

**ANÁLISIS DEL DNA MITOCONDRIAL Y DE LA
ACTIVIDAD DE LA CADENA RESPIRATORIA
MITOCONDRIAL EN LA ENFERMEDAD DE
ALZHEIMER DE TIPO ESPORÁDICO**

Benjamín Rodríguez Santiago
Tesis Doctoral

**Tesis realizada en el Centre de Genètica Mèdica i Molecular de l'Institut
de Recerca Oncològica para optar al grado de
DOCTOR EN BIOLOGÍA**

PROGRAMA DE DOCTORADO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

BIENIO 1998-2000

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

UNIVERSITAT DE BARCELONA

Presentada por:

BENJAMÍN RODRÍGUEZ SANTIAGO

Directora de la tesis:

El interesado:

Dra. Virginia Nunes Martínez
Centre de Genètica Mèdica i Molecular
Institut de Recerca Oncològica

Benjamín Rodríguez Santiago

Tutor de la tesis:

Dr. Manuel Palacín Prieto
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Universitat de Barcelona

Para ti, Mamá
Y para Papá, en memoria

“De casi nada hay registro, los pensamientos y movimientos fugaces, los planes y los deseos, la duda secreta, las ensoñaciones, la crueldad y el insulto, las palabras dichas y oídas y luego negadas o malentendidas o tergiversadas, las promesas hechas y no tenidas en cuenta, ni siquiera por aquellos a quienes se hicieron, todo se olvida o prescribe, cuanto se hace a solas y no se anota y también casi todo lo que no es solitario sino en compañía, cuán poco va quedando de cada individuo, de qué poco hay constancia, y de ese poco que queda tanto se calla, y de lo que no se calla se recuerda tan sólo una mínima parte, y durante poco tiempo, la memoria individual no se transmite ni interesa al que la recibe, que forja y tiene la suya propia.”

Javier Marías

Mañana en la batalla piensa en mí

¡GRACIAS!

Después de ver la tesis de bolsillo que me ha quedado (¡no se asuste, amigo lector!) no sé si debo dar las gracias o bien echar la culpa a unas cuantas personas que me han ayudado a *ejecutar el trabajo...* Aquí va una lista de sospechosos habituales involucrados en el caso de la mitocondria y la enfermedad de Alzheimer:

Gracias, **Virginia**, por acogerme en tu laboratorio y confiar en mí. Por dirigir mi tesis y hacer que las cosas más complicadas parezcan fáciles y alcanzables. Por tu flexibilidad y tolerancia, por tener siempre un momento para comentar cualquier cosa. Por mirar siempre hacia adelante a pesar del estrés que supone ejercer de directora del departamento.

Sempre va bé tenir un altre perspectiva, gràcies **Jordi** per la teva confiança i la teva ajuda, per estar disposat a explicar-me qualsevol cosa de forma entenedora i aclarir-me molts dubtes. Pel teu entusiasme i les xerrades plegats, per fer que els congressos als que hem assistit plegats hagin sigut més enriquidors. Gràcies a les persones del **Grup de Recerca Muscular del Clínic**, a la **Diana**, el **Francesc**, l'**Oscar** i sobretot l'**Anna** i la **Sònia**, per la seva inestimable ajuda amb els experiments bioquímics i les estones junts al laboratori de la **Fundació**.

Gràcies, **Montse**, per haver-me “adoptat” en les primeres setmanes al departament. Per mostrar-me sempre que les coses s’han de fer bé i no de qualsevol manera, per fer-me pensar més enllà del que és evident i lluitar contra el meu conformisme natural.

A la gent del **lab Z**: A la meva germana de poiata per compartir penes, alegries i molts riures, gràcies **Mariona**. A la **Nònia** per la seva amabilitat i els seus acudits (i el seu ajut amb l’estadística, sort de l’exemple de taps de Fontdor que cauen del cel, ni SPSS ni res!). A la **Laura**, per la seva ajuda amb les seqüències i a la resta de persones del **lab Z**, passades o presents: **Enric**, **Jesus**, **Sandra**, **Sergio**, **Lola**, **Ruth**, **Marisa**, **Mayte** i **Aina**.

Al **Xavi**, al **David**, al **Rafa** i al **Joan**, per ser el camí més directe cap al bon humor, pel seu optimisme, per ser güenos, pero güenos de verdá! per deixar-me donar sortida al costat més bandarra que un porta a dins (i ells també!).

