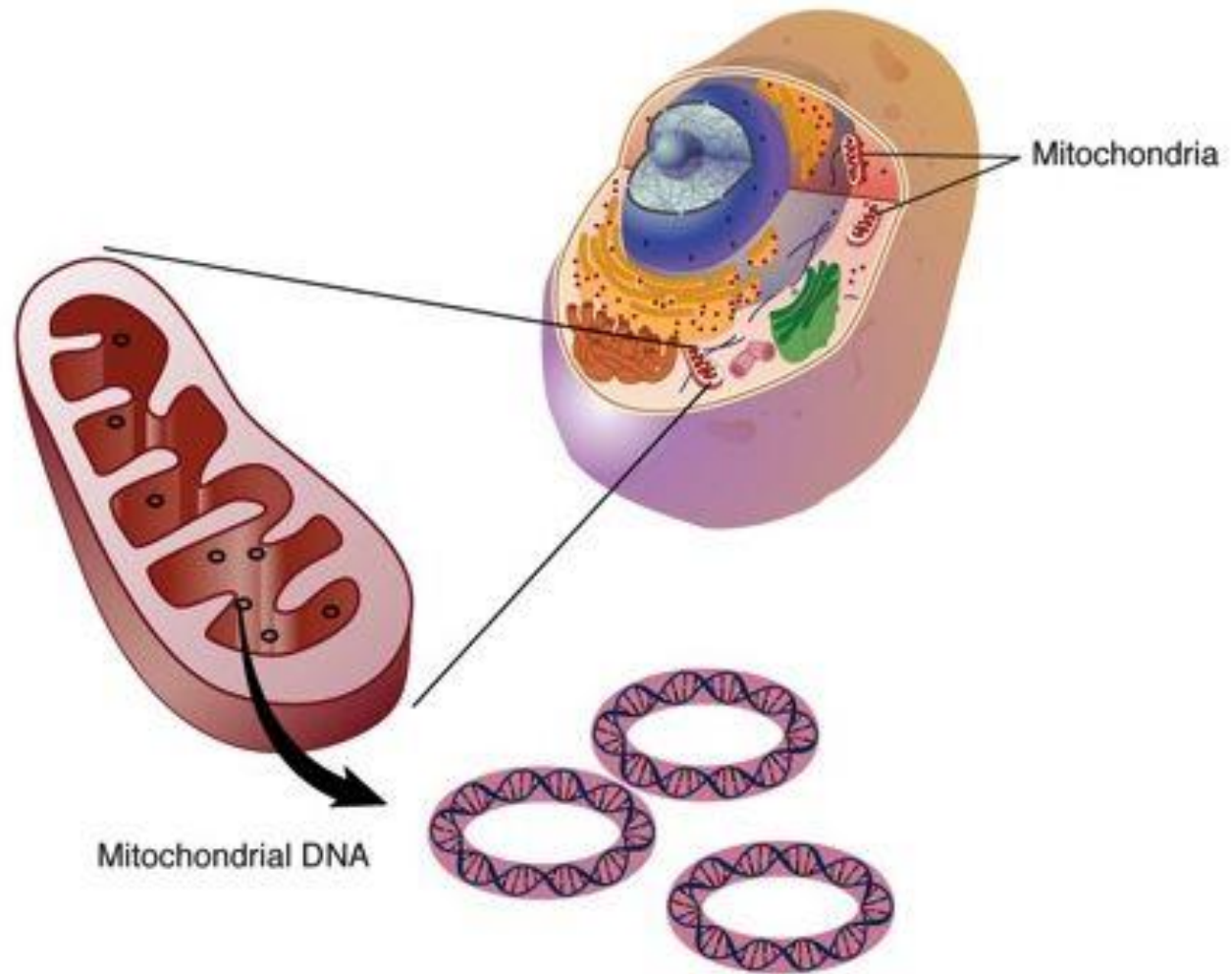


DNA Mitochondrial (mt)

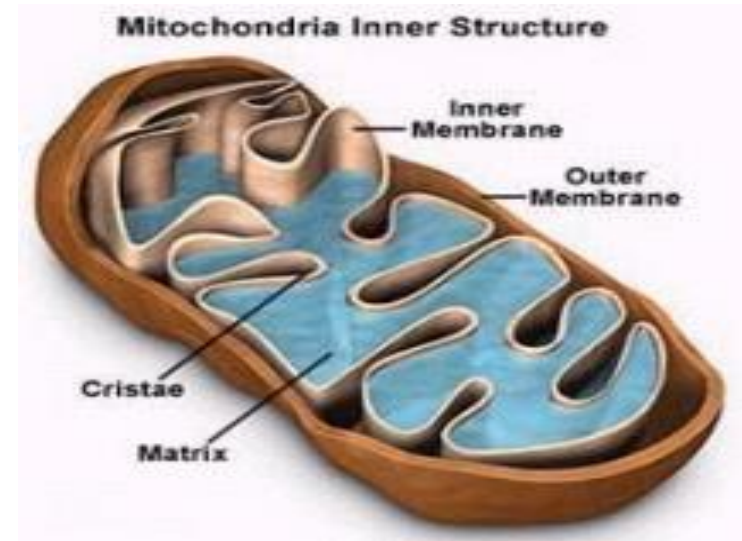


Características de las Mitocondrias

- Su tamaño varía entre 0.5 y 1 μm
- Formadas por una membrana lisa externa y una interna (crestas mitocondriales)

- Promedio general de mitocondrias/célula: 500 a 1000
- Los eritrocitos no tienen mitocondrias (ni núcleo)
- Las plaquetas tienen sólo mitocondrias y no DNA nuclear
- Los linfocitos maduros tienen 10 a 50 organelas
- Los ovocitos llegan a tener entre 100.000 a 200.000 mitocondrias

➤ Existen entre 2 a 10 moléculas de DNAm_t; ribosomas mt; tRNA mt y subunidades enzimáticas (elementos estructurales de la MI) que forman los complejos respiratorios I-IV encargados de OXPHOS (fosforilación oxidativa).



