



Departamento de Bioquímica

**CONSECUENCIAS FISIOPATOLÓGICAS CELULARES DE
MUTACIONES EN EL GEN *BCS1L* ASOCIADAS A DÉFICITS
ENZIMÁTICOS DEL COMPLEJO III MITOCONDRIAL**

Tesis Doctoral

Lorena Marín Buera

Madrid 2012

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Memoria presentada por la Licenciada en Bioquímica

Lorena Marín Buera

para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

**CONSECUENCIAS FISIOPATOLÓGICAS CELULARES DE
MUTACIONES EN EL GEN *BCS1L* ASOCIADAS A DÉFICITS
ENZIMÁTICOS DEL COMPLEJO III MITOCONDRIAL**

Directora de Tesis:

Dra. Cristina Ugalde Bilbao

Instituto de Investigación del Hospital Universitario 12 de Octubre

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Doña **Cristina Ugalde Bilbao**, Doctora en Ciencias, como Directora de Tesis,

CERTIFICA:

Que Doña Lorena Marín Buera, con DNI 25191441-R, licenciada en Bioquímica, ha realizado bajo mi dirección en el Instituto de Investigación del Hospital Universitario 12 de Octubre (i+12) de Madrid, el trabajo titulado:

**CONSECUENCIAS FISIOPATOLÓGICAS CELULARES DE MUTACIONES
EN EL GEN *BCSL1* ASOCIADAS AL DÉFICIT ENZIMÁTICO DEL
COMPLEJO III MITOCONDRIAL**

Una vez supervisado el trabajo, considero que reúne todos los requisitos necesarios en cuanto a originalidad y calidad para ser presentado como Tesis Doctoral con el objeto de optar al título de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Madrid, a 7 de Noviembre de 2012

Dra. Cristina Ugalde Bilbao
Directora de Tesis

Instituto de Investigación
Hospital Universitario 12 de Octubre
Avenida de Córdoba s/n
28041 Madrid

Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a la concesión de un Contrato de Formación en Investigación por parte del Fondo de Investigaciones Sanitarias / Instituto de Salud Carlos III al proyecto de investigación PI08/0021, asignado a Doña Lorena Marín Buera.

A mis padres y a mi hermano Pablo

HOW DO I LOVE YOU, THESIS?
LET ME COUNT THE WAYS...



AGRADECIMIENTOS

Han pasado ya 4 años desde que llegué a Madrid con mi maleta azul y la ilusión de un nuevo comienzo profesional. Un tiempo antes había empezado mi andadura en este mundo de la ciencia sin mucha suerte. En total, todo este período es un sumatorio de vivencias y de personas que me han cambiado, me han ayudado, me han hecho evolucionar y en definitiva, me han acompañado a lo largo del desarrollo de esta tesis doctoral. Por ello, desde estas líneas, quisiera agradecer a todas las personas e instituciones que han hecho posible que hoy tengas este libro en tus manos.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mi directora de tesis, la Dra. Cristina Ugalde, por haberme dado la oportunidad de incorporarme a su grupo y formarme científicamente. Gracias por estos años que tanto me han enseñado, y sobre todo, por tu confianza en mí y tu ayuda. También quisiera dar las gracias al Dr. Miguel Ángel Martín Casanueva por permitirme formar parte de la gran familia de las “raras y mitocondriales” del Instituto de Investigación del Hospital 12 de Octubre de Madrid.

A la Dra. María Morán por estar siempre ahí cuando voy a ella con doscientas preguntas y por introducirme en el maravilloso mundo de las inmunofluorecencias. Al Dr. Paco Martínez por estar siempre dispuesto a ayudar y por su buen sentido del humor. A la Dra. Montse Martínez de la Unidad de Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid, por toda la ayuda con los experimentos de DIGE de esta tesis.

Cronológicamente, querría comenzar dando las gracias a mis amigos de Barcelona, que conocí en mi primera etapa en el Institut de Recerca de Vall d’Hebron y que me apoyaron en TODO momento, especialmente en mi marcha a Madrid con un “Te iremos a ver y ¡saldremos de fiesta! Busca discotecas Lorein” (jajaja). Por todos los buenos momentos vividos allí y aquí. Gràcies a l’Anna Barbosa, la Laura “Fontru”, la Marta G Bellmunt, el Jordi Romero, el Tomàs Pinós, (fuiesteis y sois un gran apoyo para mí), Guillermo (si no, no estaríamos aquí jajaja), “lo” Guillem, Pep “Dr.Poma”, Irene (por los momentos MoFlo jaja) y MarioMarotta (por los buenos consejos).

A mis compañeros de laboratorio, Gabi, Miguelón, Xandra y Paz, por las risas y tantos buenos momentos que hemos vivido durante estos 4 años. Por esa botellita de sidra siempre a tiempo, por apoyarme y darme ánimos y por hacer que ir a trabajar todos los días con vosotros, sea una necesidad. ¡Más que compañeros sois mis AMIGOS! ¡SÍ que os voy a echar de menos! (y vosotros a mí.. ¡y lo sabéis! ajajaja ☺)

También quería agradecer a Inés “mi encanna”, su ayuda en este tiempo y los buenos momentos que hemos pasado juntas en la poyata (jarrriba la proteómica!) y fuera de ella. Gracias a Alberto Blázquez por toda su ayuda, sobre todo en mis comienzos en el laboratorio. A Aitor y a Juan Carlos Rubio, su paciencia con la “cateta” (hasta esta tesis) del Word y del EndNote (jajaja). Gracias por tener un momento siempre para mí. A Juan Carlos González por toda la ayuda con los experimentos en el microscopio confocal y una vez más, otra persona que se suma a la tarea de “descatetizarme” e instruirme, en este caso, en el buen uso(☺) y manejo del ImageJ (véase portada, jaja)

A Inma (Solís) por toda su ayuda en mis atascos mentales con algún que otro experimento, por sus consejos y por nuestras charlas en cultivos. ¡Gracias!

A Crista y Erica, que aunque en este último año no han estado por aquí, han compartido todo conmigo en los tres primeros años de mi tesis. Lo bueno y lo malo, la salud y...jajaja. Gracias Vedettes, por todos los momentos irrepetibles que me llevo de Madrid, y por los consejos y el apoyo, eso sí, todo caña en mano (jajaja)

Gracias también a mis amigos de Zaragoza, Rodrigo, Roberto, Jorge y María. Por todos esos buenos momentos en los que esta bioquímica se mete entre ingenieros, por vuestros consejos, por el Gecko, por vuestro apoyo y por lo bien que lo pasamos juntos.

A mis neskas en roulotte de Pamplona, porque las quiero como hermanas. Que por muy agobiada que esté, ellas están ahí para quitarle todo el hierro que yo añada al asunto. Porque cuando nos juntamos todas, es como volver a estar en casa. Gracias a Ana “Laordengoitia”, Lauritron, Elisarte, Majo, Naiara “nayermaster” y Pili.

A mis padres y a mi hermano Pablo, que son mi verdadero apoyo en cada paso que he dado en mi vida (quién dice paso dice mudanza, cambio de ciudad, de trabajo...jaja). Gracias por estar ahí siempre y por vuestra paciencia infinita. Esta tesis os la dedico a vosotros

Y por último y no por eso menos importante, a Valentí, por ser un apoyo al 200% y convertirse muchas veces en mi postdoc a domicilio. Gracias por estar a mi lado y ayudarme y darme tranquilidad. Por todo lo que ya hemos vivido juntos en estos 5 años y ¡por todo lo que vendrá! London calling!

RESUMEN / SUMMARY

Las mitocondrias son orgánulos intracelulares cuya principal función es generar la mayor parte de la energía celular en forma de adenosín trifosfato (ATP), molécula utilizada como fuente de energía química, a partir de un proceso conocido como fosforilación oxidativa (OXPHOS). El sistema OXPHOS está situado en la membrana interna mitocondrial y está formado por cinco complejos enzimáticos multiproteicos que catalizan la síntesis de ATP acoplada a un gradiente electroquímico de protones. Dentro del sistema OXPHOS, el complejo citocromo *bc1* (complejo III) cataliza la transferencia de electrones desde el coenzima Q reducido al citocromo c, asociada a un bombeo de protones al espacio intermembrana. Dicho complejo está formado por 11 subunidades codificadas por dos genomas diferentes, la subunidad citocromo b (CYTB) está codificada por el ADN mitocondrial (ADNmt) y el resto de subunidades están codificadas por el núcleo. Asimismo, se han descrito proteínas reguladoras y factores de ensamblaje nucleares implicados en la biosíntesis del complejo III, tales como BCS1L y TTC19 en humanos.

Los déficits enzimáticos del sistema OXPHOS constituyen la primera causa de errores congénitos del metabolismo energético, siendo el déficit aislado del complejo III un defecto relativamente raro. Las mutaciones que generan fallos en la biosíntesis de este complejo pueden conducir al déficit enzimático del complejo III de modo aislado o combinado con otros complejos de la cadena respiratoria. El déficit del complejo III mitocondrial está asociado a un grupo heterogéneo de enfermedades neuromusculares o multisistémicas de severidad variable que pueden manifestarse tanto en la infancia como en adultos.

El objetivo principal de este trabajo ha sido estudiar las consecuencias fisiopatológicas del déficit enzimático del complejo III en fibroblastos de seis pacientes con mutaciones en *BCS1L*, así como establecer correlaciones genotipo-fenotipo. Para ello se realizaron análisis de: 1) Proliferación celular, 2) Ensamblaje de los complejos y supercomplejos mitocondriales mediante electroforesis azul nativa, 3) Alteraciones estructurales de la red mitocondrial, 4) Estrés oxidativo celular, analizando por métodos bioquímicos, inmunocitoquímicos y citométricos la producción de ROS y los niveles de enzimas antioxidantes, 5) Medición del potencial de membrana mitocondrial, 6) Muerte celular, 7) Análisis de la interacción entre las proteínas BCS1L y LETM1 y 8) Aplicación de la tecnología proteómica DIGE para la búsqueda de posibles biomarcadores y dianas terapéuticas en el déficit enzimático del complejo III.

Mitochondria are intracellular organelles that generate most cellular energy as adenosine triphosphate (ATP), a molecule used as a source of chemical energy, produced in a process known as oxidative phosphorylation (OXPHOS). The OXPHOS system is located in the mitochondrial inner membrane and consists of five multiprotein enzyme complexes, which are responsible for electron transport and generation of the proton gradient in the mitochondrial intermembrane space, and of the H⁺ ATP synthase that uses this proton gradient to produce ATP. Within the OXPHOS system, the cytochrome *bc1* complex (complex III) catalyzes the transfer of electrons from reduced coenzyme Q to cytochrome c associated with a proton pump to the intermembrane space. This complex consists of 11 subunits encoded by two different genomes, the cytochrome b (CYTB) subunit is encoded by mitochondrial DNA (mtDNA) and the remainder subunits are encoded by the nucleus.

The OXPHOS system enzyme deficiencies are the leading cause of congenital errors of energy metabolism, being complex III deficiency a relatively uncommon defect. Mutations that generate defects in the biosynthesis of this complex lead to either isolated or combined enzyme deficiencies of the respiratory chain complexes. Mitochondrial complex III deficiency is associated with a heterogeneous group of neuromuscular and multisystem disorders of variable severity that are present in childhood and adulthood. Not only most complex III subunits are encoded by the nucleus, but also regulatory proteins and assembly factors have been described to be involved in the biosynthesis of this complex, such as BCS1L and TTC19 in human.

The aim of this work was to study the pathophysiological consequences of *BCS1L* mutations in fibroblasts from six complex III-deficient patients by establishing genotype-phenotype correlations. For this purpose, we analyzed: 1) Cell proliferation, 2) Assembly or stability of the mitochondrial respiratory chain complexes and supercomplexes by blue native electrophoresis, 3) Structural alterations of the mitochondrial network, 4) Cellular oxidative stress, analyzing by biochemical, immuno histochemical and cytometric measurements ROS production and the levels of antioxidant enzymes, 5) The bioenergetic function by measuring the mitochondrial membrane potential, 6) Cell death, 7) The interaction between BCS1L and the LETM1 protein, 8) The proteomic DIGE technology was applied in the search for putative new biomarkers and therapeutic targets for complex III enzyme deficiency.

ÍNDICE

RESUMEN/SUMMARY	1
ÍNDICE.....	7
ABREVIATURAS.....	15
INTRODUCCIÓN.....	19
1. La mitocondria: Estructura y función	21
2. Genoma Mitocondrial.....	23
2.1 Genética Mitocondrial.....	24
3. Sistema de Fosforilación Oxidativa (OXPHOS).....	25
3.1 Organización estructural y función del sistema OXPHOS: Supercomplejos	26
3.2 Complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial	28
3.2.1 Estructura y función del Complejo III	28
3.2.2 Función de las subunidades catalíticas: El ciclo Q	30
3.2.3 Función de las subunidades accesorias	31
3.2.4 Biogénesis del Complejo III	32
3.2.4.1 Factores de ensamblaje del Complejo III	32
3.2.4.1.1 Cbs1, Cbs2, Cbp1 y Cbp2	32
3.2.4.1.2 Cbp3, Cbp4 y Cbp6	33
3.2.4.1.3 Cyc3 y Cyt2.....	33
3.2.4.1.4 Cyc2.....	33
3.2.4.1.5 Bca1.....	34
3.2.4.1.6 Usb1.....	34
3.2.4.1.7 TTC19.....	34
3.2.4.1.8 bcs1/BCS1L.....	34
3.2.4.1.9 Mzm1	35
3.2.4.1.10 LETM1	35
3.2.4.2 Ensamblaje del Complejo III	36
4. ENFERMEDADES MITOCONDRIALES DEL SISTEMA OXPHOS.....	37
4.1 Déficit enzimático del Complejo III	38
4.1.1 Mutaciones en genes mitocondriales: <i>CYTB</i>	38

4.1.2 Mutaciones en genes estructurales nucleares	39
4.1.3 Mutaciones en factores de ensamblaje	39
4.1.3.1 Mutaciones en TTC19.....	39
4.1.3.2 Mutaciones en <i>BCS1L</i>	40
OBJETIVOS	41
MATERIALES Y MÉTODOS	45
1. Pacientes.....	47
2. Materiales.....	48
2.1 Muestras biológicas de pacientes y controles	48
2.2 Reactivos, soluciones y tampones	51
2.3 Anticuerpos.....	51
3. Métodos.....	53
3.1 Cultivos celulares.....	53
3.1.1 Mantenimiento de los cultivos celulares	53
3.1.2 Ensayos de proliferación celular	54
3.2 Inmunofluorescencia.....	54
3.3 Ensayos de colocalización	56
3.4 Determinación de los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) en células vivas	56
3.4.1 Citometría de flujo	56
3.4.2 Microscopía confocal.....	57
3.5 Determinación del patrón morfológico de la red mitocondrial.....	57
3.6 Análisis de la muerte celular	58
3.6.1 Ensayos de apoptosis (TUNEL).....	58
3.6.2 ELISA	58
3.7 Determinación del potencial de membrana mitocondrial.....	59
3.8 Análisis de proteínas.....	60
3.8.1 Preparación de lisados celulares.....	60
3.8.2 Fraccionamiento Subcelular.....	60

3.8.3	Fraccionamiento submitocondrial	61
3.8.4	Inmunoprecipitación	62
3.8.5	Cuantificación de proteínas	63
3.8.6	Separación de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	63
3.8.7	Transferencia a filtros de nitrocelulosa e inmunodetección directa (<i>Western-blot</i>)	64
3.8.8	Ensayos de electroforesis azul nativa (<i>Blue Native Electrophoresis, BNE</i>).....	65
3.8.8.1	Obtención de pellets mitocondriales a partir de fibroblastos mediante tratamiento con digitonina	65
3.8.8.2	Preparación de muestras para ensayos de electroforesis azul nativa (BNE-PAGE).....	65
3.8.8.3	Electroforesis bidimensional azul nativa (2D-BN/SDS-PAGE)	65
3.8.8.4	Ensayos de Actividad en Gel (<i>IGA: In Gel Activity Assay</i>).....	67
3.8.9	Electroforesis Bidimensional (2-DE).....	67
3.8.9.1	Preparación de muestras para 2D-PAGE.....	68
3.8.9.2	Tinción con azul de <i>coomassie</i> y captura de imágenes.....	70
3.8.9.3	Electroforesis diferencial bidimensional en gel (2D-DIGE, <i>Difference Gel Electrophoresis</i>)	70
3.8.9.3.1	Estándar interno y diseño experimental.....	70
3.8.9.3.2	Marcaje de las muestras	71
3.8.9.3.3	Electroforesis bidimensional	71
3.8.9.3.4	Captura de imágenes.....	72
3.8.9.3.5	Análisis de las Imágenes	72
3.8.9.3.6	Análisis de los Componentes Principales (ACP).....	73
3.8.9.3.7	Identificación de proteínas por Espectrometría de Masas (MS).....	74
	RESULTADOS.....	77
1.	Consecuencias fisiopatológicas celulares de las mutaciones en el gen <i>BCS1L</i>.....	79
1.1	Análisis genético de <i>BCS1L</i> en los pacientes de estudio	79
1.2	Capacidad de crecimiento de fibroblastos con mutaciones en <i>BCS1L</i>	80
1.3	Efecto de las mutaciones en <i>BCS1L</i> en los niveles estacionarios de la proteína <i>BCS1L</i> y de las subunidades de cadena respiratoria.....	81

1.4	Localización subcelular de la proteína BCS1L en los fibroblastos mutados.....	82
1.5	Ensamblaje de los complejos de cadena respiratoria mitocondrial en fibroblastos con mutaciones en <i>BCS1L</i>	83
1.6	Ensamblaje de los supercomplejos mitocondriales en fibroblastos con mutaciones en <i>BCS1L</i>	86
1.7	Niveles de ROS y de las enzimas antioxidantes en fibroblastos con mutaciones en <i>BCS1L</i>	88
1.7.1	Niveles de ROS en células vivas	88
1.7.2	Niveles estacionarios de las enzimas antioxidantes	89
1.8	Alteraciones estructurales en la red mitocondrial de fibroblastos con mutaciones en <i>BCS1L</i>	90
1.8.1	Morfología de la red mitocondrial en pacientes con mutaciones en <i>BCS1L</i>	91
1.8.2	Análisis de los niveles estacionarios de las proteínas implicadas en el proceso de fusión-fisión mitocondrial	93
1.9	Determinación del potencial de membrana mitocondrial	93
1.10	Análisis de la inducción de la muerte celular en fibroblastos con mutaciones en <i>BCS1L</i>	94
1.10.1	Ensayos de TUNEL y ELISA	94
1.10.2	Análisis de los niveles estacionarios de proteínas implicadas en la muerte celular programada.	95
2.	Análisis de la interacción entre las proteínas BCS1L y LETM1 en fibroblastos con mutaciones en <i>BCS1L</i>	97
2.1	Interacción entre BCS1L y LETM1 en muestras de pacientes	97
2.2	Niveles estacionarios y localización subcelular de la proteína LETM1 en fibroblastos mutados en <i>BCS1L</i>	99
2.3	Ensamblaje de los complejos de BCS1L y LETM1 en fibroblastos mutados en <i>BCS1L</i>	100
3.	Estudio del patrón de expresión diferencial de proteínas en fibroblastos con mutaciones en <i>BCS1L</i>	103
3.1	Electroforesis diferencial en gel en dos dimensiones (2D-DIGE): Ajuste de las condiciones electroforéticas.....	103
3.2	Diseño experimental del 2D-DIGE y mapa del proteoma diferencial de fibroblastos control y mutados en <i>BCS1L</i>	104
3.3	Análisis de los Componentes Principales (ACP).....	107

3.4	Identificación de las proteínas de expresión diferencial	110
3.4.1	Clasificación funcional de las proteínas identificadas	112
3.4.2	Características funcionales de las proteínas identificadas	114
3.5	Validación de los resultados del ensayo 2D-DIGE: Gelsolina	117
3.5.1	Diferencias de expresión de la gelsolina entre fibroblastos control y mutados en <i>BCS1L</i> en el ensayo 2D-DIGE.....	118
3.5.2	Inmunodetección de gelsolina mediante <i>Western-blot</i>	119
3.5.3	Fraccionamiento submitocondrial	120
3.5.4	Interacción Gelsolina-VDAC.....	121
	DISCUSIÓN.....	125
1.	Consecuencias fisiopatológicas CELULARES de las mutaciones en el gen <i>BCS1L</i>	127
2.	Interacción entre <i>BCS1L</i> y <i>LETM1</i> en fibroblastos con mutaciones en <i>BCS1L</i>	132
3.	Expresión diferencial de proteínas en fibroblastos con mutaciones en <i>BCS1L</i>	133
	CONCLUSIONES.....	145
	BIBLIOGRAFIA.....	149
	ANEXOS.....	179

ABREVIATURAS

2D-BN/SDS-PAGE Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida. 1D: primera dimensión en condiciones nativas. 2D: segunda dimensión en condiciones desnaturalizantes

2D-PAGE Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

ADNc ADN complementario

ADNg ADN genómico

ADNmt ADN mitocondrial

ADNn ADN nuclear

ARNm ARN mensajero

ARNr ARN ribosómico

ARNt ARN de transferencia

ATP Adenosín trifosfato

BN-PAGE Electroforesis azul nativa en geles de poliacrilamida (*Blue-Native*)

CI Complejo I, NADH deshidrogenasa

CII Complejo II, Succinato deshidrogenasa

CIII Complejo III, Ubiquinol: citocromo c oxidoreductasa

CIV Complejo IV, Citocromo c oxidasa

CoQ Coenzima Q10 o ubiquinona

COX Citocromo c oxidasa

CS Citrato sintasa

CYTB Citocromo b

CYTC Citocromo c

CYTC1 Citocromo c1

CV Complejo V, H⁺ ATP sintasa

DAPI 4',6-Diamidino-2-fenilindol

DCA Dicloroacetato

DCFDA Diacetato de 2', 7'-diclorofluoresceína

DIGE Electroforesis diferencial en gel

DMEM Medio Eagle modificado por Dulbecco

DMSO Dimetil sulfóxido

EIM Espacio intermembrana

FBS Suero fetal bovino

GPx Glutación peroxidasa

GRx Glutación reductasa

GRACILE Acrónimo de los síntomas: Retraso en el crecimiento, Aminoaciduria, Colestasis, Sobrecarga de hierro, Acidosis láctica y Muerte temprana

IGA Ensayo de actividad en gel (*In gel activity*)

LTM Lisado total mitocondrial

LS Síndrome de Leigh (*Leigh Syndrome*)

MALDI Desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*)

MELAS Acrónimo de los síntomas: Miopatía mitocondrial, Encefalopatía, Acidosis Láctica y accidentes Cerebrovasculares (*Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic acidosis and Stroke-like episodes*)

MEM Membrana externa mitocondrial

MIM Membrana interna mitocondrial

NTB Azul de nitrotetrazolium

OXPHOS Fosforilación oxidativa

(p/v) Masa de soluto (g) / volumen de disolución (ml) x 100

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

PTP Poro de transición de permeabilidad (*Permeability Transition Pore*)

RFLP Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

RISP Proteína hierro-azufre de Rieske (*Rieske Iron-Sulfur Protein*)

RMN Resonancia magnética nuclear

ROS Especies reactivas del oxígeno

SOD Superóxido dismutasa

TIM Translocasa de membrana mitocondrial interna (*Translocase of the Inner Membrane*)

TOM Translocasa de membrana mitocondrial externa (*Translocase of the Outer Membrane*)

TOF Tiempo de vuelo (*Time of Flight*)

TUNEL Transferasa terminal de marcaje de dUTP en extremos (*Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling*)

VDAC Canal aniónico dependiente de voltaje (*Voltage-Dependent Anion Channel*)

(v/v) Volumen / volumen total x 100

INTRODUCCIÓN

1. LA MITOCONDRIA: ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

Las mitocondrias son orgánulos celulares de doble membrana cuya función principal es la producción de energía en forma de ATP, a partir de los nutrientes orgánicos, mediante un proceso acoplado a un gradiente electroquímico que lleva a cabo el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) (Figura 1(1)). Además, en las mitocondrias se producen algunos de los procesos metabólicos más importantes del organismo, como el ciclo de los ácidos grasos, el ciclo de Krebs y la biosíntesis de aminoácidos y del grupo hemo. También intervienen en otros procesos, como la apoptosis vía activación de caspasas mediante la liberación de citocromo c (Figura 1(2)), la homeóstasis del calcio e iones, el metabolismo lipídico y la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) implicadas en el envejecimiento.

Estas organelas están formadas por una membrana externa (MEM) y una membrana interna (MIM) que divide a la mitocondria en dos compartimentos: la matriz y el espacio intermembrana (EIM). La membrana externa es una bicapa lipídica similar a la membrana plasmática, altamente permeable a iones y a otras moléculas inferiores a 5000 Da. Contiene una gran cantidad de proteínas de membrana llamadas porinas o VDAC (*Voltage-Dependent Anion Channel*) (Figura 1(3)), que son la principal vía a través de la cual se intercambian metabolitos entre la mitocondria y el citosol. Además, la membrana externa contiene el sistema de translocasas TOM/TOB, que participa en el reconocimiento inicial e importe de todas las proteínas con destino mitocondrial (Figura 1(4)). Por otro lado, la membrana interna mitocondrial tiene un mayor contenido en proteínas y fosfolípidos como la cardiolipina y es altamente selectiva, necesitando de la presencia de numerosos transportadores específicos o translocasas de membrana, como el complejo TIM22/TIM23 y la translocasa OXA1, gracias a los cuales se produce el transporte al interior de la mitocondria y posterior procesamiento de las proteínas de destino mitocondrial que han sido sintetizadas en el citoplasma (Figura 1(4)). También contiene transportadores de grupos prostéticos, necesarios para la correcta biosíntesis y funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial (Figura 1(5)). La membrana interna se encuentra plegada formando invaginaciones hacia el interior de la matriz, llamadas crestas mitocondriales. Los sitios de contacto entre las membranas interna y externa constan de componentes del llamado poro de membrana (PTP) (*Reichert y Neupert, 2004*). El número y la morfología de estas crestas reflejan la respuesta de la mitocondria a la demanda energética de la célula, ya que es en la membrana interna

donde se encuentra el sistema OXPHOS y por tanto, la síntesis de ATP mitocondrial (Scheffler, 1999).

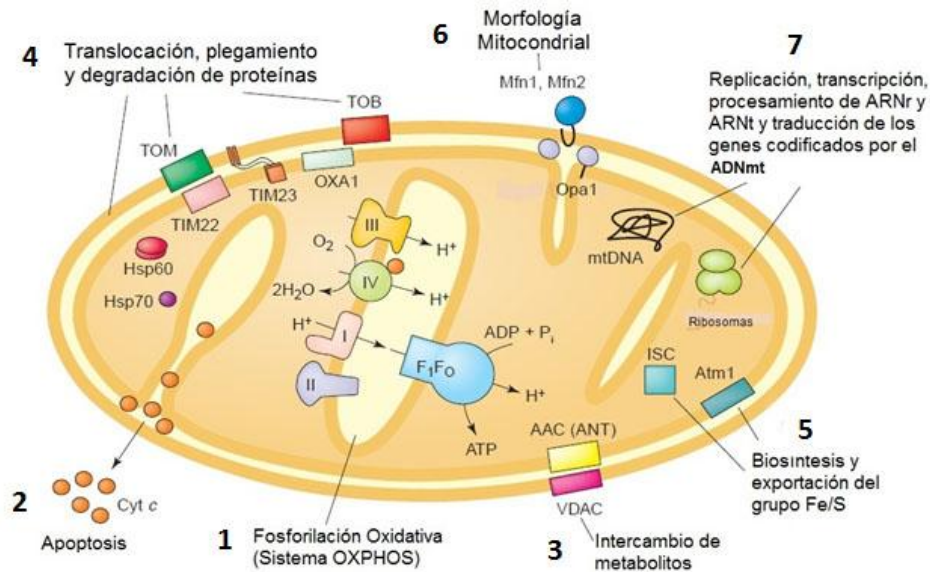


Figura 1. Visión general de los procesos relacionados con la mitocondria. (1) Sistema de fosforilación oxidativa (complejos I, II, III IV y H^+ ATP sintasa) (2) Apoptosis vía liberación de citocromo c (Cyt c) desde el espacio intermembrana (3) Intercambio de metabolitos y nucleótidos a través de canales y moléculas transportadoras (4) Translocación de proteínas a través de las translocasas de membrana externa (TOM) e interna (TIM), plegamiento (Hsp70, Hsp60) y degradación de proteínas (5) Biosíntesis y exportación de grupos Fe/S (6) Proteínas implicadas en los procesos de dinámica mitocondrial (Fzo1, Mfn1, Mfn2, Mgm1 y Opa1) (7) Procesos de replicación, transcripción, procesamiento de ARNs y traducción de genes mitocondriales (modificado de (Reichert y Neupert, 2004).

Las mitocondrias no se encuentran en el citoplasma como orgánulos individuales, sino que adoptan diferentes formas en función del tipo celular y la demanda metabólica de la célula. Pueden alternar estructuras ovoides o alargadas, sometiéndose a ciclos repetitivos de fusión y fisión mitocondrial en un proceso que se conoce como dinámica mitocondrial (Figura 1(6)). Estos procesos son dependientes del potencial de membrana y se encuentran en equilibrio, dictando el tamaño y el grado de conectividad de la llamada red mitocondrial. En estos procesos no solo son necesarios la fusión de membranas externa e interna, sino también la mezcla de los contenidos de la matriz (Malka et al., 2005) y la redistribución de proteínas y lípidos a través de la célula (Nakada et al., 2001). En células de mamífero, la fisión parece ser un hecho esencial en células proliferantes, ya que las mitocondrias deben multiplicarse y dividirse entre células hijas. En este proceso intervienen proteínas como DRP1/DLP1 (*Dynamamin related-proteins*) y FIS1 en humanos (Chen y Chan, 2005; Rojo et al., 2002). En el caso de la fusión mitocondrial, está mediada por las proteínas MFN1 (*Mitofusina 1*), MFN2

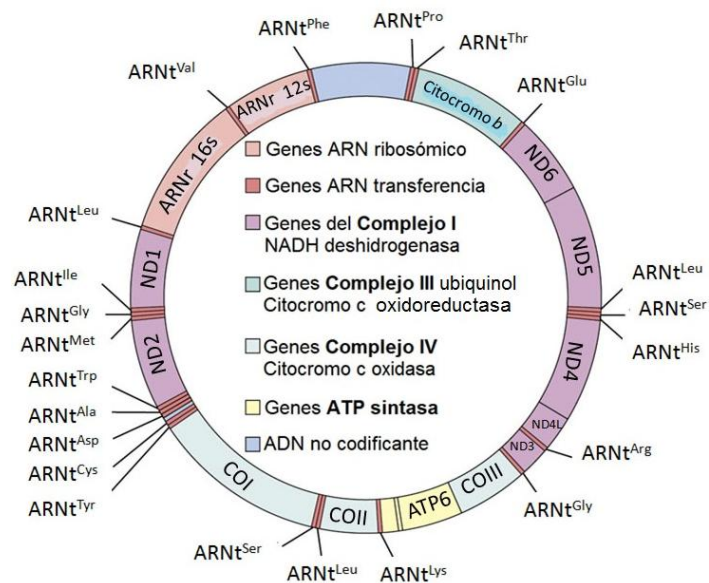
(*Mitofusin 2*) y OPA1 (*Optic Atrophy-1*) (Cipolat et al., 2004). En definitiva, el mantenimiento de la morfología mitocondrial está directamente relacionado con la estabilidad metabólica de la célula, estableciéndose un balance entre los fenómenos de fusión y de fisión, según las necesidades de la célula en un momento determinado.