Vull agrair a la gent de **secretaria de Genètica i d’administració de l’IRO**, especialment a l’**Antònia**, la **Pili** i el **Joan**, la seva dedicació i maldecaps per posar una mica d’ordre al departament. A **Mari**, per cuidar-nos el material del laboratorio. Zenkius, **Helena**, per mirar-te els articles. I a la resta de persones dels altres grups del departament de Genètica de l’IRO, sempre disposats a xerrar, fer un favor o aguantar una conyeta.

A la **Colla**, por todos estos años de amistad y por interesarse por mi trabajo... ¿Quizá para tener más munición para hacer cachondeo? Mmm...

Paqui, **Domingo**, **Judith**, **José**, **Jardel**, **Selma** y **Javi**, gracias por vuestro cariño y hacerme sentir a gusto entre vosotros.

Luis, **Loles**, **Nail**, **Gabriel**, **Susana**, **Miriam**, **Álex**, gracias por ser tan buenos hermanos, cuñados y sobrino, entre otras muchas cosas, por preocuparos por mí sin esperar nada a cambio.

Mamá, gracias por ser un ejemplo de vitalidad, comprensión y tolerancia, espero haber heredado alguna parte.

Cris, gracias por hacer que me sienta afortunado cada día.

ÍNDICE y PRESENTACIÓN

1. Índice

ÍNDICE Y PRESENTACIÓN	3
1. ÍNDICE.....	3
2. PRESENTACIÓN.....	6
3. ABREVIATURAS	7
INTRODUCCIÓN.....	9
4. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.....	11
4.1. HISTORIA	11
4.2. ASPECTOS GENERALES DE LA EA.....	12
4.3. EA FAMILIAR Y EA ESPORÁDICA	13
4.4. PLACAS SENILES Y OVILLOS NEUROFIBRILARES.....	14
4.4.1. Las placas seniles	15
4.4.2. Los ovillos neurofibrilares.....	17
4.5. GENES IMPLICADOS EN LA EA.....	18
4.5.1. PPA, PSEN1 y PSEN2	19
4.5.1.1. La proteína precursora amiloide	20
4.5.1.2. Presenilinas.....	21
4.5.2. Apolipoproteína E.....	22
4.6. OTROS GENES.....	24
4.7. LA VACUNA.....	25
4.8. EL TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DE LA EA	25
4.8.1. Terapia de la complementación	27
4.8.2. Componentes anti-apoptóticos.....	27
4.8.3. Sustancias anti-amiloides	27
4.8.4. Inhibición de la agregación proteica	28
4.8.5. Drogas que reducen la cantidad de lípidos	28
4.8.6. Sustancias con impacto en la mitocondria	29
5. LA MITOCONDRIA	31
5.1. CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES.....	31
5.2. FUNCIÓN DE LA MITOCONDRIA EN LA CÉLULA	32
5.3. EL MTDNA	35
5.3.1. Genética mitocondrial	35
5.4. MITOCONDRIA Y ENFERMEDAD	38
5.4.1. Tipos de alteraciones del mtDNA	39
6. MITOCONDRIA Y ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.....	41
6.1. ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS Y DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL	41
6.2. EL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA EA	41
6.2.1. Radicales libres.....	44
6.2.1.1. Alteraciones oxidativas en la EA	45
6.2.2. Placas, ovillos y estrés oxidativo	48
6.2.3. APOE y la glutatión reductasa.....	51
6.2.4. Estrés oxidativo y muerte neuronal.....	51
6.2.5. Excitotoxicidad	52