Características del DNA mitocondrial

➤ Molécula circular (16569 bp en humanos).

Secuencia completa: Anderson, et al., 1980./ Secuencia de Cambridge

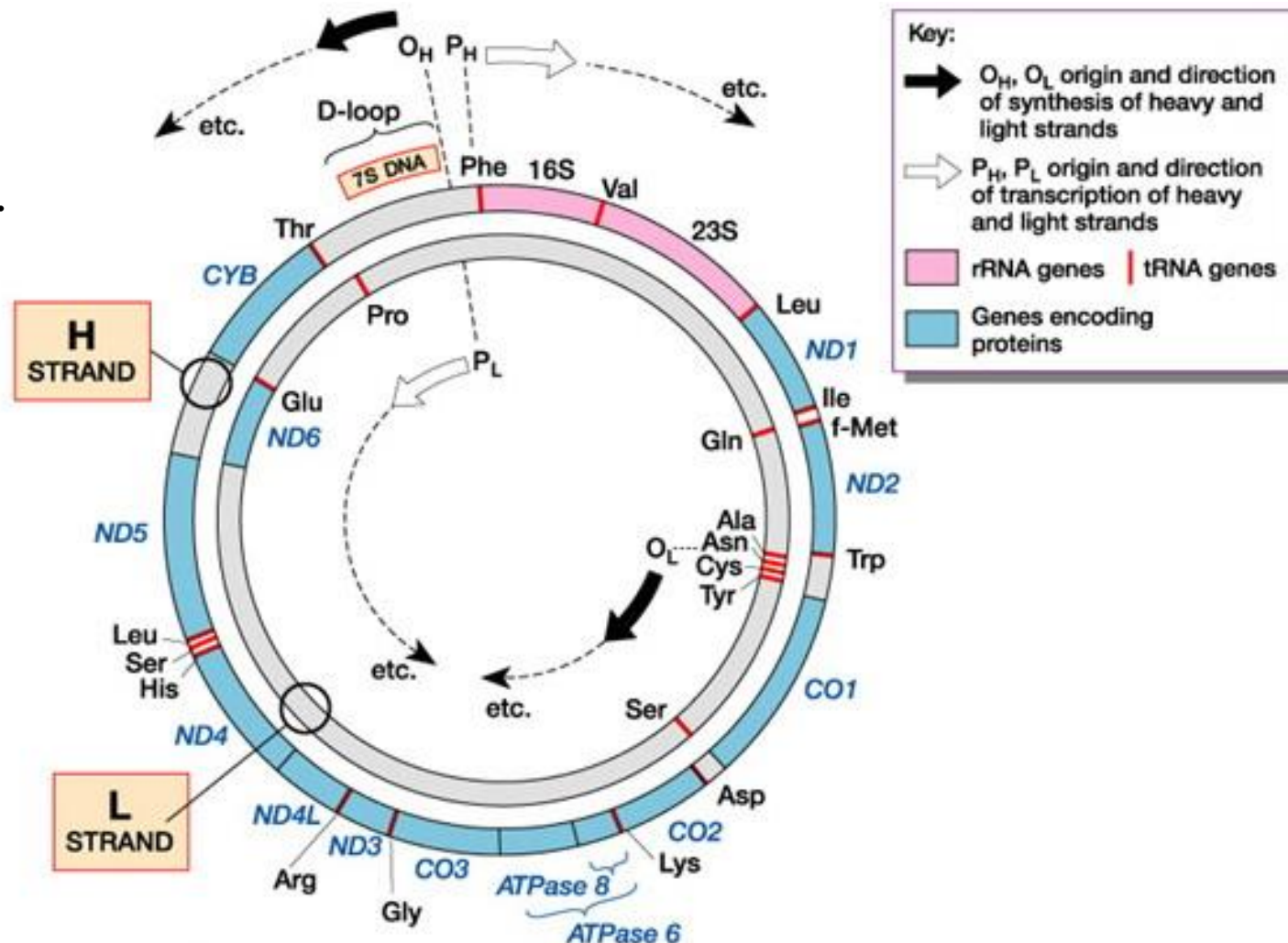
➤ Cadenas complementarias asimétricas
H - rica en bases G
L - rica en bases C

➤ Carece de intrones, los genes se ubican uno a continuación del otro.

➤ Sólo dos regiones de secuencias no codificantes:

1) Entre los extremos de los genes tRNA Lisina y ATPasa8 (5' 8294-3' 8301) (9bp).

2) **D-Loop** (Asa D o RHVI) 16024-576 (1121bp).



Replicación y transcripción del DNAm

Replicación:

DNA Polimerasa gamma (γ). Codificada en el DNA nuclear 15q26.
Tiene actividad exonucleasa 3'-5'.

Síntesis de DNA

1. Separación de las cadenas complementarias a nivel del OH
Simultáneamente inicio de la síntesis de la cadena H 3'-5' (molde la cadena L)
2. Estructura triple cadena se mantiene hasta que la síntesis progresa a los 2/3 del DNAm y alcanza el OL (origen de replicación de la L); comienza la síntesis de la cadena L en dirección opuesta usando la H como molde.

