Suposaren que aquestes mutacions s'haurien originat de *Novo* (presumiblement durant les primeres fases de l'embriogènesi) en un número limitat de mioblastes i que, per raons desconegudes quedaren fixades i desencadenaren la patologia.

La intolerància a l'exercici deguda a mutacions somàtiques en el mtDNA, no està restringida a defectes en el gen del citocrom b. Altres gens poden estar-hi involucrats, com és el cas d'un pacient que presentava un dèficit aïllat del complex I de la cadena respiratòria i en el qual trobaren una mutació patogènica en el gen que codifica per la proteïna estructural ND4 del complex I (Andreu i col., 1999b).

La pacient 5 presentava la mateixa simptomatologia clínica que els pacients descrits pel citocrom b i ND4, severa intolerància a l'exercici, però amb dèficit combinat dels complexos III i IV, en el qual el defecte molecular fou trobat en el gen del tRNA^{Leu (CUN)}. El fenotip clínic d'aquest tipus de pacients (Andreu i col., 1999a; Andreu i col., 1999b) és molt desconcertant pel neuròleg. En la majoria dels casos totes les proves neurològiques resulten negatives. Tal fou el cas de la nostra pacient. Només un discret augment de l'àcid làctic en sang (3.8 mmol/L, quan els valors normals són <1.8 mmol/L) va suggerir malaltia mitocondrial i es va procedir a fer biòpsia muscular. La biòpsia va desvetllar moltes RRFs que no es tenyien per l'activitat citocrom C oxidasa, fet que indicava que dita activitat es veia alterada (fig. 4.1.11).

L'anàlisi bioquímic dels enzims de la cadena respiratòria va mostrar dèficit dels complexos III i IV (taula 4.1.1). Aquest dèficit combinat de dos complexos, sumat als resultats histoquímics, ens varen suggerir que el defecte molecular podia estar en algun tRNA, ja que mutacions en tRNAs afecten a la síntesi global de proteïnes (Di Mauro, 1997). Després de seqüenciar els 22 tRNAs, vàrem trobar la transició G a A a la posició 12334 (fig. 4.1.12), canvi no reportat a la literatura.

Vàries evidències donen suport a la patogenicitat d'aquesta mutació. Primer, la mutació és heteroplàsmica, presentant-se en un percentatge molt elevat en el múscul de la pacient (88% de genomes mutats), i en canvi no poguérem detectar base mutada en cap dels altres teixits estudiats (fig.4.1.13). Segon, la proporció de

genomes mutats és més elevada en RRFs (65%) que en non-RRFs (15%), suggerint una relació directa entre la mutació i el fenotip morfològic (fig.4.1.14). Tercer, el canvi afecta a un residu del braç aminoacil del tRNA^{Leu(CUN)} que està molt conservat al llarg de l'evolució (taula 5.1), curiosament al mateix nucleòtid que la mutació 3302 en el tRNA^{Leu(UUR)}, on es va demostrar que es produïa un processament anormal del RNA (Bindoff i col., 1993) (figura 5.1). I quart, la mutació G12334A no es va trobar en una sèrie de 100 DNAs control provinents de biòpsies musculars.

	aa stem	DHU stem	DHU loop	DHU stem	ac stem	ac stem	ac stem	V loop	T Ψ C stem	T Ψ C stem	T Ψ C stem	aa stem
Pacient	ACTTTTAAAGGAT	AACAGCT	ATCCA	TTGGTCTTAGGCCCCAA	AAAT	TTTGGTGCAACTCCAAA	TAAAA	A	TTA			
Humans	ACTTTTAAAGGAT	AACAGCT	ATCCA	TTGGTCTTAGGCCCCAA	AAAT	TTTGGTGCAACTCCAAA	TAAAA	G	TTA			
Bou	ACTTTTAAAGGAT	AGTAGTTT	ATCCGTTGGTCTTAGGAACCAA	AAA	ATTGGTGCAACTCCAAA	TAAAA	G	TTA				
Rata	ACTTTTATAGGAT	AGAAGTA	ATCCA	TTGGTCTTAGGAACCAA	AAAC	CTTGGTGCAACTCCAAA	TAAAA	G	TTA			
Pollastre	ACTTTTAAAGGAT	AAGAGCA	ATCCGTTGGTCTTAGGA	ACCACCTAT	CTTGGTGCAAATCCAAG	TAAAA	G	TTA				
Xenopus	GCTTTTAAAGGAA	AACAGTCTATCCGCTGGTCTTAGGA	ACCAGAACTCTTGGTGCAAATCCAAGTGA	AAAG	GCT							

Taula 5.1: Comparació de la seqüència del gen tRNA^{Leu(CUN)} en diferents espècies. La mutació G12334A afecta a un residu molt conservat al llarg de l'evolució.

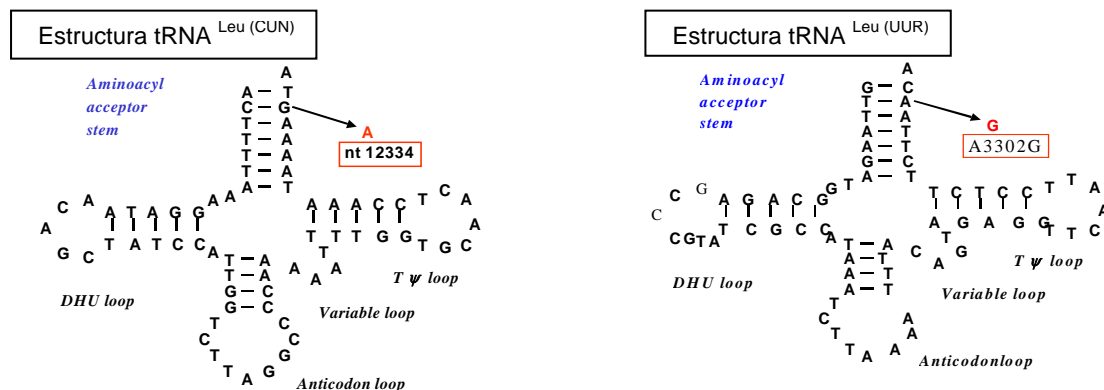


Fig 5.1: Comparació entre l'estructura del tRNA^{Leu(CUN)} i el tRNA^{Leu(UUR)}, on es marquen en vermell les mutacions G12334A i A3302G.

Tot i que no va ser possible disposar de biòpsia per a poder realitzar cultiu de mioblastes, les dades clíniques i l'anàlisi de RFLP, fortament suggereixen que la mutació G12334A, a l'igual que en els casos dels pacients amb mutacions en el citocrom b i en ND4 (Andreu i col., 1999a; Andreu i col., 1999b), està restringida a múscul esquelètic, l'únic teixit afectat. Curiosament, totes les mutacions restringides a múscul esquelètic són transicions G a A, suggerint un mecanisme comú de mutagènesi.

Tal i com ja s'ha comentat amb anterioritat, l'herència materna del mtDNA és una de les regles distintives de la genètica mitocondrial. Però a finals del 2002, Schwartz i col·laboradors qüestionaren aquest dogma al reportar herència paterna del mtDNA en un pacient esporàdic amb intolerància a l'exercici de llarga evolució (Schwartz i col., 2002). La biòpsia muscular del pacient evidencià presència de RRFs i dèficit aïllat del complex I, i el defecte molecular fou una mutació restringida a múscul esquelètic en el gen estructural ND2 del mtDNA. L'haplotip del mtDNA i l'anàlisi de microsatèl·lits de sang paterna va demostrar inequívocament que el 90% del mtDNA del múscul del pacient era d'origen patern, mentre que el mtDNA provinent de sang era, com calia esperar, d'origen matern.

Aquest cas va plantejar la pregunta de si podia haver-hi relació entre les mutacions restringides a múscul esquelètic i l'herència paterna del mtDNA. D'aquí que decidírem estudiar dita possibilitat en els nostres pacients amb mutacions puntuals restringides a múscul esquelètic, afectats de intolerància al exercici. També vàrem incloure en l'estudi pacients esporàdics afectats de miopatia amb delecions simples restringides a múscul esquelètic. Seqüenciàrem les regions hipervariables 1 i 2 del D-loop i haplotipàrem el mtDNA provinent de sang i de múscul en tots els pacients i, quan disposàrem de sang paterna i/o materna, també la vàrem incloure en l'anàlisi (taula 4.1.2). No trobàrem cap evidència d'herència paterna en cap dels deu pacients estudiats. En el D-loop, trobàrem polimorfismes simples en el múscul dels pacients 1, 4, 5, 6, 7 i 8 (nomenclatura segons la taula 4.1.2) que no eren presents en la seva sang, canvis que s'han de considerar mutacions que es generaren *de novo* en les primeres fases del desenvolupament en el mtDNA d'herència materna de l'estirp muscular.

Els nostres resultats suggereixen que l'herència paterna deu ser un fenomen molt poc freqüent que no es pot relacionar amb les mutacions patogèniques restringides a múscul esquelètic, tot i que no podem excloure que aquest fenomen no pugui donar-se en casos aïllats, com és el del pacient presentat per Schwartz i col·laboradors. De fet, en ratolí ja s'havia reportat herència paterna, però com a fenomen molt rar, i amb una freqüència molt baixa, entre 1-5/100000 genomes per generació (Gyllesten i col., 1991).

Amb la finalitat d'entendre el mecanisme d'acumulació dels genomes mutats en el múscul esquelètic, estudiàrem la presència de possibles duplicacions en les regions promotores i reguladores del D-loop, com a possibles mediadores d'avantatge replicativa en les molècules mutades. Trobàrem en els músculs dels cinc pacients amb mutacions puntuals una duplicació de 652 bp (fig.4.1.16A), que es correspon a la duplicació tipus IV, segons la nomenclatura de Wei i col·laboradors

(Wei i col., 1996). La co-existència de dita duplicació i la mutació patogènica, totes dues restringides a múscul esquelètic, ens suggeriren que ambdues mutacions podien estar relacionades. Férem PCR llarga per a mirar la colinialitat de la mutació i la duplicació en el múscul d'aquests pacients. Les molècules amb la mutació no portaven la duplicació, fet que va suggerir que la mutació i la duplicació no eren colinials.

Duplicacions en tàndem en el mtDNA s'han descrites com a esdeveniments moleculars associats a l'envelliment (Lee i col., 1994; Wei i col., 1996), i una duplicació de 200 bp es va identificar en el primer pacient descrit amb mutació en el citocrom b (Boudizi i col., 1998). En aquest cas, els autors suggeriren que la duplicació podia ser el resultat de rotures de cadena senzilla de mtDNA, mediades per dany oxidatiu derivat de la disfunció de la cadena respiratòria (Boudizi i col., 1998). De totes formes, l'observació en els nostres pacients suggereix que la duplicació de 652 bp ha d'estar d'alguna manera relacionada amb els elevats augments de genomes mutats que s'acumulen en els músculs d'aquests pacients. La mutació podria conferir desavantatge replicatiu a les molècules salvatges, permetent l'acumulació de molècules mutades durant els cicles de replicació del mtDNA. Dues observacions són consistents amb aquesta hipòtesi: Primera, la duplicació de 652 bp inclou part de les caixes de seqüències conservades 2 i 3 (CSB2, CSB3), a més a més de la seqüència de l'iniciador de replicació del promotor de la cadena lleugera (fig.4.1.16B). L'estructura resultant anormal de la regió control en els genomes duplicats podria generar disfunció de la replicació del mtDNA. Segon, el lent i progressiu desenvolupament del fenotip clínic d'aquests pacients amb intolerància a l'exercici és consistent amb l'acumulació gradual de genomes mutats durant els cicles de replicació al llarg de la vida en el múscul esquelètic. No podem excloure que altres duplicacions, a més a més de la de 652 bp observada en els nostres pacients, puguin també afectar l'índex de replicació del mtDNA en el múscul. Aquest podria ser el cas de la duplicació identificada al pacient portador de la mutació G15615A (Boudizi i col., 1998).

Tenint en compte que el model clàssic de replicació proposat per Clayton (Clayton, 1982) està essent fortament discutit després de les recents investigacions realitzades per Holt i col·laboradors i Yang i col·laboradors (Holt i col., 2000; Yang i col., 2002), totes les interpretacions que poguem fer agafant el model asimètric clàssic de replicació poden induir-nos a error. En aquest sentit cal comentar que alguns dels polimorfismes simples trobats en els músculs dels pacients, i que co-linealitzaven amb la mutació patogènica, es trobaven molt propers al major punt de síntesi de DNA situat a la posició 191, sempre segons el model clàssic. Seguint amb

aquesta línia argumental, Wang i col·laboradors observaren una elevada prevalència de dos polimorfismes, A189G i T408A, en els mtDNAs provinents de múscul esquelètic de persones majors (55-90 anys), suggerint que ambdós polimorfismes podien afectar la regulació de la replicació en el teixit post-mitòtic adult (Wang i col., 2001).

El paper d'aquestes duplicacions en l'acumulació del mtDNA mutat i en l'expressió de la intolerància a l'exercici de llarga evolució haurà de ser adreçat en futures investigacions.

5.1.6 Pacient 6: La necrosi bilateral de l'estriat en edat pediàtrica és un grup de desordres neurològics poc freqüents caracteritzat per degeneració del corpus estriat. La seva principal característica patològica és una degeneració simètrica del nucli caudat i el putamen, afectant-se en determinats casos també el globus pallidus i altres nuclis. BSN és una entitat heterogènia pel que respecta a la variabilitat de la seva presentació clínica. De fet, s'ha intentat establir una classificació de les seves diferents manifestacions fenotípiques, però sempre hi ha un buit entre la forma de manifestació i el defecte metabòlic. En principi es pensava que les lesions del gangli basal eren típiques de la síndrome de Leigh. Goutières i Aicardi dividiren els pacients amb BSN documentats en tres grups (Goutières i Aicardi, 1982): (i) aquells amb síndrome de Leigh definida o probable; (ii) aquells amb degeneració familiar de l'estriat, que cursen amb una manifestació lenta i progressiva; i (iii) aquells que es presenten amb una manifestació abrupta de la disfunció neurològica, seguida d'una fallida sistèmica greu. El nostre pacient encaixaria més en aquest tercer grup, presentant un quadre de disartria, distonia i, començant a evidenciar retràs mental. La manifestació clínica dels símptomes va aparèixer després d'haver patit una infecció greu, característica típica d'aquest tercer grup de pacients amb BSN.

La BSN tant es pot presentar amb un patró d'herència autosòmica recessiva, materna, o de forma espontània. Davant la disparitat tant fenotípica com en el patró d'herència, l'abordatge del diagnòstic molecular és complicat. Però en les BSN degudes a mutacions en el mtDNA hi ha certs trets comuns: només s'han descrit mutacions en els polipèptids codificats pel mtDNA ATPasa 6 del complex V, i en diverses subunitats del complex I (bàsicament en ND1, ND4, ND5 i ND6).

En el cas del pacient 6, l'estudi de la biòpsia muscular, mostrant algunes RRFs i dèficit aïllat del complex I, va suggerir que el defecte molecular podia estar en un gen del mtDNA codificant d'alguna subunitat del complex I. Després de seqüenciar les 7 subunitats de dit complex codificades pel mtDNA, trobarem la transició T a C a la posició 14487 en el gen de la subunitat ND6 (figura 4.1.18,

resultats), canvi no reportat a la literatura. L'anàlisi de RFLP evidencià que la mutació era heteroplàsmica, presentant-se amb un gran número de molècules mutades en el múscul (93% de mtDNA mutat) (figura 4.1.19, resultats). Gràcies a que disposàrem de dues mostres de sang obtingudes en sis anys de diferència, poguérem observar que en aquest teixit la càrrega mutacional havia disminuït en aquest interval de temps (del 77% que tenia al 1995 al 67% en el 2001). Aquest fenomen ja s'havia constatat en cèl·lules perifèriques sanguínies portadores de la mutació A3243G, atribuïnt-se a una avantatge replicativa de les molècules salvatges *versus* les mutades, en els teixits amb capacitat mitòtica (Sue i col., 1998). L'anàlisi de RFLP també evidencià que la mare era portadora de la mutació (26 % de genomes mutats en la sang), suggerint que el pacient 6 havia heretat la mutació de la seva mare, que era assintomàtica molt possiblement degut a que el percentatge de la mutació mai superava l'umbral patogènic en cap teixit.

