

# Enfermedades genéticas del ADN mitocondrial humano

Abelardo Solano, Q. F. B.,<sup>(1)</sup> Ana Playán, Ph.D.,<sup>(1)</sup>  
Manuel J. López-Pérez, Ph.D.,<sup>(1)</sup> Julio Montoya, Ph.D.<sup>(1)</sup>

Solano A, Playán A, López-Pérez MJ, Montoya J.  
Enfermedades genéticas  
del ADN mitocondrial humano.  
*Salud Publica Mex* 2001;43:151-161.

El texto completo en inglés de este artículo está  
disponible en: <http://www.insp.mx/salud/index.html>

## Resumen

Las enfermedades mitocondriales son un grupo de trastornos que están producidos por un fallo en el sistema de fosforilación oxidativa (sistema Oxphos), la ruta final del metabolismo energético mitocondrial, con la consiguiente deficiencia en la biosíntesis del trifosfato de adenosina (ATP, por sus siglas en inglés). Parte de los polipéptidos que componen este sistema están codificados en el ácido desoxirribonucleico (DNA) mitocondrial y, en los últimos años, se han descrito mutaciones que se han asociado con síndromes clínicos bien definidos. Las características genéticas del DNA mitocondrial, herencia materna, poliplasmia y segregación mitótica, confieren a estas enfermedades propiedades muy particulares. Las manifestaciones clínicas de estas enfermedades son muy heterogéneas y afectan a distintos órganos y tejidos por lo que su correcto diagnóstico implica la obtención de datos clínicos, morfológicos, bioquímicos y genéticos. El texto completo en inglés de este artículo está disponible en: <http://www.insp.mx/salud/index.html>

Palabras clave: ADN mitocóndrico; enfermedades mitocondriales; España

Solano A, Playán A, López-Pérez MJ, Montoya J.

Genetic diseases  
of the mitochondrial DNA.  
*Salud Publica Mex* 2001;43:151-161.

The English version of this paper  
is available at: <http://www.insp.mx/salud/index.html>

## Abstract

Mitochondrial diseases are a group of disorders produced by defects in the oxidative phosphorylation system (Oxphos system), the final pathway of the mitochondrial energetic metabolism, resulting in a deficiency of the biosynthesis of ATP. Part of the polypeptide subunits involved in the Oxphos system are codified by the mitochondrial DNA. In the last years, mutations in this genetic system have been described and associated to well defined clinical syndromes. The clinical features of these disorders are very heterogeneous affecting, in most cases, to different organs and tissues and their correct diagnosis require precise clinical, morphological, biochemical and genetic data. The peculiar genetic characteristics of the mitochondrial DNA (maternal inheritance, polyplasmia and mitotic segregation) give to these disorders very distinctive properties. The English version of this paper is available at: <http://www.insp.mx/salud/index.html>

Key words: DNA, mitochondrial; mitochondrial diseases; Spain

Las mitocondrias son organelos subcelulares que se encuentran en el citoplasma de las células eucariotas, cuya función principal es la producción de la energía celular en forma de trifosfato de adenosina

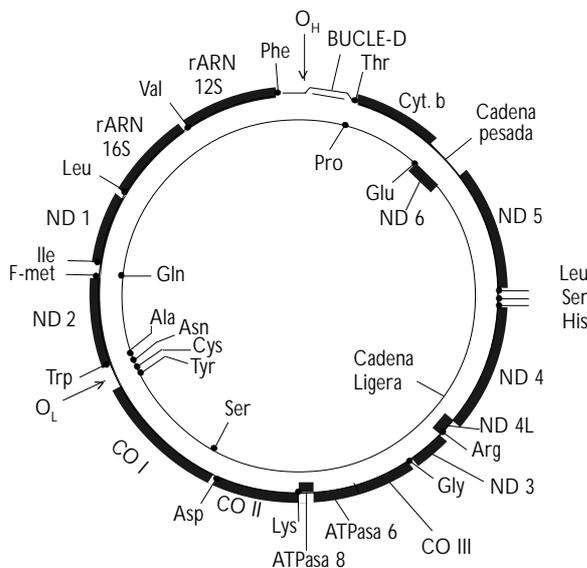
(ATP, por sus siglas en inglés). Una de las particularidades de estos organelos es la de poseer un sistema genético propio con toda la maquinaria necesaria para su expresión, es decir, para replicar, transcribir y

Este trabajo ha sido subvencionado por la Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica (PB97-1019), el Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS 98-0049-01), la Diputación General de Aragón (P24/97) de España, así como por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) de México.

(1) Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España.

Fecha de recibido: 22 de mayo de 2000 • Fecha de aprobado: 13 de noviembre de 2000  
Solicitud de sobretiros: Dr. Julio Montoya. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Facultad de Veterinaria,  
Universidad de Zaragoza. Miguel Servet 177, E-50013 Zaragoza, España.  
Correo electrónico: [jmontoya@posta.unizar.es](mailto:jmontoya@posta.unizar.es)

traducir la información genética que contiene. El ácido desoxirribonucleico mitocondrial (mtDNA, por sus siglas en inglés) humano es una molécula circular compuesta por 16 569 pares de bases<sup>1</sup> que contiene información para 37 genes: dos ácidos ribonucleicos ribosómicos (rRNA), componentes de los ribosomas específicos mitocondriales, 22 de transferencia (tRNA), que son capaces de leer todo el código genético, y 13 polipéptidos que forman parte de cuatro de los cinco complejos multienzimáticos del sistema de fosforilación oxidativa (sistema Oxphos), etapa terminal de la ruta de producción de ATP. Estos péptidos corresponden a siete subunidades (ND1, 2, 3, 4, 4L, 5, 6) del dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido (NADH): ubiquinona óxido-reductasa (complejo I); una subunidad (cyt b) de la ubiquinol: citocromo c óxido-reductasa (complejo III); tres subunidades (CO I, II, III) de la citocromo c oxidasa (complejo IV), y dos subunidades de la ATP sintetasa (complejo V)<sup>2</sup>



**FIGURA 1. MAPA GENÉTICO DEL DNA MITOCONDRIAL HUMANO. SE REPRESENTA LAS DOS HEBRAS DEL DNA CON LOS GENES QUE CODIFICAN: rRNA (12S Y 16S), tRNA, SEÑALADOS CON LA ABBREVIATURA DEL AMINOÁCIDO QUE TRANSPORTAN, Y SECUENCIAS CODIFICADORAS DE PROTEÍNAS (CO: SUBUNIDADES CITOCROMO C OXIDASA; CYT B: CITOCROMO B Y ND: SUBUNIDADES DE NADH DESHIDROGENASA). H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> Y L INDICAN LOS LUGARES DE INICIACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN DE LAS HEBRAS PESADA Y LIGERA, RESPECTIVAMENTE. O<sub>H</sub> Y O<sub>L</sub> SIMBOLIZAN LOS ORÍGENES DE REPLICACIÓN DE LA CADENA PESADA Y LIGERA**

(figura 1). El resto de los polipéptidos componentes de estos complejos, así como el complejo II completo, están codificados en el DNA nuclear. La biogénesis de este sistema constituye un caso único en la célula ya que para su formación se requiere la expresión coordinada de los dos sistemas genéticos.