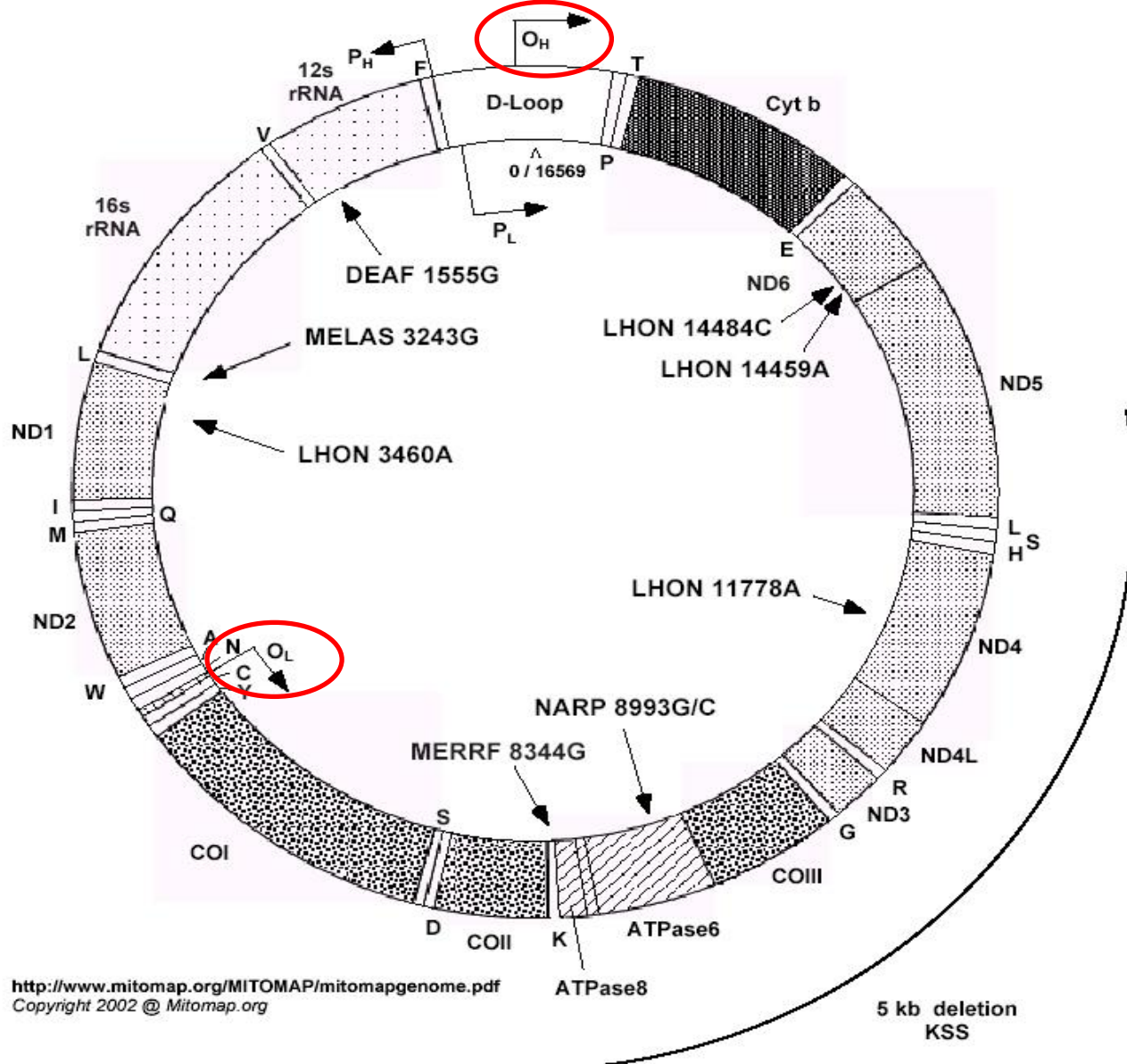
Duración total 2 horas a una velocidad de 270nt/minuto por cadena; es 100 a 200 veces más lenta que la nuclear.

Transcripción:

Las dos cadenas se transcriben; el D-Loop contiene un promotor para cada cadena

En mamíferos, existen pequeñas variaciones en el código genético del DNAm con respecto al código genético universal (ej: posee 4 codones de stop).

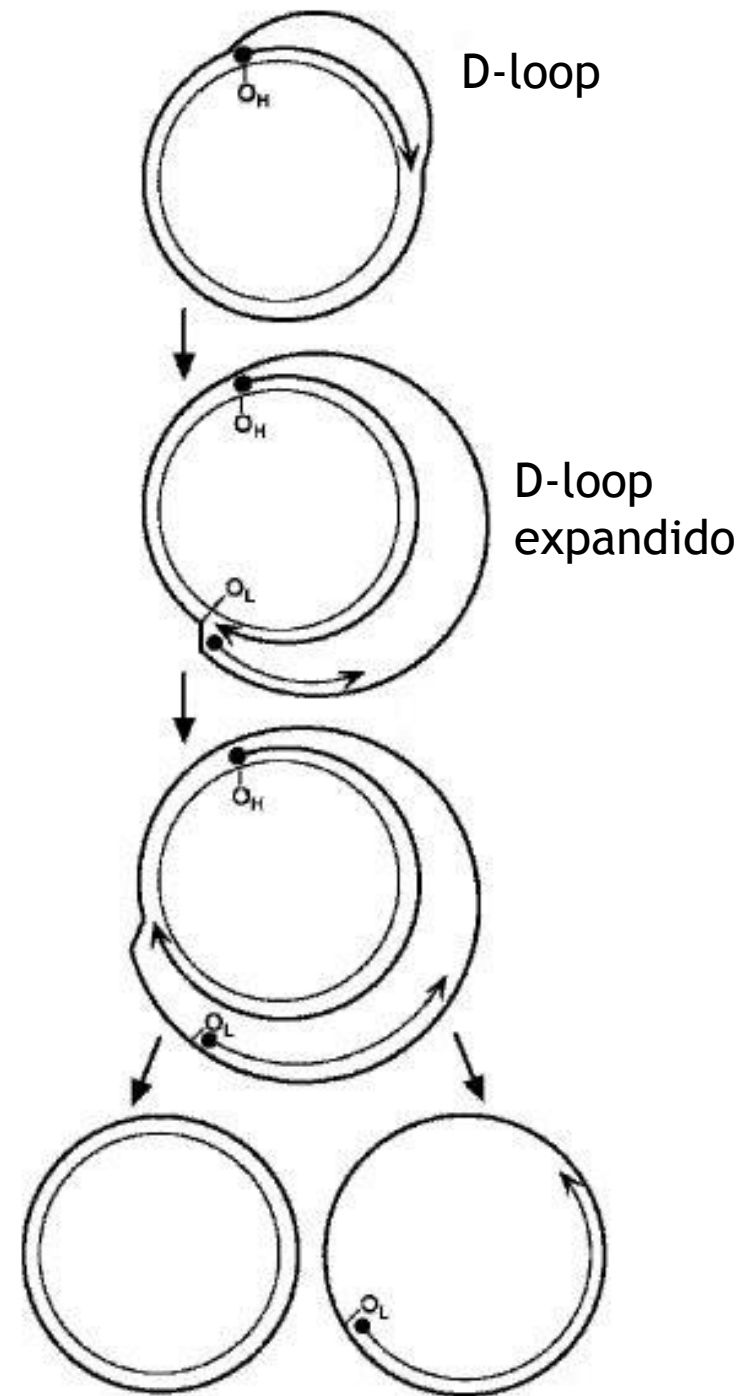
Transcripción y traducción ocurren en la mitocondria