Analitzàrem 150 DNAs controls del nostre banc de DNA i no trobàrem la mutació T14487C en cap d'ells.

La mutació T14487C canvia la metionina 63 a valina (M63V) en el polipèptid ND6. Aquest residu està molt conservat al llarg de l'evolució, i curiosament està situat just després del codó 64 afectat per les mutacions C14482G, C14482A i T14484C, descrites en casos de neuropatia òptica hereditària de Leber (LHON), i de les quals s'han fet extensius estudis patogènics (Valentino i col., 2002; Carelli i col., 1999).

Alhora que estudiàvem aquest pacient, el grup del Dr. Montoya va identificar la mateixa mutació en un altre individu afectat de distonia i BSN (pacient 2 a la figura 4.1.19, apartat resultats), donant solidesa a la patogenicitat del canvi de T a C a la posició 14487. El mateix grup va generar híbrids mitocondrials portadors de la mutació, va analitzar el consum d'oxigen rotenona-depenent i va comprovar que la línia portadora del 100% de mutació mostrava nivells pràcticament indetectables d'activitat (quasi 0 fmol O₂/cèl·lula/min) en comparació amb la línia control 0% mutada (1,758 fmol O₂/cèl·lula/min) (Solano i col., 2003). Aquests resultats fortament suggeriren que la mutació T14487C suprimeix l'activitat de la NADH-Deshidrogenasa.

El fenotip de BSN i distonia s'ha associat a dèficits de complex I, corroborats amb estudis *in vitro*, tant en plaquetes de pacients (Beneck i col., 1992) com en híbrids mitocondrials generats a partir de cèl·lules de pacients amb distonia idiopàtica (Tabrizi i col., 1998). A més a més, la recent identificació de tres pacients portadors de les mutacions 3460, 14459 i 14484 que presentaven desordres neurològics semblants a la síndrome de Leigh, i que com a tret comú el MRI mostrà

la presència de lesions bilaterals del tall cerebral (Funalot i col., 2002), dóna solidesa a la hipòtesi de que les mutacions en ND6 deuen jugar un paper important en la presentació de fenotips amb distonia. La identificació de diferents mutacions en els gens del mtDNA ND6 i ATPasa 6 associades a BSN i distonia suggereixen una implicació gen-específic en la presentació d'aquest fenotip.

Els nostres resultats suggereixen que en pacients amb BSN d'herència materna o esporàdica, els gens mitocondrials ND s'haurien d'estudiar, principalment si s'evidencia dèficit de complex I.

5.2 Estudi dels mecanismes de patogenicitat en híbrids transmitocondrials.

Tal i com hem explicat a la introducció, la cadena respiratòria mitocondrial, a més a més de generar la majoria d'energia utilitzada per les nostres cèl·lules i teixits, és la font principal de producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS). Des de que es coneix que inhibint la cadena de transport d'electrons a nivell dels complexos I i III es potencia la generació de ROS (Boveris i col., 1972; Loschen i col., 1974; Cadenas i Boveris, 1980), s'ha hipotetitzat que mutacions en el mtDNA podrien produir el mateix efecte que els inhibidors dels esmenats complexos, generant-se una sobreproducció de ROS, fet que provocaria dany sobre el mateix DNA mitocondrial, lípids i proteïnes (Freeman i Crapo, 1982).

Hi ha hagut varies temptatives per a intentar demostrar aquesta possible via patogènica de les mutacions en el DNA mitocondrial. En cultiu de fibroblastes derivats de pell de pacients amb dèficits de complex I es va observar un augment en la producció de ROS (Pitkanen i col., 1996). El mateix estudi fet en fibroblastes derivats de pacients amb síndrome de MELAS i MERRF va corroborar un increment dels nivells de H₂O₂ intracel·lular (Wei i col., 2001).

Com hem vist a l'apartat 1.7, les parelles de híbrids transmitocondrials aporten un model cel·lular molt valuós per a estudiar els efectes bioquímics i moleculars d'una mutació puntual en el mtDNA. Emprant aquest model, hem analitzat la resposta dels enzims antioxidants davant del suposat augment de ROS en les línies mutades, com a indicador indirecte d'aquesta sobreproducció.

Generarem híbrids de tots els pacients que tenien la mutació en sang, i analitzarem les línies MELAS (pacient 1), MERRF (pacient 2), i COX (pacient 3). De tots ells intentarem obtenir clons amb el 0% de mutació i clons amb el 100%. En el cas de la pacient 1 fou impossible aconseguir clons a baixos nivells de mutació, amb el que no disposarem de control isogènic i els assajos de la seva línia mutada 100% (MELAS) les compararem amb la línia control 0% de MERRF.

Prèviament a la realització dels assajos bioquímics dels enzims antioxidants, i amb la finalitat de comprovar que les línies mutades eren deficitàries en la funció OXPHOS, estudiàrem la bioquímica dels complexos de la cadena respiratòria. Tant la línia MERRF com la MELAS presentaren remarcables dèficits dels complexos I, III i IV de la cadena respiratòria (veure taula 4.2.1, resultats), els tres complexos bioquímics que tenen subunitats proteïques codificades pel mtDNA. Aquests resultats corroboraren anteriors estudis que havien observat els mateixos dèficits de la cadena respiratòria en MELAS (Chomyn i col., 1992; King i col., 1992) i en MERRF (Chomyn i col., 1991; Enriquez i col., 1995; Masucci i col., 1995). Pel que fa a la línia COX, i com calia esperar, només presentava dèficit aïllat del complex IV, tal i com prèviament havien observat D'Aurelio i col·laboradors (D'Aurelio i col., 2001).

Tant a les línies MERRF com MELAS, l'activitat SOD-Mn, directament relacionada amb la producció d'anió superòxid, es presentà molt augmentada (veure resultats, taules 4.2.3 i 4.2.5). Per contra, a la línia COX no s'observà augment d'activitat SOD-Mn (veure resultats, taula 4.2.9). Tenint en compte que els productors de ROS a la mitocòndria són els complexos I i III (Boveris i Chance, 1973; Boveris, 1977), no és d'estranyar que les mutacions en ambdós tRNAs mostrassin un augment d'activitat SOD-Mn. Aquests resultats correlacionen amb un estudi previ fet en mioblastes amb la mutació A3243G, a on s'observà augment de les activitats SOD-Mn i catalasa (Rusanen i col., 2000). En el nostre estudi, aquest augment d'activitat fou conseqüència de la sobre-expressió del gen de la SOD2 (veure resultats, figures 4.2.1b i 4.2.3b). Observacions prèvies d'altres autors ja havien constatat inducció dels nivells de mRNA de SOD-Mn (Akashi i col., 1995; Wong i col., 1988) i de proteïna (Lewis-Molock i col., 1994; Akashi i col., 1995; Wong i col., 1988) en resposta a estrés oxidatiu. En l'únic model animal de malaltia mitocondrial on s'ha estudiat l'estrés oxidatiu, el ratolí knockout pel transportador de nucleòtids ANT1, també es va trobar increment de la producció de ROS associat a augments en els nivells de proteïna SOD-Mn i GSH-Px1 (Esposito i col., 1999).

En canvi a la línia COX mutada, la disfunció a nivell de complex IV de la via OXPHOS no va derivar en un augment d'activitat SOD-Mn. Tot i que el complex IV per si sol no és una font de producció de ROS (Babcock i Wikstrom, 1992; Babcock i Varotsis, 1993; Varotsis i col., 1993), Dawson i col·laboradors havien suggerit que inhibint aquest complex es podia exacerbar la generació de ROS pels complexos I i III (Dawson i col., 1993). Recentment Chen i col·laboradors, inhibint la citocrom oxidasa amb azida, no han observat augment de producció de ROS en mitocòndries aïllades de cor de rata ni amb substrats pel complex I (malat, piruvat, glutamat) ni

amb substrats pel complex II (succinat). Però al fer el mateix experiment amb partícules mitocondrials, que són carents de matriu mitocondrial i per tant d'enzims antioxidants, sí han constatat augment de ROS al induir la cadena respiratòria amb NADH, en presència d'azida (Chen i col., 2003). Aquests resultats han suggerit als autors que bloquejant el complex IV es pot induir producció de ROS pel complex I, però no pel complex III (Chen i col., 2003). El complex I està ancorat a la cara interna de la membrana mitocondrial interna i allibera el $O_2^{\cdot-}$ cap a la matriu, on hauria de ser metabolitzat per la SOD-Mn. Però segons el nostre sistema, la generació d'anió superòxid que es pugui produir via complex I efecte de la mutació G6930A, no deu ser suficient per a estimular una sobre-activació de la superòxid dismutasa mitocondrial.

L'activitat SOD-CuZn també augmentà en MERRF i en MELAS. Degut a que el $O_2^{\cdot-}$ no difon fàcilment a través de les membranes cel·lulars, no esperàvem trobar aquest enzim activat. Però recentment s'ha demostrat que SOD1, no només és un enzim citosòlic, sinó que també està present dins la mitocòndria, exactament a l'espai intermembrana (Okado-Matsumoto i Fridovich, 2001). A més a més, s'ha observat que l'anió superòxid generat a la matriu mitocondrial és capaç de difondre cap a l'espai intermembrana (Han i col., 2001), i d'aquí pot ser exportat al citoplasma via canals voltatge-depenents (Han i col., 2003). A l'igual que en el cas de la SOD-Mn, aquest augment d'activitat era degut a un augment en l'expressió de proteïna, tal i com es va demostrar per anàlisi de Western blot (veure resultats, figures 4.2.1a i 4.2.3a). Així doncs, el superòxid format a la membrana mitocondrial interna és descomposat per la SOD-Mn, que està unida a aquesta membrana, mentre que el que escapa cap a l'espai intermembrana i citosol és metabolitzat per la SOD-CuZn.

A l'igual que en el cas de la SOD-Mn, la SOD-CuZn no es va veure significativament activada a la línia COX (veure resultats, taula 4.2.9). A diferència del complex I, el complex III genera superòxid a les dues cares de la membrana mitocondrial interna, amb el que part de l'anió superòxid format va a parar a la matriu mitocondrial (el que es genera al centre Q_i) i part s'allibera a l'espai intermembrana (el que es genera a Q_o). És aquesta darrera fracció de $O_2^{\cdot-}$ que és substrat per la SOD-CuZn. El fet de no haver trobat aquest enzim activat en COX corrobora que bloquejos al complex IV no indueixen producció de ROS pel complex III, tal i com han apuntat recentment Chen i col·laboradors (Chen i col., 2003).

El H_2O_2 , producte de la detoxificació de les SOD, pot difondre fàcilment a través de les membranes mitocondrials. A la mitocòndria és detoxificat per la GSH-Px1, i en el citosol per varies GSH-Pxs. Tant les activitats GSH-Px seleno-depenents

com les no seleno-depenents augmentaren molt tant en MERRF com en MELAS, resultats esperats després d'haver observat que l'activitat SOD incrementava en ambdues línies mutades, i per tant es generava més substrat per les glutacions peroxidases. Per la mateixa raó no esperàvem trobar augmentades aquestes activitats en COX, i així fou, tant la línia mutada com el seu control isogènic mostraren les mateixes activitats GSH-Px.

La catalasa, enzim detoxificador del H_2O_2 als peroxisomes, també incrementà la seva activitat en MERRF i en MELAS (veure resultats, taules 4.2.4 i 4.2.7). Tal i com hem explicat anteriorment, el H_2O_2 és fàcilment difusible a través de les membranes, amb el que no hauria de sorprendre que si augmenta la seva concentració en el citoplasma, també pugui fer-ho en els peroxisomes. Però altres raons poden estar associades a dit augment. Higgins i col·laboradors, analitzant per microscopia confocal les mitocòndries del ratolí transgènic que expressa la SOD1 mutant G93A, observaren que els peroxisomes s'adherien a la membrana mitocondrial, i fins i tot eren capaços de ser internalitzats per les vacuoles que es formen a les mitocòndries anormals d'aquests animals (Higgins i col., 2003). En l'esmenat treball els autors no comenten la hipòtesi del per què es produeix dit fenomen, tot i que ho relacionen amb l'elevada quantitat de ROS que deuen contenir les vacuoles. De fet, sembla com si es produís una mena de "quimiostasi" que atragués als peroxisomes cap a la mitocòndria per ajudar a combatre l'excés d'espècies reactives d'oxigen. Tal vegada el nostre augment d'activitat catalasa es degui a un fenomen semblant.

A diferència de les SOD, l'augment d'activitat catalasa no fou degut a una regulació dels seus nivells proteics (veure resultats, figures 4.2.2 i 4.2.4). La catalasa és l'enzim més eficient que es coneix i mai se satura de substrat (Lledías i col., 1998), fet que explicaria que en presència de més disponibilitat de H_2O_2 no hi hagués la necessitat de produir més proteïna.

Pel que fa a les COX, i tal i com calia esperar després d'haver analitzat els enzims anteriors, no observàrem diferències significatives en l'activitat catalasa entre la línia mutada i el seu control isogènic (veure taula 4.2.10).

Una consideració que cal enfatitzar és que les cèl·lules es cultivaren en medi ric en glucosa. Com s'ha apuntat en la introducció, en l'estadi 4 de la respiració (absència d'ADP), el moviment de H^+ cap a l'ATP sintetasa s'atura, provocant que el fluxe d'electrons minvi i la cadena respiratòria torni més reduïda. Com a conseqüència es produeix més $O_2^{\cdot-}$. En el nostre sistema la disponibilitat de substrat

(ADP) és excedent, d'aquí que caldria esperar més producció de ROS *in vivo* i subseqüentment més estrés oxidatiu. A més a més, al créixer les cèl·lules en medi ric en glucosa fa que es generi més piruvat, que s'ha vist que funciona com un potent agent antioxidant en òrgans com el cor (Mallet, 2000). Tot i que no es coneix a què es deu la seva capacitat antioxidant, s'ha apuntat que possiblement augmenta l'eficiència del sistema antioxidant glutatió/NADPH (Mallet, 2000).

El fet de treballar amb cèl·lules immortals suposa un risc en el sentit de que si es deixen molts de passis en cultiu augmenta la possibilitat de generar-se reordenaments cromosòmics, o mutacions puntuals tant en el genoma nuclear com en el mitocondrial. Per a comprobar la influència dels passis sobre les línies de híbrids transmitocondrials, deixarem créixer la línia control de MERRF fins a 71 passis. Fèrem dos grups, un que comprenia de 18 a 22 passis, que anomenarem JOVE, i l'altre de 66 a 71 passis, que anomenarem VELLA, i determinarem l'activitat antioxidant en ambdós grups, observant que a la línia VELLA tots els enzims s'activaven respecte a la línia JOVE, apreciànt-se augment significatiu tant de les activitats SOD com de les activitats glutatió peroxidasa i catalasa (veure resultats, apartat 4.2.2.4). Cal afegir que a nivell experimental observarem que totes les activitats antioxidants es mantien constants en la línia control de MERRF fins als passis 28 a 30, a partir d'aquests passis començaven a augmentar de forma progressiva. Caldrà analitzar a nivell molecular aquests clons per a determinar quina és la raó que condueix a l'activació dels enzims antioxidants. Per minimitzar la influència dels passis en els nostres assajos, totes les activitats es mesuraren entre els passis 18 i 22, post-fusió.

A partir dels resultats obtinguts en aquesta tesi, sembla evident que les dues mutacions en tRNAs que estudiarem, la A8344G en el tRNA^{Lys} i la A3243G en el tRNA^{Leu(UUR)}, indueixen producció de ROS, ja que en ambdues constatarem un augment de l'activitat de tots els enzims antioxidants estudiats. Totes les mutacions en tRNAs afecten a la síntesi global de proteïnes, amb el que tots els complexos de la cadena respiratòria que contenen subunitats codificades pel mtDNA es veuen afectats, o sigui els complexos I, III i IV. Per contra, la mutació G6930A en la subunitat I de la COX (complex IV) no va induir activació de cap dels enzims antioxidants analitzats, suggerint que no hi havia més generació de ROS efecte de la mutació.

