

Importancia del genoma mitocondrial humano en Medicina

O. González Moreno*, F.J. Novo**

Departamento de Histología y Anatomía Patológica y Departamento de Genética**, Facultad de Ciencias. Universidad de Navarra*

RESUMEN: La función mitocondrial es necesaria para la producción de energía, pero también juega un papel importante en el estrés oxidativo y en la apoptosis. Parte de los complejos responsables del metabolismo mitocondrial están codificados en el ADN mitocondrial (mtDNA). El conocimiento de la estructura y función del mtDNA ayuda a comprender (1) los rasgos fisis-patológicos de las enfermedades mitocondriales; (2) el patrón hereditario de las mismas; y (3) las estrategias de diagnóstico molecular que se pueden emplear en estas enfermedades. En el futuro próximo, se esperan importantes avances en la comprensión de las interacciones entre el genoma nuclear y el genoma mitocondrial, y su papel en la biogénesis y mantenimiento de las mitocondrias.

SUMMARY: Mitochondrial function is necessary for energy production, but also plays important roles in oxidative stress and apoptosis. Part of the complexes responsible for mitochondrial metabolism are encoded in mitochondrial DNA (mtDNA). Knowledge of the structure and function of mtDNA affords a better understanding of (1) the physiopathology of mitochondrial disorders; (2) the pattern of inheritance of mitochondrial diseases; and (3) the strategies that can be employed in the molecular diagnosis of these disorders. In the near future important breakthroughs are expected regarding the understanding of the cross-talk between nuclear and mitochondrial genomes, and its relevance in the biogenesis and maintenance of mitochondria.

Palabras clave

Mitocondria; ADN mitocondrial; enfermedades mitocondriales.

Key words

Mitochondria; mitochondrial DNA, mitochondrial disease.

Correspondencia

Dr. F.J. Novo
Dept. Genética
Irunlarrea s/n. 31008
Pamplona. España
E-mail: fnovo@unav.es

Introducción

La mitocondria es un orgánulo de probable origen endosimbiónico que se ha adaptado a su nicho intracelular: para aumentar su tasa de replicación y asegurar la transmisión a las células hijas después de cada división mitótica, el genoma de las mitocondrias de mamíferos se ha ido reduciendo de tamaño hasta alcanzar las 16.569 pb (pares de bases) en el caso del genoma mitocondrial humano. Esta reducción se ha conseguido por la delección de genes no esenciales y la transferencia de muchos genes esenciales al genoma nuclear. En esta revisión resumiremos brevemente el metabolismo mitocondrial y la estructura y función del genoma mitocondrial, así como las características clínico-patológicas de las enfermedades debidas a alteraciones del ADN mitocondrial. Finalmente, presentamos la estrategia diagnóstica a seguir en estas enfermedades, con especial hincapié en el análisis molecular del ADN mitocondrial.

Metabolismo mitocondrial

Las mitocondrias son las verdaderas centrales térmicas de nuestro organismo ya que en ellas tiene lugar la fosforilación oxidativa (OXPHOS), es decir,

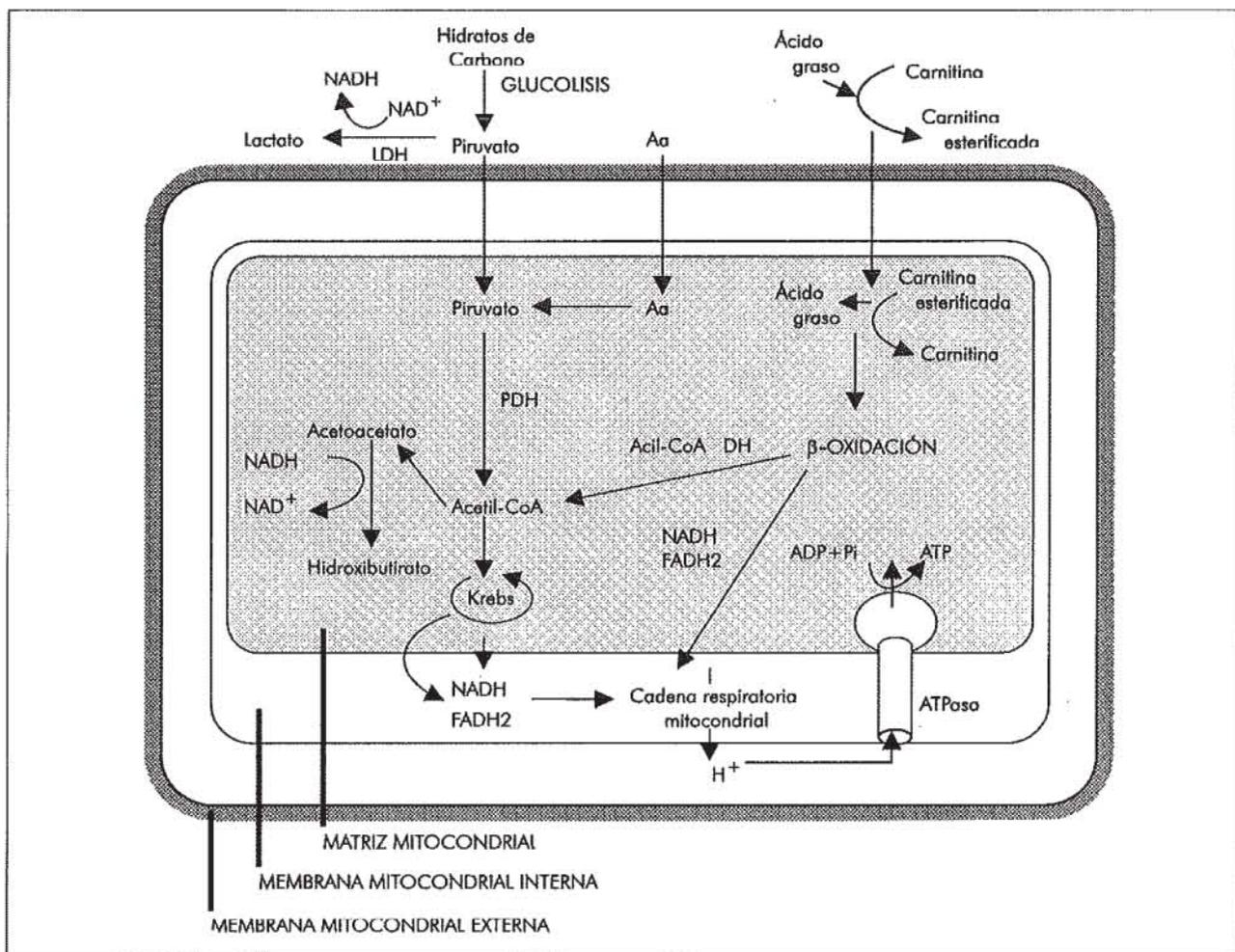
ARTÍCULOS DE REVISIÓN

la respiración celular acoplada a la producción de energía en forma de ATP. El combustible para la producción de energía en la mitocondria es suministrado predominantemente por los hidratos de carbono (vía piruvato, mediante la glucólisis aeróbica), los ácidos grasos (al sufrir la β -oxidación) y la oxidación del acetyl-CoA en el ciclo de Krebs. El funcionamiento del sistema OXPHOS tiene, además, importancia médica por la generación de especies reactivas de O_2 (Reactive Oxygen Species, ROS) y por la regulación de la muerte celular programada o apoptosis. Las proteínas incluidas en el OXPHOS se localizan dentro de la membrana mitocondrial interna (1), e incluyen:

1. Componentes de la cadena transportadora de electrones (Cadena respiratoria mitocondrial, CRM).
2. ATPasa de membrana.
3. Translocador de nucleótidos de Adenina (ANT).