- Estructura en triple cadena de DNA: una L y una H complementarias + una H sola.
- El D-Loop contiene los promotores de inicio de la **transcripción** de la cadena H (PH) y de la cadena L (PL), así como el origen de **replicación** de la cadena H (OH)

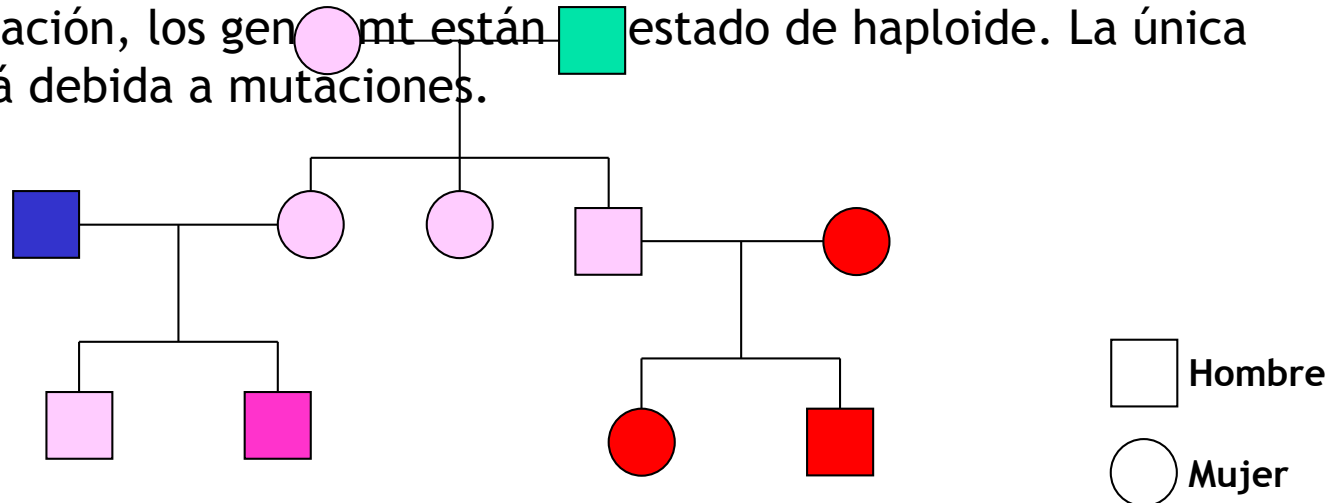
Replicación del DNAm_t: modelo asimétrico

La replicación del DNAm_t ocurre mediante un mecanismo de desplazamiento asincrónico que involucra dos orígenes unidireccionales ubicados en distintas cadenas.

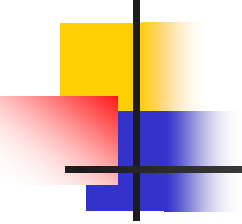


Herencia del DNAm

- Lo hereda la madre a todos sus hijos y las hijas a los propios.
- Las mitocondrias del espermatozoide maduro (60-70) se ubican en la pars intermedia generando energía para la motilidad.
- Al momento de la fecundación sólo entra la cabeza del espermatozoide y tal vez algunas pocas mitocondrias.
- Ante la gran cantidad de dotación materna versus pocos genomas mt masculinos (se pierden) la herencia se convierte en **exclusivamente materna**.
- No existe recombinación, los gen^{mt} están en estado de haploide. La única variación posible será debida a mutaciones.