2. GENOMA MITOCONDRIAL

En las células eucariotas la mayor parte de la información genética está contenida en el núcleo. Sin embargo la mitocondria contiene su propio genoma, el ADN mitocondrial (ADNmt) (Nass y Nass, 1963). Por ello, dentro de la mitocondria también se dan lugar procesos de replicación, transcripción y procesamiento de ARNs y de los genes mitocondriales (Figura 1(7)).

El genoma mitocondrial es una molécula de ADN circular que contiene 16.569 pares de bases (Anderson et al., 1981; Andrews et al., 1999). El ADN mitocondrial está formado por dos cadenas distintas: la cadena pesada (H), rica en guanina y timina y la cadena ligera (L). La mayoría de los genes del ADNmt codifican los 2 ARN ribosómicos (ARNr 12S y 16S) y 22 ARN de transferencia (ARNt).

Figura 2. Representación del ADN mitocondrial (ADNmt) humano. Localización de los genes correspondientes a las distintas subunidades de cadena respiratoria. Se indican los ARN de transferencia (ARNt) junto al aminoácido que transporta, así como los ARN ribosómicos: ARNr 12s y ARNr 16s.



Los 13 genes restantes codifican proteínas del sistema OXPHOS: 7 subunidades (ND1, ND2, ND3, ND4L, ND4, ND5 y ND6) de las 45 que forman el complejo I (NADH deshidrogenasa), una subunidad (citocromo b, CYTB) de las 11 del complejo III (ubiquinol citocromo c oxidoreductasa o complejo *bc1*), tres subunidades (COX1, COX2, COX3) de las 13 del complejo IV (citocromo c oxidasa) y dos subunidades

(ATP6 y ATP8) de las 16 proteínas que forman el complejo V (H^+ ATP sintasa) (Figura 2).

El genoma mitocondrial es compacto: los genes estructurales no poseen zonas ni 5' ni 3' no traducidas (UTRs), no contienen intrones y los espacios intergénicos son mínimos, llegando en algunos casos a solapar entre ellos. Solo existen dos regiones no codificantes en el ADNmt: una región de ~1 Kb que se denomina *D-loop* en mamíferos, donde se localizan el origen de replicación de la cadena pesada (OH) y los promotores a partir de los cuales se inicia la transcripción mitocondrial (ITL, ITH1 y ITH2); y otra región de ~30 nucleótidos localizada en el interior de un grupo de ARNt a dos-tercios desde el *D-loop* (Strachan y Read, 1999).

El ADNmt se encuentra formando parte de complejos nucleoproteicos asociados a la membrana interna mitocondrial, denominados nucleoides (Bogenhagen et al., 2003). Dichos nucleoides se consideran la unidad de transmisión y herencia del ADNmt. El genoma mitocondrial se replica y transcribe en la mitocondria. En la región *D-loop*, están los elementos *cis*- responsables de la regulación de estos procesos. Sin embargo, todos los factores transactivadores están codificados en el núcleo (Garesse y Vallejo, 2001). Aproximadamente los 1500 genes restantes que dan lugar al proteoma mitocondrial también están codificados en el núcleo, son traducidos por ribosomas citoplasmáticos y transportados a la mitocondria a través de los diversos sistemas de importe de proteínas (Wallace, 2005). El genoma mitocondrial posee, por tanto, una capacidad codificante limitada y necesita coordinarse con el genoma nuclear para su correcta funcionalidad (Garesse y Vallejo, 2001).

2.1 Genética Mitocondrial

El ADNmt se hereda exclusivamente por vía materna, ya que las mitocondrias procedentes del esperma que penetran en el oocito son eliminadas mediante ubiquitinación (Sutovsky et al., 2000). Además el ADNmt posee una naturaleza poliploide (de cientos de miles de copias por célula), por lo que se habla de **homoplasmia** cuando todas las copias del ADNmt son idénticas en un individuo particular y de **heteroplasmia**, cuando coexisten dos o más genotipos distintos. Cuando una mutación afecta a todas las copias del genoma mitocondrial se denomina mutación homoplásmica, mientras que cuando solo está presente en una parte del total de copias del mismo, se denomina mutación heteroplásmica. Esto lleva a definir otra de las características del genoma mitocondrial, conocida como **efecto umbral** (Taylor y

Turnbull, 2005), que se refiere a la presencia de un nivel mínimo de ADNmt mutado para cada mutación, necesario para que ocurra la expresión fenotípica o bioquímica del defecto mitocondrial.

3. SISTEMA DE FOSFORILACIÓN OXIDATIVA (OXPHOS)

La síntesis de ATP es llevada a cabo por el sistema OXPHOS, el cual se localiza en la membrana interna mitocondrial y está formado por los cuatro complejos enzimáticos de la cadena respiratoria y el complejo V o H^+ -ATP sintasa (Figura 3). La cadena respiratoria transfiere electrones desde el NADH y el $FADH_2$, productos ambos de la degradación de sustratos orgánicos en la matriz mitocondrial, al oxígeno molecular, el último aceptor de electrones. La energía procedente de la oxidación de estos sustratos se utiliza para generar un gradiente protón-motriz a través de la membrana interna mitocondrial. El complejo V utiliza este gradiente de protones para catalizar la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (Reid *et al.*, 1966). Esta reacción es reversible y la ATP sintasa puede mantener el gradiente de H^+ a expensas de la hidrólisis de ATP (Scheffler, 1999). Al proceso que acopla estas dos reacciones químicas se le denomina fosforilación oxidativa.

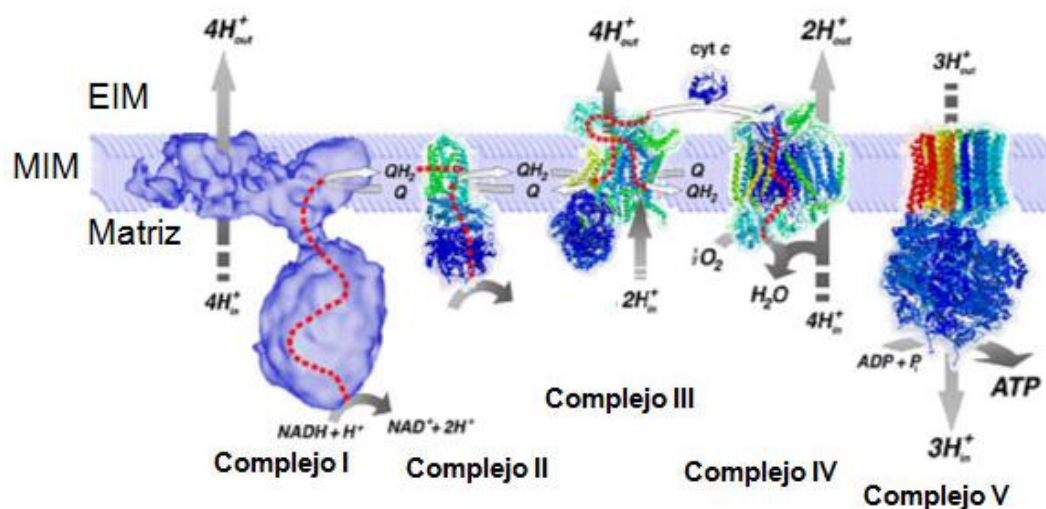


Figura 3. Sistema de Fosforilación Oxidativa (OXPHOS). A través del sistema OXPHOS los coenzimas reducidos, provenientes del catabolismo de nutrientes celulares, se oxidan y ceden sus electrones a la cadena de transporte electrónico y finalmente, al O_2 . El gradiente de protones generado se transforma en energía química, que es utilizada por el complejo V para la producción de ATP. Cyt c: citocromo c, Q: Ubiquinona oxidada, QH_2 : ubiquinona reducida, MIM: Membrana interna mitocondrial, EIM: Espacio intermembrana (modificado de Nijtmans *et al.* 2004).

Las reacciones de oxido reducción son llevadas a cabo por los cuatro complejos de la cadena respiratoria: la NADH deshidrogenasa: ubiquinona oxidoreductasa

(complejo I), la succinato: ubiquinona oxidoreductasa (complejo II), la ubiquinol: citocromo c oxidoreductasa o complejo *bc1* (complejo III) y la citocromo c oxidasa (complejo IV). Dichos complejos están ligados a través de pequeños transportadores electrónicos situados en la membrana, como son la ubiquinona, embebida en la membrana lipídica y el citocromo c, localizado en la superficie externa de la membrana interna mitocondrial (*Green y Tzagoloff, 1966*).

Desde el punto de vista genético el sistema OXPHOS es único, ya que con excepción de las subunidades del complejo II, que están todas codificadas por el genoma nuclear, el resto de los complejos del sistema OXPHOS tiene subunidades codificadas por ambas genomas: nuclear y mitocondrial. Las subunidades nucleares se sintetizan en ribosomas libres en el citosol y se importan a la mitocondria, donde se ensamblan junto a grupos prostéticos y subunidades codificadas por el genoma mitocondrial, formando los complejos de la cadena respiratoria con la ayuda de chaperonas o factores de ensamblaje específicos (*Fontanesi et al., 2008; McKenzie y Ryan; Rutter et al.; Zara et al., 2009*).

3.1 Organización estructural y función del sistema OXPHOS: Supercomplejos

El primer modelo sobre la organización estructural del sistema OXPHOS se denominó modelo de “estado sólido” (*Chance and Williams, 1955*), que postulaba que los complejos de la cadena respiratoria se encontraban asociados en estructuras rígidas de alto peso molecular en la membrana interna mitocondrial. Este modelo fue cuestionado por el llamado “modelo de estado fluido” (*Hochli y Hackenbrock, 1976*), que postulaba que los complejos difundían libremente a través de la membrana interna mitocondrial. Dicho modelo se perfeccionó sugiriendo que el transporte de electrones ocurría gracias a choques aleatorios entre los complejos y los transportadores electrónicos citocromo c o coenzima Q, dando lugar al “modelo de colisión al azar” (*Hackenbrock et al., 1986*). Posteriormente, se confirmó que los complejos de la cadena respiratoria se podían asociar en estructuras supramoleculares denominadas supercomplejos o respirasomas (Figura 4) (*Eubel et al., 2004; Eubel et al., 2003; Schagger y Pfeiffer, 2000*). Actualmente se acepta que ambas organizaciones puedan coexistir, dando lugar al “modelo de plasticidad” o de “agregación dinámica”, que postula que los complejos de la cadena respiratoria se encuentran en equilibrio dinámico, pasando de estructuras individuales a asociarse en forma de supercomplejos,

adaptándose de esta manera a cambios en el metabolismo energético (Acin-Perez *et al.*, 2008; Hochman *et al.*, 1985). En mamíferos, la mayor parte del complejo I (>90%) se encuentra ensamblado en supercomplejos, mientras que solo un 50% de complejo III y aproximadamente un 20% de complejo IV se asocian en estas especies supramoleculares (Moreno-Lastres *et al.*, 2012; Schagger, 2001; Schagger and Pfeiffer, 2000).

Se han descrito distintas variantes de supercomplejos. El complejo I puede formar una asociación estable con el dímero del complejo III, formando el supercomplejo I+III₂, al cual se pueden unir de una a cuatro copias del complejo IV, formando el supercomplejo I+III₂+IV₁₋₄ o respirasoma (Althoff *et al.*, 2011; Dudkina *et al.*, 2005; Dudkina *et al.*, 2011; Schafer *et al.*, 2006; Schagger y Pfeiffer, 2000). Asimismo, el complejo III dimérico se puede asociar a una o dos copias del complejo IV, dando lugar al supercomplejo III₂+IV₁₋₂, cuya primera estructura detallada se estudió en *Saccharomyces cerevisiae* (Heinemeyer *et al.*, 2007). Otros estudios apuntan a la presencia de los complejos II y V en supercomplejos (Acin-Perez *et al.*, 2008; Wittig and Schagger, 2009), aunque existen discrepancias respecto a este tema (Moreno-Lastres *et al.*, 2012).

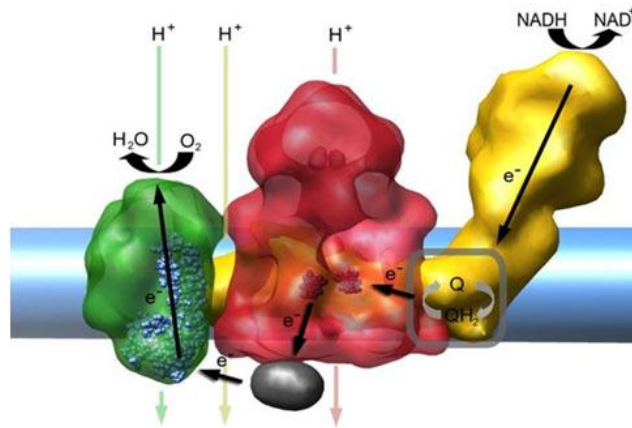


Figura 4. Estructura del supercomplejo I+III₂+IV₁ o respirasoma mitocondrial. El complejo I está representado en color amarillo, el complejo III en color rojo y el complejo IV en color verde (Vonck and Schafer, 2009).

El significado funcional de los supercomplejos podría ser aumentar la eficiencia del flujo de electrones entre los complejos de la cadena respiratoria, disminuyendo las fugas de electrones o de protones y reduciendo la distancia de difusión de los transportadores electrónicos ubiquinona y citocromo *c* (Heinemeyer *et al.*, 2007; Lenaz y Genova, 2010; Schagger, 2001). Recientemente nuestro grupo ha descrito un nuevo

papel de los supercomplejos como unidades estructurales donde el complejo I se ensambla y se activa (*Moreno-Lastres et al., 2012*)

La formación de supercomplejos es necesaria para mantener la estabilidad de sus componentes individuales, por lo que existe una interdependencia estructural entre los complejos de la cadena respiratoria. Esto tiene importantes implicaciones tanto biológicas como biomédicas. En estudios previos realizados en muestras de pacientes, se ha demostrado que mutaciones en genes que codifican subunidades del complejo I pueden afectar a la estabilidad de otros complejos, lo que puede conducir a un déficit enzimático de los complejos I y III, o de los complejos I y IV (*Budde et al., 2000; Saada et al.; Ugalde et al., 2004*). Por otro lado, la ausencia de complejo III y del transportador citocromo c en mamíferos, puede resultar en una disminución de los niveles de complejo I (*Acin-Perez et al., 2004; Blakely et al., 2005; Schagger et al., 2004*) y mutaciones patogénicas en subunidades o en factores de ensamblaje del complejo III, conllevan déficits combinados de los complejos I y III, e incluso del complejo IV en los tejidos afectados (*Diaz et al., 2011; Fernandez-Vizarra et al., 2007; Lamantea et al., 2002; Moran et al., 2010a; Vempati et al., 2009*). Asimismo, en estudios llevados a cabo en híbridos transmitocondriales, mutaciones en subunidades del complejo IV pueden originar deficiencias secundarias de complejo I (*D'Aurelio et al., 2006*). Se desconocen los mecanismos que regulan estas interdependencias estructurales.

3.2 Complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial

El complejo III mitocondrial (CIII, ubiquinol citocromo c oxidoreductasa o complejo *bc1* (E.C.1.10.2.2) cataliza la transferencia de electrones desde el coenzima Q reducido al citocromo c, con una translocación de protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana (*Baum et al., 1967*).

3.2.1 Estructura y función del Complejo III

El complejo III es un homodímero funcional que ha sido cristalizado en varios organismos, incluyendo levadura, pollo y bovino (*Hunte et al., 2000; Iwata et al., 1998; Xia et al., 1997; Zhang et al., 1998*) (Figura 5). En levadura, cada monómero del complejo III está formado por diez subunidades (*Ljungdahl et al., 1987*), de las cuales tres tienen función catalítica: citocromo b, Cob; citocromo *c1*, Cyt1; y la proteína

hierro-azufre de Rieske, Rip1; dichas subunidades contienen centros redox y participan en el transporte electrónico. Las siete subunidades restantes (no catalíticas) no tienen cofactores asociados y son importantes para la estabilidad del complejo (Berden *et al.*, 1988; Crivellone *et al.*, 1988) (Tabla 1). A diferencia de levaduras, el complejo III de mamíferos está formado por once subunidades (Tabla 1). Al igual que en levadura, tiene tres subunidades catalíticas: CYTB, CYC1 y RISP, que contienen grupos prostéticos y las otras ocho constituyen subunidades estructurales o accesorias. La subunidad adicional respecto a levaduras, corresponde al procesamiento de la presecuencia de la proteína RISP, que en vez de proteolizarse se integra en el complejo III (Graham *et al.*, 1994; Graham and Trumpower, 1991; Nett and Trumpower, 1999; Ramabadran and Beattie, 1992).

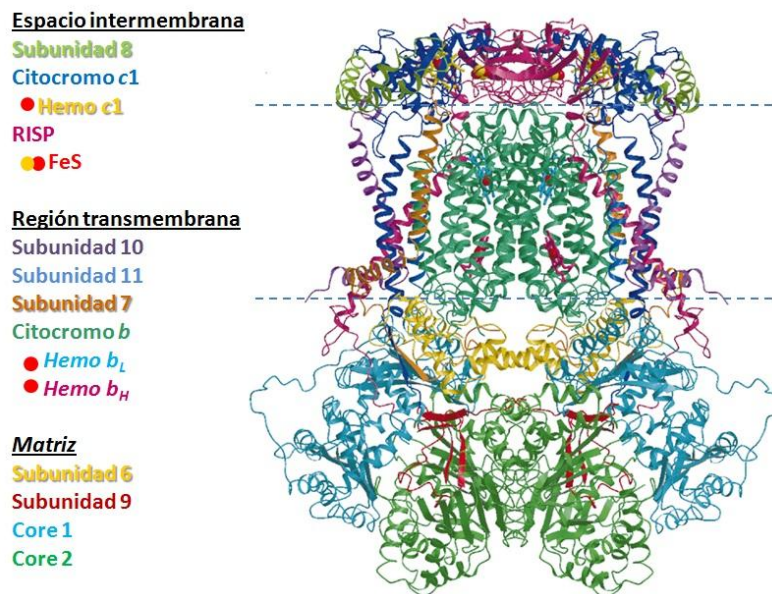


Figura 5. Estructura dimérica del complejo *bc1* mitocondrial de corazón bovino. Cada monómero está formado por 11 subunidades, 10 codificadas en el núcleo y una (citocromo *b*) en el genoma mitocondrial. La masa molecular del dímero es de ~450 kDa (modificado de (Iwata *et al.*, 1998).

La subunidad CYTB es la única codificada por el genoma mitocondrial (Nobrega y Tzagoloff, 1980) y el resto son codificadas por el ADN nuclear (Beckmann *et al.*, 1987; Berden *et al.*, 1988; Phillips *et al.*, 1990). El genoma nuclear también codifica proteínas que promueven la maduración del pre-ARNm y la traducción del ARNm maduro de CYTB (Gampel *et al.*, 1989; Pillar *et al.*, 1983; Rodel, 1986), así como los factores de ensamblaje que ensamblan las distintas subunidades en el complejo

(Bousquet et al., 1991; Crivellone, 1994; Gruschke et al., 2011; Kronekova and Rodel, 2005; Wu and Tzagoloff, 1989).

Tabla 1. Composición del complejo III mitocondrial humano

Gen	SU humano	Centros Redox	Función	aa	PM (kDa)	Cromosoma	SU Levadura
<i>UQCRC1</i>	CORE1	no	Posible mediación de la formación del complejo entre los citocromos <i>c</i> y <i>c</i> ₁	480	52.6	3p21,3	Cor1
<i>UQCRC2</i>	CORE2	no	No catalítica	453	48.4	16p12	Cor2
<i>MT-CYB</i> <i>CYTB</i>	CYTB	hemo <i>b</i> _H hemo <i>b</i> _L	Transferencia electrónica	380	42.7	ADNmt	Cob
<i>CYCI</i>	CYCI	hemo <i>c</i> ₁	Transferencia electrónica	325	35.4	8q24,3	Cyt1
<i>UQCRFS1</i>	Rieske RISP	2Fe.2S	Transferencia electrónica	274	29.7	19q12-q13,1	Rip1
<i>UQCRH</i>	SU 6 Hinge	no	Proteína bisagra (interacciona con CYC1). Podría mediar la formación del complejo entre los citocromos <i>c</i> y <i>c</i> ₁	91	11	1	Qcr6
<i>UQCRB</i>	SU 7	no	Inserción del complejo III en la membrana Bombeo de protones	111	14	8q22	Qcr7
<i>UQCRQ</i>	SU 8 QP-C	no	Junto a CYTB, une ubiquinona Oxidación del centro quinol del QH ₂	82	9.5	5q31,1	Qcr8
<i>UQCRI0</i>	SU 9	no	Interacciona con CYC1 Requerida en la incorporación de RISP	63	7.2	22q12	Qcr9
<i>UQCRI1</i>	SU 10	no	Estabilización de RISP en el complejo III Interacciona con Qcr6p	56	6.4	19p13,3	Qcr10
<i>UQCRFS1</i>	SU 11	no	NC (procesada de RISP)	78	8.0	19q12-q13,1	NO

Se indican las subunidades del complejo III, así como sus funciones asociadas. **PM**: peso molecular en kilodaltons (kDa); **aa**: aminoácido; **SU**: subunidad; **QH₂**: ubiquinol; **H⁺**: protones; **N**: sitio electronegativo de la membrana interna mitocondrial; **P**: sitio electropositivo de la membrana interna mitocondrial; **ADNmt**: ADN mitocondrial; **cit.**: citocromo; **NC**: no conocida.

3.2.2 Función de las subunidades catalíticas: El ciclo Q

El complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial realiza dos funciones bien diferenciadas: por un lado, una reacción redox o transferencia electrónica y por otro, un bombeo de protones, mediante un mecanismo denominado Ciclo Q (Mitchell, 1976).

Estas reacciones redox y la química asociada a los protones tienen lugar en dos centros separados topográficamente, el centro N con carga electronegativa en la matriz mitocondrial y el centro P con carga electropositiva en el espacio intermembrana.

En este ciclo se da la oxidación de dos moléculas de ubiquinol en el centro P. En la oxidación de la primera molécula de ubiquinol se transfieren dos electrones a los grupos hierro-azufre de la subunidad RISP y al hemo b_L del citocromo b (Figura 6). Los grupos reducidos de la subunidad RISP permiten la transferencia electrónica desde los mismos al grupo hemo c_1 . Coincidiendo con la oxidación del ubiquinol, se produce la liberación de dos protones desde el centro P. El segundo electrón se transfiere desde el grupo hemo b_L al hemo b_H del citocromo b, el cual reduce la ubiquinona dando lugar a la formación de un intermediario estable, la ubisemiquinona. La oxidación del segundo ubiquinol en el centro P y la reducción del grupo b_H del citocromo b reduce la ubisemiquinona a ubiquinol, acompañado de la captación de dos protones en el centro N (Hunte *et al.*, 2003).

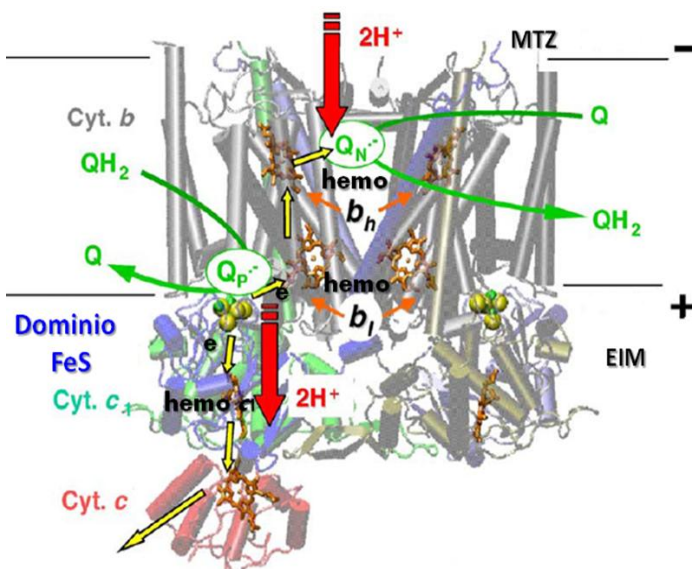


Figura 6. Esquema del Ciclo Q.

El balance del ciclo Q es de 2 moléculas de ubiquinol oxidadas, 2 moléculas de citocromo c (Cyt.c) se reducen, se captan 2 protones desde la matriz (MTZ) y se liberan 4 protones al espacio intermembrana (EIM).

Q: Ubiquinona; QH₂: Ubiquinol; QN⁻: Ubisemiquinona del centro N o electronegativo; QP⁺: Ubisemiquinona del centro N o electropositivo (modificado de (Mulkidjanian, 2005)).

3.2.3 Función de las subunidades accesorias

Además de su papel estructural, se han descrito otras posibles funciones que podrían estar desarrollando las subunidades no catalíticas del complejo III (Tabla 1). Estudios en levaduras demuestran la implicación de Cor1 y Cor2 en el ensamblaje del complejo funcional (Crivellone *et al.*, 1988; Suzuki *et al.*, 1989; Tzagoloff *et al.*, 1986). En modelo bovino, se ha descrito que los ortólogos Core 1 y Core 2 poseen actividad peptidasa y podrían estar implicadas en el procesamiento de otras proteínas de

membrana interna mitocondrial (*Yu et al., 1999*). La subunidad Qcr6 podría estar implicada en la maduración del citocromo *c1* (*Yang y Trumpower, 1994*). La subunidad Qcr7 podría mediar el ensamblaje del complejo III en la membrana interna (*Lee et al., 2001*). Su ortólogo humano, UQCRB, parece jugar un papel importante como mecanismo sensor del oxígeno en la regulación de la respuesta celular a hipoxia (*Jung et al., 2011*). La subunidad Qcr8 participaría en la unión y oxidación del ubiquinol (*Bruel et al., 1996; Hemrika et al., 1993*). La subunidad Qcr9 es esencial para la incorporación de la subunidad Rip1 (*Zara et al., 2009*) y parece estabilizar otras subunidades catalíticas, ya que interacciona con citocromo b en levadura (*Saint-Georges et al., 2002*). Por último, la subunidad Qcrp10 se requeriría para la estabilización de la subunidad Rip1 dentro del complejo *bc1* (*Brandt et al., 1994*).

3.2.4 Biogénesis del Complejo III

Dado el origen bigenómico del complejo III, la biogénesis del complejo III debe ser un proceso altamente coordinado de regulación y señalización entre el núcleo y la mitocondria (*Ryan y Hoogenraad, 2007*). Para la formación de este complejo no solo son necesarias las subunidades proteicas que lo componen. También se requiere de la acción de chaperonas específicas o factores de ensamblaje, cuyas funciones abarcan desde el correcto plegamiento de proteínas diana y posterior ensamblaje en estructuras oligoméricas (*Ellis and van der Vies, 1991*), la formación de grupos prostéticos, hasta la regulación de la maduración y traducción de los transcritos de las distintas subunidades, como en el caso del citocromo b (*Rodel, 1997*).

3.2.4.1 Factores de ensamblaje del Complejo III

Se han descrito hasta la fecha 16 factores de ensamblaje del complejo III, principalmente en levaduras:

3.2.4.1.1 Cbs1, Cbs2, Cbp1 y Cbp2

Las proteínas Cbs1 y Cbs2 están implicadas en la activación de la traducción del ARNm de *cob*, interaccionando con su región 5' no traducida y con el ribosoma mitocondrial (*Rodel, 1986*). Por otro lado, Cbp1 participa en el mantenimiento de la estabilidad del ARNm de *cob*. Cbp2 es una proteína de matriz mitocondrial implicada en el procesado del pre-ARNm de *cob* (*Gampel y Cech, 1991*). Mutaciones en estos genes que codifican proteínas que intervienen en la maduración y estabilización del

ARNm de *cob* provocaron una disminución de la proteína Cob, así como de otras subunidades del complejo III (*Berden et al., 1988; Crivellone et al., 1988*).

3.2.4.1.2 Cbp3, Cbp4 y Cbp6

Las proteínas Cbp3, Cbp4 y Cbp6 son chaperonas moleculares de membrana interna mitocondrial que ejercen su función en estadios tempranos del ensamblaje del complejo III en levaduras (*Crivellone, 1994; Wu y Tzagoloff, 1989*). Inicialmente se describió la posible implicación de Cbp3 en el correcto ensamblaje de las subunidades Rip1 y Cyt1, además de ayudar en la estabilización del supercomplejo III₂+IV (*Shi et al., 2001*). Asimismo, Cbp4 podría tener un papel importante en la incorporación al complejo III de Rip1, Cob, Qcr7 y Qcr8. En un principio se describió que las proteínas Cbp3 y Cbp4 interactúan en complejos de alto peso molecular que podrían representar intermediarios del ensamblaje del complejo III (*Kronekova y Rodel, 2005*). Sin embargo, estudios más recientes apuntan a una interacción entre Cbp3, Cbp4 y Cbp6, formando un complejo que se asociaría a los ribosomas mitocondriales para regular la traducción del citocromo b (*Gruschke et al., 2011; Gruschke et al., 2012*).