La fosforilación oxidativa tiene lugar en la cadena respiratoria mitocondrial (CRM): cinco grandes complejos multienzimáticos, situados en la membrana interna, recogen los electrones de las reacciones de oxido-reducción y los llevan al O_2 , al tiempo que realizan la fosforilación del ADP para producir ATP (Figura 1). Los complejos de la cadena respiratoria funcionan como transportadores de electrones ordenados de tal manera que el potencial redox de cada

Figura 1



Esquema de las principales vías metabólicas que tienen lugar en la mitocondria

ARTÍCULOS DE REVISIÓN

uno de ellos va en aumento hasta llegar al citocromo a₃, el cual es capaz de oxidarse a la vez que reduce el O₂ a H₂O. **El complejo I** (NADH-CoQ reductasa) oxida el NADH procedente del ciclo de Krebs y transfiere los electrones al complejo III, a través de la Ubiquinona. **El complejo II** (Succinil-CoQ reductasa) toma los electrones del succinato, transferidos al FADH₂ mediante la Succinato DH (SDH), y se los transmite al **complejo III**. El complejo III (Ubiquinona-citocromo c reductasa) recupera los electrones de los complejos I y II y se los cede al citocromo c, situado en la cara externa de la membrana mitocondrial interna; el **complejo IV** (citocromo c oxidasa: COX) oxida el citocromo reducido y asegura el consumo de O₂ molecular. La energía liberada se utiliza para bombear H⁺ fuera de la membrana interna y crear así un gradiente electroquímico ($\Delta\psi$). El flujo de H⁺ conduce a la formación de un enlace rico en energía entre el ADP y el Pi para generar ATP en el citosol. De este modo, el transporte de electrones hasta el oxígeno por el CRM está asociado a la fosforilación de ADP.

OXPPOS es la mayor fuente endógena de ROS tóxicos (O₂⁻, H₂O₂ y OH[•]), ya que en determinadas circunstancias se acumulan los electrones en las etapas tempranas del CRM (Complejo I y CoQ), donde pueden donarse directamente al O₂ molecular para dar anión superóxido (O₂⁻). Este anión es convertido por la superóxido dismutasa (MnSOD) en H₂O₂, que a su vez es convertida en H₂O por la Glutatión peroxidasa (GPx). En presencia de metales de transición, el H₂O₂ puede convertirse en el radical Hidroxilo (OH[•]), altamente reactivo. Una exposición crónica a ROS puede resultar en daños oxidativos para la mitocondria y para proteínas, lípidos y ácidos nucleicos celulares, siendo éste uno de los principales agentes de daño al ADN.

La mitocondria también proporciona un interruptor para el inicio de la apoptosis (2), a través del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mtPTP). La membrana mitocondrial interna contiene un buen número de factores de inducción de apoptosis y precursores inactivos de unas proteasas especiales denominadas caspasas. Tanto la reducción en la producción de energía mitocondrial como el aumento crónico del estrés oxidativo pueden activar el mtPTP, cuya apertura causa, a su vez, un colapso del gradiente electroquímico y la liberación desde la membrana mitocondrial interna de estos factores de

promoción de muerte celular. El citocromo c, por su parte, es un factor crucial en la activación de la cascada de las caspasas.

En conclusión, muchos de los rasgos fisiopatológicos de las enfermedades mitocondriales pueden explicarse por la perturbación de uno o varios de los procesos del metabolismo mitocondrial (producción de energía, estrés oxidativo y regulación de la apoptosis). Por ejemplo, mutaciones que interrumpen el sistema OXPPOS reducen el rendimiento energético y presumiblemente dañan múltiples procesos celulares. A su vez, esto puede incrementar la producción de ROS y generar estrés oxidativo, con la consiguiente activación del mtPTP y la puesta en marcha de apoptosis.

El ADN mitocondrial humano

El mtDNA humano es una molécula circular de 16.569 pb. El número de moléculas de mtDNA por célula varía entre unos pocos cientos en los espermatozoides a unas 200.000 copias en el oocito, pero en la mayor parte de los tejidos el rango está comprendido entre unas 1.000 y 10.000 copias por célula, con 2 a 10 moléculas de DNA por mitocondria (3-5). Este genoma contiene información para 37 genes:

1. Genes que codifican las 2 subunidades 12S y 16S del rRNA (RNA ribosomal) de la matriz mitocondrial.
2. Los genes para los 22 tRNA (RNA transferente), requeridos para la síntesis de proteínas mitocondriales en la misma matriz mitocondrial.
3. Genes que codifican 13 polipéptidos que forman parte de los complejos multienzimáticos del sistema OXPPOS. En concreto, en el genoma mitocondrial se codifican:
 - 7 subunidades del Complejo I.
 - 1 subunidad del Complejo III.
 - 3 subunidades del Complejo IV.
 - 2 subunidades de la ATPasa (Complejo V).

Es importante no perder de vista que el resto de las subunidades polipeptídicas de estos complejos, así como el Complejo II completo, están codificados en el genoma nuclear, de manera que no todas las enfermedades mitocondriales están necesariamente causadas por alteraciones en el ADN mitocondrial.