Los caracteres moleculares básicos y peculiares del sistema genético mitocondrial se descubrieron al inicio de los años ochenta,<sup>1,3-6</sup> y en 1988 se encontraron las primeras mutaciones asociadas a enfermedades.<sup>7-9</sup> Desde entonces, el número de mutaciones en el mtDNA y de enfermedades asociadas ha crecido de modo espectacular y ha generado lo que hoy se podría llamar como una "medicina mitocondrial".<sup>10,11</sup>

Se designa con el nombre de enfermedades mitocondriales a un grupo de trastornos cuya característica común es un defecto en la producción de ATP. Sin embargo, frecuentemente este término se aplica a trastornos producidos por daños en el sistema Oxphos, debido a que durante muchos años sólo se habían encontrado mutaciones en el mtDNA relacionados con los mismos. Hoy en día, se han comenzado a identificar genes nucleares codificantes de proteínas de los complejos del sistema Oxphos o responsables de su ensamblaje. En este trabajo nos limitaremos a describir las enfermedades debidas a daños en el sistema genético mitocondrial por ser las más conocidas y por presentar un modo de herencia muy particular.

### Caracteres específicos de la genética mitocondrial

El tipo de herencia del sistema genético mitocondrial, su localización en un organelo citoplasmático, la disposición continua de los genes sin nucleótidos intermedios ni intrones y la poliplasmia (alto número de copias en cada célula) proporcionan caracteres genéticos que los diferencian claramente de los del DNA nuclear. Cada célula contiene entre unas 1 000 y 10 000 copias de mtDNA dependiendo del tejido, pasando por unos cuantos cientos en los espermatozoides y hasta unas 100 000 en el oocito. Cada mitocondria contiene entre 2 y 10 moléculas.

*Herencia materna.* El mtDNA se hereda por vía materna con un patrón vertical no mendeliano. La madre transmite su genoma mitocondrial a todos sus hijos, pero solamente las hijas lo pasarán a todos los miembros de la siguiente generación y así sucesivamente. Esto se debe al elevado número de moléculas de mtDNA que existe en los óvulos (entre 100 000 y 200 000 copias) en comparación con unos pocos cientos que hay en los espermatozoides. Además, las mitocondrias

que puedan entrar en el óvulo fecundado se eliminan por un proceso activo.<sup>12</sup>

**Segregación mitótica.** El fenotipo de una línea celular puede variar durante la división celular debido a que las mitocondrias se distribuyen al azar entre las células hijas por lo que si en una célula coexisten dos poblaciones de mtDNA, una normal y otra mutada (heteroplasmia), a lo largo de las divisiones se podrán originar tres genotipos diferentes: homoplásmico para el DNA mitocondrial normal, homoplásmico para el DNA mutado y heteroplásmico. Por tanto, el fenotipo de una célula con heteroplasmia dependerá del porcentaje de DNA mutado que contenga. Si el número de moléculas de mtDNA dañado es relativamente bajo se produce una complementación con las moléculas de DNA normal y no se manifestará el defecto genético. Cuando el DNA mutado sobrepasa un umbral determinado se manifestará un fenotipo patogénico (efecto umbral), es decir, si la producción de ATP llega a estar por debajo de los mínimos necesarios para el funcionamiento de los tejidos, debido a la producción defectuosa de proteínas codificadas en el mtDNA, se produce la aparición de la enfermedad. El número de moléculas de DNA es diferente en cada órgano y tejido según la cantidad de energía requerida para su funcionamiento. Por ello, los tejidos que preferentemente se afectan son la visión, el sistema nervioso central, músculo esquelético, corazón, islotes pancreáticos, riñón e hígado.

**Alta velocidad de mutación.** El mtDNA presenta una tasa de mutación espontánea 10 veces superior a la del DNA nuclear. Este fenómeno puede estar causado porque en la mitocondria se producen continuamente radicales de oxígeno, como consecuencia de la oxidación final de los compuestos carbonados, que pueden dañar a un DNA que no está protegido por proteínas. Debido a este hecho, la variación de secuencias entre individuos de una misma especie es muy grande, hasta unos 70 nucleótidos,<sup>13</sup> y en un mismo individuo se estará generando, a lo largo de la vida, una pequeña heterogeneidad en el mtDNA. De este modo, se ha llegado a proponer que la disminución en la capacidad respiratoria de los tejidos que tiene lugar en el envejecimiento pueda ser debida a una acumulación de este daño mitocondrial.<sup>14</sup> Esta teoría tiene su primera evidencia en un trabajo del grupo de Attardi, que documenta que las mitocondrias se deterioran con la edad como consecuencia de la acumulación de mutaciones.<sup>15</sup> Las variaciones de secuencia existentes entre diferentes individuos han resultado muy útiles para estudios antropológicos, etnológicos y forenses, y es la base de la hipótesis de

que el hombre desciende de una mujer que vivió en África hace unos 250 000 años ("Eva mitocondrial").<sup>16</sup>

### Enfermedades genéticas del DNA mitocondrial

Las enfermedades originadas por daños en el genoma mitocondrial tienen en común el estar producidas por una deficiencia en la biosíntesis de ATP, ya que toda la información que contiene este DNA está dirigida a la síntesis de proteínas componentes del sistema Oxphos. Las manifestaciones de estas enfermedades son muy variadas y pueden afectar a todos los órganos y tejidos, ya que la síntesis de ATP se produce en todos ellos y a cualquier edad. Estas pueden presentar una serie de aspectos clínicos, morfológicos y bioquímicos muy concretos que dan lugar a síndromes bien caracterizados pero, en la mayor parte de los casos, principalmente en edad pediátrica, los síntomas son muy poco informativos y es sólo la presencia de anomalías neurológicas, a veces acompañadas de aumento de ácido láctico y de otros síntomas clínicos secundarios que afectan a diversos órganos, lo que da alguna orientación en el diagnóstico de una enfermedad mitocondrial.<sup>17</sup> Entre las manifestaciones clínicas más comunes se encuentran una o varias de las siguientes: desórdenes motores, accidentes cerebrovasculares, convulsiones, demencia, intolerancia al ejercicio, ptosis, oftalmoplejía, retinopatía pigmentaria, atrofia óptica, ceguera, sordera, cardiomiopatía, disfunciones hepáticas y pancreáticas, diabetes, defectos de crecimiento, anemia sideroblástica, pseudo obstrucción intestinal, nefropatías, acidosis metabólica y otras más secundarias.

La presencia de uno o más de estos síntomas requiere a continuación de un estudio morfológico, histoquímico y bioquímico para asegurar la naturaleza de estas enfermedades. Así, con mucha frecuencia se encuentran: fibras rojo-rasgadas (acumulación de mitocondrias anormales en tamaño y número) en biopsias musculares teñidas con tricromo de Gomori y fibras no reactivas a la tinción histoquímica de la citocromo c oxidasa; defectos en uno o varios complejos de la cadena respiratoria; y desarreglos metabólicos con elevación de lactato, piruvato o una aminoaciduria generalizada causados por una disfunción de la cadena respiratoria que conlleva un aumento de equivalentes reductores en la mitocondria y citoplasma, y una alteración del funcionamiento del ciclo de Krebs debido al exceso de NADH, lo que provoca una acumulación de piruvato y su posterior conversión a lactato que difunde a la sangre. Sin em-

bargo, la ausencia de algunos de estos caracteres no debe descartar la posibilidad de enfermedad mitocondrial, especialmente en pacientes en edad pediátrica. Además, los estudios familiares pueden ser decisivos si se comprueba la existencia de herencia materna de la enfermedad. El estudio genético del paciente y familiares relacionados por vía materna pueden asegurar finalmente que nos encontramos ante este tipo de trastornos. De hecho, hoy en día, el desarrollo y rapidez de las técnicas de genética molecular permiten, en ocasiones, una confirmación de la enfermedad antes de haber realizado muchas de las pruebas anteriormente citadas. La complejidad del diagnóstico de estas enfermedades hace preciso que los pacientes tengan que acudir a centros muy especializados donde se pueda llevar a cabo evaluaciones clínicas, metabólicas, patológicas, bioquímicas y genéticas, y a que en su diagnóstico estén implicados especialistas de muy diverso origen.