A dia d'avui, no hi ha cap tipus de teràpia curativa per les malalties mitocondrials. Per l'observat en el nostre estudi, l'estrés oxidatiu deu jugar un paper important en les mutacions que afecten als complexos generadors de ROS, com són

el complex I i III. Els nostres resultats suggereixen que en pacients afectats per mutacions en aquests complexos, l'administració d'antioxidants, en forma de vitamines o cofactors, podria ser una bona teràpia preventiva per ajudar a neutralitzar la producció d'espècies reactives d'oxigen.

El fet de que no totes les mutacions en el mtDNA es comportin igual quant a activar les defenses antioxidants, suggereix que no en totes les malalties mitocondrials es produeix generació de ROS, i per tant en aquests darrers casos la teràpia antioxidant seria contraindicatòria. De fet, en els pocs estudis que s'han fet per determinar els efectes d'aquesta teràpia en pacients s'han trobat resultats contradictoris, pacients que han respost bé i d'altres que no. Estudis futurs, seleccionant els grups de pacients segons els tipus de mutacions que els afecten, seràn necessaris per a adreçar aquesta qüestió.

6. Conclusions

1. S'ha identificat en un pacient amb un quadre de Diabetis mellitus, sordesa neurosensorial i miopatia, la mutació A3243G en el gen del mtDNA que codifica pel tRNA^{Leu(UUR)}.
2. S'ha identificat en un pacient afectat de lipomatosi múltiple simètrica la mutació A8344G en el gen del mtDNA que codifica pel tRNA^{Lys}.
3. S'ha identificat en un pacient amb un quadre multisistèmic d'afectació neurosensorial que cursava amb atacs epilèptics, ataxia d'extremitats, atròfia òptica, sordesa total, i fatigabilitat muscular, la mutació G6930A en el gen del mtDNA que codifica per la subunitat II de la citocrom oxidasa.
4. S'ha identificat en un pacient afectat d'oftalmoplegia externa progressiva la mutació puntual G5703A en el gen del mtDNA que codifica pel tRNA^{Ans}.
5. S'ha identificat una nova mutació patogènica restringida a musculatura esquelètica, la transició G12334A en el gen del mtDNA que codifica pel tRNA^{Leu(CUN)}, en un pacient afectat de intolerància severa a l'exercici.
6. S'ha identificat, en un pacient afectat de necrosi bilateral del estriat i distonia, la nova mutació patogènica T14487C al gen del mtDNA que codifica per la subunitat ND6 del complex NADH-Deshidrogenasa.
7. S'han generat cinc línies de híbrids transmitocondrials portadores de les mutacions A3243G, A8344G, G6930A, G5703A i T14487C, per a poder fer estudis in vitro que ens ajudin a entendre els mecanismes de patogenicitat de les mutacions en el mtDNA.
8. L'anàlisi del sistema antioxidant en els models dels híbrids transmitocondrials, mitjançant assajos bioquímics de l'activitat dels enzims SOD-Mn, SOD-CuZn, GPX-Se, GPX-No Se i Catalasa, ha permès corroborar que les dues mutacions estudiades que afecten a gens del mtDNA que codifiquen per tRNAs (la A3243G en el tRNA^{Leu(UUR)} i la A8344G en el tRNA^{Lys}) provoquen sobre-activació de tots els enzims antioxidants estudiats, suggerint que indueixen la producció d'espècies reactives d'oxigen.

9. S'ha comprovat, mitjançant anàlisi de western blot, que l'augment de les activitats SOD-Mn i SOD-CuZn en les línies portadores de les mutacions A3243G i A8344G es deu a un augment en els nivells de proteïna d'ambdós enzims. En canvi, l'augment d'activitat catalasa també observat en ambdues línies no es deu a una sobre-expressió de l'enzim.

10. L'anàlisi del sistema antioxidant en els models dels híbrids mitocondrials també ha permès demostrar que la línia portadora de la mutació G6930A, que afecta al gen del mtDNA que codifica per la subunitat II de la COX, no fa augmentar l'activitat dels enzims antioxidants, suggerint que no induïx producció de ROS, o bé que aquesta no és suficientment significativa com per poder sobre-activar els enzims antioxidants.

11. Analitzant el sistema antioxidant en el híbrid control (0% de mutació) de la línia MERRF, s'ha observat que totes les activitats dels enzims antioxidants estudiats augmenten en funció del número de passis, suggerint que l'estrés oxidatiu incrementa amb els passis en els híbrids en cultiu.

7. Bibliografia

Abe, J., Takahashi, M., Ishida, M., Lee, J.D., Berk, B.C. (1997) c-Src is required for oxidative stress-mediated activation of big mitogen-activated protein kinase 1. *J Biol Chem.* **272**(33):20389-94.

Abe, J., Okuda, M., Huang, Q., Yoshizumi, M., Berk, B.C. (2000) Reactive oxygen species activate p90 ribosomal S6 kinase via Fyn and Ras. *J Biol Chem.* **275**(3):1739-48.

Abe, M.K., Chao, T.S., Solway, J., Rosner, M.R., Hershenson, M.B. (1994) Hydrogen peroxide stimulates mitogen-activated protein kinase in bovine tracheal myocytes: implications for human airway disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **11**(5):577-85.

Abrahams, J.P., Leslie, A.G., Lutter, R., Walker, J.E. (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature.* **370**(6491):621-8

Ackrell, B.A.C., Johnson, M.K., Ginsalus, R.P. i col. (1992) Structure and function of succinate dehydrogenase and fumarate reductase. In Muller, F. Ed. *Biochemistry of Flavoenzymes*. Boca Ratón, FL: CRC Press; p.229-297.

Adams, P.A., Milton, R.C., Silver, J. (1994) Mossbauer spectra of the heme peptide (HP) 1-50 and the heme peptide:non-heme peptide (NHP) non-covalent complex 1-50:51-104 derived from cytochrome c: evidence for cytochrome c iron site solvation in aqueous solution. *Biometals.* **7**(3):217-20.

Adachi, T., Yamazaki, N., Tasaki, H., Toyokawa, T., Yamashita, K., Hirano, K. (1998) Changes in the heparin affinity of extracellular-superoxide dismutase in patients with coronary artery atherosclerosis. *Biol Pharm Bull.* **21**(10):1090-3.

Ahlers, P., Zwicker, K., Kerscher, S. i Brand U. (2000) Function of conserved acidic residues in the PSST homologue of complex I (NADH: ubiquinone oxidoreductase) from *Yarrowia lipolytica*. *J Biol Chem* **275**: 23577-23582.

Aikawa, R., Komuro, I., Yamazaki, T., Zou, Y., Kudoh, S., Tanaka, M., Shiojima, I., Hiroi, Y., Yazaki, Y. (1997) Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through Src and Ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. *J Clin Invest.* **100**(7):1813-21.

- Akashi, M., Hachiya, M., Paquette, R.L., Osawa, Y., Shimizu, S., Suzuki, G.** (1995) Increases manganese superoxide dismutase mRNA levels in human fibroblasts. Possible mechanisms for its accumulation. *J Biol Chem.* **30** (26):15864-9.
- Aloni, Y. i Attardi, G.** (1971a) Expression of the mitochondrial genome in HeLa cells. II. Evidence for complete transcription of mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.* **55**: 251-270
- Aloni, Y. i Attardi, G.** (1971b) Symmetrical in vivo transcription of mitochondrial DNA in HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**: 1757-1761.
- Alvarez, M.E., Pennell, R.I., Meijer, P.J., Ishikawa, A., Dixon, R.A., Lamb, C.** (1998) Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell.* **92**(6):773-84.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R., Young, I.G.** (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* **290** (5806): 457-65.
- Andreu, A.L., Bruno, C., Shanske, S., Shtilbans, A., Hirano, M., Krishna, S., Hayward, L., Systrom, D.S., Brown, R.H. Jr, DiMauro, S.** (1998) Missense mutation in the mtDNA cytochrome b gene in a patient with myopathy. *Neurology.* **51**(5):1444-7.
- Andreu, A.L., Tanji, K., Bruno, C., Hadjigeorgiou, G.M., Sue, C.M., Jay, C., Ohnishi, T., Shanske, S., Bonilla, E., DiMauro, S.** (1999) Exercise intolerance due to a nonsense mutation in the mtDNA ND4 gene. *Ann Neurol.* **45**(6):820-3.
- Andreu, A.L., Hanna, M.G., Reichmann, H., Bruno, C., Penn, A.S., Tanji, K., Pallotti, F., Iwata, S., Bonilla, E., Lach, B., Morgan-Hughes, J., DiMauro, S.** (1999a) Exercise intolerance due to mutations in the cytochrome b gene of mitochondrial DNA. *N Engl J Med.* **341**(14):1037-44.
- Andreu, A.L., Tanji, K., Bruno, C., Hadjigeorgiou, G.M., Sue, C.M., Jay, C., Ohnishi, T., Shanske, S., Bonilla, E., DiMauro, S.** (1999b) Exercise intolerance due to a nonsense mutation in the mtDNA ND4 gene. *Ann Neurol.* **45**(6):820-3.
- Andreu, A.L.** (2001) Exercise intolerance resulting from a muscle-restricted mutation in the mitochondrial tRNA(Leu (CUN)) gene. *Ann Med.* **33**(7):493-6.

- Amalric, F., Merkel, C., Geldfand, R. i Attardi, G.** (1978) Fractionation of mitochondrial RNA from HeLa cells by High-Resolution Electrophoresis under strongly denaturing conditions. *J. Mol. Biol.* **118**: 1-25.
- Arnold, S., Kadenbach, B.** (1999) The intramitochondrial ATP/ADP-ratio controls cytochrome c oxidase activity allosterically. *FEBS Lett.* **443**(2):105-8.
- Attardi, G., Schortz, G.** (1988) Biogenesis of mitochondria. *Ann Rev Cell Biol*; **4**:289-333.
- Aust, S.D., Roerig, D.L., Pederson, T.C.** (1972) Evidence for superoxide generation by NADPH-cytochrome c reductase of rat liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun.* **47**(5):1133-7.
- Austin, S.A., Vriessendorp, F.J., Thandroyen, F.T., Hecht, J.T., Jones, O.T., Johns, D.R.** (1998) Expanding the phenotype of the 8344 transfer lysine mitochondrial DNA mutation. *Neurology* **51**: 1447-1450.
- Avraham, K.B., Schickler, M., Sapoznikov, D., Yarom, R., Groner, Y.** (1988) Down's syndrome: abnormal neuromuscular junction in tongue of transgenic mice with elevated levels of human Cu/Zn-superoxide dismutase. *Cell.* **54**(6):823-9.
- Babcock, G.T., Wikstrom, M.** (1992) Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. *Nature.* **356**(6367):301-9.
- Babcock, G.T., Varotsis, C.** (1993) Discrete steps in dioxygen activation--the cytochrome oxidase/O₂ reaction. *J Bioenerg Biomembr.* **25**(2):71-80.
- Babior, B.M.** (1999) NADPH oxidase: an update. *Blood.* **93**(5):1464-76.
- Bae, G.U., Seo, D.W., Kwon, H.K., Lee, H.Y., Hong, S., Lee, Z.W., Ha, K.S., Lee, H.W., Han, J.W.** (1999) Hydrogen peroxide activates p70(S6k) signaling pathway. *J Biol Chem.* **274**(46):32596-602.
- Banci, L., Benedetto, M., Bertini, I., Del Conte, R., Piccioli, M., Viezzoli, M.S.** (1998) Solution structure of reduced monomeric Q133M2 copper, zinc superoxide dismutase (SOD). Why is SOD a dimeric enzyme?. *Biochemistry.* **37**(34):11780-91.
- Battersby, B.J., Loreda-Osti, J.C., Shoubridge, E.A.** (2003) Nuclear genetic control of mitochondrial DNA segregation. *Nat. Genet.* **33**:183-186.

Bauer, M.F., Hofmann, S. Neupert, W., Brunner, M. (2000) Protein translocation into mitochondria: the role of TIM complexes. *Trends Cell Biol.* **10**: 25-31.

Baysal, B.E., Ferrell, R.E., Willett-Brozick, J.E., Lawrence, E.C., Myssiorek, D., Bosch, A., van der Mey, A., Taschner, P.E., Rubinstein, W.S., Myers, E.N., Richard, C.W. 3rd, Cornelisse, C.J., Devilee, P., Devlin, B. (2000) Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science.* **287**(5454):848-51.

Benecke, R., Strumper, P., Weiss, H. (1992) Electron transfer complex I defect in idiopathic dystonia. *Ann Neurol.* **32**(5):683-6

Benit, P., Chretien, D., Kadhom, N., de Lonlay-Debeney, P., Cormier-Daire, V., Cabral, A., Peudenier, S., Rustin, P., Munnich, A., Rotig, A. (2001) Large-scale deletion and point mutations of the nuclear NDUFV1 and NDUFS1 genes in mitochondrial complex I deficiency. *Am J Hum Genet.* **68**(6):1344-52. Epub 2001 May 07.

Benov, L., Fridovich, I. (1998) Superoxide dependence of the toxicity of short chain sugars. *J Biol Chem.* **273**(40):25741-4.

Berkovic, S.F., Carpenter, S., Evans, A., Karpati, G., Shoubrdge, E.A., Andermann, F., Tyler, J.L., Diksic, M., Arnold, D., Wolfe, L.S., Andermann, E., Hakim, A.M. (1989) Myoclonus epilepsy and ragged-red fibers (MERRF). A clinical, pathological, biochemical and position emission tomography study. *Brain* **112**: 1231-1260.

Berkovic, S.F., Shoubridge, E.A., Andermann, F., Andermann, E., Carpenter, S. Karpati, G. (1991) Clinical spectrum of mitochondrial DNA mutation at base pair 8344. *Lancet* **338**: 457.

Berkovic, S.F., Andermann, F., Shoubridge, E.A., Carpenter, S., Robitaille, Y., Andermann, E., Melmed, C., Karpati, G. (1991) Mitochondrial dysfunction in multiple symmetric lipomatosis. *Ann Neurol.* **29**: 566-569.

Bibb, M.J., Van Etten, R.A., Wright, C.T., Walberg, M.W., Clayton, D.A. (1981) Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell* **26**: 167-180.

Bindoff, L.A., Howell, N., Poulton, J., McCullough, D.A., Morten, K.J., Lightowers, R.N., Turnbull, D.M., Weber, K. (1993) Abnormal RNA processing associated with a

novel tRNA mutation in mitochondrial DNA. A potential disease mechanism. *J Biol Chem.* **268**(26):19559-64.

Bohlega, S., Tanji, K., Santorelli, F.M., Hirano, M., al-Jishi, A., DiMauro, S. (1996) Multiple mitochondrial DNA deletions associated with autosomal recessive ophthalmoplegia and severe cardiomyopathy. *Neurology.* **46**(5): 1329-1334.

Bourgeron, T., Rustin, P., Chretien, D., Birch-Machin, M., Bourgeois, M., Viegas-Pequignot, E., Munnich, A., Rotig, A. (1995) Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nat Genet.* **11**(2):144-9.

Boveris, A., Oshino, N., Chance, B. (1972) The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J.* **128**(3):617-30.

Boveris, A. (1977) Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide. *Adv Exp Med Biol.* **78**:67-82.

Boveris, A., Chance, B. (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J.* **134**(3):707-16.

Boyer, P.D. (1997) The ATP synthase--a splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem.* **66**:717-49.

Borgstahl, G.E., Parge, H.E., Hickey, M.J., Beyer, W.F. Jr, Hallewell, R.A., Tainer, J.A. (1992) The structure of human mitochondrial manganese superoxide dismutase reveals a novel tetrameric interface of two 4-helix bundles. *Cell.* **71**(1):107-18. Erratum in: *Cell* 1993 Feb 12;72(3):following 476.

Brand, K. (1997) Aerobic glycolysis by proliferating cells: protection against oxidative stress at the expense of energy yield. *J Bioenerg Biomembr.* **29**(4): 355-364

Brandt, U. (1997) Proton-translocation by membrane-bound NADH:ubiquinone-oxidoreductase (complex I) through redox-gated ligand conduction. *Biochim Biophys Acta* **1318**: 79-91.