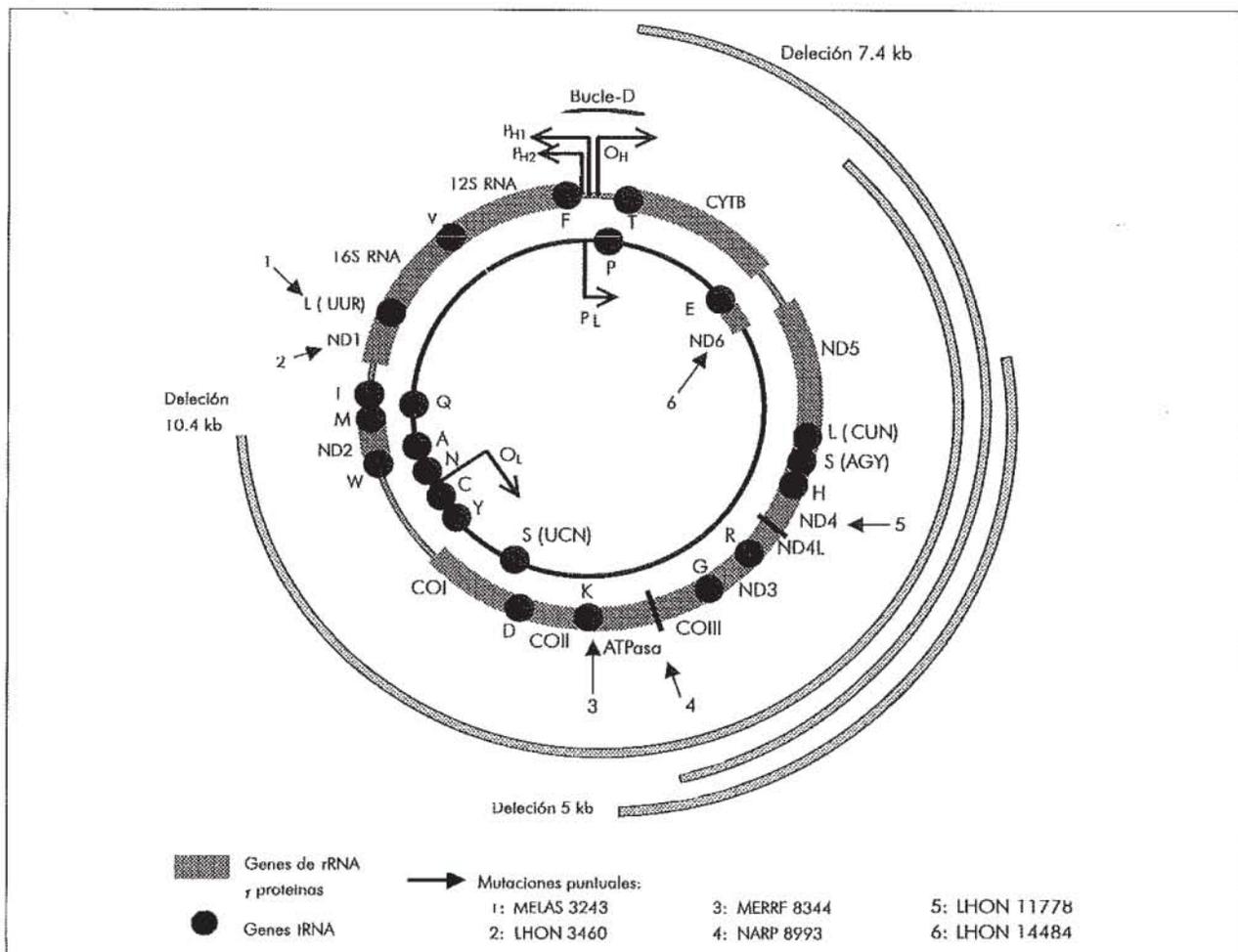
La característica estructural más sorprendente del mtDNA es que los genes se encuentran situados uno a continuación del otro, sin apenas intrones ni regiones no codificantes entre los genes. Al contrario que el genoma nuclear, en el que las regiones no codifi-

ARTÍCULOS DE REVISIÓN

cantes son mayoritarias, el ADN mitocondrial sólo posee un 3% de secuencias no codificantes. Veintiocho de los genes mitocondriales (2 rRNAs, 14 tRNAs y 12 polipéptidos) se encuentran en una de las cadenas (cadena H ó pesada), mientras que los 9 genes restantes (1 polipéptido y 8 tRNAs) están en la cadena complementaria (cadena L ó ligera). La única zona del mtDNA que no codifica ningún gen es la región del bucle de desplazamiento (bucle-D), localiza-

zada alrededor del origen de replicación de la cadena H. Esta región contiene también los promotores de la transcripción y los elementos reguladores de la expresión génica. Otra de las peculiaridades de la organización genética del mtDNA es que los genes de los tRNAs se distribuyen entre los genes de los rRNAs y los codificantes de proteínas; esta disposición tiene consecuencias muy importantes para el procesamiento del RNA (Figura 2).

Figura 2



Esquema de la estructura del mtDNA. Los genes de los tRNA están representados por círculos y van acompañados del nombre del aminoácido usando el código de una letra. Los genes que codifican los rRNA y las subunidades de los complejos mitocondriales están representados por los rectángulos punteados. En la región del Bucle-D se encuentran los promotores de la transcripción de la cadena pesada (PH1 y PH2) y de la ligera (PL), así como el origen de replicación de la cadena pesada (OH). El origen de replicación de la cadena ligera se encuentra en los nucleótidos 5721-5798. Se incluye también la posición de algunas mutaciones y deleciones más frecuentes.

ARTÍCULOS DE REVISIÓN

Para la replicación del mtDNA hacen falta dos orígenes diferentes, uno para cada cadena (O_H y O_L). Ambos orígenes de replicación están muy separados, haciendo que el proceso sea unidireccional y asimétrico. La síntesis del DNA se inicia en O_H y es realizada por una polimerasa específica de la mitocondria, la DNAPol, que alarga un RNA iniciador fruto del procesamiento de un transcrito primario que se sintetiza a partir del promotor L. La replicación continúa unidireccionalmente hasta alcanzar O_L , momento en el cual comienza la síntesis de la segunda cadena del DNA, alargando también un pequeño iniciador de RNA.

En la transcripción del mtDNA intervienen una RNAPol (polimerasa de ARN), al menos un factor de transcripción implicado en la iniciación (mtTFA), y uno de terminación (mtTERF). Las dos cadenas del mtDNA se transcriben completamente a partir de tres puntos de iniciación diferentes, dos para la cadena pesada (H1 y H2) y uno para la cadena ligera (L), originando tres moléculas policistrónicas que se procesan posteriormente por cortes endonucleolíticos precisos en los extremos 5' y 3' de las secuencias de los tRNAs, para dar lugar a los rRNAs, tRNAs y mRNAs maduros. De esta forma los tRNAs, situados entre los genes de los rRNAs y mRNAs, actúan como señales de reconocimiento para los enzimas de procesamiento. En particular, la cadena H se transcribe mediante dos unidades de transcripción solapadas en la región de los rRNAs: la primera de estas unidades comienza delante del gen para el tRNA^{Phe} (lugar de iniciación H1), termina en el extremo 3' del gen para el rRNA 16S y es responsable de la síntesis de los rRNAs 12S y 16S, del tRNA^{Phe} y del tRNA^{Val}. El factor de terminación (mtTERF) se une a una secuencia situada en el gen del tRNA^{Leu} y provoca la terminación de esta unidad. La segunda unidad de transcripción comienza cerca del extremo 5' del gen del rRNA 12S (lugar de iniciación H2) y transcribe la casi totalidad de la cadena pesada; el procesamiento de este RNA policistrónico origina los mRNAs de 12 péptidos y los otros 12 tRNAs codificados en esta cadena. La transcripción de la cadena ligera comienza cerca del extremo 5' del RNA 7S (en el bucle-D) y da lugar al iniciador de la replicación de la cadena pesada, 8 tRNAs y 1 péptido (ND6).

La síntesis de las proteínas mitocondriales tiene lugar en ribosomas específicos de la mitocondria, cuyos componentes están codificados en el mtDNA

(rRNA 12S y 16S) y en el genoma nuclear (84 proteínas ribosomales). En este sistema de traducción se sintetizan las trece proteínas codificadas en el mtDNA utilizando un código genético que difiere ligeramente del código genético universal. Así, UGA codifica el aminoácido triptófano (Trp) en vez de ser un codón de terminación, y los codones AUA y AUU se utilizan también como codones de iniciación.

La biogénesis de la mitocondria depende de la expresión coordinada de los genomas mitocondrial y nuclear, pero hasta ahora se conoce muy poco acerca de los mecanismos que regulan la interacción de ambos sistemas genéticos. La expresión del mtDNA parece estar regulada por el factor de iniciación de la transcripción mtTFA, codificado en el genoma nuclear. Este factor podría ser el responsable tanto de los niveles de RNA como del número de copias de mtDNA, ya que la replicación depende de la síntesis de un iniciador de RNA a partir del promotor de la cadena ligera. La regulación de la relación entre rRNAs y mRNAs mitocondriales se realiza fundamentalmente mediante la selección del lugar de iniciación de la transcripción de la cadena pesada, que a su vez está relacionada con el factor mtTERF (que causa terminación de la transcripción después de la síntesis de los rRNAs) y con el procesamiento de los RNAs primarios. Asimismo, la actividad transcripcional puede estar regulada por estímulos hormonales, especialmente por hormonas tiroideas que actúan tanto de un modo indirecto (por activación de genes nucleares) como directamente sobre el propio mtDNA.