Frecuencia mutacional del DNAm

- 
- 10-20 veces ↑ que el genoma nuclear.
 - Asa D de 100 a 200 veces ↑.
-

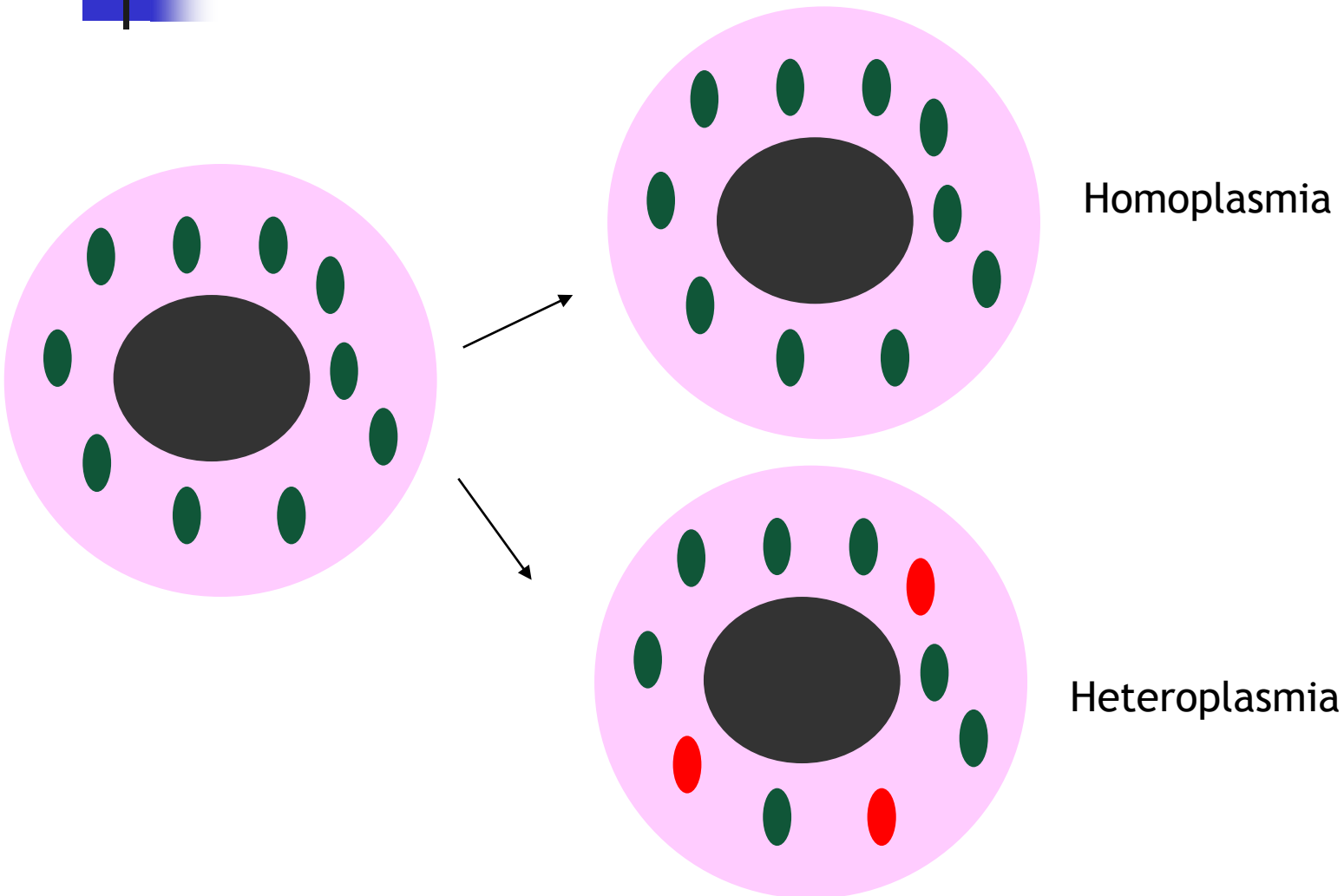
Causado por 3 factores:

- 1) Máquina productora de energía → genera ROS (*reactive oxygen species*)
- 2) Ausencia de Histonas → acción deletérea ROS ↑
- 3) Reparación de daños deficiente a causa de la baja eficiencia de reparación de la polimerasa γ .

**El D-Loop es la región del DNAm más lábil a mutaciones
¿Por qué?**

Concepto de homoplasma y heteroplasma

El genoma mt tiene $\uparrow$ frecuencia mutacional
 $\uparrow$ # de genomas mt/mitocondria/célula/individuo
Mezcla entre genomas mutados/ genomas heredados>>> Heteroplasma



Enfermedades mitocondriales

Origen: Algún defecto en las rutas metabólicas de producción de ATP

Causas: Mutaciones en el DNAmto o en el **DNA nuclear (¿Por qué?)**

Expresión clínica :

- ✓ Variable
- ✓ Comienzo a cualquier edad
- ✓ Afecta órganos no ligados embriológicamente pero con ↑ consumo de energía
- ✓ Períodos libres de síntomas