Brigelius-Flohé, R. (1999) Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med.* **27**(9-10):951-65.

Brown, M.D., Yang, C.C., Trounce, I., Torroni, A., Lott, M.T., Wallace, D.C. (1992) A mitochondrial DNA variant, identified in Leber hereditary optic neuropathy patients, which extends the amino acid sequence of cytochrome c oxidase subunit I. *Am J Hum Genet.* **51**(2):378-85.

Brown, W.M., George, J.M., Wilson, A.C. (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 1967-1971.

Bruno, C., Martinuzzi, A., Tang, Y., Andreu, A.L., Palloti, F., Bonilla, E., Shanske, S., Fu, J., Sue, C.M., Angelini, C., DiMauro, S., Manfredi, G. (1999) A stop-codon mutation in the human mtDNA cytochrome c oxidase I disrupts the functional structure of complex IV. *Am J Hum Genet.* **65**(3): 611-20.

Cadenas, E., Boveris, A. (1980) Enhancement of hydrogen peroxide formation by protofophores and ionophores in antimycin-supplemented mitochondria. *Biochem J.* **188**(1):31-7.

Cadenas, E., Davies, K.J. (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Rad Biol Med.* **29**: 222-230.

Callsen, D., Sandau, K.B., Brune, B. (1999) Nitric oxide and superoxide inhibit platelet-derived growth factor receptor phosphotyrosine phosphatases. *Free Radic Biol Med.* **26**(11-12):1544-53.

Cantatore, P., Attardi, G. (1980) Mapping of nascent light and heavy strand transcripts on the physical map of HeLa cell mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res.* **8**: 2605-2624.

Campos, Y., Martín, M.A., Navarro, C., Gordo, P., Arenas, J. (1996) Single large-scale mitochondrial DNA deletion in a patient with mitochondrial myopathy associated with multiple symmetric lipomatosis. *Neurology* **47**: 1012-1014.

Campos, Y., Garcia-Redondo, A., Fernandez-Moreno, M.A., Martínez-Pardo, M., Goda, G., Rubio, J.C., Martin, M.A., del Hoyo, P., Cabello, A., Bornstein, B., Garesse, R., Arenas, J. (2001) Early-onset multisystem mitochondrial disorder caused by a nonsense mutation in the mitochondrial DNA cytochrome C oxidase II gene. *Ann Neurol.* **50**(3): 409-413.

Capdevila, J., Chacos, N., Werringloer, J., Prough, R.A., Estabrook, R.W. (1981) Liver microsomal cytochrome P-450 and the oxidative metabolism of arachidonic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **78**(9):5362-6.

Carelli, V., Ghelli, A., Bucchi, L., Montagna, P., De Negri, A., Leuzzi, V., Carducci, C., Lenaz, G., Lugaresi, E., Degli Esposti, M. (1999) Biochemical features of mtDNA 14484 (ND6/M64V) point mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Ann Neurol.* **45**(3):320-8

Casali, C., Santorelli, F.M., D'Amati, G., Bernucci, P., DeBiase, L., DiMauro, S. (1995) A novel mtDNA point mutation in maternally inherited cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun.* **213**(2):588-93.

Casali, C., Fabrizi, G.M., Santorelli, F.M., Colazza, G., Villanova, M., Dotti, M.T., Cavallaro, T., Cardaioli, E., Battisti, C., Manneschi, L., DiGennaro, G.C., Fortini, D., Spadaro, M., Morocutti, C., Federico, A. (1999) Mitochondrial G8363A mutation presenting as cerebellar ataxia and lipomas in an Italian family. *Neurology* **52**: 1103-1104.

Casari, G., De Fusco, M., Ciarmatori, S., Zeviani, M., Mora, M., Fernandez, P., De Michele, G., Filla, A., Coccozza, S., Marconi, R., Durr, A., Fontaine, B., Ballabio, A. (1998) Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease. *Cell.* **93**(6):973-83.

Chakrapani, A., Heptinstall, L., Walter, J. (1998) "A family with Leigh syndrome caused by the rarer T8993C mutation". *Journal of Inherited Metabolic Disease* **21**(6): 685-686.

Chance, B. (1974) The function of cytochrome c. *Ann N Y Acad Sci.* **227**:613-26.

Chance, B., Sies, H., Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* **59**(3):527-605.

Chang, D.D., Clayton, D.A. (1985) Priming of human mitochondrial DNA replication occurs at the light-strand promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 351-355.

Chang, D.D., Hauswirth, W.W., Clayton, D.A. (1985) Replication priming and transcription initiate from precisely the same site in mouse mitochondrial DNA. *EMBO J.* **4**:1559-1567.

Chen, S., Guillory, R.J. (1981) Studies on the interaction of arylazido-beta-analyl NAD⁺ with mitochondrial NADH dehydrogenase. *J Biol Chem* **256**: 8318-8323.

Chen, Q., Vazquez, E.J., Moghaddas, S., Hoppel, C.L., Lesnefsky, E.J. (2003) Production of reactive oxygen species by mitochondria: Central role of complex III. *J Biol Chem.* **278**(38): 36027-36031.

Chinnery, P.F. (2000) Epidemiology of mitochondrial DNA mutations. *Ann Neurol* **48**: 188-193.

Cho, G., Kang, S., Seo, S.J., Kim, Y., Jung, G. (1997) The transcriptional repression of the human Cu/Zn superoxide dismutase(sod1) gene by the anticancer drug, mitomycin C(MMC). *Biochem Mol Biol Int.* **42**(5):949-56.

Chomyn, A., Cleeter, M.W.J., Ragan, C.I., Riley, M., Doolittle, R.F., Attardi, G. (1986) URF6, last unidentified reading frame of human mtDNA, codes for an NADH dehydrogenase subunit. *Science* **234**:614.

Chomyn, A., Meola, G., Bresolin, N., Lai, S.T., Scarlato, G., Attardi, G. (1991) In vitro genetic transfer of protein synthesis and respiration defects to mitochondrial DNA-less cells with myopathy-patient mitochondria. *Mol Cell Biol.* **11**(4): 2236-2244.

Chomyn, A., Martinuzzi, A., Yoneda, M., Daga, A., Hurko, O., Johns, D., Lai, S.T., Nonaka, I., Angelini, C., Attardi, G. (1992) MELAS mutation in mtDNA binding site for transcription termination factor causes defects in protein synthesis and in respiration but no change in levels of upstream and downstream mature transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**(10):4221-5.

Chomyn, A., Attardi, G. (1992) Recent advances on mitochondrial biogenesis. In *Molecular Mechanisms in Biogenesis*. L.Ernster (Ed.) Elsevier Science Publishers B. V., 483-508.

Chomyn, A., Enriquez, J.A., Micol, V., Fernandez-Silva, P., 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**(25):19198-209.

Christman, M.F., Morgan, R.W., Jacobson, F.S., Ames, B.N. (1985) Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell*. **41**(3):753-62.

Chung, D.J., Wright, A.E., Clerch, L.B. (1998) The 3' untranslated region of manganese superoxide dismutase RNA contains a translational enhancer element. *Biochemistry*. **37**(46):16298-306.

Chung, Y.W., Jeong, D.W., Won, J.Y., Choi, E.J., Choi, Y.H., Kim, I.Y. (2002) H₂O₂-induced AP-1 activation and its effect on p21(WAF1/CIP1)-mediated G2/M arrest in a p53-deficient human lung cancer cell. *Biochem Biophys Res Commun*. **293**(4):1248-53.

Church, S.L., Grant, J.W., Meese, E.U., Trent, J.M. (1992) Sublocalization of the gene encoding manganese superoxide dismutase (MnSOD/SOD2) to 6q25 by fluorescence in situ hybridization and somatic cell hybrid mapping. *Genomics*. **14**(3):823-5.

Ciafaloni, E., Shanske, S., Apostolski, S., Griggs, R.L., Bird, M., DiMauro, S. (1991) Multiple deletions of mitochondrial DNA. *Neurology* **41**(Suppl.1): 207

Cino, M., Del Maestro, R.F. (1989) Generation of hydrogen peroxide by brain mitochondria: the effect of reoxygenation following postdecapitative ischemia. *Arch Biochem Biophys*. **269**(2):623-38.

Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C.E., 3rd, Tekaia, F., Bradcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Barrell, B.G i col. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence [published erratum appears in *Nature* 1998 Nov 12; 396(6707): 190]. *Nature* **393**: 537-544.

Clayton, D.A. (1982) Replication of mitochondrial DNA. *Cell* **28**: 693-705.

Clayton, D.A. (2000) Transcription and replication of mitochondrial DNA. *Hum. Reprod.* **15**: 11-17.

- Crapo, J.D., Oury, T., Rabouille, C., Slot, J.W., Chang, L.Y.** (1992) Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**(21):10405-9.
- Crews, S., Attardi, G.** (1980) The sequences of the small ribosomal RNA gene and the phenylalanine tRNA gene are joined end to end in human mitochondrial DNA. *Cell.* **19**(3):775-84.
- Crofts, A.R., Berry, E.A.** (1998) Structure and function of the cytochrome bc1 complex of mitochondria and photosynthetic bacteria. *Curr Opin Struct Biol.* **8**(4):501-9.
- Cunnick, J.M., Dorsey, J.F., Standley, T., Turkson, J., Kraker, A.J., Fry, D.W., Jove, R., Wu, J.** (1998) Role of tyrosine kinase activity of epidermal growth factor receptor in the lysophosphatidic acid-stimulated mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem.* **273**(23):14468-75.
- Dairaghi, D.J., Shadel, G.S., Clayton, D.A.** (1995) Addition of a 29 residue carboxyl-terminal tail converts a simple HMG box-containing protein into a transcriptional activator. *J. Biol. Mol.* **249**: 11-28.
- D'Aurelio, M., Palloti, F., Barrientos, A., Gajewski, C.D., Kwong, J.Q., Bruno, C., Beal, F., Manfredi, G.** (2001) In vivo regulation of oxidative phosphorylation in cells harbouring a stop-codon mutation in mitochondrial DNA-encoded cytochrome c oxidase subunit I. *J Biol Chem.* **276**(50): 46925-46932.
- Dawson, T.L., Gores, G.J., Nieminen, A.L., Herman, B., Lemasters, J.J.** (1993) Mitochondria is a source of reactive oxygen species during reductive stress in rat hepatocytes. *Am J Physiol.* **264**(4): 961-967.
- Deckert, G., Warren, P.V., Gaasterland, T., Young, W.G., Lenox, A.L., Graham, D.E., Overbeek, R., Snead, M.A., Keller, M., Aujay, M., Huber, R., Feldman, R.A., Short, J.M., Olsen, G.J., Swanson, R.V.** (1998) The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Nature* 392: 353-358.
- Degli Esposti, M., Ghelli, A., Ratta, M., Cortes, D., Estornell, E.** (1994) Natural substances (acetogenins) from the family Annonaceae are powerful inhibitors of mitochondrial NADH dehydrogenase (Complex I). *Biochem J* **301**, 161-167.
- de Haan, J.B., Bladier, C., Griffiths, P., Kelner, M., O'Shea, R.D., Cheung, N.S., Bronson, R.T., Silvestro, M.J., Wild, S., Zheng, S.S., Beart, P.M., Hertzog, P.J.,**

- Kola, I.** (1998) Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. *J Biol Chem.* **273**(35):22528-36.
- Deisseroth, A., Dounce, A.L.** (1970) Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiol Rev.* **50**(3):319-75.
- De La Torre, R., Casado, A., Lopez-Fernandez, E., Carrascosa, D., Ramirez, V., Saez, J.** (1996) Overexpression of copper-zinc superoxide dismutase in trisomy 21. *Experientia.* **52**(9):871-3.
- de Lonlay, P., Valnot, I., Barrientos, A., Gorbatyuk, M., Tzagoloff, A., Taanman, J.W., Benayoun, E., Chretien, D., Kadhon, N., Lombes, A., de Baulny, H.O., Niaudet, P., Munnich, A., Rustin, P., Rotig, A.** (2001) A mutant mitochondrial respiratory chain assembly protein causes complex III deficiency in patients with tubulopathy, encephalopathy and liver failure. *Nat Genet.* **29**(1):57-60.
- Demple, B., Amabile-Cuevas, C.F.** (1991) Redox redux: the control of oxidative stress responses. *Cell.* **67**(5):837-9.
- Derbeneva, O.A., Sukernik, R.I., Volodko, N.V., Hosseini, S.H., Lott, M.T., Wallace, D.C.** (2002) Analysis of mitochondrial DNA diversity in the aleuts of the commander islands and its implications for the genetic history of beringia. *Am J Hum Genet.* **71**(2):415-21
- DiMauro, S.** (1993) Clinical features associated with the A-->G transition at nucleotide 8344 of mtDNA ("MERRF mutation"). *Neurology.* **43**(6):1200-6.
- DiMauro, S., Bonilla, E.** (1997) Mitochondrial encephalomyopathies. In Rosenberg RN, Prusiner SB, DiMauro S, editors. The molecular and genetic basis of neurological disease. *Boston: Butterworth-Heinemann*; 389-446
- DiMauro, S., Bonilla, E., Davidson, M., Hirano, M., Schon, E.A.** (1998) Mitochondria in neuromuscular disorders. *Biochim Biophys Acta.* **1366**(1-2):199-210.
- Doda, J.N., Wright, K.T., Clayton, D.A.** (1981) Elongation of displacement-loop strands in human and mouse mitochondrial DNA is arrested near specific template sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 6116-6120.

Doersen, C.J., Guerrier-Takada, C., Altman, S. i Attardi, G. (1985) Characterization of an RNase P activity from HeLa cell mitochondria. *J. Biol. Chem.* **260**: 5942-5949.

Dougall, W.C., Nick, H.S. (1991) Manganese superoxide dismutase: a hepatic acute phase protein regulated by interleukin-6 and glucocorticoids. *Endocrinology.* **129**(5):2376-84.

Dubin, D.T., Montoya, J., Timko, K.D., Attardi, G. (1982) Sequence analysis and precise mapping of the 3' ends of HeLa cell mitochondrial ribosomal RNAs. *J Mol Biol.* **157**(1):1-19.

Dumoulin, R., Sagnol, I., Ferlin, T., Bozon, D., Stepien, G., Mousson, B. (1996) A novel gly290asp mitochondrial cytochrome b mutation linked to a complex III deficiency in progressive exercise intolerance. *Mol Cell Probes.***10**(5):389-91.

Dupuis, A., Chevallet, M., Darrouzet, E., Duborjal, H., Lunardi, J., Issartel, J.P. (1998) The complex I from *Rhodobacter capsulatus*. *Biochim Biophys Acta* **1364**, 147-165.

Dykens, J.A. (1997) Mitochondrial free radical production and the etiology of neurodegenerative disease. In: Neurodegenerative diseases: Mitochondria and free radicals in pathogenesis (Beal F, Bodis-Wollner I, Howell N, eds), pp 319-334, *New York: Wiley.*

Earley, F.G., Ragan, C.I. (1984). Photoaffinity labeling of mitochondrial NADH dehydrogenase with arylazidoamorphigenin, an analogue of rotenone. *Biochem J* **224**, 525-534.

Earley. F.G., Patel, S.D., Ragan, I., Attardi, G. (1987). Photolabelling of mitochondrially encoded subunit of NADH dehydrogenase with [³H] dihydrorotenone. *FEBS Lett* **219**: 108-112.

El Meziane, A., Lehtinen, S.K., Hance, N., Nijtmans, L.G., Dunbar, D., Holt, I.J., Jacobs, H.T. (1998) A tRNA suppressor mutation in human mitochondria. *Nat Genet.* **18**(4):350-3.

El Meziane, A., Lehtinen, S.K., Holt, I.J., Jacobs, H.T. (1998) Mitochondrial tRNA-leu isoforms in lung carcinoma cybrd cells containing the np 3243 mtDNA mutation. *Hum. Mol. Genet.* **7**: 2141-2147.

Elston, T., Wang, H., Oster, G. (1998) Energy transduction in ATP synthase. *Nature*. **391**(6666):510-3.

