

DNA Mitochondrial (mt)

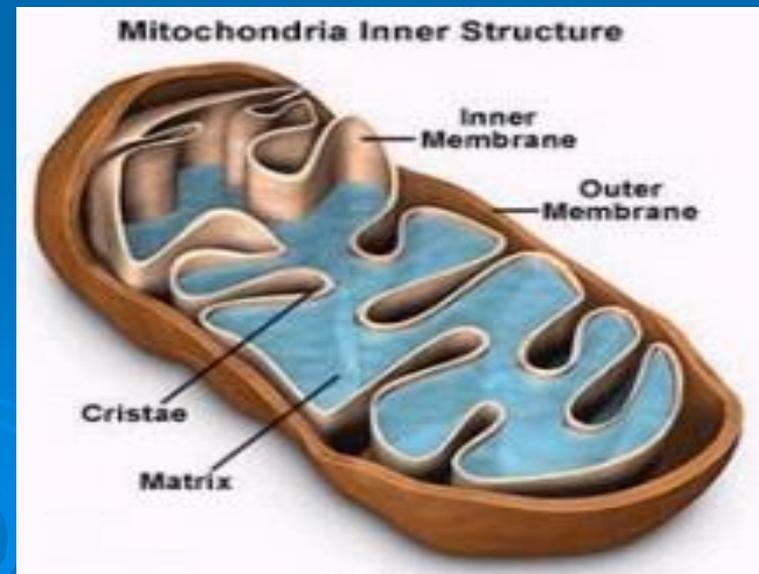
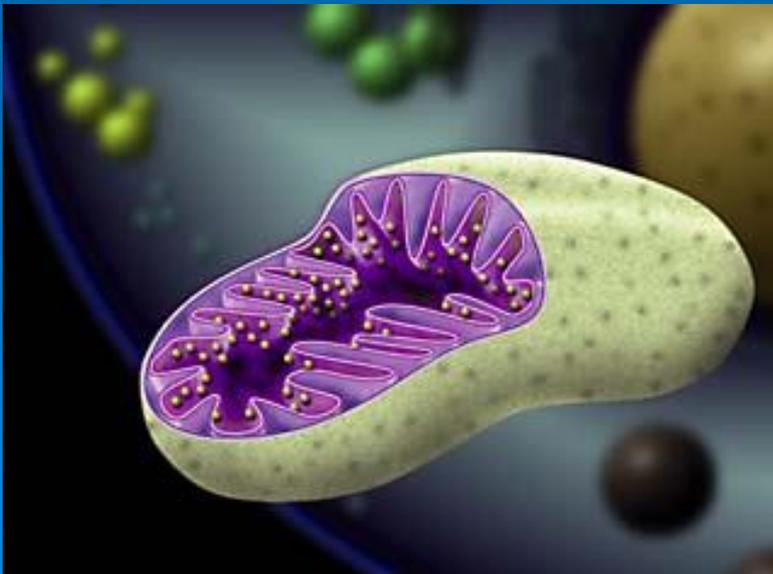
Mito = hebra khondrion = gránulo

Características generales

A decorative graphic consisting of several sets of concentric circles in a lighter shade of blue, located in the bottom right area of the slide.

Características 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
- Eritrocitos no tienen mitocondrias
- Plaquetas tienen sólo mitocondrias y no DNA nuclear
- Linfocitos maduros tienen 10 a 50 organelas
- 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.