3.2.4.1.3 Cyc3 y Cyt2

Cyc3 o citocromo c hemoliasa (CCHL) es una proteína del espacio intermembrana, implicada en los pasos finales de maduración de los citocromos c y c1. Media la unión covalente del grupo hemo a las apo-proteínas apo-Cob y apo-Cyt1 (*Bernard et al., 2003; Dumont et al., 1991; Dumont et al., 1987*).

Cyt2 o citocromo c1 hemoliasa (CC1HL) media, junto con Cyc3, la unión covalente del grupo hemo al apo-Cyt1 (*Zollner et al., 1992, 1994*).

3.2.4.1.4 Cyc2

Cyc2 participa en el mantenimiento de la estabilidad osmótica de la mitocondria (*Pearce et al., 1998; Sanchez et al., 2001*). Inicialmente se describió como una proteína esencial para el correcto importe del citocromo c a la membrana interna mitocondrial (*Dumont et al., 1993; Pearce et al., 1998*). Cyc2 es una hemo reductasa dependiente de NAD(P)H, relacionada con la maduración de los citocromos c y c1 mediante la regulación del estado redox de la reacción de unión del grupo hemo a dichas apo-proteínas (*Bernard et al., 2003; Bernard et al., 2005*). Para ello, Cyc2 formaría un complejo con la proteína Cyc3, el cual reduciría el hierro del grupo hemo antes de su unión a los apo-Cob y apo-Cyt1 (*Corvest et al., 2012*).

3.2.4.1.5 Bca1

Es una proteína de membrana interna mitocondrial con varios dominios transmembrana. Aunque se desconoce su rol exacto, se cree que Bca1 ejerce su función en estadios tempranos del ensamblaje del complejo III, en concreto antes de la inserción de la subunidad Rip1 en el pre-complejo III (*Mathieu et al., 2011*).

3.2.4.1.6 Usb1

Proteína con localización dual en el núcleo y en la mitocondria cuya sobreexpresión puede compensar los defectos de cadena respiratoria provocados por mutaciones en *oxal*. Usb1 se asocia a las subunidades Cor1 y Qcr2 del complejo III (*Glatigny et al., 2011*). Inicialmente Usb1p se definió como una proteína de unión a ARN en levadura (*Scherrer et al., 2010*), por lo que podría estar implicada en el procesamiento y en la estabilidad de algunos ARN mitocondriales (*Glatigny et al., 2011*).

3.2.4.1.7 TTC19

Es una proteína con dominios tetratricopéptidos repetidos (*tetratricopeptide repeat domain 19*) que se encuentra en la membrana interna mitocondrial como parte de dos complejos de alto peso molecular, uno de los cuales colocaliza con el complejo III, lo que sugiere una interacción directa proteína-complejo. Posiblemente interviene en los estadios tempranos del ensamblaje del complejo III, aunque se desconoce su función precisa (*Ghezzi et al., 2011*).

3.2.4.1.8 bcs1/BCS1L

La proteína BCS1L es una chaperona mitocondrial perteneciente a la familia de las AAA-ATPasas, implicada en la inserción de la subunidad RISP en el complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial (*Cruciat et al., 1999; Nobrega et al., 1992*). Las proteínas de esta familia unen nucleótidos, muestran distintas localizaciones subcelulares y ejercen funciones dispares, tales como chaperonas, secreción proteica, fusión a membranas y regulación de la transcripción (*Frickey y Lupas, 2004; Petruzzella et al., 1998*). Estudios recientes en levadura han demostrado que Bcs1 es una translocasa que participa en la translocación y plegamiento de la proteína Rip1/RISP a través de la membrana interna mitocondrial (*Wagener et al., 2011*).

El gen *BCS1L* humano consta de 8 intrones y 9 exones, 7 de los cuales corresponden a la secuencia codificante. Se ha propuesto que existen diferentes especies de ARNm de *BCS1L* con la región 5' UTR procesada de forma alternativa (*Petruzzella et al., 1998; Visapaa et al., 2002*). En humanos, BCS1L es una proteína de membrana

interna mitocondrial de 419 aa que exhibe un 50% de homología con la proteína Bcs1 de levadura (*Nobrega et al., 1992; Petruzzella et al., 1998*). Esta proteína contiene tres motivos en su extremo amino terminal necesarios para su importe a la mitocondria y su correcto procesamiento. Se tratan de un **dominio transmembrana** (del aminoácido 45 al 69), seguido de una **señal interna de importe** al interior de la mitocondria (del aminoácido 69 al 83) que no es procesada. Esta zona está cargada con residuos positivos que ayudarían a la internalización de la proteína en la mitocondria, de forma dependiente de potencial de membrana y de ATP. Además, existe una **región auxiliar** (del aminoácido 83 al 126) que es necesaria para el importe y el correcto procesamiento de la proteína (*Folsch et al., 1996; Stan et al., 2003*). También existe un dominio característico de la familia de las AAA-ATPasas en el extremo carboxilo terminal, de 200 aminoácidos hidrofóbicos y ácidos, que está muy conservado evolutivamente.

La proteína BCS1L humana tiene una función relacionada con Bcs1 de levadura, ya que mutaciones en el gen *BCS1L* dan lugar a un déficit enzimático de complejo III en pacientes (*Blazquez et al., 2009; de Lonlay et al., 2001; De Meirleir et al., 2003; Fernandez-Vizarra et al., 2007; Gil-Borlado et al., 2009; Hinson et al., 2007; Kotarsky et al., 2010; Moran et al., 2010a*). Las mutaciones en *BCS1L* afectan a los últimos pasos del ensamblaje del complejo III, ya que se acumula un pre-complejo III parcialmente ensamblado (*Crivellone et al., 1988; Schoppink et al., 1988*), que puede dimerizar y unirse a otros complejos, aunque no es funcional (*Fernandez-Vizarra et al., 2007; Fernandez-Vizarra et al., 2009*). Ello podría alterar el ensamblaje del respirasoma mitocondrial, reduciendo la actividad de la cadena de transporte electrónico y aumentando la producción de especies reactivas de oxígeno (*Hinson et al., 2007*).

3.2.4.1.9 Mzm1

Es una proteína de matriz mitocondrial perteneciente a la familia de las metaloproteínas. Está implicada en la homeóstasis de los depósitos de zinc mitocondrial y en estadios tardíos del ensamblaje del complejo III de levaduras, donde parece estar interviniendo en la estabilización e incorporación de la proteína Rip1 en el complejo (*Atkinson et al., 2010; Atkinson et al., 2011; Cui et al., 2012*).

3.2.4.1.10 LETM1

La proteína LETM1, ortóloga de Mdm38 en levaduras, está localizada en la membrana interna mitocondrial (*Schlickum et al., 2004*), expuesta hacia la matriz y oligomerizada en varios complejos de alto peso molecular (Dimmer et al., 2008). Se ha descrito su implicación en la regulación del intercambio K^+/H^+ mitocondrial, en el

control de la homeostasis, en el mantenimiento de la morfología mitocondrial y en la viabilidad celular (*Dimmer et al., 2008; Nowikovsky et al., 2004*). Asimismo, se ha descrito la implicación de LETM1 como intercambiador mitocondrial de $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ en *Drosophila* (*Jiang et al., 2009*) y en células endoteliales humanas (*Waldeck-Weiermair et al., 2011*). Mdm38p juega también un papel crítico en la biogénesis de la cadena respiratoria mediante su unión a los ribosomas mitocondriales para el importe de las subunidades citocromo b y COX1 a través de la membrana interna (*Frazier et al., 2006*). Esto se ha corroborado en estudios en células *HeLa*, donde LETM1 se uniría al ribosoma mitocondrial a través de la proteína ribosomal L36, ejerciendo así un papel como regulador de la producción de ATP mitocondrial (*Piao et al., 2009*). Además, se ha descrito la interacción de LETM1 con el factor de ensamblaje BCS1L (apartado 3.2.4.1.8), que es necesaria para la formación o estabilidad de los complejos LETM1. Ambas proteínas poseen un papel crucial en el correcto ensamblaje de los supercomplejos mitocondriales y en el mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial (*Tamai et al., 2008*).

3.2.4.2 Ensamblaje del Complejo III

Se desconoce el proceso de biosíntesis del complejo III en mamíferos, pero se ha propuesto un modelo de ensamblaje de dicho complejo en levaduras (*Berden et al., 1988; Grivell, 1989; Tzagoloff, 1995; Zara et al., 2004*). La biogénesis del complejo III se iniciaría con la traducción e inserción en la membrana interna de la subunidad mitocondrial Cob (CYTB), de tal manera que se añadirían a este núcleo central otras subunidades catalíticas y supernumerarias. La síntesis de Cob ocurriría preferentemente en aquellos ribosomas donde se une el complejo formado por los factores de ensamblaje Cbp3, Cbp4 y Cbp6 (Figura 7A) (*Gruschke et al., 2011*).

A este núcleo se unirían en primer lugar las subunidades nucleares Qcr7 (UQCRB) y Qcr8 (UQCRQ), formando un subcomplejo temprano de ensamblaje de 230 kDa (Figura 7A). A este subcomplejo se añadirían posteriormente las subunidades Cor1 (CORE1), Cor2 (CORE2), la subunidad catalítica Cyt1 (CYC1) y Qcr6 (UQCRH) así como los factores de ensamblaje Bca1 y Cyt2. A este segundo subcomplejo se asociaría en un paso posterior la subunidad Qcr9 (UQCR10) formando el subcomplejo de ensamblaje tardío de 500 kDa, que también contiene el factor de ensamblaje Bcs1 (BCS1L) (Figura 7B). El factor Bcs1, junto con otro factor de ensamblaje adicional Mzm1, es esencial para la incorporación de la subunidad Rip1 (RISP) (*Atkinson et al.,*

2011; Nobrega *et al.*, 1992). La subunidad Qcr10 (UQCR11) sería la última subunidad en insertarse en el complejo *bc*₁.

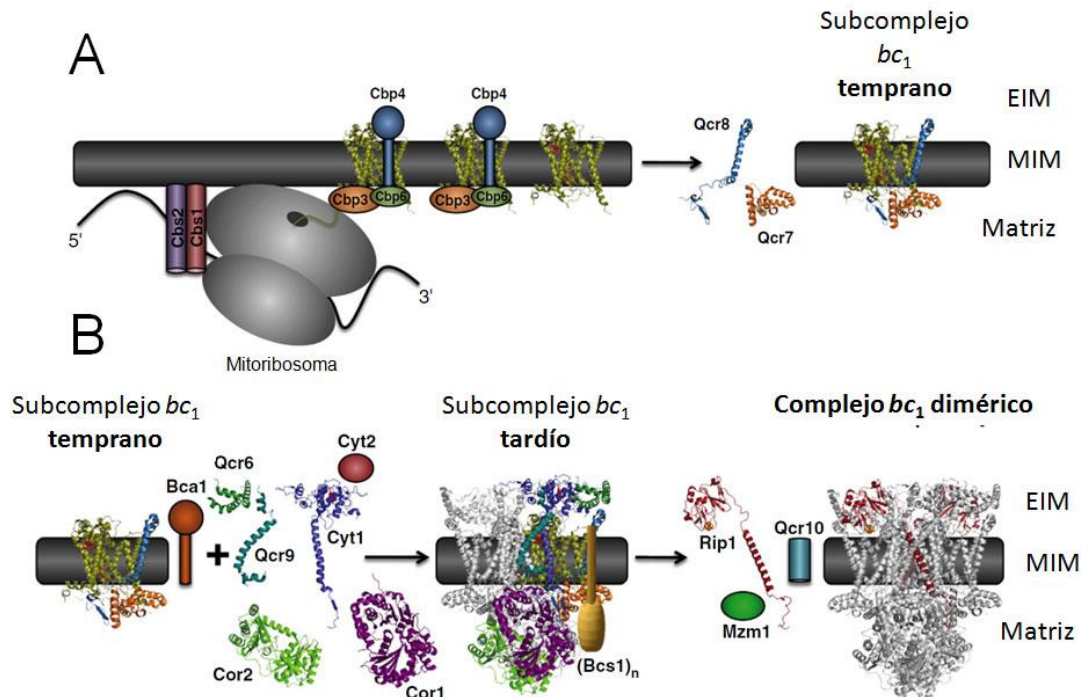


Figura 7. Modelo de ensamblaje del complejo *bc*₁ en levadura. En primer lugar se produce la traducción de la subunidad mitocondrial *Cob* que con la ayuda de los factores de ensamblaje *Cbp3*-*Cbp4*-*Cbp6* quedaría plegada e insertada en la membrana interna mitocondrial. Posteriormente, se formaría el subcomplejo *Qcr8*/*Qcr7*/*Cob* al que se asocian las subunidades *Cor1*, *Cor2*, *Cyt1*, *Qcr6* y *Qcr9* formando el subcomplejo *bc*₁ tardío. *Bcs1* se asociaría a este subcomplejo y participaría junto a *Mzm1* en la incorporación de la subunidad catalítica *Rip1*. La subunidad *Qcr10* sería la última subunidad en insertarse en el complejo *bc*₁ (modificado de (Smith *et al.*, 2012).

4. ENFERMEDADES MITOCONDRIALES DEL SISTEMA OXPHOS

Enfermedades mitocondriales son aquellas en las que el defecto genético ocurre en proteínas implicadas en el mantenimiento, funcionamiento y constitución de la cadena respiratoria mitocondrial, perjudicando directamente al sistema de fosforilación oxidativa. Dado el amplio número de procesos celulares en los que interviene la mitocondria, no es de extrañar que se produzcan efectos fisiopatológicos diversos debido a estos fallos del sistema OXPHOS, provocando un amplio número de enfermedades y síndromes que abarcan prácticamente todas las especialidades médicas. Respecto a la epidemiología de las enfermedades mitocondriales, se considera que uno de cada 5000 nacidos vivos está afectado por una patología de origen mitocondrial (Horvath *et al.*, 2008). Debido al origen bi-genómico del sistema OXPHOS, las

enfermedades mitocondriales pueden ser debidas a mutaciones en genes del ADNmt o en genes nucleares (*Smeitink et al., 2001*), que codifican no solo las subunidades de sistema OXPHOS, sino también proteínas reguladoras y factores de ensamblaje, involucrados en la biogénesis del sistema OXPHOS y en su función (*Fernandez-Vizarra et al., 2007*).

4.1 Déficit enzimático del Complejo III

El déficit enzimático de complejo III [OMIM 124000] es un defecto poco común del sistema OXPHOS. Está asociado con una amplia variedad de enfermedades musculares y neurológicas, presentando manifestaciones clínicas de distinta severidad (*Benit et al., 2009; Borisov, 2002; Scaglia et al., 2004*).

4.1.1 Mutaciones en genes mitocondriales: *CYTB*

Hasta hace relativamente poco tiempo, las mutaciones en el gen citocromo *b* (*MT-CYB*, *CYTB*) [OMIM 516020], constituían la causa más frecuente de déficit enzimático del complejo III (*Andreu et al., 1999b*). Hoy en día se considera que dichas mutaciones representan un pequeño porcentaje del total de pacientes con déficit enzimático del complejo III. Las mutaciones en este gen pueden estar asociadas tanto a un déficit aislado del complejo III, como a un déficit combinado de los complejos I y III. Ello es posiblemente debido a la interdependencia que existe entre estos dos complejos para formar supercomplejos activos enzimáticamente (*Acin-Perez et al., 2004; Blakely et al., 2005; Lamantea et al., 2002; Schagger et al., 2004*).

Hasta ahora se han descrito 27 mutaciones diferentes en *CYTB*. Clínicamente, los síntomas asociados con las mutaciones en son variables y despliegan un amplio espectro de enfermedades neuromusculares y miopatías. Mayoritariamente se dan en adultos que cursan intolerancia al ejercicio, debilidad proximal de extremidades y acidosis láctica (*Andreu et al., 1999a; Andreu et al., 1999b; Benit et al., 2009; Borisov, 2002; Legros et al., 2001; Mourmans et al., 1997*), así como en niños que padecen cardiomiopatía asociada a fibras rojo rasgadas (FRR) (*Cormier et al., 1991; Keightley et al., 2000*). Existen otras manifestaciones multisistémicas que incluyen síntomas que afectan al sistema nervioso central (*Keightley et al., 2000; Wibrand et al., 2001*).

4.1.2 Mutaciones en genes estructurales nucleares

Las mutaciones en genes estructurales nucleares son raras y hasta ahora solamente dos genes se han asociado a un déficit enzimático de complejo III: *UQCRQ* [OMIM 609653] (Barel et al., 2008) y *UQCRB* [OMIM 609653] (Haut et al., 2003).

El gen *UQCRQ* codifica la subunidad 8 del complejo III, también llamada QP-C. Esta proteína de 9,5 kDa se une a ubiquinona (*Usui et al., 1990; Yu et al., 1995*). La primera mutación sin sentido en *UQCRQ* se detectó en una familia israelí que presentaba retraso psicomotor severo y signos extrapiramidales (*Barel et al., 2008*). Esta mutación consistía en un cambio homocigótico c.208C>T en el exón 2 de *UQCRQ*, provocando el cambio de una serina a una fenilalanina en el residuo aminoacídico 45 (p.Ser45Phe).

El gen *UQCRB* codifica la subunidad 7 del complejo III, una proteína de 13,4 kDa que se cree que participa en la transferencia de electrones cuando se une ubiquinona (*von Jagow et al., 1986; Wakabayashi et al., 1985*). Se detectó una delección homocigótica en un paciente turco de padres consanguíneos que presentaba déficit aislado del complejo III, acidosis láctica, con episodios esporádicos de hipoglucemia y disfunción hepática. Esta delección abarcaba los nucleótidos 338-341 del ADNc de *UQCRB*, provocando una sustitución en los últimos siete aminoácidos y la adición de 14 aminoácidos en el extremo C-terminal de la proteína (*Haut et al., 2003*).

4.1.3 Mutaciones en factores de ensamblaje

Se han descrito hasta el momento mutaciones en dos genes relacionados con el correcto ensamblaje y funcionamiento del complejo III y que provocan déficit enzimático de complejo III: *BCS1L* [OMIM 603647] y *TTC19* [OMIM 613814].

4.1.3.1 Mutaciones en TTC19

Recientemente se han identificado mutaciones en el factor de ensamblaje TTC19 en cuatro pacientes de origen italiano con un déficit severo de complejo III. Dichos pacientes presentaron alteraciones neurológicas tardías, lesiones en el putamen y en la *substancia nigra*, además de atrofia cerebelar y fallo neurológico progresivo (*Ghezzi et al., 2011*). Estas observaciones en pacientes humanos se corroboraron en el modelo de *Drosophila*, donde la eliminación del gen homólogo provocaba graves alteraciones neurológicas.

4.1.3.2 Mutaciones en *BCS1L*

La mayoría de las mutaciones que originan un déficit de complejo III se han descrito en el gen *BCS1L* (Diaz *et al.*, 2011; Fernandez-Vizarra *et al.*, 2009; Moran *et al.*, 2010a). En 2001, se describió la primera mutación en *BCS1L* en seis pacientes no consanguíneos con cuadros clínicos de acidosis metabólica neonatal, tubulopatía proximal, fallo hepático y encefalopatía. Estudios en levadura confirmaron los efectos deletéreos de estas mutaciones (de Lonlay *et al.*, 2001). Desde entonces se han descrito más de 25 mutaciones patogénicas que afectan a la función de BCS1L. Dichas mutaciones conducen a tres fenotipos clínicos: 1) El más benigno es el Síndrome de Björnstad [OMIM 262000], enfermedad autosómica recesiva caracterizada por sordera neurosensorial y *pili torti* (Hinson *et al.*, 2007); 2) Un fenotipo clínico intermedio representado por el déficit enzimático del complejo III en neonatos, niños o adultos que cursan con encefalopatía, única o en combinación con otros signos neurológicos, acidosis metabólica, sobrecarga de hierro, tubulopatía neonatal proximal y fracaso hepático (Al-Owain *et al.*, 2012; Blazquez *et al.*, 2009; de Lonlay and Seta, 2009; De Meirleir *et al.*, 2003; Fernandez-Vizarra *et al.*, 2007; Gil-Borlado *et al.*, 2009; Kotarsky *et al.*, 2010; Leveen *et al.*, 2011; Lynn *et al.*, 2012; Ramos-Arroyo *et al.*, 2009; Tuppen *et al.*, 2010). Otras características clínicas incluyen microcefalia, hipotonía, defectos oculares, características dismórficas, sordera y anomalías capilares; 3) El fenotipo clínico más grave es el síndrome de GRACILE [OMIM 603358], una enfermedad hereditaria detectada en la población finlandesa, que está causada por la mutación homocigótica c.232A>G (p.S78G). Se caracteriza por retraso en el crecimiento, aminoaciduria, colestasis, sobrecarga de hierro, acidosis láctica, y muerte temprana (Fellman, 2002; Kotarsky *et al.*, 2010; Visapaa *et al.*, 2002). Los neonatos afectados presentan retraso en el crecimiento y suelen desarrollar anemia de Fanconi, aminoaciduria, colestasis con fallo hepático progresivo y sobrecarga de hierro con hemosiderosis. Todos los pacientes fallecen a las pocas semanas de nacer. No presentan signos dismórficos o neurológicos, probablemente debido a la pronta aparición y rápida evolución de la enfermedad. Estudios en pacientes con Síndrome de GRACILE, así como en un modelo murino para el este síndrome (Leveen *et al.*, 2011), revelaron un déficit enzimático del complejo III así como una sobrecarga de hierro, sugiriendo un papel adicional de *BCS1L* en el metabolismo del hierro (Visapaa *et al.*, 2002). En este aspecto, el síndrome de GRACILE y la manifestación más grave de déficit enzimático del complejo III son tan solo sutilmente diferentes.

OBJETIVOS

El déficit del complejo III mitocondrial está asociado a un grupo muy heterogéneo de enfermedades neuromusculares y alteraciones multisistémicas de severidad variable, que pueden originarse en niños y adultos. La mayor parte de las subunidades del complejo III están codificadas por genes nucleares, así como un elevado número de proteínas reguladoras y factores de ensamblaje implicados en la biosíntesis de dicho complejo en diferentes organismos. Desde el punto de vista clínico y genético, el déficit enzimático del complejo III puede clasificarse en defectos funcionales debidos a mutaciones en genes que codifican componentes estructurales, o aquellos causados por mutaciones en factores de ensamblaje, tales como *BCS1L*.

El principal objetivo de este trabajo fue **caracterizar las consecuencias fisiopatológicas celulares de las mutaciones en el gen *BCS1L*** en fibroblastos de seis pacientes con déficit enzimático del complejo III mitocondrial, a fin de mejorar el diagnóstico de las patologías mitocondriales asociadas a dicho fallo enzimático. Dentro de este interés, los objetivos concretos de esta tesis se dividieron en tres partes:

- 1) Establecer correlaciones genotipo-fenotipo en fibroblastos portadores de mutaciones en el gen *BCS1L*, mediante el análisis comparativo de la localización y niveles de la proteína BCS1L y de las subunidades de los complejos de la cadena respiratoria, las actividades de los complejos de la cadena respiratoria respecto al ensamblaje o estabilidad de los complejos OXPHOS individuales, la arquitectura de la red mitocondrial, la bioenergética y el estrés oxidativo determinando el potencial de membrana mitocondrial, la producción de especies reactivas del oxígeno y los niveles de las defensas antioxidantes y por último, la muerte celular.
- 2) Caracterizar la interacción entre las proteínas BCS1L y LETM1, así como evaluar el impacto de las mutaciones en *BCS1L* sobre dicha interacción y sobre el ensamblaje o estabilidad de los supercomplejos mitocondriales del sistema OXPHOS. Con ello se pretende mejorar el conocimiento sobre la biogénesis del respirasoma humano.
- 3) Identificar las vías celulares afectadas en las patologías mitocondriales asociadas al déficit enzimático del complejo III, mediante un estudio de expresión proteica diferencial en fibroblastos control y de pacientes con mutaciones en *BCS1L*, que permita identificar nuevos biomarcadores y posibles dianas terapéuticas para este tipo de enfermedades.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. PACIENTES

Este estudio se realizó con muestras de fibroblastos procedentes de 6 pacientes con mutaciones en el gen *BCSIL*, en los que previamente se había detectado un déficit enzimático primario del complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial en músculo esquelético, de forma aislada o combinada con déficits de los complejos I o IV. Dichas mutaciones fueron caracterizadas genética y bioquímicamente para demostrar su patogenicidad (*Blazquez et al., 2009; de Lonlay et al., 2001; De Meirleir et al., 2003; Gil-Borlado et al., 2009; Moran et al., 2010a*).

El resumen de los cuadros clínicos más relevantes de los pacientes de estudio aparece en la Tabla 2, así como sus características genéticas y bioquímicas más relevantes.

A continuación, se resumen brevemente las clínicas de los pacientes de estudio:

➤ Paciente 1

La paciente 1 (P1) era una niña de 11 días de edad, nacida de padres consanguíneos de origen turco. La paciente presentó hipotonía severa acompañada de una marcada acidosis láctica, reflejos débiles, disfunción renal y hepatomegalia, acompañada de un aumento en las enzimas hepáticas y en los niveles de alanina. También se observaron concentraciones bajas de albúmina, niveles elevados de ferritina y un descenso en la capacidad de unión a hierro y en los niveles de transferrina. Las actividades enzimáticas de la cadena respiratoria mitocondrial en fibroblastos, reflejaron un déficit combinado de los complejos I y III (Tabla 3). El gen *BCSIL* se secuenció en nuestro laboratorio en base a las características clínicas de la paciente descritas en (*Moran et al., 2010a*); por lo tanto, no se le practicó biopsia muscular.

➤ Pacientes 2 y 3

Los pacientes 2 y 3 (P2 y P3) eran dos hermanos cuyas características clínicas completas fueron descritas en (*De Meirleir et al., 2003*). En resumen, estos pacientes presentaron acidosis láctica, hipoglucemia, hipotonía, hepatopatía y un meconio grueso. Además, el paciente P2 presentaba encefalopatía, tubulopatía y fallo en el crecimiento. Respecto a las actividades enzimáticas de cadena respiratoria, estos pacientes presentaron un déficit aislado de complejo III en músculo (Tabla 2) y déficits combinados de los complejos I y III en fibroblastos (Tabla 3).

➤ Paciente 4

El paciente 4 (P4) aparece descrito detalladamente en (*Gil-Borlado et al., 2009*). Este paciente presentó acidosis láctica, tubulopatía, hepatopatía, hipoglucemia e hipotonía, retraso en el desarrollo y microcefalia. Las actividades enzimáticas de la cadena respiratoria mitocondrial mostraron un déficit aislado del complejo III en tejido muscular (Tabla 2) y un déficit combinado de los complejos III y IV en fibroblastos de piel (Tabla 3).

➤ Paciente 5

La paciente 5 (P5) era una niña de 19 meses de edad de padres no consanguíneos, diagnosticada con Síndrome de Leigh acompañado de disfunción hepática y tetraparesia espástica. Las actividades de cadena respiratoria mostraron un déficit aislado del complejo III en músculo (Tabla 2), no viéndose afectadas las actividades en fibroblastos (Tabla 3).

➤ Paciente 6

El paciente 6 (P6) es un niño de padres no consanguíneos, que con 6 meses de edad presentó hipotonía, retraso psicomotor, hepatopatía y características dismórficas. La analítica en sangre mostró hipoglucemia leve y acidosis láctica. El estudio de cadena respiratoria mitocondrial en homogenado muscular reveló un déficit enzimático aislado del complejo III (Tabla 2). En fibroblastos también se observó un déficit leve del complejo III (Tabla 3).

2. MATERIALES

2.1 Muestras biológicas de pacientes y controles

Se utilizaron fibroblastos procedentes de biopsias de piel de los 6 pacientes en estudio. Las líneas de los pacientes P1, P2, P3 fueron cedidas por la Dra. Sara Seneca (*Center of Medical Genetics, AZ-VUB, Bruselas*). Los fibroblastos procedentes del paciente P4 fueron cedidos por la Dra. Celia Pérez Cerdá (*CBMSO, Madrid*). Los explantes de los pacientes P5 y P6 fueron extraídos en el Hospital 12 de Octubre (Madrid) y cultivados en nuestro laboratorio.

Se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes siguiendo la normativa del comité ético del Hospital 12 de Octubre de Madrid, compatible con la Declaración de Derechos Humanos de Helsinki.

Como controles se utilizaron cultivos primarios de fibroblastos con dos orígenes diferentes:

- a) Cultivos comerciales de fibroblastos neonatales primarios (Lonza). Estas líneas son: *Normal Human Dermal Fibroblasts (Neonatal skin) NHDF 16102*, denominada C1 y *Normal Human Dermal Fibroblasts (Neonatal skin) NHDF 15820*, denominada C2.
- b) Fibroblastos provenientes de familiares de pacientes para los que no había evidencia de enfermedad mitocondrial, en un rango de edades desde la infancia a la edad adulta y en proporción equivalente de sexos. Estas muestras proceden del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre y se han denominado C3, C4 y C5.

Tabla 2. Características clínicas, bioquímicas y genéticas de los pacientes de estudio con mutaciones en *BCS1L*.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6
Sexo	Mujer	Varón	Mujer	Varón	Mujer	Varón
Edad de inicio síntomas	Al nacer	Al nacer	Al nacer	Al nacer	19 meses	6 meses
Edad de muerte	7 meses	3 meses	3 semanas	11 meses	Viva (6 años)	Vivo (5 años)
Retraso en el desarrollo	+	+	+	-	-	+
Acidosis Láctica	+	+	+	+	+	+
Tubulopatía	+	+	-	+	-	-
Hepatopatía	+	+	+	+	+	+
Hipoglucemia	-	+	+	+	-	+
Fallo en el crecimiento	+	+	-	+	+	+
Encefalopatía	-	+	-	-	+	-
Hipotonía	+	+	+	+	-	+
Mareos	+	-	-	-	+	-
Microcefalia	+	-	-	+	-	+
Otros síntomas		Ptosis		Anemia	Tetraparesia espástica	Sordera neurosensorial leve
RMN cerebral	n.d.	Retraso en la mielinización	Normal	Normal	Lesiones sustancia blanca y gris	Normal
Sobrecarga de hierro	Sí	Sí	Sí	No	n.d.	No
% Actividad CI	n.d.	Normal	n.d.	n.d.	Normal	Normal
% Actividad CIII	n.d.	64%	39%*	30%	38%	26%
% Actividad CIV	n.d.	Normal	Normal*	Normal	Normal	Normal
Mutaciones en <i>BCS1L</i>	[p.P99L]+ [p.P99L]	[p.R56X]+ [p.R45C]	[p.R56X]+ [p.R45C]	[p.R56X]+ [g.1181A>G], [g.1164C>G]	[p.R184C] + [?]	[p.T50A]+ [p.T50A]

Las actividades de cadena respiratoria en homogenados musculares (excepto *: en fibroblastos) se expresan como porcentajes de las actividades enzimáticas residuales relativas a la media de los controles. CI, complejo I; CIII, complejo III; CIV, complejo IV; n.d., no determinado.