Enriquez, J.A., Chomyn, A., Attardi, G. (1995) MtDNA mutation in MERRF syndrome causes defective aminoacylation of tRNA(Lys) and premature translation termination. *Nat Genet*. **10**(1):47-55.

Engel, Cunningham, C.G. (1963) Rapid examination of muscle tissue: an improved trichromic stain method for fresh-frozen biopsy section. *Neurology*. **13**: 919-922

Epp, O., Ladenstein, R., Wendel, A. (1983) The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution. *Eur J Biochem*. **133**(1):51-69.

Esposito, L.A., Melov, S., Panov, A., Cottrell, B.A., Wallace, D.C. (1999) Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 4820-4825.

Falkenberg, M., Gaspari, M., Rantanen, A., Trifunovic, A., Larsson, N.G., Gustafsson, C.M. (2002) Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nature Genet*. **31**: 289-294.

Fan, L., Sanschagrin, P.C., Kaguni, L.S., Kuhn, L.A. (1999) The accessory subunit of mtDNA polymerase shares structural homology with aminoacyl-tRNA synthetases: implications for a dual role as a primer recognition factor and processivity clamp. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 9527-9532.

Fillingame, R.H., Angevine, C.M., Dmitriev, O.Y. (2002) Coupling proton movements to c-ring rotation in F(1)F(o) ATP synthase: aqueous access channels and helix rotations at the a-c interface. *Biochim Biophys Acta*. 1555(1-3):29-36.

Finkel, T. (1998) Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol*. **10**(2):248-53. sequences of the human mitochondrial mRNAs. *Nature* **290**, 465-470.

Follmann, K., Arnold, S., Ferguson-Miller, S., Kadenbach, B. (1998) Cytochrome c oxidase from eucaryotes but not from procaryotes is allosterically inhibited by ATP. *Biochem Mol Biol Int*. **45**(5):1047-55.

- Forman, H.J., Williams, J.J., Nelson, J., Daniele, R.P., Fisher, A.B.** (1982) Hyperoxia inhibits stimulated superoxide release by rat alveolar macrophages. *J Appl Physiol.* **53**(3):685-9.
- Freeman, B.A., Crapo, J.D.** (1982) Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest.* **47**(5):412-26.
- Fridovich, I., Freeman, B.** (1986) Antioxidant defenses in the lung. *Annu Rev Physiol.* **48**:693-702.
- Friedrich, T., Steinmuller, K., Weiss, H.** (1995) The proton-pumping respiratory complex I of bacteria and mitochondria and its homologue in chloroplasts. *FEBS Lett* **367**:107-111.
- Friedrich, T., Weiss, H.** (1999) A reductase/isomerase subunit of mitochondrial NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) carries an NADPH and is involved in the biogenesis of the complex. *J Mol Biol* **292**: 569-580.
- Funalot, B., Reynier, P., Vighetto, A., Ranoux, D., Bonnefont, J.P., Godinot, C., Malthiery, Y., Mas, J.L.** (2002) Leigh-like encephalopathy complicating Leber's hereditary optic neuropathy. *Ann Neurol.* **52**(3):374-7.
- Gamez, J., Playan, A., Andreu, A.L., Bruno, C., Navarro, C., Cervera, C., Arbos, M.A., Schwartz, S., Enriquez, J.A., Montoya, J.** (1998) Familial multiple symmetric lipomatosis associated with the A8344G mutation of mitochondrial DNA. *Neurology.* **51**(1):258-60.
- Gamou, S., Shimizu, N.** (1995) Hydrogen peroxide preferentially enhances the tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor receptor. *FEBS Lett.* **357**(2):161-4.
- Gattermann, N., Retzlaff, S., Wang, Y.L., Berneburg, M., Heinisch, J., Wlaschek, M., Aul, C., Schneider, W.** (1996) "A heteroplasmic point mutation of mitochondrial tRNA^{Leu}(CUN) in non-lymphoid haemopoietic cell lineages from a patient with acquired idiopathic sideroblastic anaemia". *British J of Haematol.* **93**(4): 845-855.
- Gattermann, N., Retzlaff, S., Wang, Y.L., Hofhaus, G., Heinisch, J., Aul, C., Schneider, W.** (1997) Heteroplasmic point mutations of mitochondrial DNA affecting subunit I of cytochrome c oxidase in two patients with acquired idiopathic sideroblastic anemia. *Blood.* **90**(12): 4961-4972.

Genova, M.L., Ventura, B., Giuliano, G., Bovina, C., Formiggini, G., Parenti, Castelli, G., Lenaz, G. (2001) The site of production of superoxide radical in mitochondrial Complex I is not a bound ubiquinone but presumably iron-sulfur cluster N2. *FEBS Lett.* **505**(3):364-8.

Gladyshev, V.N., Hatfield, D.L. (1999) Selenocysteine-containing proteins in mammals. *J Biomed Sci.* **6**(3):151-60.

Goldkorn, T., Balaban, N., Matsukuma, K., Chea, V., Gould, R., Last, J., Chan, C., Chavez, C. (1998) EGF-Receptor phosphorylation and signaling are targeted by H₂O₂ redox stress. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **19**(5):786-98.

Goldman, R., Ferber, E., Zor, U. (1997) Involvement of reactive oxygen species in phospholipase A₂ activation: inhibition of protein tyrosine phosphatases and activation of protein kinases. *Adv Exp Med Biol.* **400A**:25-30.

Gonzalez-Rubio, M., Voit, S., Rodriguez-Puyol, D., Weber, M., Marx, M. (1996) Oxidative stress induces tyrosine phosphorylation of PDGF alpha-and beta-receptors and pp60c-src in mesangial cells. *Kidney Int.* **50**(1):164-73.

Goto, Y., Nonaka, I., Horai, S. (1990) A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature.* **348**(6302):651-3.

Goto, Y., Nonaka, I., Horai, S. (1991) A new mtDNA mutation associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS). *Biochim Biophys Acta.* **1097**(3):238-40.

Goto, Y., Tojo, M., Tohyama, J., Horai, S., Nonaka, I. (1992) A novel point mutation in the mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) gene in a family with mitochondrial myopathy. *Ann Neurol.* **31**(6):672-5.

Goto, Y., Tsugane, K., Tanabe, Y., Nonaka, I., Horai, S. (1994) A new point mutation at nucleotide pair 3291 of the mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) gene in a patient with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS). *Biochem Biophys Res Commun.* **202**(3):1624-30.

Goutieres, F., Aicardi, J. (1982) Acute neurological dysfunction associated with destructive lesions of the basal ganglia in children. *Ann Neurol.* **12**(4):328-32.

- Greenberg, J.T., Monach, P., Chou, J.H., Josephy, P.D., Demple, B.** (1990) Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87**(16):6181-5.
- Grossman, L.I., Watson, R., Vinograd, J.** (1973) The presence of ribonucleotides in mature closed-circular mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 3339-3343.
- Guenebaut, V., Vicentelli, R., Mills, D., Weiss, H., Leonard, K.R.** (1997) Three-dimensional structure of NADH-dehydrogenase from *Neurospora crassa* by electron microscopy and conical tilt reconstruction. *J Mol Biol* **265**: 409-418.
- Hagerhall, C.** (1997) Succinate: quinoneoxoreductases. Variations on a conserved theme. *Biochim biophys Acta* **1320**:107-141.
- Halliwell B.** (1989) Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol.* **70**(6):737-5.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.** (1992) Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett.* **307**(1):108-12.
- Hansford, R.G., Hogue, B.A., Mildaziene, V.** (1997) Dependence of H₂O₂ formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *J Bioenerg Biomembr.* **29**(1):89-95.
- Hammans, S.R., Sweeney, M.G., Hanna, M.G., Brockington, M., Morgan-Hughes, J.A., Harding, A.E.** (1995) The mitochondrial DNA transfer RNA^{Leu}(UUR) A→G(3243) mutation. A clinical and genetic study. *Brain.* **118** (Pt 3):721-34.
- Hammen, P.K., Weiner, H.** (1998) Mitochondrial leader sequences: structure similarities and sequence differences. *J Exp Zool* **282**: 280-283.
- Han, D., Williams, E., Cadenas, E.** (2001) Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its releases into the intermembrane space. *Biochem J.* **353**:411-416.
- Han, D., Antunes, F., Canali, R., Rettori, D., Cadenas, E.** (2003) Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J Biol Chem.* **278**(8):5557-63. Epub 2002 Dec 12.

Hanna, M.G., Nelson, I.P., Rahman, S., Lane, R.J., Land, J., Heales, S., Cooper, M.J., Schapira, A.H., Morgan-Hughes, J.A., Wood, N.W. (1998) Cytochrome c oxidase deficiency associated with the first stop-codon point mutation in human mtDNA. *Am J Hum Genet.* **63**(1): 29-36.

Hao, H., Bonilla, E., Manfredi, G., DiMauro, S., Moraes, C.T. (1995) Segregation patterns of a novel mutation in the mitochondrial tRNA glutamic acid gene associated with myopathy and diabetes mellitus. *Am J Hum Genet.* **56**(5):1017-25.

Harris, C.A., Derbin, K.S., Hunte-McDonough, B., Krauss, M.R., Chen, K.T., Smith, D.M., Epstein, L.B. (1991) Manganese superoxide dismutase is induced by IFN-gamma in multiple cell types. Synergistic induction by IFN-gamma and tumor necrosis factor or IL-1. *J Immunol.* **147**(1):149-54.

Hass, M.A., Massaro, D. (1988) Regulation of the synthesis of superoxide dismutases in rat lungs during oxidant and hyperthermic stresses. *J Biol Chem.* **263**(2):776-81.

Hauswirth, W.W., Laipis, P.J. (1985) Transmission Genetics of Mamalian Mitochondria: A Molecular Model and Experimental Evidence. In *E Quagliariell (ed), achievements and perspectives of Mitochondrial Research.* Amsterdam: Elsevier **49**:

Hendrickson, D.J., Fisher, J.H., Jones, C., Ho, Y.S. (1990) Regional localization of human extracellular superoxide dismutase gene to 4pter-q21. *Genomics.* **8**(4):736-8.

Hermann, J.M., Neupert, W. (2000) Protein transport into mitochondria. *Curr Opin Microbiol;* **3**:210-14.

Higgins, C.M., Jung, C., Ding, H., Xu, Z. (2002) Mutant Cu, Zn superoxide dismutase that causes motoneuron degeneration is present in mitochondria in the CNS. *J Neurosci.* **22**(6):RC215.

Higgins, C.M., Jung, C., Xu, Z. (2003) ALS-associated mutant SOD1G93A causes mitochondrial vacuolation by expansion of the intermembrane space and by involvement of SOD1 aggregation and peroxisomes. *BMC Neurosci.* **4**(1):16.

Higuchi, M., Manna, S.K., Sasaki, R., Aggarwal, B.B. (2002) Regulation of the activation of nuclear factor kappaB by mitochondrial respiratory function: evidence for the reactive oxygen species-dependent and -independent pathways. *Antioxid Redox Signal.* **4**(6):945-55.

Hoffschir, F., Daya-Grosjean, L., Petit, P.X., Nocentini, S., Dutrillaux, B., Sarasin, A., Vuillaume, M. (1998) Low catalase activity in xeroderma pigmentosum fibroblasts and SV40-transformed human cell lines is directly related to decreased intracellular levels of the cofactor, NADPH. *Free Radic Biol Med.* **24**(5):809-16.

Holme, E., Larsson, N.G., Oldfors, A., Tulinius, M., Sahlin, P., Stenman, G. (1993) Multiple symmetric lipomas with high levels of mtDNA with the tRNA(Lys) A-->G(8344) mutation as the only manifestation of disease in a carrier of myoclonus epilepsy and ragged-red fibers (MERRF) syndrome. *Am J Hum Genet.* **52**(3):551-6.

Holt, I.J., Harding, A.E., Morgan-Hughes, J.A. (1988) Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature.* **331**(6158):717-9.

Holt, I.J., Harding, A.E., Petty, R.K., Morgan-Hughes, J.A. (1990) A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am J Hum Genet.* **46**(3):428-33.

Holt, I.J., Lorimer, H.E., Jacobs, H.T. (2000) Coupled leading-and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell* **100**: 515-524.

Hopkins, L.C., (1988b) Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF): genetic, pathophysiological, and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease. *Cell.* **55**(4):601-10.

Howell, N., Bindoff, L.A., McCullough, D.A., Kubacka, I., Poulton, J., Mackey, D., Taylor, L., Turnbull, D.M. (1991) Leber hereditary optic neuropathy: identification of the same mitochondrial ND1 mutation in six pedigrees. *Am J Hum Genet.* **49**(5):939-50.

Huang, L.E., Arany, Z., Livingston, D.M., Bunn, H.F. (1996) Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem.* **271**(50):32253-9.

Huoponen, K., Vilkki, J., Aula, P., Nikoskelainen, E.K., Savontaus, M.L. (1991) A new mtDNA mutation associated with Leber hereditary optic neuroretinopathy. *Am J Hum Genet.* **48**(6):1147-53.

Hutchin, T.P., Parker, M.J., Young, I.D., Davis, A.C., Pulleyn, L.J., Deeble, J., Lench, N.J., Markham, A.F., Mueller, R.F. (2000) A novel mutation in the

mitochondrial tRNA(Ser(UCN)) gene in a family with non-syndromic sensorineural hearing impairment. *J Med Genet.* **37**(9):692-4.

Ilieva, H., Nagano, I., Murakami, T., Shiote, M., Manabe, Y., Abe, K. (2002) Change in superoxide dismutase 1 protein localization towards mitochondria: an immunohistochemical study in transgenic G93A mice. *Neurosci Lett.* **332**(1):53-6.

Inoue, N., Ramasamy, S., Fukai, T., Nerem, R.M., Harrison, D.G. (1996) Shear stress modulates expression of Cu/Zn superoxide dismutase in human aortic endothelial cells. *Circ Res.* **79**(1):32-7.

Isoherranen, K., Peltola, V., Laurikainen, L., Punnonen, J., Laihia, J., Ahotupa, M., Punnonen, K. (1997) Regulation of copper/zinc and manganese superoxide dismutase by UVB irradiation, oxidative stress and cytokines. *J Photochem Photobiol B.* **40**(3):288-93.

Ivancich, A., Jouve, H.M., Sartor, B., Gaillard, J. (1997) EPR investigation of compound I in *Proteus mirabilis* and bovine liver catalases: formation of porphyrin and tyrosyl radical intermediates. *Biochemistry.* **36**(31):9356-64.

Izawa, S., Inoue, Y., Kimura, A. (1996) Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J.* **320** (Pt 1):61-7.

Iwata, S., Lee, J.W., Okada, K., Lee, J.K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T.A., Ramaswamy, S., Jap, B.K. (1998) Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex. *Science.* **281**(5373):64-71.

Jackson, R.M., Parish, G., Ho, Y.S. (1996) Effects of hypoxia on expression of superoxide dismutases in cultured ATII cells and lung fibroblasts. *Am J Physiol.* **271**(6 Pt 1):L955-62.

Jenuth, J.P., Peterson, A.C., Shoubridge, E.A. (1997) Tissue-specific selection for different mtDNA genotypes in heteroplasmic mice. *Nat.Genet.* **16**: 93-95

Johns, D.R., Berman, J. (1991) Alternative, simultaneous complex I mitochondrial DNA mutations in Leber's hereditary optic neuropathy. *Biochem Biophys Res Commun.* **174**(3):1324-30.

Johns, D.R., Neufeld, M.J. (1991) Cytochrome b mutations in Leber hereditary optic neuropathy. *Biochem Biophys Res Commun.* **181**(3):1358-64.

Johns, D.R., Neufeld, M.J., Park, R.D. (1992) An ND-6 mitochondrial DNA mutation associated with Leber hereditary optic neuropathy. *Biochem Biophys Res Commun.* **187**(3):1551-7.

Jun, A.S., Brown, M.D., Wallace, D.C. (1994) A mitochondrial DNA mutation at nucleotide pair 14459 of the NADH dehydrogenase subunit 6 gene associated with maternally inherited Leber hereditary optic neuropathy and dystonia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**(13):6206-10.

Kadenbach, B., Arnold, S. (1999) A second mechanism of respiratory control. *FEBS Lett.* **447**(2-3):131-4.