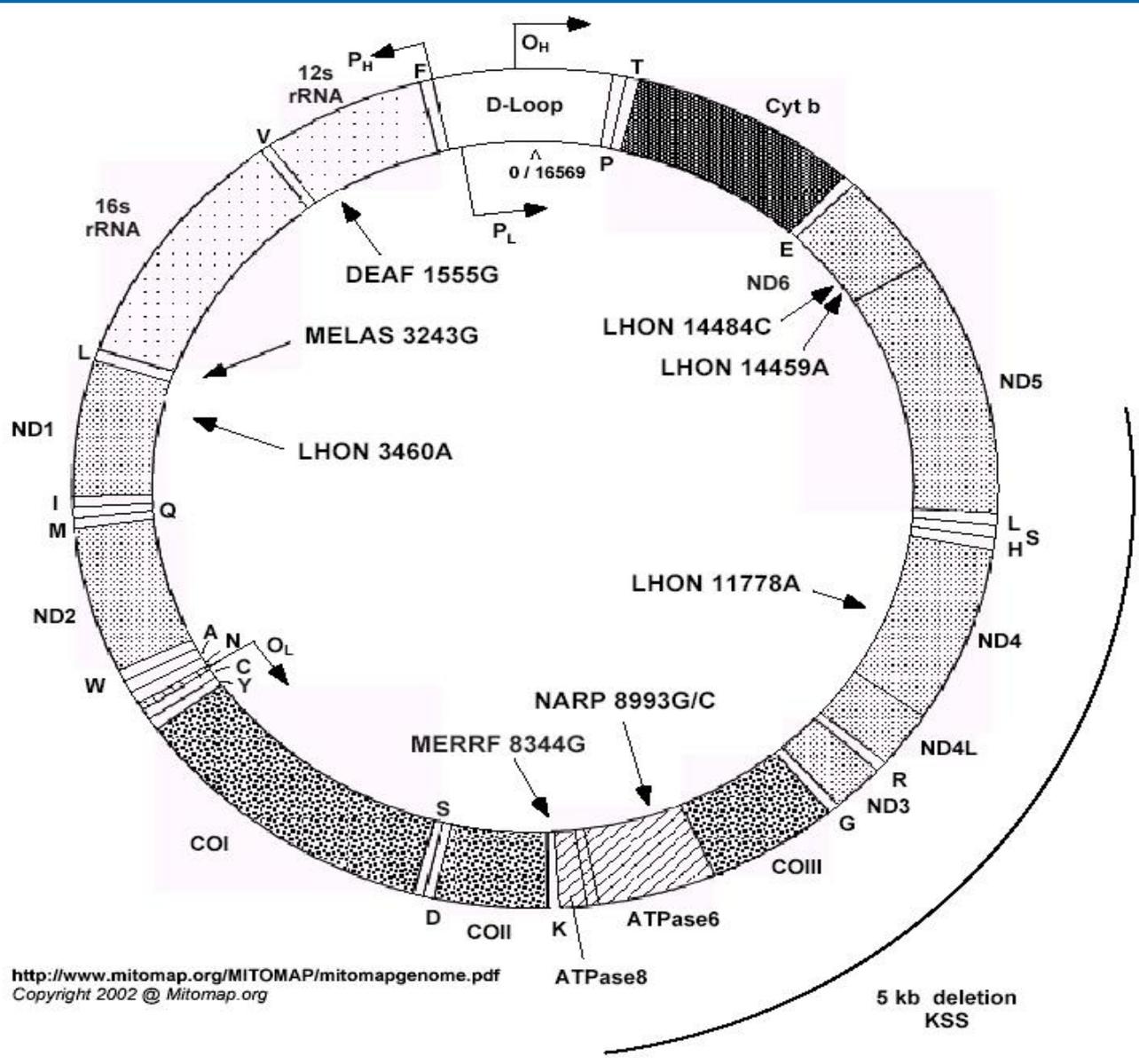


Características DNAm:

- 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:
 - Entre los extremos de los genes tRNA^{Lisina} y ATPasa8 (5' 8294-3' 8301) (9bp)
 - D-Loop (Asa D o RHVI) 16024-576 (1121bp)



- ✓ Estructura en tres cadenas de DNA una L y una H complementarias + una H sola.
- ✓ Inicio del D-Loop contiene Promotores de inicio de transcripción de la cadena H (PH), de la cadena L (PL) y del origen de replicación de la H (OH)



Replicación y Transcripción del DNAm_t

POLG Polimerasa 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_t 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.

Grupo 1, Transcripción, Búsqueda bibliográfica (Clayton, 2000 por ej.)

Herencia

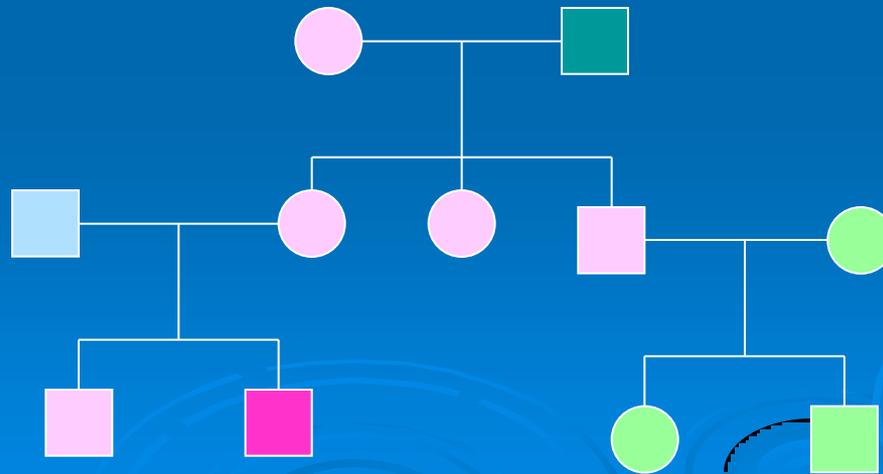
Madre a todos sus hijos y las hijas a los propios.