Genética mitocondrial

El mtDNA presenta una serie de características genéticas (5,6) que lo diferencian claramente del ADN nuclear:

- *Alta tasa de mutación:* La tasa de mutación espontánea del mtDNA es unas 10 veces superior a la del ADN nuclear. Por tanto, hay una gran variación de secuencias entre especies e incluso entre individuos de una misma especie. En el hombre se ha calculado que dos individuos escogidos al azar tienen como promedio 50-70 nucleótidos diferentes en su genoma mitocondrial. Además de estas diferencias, en un individuo determinado se está produciendo continuamente, a lo largo de la vida, una heterogeneidad en el mtDNA como consecuencia de las mutaciones que se están dando en sus célu-

las somáticas. Se ha propuesto que una acumulación de este daño mitocondrial pudiera ser la causa de la disminución en la capacidad respiratoria de los tejidos que tiene lugar durante el envejecimiento.

- *Poliplasmia y Segregación mitótica:* En cada célula hay cientos o miles de moléculas de mtDNA. En principio, todas las células de un individuo normal tienen moléculas idénticas de mtDNA, situación que se denomina homoplasmia. Si en una célula aparecen dos poblaciones de mtDNA, una normal y otra mutada, se dice que estamos en una situación de heteroplasmia. Durante la división celular, las mitocondrias -y, por tanto, las moléculas de mtDNA- se distribuyen al azar entre las células hijas.
- *Efecto umbral:* El fenotipo de una célula en heteroplasmia dependerá del porcentaje de DNA dañado que exista en la célula; es decir, del grado de heteroplasmia. Cuando el número de moléculas de mtDNA mutadas es pequeño, el mtDNA normal es capaz de mantener la función mitocondrial. Sin embargo, cuando el número de copias de mtDNA mutado sobrepasa un umbral determinado, la producción de ATP puede llegar a estar por debajo de los mínimos necesarios para el funcionamiento de los tejidos, llevando al desarrollo de patología mitocondrial. Es importante tener en cuenta que los distintos tejidos pueden variar en el grado de homoplasmia o heteroplasmia para un mtDNA mutado, lo que origina una gran variabilidad en la expresividad clínica de las enfermedades mitocondriales. Por otra parte, los tejidos tienen distintas necesidades energéticas, y el número de orgánulos y de moléculas de mtDNA es también diferente en cada tejido. Por tanto, los órganos preferentemente afectados en las enfermedades mitocondriales son aquellos que dependen en mayor grado de la producción de energía para su correcto funcionamiento.
- *Herencia materna:* El mtDNA se hereda exclusivamente por vía materna. La pequeña cantidad de genoma mitocondrial contenido en el espermatozoide raramente entra en el óvulo fecundado, y cuando lo hace es eliminado activamente. El tipo de herencia matrilineal es bastante fácil de reconocer al examinar un árbol genealógico (Figura 3), y tiene importantes consecuencias en el consejo genético (ver más adelante).

Enfermedades asociadas con mutaciones en el mtDNA

Las enfermedades mitocondriales son un grupo de trastornos debidos a defectos en el sistema de fosforilación oxidativa que conduce a la síntesis de ATP, ruta final del metabolismo energético mitocondrial. El término fue introducido por Luft en 1962 al describir un paciente con hipermetabolismo, no causado por una disfunción tiroidea, que presentaba un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa en mitocondrias de músculo.

Como los componentes de los complejos multienzimáticos de la cadena respiratoria y fosforilación oxidativa están codificados tanto en el ADN nuclear como en el mtDNA, estas enfermedades pueden estar causadas por mutaciones en los genes de ambos sistemas genéticos. Sin embargo, habitualmente se conoce con el nombre de Enfermedades Mitocondriales a las originadas por alteraciones del mtDNA.

En general, se trata de trastornos multisistémicos que afectan fundamentalmente a los tejidos y órganos con mayor dependencia de la función mitocondrial (SNC, músculo cardíaco y esquelético, riñones y sistema endocrino). Sin embargo, al estar las mitocondrias presentes en todos los tejidos, otros muchos órganos pueden estar implicados en estas enfermedades (6-8). De hecho, una de las pistas que conduce a la sospecha de enfermedad mitocondrial es la afectación multi-orgánica. Las manifestaciones clínicas más frecuentes son las alteraciones neurológicas y musculoesqueléticas (demencia, desórdenes motores, intolerancia al ejercicio, accidentes cerebrovasculares, convulsiones), y oculares (ptosis palpebral, oftalmoplegia, retinopatía pigmentaria, atrofia del nervio óptico, ceguera). No es raro encontrar cardiomiopatía, disfunción hepática, disfunción pancreática (en ocasiones diabetes mellitus), nefropatías, alteraciones metabólicas (acidosis), anemia sideroblástica y retrasos del crecimiento. Otros caracteres morfológicos y bioquímicos que suelen estar asociados a enfermedades mitocondriales son las fibras rojo-rasgadas (ragged red fibres) en biopsias musculares: son fibras musculares que al tricrómico de Gomori presentan un color rojo en su periferia, provocado por el acúmulo de mitocondrias anormales en tamaño y número y lípidos en dicha zona. También son características las fibras no reactivas a la tinción histoquímica de la citocromo c oxidasa, así como defectos bioquímicos en uno o varios comple-

ARTÍCULOS DE REVISIÓN

jos de la cadena respiratoria. Sin embargo, algunas enfermedades claramente mitocondriales no presentan estos caracteres típicos, especialmente en pacientes pediátricos.

Dada la heterogeneidad de las manifestaciones clínicas, morfológicas y bioquímicas presentes en las enfermedades mitocondriales, su clasificación puede hacerse basándose en las características moleculares de las mutaciones que las causan. Así, las enfermedades mitocondriales se pueden dividir en dos grandes grupos: (1) enfermedades asociadas a mutaciones puntuales, y (2) enfermedades debidas a alteraciones estructurales del mtDNA.

Enfermedades asociadas a mutaciones puntuales

Debido a la alta tasa de mutación del mtDNA, es posible encontrar un gran número de mutaciones. Actualmente se han descrito más de 50 mutaciones puntuales (ver Tabla 1), que se localizan en los tres tipos de genes codificados en el mtDNA (rRNA, tRNA y polipéptidos del OXPHOS). Según su efecto patogénico, distinguimos:

- Mutaciones que originan el cambio de un aminoácido por otro, afectando a alguno de los 13 genes codificantes de proteínas.
- Mutaciones que afectan a los genes de los rRNA ó tRNA, que tienen efectos globales en la síntesis de las proteínas mitocondriales.

Neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON)

La neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON) fue la primera enfermedad humana heredada por vía materna que se asoció con una mutación en el mtDNA. Está caracterizada por una ceguera bilateral aguda o subaguda originada por atrofia del nervio óptico, que aparece en la segunda o tercera década de la vida y que afecta más a hombres que a mujeres. Normalmente, los pacientes sólo tienen afectada la visión, pero en algunos casos puede ir acompañada de trastornos en la conducción cardíaca, neuropatía periférica y ataxia.