Tabla 3. Actividades residuales de las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial en fibroblastos de los pacientes de estudio.

	Complejo I	Complejo II	Complejo III	Complejo IV	CS
Rango controles (n=11)	26-50	10-18	28-87	52-105	60-160
Media controles \pmSD	37 \pm 10	14 \pm 3	60 \pm 27	85 \pm 26	125 \pm 44
Paciente 1	21,4	16,4	17,5	50,7	85
Paciente 2	24,0	16,7	17,8	62,2	103
Paciente 3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Paciente 4	29,4	9,3	18,5	44,1	65
Paciente 5	30,0	11,7	36,2	76,1	101
Paciente 6	27,1	11,2	27,1	59,5	105

Las enzimas de cadena respiratoria se expresan como $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína. Los valores anormales se han resaltado en negrita. Las actividades enzimáticas del paciente 3 se han descrito previamente en (*De Meirleir et al., 2003*) y están indicadas en la Tabla 2. CS, citrato sintasa; n.d., no determinado.

2.2 Reactivos, soluciones y tampones

Las soluciones y tampones de uso común empleados en este trabajo se realizaron de acuerdo con las descripciones detalladas en (*Sambrook y Russel, 2001*). La composición de los medios específicos utilizados en cada experimento viene detallada y descrita en el apartado de métodos o en la bibliografía correspondiente.

2.3 Anticuerpos

Los anticuerpos primarios utilizados en inmunoprecipitaciones e inmunofluorencias, así como en los análisis de *Western-blot* (apartado 3.6.7.), aparecen descritos en la Tabla 4. En la Tabla 5, aparecen los anticuerpos secundarios utilizados. En estas tablas también se indican las diluciones de uso, además de las casas comerciales donde fueron adquiridos.

Tabla 4. Anticuerpos primarios empleados en este trabajo.

ANTICUERPO	PESO MOLECULAR	ORIGEN	FABRICANTE	UTILIDAD DILUCIÓN
BCS1L	47,5 kDa	Conejo	Abnova, Proteintech	WB 1:1000

MATERIALES Y MÉTODOS

BCS1L	47,5 kDa	Ratón	Abnova	IP/WB 1:1000
Caspasa 3	35 kDa	Ratón	BD Biosciences	WB 1:1000
Caspasa 8	57/46.5 kDa	Ratón	Cell Signaling Technology	WB 1:1000
Caspasa 9	47/37/35 kDa	Ratón	Cell Signaling Technology	WB 1:1000
Catalasa	60 kDa	Ratón	Sigma	WB 1:10000
Citocromo c	35/19/17 kDa	Conejo	Cell Signaling Technology	WB 1:4000
CORE2	48,5 kDa	Ratón	Molecular Probes	WB 1:600
COX2	25,6 kDa	Ratón	Molecular Probes	WB 1:1000
COX5A	16,8 kDa	Ratón	Molecular Probes	WB 1:2000
DRP1	79 kDa	Ratón	BD Biosciences	WB 1:1000
Gelsolina	83 kDa	Ratón	Sigma	WB 1:2000
Gelsolina	83 kDa	Conejo	Abcam	IP/ WB 1:1000
GPx	~28 kDa	Ratón	Assay Designs	WB 1:1000
GR	58 kDa	Ratón	Abcam	WB 1:10000
LETM1	83 kDa	Ratón	Abnova	IP/ WB 1:2000
MFN2	86 kDa	Ratón	Abnova	WB 1:1000
MnSOD	22 kDa	Ratón	Sigma	WB 1:10000
NDUFA9	39 kDa	Ratón	Molecular Probes	WB 1:1000
NDUFS3	30 kDa	Ratón	Molecular Probes	WB 1:1000
OPA1	80-100 kDa	Ratón	BD Biosciences	WB 1:1000
Porina	31 kDa	Ratón	Mitosciences	WB/ IF 1:1000
RISP	29,6 kDa	Ratón	Molecular Probes	WB 1:1000
SDHA	70 kDa	Ratón	Molecular Probes	WB 1:1000
VDAC	31kDa	Ratón	Abcam	WB 1:1000
α - H ⁺ ATP sintasa	~ 50 kDa	Ratón	Mitosciences	IF 1:1000
β -Actina	42 kDa	Ratón	Sigma	WB 1:40000

En la tabla se indica la proteína que reconoce el anticuerpo, el peso molecular aparente que muestra en SDS-PAGE, el origen animal del anticuerpo, la compañía comercial, la utilidad experimental y la dilución empleada. WB, *Western-blot*; IP, Inmunoprecipitación; IF, Inmunofluorescencia.

Tabla 5. Anticuerpos secundarios empleados en este trabajo

ANTICUERPO	ORIGEN	ACOPLADO A	FABRICANTE	UTILIDAD DILUCIÓN
Alexa Fluor® 488 anti-IgG _{2b} (γ2b) de ratón	Cabra	Alexa Fluor 488	Molecular Probes	IF 1:1000
FITC anti-IgG ₁ de ratón	Conejo	FITC	Mitosciences	IF 1:1000
GAMPO Anti-IgG de ratón	Cabra	Peroxidasa	Molecular Probes	WB 1:1200
GARPO Anti-IgG de conejo	Cabra	Peroxidasa	Molecular Probes	WB 1:1200
TXRD anti-IgG _{2b} de ratón	Cabra	Texas Red	Mitosciences	IF 1:1000

En la tabla se indica el anticuerpo, el origen animal del anticuerpo, molécula que lleva acoplada, la compañía comercial donde fue adquirido, así como la utilidad experimental que se les ha dado en esta tesis y la dilución empleada. WB, *Western-blot*; IF, Inmunofluorescencia.

3. MÉTODOS

3.1 Cultivos celulares

3.1.1 Mantenimiento de los cultivos celulares

Las células se cultivaron a una temperatura de 37°C en una atmósfera de 5% CO₂, 95% aire y 99% de humedad. Tanto para los cultivos primarios de fibroblastos procedentes de pacientes como de controles, se utilizó el medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium*) a 4,5g/l glucosa o 1g/l glucosa (Invitrogen), complementado con suero fetal bovino (FBS: *fetal bovine serum*) al 10% y 100 U/ml de penicilina-estreptomicina (Lonza).

La descongelación de las diferentes líneas se realizó mediante inmersión de criotubos (Nunc, Thermo Fisher) en un baño a 37°C y su posterior cultivo. Para el subcultivo de las distintas líneas celulares se desagregaron de la placa mediante un tratamiento con Tripsina-EDTA (0,5 mg/ml tripsina, 0,22 mg/ml EDTA) (Lonza) a 37°C. Posteriormente se sembraron en botellas de cultivo T-75 o T-175 (Nunc, Thermo Fisher) en función del número de células necesarias para el experimento. Los

fibroblastos se pasaron cuando alcanzaron el 80-90% de confluencia, mediante dilución 1/6 en controles y 1/3-1/4 en pacientes.

Para la congelación de estas células se utilizó una solución de congelación consistente en un 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma), en el medio de cultivo DMEM. Una vez desagregadas las células según se ha descrito y centrifugadas, éstas se resuspendieron en 1 ml de esta solución y se introdujeron en criotubos. Estos criotubos se colocaron en contenedores con 2-propanol (Sigma) a temperatura ambiente y se depositaron en congeladores de -80°C.

Se testó la presencia de *Mycoplasma* en estas líneas celulares mediante tinción con DAPI y microscopía de fluorescencia, dando resultados negativos.

3.1.2 Ensayos de proliferación celular

Los fibroblastos de pacientes y controles se cultivaron en placas M12. Diariamente, se tripsinizaron las células correspondientes a 3 pocillos por cada condición. Una alícuota de la suspensión celular se diluyó 1:10 en solución *Trypan Blue* al 0.5% (Sigma), colorante capaz de penetrar y teñir únicamente las células muertas. Se aplicaron 10 µl de la dilución en cámara de contaje *Neubauer*. Se contaron las células vivas de los 4 campos independientes. Posteriormente, se aplicó la fórmula:

$$\text{Nº Células} = \text{promedio células en 4 campos} \times 10^4 \times 10^{(\text{dilución})} \times \text{ml totales}$$

Este proceso se llevó a cabo diariamente durante 5 días.

3.2 Inmunofluorescencia

Mediante esta técnica se puede evaluar la localización subcelular de una molécula determinada. A través del uso de anticuerpos secundarios acoplados a fluorocromos diferentes, esta técnica puede aplicarse a distintas proteínas de forma simultánea, permitiendo el análisis de colocalización doble o triple entre las diferentes proteínas.

Los fibroblastos se sembraron en cubreobjetos de vidrio estériles y se colocaron en placas de 24 pocillos (Nunc). Cuando la confluencia de las células fue del 60-70%, se lavaron los pocillos dos veces con tampón fosfato salino (PBS) (Lonza) durante 5 minutos y se procedió a la fijación, proceso por el cual las células mueren manteniendo las propiedades fisicoquímicas inalteradas. Para ello, se incubaron a 37°C durante 15 minutos en una solución de paraformaldehído (PFA) (Sigma) al 4% en PBS

previamente atemperada. Finalizada la incubación, se hizo un lavado rápido con 0,5 ml de PBS por pocillo y 2 lavados de 10 minutos con 1 ml PBS por pocillo.

Después de los lavados con PBS, se procedió a la permeabilización de las células durante 15 minutos con 0,1% Triton X-100 y seguidamente se bloquearon con un 10% de suero de cabra en PBS durante 60 minutos a temperatura ambiente. Finalizado el bloqueo, se incubaron en cada experimento correspondiente los anticuerpos primarios citados en el apartado 2.3 de Materiales e indicados en la Tabla 4 de este apartado.

Para los ensayos de inmunofluorescencia se usaron distintos anticuerpos primarios, que figuran en la Tabla 6. En el caso del anticuerpo que reconoce la proteína de membrana externa mitocondrial VDAC (*Voltage Dependent Anion-Channel*), se realizó un paso previo a la permeabilización con Triton X-100, consistente en hervir los cubreobjetos durante 10 minutos en una solución de Tris 100 mM, Urea 5% pH 9.5 a 95°C en placas de vidrio. Se lavaron después dos veces con 1 mL de PBS antes de la permeabilización y se procedió igual que se ha indicado en el párrafo anterior. Una vez incubados los anticuerpos primarios correspondientes durante 1 hora, se volvieron a lavar los cubreobjetos cuatro veces durante 10 minutos con 1% de suero de cabra en PBS y se incubaron los anticuerpos secundarios correspondientes a cada experimento.

Tabla 6. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en los experimentos de inmunofluorescencia

Anticuerpo Primario	Concentración utilizada	Anticuerpo Secundario	Concentración utilizada
α - H ⁺ ATP sintasa	2 μ g/ml	Anti-IgG2b TXRD	2 μ g/ml
VDAC	5 μ g/ml	Anti-IgG2b TXRD	2 μ g/ml
Gelsolina	1 μ /ml	Anti-IgG1 FITC	2 μ g/ml

Anticuerpos primarios y los secundarios correspondientes a la derecha del primario, indicando en cada caso las concentraciones experimentales.

Se retiró el anticuerpo secundario y tras lavar los cubreobjetos de la misma manera que se hizo para el anticuerpo primario, tras el último lavado se pasaron por agua, se secaron y se montaron sobre portaobjetos con *ProLong Gold*. Después de dejarlos secar 24 horas en la oscuridad, se observaron con un objetivo 63x en un microscopio confocal *Zeiss LSM 510 META* (*Zeiss, Germany*).

3.3 Ensayos de colocalización

Se realizaron los ensayos de inmunofluorescencia según el protocolo descrito en el apartado 3.2, con anticuerpos primarios que reconocían las proteínas VDAC y gelsolina en las concentraciones indicadas en la Tabla 6. Los ensayos de colocalización se realizaron con un microscopio confocal *Zeiss LSM 510 META (Zeiss, Germany)* usando un objetivo de 63× (Plan-apocromático NA=1.4.). Las imágenes fueron obtenidas a 1024×1024 píxeles (1 píxel=0,14 μm) en un plano focal de 0,5 μm. Para la colocalización de gelsolina y VDAC se usó el programa *ImageJv.1.45g (Wayne Rasband, National Institute of Health)*, en el que se procedió a la separación de los canales de cada imagen original, seguida del análisis mediante la aplicación de colocalización, usando una ratio de ambos canales de 25,0%, y fijando los umbrales de fondo en un valor de intensidad de fluorescencia de 50. Los píxeles correspondientes a la colocalización de gelsolina y VDAC se muestran en amarillo.

3.4 Determinación de los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) en células vivas

La medida de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) se realizó en fibroblastos, utilizando el reactivo diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFDA, Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante. El diacetato de diclorofluoresceína es incorporado por la célula y una vez en el citosol, las esterasas celulares rompen el enlace éster de los acetatos generando diclorofluoresceína, que al tener cargas negativas adicionales impiden su difusión fuera de la célula. La diclorofluoresceína es entonces oxidada por las especies reactivas del oxígeno, fundamentalmente el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), emitiendo a una longitud de onda de 534 nm en el canal del verde (*Panaretakis et al., 2001*). Estas medidas se llevaron a cabo mediante dos técnicas diferentes:

3.4.1 Citometría de flujo

Para ello se sembraron 1x10⁶ fibroblastos en placas P6 de cultivo (Nunc) hasta llegar a un 50% de confluencia. El día de la medida se tripsinizaron los fibroblastos y se lavaron con PBS. Después se incubaron con 10 μM DCFDA en PBS durante 30 minutos a 37 °C en oscuridad. Las células se lavaron una vez con PBS y se resuspendieron en 500 μl de PBS. Para detectar y descartar la proporción de células muertas se añadió yoduro de propidio a una concentración final de 1μg/ml. Inmediatamente después las

muestras se analizaron en el citómetro de flujo. Siempre se llevaron en paralelo, como control, células sin incubar con DCFDA.

Para medir los niveles de H₂O₂ intracelulares, se excitó la diclorofluoresceína a 488 nm por un láser 15 mW y se midió la fluorescencia emitida mediante citometría de flujo en un FACScan (Becton Dickinson), analizándose 1x10⁵ células por muestra mediante el uso del programa *Cell Quest* (Becton Dickinson). Como control negativo se utilizaron células con el mismo tratamiento a las cuales no se les añadió el fluorocromo (sin DCFDA) y como control positivo se utilizaron células a las cuales se les añadió 200 μM de H₂O₂.

3.4.2 Microscopía confocal

Para el análisis de los niveles de H₂O₂, los fibroblastos cultivados sobre cubreobjetos de vidrio se incubaron con 5 μM de DCFDA en DMEM, a 37 °C durante 20 minutos. Tras las incubaciones, las células se lavaron 3 veces con PBS a 37 °C y los cubreobjetos se montaron invertidos sobre una gota de PBS colocada en un portaobjetos. Estas preparaciones se observaron inmediatamente con un objetivo 20X más un zoom digital 2X en un microscopio confocal *Zeiss LSM 510 META*. Como control de la autofluorescencia de las células en el canal verde se utilizaron células sin teñir.

3.5 Determinación del patrón morfológico de la red mitocondrial

La morfología mitocondrial se determinó en cinco líneas independientes de fibroblastos control y las seis líneas de fibroblastos con mutaciones en *BCSIL*, según el método descrito por (*Guillery et al., 2008*). Para ello, tres examinadores independientes analizaron visualmente y por triplicado un mínimo de 400 células por línea, estableciendo la proporción de células que contenían: a) mitocondrias predominantemente elongadas, b) mitocondrias con una morfología intermedia, en la que existía una proporción equivalente entre mitocondrias elongadas y fragmentadas y c) mitocondrias mayoritariamente fragmentadas. Los datos se presentan como la media ± desviación estándar (DE) de los valores obtenidos para cada línea celular.

Para medir el diámetro mitocondrial, se utilizó el programa ImageJ después de ajustar la escala de las imágenes de acuerdo al objetivo empleado para obtener las fotografías. Los resultados se presentan como los valores de la media de 200

determinaciones para cada línea celular, tal como aparece descrito en (*Moran et al., 2010b*). El análisis estadístico se realizó mediante el análisis de la varianza de una vía (ANOVA). Cuando se obtuvieron valores p significativos, se utilizó el test de Scheffe *post hoc* para determinar las diferencias entre grupos. Se seleccionaron valores $p < 0,05$ para fijar la significancia estadística.

3.6 Análisis de muerte celular

La muerte celular eucariótica puede ocurrir de dos maneras, mediante necrosis o apoptosis (muerte celular programada). La apoptosis se caracteriza porque la célula se encoge dando lugar a vesículas pequeñas que contienen el material citoplasmático, en un proceso denominado zeiosis. Además, se produce la activación de endonucleasas endógenas así como proteasas específicas. La diferencia entre apoptosis y necrosis, es que en ésta última se produce una degeneración en el entorno celular como consecuencia de la lisis violenta de la célula y la liberación del contenido citosólico al medio extracelular.

A continuación se detallan los métodos utilizados para analizar la muerte celular:

3.6.1 Ensayos de apoptosis (TUNEL)

En la célula apoptótica se produce el procesado del ADN genómico, originándose fragmentos de ADN de bajo peso molecular (mono y oligómeros), así como roturas de cadena simple o mellas en el ADN de elevado peso molecular. Estas discontinuidades se pueden identificar marcando los extremos 3'-OH que han quedado libres mediante la adición enzimática de nucleótidos marcados. La enzima que posibilita la adición de estos nucleótidos a las cadenas truncadas de ADN es la TdT o terminal deoxinucleotidil transferasa (TUNEL: *Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling*). Este método se basa en el etiquetado de fragmentos de DNA mediante la adición de nucleótidos marcados con fluoresceína y el posterior análisis de las células fluorescentes mediante microscopía de epifluorescencia. Los experimentos de medida del índice de apoptosis se realizaron con el *kit* comercial *In situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein* (Roche). Se utilizó el método indicado por el fabricante.

3.6.2 ELISA

La endonucleasa endógena activada durante el proceso apoptótico es dependiente de Ca^{2+} y Mg^{2+} y corta ADN de doble cadena en las regiones internucleosomales más

accesibles, generando mono- y oligonucleosomas. En contraste, el ADN de los nucleosomas se encuentra muy compactado gracias a las histonas H2A, H2B, H3 y H4, de manera que queda protegido frente al corte por endonucleasa (*Burgoyne et al., 1974; Stach et al., 1979*). Los fragmentos de ADN producidos son múltiples discretos de 180 pb. El enriquecimiento de mono- y oligonucleosomas en el citoplasma de las células apoptóticas es debido al hecho de que la degradación del ADN ocurre varias horas antes de la rotura de la membrana plasmática (*Bonfoco et al., 1995; Duke et al., 1986; Terui et al., 1995*).

Para realizar el ensayo de muerte celular se utilizó el kit *Cell Death Detection ELISA PLUS 10X* (Roche). El ensayo está basado en la cuantificación de ADN fragmentado, mono- y oligonucleosomas en la fracción citoplasmática de los lisados celulares, mediante inmunodetección utilizando anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos contra el ADN y las histonas. Las células utilizadas en este ensayo se tripisinizaron el mismo día del experimento, siguiendo para este método, las instrucciones del fabricante.

3.7 Determinación del potencial de membrana mitocondrial

La medida del potencial de membrana mitocondrial se determinó mediante microscopía confocal en células vivas según el método descrito por (*Davidson et al., 2007*) con ligeras variaciones. Se sembraron fibroblastos en portaobjetos *LabTek II* (Nunc) que se incubaron en DMEM sin rojo fenol con 4,5 g/l glucosa, 100 mM piruvato sódico y 25 mM HEPES. Con el fin de despolarizar la membrana plasmática se añadió 55 mM KCl, se incubó durante 10 minutos a 37°C y a continuación se añadió tetrametil rodamina éster (TMRM) a una concentración final de 30 nM, manteniéndose durante 45 minutos a 37 °C en el incubador. Posteriormente, se mantuvieron durante 45 minutos a 37 °C en el incubador. A continuación, las células se observaron con un microscopio confocal *Zeiss LSCM 510 Meta* (*Zeiss, Germany*), con pletina termostaticada a 37 °C. Las imágenes se obtuvieron con un objetivo 40X y una sección óptica de 4 µm, excitando con un láser a 561 nm y al 1,5% de potencia y se analizaron con el programa *Image J 1.46o* (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). Los valores de intensidad media de fluorescencia por célula se normalizaron de acuerdo con el contenido mitocondrial de cada línea celular, estimado mediante la actividad citrato sintasa.

3.8 Análisis de proteínas

3.8.1 Preparación de lisados celulares

Los fibroblastos en cultivo se tripsinizaron, se centrifugaron a 1500 rpm a 4°C y posteriormente se lavaron dos veces con PBS (Lonza). Por cada 2×10^6 células, se añadieron 125 μ l de un tampón de extracción de proteínas en PBS conteniendo n-dodecil β -D-maltósido al 2% (p/v) (DDM, Sigma), 0,1 mM PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo, Sigma) y una mezcla de inhibidores de proteasas (*Protease Inhibitor Cocktail Tablets*, Roche). Tras 15 minutos en hielo, el homogenado celular se centrifugó a 10000 rpm durante 30 minutos a 4°C. La concentración de proteínas en el sobrenadante se determinó utilizando el *MicroBCA Protein Assay Kit* (Pierce), según las instrucciones del fabricante. Una vez realizada la cuantificación, el sobrenadante se mezcló con un volumen igual de solución de *Laemmli 2X* (BioRad) conteniendo un 5% de β -mercaptoetanol. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante 60 minutos y posteriormente se guardaron a -20°C hasta su uso.

3.8.2 Fraccionamiento Subcelular

El fraccionamiento subcelular consiste en la obtención de fracciones puras o enriquecidas en un determinado componente celular o en una fracción de membrana. Este procedimiento se realiza con un tampón isotónico (0,25 M Sacarosa, 20 mM Tris-HCl pH 7,8, 0,2 mM EDTA y 0,1 mM PMSF) en el que se resuspenden las células. Posteriormente, se lleva a cabo la homogenización de la muestra mediante la utilización de homogeneizadores *ReadyPrep™ Minigrinders* (Biorad, Hercules, CA).

Se siguieron los siguientes pasos:

Se resuspendieron aproximadamente 4×10^6 fibroblastos en tampón isotónico y se homogeneizaron de forma mecánica 10 x 4 veces con los homogeneizadores. Las células rotas y los núcleos se centrifugaron a 1000 g durante 10 min. El sedimento (*pellet*) resultante se consideró como la fracción nuclear y restos celulares.

Por otro lado, los sobrenadantes se centrifugaron a 10000 g durante 25 minutos. El sobrenadante obtenido se aisló como fracción citosólica y el sedimento como fracción mitocondrial.

Con la fracción citosólica:

- Se centrifugó otros 25 minutos a 10000g y se descartó el *pellet*, correspondiente a los restos celulares y restos de la fracción mitocondrial.

Con la fracción mitocondrial:

- Se realizaron dos lavados con el tampón isotónico
- Se centrifugó a 10000 g durante 25 min.
- Finalmente, se resuspendió el *pellet* resultante en 50 μ l de PBS y 0,1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)

En este punto, las dos fracciones se trataron igual, siguiendo el método anteriormente detallado para el procesado de lisados celulares y se sometieron a análisis por *Western-blot* (apartado 3.6.7).

3.8.3 Fraccionamiento submitocondrial

Las mitocondrias se purificaron con el *kit* comercial: *Mitochondria Isolation Kit MACS* (Miltenyi Biotec), partiendo de un lisado celular. Este *kit* se basa en la purificación magnética de mitocondrias marcadas con un anticuerpo monoclonal acoplado a partículas metálicas que se une específicamente a la translocasa de membrana externa mitocondrial 22 (TOM22). El lisado celular se carga en las columnas MACS y posteriormente, las mitocondrias se separan a través del campo magnético del separador MACS. El protocolo que se utilizó viene especificado por el fabricante.

Las mitocondrias aisladas se subfraccionaron utilizando una solución fosfato de “hinchamiento-reducción” del volumen mitocondrial descrito anteriormente (*Bijur and Jope, 2003; Hovius et al., 1990*), con pequeñas modificaciones. El *pellet* mitocondrial se resuspendió en tampón A (10 mM KH_2PO_4 pH 7,4 e inhibidor de proteasas) y se incubó durante 20 minutos a 0°C con agitación. Pasado este tiempo, se añadió el mismo volumen del tampón B (10 mM KH_2PO_4 pH 7,4, 32% sacarosa, 30% glicerol, 10 mM NaCl_2 e inhibidor de proteasas) durante 20 minutos a 0°C. A continuación, se centrifugó a 10000 g durante 10 minutos y se separaron sobrenadante y sedimento. Por un lado, del sobrenadante se recogieron la fracción que contenía la membrana externa mitocondrial (MEM) y el espacio intermembrana (EIM). Por otro lado, en el *pellet* se recuperaron las fracciones de membrana interna mitocondrial (MIM) y matriz (MTZ). Dicho *pellet* se lavó dos veces con una mezcla 1:1 de los tampones A y B. Posteriormente, se resuspendió en tampón A y se sonicó dos veces durante 3 segundos a 0°C para romper la membrana interna y liberar así el contenido de la matriz.

Por un lado, el sobrenadante que contiene la membrana externa mitocondrial y el espacio intermembrana y por otro, el *pellet* sonicado y resuspendido en tampón A, que contiene las fracciones correspondientes a la membrana interna mitocondrial y la matriz, se sometieron a subfraccionamiento por centrifugación a 140000 g durante 1 hora a 4°C. Después de esta centrifugación, los *pellets* que se recogieron correspondieron a membrana externa mitocondrial (MEM) y membrana interna mitocondrial (MIM), las cuales se resuspendieron en 30 µl del tampón A:B (1:1). Los sobrenadantes se recogieron como espacio intermembrana mitocondrial (EIM) y matriz (MTZ), respectivamente. Las muestras fueron analizadas por *Western-blot* (apartado 3.6.7) y la identidad de cada fracción fue determinada usando anticuerpos específicos: porina en membrana externa mitocondrial (MEM), subunidad CORE2 del complejo III en membrana interna mitocondrial (MIM) y citocromo c en espacio intermembrana (EIM) (Tabla 4).

3.8.4 Inmunoprecipitación

La coimmunoprecipitación es una técnica analítica de interacciones proteína-proteína. El objetivo es visualizar aquellas proteínas que interactúan con la proteína objeto de la inmunoprecipitación. Por lo tanto el tampón inicial que se utilizará tiene que respetar la integridad de las interacciones.

Los protocolos de inmunoprecipitación se fundamentan en la capacidad de los anticuerpos en formar complejos antígeno-anticuerpo que se añaden a un extracto proteico. Estos complejos se precipitan por reacción con una fase sólida inmunoabsorbente. Esta fase se encuentra formada por proteínas (A o G) de gran afinidad por el fragmento F_c de las inmunoglobulinas y unidas a resinas insolubles como agarosa o sefarosa. Una vez sedimentados por centrifugación, los componentes se disocian y se analizan por *SDS-PAGE* y *Western-blot* (apartados 3.6.6. y 3.6.7).

Como primer paso, se equilibró la proteína A/G agarosa (Roche Applied Science). Para ello, se sustituyó el tampón en el que se encuentra conservada por el tampón de extracción mediante lavados y centrifugaciones de 15 segundos a 2500 rpm con el fin de evitar la rotura de la proteína A o G de la agarosa.

Se partió de sedimentos (*pellets*) celulares o mitocondriales. Cada *pellet* se solubilizó durante 30 minutos a 4°C con 1% Triton X-100 en 300µl de tampón de extracción (20 mM HEPES-NaOH pH 7,4, 150 mM NaCl, 10% glicerol e inhibidores de proteasas). Posteriormente, se centrifugaron durante 10 minutos a 13000 rpm. Se

descartó el *pellet* y del sobrenadante, se separó una alícuota (10% del total) que constituye la muestra control del extracto proteico no sujeta a inmunoprecipitación.

Se aumentó el volumen de dicho extracto a 500 μ l con tampón de extracción para favorecer la formación de inmunocomplejos. Se realizó el pre-aclarado de las muestras, consistente en una incubación de 2 horas a 4°C en agitación con 20 μ l de proteína A o proteína G agarosa equilibrada, en función de la especie de la que proviene el anticuerpo utilizado en la inmunoprecipitación. Posteriormente, se centrifugó la muestra durante 5 minutos a 2500 rpm y se descartó el *pellet*. El sobrenadante se incubó durante toda la noche a 4°C en agitación con 3 μ g del anticuerpo específico. Se añadieron 35 μ l de proteína A/G y la muestra se incubó durante 5 horas a 4°C con agitación. Finalmente, se centrifugó durante 5 minutos a 2500 rpm y 4°C. El sedimento constituye el inmunoprecipitado y el sobrenadante la fracción no unida.

El inmunoprecipitado se lavó 3 veces con el tampón de extracción y la proteína A/G se resuspendió en un volumen igual de solución *Laemmli 2X* para conseguir una concentración final 1X. Se hirvió 5 minutos a 95°C y se centrifugó 5 minutos a 2500 rpm, recuperando el sobrenadante (de esta manera se elimina la matriz de agarosa, que perjudica la electroforesis posterior). A la fracción no unida se le añadió solución *Laemmli 5X* para conseguir una concentración final idéntica a la del punto anterior.

La composición de la solución *Laemmli 1x* o tampón de carga utilizado en estos experimentos fue: 188 mM Tris HCl pH 6.8, 30% glicerol (v/v), 6% SDS (v/v), 15% β -mercaptoetanol (v/v), 0,02% azul de bromofenol (p/v).