Desde que en 1988 se describieran las primeras enfermedades causadas por daños en el mtDNA,<sup>7-9</sup> se han encontrado más de 150 mutaciones (más 100 deleciones y unas 50 mutaciones puntuales) asociadas a enfermedades humanas. El interés por su estudio ha crecido enormemente debido al gran aumento de pacientes diagnosticados con estos trastornos y a que se presentan desde en recién nacidos hasta en adultos de todas las edades. Además, muchas de estas mutaciones se transmiten por línea materna, como se ha indicado anteriormente, lo que hace que el diagnóstico en un individuo pueda tener implicaciones en muchas generaciones de una familia.

A pesar de la importancia que las enfermedades mitocondriales tienen últimamente y de ser responsables de una considerable morbilidad, hasta ahora no se han realizado estudios exhaustivos sobre su prevalencia en la población general. Las razones son múltiples:<sup>18</sup> complejidad de las manifestaciones clínicas, necesidad de biopsias musculares para su diagnóstico (no siempre se pueden detectar las mutaciones en muestras de sangre); necesidad de secuenciar todo el genoma mitocondrial para poder localizar mutaciones no detectadas hasta ahora, problemas éticos para realizar análisis genéticos presintomáticos en niños, diagnóstico erróneo de muchos pacientes al no ser atendidos en centros especializados, etcétera. Sin embargo, a pesar de todas estas dificultades, el grupo del doctor Turnbull, en Newcastle, Reino Unido, ha publicado muy recientemente los primeros datos epidemiológicos de las enfermedades del mtDNA, centrados en la población blanca de Europa del Norte residente en el noreste de Inglaterra.<sup>18</sup> Así, ha mostrado que los defectos en el mtDNA

son la causa de enfermedad en 6.57 de cada 100 000 individuos de la población adulta trabajadora y que 7.59 por cada 100 000 adultos y niños no afectados corren el riesgo de desarrollar una de estas enfermedades. En total, 12.48 por 100 000 individuos (1 de cada 8 000) tienen o presentan un riesgo de padecer una enfermedad causada por daños en el mtDNA. Estos datos representan un mínimo de prevalencia porque, muy probablemente, el número de pacientes que han quedado sin diagnosticar es elevado por haber sido atendidos por médicos de asistencia primaria, y no en clínicas neurológicas, y que hayan podido pasar desapercibidos por presentar solamente algunos de los síntomas acompañantes de estas enfermedades como diabetes o ptosis.

Los datos obtenidos por el grupo de Newcastle han permitido comprobar que la prevalencia de las enfermedades debidas a daños en el mtDNA, consideradas en su conjunto, es equivalente a la de otras enfermedades neurológicas como la enfermedad de Huntington y la esclerosis amiotrófica lateral (6.4 y 6.2 por cada 100 000 individuos, respectivamente), y superior a la de otras enfermedades neuromusculares hereditarias como la distrofia de Duchenne (3.2 por cada 100 000 individuos).<sup>18</sup>

La experiencia de nuestro servicio de diagnóstico en la Universidad de Zaragoza es que un 16% de los pacientes remitidos para el estudio genético presentan una deleción o mutación puntual.<sup>19,20,\*</sup> No hemos realizado ningún estudio de lo que este número representa entre la población general española; pero, seguro que tanto en el estudio realizado en Inglaterra como en nuestro laboratorio, el número de pacientes será muy superior cuando se secuencie el mtDNA de todos los posibles implicados y se detecten nuevas mutaciones. Estos números, junto al hecho de que no exista una terapia eficaz, y que, aunque algunas de estas enfermedades puedan mejorar o estabilizarse a lo largo de su curso, ilustran la importancia que tienen en relación con la salud pública, particularmente en cuanto a su atención y consejo genético, pues la mayoría tiene un desenlace fatal.

La heterogeneidad de las manifestaciones clínicas, morfológicas y bioquímicas de las enfermedades del mtDNA, hace que su clasificación se base muy frecuentemente en las características genéticas de las mutaciones, a pesar de que, en algunos casos, una misma mutación pueda dar lugar a fenotipos clínicos muy diversos. Así, las enfermedades del mtDNA

\* Solano A. Enfermedades del mtDNA (tesis doctoral). Zaragoza: Universidad de Zaragoza. En realización, 2000.

se pueden dividir en tres grandes grupos según estén asociadas a mutaciones puntuales, a reorganizaciones o a disminución de número de copias del mtDNA. En la severidad de la manifestación de la enfermedad intervienen varios factores: la naturaleza de la mutación, el grado de heteroplasmia, los requerimientos energéticos del tejido y la capacidad del tejido para compensar el daño celular. A continuación se presenta un resumen de las enfermedades más comunes asociadas a estos tipos de mutaciones.

#### *Enfermedades asociadas a mutaciones puntuales en el mtDNA*

Dado el alto índice de mutación del mtDNA, como se ha indicado anteriormente, es posible encontrar un gran número de mutaciones puntuales. Sin embargo, la mayoría son mutaciones silenciosas que no causan ningún tipo de defecto. Las mutaciones patológicas se pueden encontrar tanto en los genes de tRNA, de rRNA, como en los codificantes de proteínas, y responden siempre a un tipo de herencia materna.

*Neuropatía óptica hereditaria de Leber.* La neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON) se caracteriza por la pérdida bilateral de la visión central, originada por atrofia del nervio óptico. Aparece en la segunda o tercera década de la vida y afecta a más hombres que a mujeres. Aunque normalmente sólo la visión está afectada, hay casos en los que también aparecen trastornos en la conducción cardíaca, neuropatía periférica y ataxia cerebelar.

Esta fue la primera enfermedad humana de herencia materna que se asoció a una mutación en el mtDNA. Después se llegó a asociar hasta con 16 mutaciones puntuales (cuadro I), localizadas todas ellas en genes codificantes de proteínas, y que se clasificaron en primarias, secundarias o intermedias según su relación con la aparición de la enfermedad. Sin embargo, últimamente sólo tres, G3 460A, G11 778A y T14 484C, están consideradas como primarias o patogénicas verdaderas, siendo la G11 778A la responsable en 50% de los casos y la que provoca la forma más severa de la enfermedad. Las tres se encuentran en genes que codifican algún polipéptido del complejo I del sistema Oxphos. La detección de estas mutaciones se suele hacer en células sanguíneas donde se encuentran tanto en forma homo como heteroplásmica. El resto de las mutaciones se consideran como secundarias, suelen acompañar a las anteriores en forma homoplásmica y se desconoce su relación directa con la enfermedad. Entre estas últimas vale la pena mencionar que la mutación G15257A, consi-

derada como intermedia por algunos autores, se ha encontrado en varias familias analizadas en nuestro laboratorio por lo que pensamos que puede contribuir de forma decisiva a la aparición de la enfermedad.