Son muchas las mutaciones puntuales que se han asociado con esta enfermedad, pero la gran mayoría de los casos están debidos a tres de ellas: las localizadas en los nucleótidos 11.778, 3.460 y 14.484. Todas estas mutaciones están localizadas en genes estructurales y están presentes en forma homoplásmica. La asociación

de LHON y distonía está causada por la mutación G14459A en el gen mitocondrial ND6, que codifica una subunidad de la NADH-DH. La mutación cambia el aminoácido 72 de Ala a Val, provocando una reducción substancial en la actividad del Complejo I.

La mayor predominancia de la enfermedad en hombres sugiere que puede existir alguna influencia de un gen nuclear situado en el cromosoma X. De hecho, en familias finlandesas se ha descrito ligamiento de la enfermedad con el locus DXS7, aunque este hallazgo no se ha confirmado en familias de otro origen étnico.

Síndrome de neuropatía, ataxia y retinopatía pigmentaria (NARP)

Este síndrome, caracterizado por debilidad muscular neurogénica, retraso en el desarrollo, neuropatía sensorial, convulsiones, ataxia, demencia y retinopatía pigmentaria, se ha asociado a la mutación T8993G de la subunidad 6 de la ATPasa. La mutación se encuentra en forma heteroplásmica y produce el cambio de una Leu en el codón 156 por una Arg, provocando un bloqueo en el canal de H⁺ F0 de la ATPasa. Como ya se ha comentado, variaciones en el porcentaje de mtDNA mutado son causa de la variabilidad clínica entre distintos pacientes.

Síndrome de Leigh

El Síndrome de Leigh es una enfermedad muy heterogénea en la que se han descrito hasta 3 modos de herencia: mitocondrial, ligado al X y autosómico recesivo. La enfermedad cursa con trastornos degenerativos multisistémicos de presentación temprana (en el primer año de vida), y está caracterizada por disfunción tronco-encefálica y de los ganglios basales, desmielinización, regresión psicomotora, retraso en el desarrollo, convulsiones, ataxia, neuropatía periférica, hipotonía, atrofia óptica y oftalmoplegia. La última fase de la enfermedad se asocia generalmente con degeneración de los ganglios basales y lesiones necróticas cerebrales focales en el tálamo, tronco del encéfalo y núcleo dentado. Dentro de los casos debidos a mutaciones del mtDNA, se han descrito algunos originados por la mutación T8993G, la misma que se ha mencionado anteriormente en el síndrome NARP, pero con un porcentaje de mtDNA mutado superior al 90%. También son causa del Síndrome de Leigh las mutaciones T8993C y T9176C, que cambian sendas Leu por Pro en el gen MTATP6.

Síndrome de encefalomiopatía mitocondrial con acidosis láctica y episodios de accidentes cerebro-vasculares (MELAS)

Este síndrome se ha asociado en el 90% de los casos con la mutación A3243G del genoma mitocondrial, localizada dentro de la secuencia del tRNA^{Leu(UUR)}. MELAS está caracterizado fundamentalmente por accidentes cerebro-vasculares que provocan una disfunción cerebral subaguda y cambios en la estructura cerebral, acidosis láctica y/o presencia de fibras rojo-rasgadas. Estos hallazgos pueden ir acompañados también de encefalomiopatía con convulsiones generalizadas, dolor de cabeza, sordera y demencia. Esta enfermedad se ha relacionado también con otras mutaciones localizadas en el tRNA^{Leu(UUR)}, que parece ser muy propenso a sufrir mutaciones patogénicas. La mutación principal, en la posición 3243, se ha relacionado también con otras enfermedades como oftalmoplegia progresiva externa, cardiomiopatías e incluso diabetes mellitus y sordera (cuando se presenta en un bajo porcentaje, del 5-30%), por lo que la relación genotipo-fenotipo no es muy fija.

Síndrome de epilepsia mioclónica con fibras rojo-rasgadas (MERRF)

MERRF es un síndrome de herencia materna caracterizado por epilepsia mioclónica, debilidad muscular, ataxia, convulsiones generalizadas y miopatía mitocondrial con presencia de fibras rojo-rasgadas. Otros síntomas menos comunes son demencia, sordera, neuropatía, atrofia óptica, fallo respiratorio y cardiomiopatía. Puede aparecer tanto en la infancia como en edad adulta y es de curso progresivo. El 80-90% de los casos están asociados con la presencia de una mutación A8344G del gen tRNA^{Lys}, pero en algunos casos se han encontrado también otras mutaciones en el mismo gen. Se ha demostrado que la mutación produce una disminución de la síntesis de proteínas mitocondriales por deficiencia en la aminoacilación del tRNA^{Lys}.

Otras enfermedades asociadas a mutaciones puntuales en el mtDNA

Además de las mutaciones puntuales descritas anteriormente, se han encontrado un buen número de mutaciones puntuales asociadas a otros muchos síndromes. Entre ellos podemos citar la diabetes de herencia materna con sordera, que afecta a 1-5% de la

población diabética; las cardiomiopatías de herencia materna; miopatías de herencia materna asociadas a mutaciones en tRNA^{Leu}, tRNA^{Pro}, tRNA^{Asn}, tRNA^{Tyr}; la sordera inducida por aminoglicósidos y otros tipos de sordera sindrómica o no-sindrómica de herencia materna; anemia sideroblástica; y deficiencia fatal de la cadena respiratoria infantil.

Se está estudiando el papel que puede jugar el daño en el mtDNA en enfermedades neurodegenerativas como Parkinson y Alzheimer, en las que se da una apoptosis selectiva de determinadas neuronas. En este sentido, se han descrito las mutaciones 3196A (en el gen MTRNR2, de la subunidad 16S de rRNA); 4336C (en el gen MTTQ del tRNA^{Gln}); A3397G (en el gen MTND1) y las mutaciones G5460A y G5460T (ambas afectando al gen MTND2) en pacientes con enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer. Asimismo, se está investigando la posible relación de la infertilidad masculina con daños en el mtDNA, debido a la gran dependencia que tiene la motilidad de los espermatozoides de la función de la cadena respiratoria.

Enfermedades asociadas a alteraciones estructurales del mtDNA

Algunos pacientes con enfermedades que afectan al sistema OXPHOS presentan mutaciones originadas por reordenaciones del mtDNA. Estas pueden ser tanto deleciones más o menos grandes como, menos frecuentemente, inserciones y/o duplicaciones. Hasta el momento se han descrito varios cientos de reordenaciones del mtDNA, que -al contrario que las mutaciones puntuales- suelen ser esporádicas.

Síndrome de oftalmoplegia externa progresiva (CPEO)

La oftalmoplegia externa progresiva crónica está caracterizada por oftalmoplegia, ptosis palpebral bilateral y miopatía. Además, suele ir acompañada de intolerancia al ejercicio y debilidad muscular. En el músculo se encuentran fibras rojo-rasgadas e inmunohistoquímica negativa para COX. En general, es una enfermedad benigna que suele aparecer en la adolescencia o en adultos jóvenes de forma esporádica, sin historia familiar previa. Aunque la mayoría de los casos de CPEO están debidos a alteraciones estructurales del mtDNA, se han encontrado también casos con mutaciones puntuales (ver Tabla 1).