3.8.5 Cuantificación de proteínas

Para la medida de la concentración de proteínas, se utilizó el *kit MicroBCA Protein Assay* (Pierce) siguiendo las indicaciones que vienen detalladas por el fabricante.

3.8.6 Separación de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) es una técnica utilizada para separar proteínas. La mezcla de acrilamida/bisacrilamida polimeriza fruto de una reacción de oxidación-reducción, formando un entramado cuyo tamaño de poro es inversamente proporcional a su concentración. La aplicación del detergente SDS desnaturaliza las proteínas, confiriéndoles carga negativa de forma proporcional a su

masa. Se añade también β -mercaptoetanol (Sigma) como agente reductor para la rotura de puentes disulfuro. Las proteínas migran a través de esta red cuando se aplica un campo eléctrico y se separan en función del peso molecular.

En este trabajo se prepararon geles de acrilamida al 4% para el gel concentrador y del 7% y 10% para los geles separadores, utilizando cristales separadores de 1,5 mm (BioRad). Se cargaron entre 10 y 30 μ g de proteína en función del experimento realizado. Las muestras se mezclaron con 5% β -mercaptoetanol y solución *Laemmli IX* de concentración final. Como marcador de peso molecular se utilizó el *Precision Plus Protein™ Dual Color Standard* (Biorad).

3.8.7 Transferencia a filtros de nitrocelulosa e inmunodetección directa (*Western-blot*)

Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa PROTAN® (Schleider & Schuell) a 25 V y temperatura ambiente durante toda la noche y se hibridaron con anticuerpos específicos (Tablas 4 y 5).

Las membranas se preincubaron durante 14-16 horas en solución de bloqueo (0,1% *Tween-20* y 5% leche desnatada en polvo en PBS) y se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente en las condiciones de dilución y tiempo establecidas para cada uno de ellos (Tabla 4). Las membranas se lavaron tres veces con 0,1% *Tween-20* en PBS y se incubaron utilizando una dilución 1:1500 del anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 5), durante 1 hora a temperatura ambiente en solución de bloqueo. Cada membrana se lavó tres veces con 0,1% *Tween-20* en PBS. Como reactivo de revelado se utilizó el *kit ECL Plus Western Blotting Detection System* (Amersham). La cuantificación de la señal se realizó mediante el programa de análisis de imágenes *Image J 1.46o* (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

3.8.8 Ensayos de electroforesis azul nativa (*Blue Native Electrophoresis, BNE*)

3.8.8.1 Obtención de pellets mitocondriales a partir de fibroblastos mediante tratamiento con digitonina

Las membranas mitocondriales se aislaron de los cultivos celulares como se ha descrito previamente (*Nijtmans et al., 2002*) con pequeñas modificaciones. Los fibroblastos se cultivaron hasta que las células alcanzaron el 90% de confluencia. Las células se recogieron con tripsina, se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en 100 μ l PBS más 100 μ l de solución de digitonina (4 mg/ml). Las muestras se mantuvieron en hielo durante 10 minutos para disolver las membranas. Se les añadió 1 ml de PBS frío y las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 10000 rpm a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el *pellet* se lavó una vez más en 1 ml de PBS frío.

3.8.8.2 Preparación de muestras para ensayos de electroforesis azul nativa (BNE-PAGE)

Para la separación de los complejos y supercomplejos mitocondriales en condiciones nativas, los *pellets* mitocondriales obtenidos en el apartado anterior se solubilizaron en 100 μ l de tampón (1,5 M ácido 6-amino hexanoico (Sigma), 50 mM Bis-Tris (Sigma) a pH 7,0). Se determinó la concentración de proteína utilizando el *kit Micro BCA Protein Assay* (Pierce). Después, se añadió una solución de n-dodecil β -D-maltósido (DDM, Sigma) al 2% (p/v), en el caso de los complejos mitocondriales individuales o una solución de 4 gramos digitonina por gramo de proteína, en el caso de los supercomplejos. Posteriormente, las células se incubaron en hielo durante 10 minutos. Después de centrifugar durante 30 minutos a 13000 rpm a 4°C se recogió el sobrenadante, al cual se añadieron 10 μ l de tampón de carga: 750 mM ácido 6-amino hexanoico, 50 mM Bis-Tris, 0,5 mM EDTA, 5% *Serva Blue G-250* (Serva).

3.8.8.3 Electroforesis bidimensional azul nativa (2D-BN/SDS-PAGE)

La electroforesis azul nativa (*Blue Native Electrophoresis*) es una técnica que permite separar en una primera dimensión, que se lleva a cabo en condiciones desnaturizantes, los complejos de la cadena respiratoria con su conformación nativa y por tanto, funcionalmente activos (Figura 8A). Posteriormente, las subunidades que componen dichos complejos se separan en una segunda dimensión llevada a cabo en condiciones desnaturizantes (Figuras 8B y 8C).

Para la **primera dimensión (1D-BN-PAGE)** se prepararon geles con un gradiente del 4-15% de acrilamida/bisacrilamida (29:1, Biorad), utilizando separadores de 1,5 mm. Se cargaron 40 μg de proteína mitocondrial por pocillo, utilizando como ánodo el tampón A (50 mM Bis-Tris pH 7,0) y como cátodo el tampón C1 (15 mM Bis-Tris, 50 mM tricina pH 7,0 y 0,02% *Serva Blue G-250*). Las proteínas se separaron a 30 V durante 30 minutos. Cuando el frente de electroforesis estuvo aproximadamente en la mitad del gel, se cambió el tampón C1 por el tampón C2 (15 mM Bis-Tris, 50 mM tricina pH 7,0) para lavar el exceso de azul de los geles y las muestras se separaron a 80 V hasta que el frente de azul de *coomassie* se salió del gel.

En cada experimento se realizaron ensayos 1D-BNE-PAGE por triplicado. Uno de los geles se utilizó para transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (apartado 3.6.7.) y poder analizar el ensamblaje de los complejos y los supercomplejos en su conformación nativa. Otro gel fue procesado para una segunda dimensión (2D) al 10% SDS-PAGE. El tercer gel se utilizó para realizar los ensayos de actividad en gel (IGA) de los complejos I y IV mitocondriales (apartado 3.6.8.4).

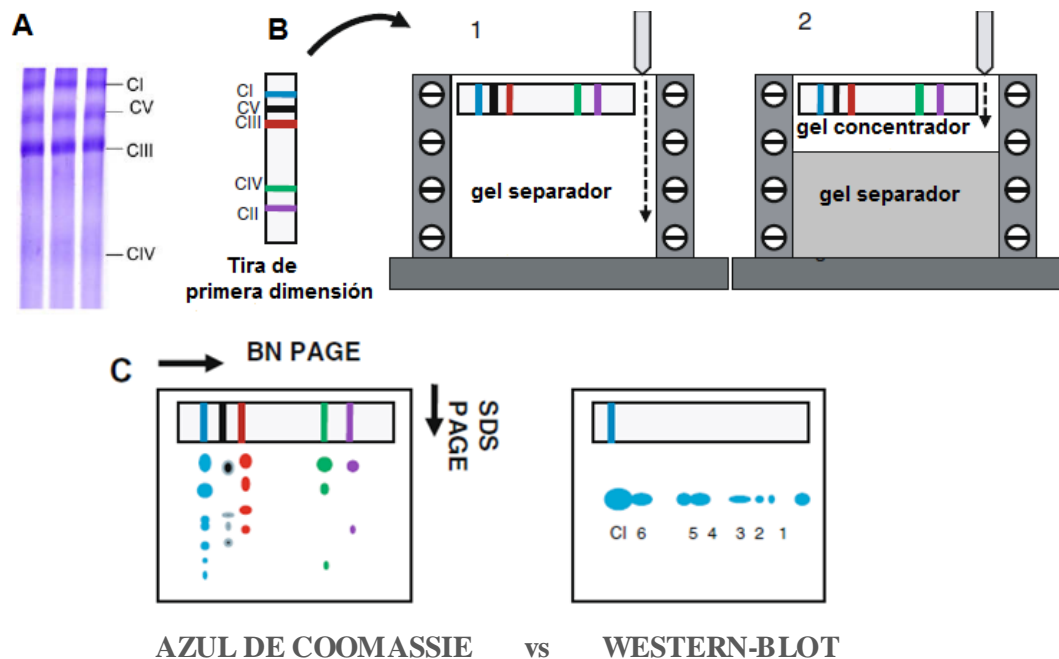


Figura 8. Electroforesis bidimensional azul nativa. (A) Muestras separadas mediante *Blue Native Electrophoresis* (BNE) en condiciones nativas. CI-CV: Complejos I al V. (B) Montaje de una tira de gel de **primera dimensión (1D-BN-PAGE)**. Para ello se corta una banda de un gel de 1D, se rota 90° y se inserta en el gel concentrante. Las proteínas se separan posteriormente en el gel separador. (C) Principio de la **segunda dimensión (2D-BN/SDS-PAGE)** en condiciones desnaturilizantes. Esquema de subcomplejos proteicos hipotéticos que se pueden observar en 2D-BN/SDS-PAGE utilizando la tinción con azul de *coomassie* o la técnica de *Western-blot*. Las flechas indican la dirección de la primera y segunda dimensión (*modificado de (Calvaruso et al., 2008)*).

En la electroforesis en **segunda dimensión (2D-BN/SDS-PAGE)**, se separaron las distintas subunidades de los complejos de la cadena respiratoria en función de su peso molecular. Para ello se cortó con un bisturí cada banda del gel de 1D-BNE-PAGE y se rotó 90° en un cristal (Figura 8B). La banda se incubó durante una hora con una solución desnaturalizante (1% SDS, 1% β -mercaptoetanol). El exceso de solución desnaturalizante se eliminó utilizando papel de filtro. Este paso es esencial pues el β -mercaptoetanol inhibe la polimerización de la acrilamida del gel separador de la 2D-BN/SDS-PAGE. Posteriormente se montó el sistema de electroforesis, utilizando cristales con separadores de 0,75 mm. El gel separador se preparó al 10% acrilamida/bisacrilamida y 0,1% SDS. El gel concentrante se preparó al 4% acrilamida/bisacrilamida con 0,1% SDS y se añadió alrededor de la banda de 1D-BNE-PAGE. Como ánodo se utilizó el tampón A-SDS (0,2 M Tris HCl pH 8,9) y como cátodo el tampón C-SDS (0,1 M Bis-Tris, 0,1 M tricina pH 8,2 y 0,1% SDS). Las proteínas se separaron a 30 V durante 30 minutos y a 80 V durante 2-4 horas.

3.8.8.4 Ensayos de Actividad en Gel (IGA: *In Gel Activity Assay*)

Para el **IGA del complejo I** los geles se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con la siguiente solución: 2 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,1 mg/ml NADH y 2,5 mg/ml azul de nitrotetrazolium (NTB, Sigma). Los geles se lavaron en agua destilada y se escanearon inmediatamente.

Para el **IGA del complejo IV** los geles se incubaron durante 48 horas a 37°C en agitación, con una solución que contenía 10 mg 3,3'-tetraclorito de diaminobencidina (DAB, Sigma), 1 nM catalasa (Sigma), 20 mg citocromo c (Sigma) y 1,5 g sacarosa (Sigma) disueltos en 18 mL de 0,05 M tampón fosfato a pH 7,4. Después de la incubación, los geles se lavaron y se escanearon inmediatamente.

3.8.9 Electroforesis Bidimensional (2-DE)

La electroforesis bidimensional es una técnica de alta resolución cuyo objetivo es la separación secuencial de mezclas de proteínas altamente complejas. En primer lugar, las proteínas se separan en un gel con gradiente de pH inmovilizado en condiciones desnaturalizantes de acuerdo con su punto isoeléctrico (isoelectroenfoque). A continuación, las proteínas se separan en función de su peso molecular por electroforesis en un gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE).

3.8.9.1 Preparación de muestras para 2D-PAGE

Se prepararon los sedimentos (*pellets*) celulares de fibroblastos procedentes de controles y de 4 pacientes, tal y como se ha indicado en el apartado (3.6.1.). Se enviaron 100 µl de cada extracto proteico al servicio de Proteómica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid. En primer lugar, se procedió a la limpieza de las muestras mediante la precipitación de proteínas con el *kit 2D-Clean up* (GE Healthcare). Estos precipitados permanecieron 24 horas a -20 °C con acetona. Los sedimentos resultantes se resuspendieron en 50 µl de tampón DIGE (10 mM Tris, 7 M urea, 2 M tiourea y 2% CHAPS). Después se procedió a la cuantificación de las proteínas precipitadas usando la técnica colorimétrica de *Bradford* (BioRad). Teniendo en cuenta esta cuantificación, se separaron 15 µg de proteína en un gel *SDS-PAGE* al 10% acrilamida (apartado 3.6.6.), que fue posteriormente teñido con azul *Coomassie* coloidal (G-250) para la comprobación de la cuantificación por el método *Bradford*.

1ª Dimensión: Isoelectroenfoque

Para ajustar las condiciones de isoelectroenfoque, se hizo una mezcla con las muestras de los cuatro pacientes (P1, P2, P4 y P6) y otra mezcla con las muestras de los 4 controles. Para añadir el agente reductor y los anfólitos a la muestra, a dicha mezcla se añadió un tampón de rehidratación para el isoelectroenfoque, que consistió en 7 M urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS, 200 mM ditiotreitól (DTT) y 4% anfólitos, en una reacción 1:1 (Figura 9A). En estas condiciones, cada mezcla de muestras se aplicó sobre una tira de 24 cm con rango de pH del 3 al 11 (pH3-11 NL, GE Healthcare), que previamente se había rehidratado con 7 M urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS, 2%, solución *IPGphor* 3-11 y la solución de rehidratación *DeStreak* (GE Healthcare), durante 8 horas utilizando un pocillo de carga (Figura 9B).

El isoelectroenfoque se llevó a cabo en la unidad *IPGphor* de *GE Healthcare* (Figura 9C). Éste se realizó a 20°C siguiendo el programa: 120 V durante 1 h; 500 V durante 2 h; 500-1000 V en gradiente durante 2 h; 1000-5000 V en gradiente durante 6 h; 5000 V durante 10 horas. Las tiras acumularon 71000 Vhs durante este proceso.

Equilibrado

Tras el isoelectroenfoque, las tiras se equilibraron por el método de (*Gorg et al., 1988*) (Figura 9D). En primer lugar, se añadió un tampón de equilibrado compuesto por 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 6 M urea, 30% glicerol, 2% dodecil sulfato sódico (SDS) y 2% DTT para mantener el estado reducido de las proteínas desnaturalizadas. Las tiras se mantuvieron durante 12 minutos en este tampón con agitación y a temperatura

ambiente. En un segundo paso, las tiras se equilibraron durante 5 minutos en el mismo tampón de equilibrado descrito anteriormente. A esta solución se le añadió un 2.5% de iodoacetamida, sustituyendo al DTT para evitar la reoxidación de las proteínas. Tras el lavado con agua destilada, las tiras estuvieron listas para la separación electroforética en una segunda dimensión.

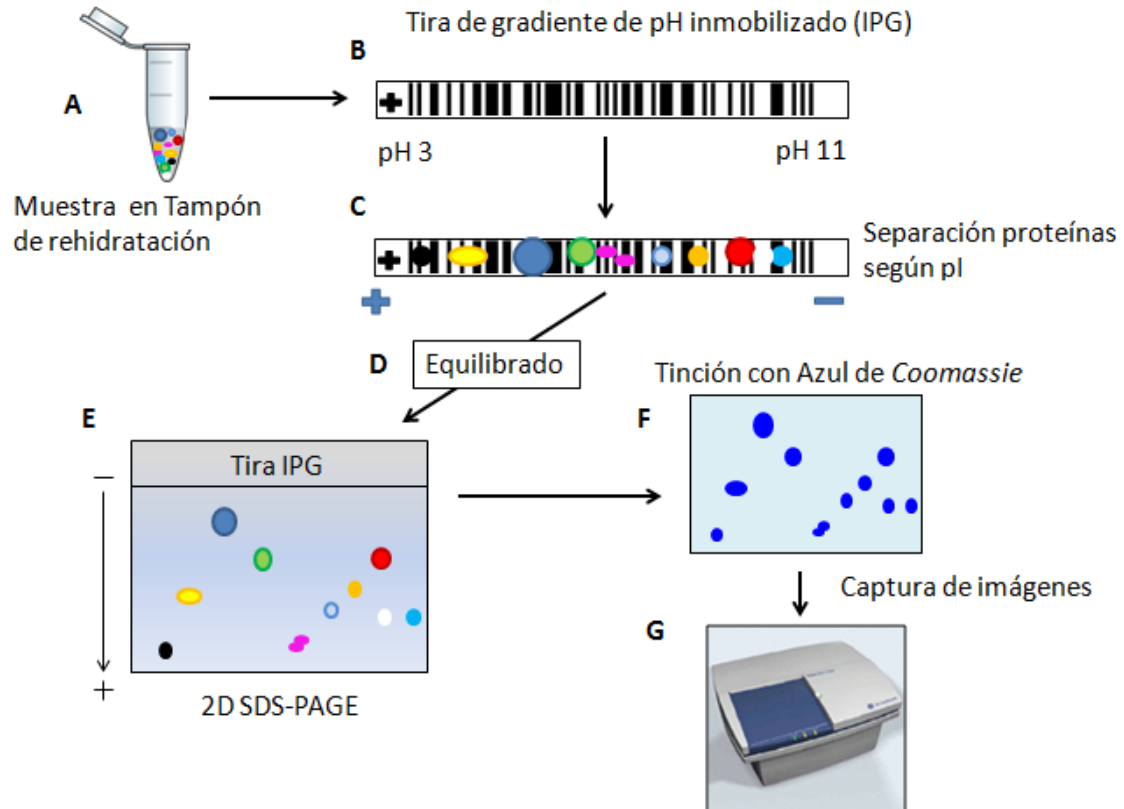


Figura 9. Electroforesis bidimensional convencional (2-DE). (A) Mezcla proteica resuspendida en tampón de rehidratación para la 1ª Dimensión o Isoelectroenfoque. (B) Tira de gradiente de pH utilizada en el Isoelectroenfoque. A las tiras rehidratadas se les aplica la mezcla de proteínas anterior. (C) Proteínas separadas en función de su punto isoeléctrico (pI). (D) Equilibrado de las tiras. (E) 2ª Dimensión en geles SDS-PAGE. (F) Tinción con azul de *Coomassie*. (G) Captura de imágenes en el escáner.

2ª Dimensión: Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE

La segunda dimensión se realizó en el sistema *Ettan DALT six* (GE Healthcare) en geles de Tris-glicina/SDS con 12% T (acrilamida), 2,6% C (bisacrilamida) de 26 x 20 cm (GE Healthcare), utilizando cristales de baja fluorescencia. Cada tira IPG se colocó en la superficie del gel (Figura 9E), evitando la aparición de burbujas entre la superficie del gel y la tira. Para fijar ambos geles y evitar pérdidas de proteínas cuando éstas

migran de un gel a otro, se preparó una solución de agarosa al 0,5% (p/v). La electroforesis se realizó a 10 W/gel durante 4 h a 18 °C.

3.8.9.2 Tinción con azul de *coomassie* y captura de imágenes

Para la visualización de las proteínas tras la segunda dimensión, se tiñeron los geles mediante el protocolo de azul de *Coomassie* coloidal (CCB). Finalizada la electroforesis, se procedió a la fijación de los geles en una solución al 50% (v/v) etanol y 2% (v/v) ácido fosfórico en agitación, durante 3 horas a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con agua bidestilada de 10 minutos cada uno. Después, los geles se incubaron en una solución al 17% (p/v) sulfato amónico, 3% ácido fosfórico y 33% metanol en la durante 1 hora. A esta solución se añadieron 330 µg *Coomassie Blue G-250*, resuspendidos anteriormente en 5 ml de metanol. Esta mezcla se dejó incubando durante 24 horas (Figura 9F). Al día siguiente se lavaron los geles en agua bidestilada hasta obtener el contraste adecuado para la digitalización de las imágenes, usando el escáner densitómetro GS-800 de BioRad (Figura 9G).

3.8.9.3 Electroforesis diferencial bidimensional en gel (2D-DIGE, *Difference Gel Electrophoresis*)

El DIGE es una variante de la electroforesis bidimensional clásica que permite separar más de una muestra proteica en un único gel, gracias al uso de tres fluorocromos *CyDye* (Cy3, Cy5, Cy2) (GE Healthcare), que marcan las proteínas previamente a su separación. Estos fluorocromos son espectralmente diferenciales, con la misma masa y carga. Por lo tanto puede obtenerse la imagen independiente de cada extracto proteico una vez separado en el gel 2D-DIGE. De esta manera, se reduce la variabilidad entre geles y se mejora la reproducibilidad y la capacidad de extraer información cuantitativa de los análisis. Así, este sistema permite la cuantificación estadística de pequeñas variaciones en los niveles de expresión de proteínas entre distintas muestras.

3.8.9.3.1 Estándar interno y diseño experimental

Los experimentos DIGE requieren el uso de diseños experimentales que no son posibles con las aproximaciones tradicionales. Para ellos, se debe tener en cuenta el número de condiciones que se quiere comparar, el número de réplicas por cada condición así como la preparación del estándar interno específico de esta técnica. El mayor número de réplicas biológicas pretende reducir las variaciones biológicas intrínsecas de las muestras que surgen dentro de las poblaciones y que se deben a

diferencias de individuo a individuo. Estas variaciones no pueden ser eliminadas de ningún experimento, pero se pueden reducir al incluir réplicas biológicas en el estudio de comparación. En nuestro caso, hemos incluido 4 pacientes portadores de distintas mutaciones en el mismo gen (*BCS1L*) y 4 controles.

Otra fuente de variación es la que se debe a la técnica en sí. En el caso de la tecnología DIGE no es necesario realizar réplicas técnicas de los geles 2D-PAGE para reducir esta variabilidad, gracias a que uno de los fluorocromos (Cy2) se usa para marcar el estándar interno y se incluye en todos los geles. Este estándar interno se genera mezclando cantidades equivalentes de todas las muestras del experimento (réplicas y condiciones). El uso del estándar interno ofrece numerosas ventajas. En particular, permite identificar las variaciones del sistema provocadas por la técnica, por ser una muestra común que se aplica a todos los geles DIGE que componen el experimento. Para eliminar la posible variabilidad de la afinidad de los diferentes fluorocromos a las proteínas, se debe marcar la mitad de las réplicas biológicas por condición (en nuestro caso, 2 pacientes y 2 controles) con Cy3 y la otra mitad con Cy5.

3.8.9.3.2 Marcaje de las muestras

Para el marcaje, los fluorocromos se llevaron a una solución de uso de 400 pmol/ μ l en dimetil formamida anhidra (Sigma). Las muestras se resuspendieron en 7 M urea, 2 M tiourea, 4% (p/v) CHAPS y 30 mM Tris-Base y se les ajustó el pH a 8,5. Se prepararon alícuotas de 50 μ g de cada muestra y se marcaron con un 1 μ l del *CyDye* correspondiente, según el diseño experimental.

Además, se preparó un estándar interno (EI), que incluyó todas las muestras del experimento en un único tubo y se marcó con Cy2 (400 pmol fluorocromo por cada 50 μ g de muestra marcada) (Figura 10A). Se incubó en la oscuridad durante 30 minutos y se paró la reacción con un exceso de lisina (1 μ l de 10 mM lisina).

3.8.9.3.3 Electroforesis bidimensional

Las tres muestras marcadas pertenecientes a un mismo gel (según el diseño experimental), se mezclaron en un único tubo antes de añadir el tampón de carga para el isoelectroenfoque de las muestras. Los siguientes pasos se realizaron como se ha indicado en el apartado anterior (apartado 3.6.9.), pero en la oscuridad, debido a que los fluorocromos son fotosensibles (Figura 10B).

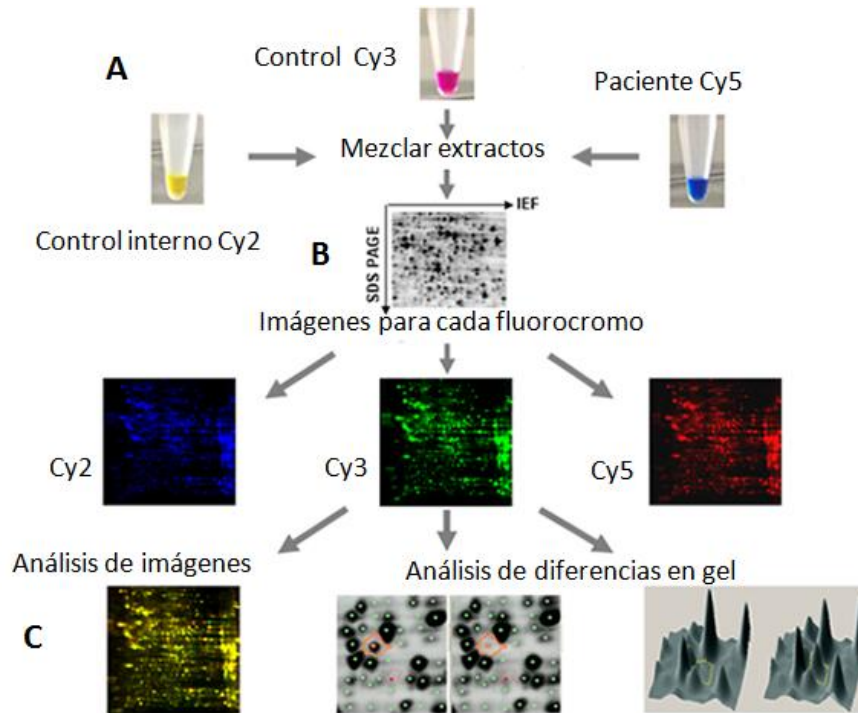


Figura 10. Electroforesis diferencial bidimensional (2D-DIGE). (A) Marcaje de las muestras con Cy2 para el estándar interno, Cy3 para muestra control y Cy5 para el paciente. (B) Electroforesis bidimensional de una muestra control y una de paciente junto con el estándar interno. Imágenes obtenidas para cada fluorocromo después de excitar a la longitud de onda adecuada. (C) Captura de imágenes en escáner y posterior análisis de puntos (*spots*) proteicos con el *software* específico para detectar diferencias de expresión entre las muestras control y del paciente.

3.8.9.3.4 Captura de imágenes

Las imágenes de los gels 2D-DIGE se digitalizaron utilizando un escáner de fluorescencia *Typhoon 9400 Variable Node Imager* (GE Healthcare). Las imágenes emitidas por cada fluorocromo (Cy2, Cy3 y Cy5) se escanearon separadamente a 488 nm/520 nm, 532 nm/580 nm y 633 nm/670 nm de excitación/emisión, respectivamente, a una resolución de 100 μm . Las imágenes fueron importadas al programa *DeCyder Differential Analysis Software* (GE Healthcare), con el que se procedió a su análisis y a su cuantificación estadística (Figura 10C).

3.8.9.3.5 Análisis de las Imágenes

Las imágenes obtenidas de los gels 2D-DIGE, a través del escáner *Typhoon 9400*, se acotaron usando el programa informático *ImageQuant v5.1* (GE Healthcare) y se importaron al programa de análisis de imágenes digitalizadas *DeCyder Differential Analysis Software v6.5* (GE Healthcare). Dentro de este programa y mediante la base de datos *Oracle*, se generó un proyecto en el que se incluyeron todas las imágenes de los

geles. A continuación, todos los mapas proteicos del mismo proyecto se analizaron mediante el módulo DIA (*Differential In-gel Analysis*), que detecta, cuantifica y compara las manchas proteicas de las tres imágenes (Cy2, Cy3, Cy5) correspondientes a cada gel. El algoritmo que emplea este módulo se basa en la co-detección de las tres señales fluorescentes (2 muestras y 1 control interno), donde se especificó la detección del máximo número de manchas posibles. La co-detección de manchas proteicas (Figura 10C) se hizo conforme al algoritmo del *software*, permitiendo diferenciar las señales de manchas verdaderas de los artefactos del gel. A continuación, se hizo un filtrado de aquellas manchas que correspondieron a fondo y se eliminaron aquellas cuyo volumen fue menor de 100.000 (volumen estimado del fondo para este experimento). En todos los casos hubo que eliminar y/o incluir alguna mancha de forma manual. En total, se generaron 4 módulos de trabajo independientes correspondientes a los geles DIGE realizados en esta tesis.

El emparejamiento de las manchas de todas las réplicas se realizó en el módulo BVA (*Biological Variation Analysis*). Los datos obtenidos en el módulo DIA se utilizaron en el módulo BVA, que tiene en cuenta las réplicas biológicas usadas en el proyecto. En primer lugar, se definieron los grupos que componen el experimento (*Controles, C y Pacientes, P*) y en cada uno de ellos se incluyó la imagen que correspondía a cada réplica, según el diseño experimental. La imagen del *Gell_146 STANDARD CY2* (Figura 32), se utilizó como gel de referencia, sobre el que se realizó el emparejamiento de las manchas proteicas de todas las imágenes que componen el proyecto. Tras realizar el emparejamiento de las manchas de forma automática, se repasaron y modificaron de manera manual aquellos emparejamientos que no se realizaron correctamente.

El tratamiento estadístico de los datos se realizó en el mismo módulo BVA. Tras el emparejamiento, se calculó la media de la *ratio* de cada una de las manchas en las 4 réplicas de cada condición respecto al estándar interno (Cy3/Cy2 o Cy5/Cy2) y se hizo la comparación entre pacientes y controles, calculando el valor *p* del test *t de Student*.

3.8.9.3.6 Análisis de los Componentes Principales (ACP)

El análisis de componentes principales (ACP) es un método estadístico cuyo objetivo es la simplificación y reducción de la dimensionalidad de un conjunto de datos con numerosas variables. Intuitivamente, la técnica sirve para determinar el número de factores subyacentes que sean capaces de explicar la mayor parte de la varianza total de

las variables originales en un conjunto de datos. De este modo, se tiene una imagen simplificada del conjunto de datos iniciales, más fácil de interpretar. En este estudio, se utilizaron los datos de todos los puntos proteicos detectados en los geles del experimento DIGE.