Kagawa, Y. Biophysical studies on ATP synthase. (1999) *Adv Biophys.* **36**:1-25

Kajander, O.A., Rovio, A.T., Majamaa, K., Poulton, J., Spelbrink, J.N., Holt, I.J., Karhunen, P.J., Jacobs, H.T. (2000) Human mtDNA sublimons resemble rearranged mitochondrial genomes found in pathological states. *Hum Mol Genet.* **9**(19):2821-35.

Kang, D., Miyako, K., Kai, Y., Irie, T., Takeshige, K. (1997) In vivo determination of replication origins of human mitochondrial DNA by ligation-mediated polymerase chain reaction. *J. Biol. Chem.* **272**: 15275-15279

Kamata, H., Manabe, T., Kakuta, J., Oka, S., Hirata, H. (2002) Multiple redox regulation of the cellular signaling system linked to AP-1 and NFkappaB: effects of N-acetylcysteine and H₂O₂ on the receptor tyrosine kinases, the MAP kinase cascade, and IkappaB kinases. *Ann N Y Acad Sci.* **973**:419-22.

Karamidas, C.L., Greenstein, P., Sue, C.M., Joseph, J.T., Tanji, K., Haller, R.G., Taivassalo, T., Davidson, M.M., Shanske, S., Bonilla, E., DiMauro, S. (2000) Recurrent mioglobinuria due to a nonsense mutation in the COXI gene of mitochondrial DNA. *Neurology.* **55**(5): 644-649.

Kaukonen, J., Juselius, J.K., Tiranti, V., Kyttala, A., Zeviani, M., Comi, G.P., Keranen, S., Peltonen, L., Suomalainen, A. (2000) Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance. *Science.* **289**(5480):782-5.

Keightley, J.A., Hoffbuhr, K.C., Burton, M.D., Salas, V.M., Johnston, W.S.W., Penn, A.M.W., Buist, N.R., Kennaway, N.G. (1996) A microdeletion in cytochrome c oxidase (COX) subunit III associated with COX deficiency and recurrent myoglobinuria. *Nat Genet.* **12(4)**: 410-416.

Keightley, J.A., Anitori, R., Burton, M.D., Quan, F., Buist, N.R., Kennaway, N.G. (2000) Mitochondrial encephalomyopathy and complex III deficiency associated with a stop-codon mutation in the cytochrome b gene. *Am J Hum Genet.* **67(6)**:1400-10. Epub 2000 Oct 20.

Keller, G.A., Warner, T.G., Steimer, K.S., Hallewell, R.A. (1991) Cu,Zn superoxide dismutase is a peroxisomal enzyme in human fibroblasts and hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88(16)**:7381-5.

King, M.P., Koga, Y., Davidson, M., Schon, E.A. (1992) Defects in mitochondrial protein synthesis and respiratory chain activity segregate with the tRNA(Leu(UUR)) mutation associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes. *Mol Cell Biol.* **12(2)**:480-90.

Kirkman, H.N., Rolfo, M., Ferraris, A.M., Gaetani, G.F. (1999) Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. *J Biol Chem.* **274(20)**:13908-14.

Klopstock, T., Naumman, M., Schalke, B., Bischof, F., Seibel, P., Kottlors, M., Eckert, P., Reiners, K., Toyka, K.V., Reichmann, H. (1994) Multiple symmetric lipomatosis: abnormalities in complex IV and multiple deletions in mitochondrial DNA. *Neurology* **44**: 862-866.

Knebel, A., Rahmsdorf, H.J., Ullrich, A., Herrlich, P. (1996) Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. *EMBO J.* **15(19)**:5314-25.

Knirsch, L., Clerch, L.B. (2001) Tyrosine phosphorylation regulates manganese superoxide dismutase (MnSOD) RNA-binding protein activity and MnSOD protein expression. *Biochemistry.* **40(26)**:7890-5.

Koehler, C.M., Merchant, S., Schatz, G. (1999) How membrane proteins travel across the mitochondrial intermembrane space. *Trends Biochem Sci* **24**:428-432

- Kohnke, D., Ludwig, B., Kadenbach, B.** (1993) A threshold membrane potential accounts for controversial effects of fatty acids on mitochondrial oxidative phosphorylation. *FEBS Lett.* **336**(1):90-4.
- Korshunov, S.S., Skulachev, V.P., Starkov, A.A.** (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett.* **416**(1):15-8.
- Kruse, B., Narasimhan, N., Attardi, G.** (1989) Termination of transcription in human mitochondria: identification and purification of a DNA binding protein factor that promotes termination. *Cell* **58**: 391-397.
- Kunkel, T.A.** (1985) The mutational specificity of DNA polymerases-alpha and -gamma during *in vitro* DNA synthesis. *J. Biol. Chem.* **260**: 12866-12874
- Kushnareva, Y., Murphy, A.N., Andreyev, A.** (2002) Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. *Biochem J.* **368**(Pt 2):545-53.
- Kwong, L.K., Sohal, R.S.** (1998) Substrate and site specificity of hydrogen peroxide generation in mouse mitochondria. *Arch Biochem Biophys.* **350**(1):118-26.
- Lagerkvist, U.** (1978) "Two out of three": An alternative method for codon reading. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 1759-1762.
- Lander, H.M., Jacovina, A.T., Davis, R.J., Tauras, J.M.** (1996) Differential activation of mitogen-activated protein kinases by nitric oxide-related species. *J Biol Chem.* **271**(33):19705-9.
- Lappalainen, P., Aasa, R., Malmstrom, B.G., Saraste, M.** (1993) Soluble CuA-binding domain from the Paracoccus cytochrome c oxidase. *J Biol Chem.*; **268**(35):26416-21.
- Larsson, N., Tulinius, M., Holme, E., Oldfors, A.** (1995) Pathogenetic aspects of the A8344G mutation of mitochondrial DNA associated with MERRF syndrome and multiple symmetric lipomas. *Muscle Nerve (Suppl.3)*: 102-106.
- Leccia, M.T., Yaar, M., Allen, N., Gleason, M., Gilchrest, B.A.** (2001) Solar simulated irradiation modulates gene expression and activity of antioxidant enzymes in cultured human dermal fibroblasts. *Exp Dermatol.* **10**(4):272-9.

- Lee, D.Y., Clayton, D.A.** (1996) Properties of a primer primer RNA-DNA hybrid at the mouse mitochondrial DNA leading-strand origin of replication. *J. Biol. Chem.* **271**: 24262-24269.
- Lee, D.Y., Clayton, D.A.** (1997) RNase mitochondrial RNA processing correctly cleaves a novel R-loop at the mitochondrial DNA leading-strand origin of replication. *Genes Dev.* **11**: 582-592.
- Lehtinen, S.K., Hance, N., El Maeziane, A., Juhola, M.K., Juhola, K.M.I., Karhu, R., Spelbrik, J.N., Holt, I.J., Jacobs, H.T.** (2000) Genotypic stability, segregation and selection in heteroplasmic human cell lines containing np 3243 mutant mtDNA. *Genetics* **154**:363-380.
- Lledias, F., Rangel, P., Hansberg, W.** (1998) Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J Biol Chem.* **273**(17):10630-7.
- Leonard, J.V., Schapira, A.H.** (2000) Mitochondrial respiratory chain disorders I: mitochondrial DNA defects. *Lancet.* **355**(9200):299-304.
- Levanon, D., Lieman-Hurwitz, J., Dafni, N., Wigderson, M., Sherman, L., Bernstein, Y., Laver-Rudich, Z., Danciger, E., Stein, O., Groner, Y.** (1985) Architecture and anatomy of the chromosomal locus in human chromosome 21 encoding the Cu/Zn superoxide dismutase. *EMBO J.* **4**(1):77-84.
- Lévêque, V.J.P., Stroupe, M.E., Lepock, J.R., Cabelli, D.E., Tainer, J.A., Nick, H.S., Silverman, D.N.** (2000) Multiple replacements of glutamine 143 in human manganese superoxide dismutase: effects on structure, stability and catalysis. *Biochemistry.* **39**: 7131-7137.
- Levin, E.D., Brady, T.C., Hochrein, E.C., Oury, T.D., Jonsson, L.M., Marklund, S.L., Crapo, J.D.** (1998) Molecular manipulations of extracellular superoxide dismutase: functional importance for learning. *Behav Genet.* **28**(5):381-90.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., Lamb, C.** (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell.* **79**(4):583-93.
- Lewis-Molock, Y., Sukuzi, K., Taniguchi, N., Nguyen, D.H., Mason, R.J., White, C.W.** (1994) Lung manganese superoxide dismutase increases during cytokine-mediated protection against pulmonary oxygen toxicity in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **10**(2):133-41.

Liochev, S.I., Fridovich, I. (1998) Lucigenin as mediator of superoxide production: revisited. *Free Radic Biol Med.* **25**(8):926-8.

Liou, W., Chang, L.Y., Geuze, H.J., Strous, G.J., Crapo, J.D., Slot, J.W. (1993) Distribution of CuZn superoxide dismutase in rat liver. *Free Radic Biol Med.* **14**(2):201-7.

Lippman, R.D. (1981) The prolongation of life: a comparison of antioxidants and geroprotectors versus superoxide in human mitochondria. *J Gerontol.* **36**(5):550-7.

Liu, Y., Fiskum, G., Schubert, D. (2002) Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem.* **80**(5):780-7.

Loeffen, J., Elpeleg, O., Smeitink, J., Smeets, R., Stockler-Ipsiroglu, S., Mandel, H., Sengers, R., Trijbels, F., van den Heuvel, L. (2001) Mutations in the complex I NDUFS2 gene of patients with cardiomyopathy and encephalomyopathy. *Ann Neurol.* **49**(2):195-201.

Loeffen, J., Smeitink, J., Triepels, R., Smeets, R., Schuelke, M., Sengers, R., Trijbels, F., Hamel, B., Mullaart, R., van den Heuvel, L. (1998) The first nuclear-encoded complex I mutation in a patient with Leigh syndrome. *Am J Hum Genet.* **63**(6):1598-608.

Loschen, G., Azzi, A., Richter, C., et al. (1974) Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Letters* 42:68-72.

Luft, R., Ikkos, D., Palmieri, G. 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**: 1776-1782.

Lutsenko, S., Cooper, M.J. (1998) Localization of the Wilson's disease protein product to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**(11):6004-9.

Lutter, R., Saraste, M., van Walraven, H.S., Runswick, M.J., Finel, M., Deatherage, J.F., Walker, J.E. (1993) F1F0-ATP synthase from bovine heart mitochondria: development of the purification of a monodisperse oligomycin-sensitive ATPase. *Biochem J.* **295** (Pt 3):799-806.

Maiorino, M., Aumann, K.D., Brigelius-Flohe, R., Doria, D., van den Heuvel, J., McCarthy, J., Roveri, A., Ursini, F., Flohe, L. (1995) Probing the presumed catalytic

triad of selenium-containing peroxidases by mutational analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx). *Biol Chem Hoppe Seyler*. **376**(11):651-60.

Mallet, R.T. (2000) Pyruvate: metabolic protector of cardiac performance. *Proc Soc Exp Biol Med*. **223**(2): 136-148.

Malmstrom, B.G., Aasa, R. (1993) The nature of the CuA center in cytochrome c oxidase. *FEBS Lett.*; **325**(1-2):49-52.

Manam, S., Van Tuyle, G.C. (1987) Separation and characterization of 5'- and 3'-tRNA processing nucleases from rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **262**: 10272-10279.

Mandel, H., Szargel, R., Labay, V., Elpeleg, O., Saada, A., Shalata, A., Anbinder, Y., Berkowitz, D., Hartman, C., Barak, M., Eriksson, S., Cohen, N. (2001) The deoxyguanosine kinase gene is mutated in individuals with depleted hepatocerebral mitochondrial DNA. *Nat Genet.* **29**(3):337-41. Erratum in: *Nat Genet* 2001; 29(4):491.

Manfredi, G., Schon, E.A., Moraes, C.T., Bonilla, E., Berry, G.T., Sladky, J.T., DiMauro, S. (1995) A new mutation associated with MELAS is located in a mitochondrial DNA polypeptide-coding gene. *Neuromuscul Disord.* **5**(5):391-8.

Marklund, S.L., Holme, E., Hellner, L. (1982) Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clin Chim Acta.* **126**(1):41-51.

Marklund, S.L., Bjelle, A., Elmqvist, L.G. (1986) Superoxide dismutase isoenzymes of the synovial fluid in rheumatoid arthritis and in reactive arthritides. *Ann Rheum Dis.* **45**(10):847-51.

Massey, V. (1994) Activation of molecular oxygen by flavins and flavoproteins. *J Biol Chem.* **269**(36):22459-62.

Masucci, J.P., Davidson, M., Koga, Y., Schon, E.A., King, M.P. (1995) In vitro analysis of mutations causing myoclonus epilepsy with ragged-red fibers in the mitochondrial tRNA(Lys) gene: two genotypes produce similar phenotypes. *Mol Cell Biol.* **15**(5):2872-81.

- Masuda, A., Longo, D.L., Kobayashi, Y., Appella, E., Oppenheim, J.J., Matsushima, K.** (1988) Induction of mitochondrial manganese superoxide dismutase by interleukin 1. *FASEB J.* **2**(15):3087-91.
- McCord, J.M., Fridovich, I.** (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* **245**(6): 1374-1377
- Matthews, P.M., Hopkin, J., Brown, R.M., Stephenson, J.B., Hilton-Jones, D., Brown, G.K.** (1994) Comparison of the relative levels of the 3243 (A-->G) mtDNA mutation in heteroplasmic adult and fetal tissues. *J Med Genet.* **31**(1):41-4.
- Merante, F., Tein, I., Benson, L., Robinson, B.H.** (1994) Maternally inherited hypertrophic cardiomyopathy due to a novel T-to-C transition at nucleotide 9997 in the mitochondrial tRNA(glycine) gene. *Am J Hum Genet.* **55**(3):437-46.
- Meyer, M., Schreck, R., Baeuerle, P.A.** (1993) H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J.* **12**(5):2005-15.
- Michel, H.** (1998) The mechanism of proton pumping by cytochrome c oxidase [127e comments] *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**(22):12819-24.
- Milligan, S.A., Owens, M.W., Grisham, M.B.** (1998) Differential regulation of extracellular signal-regulated kinase and nuclear factor-kappa B signal transduction pathways by hydrogen peroxide and tumor necrosis factor. *Arch Biochem Biophys.* **352**(2):255-62.
- Min, D.S., Kim, E.G., Exton, J.H.** (1998) Involvement of tyrosine phosphorylation and protein kinase C in the activation of phospholipase D by H₂O₂ in Swiss 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem.* **273**(45):29986-94.
- Minc, E., de Coppet, P., Masson, P., Thiery, L., Dutertre, S., Amor-Gueret, M., Jaulin, C.** (1999) The human copper-zinc superoxide dismutase gene (SOD1) proximal promoter is regulated by Sp1, Egr-1, and WT1 via non-canonical binding sites. *J Biol Chem.* **274**(1):503-9.
- Montoya, J., Ojala, D., Attardi, G.** (1981) Distinctive features of the 5'-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs. *Nature* **290**, 465-470.