La prevalencia de la enfermedad en hombres ha sugerido la influencia de un gen nuclear, y aunque se ha descrito un ligamiento de la enfermedad con el *locus* (DXS7) situado en el cromosoma X en familias finlandesas,<sup>21</sup> no se ha podido confirmar en familias de otro origen.

*Síndrome de neuropatía, ataxia y retinopatía pigmentaria.* Este síndrome está caracterizado por debilidad muscular neurogénica, ataxia y retinitis pigmentosa. Suele ir acompañado de demencia, convulsiones y neuropatía sensorial axonal, presenta una herencia materna y se ha asociado a una mutación puntual, T8993G, en el gen de la subunidad 6 de la ATPasa (cuadro I). La mutación aparece normalmente en forma heteroplásmica y en todos los tejidos estudiados: leucocitos, fibroblastos, músculo, riñón y cerebro. Existe una alta correlación entre la proporción del DNA mutado y la severidad de la enfermedad.

*Síndrome de Leigh de herencia materna.* El síndrome de Leigh de herencia materna (MILS) es una enfermedad muy heterogénea que se puede presentar asociada a diferentes tipos de herencia, autosómica recesiva, ligada al cromosoma X o materna (mitocondrial) según el gen que esté dañado. Es una enfermedad devastadora que se caracteriza por trastornos degenerativos multisistémicos que aparecen en el primer año de vida, disfunciones del tallo cerebral y de los ganglios basales, desmielinización, regresión psicomotora, retraso en el desarrollo, ataxia, convulsiones, neuropatía periférica. El diagnóstico se confirma por la presencia de lesiones necróticas cerebrales focales en el tálamo, tallo cerebral y núcleo dentado. La forma de la enfermedad, que se hereda por vía materna, está producida por la mutación en el gen de la subunidad 6 de la ATPasa, T8993G, la misma que produce el síndrome de neuropatía, ataxia y retinopatía pigmentaria, pero con un porcentaje de la mutación superior a 90%. Otras formas menos severas de esta enfermedad se han asociado con un cambio TØC\* en la misma posición del mtDNA.

*Síndrome de epilepsia mioclónica con fibras rojo-rasgadas (MERRF).* Este síndrome de herencia materna, está caracterizado por epilepsia mioclónica, convulsiones generalizadas y miopatía con presencia de fibras rojo-rasgadas. Otros síntomas clínicos que pueden acompañar a los anteriores son demencia, sordera, neuropatía,

\* Timina por citosina.

atrofia óptica, fallo respiratorio y cardiomiopatía. Aparece tanto en la infancia como en edad adulta y es de curso progresivo. Está asociado a la presencia de mutaciones en el gen del mtDNA para el tRNA<sup>Lys</sup>. En la mayoría de los casos (80%-90%) se debe a una mutación A8344G, pero también se han encontrado otras mi-

noritarias como T8356C (cuadro I), todas en forma heteroplásmica. El porcentaje de heteroplasmia necesario para la afectación varía entre individuos jóvenes (95%) e individuos por encima de los 60-70 años (60%) del DNA mutado.<sup>13</sup> La presencia de estas mutaciones en tRNA daña la síntesis de proteínas.

**Cuadro I**  
**MUTACIONES EN EL mtDNA Y ENFERMEDADES ASOCIADAS**

<i>Enfermedad</i>	<i>Mutación en el mtDNA</i>	<i>Gen afectado</i>	<i>Referencias</i>	<i>Enfermedad</i>	<i>Mutación en el mtDNA</i>	<i>Gen afectado</i>	<i>Referencias</i>
LHON				Miopatía mitocondrial	T3250C	tRNA <sup>Leu(uur)</sup>	53
Mutaciones primarias	G3460A	ND1	22,23		A3302G	tRNA <sup>Leu(uur)</sup>	54
	G11778A	ND4	7		C15990T	tRNA <sup>Pro</sup>	55
	T14484C	ND6	24	Sordera inducida por aminoglicósidos	A1555G	12S rRNA	56
Mutaciones intermedias	G5244A	ND2	25	Sordera sensorial	T7445C	tRNA <sup>Ser(ucn)</sup>	57
	G15257A	Citocromo b	25	Anemia sideroblástica	G12301A	tRNA <sup>Leu(cun)</sup>	58
Mutaciones secundarias	T3394C	ND1	24	Lipomatosis múltiple simétrica	A8344G	tRNA <sup>Lys</sup>	59
	T4160C	ND1	26	CPEO	Delección única		60
	T4216C	ND1	27		A3243G	tRNA <sup>Leu(uur)</sup>	61
	A4917G	ND2	27		A5692G	tRNA <sup>Asn</sup>	62
	G7444A	CO I	28		G5703A	tRNA <sup>Asn</sup>	63
	T9101C	ATPasa 6	29		C3256T	tRNA <sup>Leu(uur)</sup>	63
	G9438A	CO III	30	Intolerancia al ejercicio	G15084A	Citocromo b	64
	G9804A	CO III	30		G15168A	Citocromo b	64
	G13708A	ND5	27		G15723A	Citocromo b	64
	G13730A	ND5	31		G14846A	Citocromo b	64
	G14459A	ND6	32		delección de 24pb	Citocromo b	64
	G15812A	cyt b	25	LIMM	A15923G	tRNA <sup>Thr</sup>	65
NARP	T8993G	ATPasa 6	33	Muerte súbita	A3251G	tRNA <sup>Leu(uur)</sup>	66
Leigh (MILS)	T8993G	ATPasa 6	34,35	Necrosis bilateral del estriado	T9176C	ATPase 6	67
	T8993C	ATPasa 6	36		T8851C	ATPase 6	68
MELAS	A3243G	tRNA <sup>Leu(uur)</sup>	37	Multisistémicas	A3251G	tRNA <sup>Leu(uur)</sup>	66
	C3256T	tRNA <sup>Leu(uur)</sup>	38		A3252G	tRNA <sup>Leu(uur)</sup>	69
	T3271C	tRNA <sup>Leu(uur)</sup>	39		C3256T	tRNA <sup>Leu(uur)</sup>	63
	T3291C	tRNA <sup>Leu(uur)</sup>	40	Corea y demencia	G5549A	tRNA <sup>Trp</sup>	70
	T9957C	COIII	41	LHON y distonía	G14459A	ND6	32
MERRF	A8344G	tRNA <sup>Lys</sup>	42	Diabetes y miopatía	T14709C	ND6	71
	T8356C	tRNA <sup>Lys</sup>	43	Pearson	Delección única		72
Diabetes y sordera	A3243G	tRNA <sup>Leu(uur)</sup>	44	Kearns-Sayre	Delección única		73
Cardiomiopatía (MICM)	A3260G	tRNA <sup>Leu(uur)</sup>	45				
	C3303T	tRNA <sup>Leu(uur)</sup>	46				
	A4269G	tRNA <sup>Ile</sup>	47				
	A4300G	tRNA <sup>Ile</sup>	48				
	A4317G	tRNA <sup>Ile</sup>	49				
	C4320T	tRNA <sup>Ile</sup>	50				
	G8363A	tRNA <sup>Lys</sup>	51				
	T9997C	tRNA <sup>Gly</sup>	52				

LIMM: miopatía mitocondrial infantil letal; LHON: neuropatía óptica hereditaria de Leber; MELAS: encefalomiopatía mitocondrial con acidosis láctica y episodios de accidentes cerebrovasculares; MERRF: epilepsia mioclónica con fibras rojo-rasgadas; MICM: Cardiomiopatía de herencia materna; MILS: síndrome de Leigh de herencia materna; PEO: oftalmoplejía progresiva externa

*Síndrome de encefalomiopatía mitocondrial con acidosis láctica y episodios de accidentes cerebro-vasculares (MELAS).* Se trata de una encefalomiopatía mitocondrial, de herencia materna, caracterizada por accidentes cerebrovasculares producidos a edad temprana que provocan una disfunción cerebral subaguda y cambios en la estructura cerebral, y por acidosis láctica. Estos caracteres suelen ir acompañados de convulsiones generalizadas, dolor de cabeza, sordera, demencia y, a veces, presenta fibras rojo-rasgadas.