3.8.9.3.7 Identificación de proteínas por Espectrometría de Masas (MS)

Las manchas proteicas de interés se extrajeron manualmente de geles preparativos usando puntas de pipeta. Las proteínas seleccionadas para el análisis se redujeron en el gel, se alquilaron y posteriormente se digirieron con tripsina según el método descrito por (Shevchenko *et al.*, 1996).

Las manchas proteicas se lavaron dos veces con agua y se sumergieron durante 15 minutos en 100% de acetonitrilo. Se secaron en un concentrador *Savant Speed Vac* (Thermo Scientific) durante 30 minutos. Posteriormente, las muestras se redujeron con 10 mM ditioneitol (DTT) en 25 mM de bicarbonato amónico durante 30 minutos a 56°C y más tarde se alquilaron con 55 mM de bicarbonato amónico. Finalmente, las muestras se digirieron con 12,5 ng/μl de una tripsina modificada resistente a la digestión autolítica, *Sequencing grade trypsin* (Roche Molecular Biochemicals) en 25 mM de bicarbonato amónico a pH 8,5 durante 24 horas a 37°C.

Después de la digestión, se recuperó el sobrenadante y se cargó 1 μl en una placa específica para MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) y se dejó secar a temperatura ambiente. Después se añadieron 0,4 μl de 3 mg/ml ácido α-ciano-4-hidroxi-transcinámico (Sigma) en 50% de acetonitrilo a las manchas proteicas digeridas y secas y se volvieron a dejar secar a temperatura ambiente. Los análisis de MALDI-TOF/TOF (*Time-Of-Flight*) se llevaron a cabo en un espectrómetro de masas *MALDI TOF/TOF 4800 Proteomics Analyzer* (Applied Biosystems) en el Servicio de Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid. El MALDI-TOF/TOF se llevó a cabo en modo de reflector positivo con un voltaje de aceleración de 20000 V. Todos los espectros de masa se calibraron internamente usando péptidos procedentes de la autodigestión con tripsina.

El análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF produce huellas de masa peptídica y los péptidos observados con una relación señal-ruido superior a 10 se cotejaron y se representaron como una lista de pesos moleculares monoisotópicos. Las proteínas identificadas ambiguamente se identificaron por huella peptídica y se sometieron a análisis de secuenciación en tándem (MS/MS) usando el espectrómetro de masas *MALDI TOF/TOF 4800 Proteomics Analyzer* (Applied Biosystems).

Para la identificación de proteínas se utilizó la base de datos *SwissProt DB* v.57.15 (515203 secuencias; 181334896 residuos) con restricción taxonómica para *Homo sapiens* (20266 secuencias). Los péptidos del MALDI TOF/TOF se analizaron usando *MASCOT 2.2* (www.matrixscience.com) a través del servidor *Global Protein Server v3.6* de *ABSciex*. Los parámetros de búsqueda fueron: cabamidometil cisteína, como modificación de la fijación y oxidación de metionina como una modificación variable; un sitio de corte perdido de la tripsina; el estado de carga del péptido +1, así como la tolerancia a los fragmentos MS-MS a 0.3 Da. Los parámetros que se utilizaron para la búsqueda combinada (huella peptídica y espectro MS-MS) fueron los mismos descritos anteriormente en este apartado.

En la identificación de proteínas, las puntuaciones de probabilidad fueron más exigentes que la puntuación fijada por *MASCOT* como significativa, con un valor p menor a 0,05.

RESULTADOS

1. CONSECUENCIAS FISIOPATOLÓGICAS CELULARES DE LAS MUTACIONES EN EL GEN *BCS1L*

Los defectos en el sistema OXPHOS provocan con frecuencia cambios fisiológicos en la célula, tales como la producción de radicales libres (*Verkaart et al., 2007*), alteraciones en la estructura de la red mitocondrial (*Koopman et al., 2005; Koopman et al., 2007*) y la activación de la apoptosis (*Kwong et al., 2007; Suen et al., 2008*). El déficit enzimático de complejo III (OMIM 124000) es un defecto poco frecuente del sistema OXPHOS (*Benit et al., 2009*). La mayor parte de las mutaciones que dan lugar a este déficit se localizan en el gen *BCS1L* (OMIM 603647).

Para entender mejor las consecuencias fisiopatológicas de las mutaciones en *BCS1L*, se realizaron estudios en fibroblastos de 6 pacientes (P1-P6) que portaban distintas mutaciones en este gen, mediante una serie de análisis comparativos bioquímicos y celulares. Por un lado, se analizó la expresión y la localización de la proteína BCS1L, así como el estado de las subunidades y de los complejos y supercomplejos de cadena respiratoria. Por otro lado, se analizó en paralelo la proliferación celular, así como los niveles de ROS y de las principales enzimas antioxidantes en los fibroblastos mutados. También se estudió el estado de la red mitocondrial en estos fibroblastos y los niveles estacionarios de las proteínas de fusión-fisión, así como el potencial de membrana mitocondrial y la inducción de la muerte celular.

1.1 Análisis genético de *BCS1L* en los pacientes de estudio

El análisis previo de la región genómica de *BCS1L*, a partir del ADN de fibroblastos de los 6 pacientes de estudio, reveló la presencia de mutaciones en todos los pacientes (Tabla 2 y Figura 11). La paciente 1 (P1) portaba la mutación c.296C>T (p.P99L) en homocigosis. Las características patogénicas de esta mutación han sido descritas en (*de Lonlay et al., 2001*). Los pacientes 2 y 3 (P2 y P3) presentaban las mutaciones patogénicas c.133C>T (p.R45C) y c.166C>T (p.R56X) en heterocigosis (*De Meirleir et al., 2003*). El paciente 4 (P4) era heterocigoto compuesto para la mutación c.166C>T (p.R56X), así como para dos mutaciones en la región genómica 5' no codificante de *BCS1L*: g.1181A>G y g.1164C>G (*Gil-Borlado et al., 2009*). La paciente 5 (P5) era portadora de la mutación p.R184C en el alelo paterno (*Fernandez-Vizarra et al., 2007; Hinson et al., 2007*), pero no se identificaron posibles mutaciones patogénicas

en el alelo materno, salvo la variante nucleotídica g.1892A>G en homocigosis. Esta variante está localizada en el interior de una región intrónica, por lo que es difícil explicar un posible efecto deletéreo. El paciente 6 (P6) portaba la mutación c.148A>G (p.T50A) en homocigosis (*Blazquez et al., 2009*). La Figura 11 indica la localización en el ADNc de *BCS1L* de las mutaciones de estos pacientes.

En el apartado de Pacientes y en la Tabla 2, se detallan las características clínicas y bioquímicas más significativas de los 6 pacientes con mutaciones en *BCS1L*. En base a dichas características, se concluyó que los pacientes que presentaron un peor desarrollo de su enfermedad fueron P1, P2 y P3, seguidos de P4. Los pacientes P5 y P6 mostraron una sintomatología más leve y con progresión más lenta.

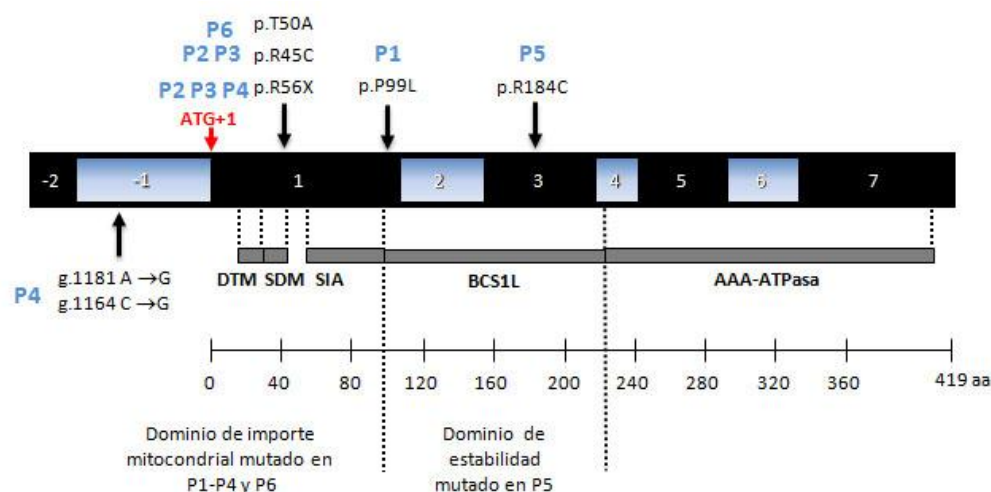


Figura 11. Representación esquemática del ADNc de *BCS1L* (Secuencia de referencia de GenBank NM_004328). Los cambios en nucleótidos o en aminoácidos encontrados en los pacientes (P1-P6) se muestran con flechas. Los exones no codificantes están indicados como -1 y -2. Los exones codificantes están indicados del 1-7. La barra numerada indica la posición de los aminoácidos a lo largo de la proteína codificada a partir del ADNc. El sitio de iniciación ATG+1 está indicado con una flecha y en rojo. Los dominios funcionales de *BCS1L*, deducidos por homología con la secuencia de *bcs1* de levadura, se indican como: **DTM**: Dominio transmembrana, **SDM**: Secuencia diana mitocondrial, **SIA**: Secuencia de importe auxiliar, **BCS1L**: Dominio de actividad y estabilidad de la proteína, **AAA-ATPasa**: Dominio ATPasa específico de la familia de las AAA-proteasas (*modificado de* (Fernandez-Vizarra et al., 2007).

1.2 Capacidad de crecimiento de fibroblastos con mutaciones en *BCS1L*

Para evaluar el efecto patogénico de las mutaciones en *BCS1L*, inicialmente se llevaron a cabo ensayos de proliferación en los fibroblastos de los pacientes de estudio y de dos controles. En un medio de cultivo con 4,5 g/l de glucosa, todos los fibroblastos de pacientes presentaron tasas de crecimiento reducidas respecto a los fibroblastos control. Además, las distintas células mutadas presentaron diferencias marcadas en sus

tasas de crecimiento. Los fibroblastos del paciente P5 mostraron la tasa de crecimiento más cercana a los controles, seguido de los fibroblastos del paciente P6, que mostraron un ligero retraso en su proliferación respecto a P5. Los fibroblastos de los pacientes P1, P2 y P4 mostraron tasas de crecimiento similares, pero retardadas respecto a las de P5 y P6. Los fibroblastos del paciente P3 presentaron la proliferación más lenta (Figura 12).

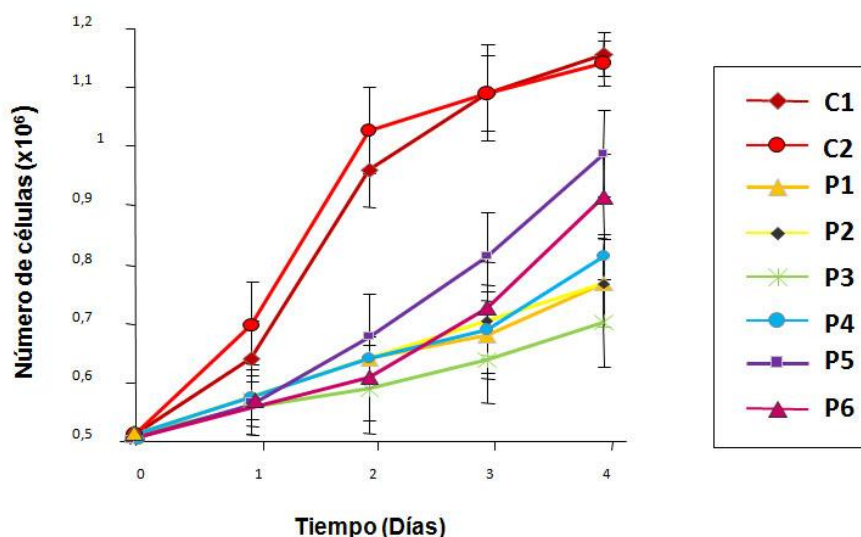


Figura 12. Efecto de las mutaciones en *BCS1L* sobre el crecimiento celular. Los fibroblastos se sembraron en placas P10 a una confluencia de 5×10^5 células por pocillo en medio suplementado con glucosa. Se realizó un conteo diario durante 4 días. Cada punto representa la media \pm DE de tres experimentos independientes para cada línea celular. C1-C2, fibroblastos control; P1-P6, fibroblastos de pacientes.

1.3 Efecto de las mutaciones en *BCS1L* en los niveles estacionarios de la proteína BCS1L y de las subunidades de cadena respiratoria

Para evaluar si las mutaciones en el gen *BCS1L* afectaban a los niveles de la propia proteína BCS1L, así como de distintas subunidades de la cadena respiratoria mitocondrial, se llevó a cabo una electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE), a partir de lisados celulares totales de las seis líneas de fibroblastos mutadas y tres controles (Figura 13). Los análisis de *Western-blot* realizados con un anticuerpo contra la proteína BCS1L revelaron niveles estacionarios similares de la proteína entre fibroblastos control y de pacientes. En cuanto a la subunidad Rieske del complejo III (RISP), se observó una disminución de alrededor del 40-60% en los fibroblastos de los pacientes P1, P2, y P3, mientras que los niveles de dicha proteína en el resto de células mutadas permanecieron similares a los controles. Estos datos correlacionaron con la severidad de los déficits enzimáticos del complejo III observados en dichos pacientes (Tablas 2 y 3). La reducción en los niveles estacionarios de la subunidad RISP es específica, ya que los

niveles de otras subunidades del complejo III como CORE2, no presentaron variaciones entre muestras control y de pacientes. Los niveles estacionarios de otras subunidades del sistema OXPHOS, como NDUFA9 del complejo I, COX5A del complejo IV y SDHA del complejo II, también fueron comparables entre muestras de controles y pacientes.

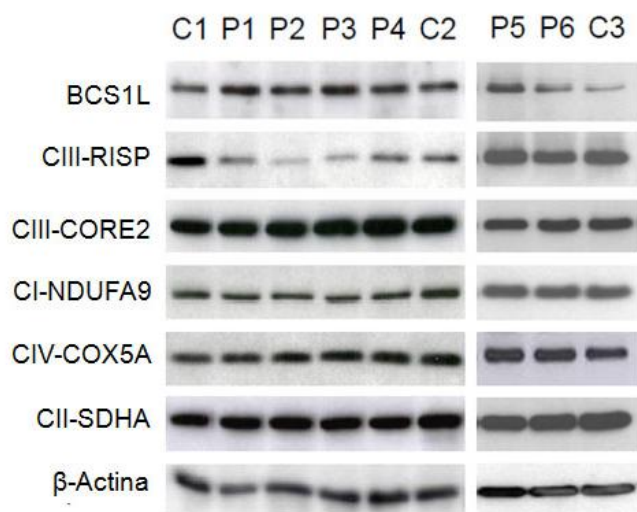


Figura 13. Análisis de los niveles de la proteína BCS1L y las subunidades de cadena respiratoria por Western-blot. Se analizaron muestras con 30µg de proteína procedente de lisados totales de fibroblastos, en geles al 10% de acrilamida. Se incubaron anticuerpos contra BCS1L, así como las siguientes subunidades OXPHOS: NDUFA9 del complejo I (CI), SDHA del complejo II (CII), CORE2 y RISP del complejo III (CIII) y COX5A del complejo IV (CIV). Se utilizó β-actina como control de carga. **P1-P6:** Pacientes 1-6; **C1-C3:** controles.

1.4 Localización subcelular de la proteína BCS1L en los fibroblastos mutados

En nuestros pacientes, la mayoría de las mutaciones en BCS1L están localizadas dentro de la región de reconocimiento y de importe de la proteína al interior de la mitocondria (Figura 11). Por tanto, dichas mutaciones podrían estar impidiendo el importe intramitocondrial de esta proteína. Para investigar la localización subcelular de BCS1L, llevamos a cabo ensayos de fraccionamiento a partir de extractos proteicos totales de fibroblastos de controles y pacientes. Las fracciones citosólicas se sometieron a electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) y posteriormente se analizaron por *Western-blot*.

Como se observa en la Figura 14, BCS1L no se detectó en las fracciones citosólicas de los fibroblastos control (C1, C2), mientras que la proteína se acumulaba claramente en la fracción citosólica de los fibroblastos de los pacientes P2, P3, P4 y P6 y ligeramente en P1 y P5. Se excluyó una posible contaminación de la fracción mitocondrial mediante el uso de un anticuerpo contra la subunidad COX2 del complejo IV. Estos resultados sugieren que el importe mitocondrial de la proteína BCS1L podría estar afectado por las mutaciones que portan todos los pacientes, lo que probablemente conllevaría una disminución de los niveles de BCS1L intramitocondriales.

Para confirmar esta hipótesis y examinar si las mutaciones en *BCS1L* afectaban a los niveles del propio complejo BCS1L, las fracciones mitocondriales se sometieron a ensayos de electroforesis azul nativa (BN-PAGE) a partir de mitocondrias de fibroblastos control y de pacientes solubilizadas con 2% dodecil maltósido (DDM). Los análisis de *Western-blot* con un anticuerpo que reconoce la proteína BCS1L, revelaron una marcada reducción de los niveles estacionarios del complejo BCS1L totalmente ensamblado (~400 kDa) en los fibroblastos de los pacientes P2, P3, P4 y P6 respecto a los controles. Además, se observó una acumulación de dos subcomplejos de ~250 kDa y ~100 kDa en las células mutadas P1-P5, que no se detectaron en controles. Estas señales podrían corresponder a intermediarios de ensamblaje o productos de degradación del complejo BCS1L, que se acumularían como consecuencia de las alteraciones estructurales de la proteína BCS1L mutada.

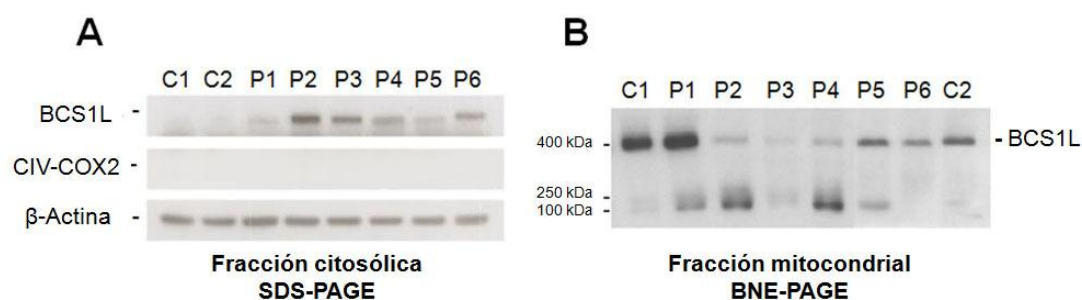


Figura 14. Localización subcelular de BCS1L en fibroblastos control y de pacientes. (A) Niveles de BCS1L en las fracciones citosólicas de fibroblastos control y mutados. Se cargaron 15 μ g de proteína y se analizaron en geles al 10% de acrilamida, que posteriormente se sometieron a *Western-blot* utilizando anticuerpos contra BCS1L y contra la subunidad COX2 del complejo IV (CIV). El anticuerpo de β -actina se usó como control de carga. **(B)** Niveles de ensamblaje del complejo BCS1L. Se separaron 30 μ g de mitocondria aislada en un gradiente del 4-15% de acrilamida en geles BN-PAGE y se sometieron a *Western-blot* usando un anticuerpo contra BCS1L. Se indican las masas moleculares de los distintos complejos BCS1L en el margen izquierdo de esta figura.

1.5 Ensamblaje de los complejos de cadena respiratoria mitocondrial en fibroblastos con mutaciones en *BCS1L*

Posteriormente se analizó mediante BN-PAGE en combinación con *Western-blot* si las mutaciones en *BCS1L* afectaban al ensamblaje del complejo III, ya que BCS1L cataliza la incorporación de la subunidad RISP en dicho complejo (Apartado 3.2.4.1.8). En estado estacionario, se observó una disminución de la subunidad RISP incorporada en el dímero del complejo III de ~450 kDa en los fibroblastos de los pacientes P1-P3 (Figura 15). Además, la subunidad RISP se acumulaba en un subcomplejo de ~300 kDa

en las células P1 y P4. Este subcomplejo no se detectó en las muestras control y no colocalizó con ninguna de las bandas correspondientes a los complejos BCS1L. En los fibroblastos de los pacientes P5 y P6, los niveles del complejo III fueron similares a los controles.

Estos resultados parecen indicar un defecto en el ensamblaje o en la estabilidad del complejo III en los fibroblastos de los pacientes P1-P4, lo cual correlaciona con los datos de actividad enzimática del complejo III descritos en las Tablas 2 y 3.

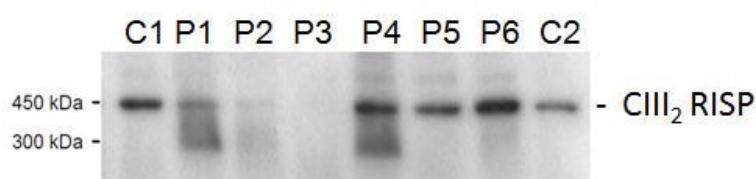


Figura 15. Ensamblaje de la subunidad RISP en el complejo III. Análisis en gel BN-PAGE al 4-15% de acrilamida y posterior análisis por *Western-blot* con un anticuerpo que reconoce la subunidad RISP del complejo III (CIII₂). En el margen izquierdo se indican los pesos moleculares de los complejos detectados con el anticuerpo de RISP. C1-C2: controles; P1-P6: pacientes.

Utilizando un anticuerpo que reconoce la subunidad NDUFS3, se observó una disminución en los niveles del complejo I en las muestras de los pacientes P1, P2 y P3. Los niveles estacionarios del complejo I permanecieron normales en el resto de muestras de pacientes (Figura 16). De acuerdo con estos datos, los ensayos de actividad en gel (IGA) también revelaron niveles bajos de actividad enzimática del complejo I en los fibroblastos de los pacientes P1, P2 y P3 respecto a los controles, mientras que las células P4 y P6 mostraron niveles normales de actividad del complejo I. Los fibroblastos del paciente P5 presentaron también una ligera caída de la actividad del complejo I. Esta reducción no correlacionó ni con los niveles estacionarios normales del complejo I en P5 (Figura 16), ni con la actividad enzimática normal del complejo I detallada en la Tabla 2, por lo que no se le dio importancia funcional.

Al utilizar un anticuerpo que reconoce la subunidad COX5A, se observó una ligera caída de los niveles estacionarios del complejo IV en los fibroblastos de los pacientes P1 y P4, lo cual correlacionó con los niveles de actividad citocromo c oxidasa mostrados en la Tabla 2.

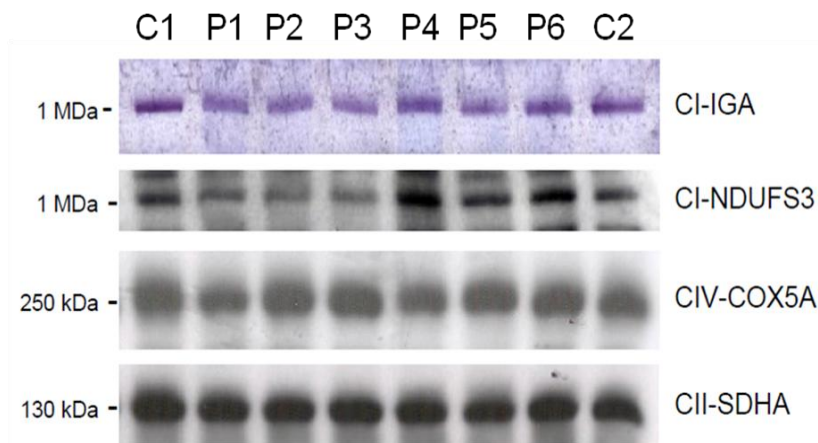


Figura 16. Ensamblaje de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial. Se analizaron 40 μ g de proteína mitocondrial en geles BN-PAGE con gradiente del 4-15% de acrilamida. En el panel superior se muestra un ensayo de actividad en gel (IGA) del complejo I. En paralelo se realizó un análisis por *Western-blot* utilizando anticuerpos que reconocen las siguientes subunidades OXPHOS: NDUFS3 del complejo I (CI), COX5A del complejo IV (CIV) y SDHA del complejo (CII). A la izquierda se indican los pesos moleculares correspondientes a los complejos de la cadena respiratoria.

Los niveles estacionarios del complejo II, utilizando un anticuerpo contra la subunidad SDHA, fueron comparables entre muestras control y de pacientes. Por ello, se cuantificaron las señales correspondientes a cada subunidad de cadena respiratoria en tres experimentos independientes y se relativizaron frente a los niveles de complejo II en cada una de las muestras. Estos ratios se utilizaron como valores numéricos para determinar los niveles relativos de los complejos I, III, y IV completamente ensamblados en fibroblastos control y mutados (Figura 17). Dichos valores confirmaron un defecto combinado del ensamblaje o estabilidad de los complejos I, III y IV de la cadena respiratoria mitocondrial en los fibroblastos del paciente P1, alteraciones en el ensamblaje de los complejos I y III en los fibroblastos de los pacientes P2 y P3, alteraciones en el ensamblaje del complejo IV en los fibroblastos del paciente P4, así como un ensamblaje normal de los complejos de cadena respiratoria en las muestras de los pacientes P5 y P6.

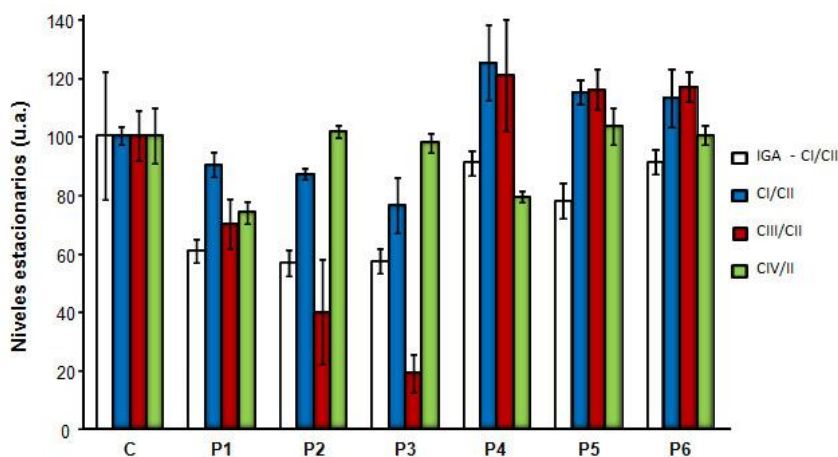


Figura 17. Niveles estacionarios relativos de los complejos de cadena respiratoria. Se cuantificaron las señales correspondientes a los complejos de cadena respiratoria en tres experimentos BN-PAGE independientes y se relativizaron frente a los niveles de complejo II. Las barras blancas muestran el porcentaje de actividad en gel (IGA) del complejo I en los pacientes (P1-P6) frente a los controles (C, n=3). Las barras de color muestran el porcentaje relativo de cada complejo de cadena respiratoria en pacientes y controles. **CI:** Complejo I, **CII:** Complejo II, **CIII:** Complejo III, **CIV:** Complejo IV. **u.a.** unidades arbitrarias.

1.6 Ensamblaje de los supercomplejos mitocondriales en fibroblastos con mutaciones en *BCS1L*

Los complejos del sistema OXPHOS pueden asociarse en estructuras supramoleculares conocidas como respirasomas o supercomplejos mitocondriales, que son dependientes del correcto ensamblaje del complejo III (Acin-Perez *et al.*, 2004). Consecuentemente, células HeLa en las que se bloqueó la expresión de *BCS1L* mostraron niveles bajos de los supercomplejos mitocondriales (Tamai *et al.*, 2008). Dado que en fibroblastos de los pacientes P1-P4 y P6, o bien existían alteraciones enzimáticas, o bien fallos en el ensamblaje o estabilidad de uno o más complejos de la cadena respiratoria, se analizó si dichos fallos podían conducir a alteraciones en la formación o composición de los supercomplejos mitocondriales. Para ello, se realizaron ensayos 2D-BN/SDS-PAGE en muestras control y de pacientes, a partir de mitocondrias solubilizadas con el detergente suave digitonina (4g/g proteína). Posteriormente se realizó un análisis de *Western-blot* para el que se utilizaron anticuerpos que reconocen las siguientes subunidades de cadena respiratoria: NDUFS2 del complejo I, RISP del complejo III y COX1 del complejo CIV (Figura 18). El lento crecimiento de las células provenientes del paciente P3 no permitió obtener la suficiente cantidad de muestra para realizar el experimento.

En dos muestras control representativas, la señal correspondiente a las subunidades NDUFS2 del complejo I y RISP del complejo III reveló la presencia

mayoritaria de ambas proteínas en estructuras de alto peso molecular, correspondientes al respirasoma o supercomplejos que contienen los complejos I, III y IV (SC). Además, la subunidad NDUFS2 estaba presente a bajos niveles en varios subcomplejos que se han descrito previamente como intermediarios del ensamblaje del complejo I (*Antonicka et al., 2003; Lazarou et al., 2007; Ugalde et al., 2004; Vogel et al., 2007*). Uno de estos subcomplejos de ~830 kDa, denominado CI*, se ha descrito como el último intermediario que se forma del complejo I antes de su incorporación a los supercomplejos (*Moreno-Lastres et al., 2012*). Curiosamente, la subunidad RISP solo apareció representada en el supercomplejo I+III₂+IV_n y no se detectó en forma de homodímero del complejo III (III₂), ni en el supercomplejo III₂+IV. Al contrario, la mayor parte de la señal correspondiente a la subunidad COX1 se detectó en el complejo IV libre, mientras que dos señales menos intensas aparecían en las formas de supercomplejos I+III₂+IV_n y en lo que se ha descrito como posible dímero del complejo IV (indicado como IV*). La subunidad COX1, al igual que RISP, tampoco se detectó en forma de supercomplejo III₂+IV.

En los fibroblastos de pacientes no se detectó una caída apreciable en los niveles de la subunidad NDUFS2 en el respirasoma (SC) respecto a los controles, salvo una leve disminución en los fibroblastos del paciente P2. En el caso de la subunidad RISP del complejo III, se observó una caída de los niveles de esta proteína en el supercomplejo I+III₂+IV_n de los fibroblastos P1 y más claramente en P2, mientras que sus niveles en las células P4 y P6 permanecieron similares a los controles. Al igual que en los controles, en las células mutadas no se detectó de forma reproducible la subunidad RISP en el complejo III dimérico (CIII₂), ni en el supercomplejo III₂+IV. En los fibroblastos mutados tampoco se observó una caída clara de los niveles de la subunidad COX1, ni en el complejo IV ni en el respirasoma. Curiosamente, en los fibroblastos P1 y P4 se observaron alteraciones en la distribución del complejo IV, con una acumulación de formas intermedias entre las que se encontraría el dímero del complejo IV. Este dato sugiere que la incorporación del complejo IV a los supercomplejos o su estabilidad en los mismos podría estar alterada. La composición de los supercomplejos en los fibroblastos P5 fue idéntica a los controles (datos no mostrados).