- Montoya, J., Christianson, T., Levens, D., Rabinowitz, M., Attardi, G.** (1982) Identification of initiation sites for heavy strand and light strand transcription in human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 7195-7199.
- Montoya, J., Gaines, G., Attardi, G.** (1983) The pattern of transcription of the human mitochondrial rRNA genes reveals two overlapping transcription units. *Cell* **34**: 151-159.
- Moraes, C.T., DiMauro, S., Zeviani, M., Lombes, A., Shanske, S., Miranda, A.F., Nakase, H., Bonilla, E., Werneck, L.C., Servidei, S., i col.** (1989) Mitochondrial DNA deletions in progressive external optalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *N Engl J Med.* **18**: 320(20): 1293-1299.
- Moraes, C.T., Ciacci, F., Bonilla, E., Jansen, C., Hirano, M., Rao, N., Lovelace, R.E., Rowland, L.P., Schon, E.A., DiMauro, S.** (1993) Two novel pathogenic mitochondrial DNA mutations affecting organelle number and protein synthesis. Is the tRNA(Leu(UUR)) gene an etiologic hot spot? *J Clin Invest.* **92**(6):2906-15.
- Moraes, C.T., Ciacci, F., Bonilla, E., Ionasescu, V., Schon, E.A., DiMauro, S.** (1993) A mitochondrial tRNA anticodon swap associated with a muscle disease. *Nat Genet.* **4**(3):284-8.
- Morten, K.J., Cooper, J.M., Brown, G.K., Lake, B.D., Pike, D., Poulton, J.** (1993) A new point mutation associated with mitochondrial encephalomyopathy. *Hum Mol Genet.* **2**(12):2081-7.
- Murphy, H.S., Shayman, J.A., Till, G.O., Mahrougui, M., Owens, C.B., Ryan, U.S., Ward, P.A.** (1992) Superoxide responses of endothelial cells to C5a and TNF-alpha: divergent signal transduction pathways. *Am J Physiol.* **263**(1 Pt 1):L51-9.
- Murthy, M.R., Reid, T.J. 3rd, Sicignano, A., Tanaka, N., Rossmann, M.G.** (1981) Structure of beef liver catalase. *J Mol Biol.* **152**(2):465-99.
- Naviaux, R.K.** (2000) Mitochondrial DNA disorders. *Eur J Pediatr.* **159 Suppl 3**: 219-226.
- Nelson, B.D., Walter, P., Ernster, L.** (1977) Funiculosin: an antibiotic with antimycin-like inhibitory properties. *Biochim Biophys Acta.* **460**(1):157-62.

Niemann, S., Muller, U. (2000) Mutations in SDHC cause autosomal dominant paraganglioma, type 3. *Nat Genet.* **26**(3):268-70.

Nishino, I., Spinazzola, A., Hirano, M. (1999) Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science.* **283**(5402):689-92.

Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., Kinoshita, K. Jr. (1997) Direct observation of the rotation of F1-ATPase. *Nature.* **386**(6622):299-302.

Ohnishi, T., Ragan, C.I., Hafeti, Y. (1985) EPR studies of iron-sulfur clusters in isolated subunits and subfractions of NADH-ubiquinone oxidoreductase. *J Biol Chem* **260**: 2782-2788.

Ohnishi, T. (1998) Iron-sulfur clusters/semiquinones in complex I. *Biochim Biophys Acta* **1364**: 186-206.

Ojala, D., Attardi, G. (1974) Identification and partial characterization of multiple discrete polyadenylic acid containing RNA components coded by HeLa cell mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.* **88**, 205-219.

Ojala, D., Montoya, J., Attardi, G. (1981) tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature* **290**(5806):470-474.

Okado-Matsumoto, A., Fridovich, I. (2001) Subcellular distribution of Superoxide dismutases (SOD) in rat liver. *J Biol Chem.* **276** (42): 38388-38393.

Okun, J.G., Zickermann, V., Brandt, U. (1999) Properties of the common inhibitor-binding domain in mitochondrial NADH-dehydrogenase (complex I). *Biochem Soc Trans* **27**: 596-601.

O'Shea, P.S., Feuerstein-Thelen, S., Azzi, A. (1984) Membrane-potential-dependent changes of the lipid microviscosity of mitochondria and phospholipid vesicles. *Biochem J.* **220**(3):795-801.

Ozawa, M., Nishino, I., Horai, S., Nonaka, I., 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**(3):271-8.

Ozawa, T. (1997) Genetic and functional changes in mitochondria associated with aging. *Physiol Rev* **77**:425-464.

Papadopoulou, L.C., Sue, C.M., Davidson, M.M., Tanji, K., Nishino, I., Sadlock, J.E., Krishna, S., Walker, W., Selby, J., Glerum, D.M., Coster, R.V., Lyon, G., Scalais, E., Lebel, R., Kaplan, P., Shanske, S., De Vivo, D.C., Bonilla, E., Hirano, M., DiMauro, S., Schon, E.A. (1999) Fatal infantile cardioencephalomyopathy with COX deficiency and mutations in SCO2, a COX assembly gene. *Nat Genet.* **23**(3):333-7.

Parisi, M.A., Clayton, D.A. (1991) Similarity of human mitochondrial transcription factor 1 to high mobility group proteins. *Science* **252**: 965-969

Peus, D., Meves, A., Vasa, R.A., Beyerle, A., O'Brien, T., Pittelkow, M.R. (1999) H₂O₂ is required for UVB-induced EGF receptor and downstream signaling pathway activation. *Free Radic Biol Med.* **27**(11-12):1197-202.

Petruzzella, V., Vergari, R., Puzziferri, I., Boffoli, D., Lamantea, E., Zeviani, M., Papa, S. (2001) A nonsense mutation in the NDUFS4 gene encoding the 18 kDa (AQDQ) subunit of complex I abolishes assembly and activity of the complex in a patient with Leigh-like syndrome. *Hum Mol Genet.* **10**(5):529-35.

Pitkanen, S., Robinson, B.H. (1996) Mitochondrial complex I deficiency leads to increased production of superoxide radicals and induction of Superoxide dismutase. *J Clin Invest.* **98**(2): 345-351.

Poulton, J., Deadman, M.E., Gardiner, R.M. (1989) Duplications of mitochondrial DNA in mitochondrial myopathy. *Lancet.* 1(8632):236-40.

Puranam, R.S., Attardi, G. (2001) The Rnase P associated with HeLa cell mitochondria contains an essential RNA component identical in sequence to that of the nuclear Rnase . *Mol. Cell. Biol.* **21**: 548-561

Puri, P.L., Avantaggiati, M.L., Burgio, V.L., Chirillo, P., Colleparado, D., Natoli, G., Balsano, C., Levrero, M. (1995) Reactive oxygen intermediates mediate angiotensin II-induced c-Jun.c-Fos heterodimer DNA binding activity and proliferative hypertrophic responses in myogenic cells. *J Biol Chem.* **270**(38):22129-34.

Putnam, C.D., Arvai, A.S., Bourne, Y., Tainer, J.A. (2000) Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *J Mol Biol.* **296**(1):295-309.

Prezant, T.R., Agapian, J.V., Bohlman, M.C., Bu, X., Oztas, S., Qiu, W.Q., Arnos, K.S., Cortopassi, G.A., Jaber, L., Rotter, J.I., et al. (1993) Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat Genet.* **4**(3):289-94.

Priller, J., Scherzer, C.R., Faber, P.W., MacDonald, M.E., Young, A.B. (1997) Frataxin gene of Friedreich's ataxia is targeted to mitochondria. *Ann Neurol.* **42**(2):265-9

Ragan, C.I. (1987) Structure of NADH-ubiquinone reductase (Complex I). *Curr Top Bioenerg* **15**:1.

Rahman, S., Taanman, J.W., Cooper, J.M., Nelson, I., Hargreaves, I., Meunier, B., Hanna, M.G., Garcia, J.J., Capaldi, R.A., Lake, B.D., Leonard, J.V., Schapira, A.H. (1999) A missense mutation of cytochrome oxidase subunit II causes a defective assembly and myopathy. *Am J Hum Genet.* **65**(4): 1030-1039.

Reid, F.M., Vernham, G.A., Jacobs, H.T. (1994) A novel mitochondrial point mutation in a maternal pedigree with sensorineural deafness. *Hum Mutat.* **3**(3):243-7.

Ren, B., Huang, W., Akesson, B., Ladenstein, R. (1997) The crystal structure of seleno-glutathione peroxidase from human plasma at 2.9 Å resolution. *J Mol Biol.* **268**(5):869-85.

Rhee, S.G. (1999) Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp Mol Med.* **31**(2):53-9.

Ribiere, C., Hininger, I., Saffar-Boccaro, C., Sabourault, D., Nordmann, R. (1994) Mitochondrial respiratory activity and superoxide radical generation in the liver, brain and heart after chronic ethanol intake. *Biochem Pharmacol.* **47**(10):1827-33.

Roesch, K., Curran, S.P., Tranebjaerg, L., Koehler, C.M. (2002) Human deafness dystonia syndrome is caused by a defect in assembly of the DDP1/TIMM8a-TIMM13 complex. *Hum Mol Genet.* **11**(5):477-86.

Rogers, R.J., Chesrown, S.E., Kuo, S., Monnier, J.M., Nick, H.S. (2000) Cytokine-inducible enhancer with promoter activity in both the rat and human manganese-superoxide dismutase genes. *Biochem J.* **347** Pt 1:233-42.

Roveri, A., Coassin, M., Maiorino, M., Zamburlini, A., van Amsterdam, F.T., Ratti, E., Ursini, F. (1992) Effect of hydrogen peroxide on calcium homeostasis in smooth muscle cells. *Arch Biochem Biophys.* **297**(2):265-70.

Rusanen, H., Majamaa, K., Hassinen, I. (2000) Increased activities of antioxidant enzymes and decreased ATP concentration in cultured myoblasts with the 3243A→G mutation in mitochondrial DNA. *Biochim Biophys Acta.* **1500**:10-16

Saada, A., Shaag, A., Mandel, H., Nevo, Y., Eriksson, S., Elpeleg, O. (2001) Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy. *Nat Genet.* **29**(3):342-4.

Santorelli, F.M., Shanske, S., Macaya, A., DeVivo, D.C., DiMauro, S. (1993) The mutation at nt 8993 of mitochondrial DNA is a common cause of Leigh's syndrome. *Ann Neurol.* **34**(6):827-34.

Santorelli, F.M., Mak, S.C., Vazquez-Acevedo, M., Gonzalez-Astiazaran, A., Ridaura-Sanz, C., Gonzalez-Halphen, D., DiMauro, S. (1995) A novel mitochondrial DNA point mutation associated with mitochondrial encephalocardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun.* **216**(3):835-40

Santorelli, F.M., Mak, S.C., El-Schahawi, M., Casali, C., Shanske, S., Baram, T.Z., Madrid, R.E., 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**(5):933-9.

Saraste, M. (1999) Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science.* **283**(5407):1488-93.

Sato, W., Hayasaka, K., Shoji, Y., Takahashi, T., Takada, G., Saito, M., Fukawa, O., Wachi, E. (1994) A mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) mutation at 3,256 associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS). *Biochem Mol Biol Int.* **33**(6):1055-61.

Seneca, S., Verhelst, H., De Meirleir, L., Meire, F., Ceuterick-De Groote, C., Lissens, W., Van Coster, R. (2001) A new mitochondrial point mutation in the transfer RNA(Leu) gene in a patient with a clinical phenotype resembling Kearns-Sayre syndrome. *Arch Neurol.* **58**(7):1113-8.

- Schagger, H., Pfeiffer, K.** (2000) Supercomplexes in the respiratory chain of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* **19**: 1777-1783.
- Shanke, S., DiMauro, S.** (1994) Mitochondrial myopathies: Biochemical myopathies: Biochemical aspects. *Curr Top Bioenerg* **17**: 21-58
- Schatz, G.** (1998) Protein transport. The doors to organelles. *Nature* **395**: 439-440.
- Scheffler, I.E.** (1999) *Mitochondria*. Wiley-Liss Inc.
- Schneider, R., Brors, B., Massow, M., Weiss, H.** (1997) Mitochondrial fatty acid synthesis: a relic of endosymbiotic origin and a specialized means for respiration. *FEBS Lett* **407**: 249-252.
- Schoubridge, E.A.** (2002) The ABCs of mitochondrial transcription. *Nature Genet.* **31**: 227-228.
- Schon, E.** (1997) The mitochondrial genome. In Rosenberg, R.N., Prusiner S.B., DiMauro, S., Barchi, R.L., Nestler, E.J. *The Molecular and Genetic Bases of Neurologic and Psychiatric Diseases (Mitochondrial Disorders, Chapter 14, pp.179-189)*. Butterworth-Heinemann, 3rd Edition.
- Schreck, R., Albermann, K., Baeuerle, P.A.** (1992) Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic Res Commun.* **17**(4):221-37.
- Schulte, U., Haupt, V., Abelmann, A., Fecke, W., Brors, B., Rasmussen, T., Schwartz, M., Vissing, J.** (2002) Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N Engl Med* **347**:576-580
- Sciacco, M., Bonilla, E.** (1996) Cytochemistry and immunocytochemistry of mitochondria in tissue sections. *Methods Enzymol.* **264**: 509-521.
- Segal, A.W., Shatwell, K.P.** (1997) The NADPH oxidase of phagocytic leukocytes. *Ann N Y Acad Sci.* **832**:215-22.
- Shoffner, J.M., Lott, M.T., Lezza, A.M., Seibel, P., Ballinger, S.W., Wallace, D.C.** (1990) Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. *Cell.* **61**(6):931-7

Silvestri, G., Moraes, C.T., Shanske, S., Oh, S.J., DiMauro, S. (1992) A new mtDNA mutation in the tRNA(Lys) gene associated with myoclonic epilepsy and ragged-red fibers (MERRF). *Am J Hum Genet.* **51**(6):1213-7.

Silvestri, G., Ciafaloni, E., Santorelli, F.M., Shanske, S., Servidei, S., Graf, W.D., Sumi, M., DiMauro, S. (1993) Clinical features associated with the A→G transition at nucleotide 8344 of mtDNA ("MERRF mutation"). *Neurology* **43**: 1200-1206.

Silvestri, G., Santorelli, F.M., Shanske, S., Whitley, C.B., Schimmenti, L.A., Smith, S.A., DiMauro, S. (1994) A new mtDNA mutation in the tRNA(Leu(UUR)) gene associated with maternally inherited cardiomyopathy. *Hum Mutat.* **3**(1):37-43.

Silvestri, G., Ciafaloni, E., Santorelli, F.M., Shanske, S., Servidei, S., Graf, W.D., Sumi, M., Keightley, J.A., Anitori, R., Burton, M.D., Quan, F., Buist, N.R., Kennaway, N.G. (2000) Mitochondrial encephalomyopathy and complex III deficiency associated with a stop-codon mutation in the cytochrome b gene. *Am J Hum Genet.* **67**(6):1400-10. Epub 2000 Oct 20.

Simon, A.R., Rai, U., Fanburg, B.L., Cochran, B.H. (1998) Activation of the JAK-STAT pathway by reactive oxygen species. *Am J Physiol.* **275**(6 Pt 1):C1640-52.

Solano, A., Roig, M., Vives-Bauza, C., Hernandez-Pena, J., Garcia-Arumi, E., Playan, A., Lopez-Perez, M.J., Andreu, A.L., Montoya, J. (2003) Bilateral striatal necrosis associated with a novel mutation in the mitochondrial ND6 gene. *Ann Neurol.* **54**(4):527-30.

Spelbrink, J.N., Li, F.Y., Tiranti, V., Nikali, K., Yuan, Q.P., Tariq, M., Wanrooij, S., Garrido, N., Comi, G., Morandi, L., Santoro, L., Toscano, A., Fabrizi, G.M., Somer H., Croxen, R., Beeson, D., Poulton, J., Suomalainen, A., Jacobs, H.T., Zeviani, M., Larsson, C. (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. Erratum in: *Nat Genet* 2001; 29(1):100.

Starkov, A.A., Fiskum, G. (2001) Myxothiazol induces H₂O₂ production from mitochondrial respiratory chain. *Biochem Biophys Res Commun.* **281**: 645-650.

Stoneking, M., Sodyall, H. (1996) Human evolution and the mitochondrial genome. *Curr Opin Genet. Dev* **6**:731-736

Storz, G., Tartaglia, L.A., Ames, B.N. (1990) Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science*. **248**(4952):189-94.

Strom, T.M., Hortnagel, K., Hofmann, S., Gekeler, F., Scharfe, C., Rabl, W., Gerbitz, K.D., Meitinger, T. (1998) Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness (DIDMOAD) caused by mutations in a novel gene (wolframin) coding for a predicted transmembrane protein. *Hum Mol Genet*. **7**(13):2021-8

Sue, C.M., Quigley, A., Katsabanis, S., Kapsa, R., Crimmins, D.S., Byrne, E., Morris, J.G. (1998) Detection of MELAS A3243G point mutation in muscle, blood and hair follicles. *J Neurol Sci*. **161**(1):36-9.