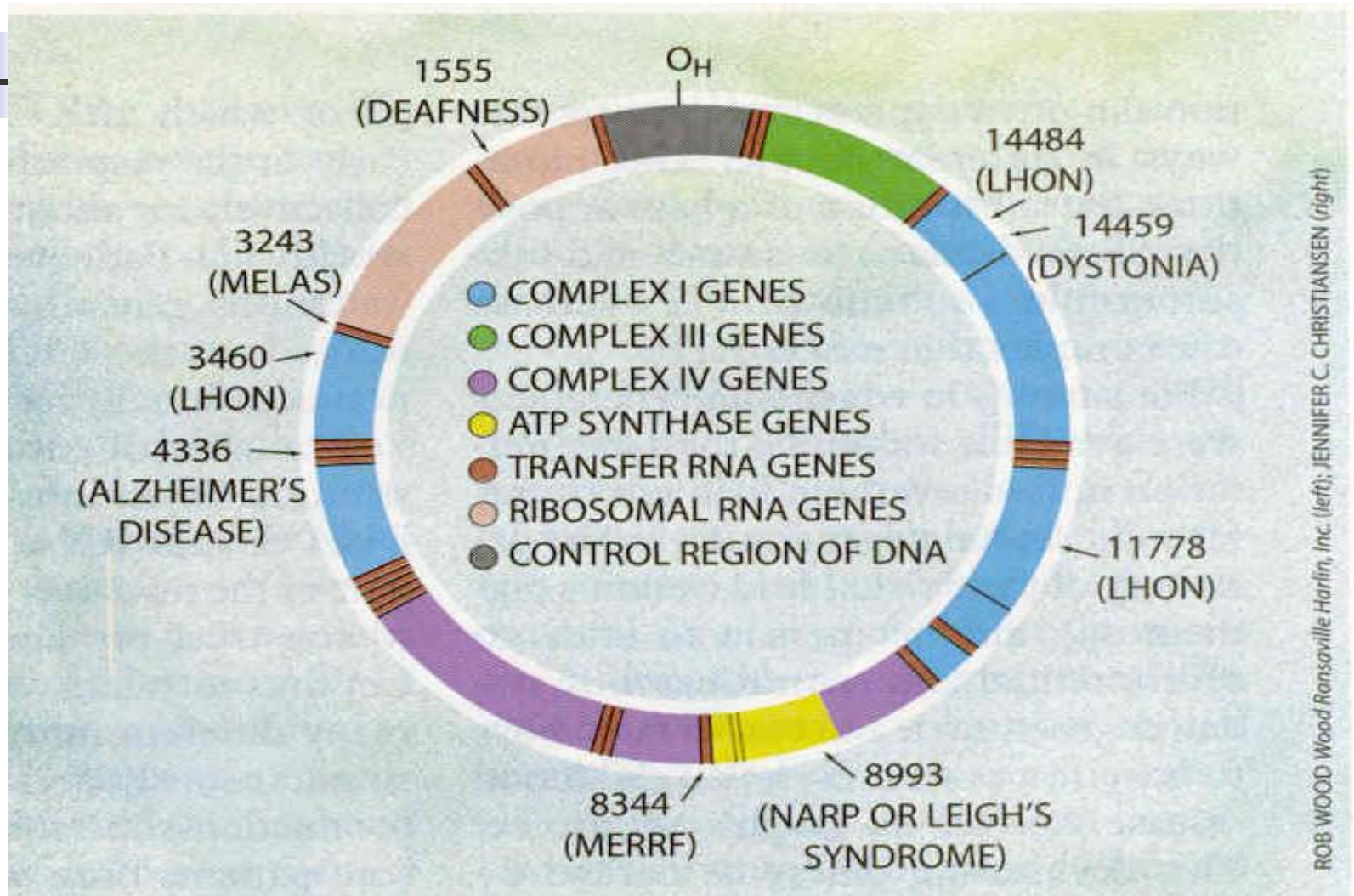
Enfermedades más
comunes

Diabetes
Sordera
Miopatía mitocondrial
Alzheimer
Leber's hereditary optic
neuropathy (LHON).
Síndrome de Kearns-Sayre

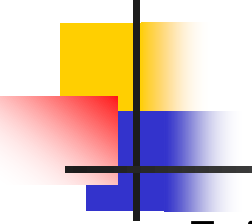
Tipos de cáncer:

Colon
Mama
Gástrico
Renal

Mutaciones del DNAmtd asociadas a enfermedades en humanos



Polimorfismos del DNAm



El Asa D (o D-Loop) es una región hipervariable

Existe una secuencia poliC en el D-Loop entre las bases 16184-16193 :
Sucesión de 9C interrumpidas en la posición 16189 por una T.

CCCCC C CCCC
 T

Mnl I CCTC ↓N₇ → transición T>C o C>T la enzima la reconocerá

PCR de una región de 312bp del D-Loop del DNAm (16108-16420)

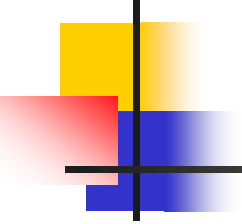


Digestión con la enzima *Mnl* I



RFLP Restriction Fragment Length Polimorfism

Metodología para el análisis de RFLP



1. PCR. Primers: MiL 16108 5' CAG CCA CCA TGA ATA TTG TAC3'
MiH 16401 5' TGA TTT CAC GGA GGA TGG TG3'
2. Gel de Agarosa 2% (fragmento de 312pb). Verificar la amplificación.
3. Digestión con *Mnl* I del fragmento amplificado.
4. Gel de poliacrilamida 10% . Visualización de los patrones de digestión

Secuencia de Anderson (Cambridge)

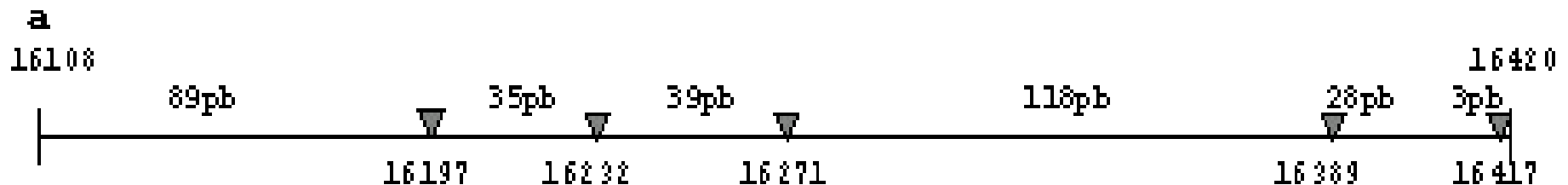
```

16081 accgctatgt atttcgtaca ttactgccag ccaccatgaa tattgtacgg taccataaat
16141 acttgaccac ctgtagtaca taaaaaccca atccacatca aaaccccctc cccatgctta
16201 caagcaagta cagcaatcaa ccctcaacta tcacacatca actgcaactc caaagccacc
16261 cctcaccac taggatacca acaaacctac ccaccccttaa cagtacatag tacataaagc
16321 catttaccgt acatagcaca ttacagtcaa atccctttctc gtcccccattgg atgaccccc
16381 tcagataggg gtccttgac caccatcctc cgtgaaatca atatcccgca caagagtgc
  