6.2.6. Apoptosis	54
6.3. EA, ENVEJECIMIENTO Y DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL.....	56
6.4. PRINCIPALES ALTERACIONES MITOCONDRIALES EN LA EA	56
6.4.1. Metabolismo energético alterado.....	56
6.4.2. Alteraciones sistema OXPHOS	57
6.4.3. Defectos observados mediante el análisis de cíbridos de pacientes con EA.....	58
6.4.4. Modelos animales de enfermedades degenerativas y envejecimiento.....	59
6.4.5. Alteraciones genoma mitocondrial	60
6.5. LA COMPLEJIDAD DE LA EA ESPORÁDICA	65
<u>OBJETIVOS</u>	<u>67</u>
7. OBJETIVOS	69
<u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	<u>71</u>
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	73
8.1. ¿EXISTE RELACIÓN ENTRE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y DEFECTOS EN EL DNA MITOCONDRIAL?.....	73
8.2. IS MITOCHONDRIAL DNA DEPLETION INVOLVED IN ALZHEIMER'S DISEASE?	85
8.3. CHOLINESTERASE INHIBITOR RIVASTIGMINE ENHANCE THE MITOCHONDRIAL ELECTRON TRANSPORT CHAIN IN LYMPHOCYTES OF PATIENTS WITH ALZHEIMER'S DISEASE.	97
8.4. MITOCHONDRIAL RESPIRATORY CHAIN IN BRAIN HOMOGENATES: ACTIVITIES IN DIFFERENT BRAIN AREAS IN PATIENTS WITH ALZHEIMER'S DISEASE.	105
8.5. EXPRESSION OF MITOCHONDRIAL GENES AND TRANSCRIPTION ESTIMATION IN DIFFERENT BRAIN AREAS IN ALZHEIMER'S DISEASE PATIENTS.	133
8.6. MITOCHONDRIAL GENETICS AND ALZHEIMER'S DISEASE.....	147
<u>DISCUSIÓN GENERAL</u>	<u>173</u>
9. DISCUSIÓN GENERAL	175
<u>CONCLUSIONES</u>	<u>189</u>
10. CONCLUSIONES	191
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	<u>193</u>
11. MATERIALES Y MÉTODOS	195
11.1. PACIENTES Y CONTROLES	195
11.1.1. Tipos de muestras.....	195
11.1.1.1. Tejidos cerebrales.....	196
11.1.1.2. Sangre.....	196
11.2. MÉTODOS	197
11.2.1. Esquema general	197
11.2.2. Manipulación del DNA	198
11.2.2.1. Extracción de DNA.....	198
A partir de sangre	198
A partir de tejido cerebral.....	199
11.2.2.2. PCR	199
Estudio de mutaciones y polimorfismos: PCR-RFLP	199

Amplificación de fragmentos grandes: PCR larga	200
11.2.2.3. Detección del genotipo <i>APOE</i>	201
11.2.2.4. Secuenciación	202
11.2.2.5. <i>Southern blot</i>	202
11.2.2.6. Cuantificación relativa del mtDNA: Estudios de depleción	205
11.2.3. Manipulación del RNA	206
11.2.3.1. Extracción de RNA	206
Aislamiento de linfocitos para extracción de RNA	206
Purificación RNA	207
11.2.3.2. Transcripción inversa (RT).....	207
11.2.3.3. RT-PCR en tiempo real para estudiar la expresión génica	208
11.2.3.4. <i>Dot blot</i>	209
11.2.4. Oligonucleótidos usados	210
11.2.5. Estudios bioquímicos de la cadena respiratoria mitocondrial.....	212
11.2.5.1. Análisis polarográficos	212
11.2.5.2. Análisis espectrofotométricos.....	213
Medida relativa de las actividades enzimáticas: citrato sintasa	214
11.2.5.3. Medida de la peroxidación lipídica de las membranas mitocondriales	214
11.2.6. Estadística y programas informáticos	214
11.2.7. Direcciones de internet.....	214

ANEXO 215

12. ANEXO.....217

ABSENCE OF MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION IN POLYMYALGIA RHEUMATICA. EVIDENCE BASED ON A SIMULTANEOUS MOLECULAR AND BIOCHEMICAL APPROACH.	217
PRESENCE OF A MAJOR WFS1 MUTATION IN SPANISH WOLFRAM SYNDROME PEDIGREES .	225
MITOCHONDRIAL DNA DEPLETION AND RESPIRATORY CHAIN ENZYME DEFICIENCIES ARE PRESENT IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS OF HIV-INFECTED PATIENTS WITH HAART-RELATED LIPODYSTROPHY	237
REVERSIBLE MITOCHONDRIAL RESPIRATORY CHAIN IMPAIRMENT DURING SYMPTOMATIC HYPERLACTATEMIA ASSOCIATED WITH ANTIRETROVIRAL THERAPY.....	245
MITOCHONDRIAL EFFECTS OF ANTIRETROVIRAL THERAPIES IN ASYMPTOMATIC PATIENTS.	253

REFERENCIAS 265

13. REFERENCIAS267

2. Presentación

Esta tesis recoge los resultados obtenidos sobre el estudio de la implicación mitocondrial en pacientes con enfermedad de Alzheimer de tipo esporádico e inicio tardío. Aunque el trabajo realizado se ha dirigido principalmente al análisis del genoma mitocondrial de pacientes con EA, la colaboración con el Dr. Casademont en el Hospital Clínic ha permitido completar el estudio con el análisis bioquímico de la cadena respiratoria mitocondrial y de la peroxidación lipídica. Dada la inmensa complejidad de la enfermedad de Alzheimer de tipo esporádico e inicio tardío y la enorme disparidad en los resultados sobre la implicación mitocondrial descritos en la literatura, el trabajo realizado ha pretendido contribuir modestamente a estudiar la relación entre los defectos del DNA mitocondrial, en caso de detectar alguno, y posibles defectos en la función de la cadena respiratoria mitocondrial en la enfermedad de Alzheimer.