Sue, C.M., Tanji, K., Hadjigeorgiou, G., Andreu, A.L., Nishino, I., Krishna, S., Bruno, C., Hirano, M., Shanske, S., Bonilla, E., Fischel-Ghodsian, N., DiMauro, S., Friedman, R. (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.

Suzuki, Y.J., Forman, H.J., Sevanian, A. (1997) Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic Biol Med*. **22**(1-2):269-85.

Sweeney, M.G., Bunday, S., Brockington, M., Poulton, K.R., Winer, J.B., Harding, A.E. (1993) Mitochondrial myopathy associated with sudden death in young adults and a novel mutation in the mitochondrial DNA leucine transfer RNA(UUR) gene. *Q J Med*. **86**(11):709-13.

Tabrizi, S.J., Cooper, J.M., Schapira, A.H. (1998) Mitochondrial DNA in focal dystonia: a cybrid analysis. *Ann Neurol*. **44**(2):258-61.

Takekoshi, S., Kambayashi, Y., Nagata, H., Takagi, T., Yamamoto, Y., Watanabe, K. (1995) Activation of protein kinase C by oxidized diacylglycerols. *Biochem Biophys Res Commun*. **217**(2):654-60.

Takeuchi, H., Kobayashi, Y., Ishigaki, S., Doyu, M., Sobue, G. (2002) Mitochondrial localization of mutant superoxide dismutase 1 triggers caspase-dependent cell death in a cellular model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem*. **277**(52):50966-72. Epub 2002 Oct 21.

Tanaka, M., Ino, H., Ohno, K., Hattori, K., Sato, W., Ozawa, T., Tanaka, T., Itoyama, S. (1990) Mitochondrial mutation in fatal infantile cardiomyopathy. *Lancet*. **336**(8728):1452.

Taniike, M., Fukushima, H., Yanagihara, I., Tsukamoto, H., Tanaka, J., Fujimura, H., Nagai, T., Sano, T., Yamaoka, K., Inui, K., et al. (1992) Mitochondrial tRNA(Ile) mutation in fatal cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun*. **186**(1):47-53.

Thierbach, G., Reichenbach, H. (1981) Myxothiazol, a new inhibitor of the cytochrome b-c1 segment of the respiratory chain. *Biochim Biophys Acta*. **638**(2):282-9.

Thyagarajan, D., Shanske, S., Vazquez-Memije, M., De Vivo, D., DiMauro S. (1995) A novel mitochondrial ATPase 6 point mutation in familial bilateral striatal necrosis. *Ann Neurol*. **38**(3):468-72

Thyagarajan, D., Bressman, S., Bruno, C., Przedborski, S., Shanske, S., Lynch, T., Fahn, S., DiMauro, S. (2000) A novel mitochondrial 12SrRNA point mutation in parkinsonism, deafness, and neuropathy. *Ann Neurol*. **48**(5):730-6

Tiranti, V., Corona, P., Greco, M., Taanman, J.W., Carrara, F., Lamantea, E., Nijtmans, L., Uziel, G., Zeviani, M. (2000) A novel frameshift mutation of the mtDNA COIII gene leads to impaired assembly of cytochrome c oxidase in a patient affected by Leigh-like syndrome. *Hum Mol Genet*. **9**(18):2733-42.

Triepels, R.H., van den Heuvel L.P., Loeffen, J.L., Buskens, C.A., Smeets, R.J., Rubio Gozalbo, M.E., Budde, S.M., Mariman, E.C., Wijburg, F.A., Barth, P.G., Trijbels, J.M., Smeitink, J.A. (1999) Leigh syndrome associated with a mutation in the NDUFS7 (PSST) nuclear encoded subunit of complex I. *Ann Neurol*. **45**(6):787-90.

Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yoshikawa, S. (1996) The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science*. **272**(5265):1136-44.

Turrens, J.F., Boveris, A. (1980) Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J*. **191**(2):421-7.

Turrens, J.F., Alexandre, A., Lehninger, A.L. (1985) Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys*. **237**: 408-414.

- Uusimaa, J., Finnila, S., Vainionpaa, L., Karppa, M., Herva, R., Rantala, H., Hassinen, I.E., Majamaa, K.** (2003) A mutation in mitochondrial DNA-encoded cytochrome c oxidase II gene in a child with Alpers-Huttenlocher-like disease. *Pediatrics*. **111**(3): 262-268.
- Valentino, M.L., Avoni, P., Barboni, P., Pallotti, F., Rengo, C., Torroni, A., Bellan, M., Baruzzi, A., Carelli, V.** (2002) Mitochondrial DNA nucleotide changes C14482G and C14482A in the ND6 gene are pathogenic for Leber's hereditary optic neuropathy. *Ann Neurol*. **51**(6):774-8.
- Valnot, I., Osmond, S., Gigarel, N., Mehaye, B., Amiel, J., Cormier-Daire, V., Munnich, A., Bonnefont, J.P., Rustin, P., Rotig, A.** (2000) Mutations of the SCO1 gene in mitochondrial cytochrome c oxidase deficiency with neonatal-onset hepatic failure and encephalopathy. *Am J Hum Genet*. **67**(5):1104-9. Epub 2000 Sep 28.
- Valnot, I., von Kleist-Retzow, J.C., Barrientos, A., Gorbatyuk, M., Taanman, J.W., Mehaye, B., Rustin, P., Tzagoloff, A., Munnich, A., Rotig, A.** (2000) A mutation in the human heme A:farnesyltransferase gene (COX10) causes cytochrome c oxidase deficiency. *Hum Mol Genet*. **9**(8):1245-9.
- Van Ark, G., Berden, J.A.** (1977) Binding of HQNO to beef-heart sub-mitochondrial particles. *Biochim Biophys Acta*. **459**(1):119-27.
- van den Heuvel, L., Ruitenbeek, W., Smeets, R., Gelman-Kohan, Z., Elpeleg, O., Loeffen, J., Trijbels, F., Mariman, E., de Bruijn, D., Smeitink, J.** (1998) Demonstration of a new pathogenic mutation in human complex I deficiency: a 5-bp duplication in the nuclear gene encoding the 18-kD (AQDQ) subunit. *Am J Hum Genet*. **62**(2):262-8.
- Van den Ouweland, J.M., Lemkes, H.H., Ruitenbeek, W., Sandkuijl, L.A., de Vijlder, M.F., Struyvenberg, P.A., van de Kamp, J.J., Maassen, J.A.** (1992) Mutation in mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness. *Nat Genet*. **1**(5):368-71.
- Van Goethem, G., Dermaut, B., Lofgren, A., Martin, J.J., Van Broeckhoven, C.** (2001) Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nat Genet*. **28**(3):211-2.

- Varlamov, D.A., Kudin, A.P., Vielhaber, S., Schroder, R., Sassen, R., Becker, A., Kunz, D., Haug, K., Rebstock, J., Heils, A., Elger, C.E., Kunz, W.S.** (2002) Metabolic consequences of a novel missense mutation of the mtDNA CO I gene. *Hum Mol Genet.* **11**(16): 1797-805.
- Varotsis, C., Zhang, Y., Appelman, E.H., Babcock, G.T.** (1993) Resolution of the reaction sequence during the reduction of O₂ by cytochrome oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA.* **90**(1):237-41.
- Vila, M.R., Gamez, J., Solano, A., Playan, A., Schwartz, S., Santorelli, F.M., Cervera, C., Casali, C., Montoya, J., Villarroja, F.** (2000) Uncoupling protein-1 mRNA expression in lipomas from patients bearing pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Biochem Biophys Res Commun.* **278**(3):800-2.
- Vilkki, J., Ott, J., Savontaus, M.L., Aula, P., Nikoskelainen, E.K.** (1991) Optic atrophy in Leber hereditary optic neuropathy is probably determined by an X-chromosomal gene closely linked to DXS7. *Am J Hum Genet.* **48**(3): 486-91
- Villani, G., Attardi, G.** (1997) In vivo control of respiration by cytochrome c oxidase in wild-type and mitochondrial DNA mutation-carrying human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**(4):1166-1171
- Visner, G.A., Dougall, W.C., Wilson, J.M., Burr, I.A., Nick, H.S.** (1990) Regulation of manganese superoxide dismutase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor. Role in the acute inflammatory response. *J Biol Chem.* **265**(5):2856-64.
- Visner, G.A., Chesrown, S.E., Monnier, J., Ryan, U.S., Nick, H.S.** (1992) Regulation of manganese superoxide dismutase: IL-1 and TNF induction in pulmonary artery and microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **188**(1):453-62.
- Vives-Bauza, C., Gamez, J., Roig, M., Briones, P., Cervera, C., Solano, A., Montoya, J., Andreu, A.L.** (2001) Exercise intolerance resulting from a muscle-restricted mutation in the mitochondrial tRNA(Leu (CUN)) gene. *Ann Med.* **33**(7):493-6.
- von Ossowski, I., Hausner, G., Loewen, P.C.** (1993) Molecular evolutionary analysis based on the amino acid sequence of catalase. *J Mol Evol.* **37**(1):71-6.
- Walker, J.E.** (1992) The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) of respiratory chains. *Q Rev Biophys.* **25**(3):253-324.

Wallace, D.C., Singh, G., Lott, M.T., Hodge, J.A., Schurr, T.G., Lezza, A.M., Elsas, L.J. 2nd, Nikoskelainen, E.K. (1988) Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science*. **242**(4884):1427-30.

Wallace, D.C., Zheng, X.X., Lott, M.T., Shoffner, J.M., Hodge, J.A., Kelley, R.I., Epstein, C.M., Vilkki, J., Ott, J., Savontaus, M.L., Aula, P., Nikoskelainen, E.K. (1991) Optic atrophy in Leber hereditary optic neuroretinopathy is probably determined by an X-chromosomal gene closely linked toDXS7. *Am J Hum Genet*. **48**(3):486-91

Wallace, D.C. (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* **283**: 1482-1488.

Wang, Y., Michikawa, Y., Mallidis, C., Bai, Y., Woodhouse, L., Yarasheski, K.E., Miller, C.A., Askanas, V., Engel, W.K., Bhasin, S., Attardi, G. (2001) Muscle-specific mutations accumulate with aging in critical human mtDNA control sites for replication. *Proc Natl Acad Sci USA*. **98**(7): 4022-4027

Wang, H., Oster, G. (1998) Energy transduction in the F1 motor of ATP synthase. *Nature*. **396**(6708):279-82

Wan, B., Doumen, C., Duszynski, J., Salama, G., LaNoue, K.F. (1993) A method of determining electrical potential gradient across mitochondrial membrane in perfused rat hearts. *Am J Physiol*. **265**(2 Pt 2):H445-52.

Wan, X.S., Devalaraja, M.N., St Clair, D.K. (1994) Molecular structure and organization of the human manganese superoxide dismutase gene. *DNA Cell Biol*. **13**(11):1127-36.

Wei, Y.H., Pang, C.Y., You, B.J., Lee, H.C. (1996) Tandem duplications and large-scale deletions of mitochondrial DNA are early molecular events of human aging process. *Ann NY Acad Sci*. **786**: 82-101.

Wei, Y.H., Lu, C.Y., Wei, C.Y., Ma, Y.S., Lee, H.C. (2001) Oxidative stress in human aging and mitochondrial disease-consequences of defective mitochondrial respiration and impaired antioxidant enzyme system. *Chin J Physiol*. **44**(1):1-11.

Weisiger, R.A., Fridovich, I. (1973) Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem*. **248**(13):4793-6.

- Wernette, C.M., Conway, M.C., Kaguni, L.S.** (1988) Mitochondrial DNA polymerase from *Drosophila melanogaster* embryos: kinetics, processivity, and fidelity of DNA polymerization. *Biochemistry* **27**: 6046-6054
- Wikstrom, M.** (1998) Cytochrome oxidase: structure and mechanism. Foreword. *J Bioenerg Biomembr.* **30**(1):3-5.
- Wong, G.H., Goeddel, D.V.** (1988) Induction of manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor: possible protective mechanism. *Science.* **242**(4880):941-4.
- Wood, P.M.** (1987) The two redox potentials for oxygen reduction to superoxide. *Trends Biochem Sci.* **12**: 250-251.
- Xia, D., Yu, C.A., Kim, H., Xia, J.Z., Kachurin, A.M., Zhang, L., Yu, L., Deisenhofer, J.** (1997) Crystal structure of the cytochrome bc₁ complex from bovine heart mitochondria. *Science.* **277**(5322):60-6. Erratum in: *Science* 1997 Dec 19;278(5346):2037.
- Yang, M.Y., Bowmaker, M., Reyes, A., Vergani, L., Angeli, P., Gringeri, E., Jacobs, H.T., Holt, I.J.** (2002) Biased incorporation of ribonucleotides on the mitochondrial L-Strand accounts for apparent strand-asymmetric DNA replication. *Cell* **111**: 495-505
- Yamaoka, K., Edamatsu, R., Itoh, T., Mori, A.** (1994) Effects of low-dose X-ray irradiation on biomembrane in brain cortex of aged rats. *Free Radic Biol Med.* **16**(4):529-34.
- Yasuda, R., Noji, H., Kinosita, K. Jr, Yoshida, M.** (1998) F₁-ATPase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete 120 degree steps. *Cell.* **93**(7):1117-24.
- Yeh, C.C., Wan, X.S., St Clair, D.K.** (1998) Transcriptional regulation of the 5' proximal promoter of the human manganese superoxide dismutase gene. *DNA Cell Biol.* **17**(11):921-30.
- Yoo, H.Y., Chang, M.S., Rho, H.M.** (1999a) The activation of the rat copper/zinc superoxide dismutase gene by hydrogen peroxide through the hydrogen peroxide-responsive element and by paraquat and heat shock through the same heat shock element. *J Biol Chem.* **274**(34):23887-92.

- Yoo, H.Y., Chang, M.S., Rho, H.M.** (1999b) Heavy metal-mediated activation of the rat Cu/Zn superoxide dismutase gene via a metal-responsive element. *Mol Gen Genet.* **262**(2):310-3.
- Yoo, H.Y., Chang, M.S., Rho, H.M.** (1999c) Xenobiotic-responsive element for the transcriptional activation of the rat Cu/Zn superoxide dismutase gene. *Biochem Biophys Res Commun.* **256**(1):133-7.
- Yoon, K.L., Aprille, J.R., Ernst, S.G.** (1991) Mitochondrial tRNA(thr) mutation in fatal infantile respiratory enzyme deficiency. *Biochem Biophys Res Commun.* **176**(3):1112-5.
- Young, T.A., Cunningham, C.C., Bailey, S.M.** (2002) Reactive oxygen species production by the mitochondrial respiratory chain in isolated rat hepatocytes and liver mitochondria: studies using myxothiazol. *Arch Biochem Biophys.* **405**: 65-72.
- Yoshikawa, S., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yamashita, E., Inoue, N., Yao, M., Fei, M.J., Libeu, C.P., Mizushima, T., Yamaguchi, H., Tomizaki, T., Tsukihara, T.** (1998) Redox-coupled crystal structural changes in bovine heart cytochrome c oxidase. *Science.* **280**(5370):1723-9.
- Zeviani, M., Gellera, C., Antozzi, C., Rimoldi, M., Morandi, L., Villani, F., Tiranti, V., DiDonato, S.** (1991) Maternally inherited myopathy and cardiomyopathy: association with mutation in mitochondrial DNA tRNA(Leu)(UUR). *Lancet.* **338**(8760):143-7.
- Zhang, N.** (1996) Characterization of the 5' flanking region of the human MnSOD gene. *Biochem Biophys Res Commun.* **220**(1):171-80.
- Zhu, C.H., Huang, Y., Oberley, L.W., Domann, F.E.** (2001) A family of AP-2 proteins down-regulate manganese superoxide dismutase expression. *J Biol Chem.* **276**(17):14407-13. Epub 2001 Jan 26.
- Zhu, Z., Yao, J., Johns, T., Fu, K., De Bie, I., Macmillan, C., Cuthbert, A.P., Newbold, R.F., Wang, J., Chevrette, M., Brown, G.K., Brown, R.M., Shoubridge, E.A.** (1998) SURF1, encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome c oxidase, is mutated in Leigh syndrome. *Nat Genet.* **20**(4):337-43.