Esta enfermedad ha sido asociada fundamentalmente con mutaciones en el gen del tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> del mtDNA. La mayor parte de los casos (80%) está asociada a la mutación A3.243G, pero también se han encontrado otras con menor incidencia y alguna en genes codificantes de proteínas (cuadro I), todas en forma heteroplásmica. Al igual que en la epilepsia mioclónica, las mutaciones en el tRNA dañan la síntesis de proteínas mitocondriales.

*Diabetes de herencia materna con sordera.* Además de los dos tipos clásicos de diabetes dependiente y no dependiente de insulina (tipo 1 y 2, respectivamente), se ha descrito recientemente un nuevo tipo de diabetes asociada a sordera, que no encuadra dentro de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud. Esta diabetes, de herencia materna, está producida por la mutación A3.243G en el gen del tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> (cuadro I), la misma descrita para el síndrome de (MELAS). La frecuencia de diabetes y sordera es aproximadamente de un 1.5% de la población diabética total.<sup>74</sup> Por otra parte, la diabetes es una de las enfermedades que se han descrito asociadas a otros síndromes mitocondriales como la encefalomiopatía mitocondrial, oftalmoplejia progresiva externa crónica, Kearns-Sayre, Pearson y diabetes insípida, diabetes mellitus, atrofia óptica y sordera (DIDMOAD).

#### *Otras enfermedades del mtDNA asociadas a mutaciones puntuales*

Además de las enfermedades descritas anteriormente, hay otras muchas que se han asociado a otras mutaciones puntuales (cuadro I). Entre ellas, se pueden citar las cardiomiopatías de herencia materna relacionadas fundamentalmente con mutaciones en el tRNA<sup>Ile</sup>: la sordera inducida por aminoglicósidos que está producida por una mutación en el rRNA 12S (A1555G), y otros tipos de sordera sindrómica o no sindrómica de herencia materna; LHON y distonía; miopatías de herencia materna unidas a mutaciones en tRNA<sup>Leu</sup>, tRNA<sup>Pro</sup>, tRNA<sup>Asn</sup>, tRNA<sup>Tyr</sup>; oftalmoplejia progresiva externa crónica; anemia sideroblástica; deficiencia fatal de la cadena respiratoria infantil; lipomatosis si-

métrica múltiple asociada a la mutación A8.344G del gen del tRNA<sup>Lys</sup> (descrita en nuestro laboratorio) y, recientemente, se ha relacionado la intolerancia al ejercicio, como entidad propia, a mutaciones puntuales en el gen del citocromo b. Así, se han descrito mutaciones en este gen que crean un codón de terminación, que cambian un aminoácido o, incluso, una delección de 24 pares de bases. En el cuadro I se citan éstos y otros síndromes que se han asociado a mutaciones puntuales y, sin ninguna duda, el espectro de fenotipos relacionados con mutaciones en el mtDNA aumentará más en un futuro. Asimismo, cabe mencionar que alguna de las mutaciones, como la A3.243G, puede estar relacionada con muy diversos fenotipos clínicos como síndromes de encefalopatía mitocondrial con acidosis láctica y episodios de accidentes cerebrovasculares de epilepsia mioclónica con fibras rojo-rasgadas y solapados, cardiomiopatías, CPEO, etcétera. Actualmente, se estudia la posible implicación del mtDNA en enfermedades neurodegenerativas como Parkinson y Alzheimer.

#### *Enfermedades asociadas a reorganizaciones en el DNA mitocondrial*

Además de las mutaciones puntuales, el mtDNA puede sufrir otro tipo de daños como son la pérdida de parte del mismo (delecciones) o la adición de un nuevo fragmento del DNA (duplicaciones), que, como en los casos anteriores, afectan a la biogénesis del sistema Oxphos y, por tanto, a la síntesis de ATP. En la actualidad hay descritos más de 100 tipos de delecciones y sólo unos cuantos casos de inserciones. Este tipo de mutaciones suelen ser espontáneas, probablemente causadas por daños en genes nucleares que controlan la replicación del mtDNA, aunque hay descritos casos de herencia materna.<sup>75</sup> Se presentan siempre en forma heteroplásmica, ya que la homoplasmia sería incompatible con la vida, y se sabe que la gravedad de los casos aumenta con la edad debido a la ventaja replicativa de estas moléculas de DNA más pequeñas en relación con la de tamaño normal.

Los tres tipos de síndromes más comunes en los que se presentan delecciones son los de Pearson, oftalmoplejia progresiva externa crónica y Kearns-Sayre.

*Síndrome de médula ósea-páncreas de Pearson.* Es una enfermedad que aparece en los primeros años de vida y que afecta a la hematopoyesis y a la función pancreática exocrina. Las características clínicas más comunes son anemia sideroblástica con vacuolización de precursores de la médula ósea que se manifiesta con una anemia macrocítica, trombocitopenia y neutropenia.

Los niños afectados suelen morir antes de los tres años de edad y los que sobreviven suelen desarrollar posteriormente el fenotipo de Kearns-Sayre, que veremos más adelante. Estos pacientes presentan deleciones grandes únicas del mtDNA, en general son esporádicas aunque se ha descrito algún caso de herencia materna.

*Oftalmoplejia progresiva externa crónica.* Esta enfermedad está caracterizada por oftalmoplejia, ptosis bilateral de los párpados y miopatía. Suele ir acompañada también de intolerancia al ejercicio y debilidad muscular. En el músculo se encuentran fibras rojo-rasgadas COX negativas. En general, es una enfermedad benigna que suele aparecer en la adolescencia o en adultos jóvenes. Aparece de forma esporádica sin historia familiar. Se ha asociado fundamentalmente a deleciones grandes y únicas en el mtDNA (ver más adelante). Asimismo, se han encontrado otras formas de CPEO con mutaciones puntuales de herencia materna (cuadro I) o con deleciones múltiples de herencia autosómica recesiva o dominante.

*Síndrome de Kearns-Sayre.* Este síndrome es, por otra parte, una enfermedad multisistémica progresiva caracterizada clínicamente por CPEO, retinopatía pigmentaria atípica, ataxia, miopatía mitocondrial, bloqueo de la conducción cardíaca, elevados niveles de proteína CSF (fluido cerebro espinal, por sus siglas en inglés), sordera y demencia. Aparece antes de los 20 años de edad.