La **Introducción** se divide en tres secciones. Dos de ellas están dedicadas a exponer las características principales de la enfermedad de Alzheimer y de la mitocondria. La tercera sección describe la relación entre las dos anteriores a través de la exposición de múltiples trabajos previos en los que se han hallado diversas y variadas anomalías mitocondriales en pacientes con la enfermedad de Alzheimer.

Dentro del capítulo titulado **Resultados y Discusión** se incluyen los artículos derivados de los estudios realizados con las muestras disponibles de pacientes con enfermedad de Alzheimer y de controles. Detrás de cada uno de los artículos se ha añadido algún comentario con el propósito de profundizar en algún detalle concreto del estudio. A continuación se encuentra el apartado **Discusión General** en el que se tratan los diversos aspectos estudiados en esta tesis de forma conjunta.

En la sección dedicada a **Materiales y Métodos** se describen brevemente aquellos aspectos que no se encuentran suficientemente detallados en los artículos y se incluye alguna aclaración sobre las técnicas puestas a punto.

A lo largo de la realización de los trabajos presentados en esta tesis sobre la implicación mitocondrial en la enfermedad de Alzheimer ha sido necesaria la puesta a punto de nuevas técnicas de estudio del DNA mitocondrial basadas en la tecnología de PCR en tiempo real. Estas técnicas han sido aplicadas también en el estudio de la implicación mitocondrial en otras enfermedades en colaboración con otros grupos. Los trabajos más importantes derivados de la puesta a punto de estas técnicas y las colaboraciones realizadas por el doctorando en otros trabajos distintos a los objetivos de esta tesis se recogen en el apartado **Anexo**, detallando en cada caso el trabajo realizado en cada una de estas colaboraciones.

3. Abreviaturas

AB	β-amiloide	MtPTP	poro de transición mitocondrial
ADP	adenosina difosfato (ADP)	nDNA	DNA nuclear
AMPA	α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoaxolopropionato	NMDA	N-metil-D-aspartato
APOE	apolipoproteína E	NO	óxido nítrico
ATP	adenosina trifosfato	NOS	óxido nítrico sintasa
CoQ	coenzima Q	PBS	solución salina de fosfato tamponado
COX	citocromo c oxidasa	PCR	reacción en cadena de la polimerasa
COX-2	ciclooxigenasa-2	pb	pares de bases
cpm	cuentas (de radioactividad) po minuto	P_i	fósforo inorgánico
CRM	cadena respiratoria mitocondrial	PPA	proteína precursora amiloide
DNA	ácido desoxiribonucleico	PSEN	presenilinas
dNTP	desoxinucleósido trifosfato	RFLP	fragmentos de restricción de longitud polimórfica
CSF	fluido cerebro-espinal	RNA	ácido ribonucleico
csp	cantidad suficiente para	RNS	especies de nitrógeno reactivas
EA	enfermedad de Alzheimer	ROS	especies reactivas del oxígeno
EAE	enfermedad de Alzheimer esporádica	rpm	revoluciones por minuto
EAF	enfermedad de Alzheimer familiar	rRNA	RNA ribosomal
EDTA	ácido etilendiamintetraacético	RT	transcripción inversa
ELA	esclerosis lateral amiotrófica	SDS	dodecilsulfato sódico
EP	enfermedad de parkinson	SNC	sistema nervioso central
HNE	4-hidroxi-2-transnonenal	SOD	superóxido dismutasa
MDA	malondialdehído	TBARS	ácido tiobarbitúrico
MME	membrana mitocondrial externa	TFAM	factor de transcripción mitocondrial A
MMI	membrana mitocondrial interna	T_h	temperatura de hibridación
MOPS	ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico	tRNA	RNA de transferencia
mRNA	RNA mensajero	V_f	volumen final
mtDNA	DNA mitocondrial	8-OHdG	8-hidroxil-2-deoxiguanosina