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**.

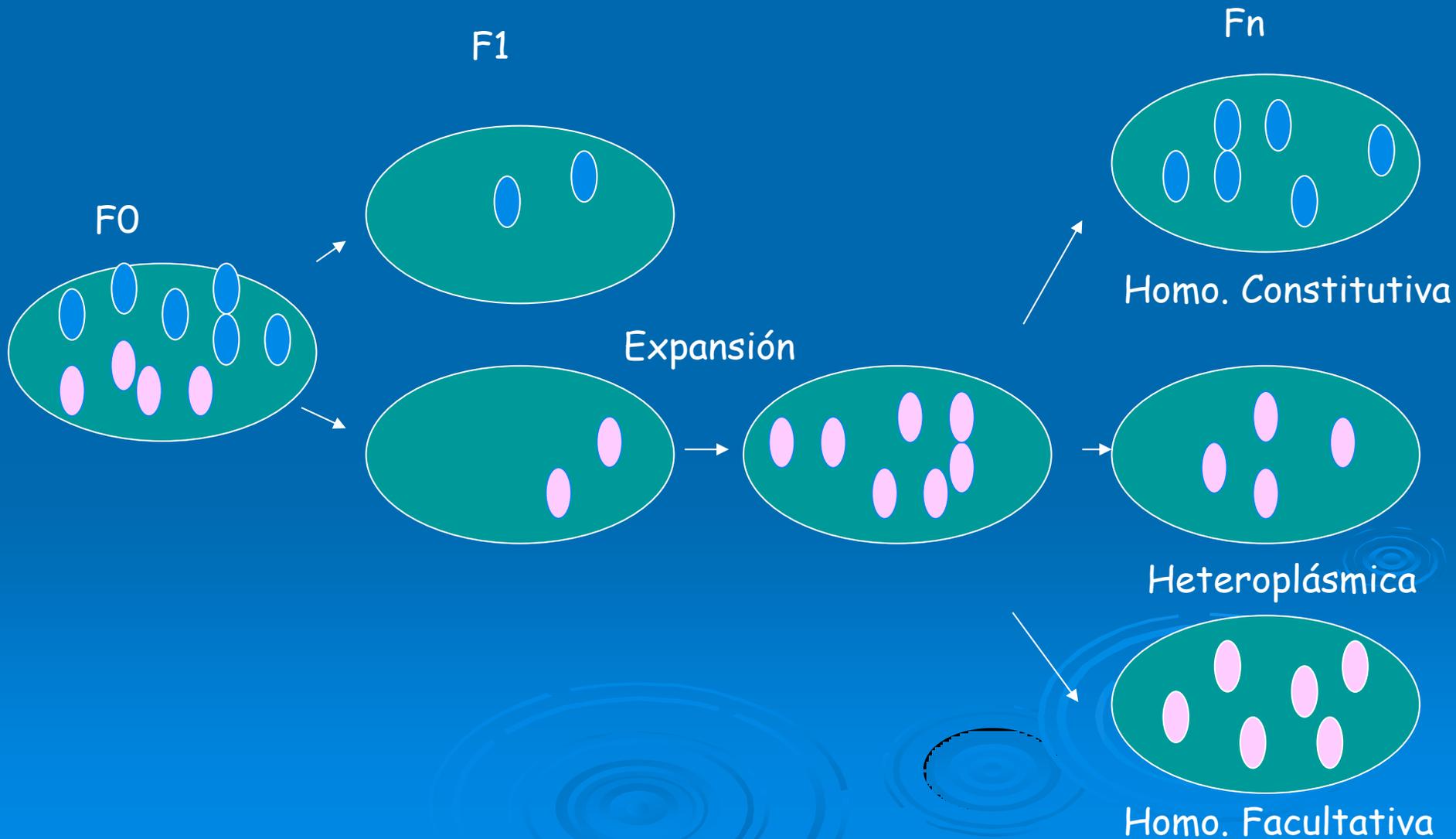
No existe recombinación > los genes mt están en estado de haploide, la única variación posible será debida a mutaciones



Genoma mt tiene ↑ frecuencia mutacional >>>>>>>

↑ # de genomas mt/mitocondria/célula/individuo

Mezcla entre genomas mutados/ genomas heredados>>> Heteroplasmia



Frecuencia Mutacional del ADNmt

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

Causado por 3 factores:

- 1) Máquina productora de energía → genera ROS
- 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_t más lábil a mutaciones

Por qué?