En resumen, estos resultados sugieren que existen alteraciones en la correcta composición, formación o estabilidad de los supercomplejos en los fibroblastos P1, P2 y P4, pero no en P6.

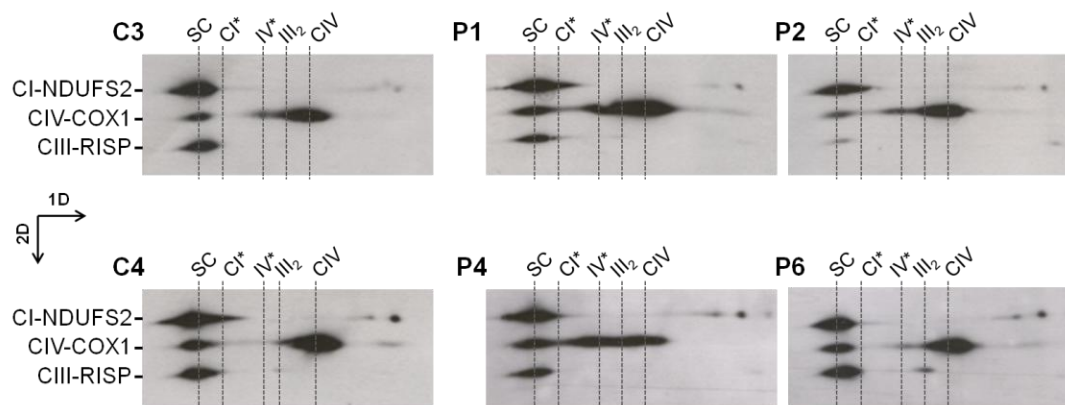


Figura 18. Análisis de los supercomplejos de cadena respiratoria en fibroblastos con mutaciones en *BCSIL*. Se separaron 50 μ g de mitocondria solubilizada con 4g digitonina/g proteína en geles 2D-BN/SDS-PAGE. Las muestras se analizaron mediante *Western-blot* con los siguientes anticuerpos: NDUFS2, del complejo I (CI); RISP, del complejo III (CIII); COX1, del complejo IV (CIV). SC, supercomplejo I+III₂+IV_n; CI*, subcomplejo de ~830 kDa del complejo I; IV*, dímero del complejo IV; III₂, complejo III dimérico; CIV, complejo IV monomérico. La pequeña señal de RISP observada en el complejo III dimérico de la muestra P6 no se ha reproducido en cuatro experimentos independientes.

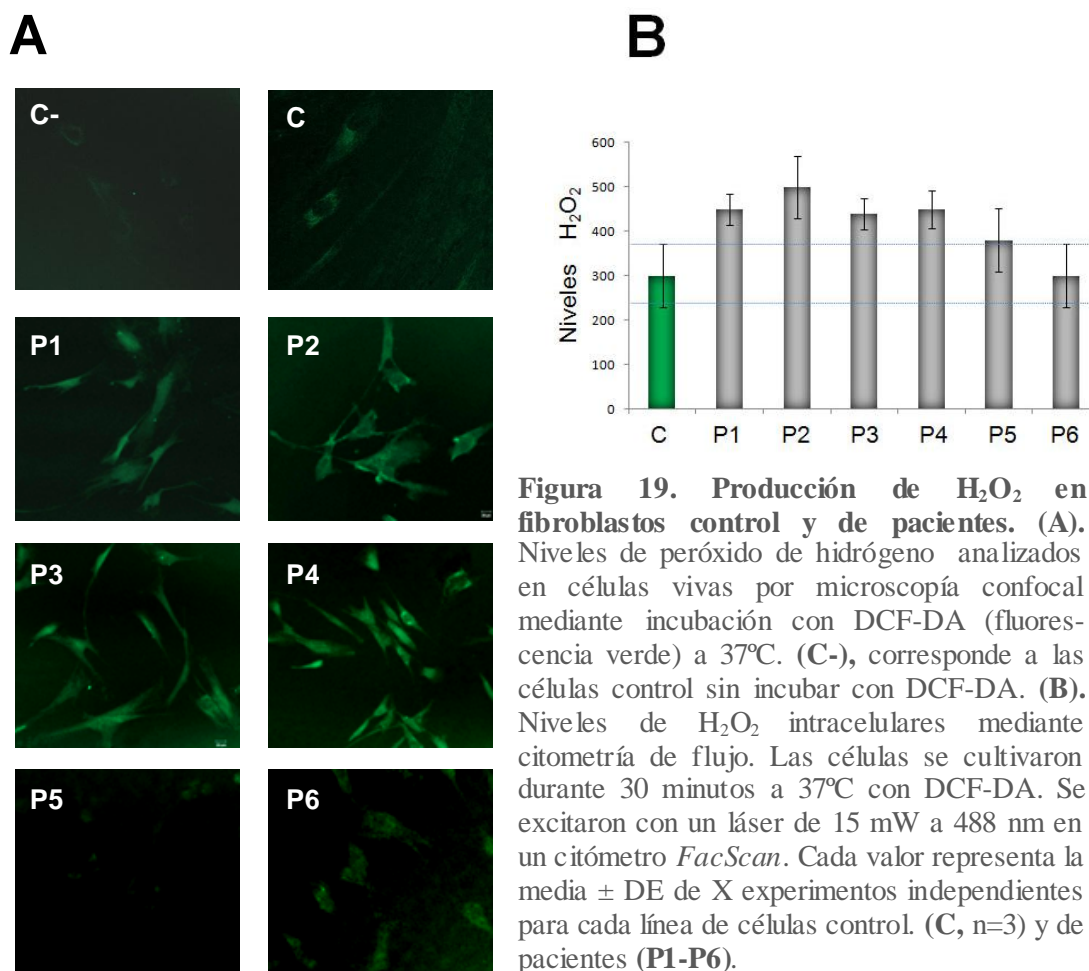
1.7 Niveles de ROS y de las enzimas antioxidantes en fibroblastos con mutaciones en *BCSIL*

Los defectos en la cadena respiratoria mitocondrial podrían causar un desajuste del transporte de electrones a lo largo de la misma, provocando un incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS). En trabajos anteriores realizados en pacientes con mutaciones en *BCSIL*, se sugirió que existía una correlación entre la severidad fenotípica de dichas mutaciones y un aumento en la producción de ROS (*Hinson et al., 2007*). Para confirmar esta posibilidad, se evaluaron tanto los niveles de ROS, como las posibles alteraciones en los niveles de las defensas antioxidantes en los fibroblastos de nuestros pacientes con mutaciones en *BCSIL*.

1.7.1 Niveles de ROS en células vivas

Los niveles de ROS se analizaron en primer lugar mediante microscopía confocal en células vivas de controles y pacientes incubadas con diacetato de diclorofluoresceína DCF-DA, compuesto usado para determinar principalmente los niveles de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Figura 19A). Estos experimentos mostraron un claro aumento en los niveles de H₂O₂ en los fibroblastos de los pacientes P1-P4 respecto a los controles, mientras que los niveles de H₂O₂ en las células de los pacientes P5 y P6 fueron similares a los controles. Para confirmar este dato, los niveles de H₂O₂ se cuantificaron

posteriormente por citometría de flujo (Figura 19B). Estos resultados corroboraron un incremento significativo de la fluorescencia (y por tanto de los niveles de H₂O₂) en los fibroblastos de los pacientes P1-P4, así como un ligero aumento no significativo en P5, mientras que los niveles de H₂O₂ en los fibroblastos del paciente P6 mostraron valores dentro del rango de los controles (Figura 19B).



1.7.2 Niveles estacionarios de las enzimas antioxidantes

A continuación, se midieron los niveles estacionarios de las enzimas antioxidantes mediante *Western-blot* a partir de lisados totales de fibroblastos control y de pacientes con mutaciones en *BCSIL* (Figura 20A). Se realizaron experimentos por triplicado, se densitometraron los niveles de las enzimas antioxidantes y los valores obtenidos se normalizaron frente a β -actina (Figura 20B).

Los niveles de la enzima superóxido dismutasa mitocondrial (MnSOD), estaban aumentados significativamente en los fibroblastos de los pacientes P1, P3, P4 y P6, mientras que las células de los pacientes P2 y P5 mostraron niveles estacionarios

similares a los controles. La incubación con un anticuerpo anti-catalasa (CAT), mostró niveles significativamente altos de esta enzima en los fibroblastos del paciente P2 y niveles bajos en P3; en el resto de las células mutadas los niveles estacionarios de catalasa fueron comparables a los controles. En el caso de la glutatión peroxidasa (GPx), solo los fibroblastos de los pacientes P1, P2 y P3 mostraron un ligero aumento no significativo de los niveles estacionarios de esta enzima. Finalmente, no se detectaron variaciones significativas en los niveles de glutatión reductasa (GR) en ninguna célula derivada de pacientes. Estos resultados sugieren una sobreexpresión generalizada de las defensas antioxidantes en todas las células mutadas en BCS1L, excepto en P5, respecto a las células control.

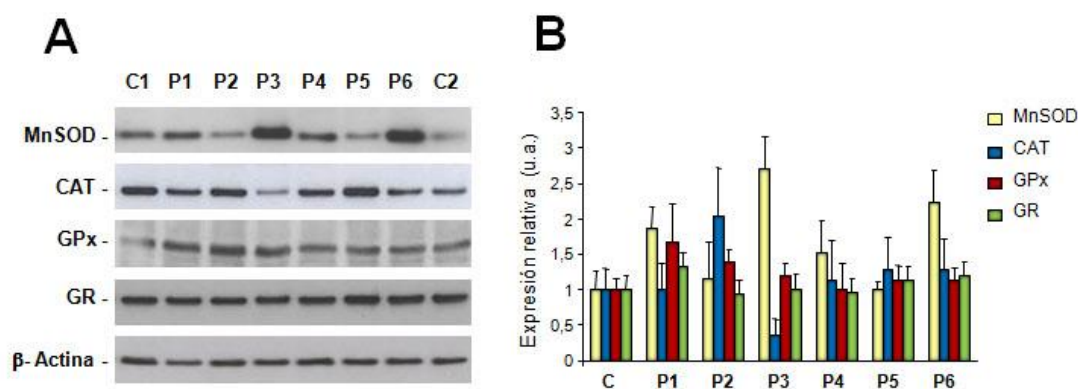


Figura 20. Niveles estacionarios de las enzimas antioxidantes. (A). Análisis de *Western-blot* realizado a partir de 30 µg de lisado total de células control (C1, C2) y de pacientes (P1-P6). Se incubaron anticuerpos contra las proteínas: MnSOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa; GPx, glutatión peroxidasa; GR, glutatión reductasa. (B) Se cuantificaron las señales de tres experimentos independientes y los valores densitometrados se relativizaron frente a la señal de β-actina. (u.a.), unidades arbitrarias. Los datos se presentan como la media ± DE del análisis de cada línea de pacientes respecto a la media de 5 controles diferentes.

1.8 Alteraciones estructurales en la red mitocondrial de fibroblastos con mutaciones en *BCS1L*

Las mitocondrias se encuentran formando redes filamentosas e interactúan entre sí mediante procesos dinámicos que conllevan fenómenos de fusión y fisión (*Chan, 2006; Guillery et al., 2008; Legros et al., 2002*). Los defectos funcionales de la cadena respiratoria mitocondrial se han asociado a una discapacidad en la síntesis de ATP, despolarización del potencial de membrana mitocondrial desencadenando una desestabilización de la red mitocondrial (*Chen y Chan, 2005; Legros et al., 2002*).

Se ha descrito que la inhibición de la actividad a nivel de los complejos I y III, podría llevar a la fragmentación de la red mitocondrial (*De Vos et al., 2005; Ljungdahl et al., 1987*). También se ha descrito que las ROS son un determinante importante en el modelado de la red mitocondrial ya que altos niveles de ROS provocarían fragmentación de la misma (*Koopman et al., 2007*). Por ello, se estudió si los déficits de cadena respiratoria mitocondrial y la consecuente producción de ROS observada en los fibroblastos de nuestros pacientes con mutaciones en *BCS1L*, se podían asociar a una desestabilización del equilibrio de fusión-fisión mitocondrial y por tanto a alteraciones en la estructura de la red mitocondrial.

1.8.1 Morfología de la red mitocondrial en pacientes con mutaciones en *BCS1L*

Para evaluar el estado de la red mitocondrial en los fibroblastos de nuestros pacientes, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia mediante microscopía confocal con un anticuerpo que reconoce la subunidad α de la ATP sintasa o complejo V (Figura 21A). Tal como se ha descrito previamente, los fibroblastos control presentaban mayoritariamente redes mitocondriales alargadas y filamentosas, con una baja proporción de filamentos cortos (*Benard a y Rossignol, 2008; Guillery et al., 2008*). Sin embargo, en los fibroblastos de pacientes se observaron predominantemente formas fragmentadas, así como la acumulación de pequeños túbulos enredados en la zona perinuclear, mitocondrias puntuadas y estructuras en forma de anillo (Figura 21B). Tras determinar el tipo de patrón de la red mitocondrial en todas las células, las alteraciones estructurales más severas se observaron en los fibroblastos de los pacientes P2 y P3, que mostraron la mayor proporción de mitocondrias puntuadas o de longitud intermedia, con pocas mitocondrias de fenotipo elongado o filamentosas (Figura 21C). Además se midió el diámetro mitocondrial, porque ésta es la dimensión más estable de la organela y variaciones en este parámetro reflejan con mayor fiabilidad las alteraciones en la morfología de la red mitocondrial (*Santamaria et al., 2006*). Como se observa en la Figura 21D, todos los pacientes mostraron un aumento significativo en el diámetro mitocondrial (ANOVA de 1 vía con $p < 0,001$), lo que apoya nuestras observaciones previas.

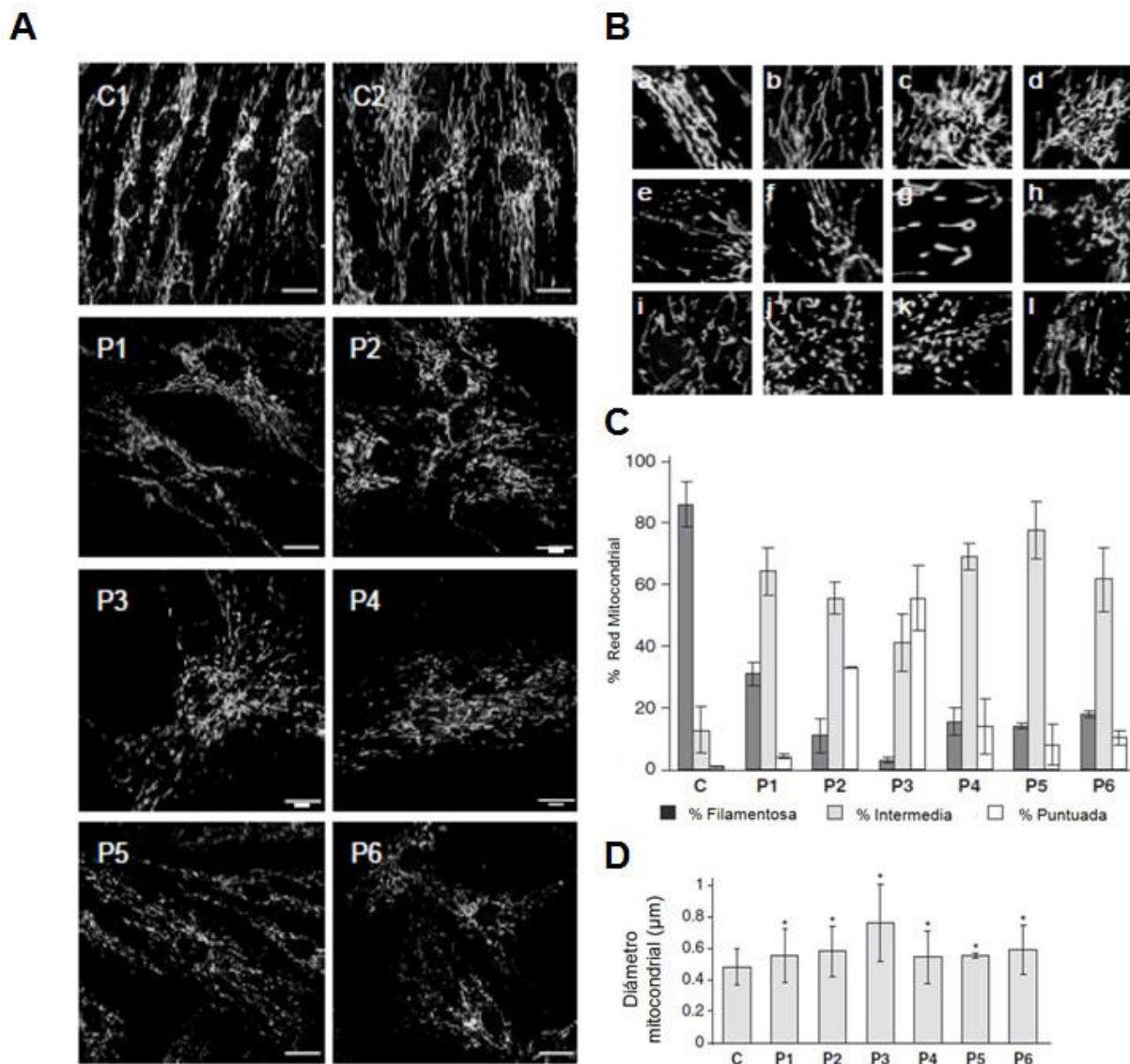


Figura 21. Morfología mitocondrial en fibroblastos control y de pacientes con mutaciones en *BCSIL*. (A) Se analizó la morfología mitocondrial en células fijadas mediante inmunofluorescencia usando un anticuerpo que reconoce la subunidad α del complejo V. C1-C2, controles; P1-P6, fibroblastos de pacientes con mutaciones en *BCSIL*. Barra de escala = 20 μm . (B) Diferentes aspectos de la red mitocondrial. (a, b) Controles con la red mitocondrial filamentosa clásica. Las formas más frecuentes encontradas en los pacientes incluyen formaciones densas y enrolladas en la zona perinuclear (c, d), formas intermedias con túbulos mitocondriales alargados (e, f), estructuras circulares (g), pequeños túbulos ramificados (h, i, j), vesículas (k), mitocondrias largas y fragmentadas (l). (C) Proporciones de los distintos fenotipos de red mitocondrial en las células: mitocondrias elongadas y filamentosas (% Filamentosa), con morfología mitocondrial intermedia (% Intermedia), únicamente mitocondrias puntuadas (% Puntuada). Los datos se presentan como media \pm DE del análisis de \sim 400 células de cada paciente y de 5 controles. (D) Diámetro mitocondrial en fibroblastos con mutaciones en *BCSIL*. Los resultados se muestran como la media \pm DE de al menos 200 determinaciones para cada línea de fibroblastos mutados y 3 controles distintos. Análisis estadístico: ANOVA de 1 vía con $p < 0,001$. Test *Scheffé post hoc*.

1.8.2 Análisis de los niveles estacionarios de las proteínas implicadas en el proceso de fusión-fisión mitocondrial

También se realizaron análisis de los niveles estacionarios de las proteínas implicadas en los fenómenos de fusión-fisión mitocondrial. A partir de lisados celulares, se analizaron por *Western-blot* los niveles de DRP1 (proteína de fisión) y OPA1 (proteína de fusión). Los niveles de ambas proteínas fueron comparables entre células de pacientes y controles. Sin embargo, se encontró una disminución del 20-40% en los niveles estacionarios de la proteína de fusión mitocondrial MFN2 en todos los pacientes. Se cuantificó la señal correspondiente a esta proteína y los valores densitométricos se normalizaron frente a β -actina (Figura 22B).

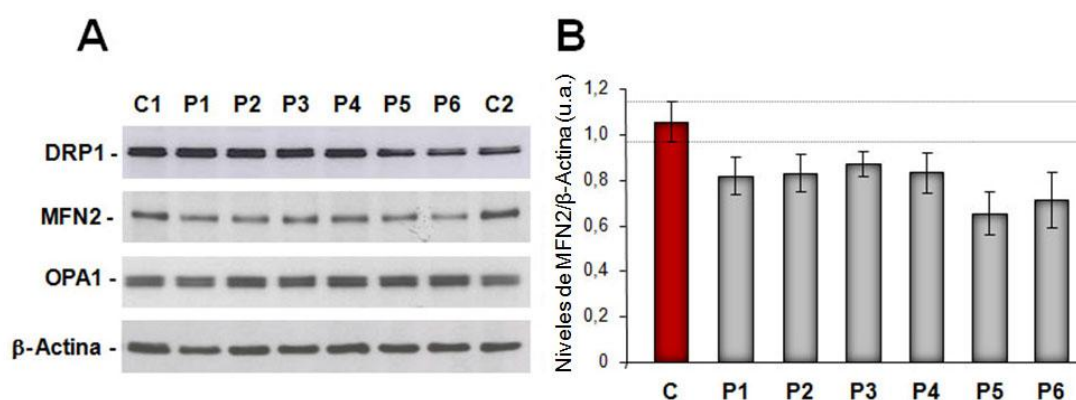


Figura 22. Efecto de las mutaciones en *BCSIL* en los niveles de proteínas implicadas en procesos de dinámica mitocondrial. (A). Se analizaron por *Western-blot* 30 μ g de extractos proteicos procedentes de lisados celulares y se incubaron frente a anticuerpos específicos contra las proteínas indicadas. C1-C2: controles. P1-P6: pacientes. (B). Niveles relativos de MFN2. Se cuantificaron las señales de 4 experimentos independientes y los datos obtenidos se normalizaron con la señal de β -actina. Los datos se presentan como media \pm DE de los valores de los fibroblastos de pacientes y de 5 controles (C). (u.a.), unidades arbitrarias.

1.9 Determinación del potencial de membrana mitocondrial

La inhibición de la fusión mitocondrial se ha asociado a la disipación de potencial de la membrana interna mitocondrial (*Legros et al., 2002*), así como a fallos enzimáticos en la cadena respiratoria mitocondrial. El estado del potencial de membrana mitocondrial en los fibroblastos con mutaciones en *BCSIL*, se determinó mediante microscopía confocal utilizando éster de tetrametil rodamina (TMRM). Este fluorocromo se acumula electroforéticamente en la mitocondria, emitiendo fluorescencia roja. En los fibroblastos mutados en *BCSIL*, se observó que el potencial de membrana mitocondrial estaba levemente hiperpolarizado o bien permanecía en el

rango de los controles (Figura 23), por lo que no existe despolarización de la membrana mitocondrial en dichas células.

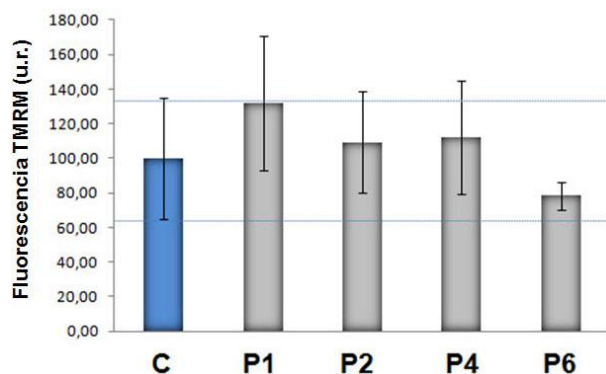


Figura 23. Potencial de membrana mitocondrial en fibroblastos control y mutados en *BCS1L*. Fluorescencia media de 4 medidas independientes realizadas en las muestras de los pacientes P1, P2, P4 y P6 y en 3 controles (C), relativizada frente a la actividad citrato sintasa. (u.r.), unidades relativas.

1.10 Análisis de la inducción de la muerte celular en fibroblastos con mutaciones en *BCS1L*

La fragmentación de la red mitocondrial y un exceso en la producción de ROS se han asociado a la inducción de la muerte celular programada (*Suen et al., 2008; Valko et al., 2007*), por lo que consiguientemente se analizó si las mutaciones en *BCS1L* conducían a un aumento en la muerte celular. Para ello se llevaron a cabo en primer lugar dos ensayos de muerte celular: TUNEL y ELISA. En segundo lugar, se analizaron los posibles mecanismos de muerte celular mediante el estudio por *Western-blot* de los niveles de las proteínas implicadas en los procesos de muerte celular programada.

1.10.1 Ensayos de TUNEL y ELISA

Se realizaron ensayos TUNEL mediante microscopía epifluorescente en las células mutadas y en 5 controles (Figura 24A) y posteriormente se cuantificó el número de núcleos apoptóticos (Figura 24B). Se observó un aumento en la proporción de núcleos apoptóticos en los fibroblastos P1-P3, pero las células P4-P6 presentaron un número de núcleos apoptóticos similar a los controles (Figura 24B). Estos datos se confirmaron mediante ensayo ELISA, que permitió detectar un aumento de la fragmentación del ADN nuclear en los fibroblastos de los pacientes P1-P3 (Figura 24C). Estos datos sugieren un efecto específico de cada mutación en la inducción de la muerte celular.

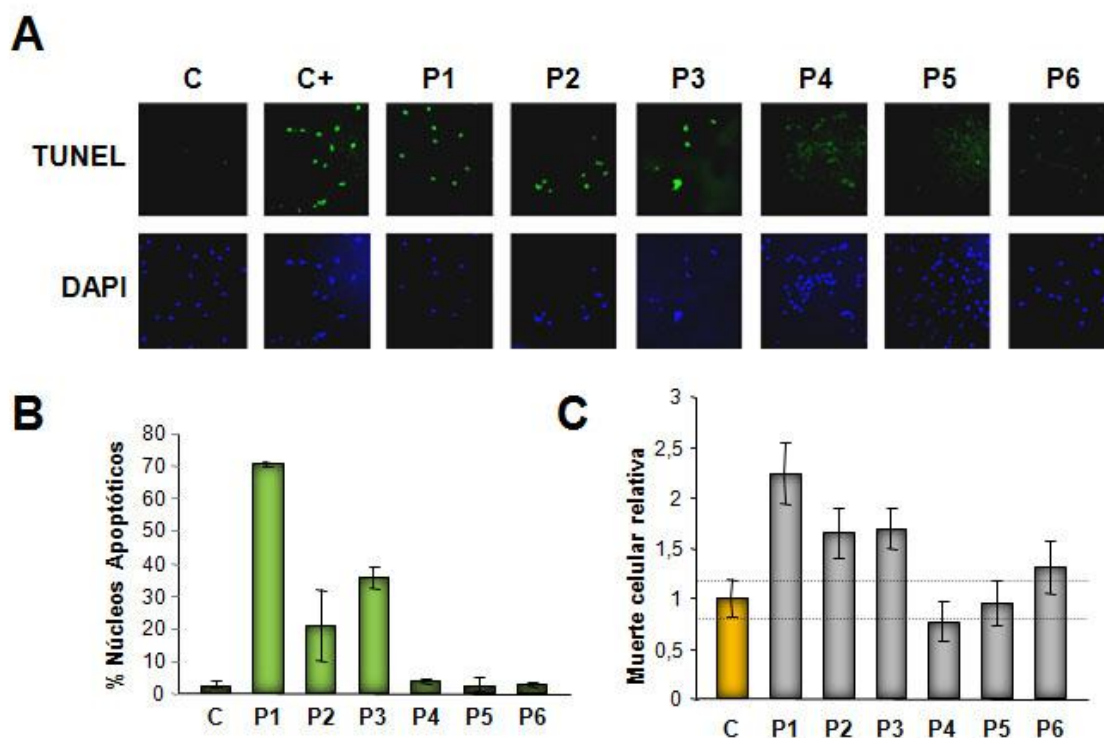


Figura 24. Ensayo de muerte celular en fibroblastos con mutaciones en *BCSIL*. (A) Ensayo TUNEL, que demostró la presencia de un alto número de núcleos apoptóticos en los fibroblastos mutados P1-P3. C, control; C+, control positivo después de 5 minutos de incubación con 12,5 $\mu\text{g/ml}$ *DNAse I*. (B) Cuantificación de núcleos apoptóticos. Los valores se expresaron como la media \pm DE del análisis de ~ 500 células de cada paciente y de 5 controles diferentes. (C) Cuantificación de la fragmentación del ADN nuclear. Los valores se expresaron como la media \pm DE del análisis de 3 medidas para cada línea celular de pacientes y de 2 controles.

1.10.2 Análisis de los niveles estacionarios de proteínas implicadas en la muerte celular programada.

Durante la etapa temprana de muerte celular programada, el citocromo c es liberado desde la mitocondria. Una vez en el citosol, interacciona con Apaf-1, lo que resulta en el procesamiento y la activación de la cascada de caspasas. Las caspasas son proteínas mediadoras de la muerte celular programada, que se activan proteolíticamente induciendo la apoptosis. Quisimos determinar en nuestros pacientes con mutaciones en *BCSIL* la activación de esta vía de muerte celular. Para ello mediante una electroforesis SDS-PAGE se separaron lisados totales procedentes de los fibroblastos mutados y de dos controles (Figura 25). Posteriormente se realizó un ensayo de *Western-blot* utilizando anticuerpos que reconocen específicamente las proteínas citocromo c (CYC), caspasa-3 y caspasa-9 (caspasas iniciadoras), así como la caspasa-8 (o efectora). En lisados celulares, se analizó la posible activación de dichas caspasas mediante su proteolización. La pro-caspasa 3, de 35 kDa, se proteoliza originando una banda de 17

kDa. Tras la activación de la pro-caspasa 8, de 57KDa, aparecen dos formas de 42 y 18 kDa. La pro-caspasa 9, de 47 kDa, se activa mediante su proteolización en formas de 37/35 kDa. La señal obtenida de la β -actina se usó como control de carga (Figura 25A). Al evaluar la salida de citocromo c al citosol en un experimento de fraccionamiento subcelular, observamos en fracción citosólica niveles de liberación de citocromo c similares a los controles en los pacientes P1, P4 y P6, o la no liberación de citocromo c al citoplasma en los pacientes P2 y P5. Relativizando la señal obtenida con respecto a los niveles de β -actina en esta fracción. Por otro lado, en la fracción mitocondrial no se apreció un descenso en los niveles de citocromo c intramitocondriales en ninguno de los pacientes respecto al control, usando como control de carga en este caso, la señal obtenida por la subunidad SDHA del complejo CII (Figura 25 B). En este experimento no se observó la liberación de citocromo c desde la mitocondria, ni la activación mediante proteólisis de las caspasas 3, 8 y 9, en ninguna muestra de pacientes ni de controles. Estos resultados sugieren que los mecanismos de apoptosis dependientes de caspasas no están activados en los fibroblastos con mutaciones en *BCS1L*.

