



# PRESENTACIÓ I ÍNDEX





# 1 ESTRUCTURA DE LA MEMÒRIA

*Aquesta memòria compila els resultats obtinguts sobre l'estudi del DNA mitocondrial en quatre malalties humanes. El conjunt del treball que es presenta ha pretès, per una banda, caracteritzar el tipus d'alteració present al genoma mitocondrial de persones afectades per una malaltia mitocondrial "clàssica" i de familiars de les mateixes. D'altra banda, ha intentat determinar si existien defectes al DNA mitocondrial en altres malalties l'etiologia de les quals encara era desconeguda. Molt modestament, tracta d'aportar dades al món de la genètica molecular mitocondrial.*

*La Introducció presenta breument les característiques principals del mitocondri i dues de les seves funcions més notables, especialment en el context de malaltia (la fosforilació oxidativa i l'apoptosi). Segueix un apartat dedicat al DNA mitocondrial en el qual es descriu l'estructura bàsica d'aquesta doble cadena circular i els tipus de mutacions que s'hi ha trobat. També es descriuen les particularitats més importants de la genètica mitocondrial. A continuació l'apartat Mitocondri i Malaltia presenta una classificació de les malalties mitocondrials i una reflexió sobre la relació genotip/fenotip en les mateixes; a més es dóna una pinzellada molt ràpida de les més freqüents i de les connexions que existeixen entre el mitocondri i les malalties neurodegeneratives. Per últim, s'esmenten les eines actuals per a l'estudi i el diagnòstic d'aquestes malalties, i les estratègies utilitzades en el seu tractament. La Introducció conclou amb un capítol dedicat a les malalties estudiades durant aquesta tesi.*

*Segueixen els Objectius del treball realitzat durant aquesta tesi doctoral. Els resultats s'inclouen sota l'epígraf Resultats i Discussió on, darrera de cada article s'afegeixen alguns comentaris i consideracions específics de la malaltia analitzada per tal de facilitar el seguiment dels diferents temes. Immediatament després d'aquest apartat s'ofereix una Discussió General que tracta aspectes globals i en la qual es raona sobre el conjunt de resultats obtinguts. A continuació es presenten les Conclusions, les quals tracten de respondre d'una manera molt concisa els objectius plantejats inicialment.*

*La secció destinada als Material i Mètodes s'inclou al final de la memòria (abans de les Referències i després de les Conclusions) en forma d'un breu apèndix.*



## 2 ÍNDEX

<b>PRESENTACIÓ I ÍNDEX</b>	<b>1</b>
1 ESTRUCTURA DE LA MEMÒRIA	3
2 ÍNDEX	4
3 ABREVIATURES	6
<b>INTRODUCCIÓ</b>	<b>7</b>
4 EL MITOCONDRI	9
Característiques principals	9
Respiració aeròbica	10
Apoptosi	12
5 DNA MITOCONDRIAL	14
El genoma mitocondrial	14
La genètica mitocondrial	15
Tipus de mutacions al mtDNA	17
6 MITOCONDRI I MALALTIA	18
Classificació de les malalties mitocondrials	18
Reordenaments	19
Mutacions puntuals	20
Observacions generals	21
Hi ha correlació genotip/fenotip en les malalties mitocondrials?	22
Malalties neurodegeneratives	24
L'envelliment i el paper dels radicals lliures	26
Eines per al diagnòstic i l'estudi de les malalties mitocondrials	27
Cíbrids transmitocondrials	29
Tractament de les malalties mitocondrials	31
Diagnòstic prenatal	32
7 MALALTIES ESTUDIADES	33
LHON	33
Mutacions al mtDNA	34
Funcionament de la CRM	36
Afectació del nervi òptic	37
Ambliopia alcohol–tabac (TAA)	37
Síndrome de Wolfram o DIDMOAD	38
Presentació clínica	38
El cervell a la WS	39
Genètica de la WS	39
Lipodistròfia associada a teràpia antivírica	42
Implicació mitocondrial en la LD-HIV	43
<b>OBJECTIUS</b>	<b>45</b>
8 OBJECTIUS	47



<b>RESULTATS I DISCUSSIÓ</b>	<b>49</b>
9 ARTICLE "ANÁLISIS DE 6 MUTACIONES LEBER EN 31 INDIVIDUOS CON ATROFIA ÓPTICA. ESTUDIO DE SU TRANSMISIÓN EN 5 FAMILIAS"	51
<b>Addenda</b>	53
Errata	54
10 ARTICLE "MITOCHONDRIAL DNA LHON MUTATIONS IN ALCOHOLIC PATIENTS DEVELOPING AMBLYOPIA"	55
<b>Addenda</b>	57
Errata	57
11 ARTICLE "PRESENCE OF A MAJOR <i>WFS1</i> MUTATION IN SPANISH WOLFRAM SYNDROME PEDIGREES"	59
<b>Addenda</b>	61
12 ARTICLE "RESPIRATORY CHAIN DYSFUNCTION ASSOCIATED WITH MULTIPLE MITOCHONDRIAL DNA DELETIONS IN ANTIRETROVIRAL THERAPY-RELATED LIPODYSTROPHY"	65
13 ARTICLE "MITOCHONDRIAL INVOLVEMENT IN ANTIRETROVIRAL THERAPY-RELATED LIPODYSTROPHY"	65
<b>Addenda</b>	67
<b>DISCUSSIÓ GENERAL</b>	<b>71</b>
14 CONSIDERACIONS ADDICIONALS	73
<b>CONCLUSIONS</b>	<b>81</b>
15 CONCLUSIONS	83
<b>MATERIALS I MÈTODES</b>	<b>85</b>
APÈNDIX	87
Comentaris previs	87
Procedència de les mostres	88
Esquema general dels mètodes emprats	88
Extracció de DNA	89
A partir de sang perifèrica	89
A partir de múscul, cervell o cultiu cel·lular	90
PCR normals	91
PCR llarga	93
Establiment de cultius cel·lulars	94
<b>REFERÈNCIES</b>	<b>97</b>
16 TREBALLS REFERENCIATS	99