Estas tres enfermedades están causadas por deleciones (de 2 a 9 kb) en el mtDNA que suelen aparecer de forma espontánea. En general, la deleción es única, pero también se han descrito casos de deleciones múltiples. La gravedad de la enfermedad depende del porcentaje de DNA mutado en el individuo. En general están localizadas en el arco grande comprendido entre los orígenes de replicación del DNA y mantienen siempre las secuencias requeridas para la replicación del DNA y los promotores de la transcripción. Entre todas las deleciones conocidas, hay una que aparece con más frecuencia (hasta en 50%), la llamada deleción común, que elimina un tramo de DNA de 4 977 pares de bases (entre los nucleótidos 8 483 a 13 460), que comprende los genes localizados entre la subunidad 8 de la ATPasa y ND5 (figura 1). No existe una clara relación entre el fenotipo y el tipo, tamaño o porcentaje del DNA delecionado ya que la misma deleción puede dar lugar a varios fenotipos diferentes. La mayor parte de las deleciones encontradas están flanqueadas por repeticiones directas de longitud variable (3-13 nt). Este hecho sugiere que la deleción se produce por errores sucedidos en el proceso de replica-

ción dependientes de la presencia de estas repeticiones. La pérdida de genes, especialmente la de los tRNA, hace que estos genomas no se puedan traducir y, por tanto, que sean dependientes de complementación con moléculas de mtDNA normales en la misma mitocondria. El umbral se suele alcanzar cuando el porcentaje de moléculas delecionadas supera 60%.

Existen otras enfermedades como una diabetes con sordera y atrofia óptica; miopatías en general; el síndrome de encefalomiopatía mitocondrial neurogastrointestinal; el de diabetes mellitus, diabetes insípida, atrofia óptica y sordera, etcétera, que están asociadas a la presencia de deleciones en el mtDNA.

Como se ha mencionado anteriormente, entre las reorganizaciones del mtDNA se pueden encontrar duplicaciones en pacientes con defectos en el sistema Oxphos. Estas pueden ser también esporádicas o de herencia materna. Se han encontrado en pacientes de Kearns-Sayre, Pearson, diabetes mellitus, tubulopatía renal y miopatía mitocondrial e incluso en individuos normales. El mecanismo por el cual pueden causar la patogenicidad no está nada claro todavía.

#### *Enfermedades asociadas a depleciones de DNA mitocondrial*

El tercer tipo de daños en el genoma mitocondrial que puede causar enfermedades no se debe a mutaciones propiamente dichas sino a una disminución de los niveles del mtDNA. El espectro clínico que produce la depleción es muy variado. Los casos descritos hasta ahora afectan fundamentalmente a niños con combinaciones variables de miopatía, nefropatía o hepatopatía, miopatía infantil fatal por fallo respiratorio y algún otro con implicación multisistémica. La depleción puede estar producida por mutaciones en genes nucleares que controlan el número de copias del mtDNA. Es, por tanto, un trastorno de herencia mendeliana que afecta a la coordinación núcleo-mitocondria, y que parece ser autosómico recesivo.

#### **Regreso a la genética mendeliana**

Debido al doble origen genético nuclear y mitocondrial del sistema Oxphos las enfermedades genéticas mitocondriales pueden estar originadas, además de por mutaciones en genes del mtDNA con herencia materna, como ya hemos visto, por mutaciones en genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales, por mutaciones que afecten al procesamiento postraducciona, al importe de proteínas por la mitocondria y al ensamblaje de los complejos, y por mutaciones que afecten al control nuclear del genoma

mitocondrial, todas ellas con un tipo de herencia mendeliana.

El primer caso ha sido hasta ahora el más estudiado por estar el genoma mitocondrial completamente secuenciado y, por tanto, por la facilidad de encontrar mutaciones que afecten a los genes que codifica. Sin embargo, la mayor parte de los genes que componen el sistema Oxphos es de origen nuclear y cabe esperar que la mayoría de las enfermedades causadas por la deficiencia de este sistema sean debidas a mutaciones en el DNA nuclear. Así, por ejemplo, a pesar de que una de las causas del síndrome de Leigh sea una mutación en el mtDNA de herencia materna, se sabe que se transmite con más frecuencia por herencia autosómica recesiva, y se han encontrado e identificado mutaciones en genes de subunidades del complejo I, codificadas por el DNA nuclear<sup>76,77</sup> y en el complejo II,<sup>78</sup> codificado enteramente en el núcleo. Asimismo, se han localizado mutaciones en un gen nuclear (SURF 1) que codifica una proteína que, aunque no forma parte del complejo IV, es necesaria para su ensamblaje.<sup>79,80</sup>

Además, en la mitocondria existen muchas otras rutas metabólicas en las que no participa para nada el mtDNA y cuya deficiencia puede causar encefalomiopatías mitocondriales. Por todo ello, la genética mendeliana de las enfermedades mitocondriales está todavía prácticamente por descubrir y nos proporcionará mucha información sobre estos trastornos.

## Referencias

- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de-Brujin MHL, Coulson AR, Drouin J *et al*. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981;290:427-465.
- Chomyn A, Mariottini P, Cleeter MWJ, Ragan CI, Doolittle RF, Matsuno-Yagi A *et al*. Functional assignment of the products of the unidentified reading frames of human mitochondrial DNA. En: Quagliariello E, Slater EC, Plamieri F, Saccone C, Kroon AM, ed. Amsterdam: Elsevier Sciences, 1985:259-275.
- Montoya J, Ojala D, Attardi G. Distinctive features of the 5'-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs. *Nature* 1981; 290: 465-470.
- Ojala D, Montoya J, Attardi G. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature* 1981; 290:470-474.
- Montoya J, Christianson T, Levens D, Rabinowitz M, Attardi G. Identification of initiation sites for heavy strand and light strand transcription in human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79:7195-7199.
- Montoya J, Gaines GL, Attardi G. The pattern of transcription of the human mitochondrial rRNA genes reveals two overlapping transcription units. *Cell* 1983; 34:151-159.
- Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AMS *et al*. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 1988; 242:1427-1430.
- Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 1988; 331:717-719.
- Zeviani M, Moraes CT, DiMauro S, Nakase H, Bonilla E, Schon E *et al*. Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology* 1988; 38:1339-1346.
- DiMauro S, Bonilla E. Mitochondrial encephalomyopathies. En: Rosenberg RN, Prusiner SB, DiMauro S, Barchi RL, ed. Boston: Butterworth-Heinemann, 1998:201-235.
- Wallace DC. Mitochondrial DNA mutations and bioenergetic defects in aging and degenerative diseases. En: Rosenberg RN, Prusiner SB, DiMauro S, Barchi RL, ed. Boston: Butterworth-Heinemann, 1998:237-269.
- Sutovsky P, Moreno RD, Schatten G. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature* 1999; 402:371.
- Wallace DC. Diseases of the mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem* 1992; 61:1175-1212.
- Miquel J. An update of the oxygen stress-mitochondrial mutation theory of aging: Genetic and evolutionary implications. *Exp Gerontol* 1998; 33:113-126.
- Michikawa Y, Mazzucchelli F, Bresolin N, Scarlato G, Attardi G. Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication. *Science* 1999; 286:774-779.
- Cann RL, Stoneking M, Wilson AC. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 1987; 325:31-36.
- Munnich A, Rotig A, Chretien D, Cormier V, Bourgeron T, Bonnefont JP *et al*. Clinical presentation of mitochondrial disorders in childhood. *J Inherited Metab Dis* 1996;19:521-527.
- Chinnery PF, Johnson MA, Wardell TM, Singh Kler R, Hayes C, Brown DT *et al*. The epidemiology of pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Ann Neurol* 2000; 48:188-193.
- Beltrán B. Análisis molecular de enfermedades del DNA mitocondrial: aplicación al diagnóstico (tesis doctoral). Zaragoza: Universidad de Zaragoza, 1995.
- Playán A. Diagnóstico molecular de enfermedades del DNA mitocondrial (tesis Doctoral). Zaragoza: Universidad de Zaragoza, 1999.
- Vilki J, Ott J, Savontaus ML, Aula P, Nikoskelainen EK. Optic atrophy in Leber hereditary optic neuropathy is probably determined by an X-chromosomal gene closely linked to DXS7. *Am J Hum Genet* 1991; 48:486-491.
- Howell N, Bindoff LA, McCullough DA, Kubacka I, Poulton J, Mackey D *et al*. Leber hereditary optic neuropathy: Identification of the same mitochondrial NDI mutation in six pedigrees. *Am J Hum Genet* 1991;49: 939-950.
- Houponen K, Vilki J, Aula P, Nikoskelainen EK, Savontaus ML. A new mitochondrial DNA mutation associated with Leber hereditary optic neuropathy. *Am J Hum Genet* 1991; 48:1147-1153.
- Johns DR, Neufeld MJ, Park RD. An ND-6 mitochondrial DNA mutation associated with Leber hereditary optic neuropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 187:1551-1557.
- Brown MD, Voljavec AS, Lott MT, Torrini A, Yang CC, Wallace DC. Mitochondrial DNA complex I and III mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Genetics* 1992; 130:163-173.
- Howell N, Kubacka I, Xu M, McCullough DA. Leber hereditary optic neuropathy: Involvement of the mitochondrial NDI gene and evidence for an intragenic suppressor mutation. *Am J Hum Genet* 1991; 48:935-942.
- Johns DR, Berman J. Alternative, simultaneous complex I mitochondrial DNA mutations in Leber's hereditary optic neuropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 174:1324-1330.
- Brown MD, Yang C, Trounce I, Torrini A, Lott MT, Wallace DC. A mitochondrial DNA variant, identified in Leber hereditary optic neuropathy patients, which extends the amino acid sequence of cytochrome c oxidase subunit 1. *Am J Hum Genet* 1992; 51:378-385.
- Lamminen T, Majander A, Juvonen V, Wikstrom M, Aula P, Nikoskelainen E *et al*. A mitochondrial mutation at nt 9101 in the ATP synthase 6 gene