ARTÍCULOS DE REVISIÓN

Tabla 1

Mutaciones más frecuentes en las principales enfermedades mitocondriales. No se incluyen alteraciones estructurales ni polimorfismos, ni se mencionan otros fenotipos. "Mutación en el mtDNA" indica la posición del nucleótido, precedido por el nucleótido original y seguido por el nuevo nucleótido que resulta de la mutación. El cambio de aminoácidos viene representado por el código de una letra. El locus designa el nombre del gen: comienza por las letras "MT" (mitocondrial), seguido por el nombre de la proteína codificada (ATP6, ND1, etc.) o del tRNA codificado ("T" indica tRNA y la letra siguiente indica el aminoácido unido a ese tRNA empleando también el código de una letra). Para una búsqueda más exhaustiva, se recomienda al lector visitar la página Web de MITOMAP, la principal base de datos de variaciones en el mtDNA (MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database. Center for Molecular Medicine, Emory University, Atlanta, GA, USA) en <http://www.gen.emory.edu/mitomap.html>

Enfermedad	Mutación en el mtDNA	Cambio de aminoácidos	Gen afectado	Locus
NARP	T8993G	L-R	ATPasa6	MTATP6
NARP/Leigh	T8993C	L-P	ATPasa6	MTATP6
MELAS	583A		tRNAPhe	MTTF
	1642A		tRNAVal	MTTV
	3243G		tRNALeu(UUR)	MTTL1
	3252G		tRNALeu(UUR)	MTTL1
	3256T		tRNALeu(UUR)	MTTL1
	3271C		tRNALeu(UUR)	MTTL1
	3291C		tRNALeu(UUR)	MTTL1
	T3308C	M-T	ND1	MTND1
PEM/MELAS	T9957C	F-L	COIII	MTCO3
	A11084G	T-A	ND4	MTND4
	G13513A	D-N	ND5	MTND5
PD/MELAS	14787del4		CYB	MTCYB
MERRF	DMD/MERRF		tRNALys	MTTK
			tRNALys	MTTK
			tRNALys	MTTK
	MICM+DEAF/MERRF		tRNALys	MTTK
CPEO			tRNALeu(UUR)	MTTL1
	MM/CPEO		tRNALeu(UUR)	MTTL1
	NIDOM/LHON/PEO	A-T	ND1	MTND1
	CPEO		tRNAIle	MTTI
	CPEO		tRNAIle	MTTI
	CPEO/MS		tRNAIle	MTTI
	CPEO		tRNAIle	MTTI
	CPEO		tRNAAsn	MTTN
	CPEO/MM		tRNAAsn	MTTN
	PEO/Myoclonus		tRNALys	MTTK
	CPEO		tRNALeu(CUN)	MTTL2
	CPEO		tRNALeu(CUN)	MTTL2
	CPEO		tRNALeu(CUN)	MTTL2

Tabla 1 (Cont.)

Mutaciones más frecuentes en las principales enfermedades mitocondriales

Enfermedad		Mutación en el mtDNA	Cambio de aminoácidos	Gen afectado	Locus
LHON	NIDDM/LHON/PEO	G3316A	A-T	ND1	MTND1
		T3394C	Y-H	ND1	MTND1
		G3460A	A-T	ND1	MTND1
		G3496T	A-S	ND1	MTND1
		C3497T	A-V	ND1	MTND1
		A4136G	Y-C	ND1	MTND1
		T4160C	L-P	ND1	MTND1
		T4216C	Y-H	ND1	MTND1
		A4917G	D-N	ND2	MTND2
		G5244A	G-S	ND2	MTND2
		G7444A	Ter-K	CO1	MTCO1
		T9101C	I-T	ATP6	MTATP6
		G9438A	G-S	CO3	MTCO3
		G9738T	A-T	CO3	MTCO3
		G9804A	A-T	CO3	MTCO3
		T10663C	U-A	ND4L	MTND4L
		G11778A	R-H	ND4	MTND4
	G13708A	A-T	ND5	MTND5	
	G13730A	G-E	ND5	MTND5	
	LHON/Distonia	G14459A	A-V	ND6	MTND6
T14484C		M-V	ND6	MTND6	
C14568T		G-S	ND6	MTND6	
G15257A		D-N	CYB	MTCYB	
G15812A		V-M	CYB	MTCYB	

Síndrome de Kearns-Sayre (KSS)

El síndrome de Kearns-Sayre es una enfermedad multisistémica progresiva que aparece antes de los 20 años de edad y que está caracterizada clínicamente por PEO y retinopatía pigmentaria. Además, suele ir acompañada de otros síntomas como ataxia, miopatía mitocondrial, bloqueo de la conducción cardíaca, proteinorraquia por encima de 100 mg/dl, sordera, demencia, fallos endocrinos y renales. La biopsia muscular muestra fibras rojo-rasgadas. Los pacientes suelen morir antes de los 40 años. Esta enfermedad está causada por deleciones grandes y únicas en el mtDNA. No se han encontrado deleciones en la

madre de los pacientes, por lo que parece que la mayoría de los casos son esporádicos.

Síndrome de Pearson

El síndrome de médula ósea-páncreas de Pearson es una enfermedad de los primeros años de vida que afecta a la hematopoyesis y a la función pancreática exocrina. Las características clínicas más comunes son la anemia sideroblástica con vacuolización de precursores de la médula ósea, que se manifiesta en una anemia macrocítica, trombocitopenia y neutropenia. Los niños afectados suelen morir antes de los 3 años y los que sobreviven suelen desarrollar más

ARTÍCULOS DE REVISIÓN

tarde un fenotipo de Kearns-Sayre. Estos pacientes presentan deleciones grandes únicas del mtDNA, y la mayoría de los casos son esporádicos.

Los tres síndromes precedentes (CPEO, Kearns-Sayre y Pearson) tienen en común la presencia de grandes deleciones (de 2 a 9kb) en el mtDNA que suelen aparecer de forma esporádica. En general, estas deleciones son únicas pero también se han descrito deleciones múltiples. Hay dos tipos de deleciones que se presentan con mayor frecuencia (deleciones comunes), de 4.997 y 7.436 pb de tamaño respectivamente. La mayor parte de las deleciones (alrededor de un 70%) están flanqueadas por repeticiones directas, pero otras no lo están. En general están localizadas en el arco grande comprendido entre los orígenes de replicación, de forma que nunca se pierde el OH (origen de replicación de la cadena pesada). La pérdida de varios genes incluidos en la deleción, especialmente de tRNAs, provoca un déficit global en la traducción proteica mitocondrial, por lo que estas deleciones siempre se encuentran en heteroplasmia.

Existen otras muchas enfermedades que están asociadas a la presencia de grandes deleciones en el mtDNA. Entre otras se pueden mencionar los fenotipos de diabetes, sordera y atrofia óptica; miopatías en general; el síndrome de encefalomiopatía mitocondrial neurogastrointestinal (MNGIE); o el síndrome de diabetes mellitus, diabetes insípida, atrofia óptica y sordera (DIDMOAD).

Otros reordenamientos del mtDNA

En algunos pacientes con defectos en la cadena respiratoria y fosforilación oxidativa se han encontrado duplicaciones parciales del mtDNA, unas veces aisladas y otras veces acompañadas también de deleciones. Pueden ser esporádicas o de herencia materna, la mayoría de los fenotipos que producen no se diferencian de los que producen las deleciones y la gravedad de la enfermedad aumenta con el porcentaje de moléculas mutadas. Los mecanismos por los que se originan las duplicaciones todavía no están claros.