```

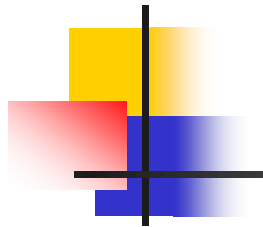
↓ Sitio de corte

Sitios de reconocimiento de MnlI

Posibles nuevos sitios para MnlI



Ejemplo de patrones de RFLP del DNAm_t



M a b c d e f g h i j k

118bp

89bp

Dímeros de primers



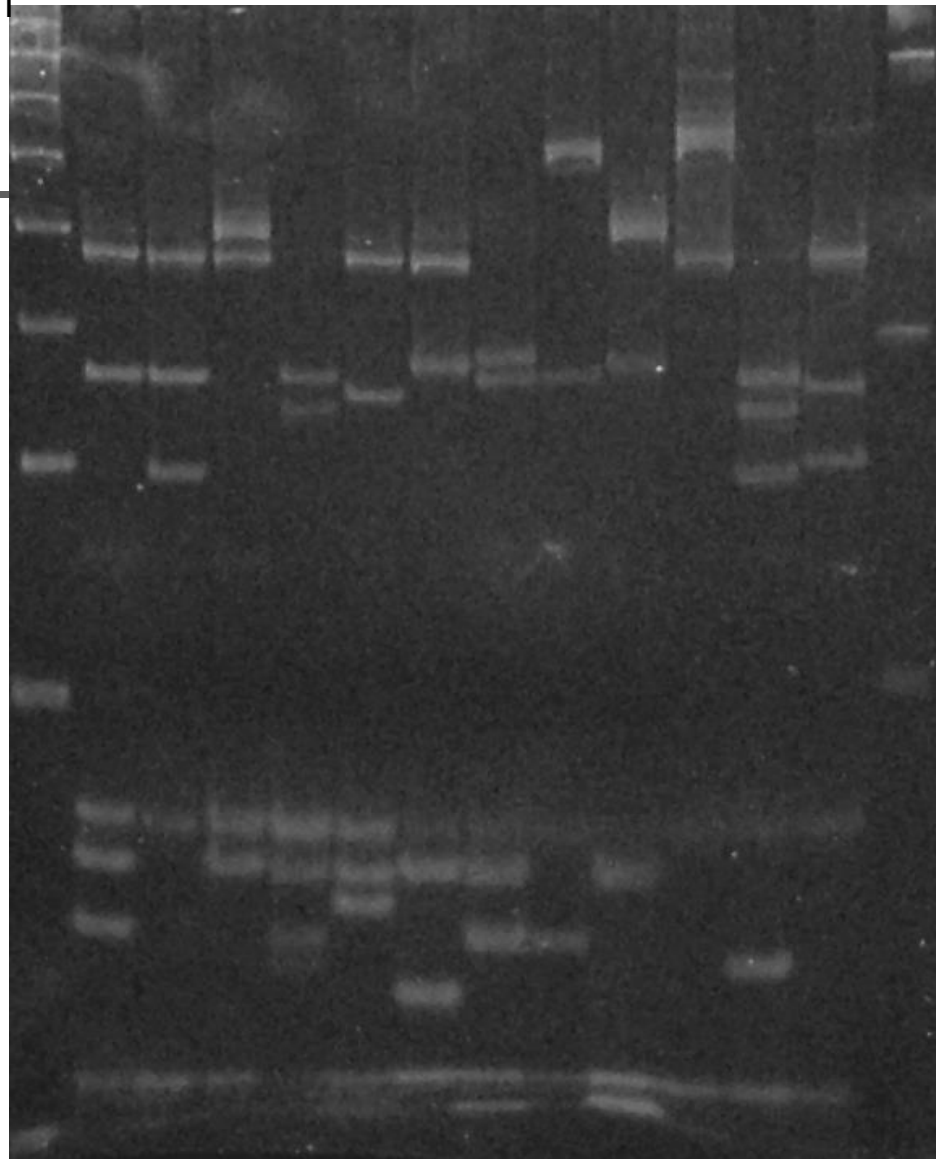
39bp

35bp

28bp

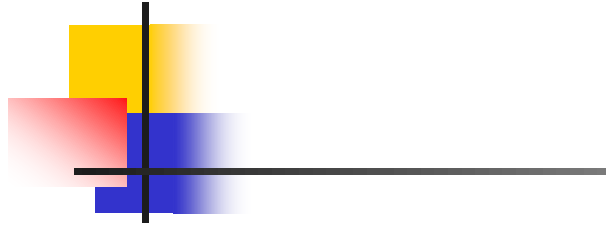
3bp

X



Ejemplo de patrones de RFLP del DNAmT

L

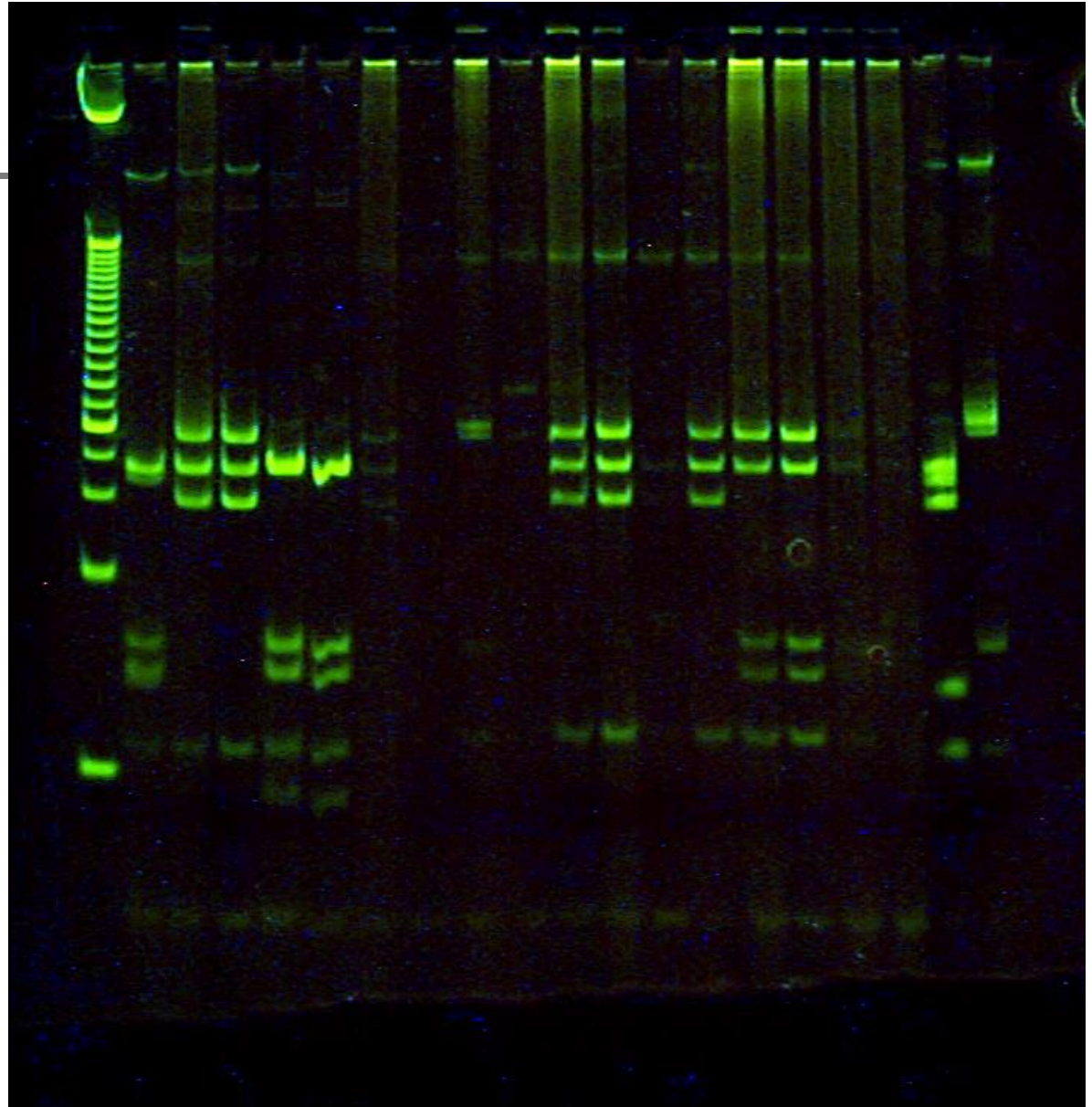


L = Ladder 25 pb

150bp
125bp
100bp

50bp

25bp



Muestras de alumnos
y sus familiares

Tarea para la próxima clase:

- Localizar los *primers* en la secuencia de Anderson
 - Localizar los sitios de reconocimiento y corte de la enzima *Mnl* I en la secuencia de Anderson
-
- Buscar todos los sitios lábiles a nuevas mutaciones (transiciones T→C o C→T)
 - Traerlo impreso (1 trabajo/grupo)

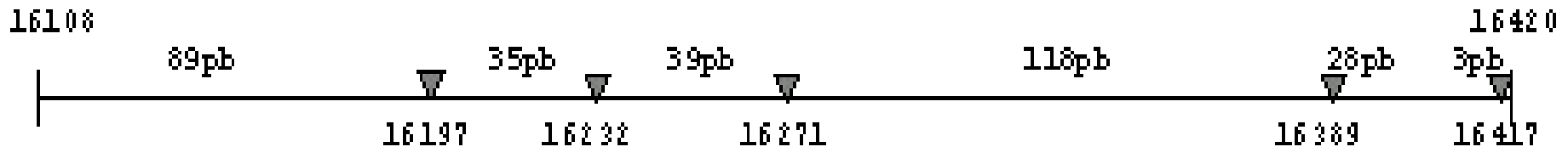
```
16081 accgctatgt atttcgtaca ttactgccag ccaccatgaa tattgtacgg taccataaat
16141 acttgaccac ctgtagtaca taaaaaccca atccacatca aaaccccctc cccatgctta
16201 caagcaagta cagcaatcaa ccctcaacta tcacacatca actgcaactc caaagccacc
16261 cctcaccac taggatacca acaaacctac ccacccttaa cagtacatag tacataaagc
16321 catttaccgt acatagcaca ttacagtcaa atcccttctc gtccccatgg atgaccccc
16381 tcagataggg gtcccttgac caccatcctc cgtgaaatca atatcccgca caagagtgct
```

Tarea para el informe (fecha límite de entrega: 14/06/17)

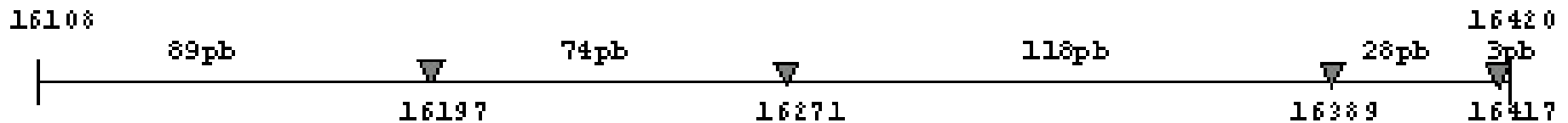
- Una vez definidos en el gel de poliacrilamida sus propios patrones, realizar los mapas de restricción para cada muestra

Ejemplos:

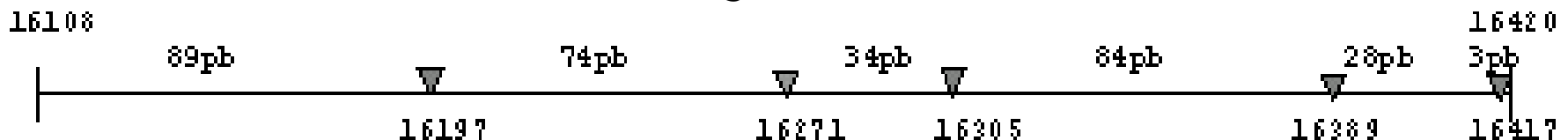
a Patrón de Anderson:



b Pérdida del sitio de corte 16232:



k Pérdida del sitio de corte 16232 + ganancia del sitio 16205:



Exposición de papers: miércoles 31/05/17

- Un paper por grupo
- Alrededor de 20 minutos de exposición por grupo

- Papers:

1. Replication of mitochondrial DNA occurs by strand displacement with alternative light-strand origins, not via a strand-coupled mechanism (paper).
2. Mitochondrial dynamics-fusion, fission, movement, and mitophagy-in neurodegenerative diseases (review)
3. Mitochondria as Decision-Makers in Cell Death (review)

Metodología para el análisis de RFLP

Primer paso: amplificación por PCR

1. PCR. Primers: MiL 16108 5' CAG CCA CCA TGA ATA TTG TAC3'
MiH 16401 5' TGA TTT CAC GGA GGA TGG TG3'
2. Gel de Agarosa 2% (fragmento de 312pb). Verificar la amplificación.
3. Digestión con *Mnl* I del fragmento amplificado.
4. Gel de poliacrilamida 10% . Visualización de los patrones de digestión

Mix de PCR

Mix para 10 tubos, con volumen final de 15 μl / tubo:

1 Tubo

10 Tubos

Reactivos	Conc. final	Volumen (μl)
Buffer 10X (posee Mg^{+2})	1 X	15
dNTPs 10 mM	0.2 mM	3
Primers Mit 25 μM	0,25 μM	1.5
TAQ DNA Pol.	0.6 $\mu\text{l}/100 \mu\text{l}$ mix	0.9
DNA (20 ng/ μl)	50 ng	2.5 x 10 = 25
H ₂ O		104.6
Total mix (μl)		Vf = 150 μl

45,4 μl