- associated with deficient oxidative phosphorylation in a family with Leber hereditary optic neuroretinopathy. *Am J Hum Genet* 1995; 56:1238-1240.
30. Johns DR, Neufeld MJ. Cytochrome-c oxidase mutations in Leber hereditary optic neuropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;196: 810-815.
31. Howell N, Halvorson S, Burns J, McCullough DA, Poulton J. When does bilateral optical atrophy become Leber hereditary optic neuropathy? *Am J Hum Genet* 1994; 53:959-963.
32. Jun AS, Brown MD, Wallace DC. A mitochondrial DNA mutation at nucleotide pair 14459 of the NADH dehydrogenase subunit 6 gene associated with maternally inherited Leber hereditary optic neuropathy and dystonia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:6206-6210.
33. Holt IJ, Harding AE, Petty RKH, Morgan-Hughes JA. A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am J Hum Genet* 1990; 46:428-433.
34. Santorelli FM, Shanske S, Macaya A, Devivo DC, Dimauro S. The mutation at Nt 8993 of mitochondrial DNA is a common cause of Leighs syndrome. *Ann Neurol* 1993; 34:827-834.
35. Tatuch Y, Robinson BH. The Mitochondrial DNA Mutation at 8993 Associated with NARP Slows the rate of ATP synthesis in isolated lymphoblast mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 192:124-128.
36. Devries DD, Vanengelen BGM, Gabreels FJM, Ruitenbeek W, Vanoot BA. A 2nd missense mutation in the mitochondrial ATPase-6 gene in Leigh's syndrome. *Ann Neurol* 1993; 34:410-412.
37. Goto YI, Nonaka I, Horai S. A mutation in the tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalopathies. *Nature* 1990; 348:651-653.
38. Sato W, Hayasaka K, Shoji Y, Takahashi T, Takada G, Saito M *et al.* A mitochondrial tRNA(Leu) mutation at 3 256 associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS). *Biochem Mol Biol Int* 1994; 33:1055-1061.
39. Goto YI, Nonaka I, Horai S. A new mtDNA mutation associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS). *Biochim Biophys Acta* 1991; 1097:238-240.
40. Goto YI, Tsugane K, Tanabe Y, Nonaka I, Horai S. A new point mutation at nucleotide pair 3291 of the mitochondrial tRNA(Leu<sup>UUR</sup>) gene in a patient with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS). *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 202:1624-1630.
41. Manfredi G, Schon EA, Moraes CT, Bonilla E, Berry GT, Sladky JT *et al.* A new mutation associated with MELAS is located in a mitochondrial DNA polypeptide-coding gene. *Neuromuscular Disord* 1995; 5:391-398.
42. Shoffner JM, Lott MT, Lezza AMS, Seibel P, Ballinger SW, Wallace DC. Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA<sup>Lys</sup> mutation. *Cell* 1990; 61:931-937.
43. Silvestri G, Moraes CT, Shanske S, Oh SJ, DiMauro S. A new mtDNA mutation in the trans-RNA(Lys) gene associated with myoclonic epilepsy and ragged-red fibers (MERRF). *Am J Hum Genet* 1992; 51:1213-1217.
44. Van den Ouweland JMW, Lemkes HHPJ, Gerbitz KD, Maassen JA. Maternally inherited diabetes and deafness (MIDD): A distinct subtype of diabetes associated with mitochondrial tRNA (Leu<sup>UUR</sup>) gene point mutation. *Muscle & Nerve* 1995; S3:S124-S130.
45. Zeviani M, Gellera C, Antozzi C, Rimoldi M, Morandi L, Villani F *et al.* Maternal inherited myopathy and cardiomyopathy: Association with mutation in mitochondrial DNA tRNA (Leu<sup>UUR</sup>). *Lancet* 1991; 338:143-147.
46. Silvestri G, Santorelli FM, Shanske S, Whitley CB, Schimmenti LA, Smith SA *et al.* A new mtDNA mutation in the tRNA(Leu<sup>UUR</sup>) gene associated with maternally inherited cardiomyopathy. *Hum Mutat* 1994; 3:37-43.
47. Taniike M, Fukushima H, Yanagihara I, Tsukamoto H, Tanaka J. Mitochondrial tRNA<sup>Leu</sup> mutation in fatal cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 186:47-53.
48. Casali C, Santorelli FM, Damati G, Bernucci P, Debiase L, DiMauro S. A novel mtDNA point mutation in maternally inherited cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 213:588-593.
49. Tanaka M, Ino H, Ohno K, Hattoti K, Sato W, Ozawa T *et al.* Mitochondrial mutation in fatal infantile cardiomyopathy. *Lancet* 1990;336:1452.
50. Santorelli FM, Mak SC, Vazquezacevedo M, Gonzalezastiazaran A, Ridaurasanz C, Gonzalezhalphen D *et al.* A novel mitochondrial DNA point mutation associated with mitochondrial encephalocardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 216:835-840.
51. Santorelli FM, Mak SC, Elschahawi M, Casali C, Shanske S, Baram TZ *et al.* Maternally inherited cardiomyopathy and hearing loss associated with a novel mutation in the mitochondrial tRNA(Lys) gene (G8363A). *Am J Hum Genet* 1996; 58:933-939.
52. Merante F, Tein I, Benson L, Robinson BH. Maternally inherited hypertrophic cardiomyopathy due to a novel T-to-C transition at nucleotide 9997 in the mitochondrial tRNA(glycine) gene. *Am J Hum Genet* 1994; 55:437-446.
53. Goto YI, Horai S, Matsuoka T, Yoga Y, Nihei K, Kobayashi M *et al.* Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS): A correlative study of the clinical features and mitochondrial DNA mutation. *Neurology* 1992; 42:545-550.
54. Bindoff LA, Howell N, Poulton J, McCullough DA, Morten KJ, Lightowlers RN *et al.* Abnormal RNA processing associated with a novel transfer RNA mutation in mitochondrial DNA - A potential disease mechanism. *J Biol Chem* 1993; 268:19559-19564.
55. Moraes CT, Ciacci F, Bonilla E, Ionasescu V, Schon EA, Dimauro S. A mitochondrial transfer RNA anticodon swap associated with a muscle disease. *Nat Genet* 1993; 4:284-288.
56. Prezant TR, Agopian JV, Bohlman MC, Bu XD, Oztas S, Qiu WQ *et al.* Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat Genet* 1993; 4:289-294.
57. Reid FM, Vernham GA, Jacobs HT. A novel mitochondrial point mutation in a maternal pedigree with sensorineural deafness. *Hum Mutat* 1994; 3:243-247.
58. Gattermann N, Retzlaff S, Wang YL, Berneburg M, Heinisch J, Wlaschek M *et al.* A heteroplasmic point mutation of mitochondrial tRNA(Leu)<sup>(CUN)</sup> in non-lymphoid haemopoietic cell lineages from a patient with acquired idiopathic sideroblastic anaemia. *Br J Haematol* 1996; 93:845-855.
59. Gamez J, Playán A, Andreu AL, Bruno C, Navarro C, Cervera C *et al.* Familial multiple symmetric lipomatosis associated with the A8344G mutation of mitochondrial DNA. *Neurology* 1998; 51:258-260.
60. Moraes CT, DiMauro S, Zeviani M, Lombes A, Shanske S, Miranda AF. Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *N Engl J Med* 1989; 320:1293-1299.
61. Hammans SR, Sweeney MG, Hanna MG, Brockington M, Morganhughes JA, Harding AE. The mitochondrial DNA transfer RNA(Leu<sup>UUR</sup>) A->G(3243) mutation-A clinical and genetic study. *Brain* 1995; 118:721-734.
62. Seibel P, Lauber J, Klopstock T, Marsac C, Kadenbach B, Reichmann H. Chronic progressive external ophthalmoplegia is associated with a novel mutation in the mitochondrial tRNA(Asn) gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 204:482-489.
63. Moraes CT, Ciacci F, Bonilla E, Jansen C, Hirano M, Rao N *et al.* Two novel pathogenic mitochondrial DNA mutations affecting organelle number and protein synthesis-Is the transfer RNA(Leu<sup>UUR</sup>) gene an etiologic hot spot? *J Clin Invest* 1993; 92:2906-2915.
64. Andreu AL, Hanna MG, Reichmann H, Bruno C, Penn AS, Tanji K *et al.* Exercise intolerance due to mutations in the cytochrome b gene of mitochondrial DNA. *N Engl J Med* 1999; 341:1037-1044.
65. Yoon KL, Aprile JR, Ernst SG. Mitochondrial tRNA<sup>Thr</sup> mutation in fatal infantile respiratory enzyme deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 176:1112-1115.