Se han encontrado familias con PEO que presentan deleciones múltiples de herencia autosómica dominante o recesiva. Esto apoya la existencia de genes nucleares implicados en la biogénesis mitocondrial y mantenimiento del mtDNA, que provocarían alteraciones estructurales del mtDNA cuando están mutados. En este sentido, se ha encontrado que PEO puede estar causada por genes localizados en 10q en

una familia finlandesa y en 3p en familias italianas, pero todavía no se han encontrado los genes nucleares implicados.

La depleción del mtDNA consiste en una disminución en los niveles de mtDNA. Es un trastorno de herencia mendeliana que afecta a la comunicación núcleo-mitocondria, y que parece ser autosómico recesivo. El defecto puede ser debido a mutaciones en genes nucleares que controlan el número de copias del mtDNA. Se desconoce por el momento cual puede ser el gen responsable, pero se ha encontrado que pacientes con depleción de mtDNA tienen niveles bajos del factor de transcripción mtTFA. El espectro clínico que produce la depleción de mtDNA puede ser muy variado; los casos descritos son fundamentalmente niños con combinaciones variables de miopatía, nefropatía o hepatopatía, miopatía infantil fatal por fallo respiratorio y algún caso con implicación multisistémica. Asimismo, parece ser la causa de una miopatía mitocondrial que aparece en pacientes de SIDA después de tratamiento con AZT.

Estrategias diagnósticas en las enfermedades mitocondriales

Como ya se ha comentado, las enfermedades mitocondriales son un grupo de entidades heterogéneas, tanto desde el punto de vista clínico como bioquímico y genético. Muestran gran variabilidad en la presentación clínica, ya que la mayor parte de las veces cursan como asociaciones de síntomas que afectan a órganos no relacionados entre sí. Además, el doble control genético (nuclear y mitocondrial) de los complejos que constituyen la cadena de transporte electrónico añade mayor complejidad, máxime cuando en ocasiones aparecen como casos esporádicos sin antecedentes familiares previos. Por otro lado, las pruebas de laboratorio necesarias para confirmar estas enfermedades tienen cierta sofisticación y requieren a veces la toma de biopsia. Todo ello hace que, habitualmente, la sospecha de enfermedad mitocondrial pase a un segundo plano y se piense en ella tras haber descartado (a menudo mediante numerosas pruebas diagnósticas complementarias) otras patologías. Desde el punto de vista práctico, la estrategia diagnóstica de las enfermedades mitocondriales se basa en la sospecha clínica, las pruebas que examinan la función mitocondrial y los análisis moleculares para determinar las alteraciones presentes en el mtDNA.

Aproximación clínica

Debe sospecharse un desorden mitocondrial ante asociaciones de síntomas no explicables que afecten a órganos aparentemente no relacionados entre sí, que pueden aparecer a cualquier edad, en ocasiones presentando un comienzo temprano y un curso rápidamente fatal.

Como hemos comentado, existen una serie de signos clínicos que sugieren la presencia de una enfermedad mitocondrial: la oftalmoplegia externa progresiva con afectación multiorgánica (diabetes, sordera, cardiomiopatía, entre otras); el deterioro de las funciones superiores y motoras en un paciente con epilepsia y mioclonias o con episodios de acidosis metabólica; la presencia de retinitis pigmentaria, sordera neurosensorial, miocardiopatía o síndrome de Wolf-Parkinson-White, en un paciente con sintomatología neurológica compleja. Los enfermos con afectación muscular suelen presentar fatigabilidad muscular al ejercicio, frecuentemente acompañada de signos vegetativos, taquicardia y acidosis metabólica; otros pacientes sólo desarrollan rhabdomiólisis desencadenada por el ejercicio o el ayuno. Una forma de presentación clínica en la infancia es la hipotonía neonatal acompañada de acidosis metabólica. En ocasiones, el principal indicador de la existencia de una posible enfermedad mitocondrial es la afectación multiorgánica, tubulopatía renal, cardiomiopatía, encefalopatía, o hipoglucemia, entre otros, sin explicación aparente. Es imprescindible emplear tiempo en la historia familiar y en la construcción del árbol genealógico (procedimiento tan frecuentemente olvidado por los clínicos), ya que estas enfermedades pueden ser transmitidas de forma autosómica recesiva o dominante, ligada al sexo, matrilineal o ser esporádicas.

Estudio de la función mitocondrial

En gran parte de los pacientes con enfermedades mitocondriales existe un aumento de ácido láctico plasmático. Si los niveles de lactato no están elevados, debe estudiarse el estado de oxidorreducción citoplasmático mediante la relación lactato/piruvato (L/P), así como la relación hidroxibutirato/acetato (HB/AA) que refleja el estado de oxidorreducción mitocondrial. La elevación de uno o ambos de estos índices, ayuda a intuir qué eslabón del metabolismo mitocondrial está afectado. Si el diagnóstico no fuera concluyente, debe buscarse la acidosis láctica tras una sobrecarga de glucosa o después de una

prueba de esfuerzo, ya que en estas circunstancias se requiere más NAD para llevar a cabo la glucólisis. En condiciones aeróbicas normales, veinte minutos de ejercicio, a unas 130-140 pulsaciones, provocan un aumento de lactato de unas tres veces el valor basal. En algunos pacientes con enfermedad mitocondrial, el aumento es de diez veces. En ocasiones, especialmente en pacientes con manifestaciones neurológicas centrales, es útil valorar la relación lactato/piruvato en líquido cefalorraquídeo, aunque la normalidad de dicho índice no descarta una enfermedad mitocondrial.

Otro índice a valorar es la *concentración plasmática de carnitina libre y su forma esterificada*. Cuando existe una disfunción mitocondrial, hay dificultades para metabolizar los ácidos grasos que se deben esterificar con la carnitina para entrar en la mitocondria; así, se producirá un incremento de la forma esterificada de la carnitina con un descenso relativo de su forma libre.

La valoración de *ácidos orgánicos* en orina ayuda a diagnosticar las deficiencias de la oxidación de ácidos grasos, poniendo en evidencia la excreción de ácidos tricarbóxicos y sus derivados. Esto, de forma indirecta, nos informará de los bloqueos en las rutas metabólicas mitocondriales.

La confirmación de la disfunción mitocondrial debe realizarse en una biopsia, que permitirá el diagnóstico histológico, bioquímico y genético. Es recomendable estudiar un órgano afectado, sobre todo en situaciones de heteroplasmia, por lo que el músculo es habitualmente el tejido de elección para la realización de la biopsia. El *análisis histológico* revelará la presencia de fibras rojo-rasgadas, fibras negativas para la actividad citocromo c oxidasa y acúmulo de lípidos. Por microscopía electrónica se detectan acúmulos mitocondriales, generalmente sub-sarcolémicos, y alteraciones en la arquitectura mitocondrial. Aunque, clásicamente, el diagnóstico de enfermedad mitocondrial se establezca por las alteraciones histológicas de la biopsia muscular, estas pruebas no son patognomónicas de la enfermedad, ya que se han descrito fibras rojo-rasgadas en polineuropatías, así como alteraciones ultraestructurales con presencia de cristales intramitocondriales en distrofias musculares o en alguna glucogenosis muscular.