### 3 ABREVIATURES

$\Delta\Psi_m$	potencial de membrana interna		materna
[Ca <sup>2+</sup> ]	concentració de calci	<b>MIM</b>	<i>Mendelian inheritance in man</i>
<b>AA</b>	alcohòlic ambliòpic	<b>MNGIE</b>	encefalomiopatia neurogastrointestinal mitocondrial
<b>acetilCoA</b>	acetilcoenzim A	<b>MS</b>	esclerosi múltiple
<b>AD</b>	malaltia d'Alzheimer	<b>mtDNA</b>	DNA mitocondrial
<b>AIF</b>	factor inductor d'apoptosi	<b>MTP</b>	porus de transició mitocondrial
<b>ALS</b>	esclerosi lateral amiotròfica	<b>NAD<sup>+</sup>(H)</b>	dinucleòtid d'adenina i nicotinamida, oxidat i reduït
<b>ANA</b>	alcohòlic no ambliòpic	<b>NARP</b>	neuropatia amb atàxia i retinopatia pigmentària
<b>ANT</b>	transportador de nucleòtids d'adenina	<b>ND</b>	subunitat de la NADH deshidrogenasa
<b>Apaf-1</b>	factor d'activació de la proteasa apoptòtica	<b>nDNA</b>	DNA nuclear
<b>ATP</b>	trifosfat d'adenosina	<b>NLD-HIV</b>	individu HIV-positiu que no presenta lipodistròfia
<b>AZT</b>	zidovudina	<b>NNRTI</b>	inhibidor no nucleòsid de la transcriptasa inversa
<b>BrEt</b>	bromur d'etidi	<b>NRTI</b>	anàleg de nucleòsids inhibidor de la transcriptasa inversa
<b>c. IV</b>	complex IV de la cadena respiratòria	<b>OXPHOS</b>	fosforilació oxidativa
<b>CK</b>	creatin quinasa	<b>PCR</b>	reacció en cadena de la polimerasa
<b>CoQ</b>	coenzim Q o ubiquinona	<b>PEO</b>	oftalmoplegia externa progressiva
<b>COX</b>	citocrom c oxidasa	<b>PI</b>	inhibidor de la proteasa
<b>CRM</b>	cadena respiratòria mitocondrial	<b>RE</b>	reticle endoplasmàtic
<b>dNTP</b>	desoxinucleòtid	<b>RFLP</b>	fragment de restricció de longitud polimòrfica
<b>ddNTP</b>	didesoxinucleòtid	<b>ROS</b>	espècie d'oxigen reactiu
<b>DIDMOAD</b>	síndrome de Wolfram	<b>RRF</b>	fibres vermelles desestructurades
<b>FAD(H<sub>2</sub>)</b>	dinucleòtid de flavina i adenina, forma oxidada i forma reduïda	<b>rRNA</b>	RNA ribosòmic
<b>FBI</b>	<i>Federal Bureau of Investigation</i>	<b>tRNA</b>	RNA de transferència
<b>GSH</b>	glutatió reduït	<b>SDH</b>	succinat deshidrogenasa
<b>HAART</b>	teràpia antivírica altament activa	<b>SNC</b>	sistema nerviós central
<b>HD</b>	malaltia de Huntington	<b>SSCP</b>	polimorfisme de conformació de cadena senzilla
<b>HIV</b>	virus d'immunodeficiència humana	<b>TAA</b>	ambliopia alcohol-tabac
<b>KSS</b>	síndrome de Kearns-Sayre	<b>T<sub>h</sub></b>	temperatura d'hibridació
<b>LD</b>	lipodistròfia	<b>Tk</b>	timidina quinasa
<b>LD-HIV</b>	individu HIV-positiu que presenta lipodistròfia	<b>TP</b>	timidina fosforilasa
<b>LHON</b>	neuropatia òptica hereditària de Leber	<b>WFS1</b>	gen 1 per a la síndrome de Wolfram
<b>MELAS</b>	encefalopatia mitocondrial amb acidosi làctica i episodis similars a ictus	<b>WS</b>	síndrome de Wolfram
<b>MERRF</b>	epilèpsia mioclònica amb fibres vermell desestructurades		
<b>MILS</b>	síndrome de Leigh d'herència		