Grupo 3 replicación y pol Gamma, errores, actividad de la enzima y frecuencia mutacional

Enfermedades mitocondriales

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

Causas: Mutaciones en el DNAm_t o en el **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 | Tipos de cáncer |
| Sordera | Colon |
| Miopatía mitocondrial | Mama |
| Alzheimer | Gástrico |
| | Renal |

¿Qué vamos a hacer durante el práctico?



Amplificación y digestión de un fragmento de DNAmT

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

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

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



digerir con *Mn/I*



RFLP Restriction **F**ragment **L**ength **P**olimorfism

Metodología para el análisis de RFLP

1. PCR 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% (312pb) Verificar la amplificación.
3. Digestión con MnlI del fragmento amplificado.
4. Gel de poliacrilamida 10% . Visualización de los patrones de digestión

Secuencia de Anderson (Cambridge)

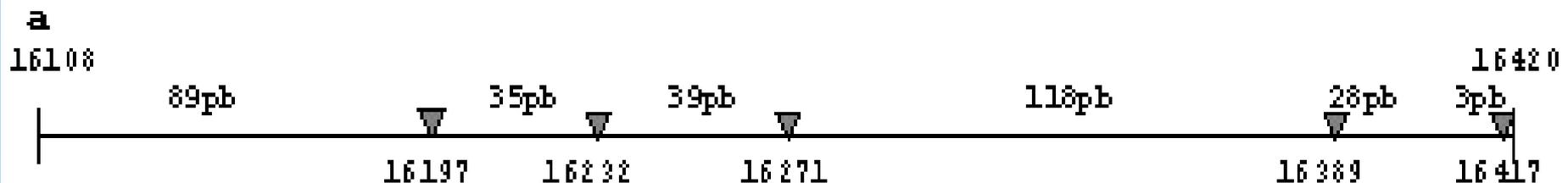
```

16081 accgctatgt atttcgtaca ttactgccag ccaccatgaa tattgtacgg taccataaat
16141 acttgaccac ctgtagtaca taaaaacca atccacatca aaaccccctc cccatgctta
16201 caagcaagta cagcaatcaa ccctcaacta tcacacatca actgcaactc caaagccacc
16261 cctcaccac taggatacca acaaacctac ccaaccttaa cagtacatag tacataaagc
16321 cattaccgt acatagcaca ttacagtcaa atcccttctc gtcccdatgg atgaccccc
16381 tcagataggg gtccttgac caccatcctc cgtgaaatca atatcccgca caagagtgct
    
```