Para estudiar las alteraciones de la cadena respiratoria mitocondrial, se requieren *estudios bioquímicos* que determinen las actividades enzimáticas de los distintos complejos de la cadena respiratoria, así como la

ARTÍCULOS DE REVISIÓN

medida del consumo de O₂ mitocondrial mediante métodos polarográficos. Las determinaciones enzimáticas pueden realizarse en mitocondrias aisladas en el homogenado del tejido biopsiado, pero los ensayos sobre mitocondrias aisladas tienen mayor fiabilidad diagnóstica. Los estudios polarográficos con electrodo de Clarke miden el consumo de O₂ en presencia de varios sustratos oxidativos, y su realización requiere mitocondrias aisladas.

Otra prueba que puede ser utilizada para diagnosticar las alteraciones de la cadena respiratoria es el estudio del metabolismo energético del músculo y cerebro *in vivo* mediante resonancia magnética. La mayor parte de los pacientes muestran un aumento de la relación del Pi/fosfocreatina.

Estudio molecular del mtDNA y consejo genético

Como regla práctica, podemos decir que en aquellos casos que muestran herencia matrilineal ha de sospecharse la presencia de mutaciones puntuales del mtDNA; en casos esporádicos, en cambio, son más frecuentes las deleciones y/o duplicaciones. Si, por el contrario, se confirma un patrón de herencia autosómico dominante, el estudio debe ir dirigido hacia la búsqueda de deleciones múltiples; si fuese autosómico recesivo, deben buscarse deleciones del mtDNA.

La detección de mutaciones puntuales se realiza habitualmente por digestión de fragmentos de PCR con enzimas de restricción sensibles al cambio de nucleótido introducido por la mutación (ver ref. 9 para detalles de los cebadores y enzimas de restricción utilizados en la detección de las principales mutaciones). En cualquier caso, resulta más fiable la detección mediante hibridación Southern del mtDNA digerido con enzimas de restricción específicos para cada una de las mutaciones concretas, pero esto no siempre es posible y, por otra parte, es más laborioso.

La presencia de deleciones se detecta con relativa facilidad por la técnica de hibridación Southern, que muestra poblaciones de mtDNA de menor tamaño que el normal (16.569 pb), utilizando como sonda un gran fragmento de mtDNA obtenido mediante PCR de largo alcance. Las deleciones son siempre heteroplásmicas, aunque pueden llegar a constituir un porcentaje muy alto de la población de mtDNA. Su determinación se hace fundamentalmente en biopsias

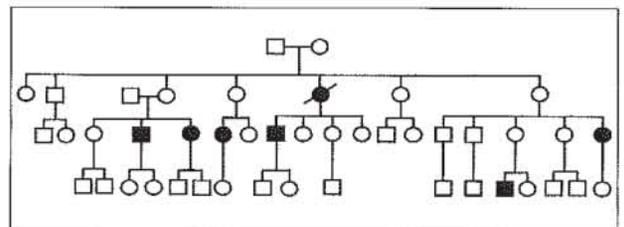
musculares, pero si la afectación es muy grave se pueden llegar a detectar también en sangre periférica. Se utiliza habitualmente mtDNA digerido con *Bam*HI o con *Eco*RV, pero hay que tener en cuenta la presencia de otros polimorfismos que complican la interpretación del patrón de bandas (9). El diagnóstico de depleción del mtDNA se realiza también por hibridación Southern, comparando los niveles de mtDNA con los de ADN nuclear, aunque es previsible que la tecnología de PCR en tiempo real acabará por imponerse.

La confirmación molecular de una alteración del mtDNA ayuda a establecer el diagnóstico de enfermedad mitocondrial y el patrón de herencia matrilineal. Esto tiene una importancia capital desde el punto de vista del consejo genético y el cálculo del riesgo de recurrencia de la enfermedad, ya que la herencia matrilineal está caracterizada por la transmisión exclusivamente por vía materna (Figura 3). En estos casos, se afectan ambos sexos pero los varones -enfermos o no- nunca transmiten la enfermedad, y sus descendientes (hijos o hijas) no son portadores. Por el contrario, las mujeres afectadas, y las posibles portadoras asintomáticas (dependiendo del grado de heteroplasmia) transmiten la enfermedad a toda su descendencia, de forma que todas sus hijas tienen riesgo de transmitir y/o padecer la enfermedad, y todos sus hijos tienen riesgo de padecerla.

Consideraciones finales

Muchos aspectos de la patología mitocondrial quedan aún por resolver. Una cuestión fundamental es el

Figura 3



Árbol genealógico característico de herencia mitocondrial (matrilineal). Todos los individuos afectados proceden, siempre por vía materna, de una misma pareja. Nótese la presencia de, al menos, cuatro mujeres portadoras sin evidencia de patología mitocondrial. Los varones afectados tendrán descendencia sana

ARTÍCULOS DE REVISIÓN

estudio de los mecanismos fisiopatológicos por los que las mutaciones en el mtDNA conducen al desarrollo de estas enfermedades. La reciente obtención de un modelo animal de ratón portador de deleciones en el mtDNA (10) abre una nueva vía para avanzar en el conocimiento de estas patologías.

Otro aspecto central es la comunicación entre los genomas nuclear y mitocondrial. A medida que el

Proyecto Genoma Humano vaya cumpliendo sus objetivos, podemos prever que se identificarán nuevos genes nucleares responsables de enfermedades mitocondriales (11,12) y se avanzará en el conocimiento de los genes nucleares responsables de la biogénesis mitocondrial y del mantenimiento del número de copias e integridad del genoma mitocondrial.

BIBLIOGRAFÍA

1. Shoffner JM, Wallace DC. Oxidative Phosphorylation Diseases. En Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. New York, McGraw-Hill, 1995.

2. Martinou JC. Key to the mitochondrial gate. *Nature* 1999;399:411-412.

3. Larsson NG, Clayton DA. Molecular genetic aspects of human mitochondrial disorders. *Annu Rev Genet* 1995;29:151-78.

4. Lightowlers RN, Chinnery PF, Turnbull DM, Howell N. Mammalian mitochondrial genetics: heredity, heteroplasmy and disease. *Trends Genet* 1997;13:450-455.

5. Enríquez JA, Martínez-Azorín F, Garesse R, et al. Sistema genético

mitocondrial humano. *Rev Neurol* 1998;26(Supl):S21-S26.

6. Johns DR. Mitochondrial DNA and disease. *N Engl J Med* 1995;333:638-644.

7. Chinnery PF, Howell N, Andrews RM, Turnbull DM. Mitochondrial DNA analysis: polymorphisms and pathogenicity. *J Med Genet* 1999;36:505-510.

8. Chinnery PF, Howell N, Andrews RM, Turnbull DM. Clinical mitochondrial genetics. *J Med Genet* 1999;36:425-436.

9. Shoffner JM. Molecular Analysis of Oxidative Phosphorylation Diseases for Detection of Mitochondrial DNA Mutations. *Current Protocols in Human Genetics* (1997) 9.9.1-9.9.26.

10. Shoubridge EA. A debut for the mito-mouse. *Nat Genet* 2000;26:132-134.

11. Delettre C, Lenaers G, Griffoin J-M, Gigarel N, Lorenzo C, Belenguer P, Pelloquin L, Grosgeorge J, Turc-Carel C, Perret E, Astarie-Dequeker C, Lasquellec I, Arnaud B, Ducommun B, Kaplan J, Hamel CP. Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* 2000;26:207-210.

12. Alexander C, Votruba M, Pesch UFA, Thiselton DL, Mayer S, Moore A Rodriguez, M, Kellner U, Leo-Kottler B, Auburger G, Bhattacharya SS, Wissinger B. OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet* 2000;26:211-215.