66. Sweeney MG, Bunday S, Brockington M, Poulton KR, Winer JB, Harding AE. Mitochondrial myopathy associated with sudden death in young adults and a novel mutation in the mitochondrial DNA leucine transfer RNA<sup>(leu)</sup> gene. *Q J Med* 1993; 86:709-713.
67. Thyagarajan D, Shanske S, Vazquezmemije M, Devivo D, Dimauro S. A novel mitochondrial ATPase 6 point mutation in familial bilateral striatal necrosis. *Ann Neurol* 1995; 38:468-472.
68. Demeirleir L, Seneca S, Lissens W, Schoentjes E, Desprechins B. Bilateral striatal necrosis with a novel point mutation in the mitochondrial ATPase 6 gene. *Pediatr Neurol* 1995; 13:242-246.
69. Morten KJ, Cooper JM, Brown GK, Lake BD, Pike D, Poulton J. A new point mutation associated with mitochondrial encephalomyopathy. *Hum Mol Genet* 1993; 2:2081-2087.
70. Nelson I, Hanna MG, Alsanjari N, Scaravilli F, Morganhughes JA, Harding AE. A new mitochondrial DNA mutation associated with progressive dementia and chorea: A clinical, pathological, and molecular genetic study. *Ann Neurol* 1995; 37:400-403.
71. Rotig A, Colonna M, Bonnefont JP, Blanche S, Fischer A, Saudubray JM *et al*. Mitochondria DNA deletion in Pearson's marrow/pancreas syndrome. *Lancet* 1989; 902-903.
72. Hao HL, Bonilla E, Manfredi G, Dimauro S, Moraes CT. Segregation patterns of a novel mutation in the mitochondrial tRNA glutamic acid gene associated with myopathy and diabetes mellitus. *Am J Hum Genet* 1995; 56:1017-1025.
73. Zeviani M, Moraes CT, DiMauro S, Nakase H, Bonilla E, Schon EA *et al*. Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology* 1998; 51:1525.
74. Maassen JA, Kadowaki T. Maternally inherited diabetes and deafness: A new diabetes subtype. *Diabetologia* 1996; 39:375-382.
75. Casademont J, Barrientos A, Cardellach F, Rotig A, Grau JM, Montoya J *et al*. Multiple deletions of mtDNA in two brothers with sideroblastic anemia and mitochondrial myopathy and in their asymptomatic mother. *Hum Mol Genet* 1994; 3:1945-1949.
76. Triepels RH, van den Heuvel LP, Loeffen JL, Buskens CA, Smeets RJ, Rubio-Gozalbo ME *et al*. Leigh syndrome associated with a mutation in the NDUFS7 (PSST) nuclear encoded subunit of complex I. *Ann Neurol* 1999; 45:787-790.
77. Loeffen J, Smeitink A, Triepels R, Smeets R, Schuelke M, Sengers R *et al*. The first nuclear-encoded complex I mutation in a patient with Leigh syndrome. *Am J Hum Genet* 1998; 63:1598-1608.
78. Bourgerom T, Rustin P, Chretien D, Birch-Machin M, Bourgeois M, Viegas-Pequignot E *et al*. Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nat Genet* 1995; 11:144-149.
79. Tiranti V, Hoertnagel K, Carrozzo R, Galimberti C, Munaro M, Granatiero M *et al*. Mutations of SURF-1 in Leigh disease associated with cytochrome c oxidase deficiency. *Am J Hum Genet* 1998; 63:1609-1621.
80. Zhu ZQ, Yao JB, Johns T, Fu K, DeBie I, MacMillan C *et al*. SURF 1, encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome c oxidase, is mutated in Leigh syndrome. *Nat Genet* 1998; 20:337-343.