↓ Sitio de corte

Sitios de reconocimiento de MnlI

Posibles nuevos sitios para MnlI



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

118bp

89bp

Dímeros de primers



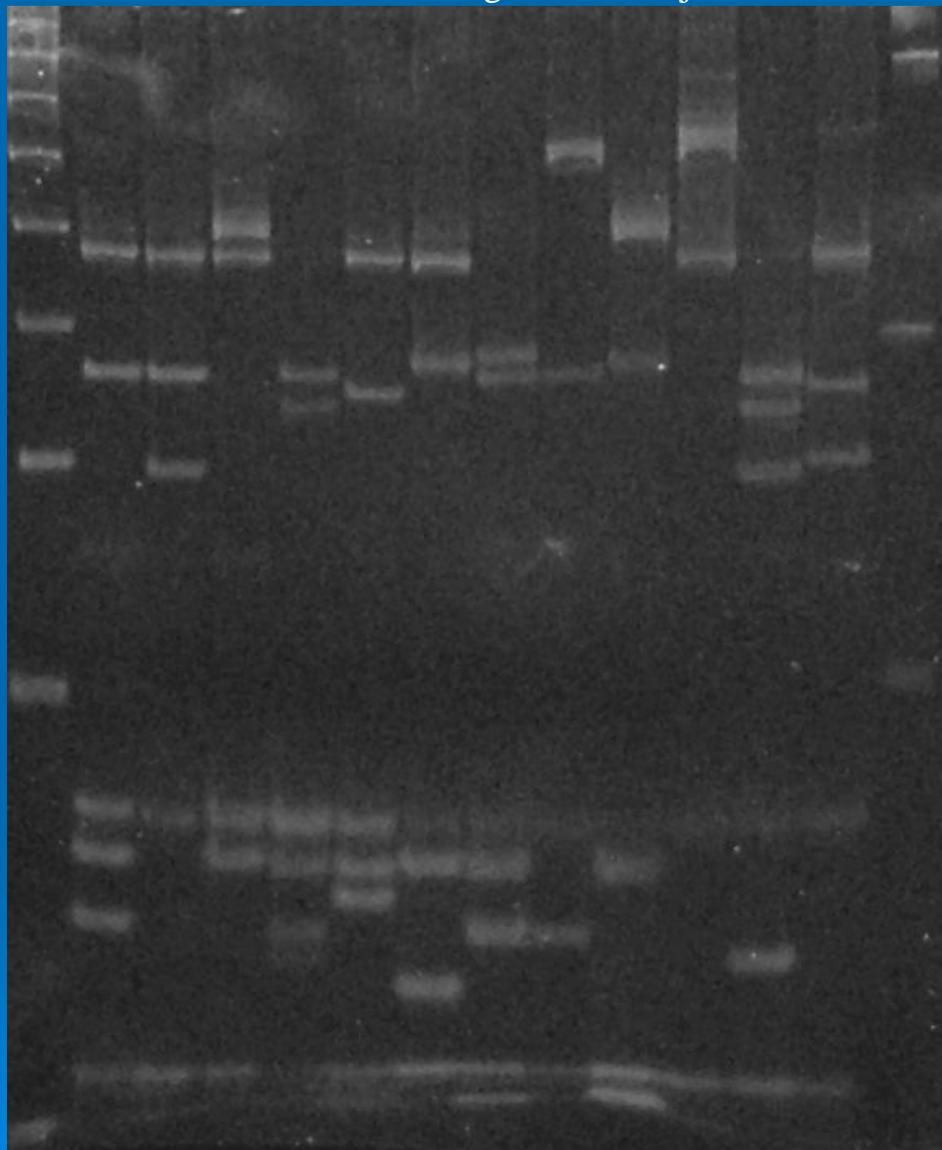
39bp

35bp

28bp

3bp

X

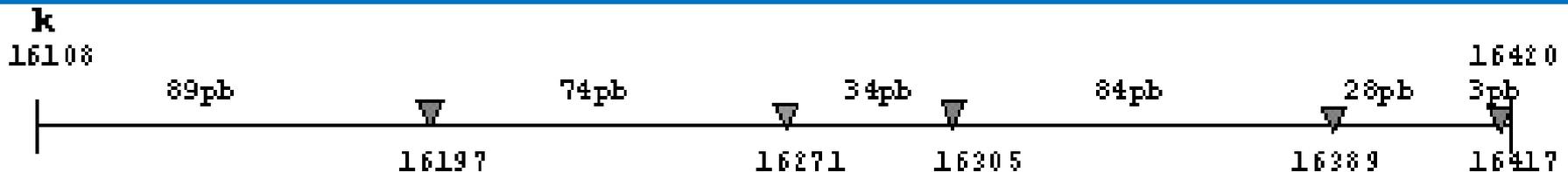
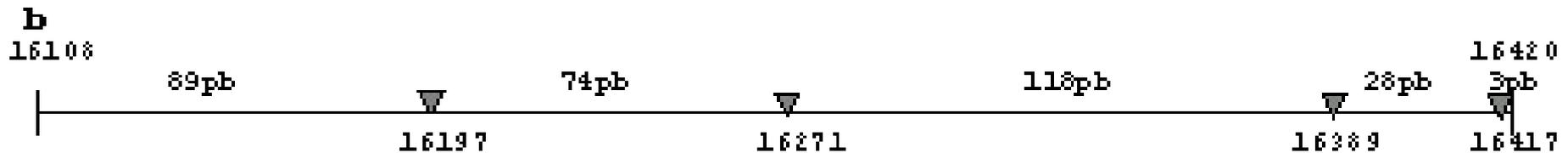


Tareas

Localizar los primers en la secuencia de Anderson

Buscar todos los sitios lábiles a nuevas mutaciones

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



¿Preguntas?