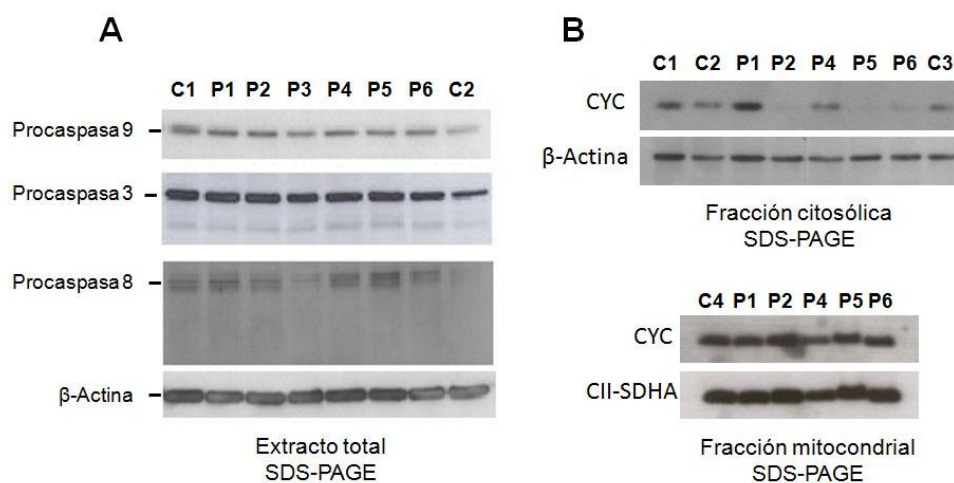


Figura 25. Niveles estacionarios de proteínas que intervienen en la apoptosis. (A) Se analizó por *Western-blot* la activación mediante proteolización de las caspasas implicadas en la cascada apoptótica, utilizando 40 μ g de extractos proteicos procedentes de lisados celulares. (B) Para el análisis de la liberación de citocromo c desde el espacio intermembrana mitocondrial al citosol, se analizaron 40 μ g de proteína procedente de fracciones citosólicas y 15 μ g de proteína mitocondrial purificada de fibroblastos control y de pacientes con mutaciones en *BCS1L*. C1-C4: controles; P1-P6: pacientes. CYC: citocromo c; CII, complejo II.

2. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN ENTRE LAS PROTEÍNAS BCS1L Y LETM1 EN FIBROBLASTOS CON MUTACIONES EN BCS1L

Como se ha descrito en el apartado 3.2.4.1.10. de la introducción, BCS1L interacciona con la proteína de membrana interna mitocondrial LETM1 en células humanas, lo que permitiría conseguir de manera eficiente el correcto ensamblaje de la cadena respiratoria (*Tamai et al., 2008*). Se ha descrito un posible papel de BCS1L en la homo-oligomerización de LETM1 en un complejo de ~ 250 kDa, lo que se ha relacionado con la estabilidad de los supercomplejos y con el mantenimiento de la morfología mitocondrial (*Dimmer et al., 2008; Tamai et al., 2008*). Por tanto, es posible que las mutaciones en *BCS1L* presentes en nuestros pacientes afecten a la interacción entre ambas proteínas y a la formación del complejo de LETM1. Para confirmar esta hipótesis se realizaron tres aproximaciones experimentales: 1) Se realizaron experimentos de co-inmunoprecipitación para analizar si las distintas mutaciones en *BCS1L* afectaban a su interacción con LETM1; 2) Mediante *Western-blot*, se compararon los niveles de LETM1 en distintas fracciones subcelulares de fibroblastos con mutaciones en *BCS1L* respecto a controles; 3) Se estudió la formación y posible colocalización de los complejos de BCS1L y LETM1 mediante 2D-BN/SDS-PAGE.

2.1 Interacción entre BCS1L y LETM1 en muestras de pacientes

Para comprobar que las mutaciones en *BCS1L* no afectaban a la interacción de esta proteína con LETM1 en el interior de la membrana interna mitocondrial, se realizaron en primer lugar ensayos de co-inmunoprecipitación en fibroblastos control y mutados a partir de extractos proteicos derivados de mitocondrias purificadas (Figura 26).

Inicialmente se procedió a ajustar las condiciones del ensayo de inmunoprecipitación en fibroblastos control. Para ello, se inmunoprecipitaron extractos mitocondriales de controles con tres anticuerpos: por un lado, el anticuerpo BCS1L se utilizó para inmunoprecipitar LETM1; por otro lado, se utilizaron los anticuerpos LETM1 y RISP (como control positivo de la interacción con BCS1L) para inmunoprecipitar BCS1L. Los inmunoprecipitados se sometieron a *Western-blot*, utilizando el anticuerpo BCS1L para detectar las inmunoprecipitaciones realizadas con LETM1 y RISP y el anticuerpo LETM1 para detectar la inmunoprecipitación realizada con BCS1L (Figura 26A). Como se esperaba, la mayor parte de la proteína BCS1L se

detectó en los inmunoprecipitados llevados a cabo con los anticuerpos LETM1 y RISP, sin apenas detectarse señal de BCS1L en el sobrenadante. Estos datos confirmaron que la proteína BCS1L puede interactuar tanto con LETM1 como con RISP en fibroblastos control. Sin embargo, tan solo se observó una señal minoritaria de la proteína LETM1 en el inmunoprecipitado realizado con el anticuerpo BCS1L, apareciendo la mayor parte de LETM1 en el sobrenadante.

Posteriormente, se inmunoprecipitaron extractos mitocondriales de fibroblastos mutados en *BCS1L* (P1, P2, P4 y P6), utilizando el anticuerpo BCS1L para inmunoprecipitar LETM1 (Figura 26B). Al igual que en los controles, se observó una parte minoritaria de la señal de LETM1 en el inmunoprecipitado, apareciendo la mayor parte de esta proteína en el sobrenadante. Estos resultados sugieren que existe una interacción entre BCS1L y LETM1 tanto en fibroblastos control como en los mutados y que, por tanto, las mutaciones en *BCS1L* no afectarían a la interacción de esta proteína con LETM1. Sin embargo, la mayor parte de la proteína LETM1 no se encontraría asociada a BCS1L.

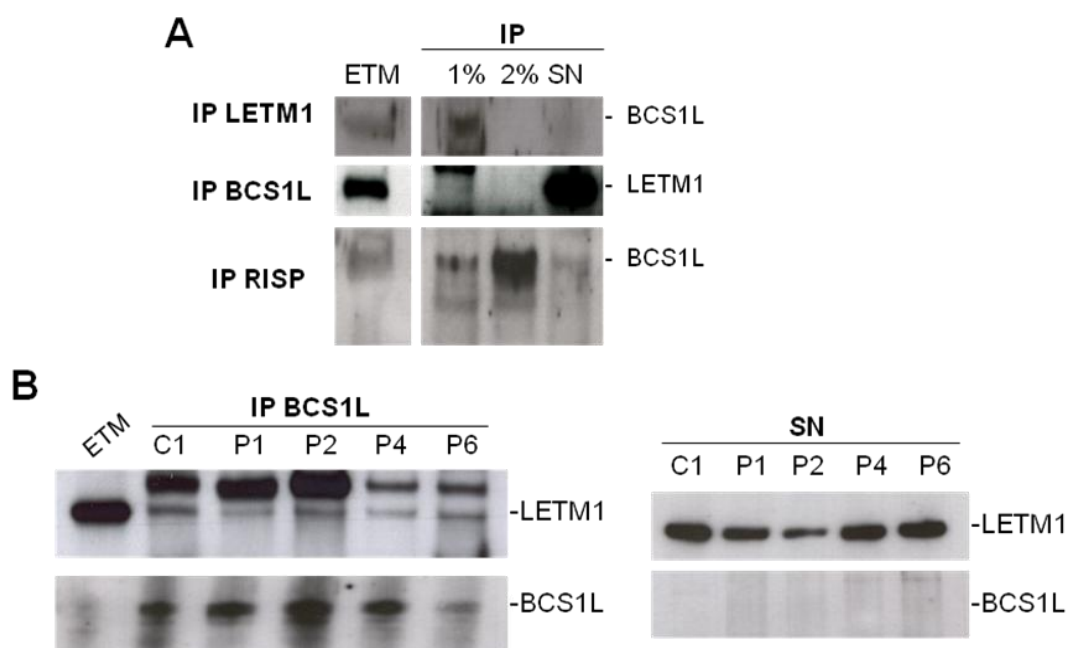


Figura 26. Interacción entre BCS1L y LETM1. (A) Se inmunoprecipitaron extractos mitocondriales de fibroblastos control con los anticuerpos que reconocen BCS1L, LETM1 y RISP y se procesaron a distintas concentraciones de Triton X-100 (1%, 2%). Los inmunoprecipitados se analizaron mediante SDS-PAGE y se incubaron con los anticuerpos BCS1L y LETM1. Los anticuerpos utilizados para la inmunoprecipitación (IP) se indican a la izquierda y los utilizados para la inmunodetección a la derecha. (B) Se analizaron extractos mitocondriales de fibroblastos control (C1) y de cuatro pacientes (P1, P2, P4 y P6) con mutaciones en *BCS1L* mediante inmunoprecipitación con un anticuerpo BCS1L monoclonal. Se utilizaron anticuerpos que reconocen LETM1 y BCS1L (policlonal) para la detección en membrana. ETM, extracto total mitocondrial; IP, inmunoprecipitado; SN, sobrenadante.

2.2 Niveles estacionarios y localización subcelular de la proteína LETM1 en fibroblastos mutados en *BCSIL*

En segundo lugar, se realizó un fraccionamiento subcelular a partir de lisados de fibroblastos procedentes de 2 controles y de pacientes con mutaciones en *BCSIL* (P1-P6). Las fracciones totales y citosólicas se sometieron a electroforesis SDS-PAGE, mientras que las fracciones mitocondriales se sometieron a BN-PAGE. Posteriormente, se analizaron los niveles de LETM1 mediante *Western-blot* utilizando un anticuerpo específico contra la proteína. En las fracciones totales y citosólicas, no se observaron diferencias significativas en los niveles de LETM1 entre muestras de pacientes (P1, P2, P4 y P6) respecto a los controles (C1 y C2) (Figuras 27A y 27B). En el caso de las fracciones mitocondriales, se observaron niveles elevados del complejo de LETM1 de ~250 kDa en todas las células de pacientes excepto P5, cuyos niveles fueron similares a los controles (Figura 27C). Además, se observó la acumulación de otro complejo de LETM1 de mayor peso molecular (~350 kDa) en las muestras de los pacientes P1 y P4 respecto a los controles, que no colocalizó con la señal correspondiente al complejo III mitocondrial (indicado como CIII-CORE2 en la Figura 27C).

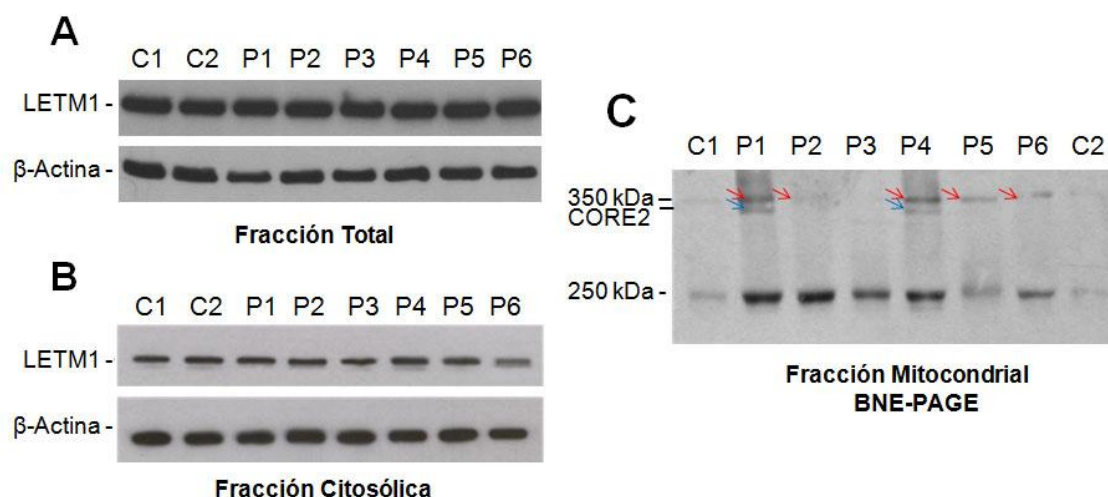


Figura 27. Niveles estacionarios de LETM1 en fracciones subcelulares de fibroblastos mutados en *BCSIL*. Se separaron 30 μ g de extractos proteicos procedentes de lisados celulares (A) y de fracciones citosólicas (B) en geles SDS-PAGE al 10% acrilamida. Los niveles de LETM1 se analizaron por *Western-blot*, utilizando β -actina como control de carga. (C) Se solubilizaron 40 μ g de mitocondrias purificadas en 2% lauril maltósido, se separaron en geles BN-PAGE al 4-15% acrilamida y los niveles de LETM1 se analizaron por *Western-blot*. Las señales de los complejos de LETM1 (250 kDa y 450 kDa, aproximadamente) se indican con flechas rojas. También se indica la posición correspondiente al complejo III mitocondrial, detectado en una incubación previa con un anticuerpo que reconoce la subunidad CORE2.

2.3 Ensamblaje de los complejos de BCS1L y LETM1 en fibroblastos mutados en *BCS1L*

En tercer lugar, se analizó el ensamblaje y la posible colocalización de los complejos en los que están presentes BCS1L y LETM1. Inicialmente, se llevaron a cabo ensayos de 2D-BN/SDS-PAGE seguido por análisis de *Western-blot* en fibroblastos control (Figura 28). Al usar un anticuerpo específico contra la proteína BCS1L, se detectaron hasta 5 señales de BCS1L (*a*, *b*, *c*, *d* y *e*) que correspondían a complejos de distinto peso molecular: *a*, de ~850 kDa, *b* y *c*, de ~400 y 450 kDa, *d*, de 250 kDa y *e*, de 100 kDa. Las formas mayoritarias de BCS1L correspondieron a las señales *b*, *c* y *e*. Al utilizar un anticuerpo que reconoce LETM1, se observaron hasta 3 señales de la proteína (*A*, *B*, y *C*) en complejos de distinto peso molecular: *A*, de ~650 kDa, *B*, de ~350 kDa y *C*, de ~250 kDa. En los fibroblastos control, la forma mayoritaria de LETM1 correspondió a la señal *C*, de ~250 kDa, que parecía colocalizar con el complejo *d* de BCS1L, del mismo peso molecular. Las señales de BCS1L y LETM1 no colocalizaron con los supercomplejos de cadena respiratoria (SC), tras examinar la distribución de las subunidades NDUFA9 del complejo I, RISP del complejo III y COX5A del complejo IV. En la parte superior se indican los pesos moleculares aproximados de las distintas señales. En rojo se indica la colocalización de BCS1L y LETM1.

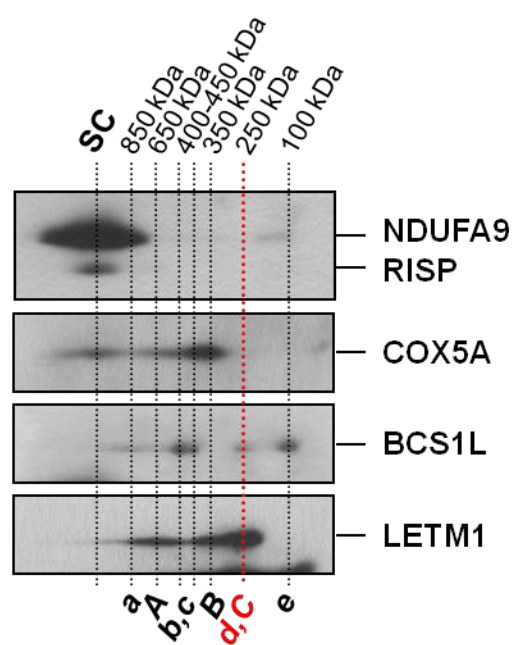


Figura 28. Alineamiento de los complejos de BCS1L y LETM1 respecto a los supercomplejos de cadena respiratoria. Se realizó un ensayo 2D-BN/SDS-PAGE con 40 μ g de extractos mitocondriales procedentes de fibroblastos control, solubilizados con 4g digitonina / g proteína. Las muestras se analizaron mediante *Western-blot* con anticuerpos que reconocen BCS1L, LETM1 y las siguientes subunidades OXPHOS: NDUFA9 del complejo I, RISP del complejo III y COX5A del complejo IV. SC, supercomplejo I+III₂+IV_n de ~1800 kDa. En la parte superior se indican los pesos moleculares aproximados de las distintas señales. En rojo se indica la colocalización de BCS1L y LETM1.

Posteriormente, se analizó la distribución de los complejos de BCS1L y LETM1 en los fibroblastos mutados en *BCS1L* (Figura 29). Al usar el anticuerpo que detecta BCS1L (Figuras 29A y 29B, paneles izquierdos), se observó un ligero aumento de los niveles relativos del complejo *a* en todos los pacientes respecto a los controles. Aunque las células del paciente P1 mostraron niveles generales elevados de BCS1L, la distribución relativa de esta proteína en los complejos *b*, *c*, *d* y *e* permaneció similar a los controles. En las muestras de los pacientes P2 y P4, se observó una disminución de los niveles del complejo *d* de BCS1L, sin detectarse variaciones significativas en la distribución relativa de BCS1L en los complejos *b*, *c* y *e*. Por último, las muestras de los pacientes P5 y P6 permanecieron con niveles relativos de los complejos *b*, *c*, *d* y *e* similares a controles.

Respecto a la distribución de los complejos de LETM1 en fibroblastos mutados (Figuras 29A y 29B, paneles derechos), se observó un desplazamiento de la señal de LETM1 desde el complejo *C*, mayoritario en los controles, bien hacia estructuras intermedias entre los complejos *A* y *B*, o bien hacia estructuras supramoleculares de tamaños superiores al complejo *A*, en las muestras de todos los pacientes y especialmente en P1. Algunas de esas señales parecían colocalizar con los supercomplejos I+III₂+IV_n (indicados con un asterisco). Estos datos indicarían una reorganización de los complejos de BCS1L y LETM1 en los fibroblastos mutados.

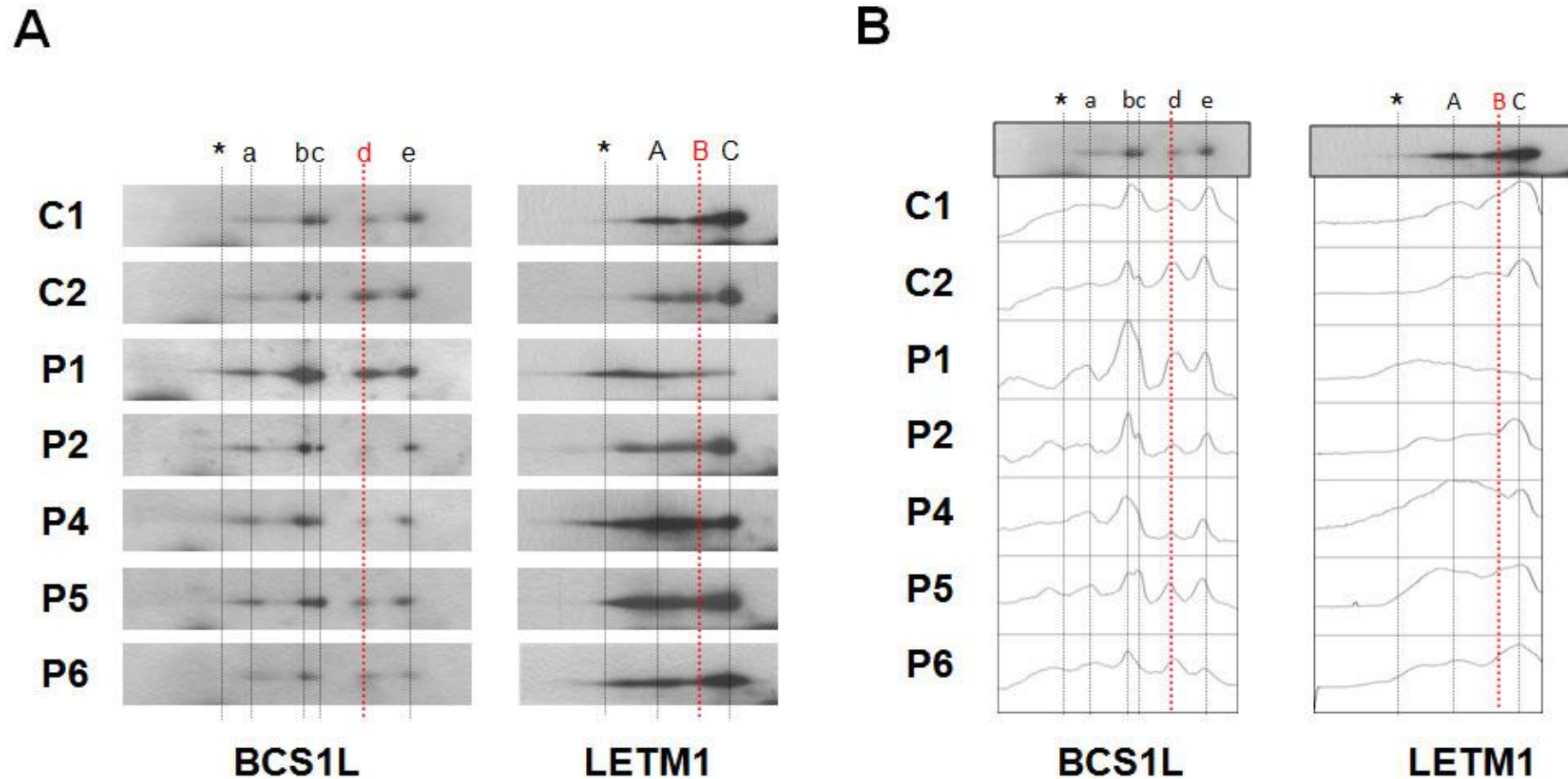


Figura 29. Distribución de los complejos de BCS1L y LETM1 en fibroblastos con mutaciones en *BCS1L*. (A) Se realizó un ensayo 2D-BN/SDS-PAGE con 40 μ g de extractos mitocondriales procedentes de fibroblastos control (C1 y C2) y mutados en *BCS1L* (P1,P2,P4,P5 y P6). Las muestras se solubilizaron con 4g digitonina / g proteína y se analizaron mediante *Western-blot* con anticuerpos que reconocen BCS1L y LETM1. El anticuerpo policlonal de BCS1L reveló 5 señales (*a, b, c, d, e, f*). El anticuerpo monoclonal de LETM1 reveló 3 señales (*A, B, C*). (B) Histograma densitométrico que representa los distintos complejos de BCS1L y LETM1. El asterisco indica la posición relativa del supercomplejo I+III₂+IV_n de ~1800 kDa. En rojo se indica la señal (*d*) de BCS1L que colocaliza con la señal (*C*) de LETM1 en un complejo de ~250 kDa.

3. ESTUDIO DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS EN FIBROBLASTOS CON MUTACIONES EN *BCSIL*

Con el fin de estudiar los procesos celulares afectados por las mutaciones en el gen *BCSIL*, que permita en un futuro la detección de nuevos biomarcadores y de dianas terapéuticas en pacientes con déficit enzimático de complejo III, se estudió el proteoma diferencial entre fibroblastos control y derivados de pacientes con mutaciones en *BCSIL* mediante el uso de la tecnología DIGE (apartado 3.6.10).

3.1 Electroforesis diferencial en gel en dos dimensiones (2D-DIGE): Ajuste de las condiciones electroforéticas

En primer lugar, se realizó una prueba previa de electroforesis bidimensional para ajustar las condiciones electroforéticas del 2D-DIGE y ver los mapas proteicos de cada una de las condiciones a comparar (apartado 3.6.9). Para realizar este experimento se partió de extractos proteicos procedentes de lisados de fibroblastos de 4 controles (C1-C4) y de 4 pacientes con mutaciones en *BCSIL* (P1, P2, P4 y P6). Las muestras se resuspendieron en el tampón de rehidratación del DIGE y posteriormente, se fraccionaron por electroforesis 2D-PAGE (Figura 30).

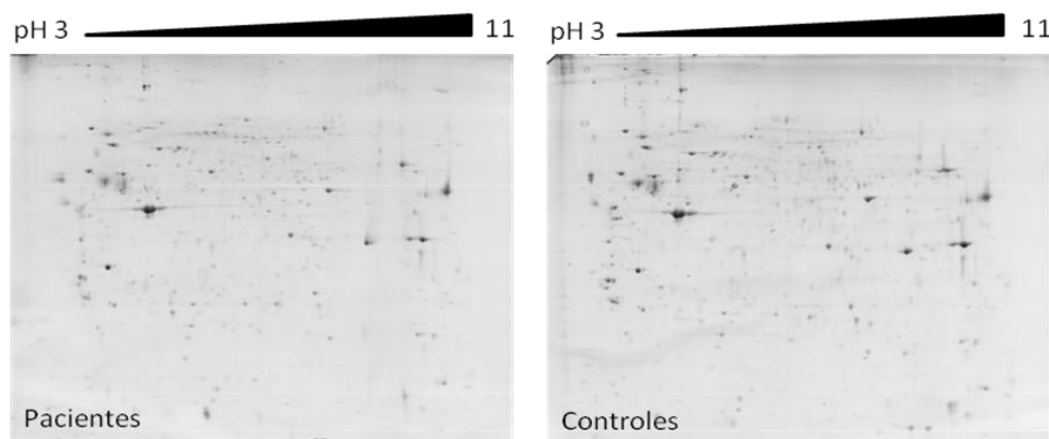


Figura 30. Geles 2D-PAGE teñidos con azul de Coomassie. Se establecieron dos grupos de muestras (controles y pacientes) y se mezclaron por separado las 4 réplicas de cada grupo. En total, se cargaron 100 µg de proteína por grupo en dos tiras de rango no lineal de pH del 3-11, que fueron sometidas a isoelectroenfoque. Posteriormente, las tiras se equilibraron y se aplicaron en un gel al 12% poliacrilamida. El gel de la izquierda corresponde a la mezcla de extractos proteicos de fibroblastos mutados y el de la derecha, a la mezcla de extractos proteicos de los fibroblastos control.

Para ello, se establecieron dos grupos de muestras (controles y pacientes) y se mezclaron, por un lado, 25 µg de proteína procedente de cada una de las 4 muestras

control (mezcla C) y por otro, 25 µg de proteína procedente de las 4 muestras de pacientes (mezcla P). En total, cada una de las mezclas contenía 100 µg de proteína. Ambas mezclas se cargaron en tiras de poliacrilamida de rango no lineal de pH del 3-11 y se separaron por punto isoeléctrico en la primera dimensión. Posteriormente, las proteínas se separaron en la segunda dimensión por masa molecular, usando geles de poliacrilamida al 12%, tal como se especifica en Materiales y Métodos (apartado 3.6.9.1).

3.2 Diseño experimental del 2D-DIGE y mapa del proteoma diferencial de fibroblastos control y mutados en *BCS1L*

A continuación, se realizó el diseño experimental del 2D-DIGE detallado en la Tabla 7. Según el mismo, cada preparación debía contener una mezcla de dos muestras procedentes de un paciente y un control, cada una de ellas marcadas con un fluorocromo distinto (Cy5 y Cy3), así como el estándar interno (EI) marcado con el fluorocromo Cy2. Se realizaron 4 geles siguiendo dos criterios: 1) Que la mitad de cada una de las muestras biológicas (2 controles y 2 pacientes) estuvieran marcadas con Cy5 y la otra mitad con Cy3; 2) Que existiera una distribución arbitraria de las muestras biológicas en los geles DIGE.

Tabla 7. Diseño experimental del 2D-DIGE

	Cy5	Cy3	Cy2
Gel 1	C1	P6	EI
Gel 2	C2	P1	EI
Gel 3	P2	C3	EI
Gel 4	P4	C4	EI

Tabla 7. Diseño Experimental del 2D-DIGE. Tras comprobar que las muestras eran adecuadas para el experimento de 2D-DIGE, se realizaron emparejamientos de muestras control y mutadas, marcando la mitad de las muestras con Cy5 y la otra mitad con Cy3. El estándar interno (EI), marcado con Cy2, actúa como control interno y está formado por una mezcla de todas las muestras a analizar. Controles: C1-C4. Pacientes: P1, P2, P4 y P6. Estándar interno: EI. Fluorocromos de cianina utilizados: Cy5, Cy3 y Cy2.

Siguiendo las mismas condiciones de los geles 2D-PAGE previos, se prepararon las muestras de acuerdo con el diseño experimental y se realizó el experimento 2D-DIGE en 4 geles independientes. En total se obtuvieron 12 imágenes digitalizadas: 8 de ellas correspondientes a las muestras de fibroblastos control y derivados de pacientes, marcados con Cy3 y Cy5, así como 4 imágenes correspondientes al estándar interno,

marcado con Cy2. Las imágenes superpuestas de Cy3 y Cy5 de cada uno de los geles se muestran en la Figura 31.

Posteriormente, se realizó el análisis comparativo de los geles 2D-DIGE usando el programa *DeCyder v6.5*. En él se realizó la codetección de las manchas proteicas en cada gel, su emparejamiento con el resto de los geles y la normalización de las cuantificaciones. En total, se detectaron 1788 manchas proteicas para el gel 1, 1738 manchas proteicas para el gel 2, 1762 manchas proteicas para el gel 3 y 1980 manchas proteicas para el gel 4.

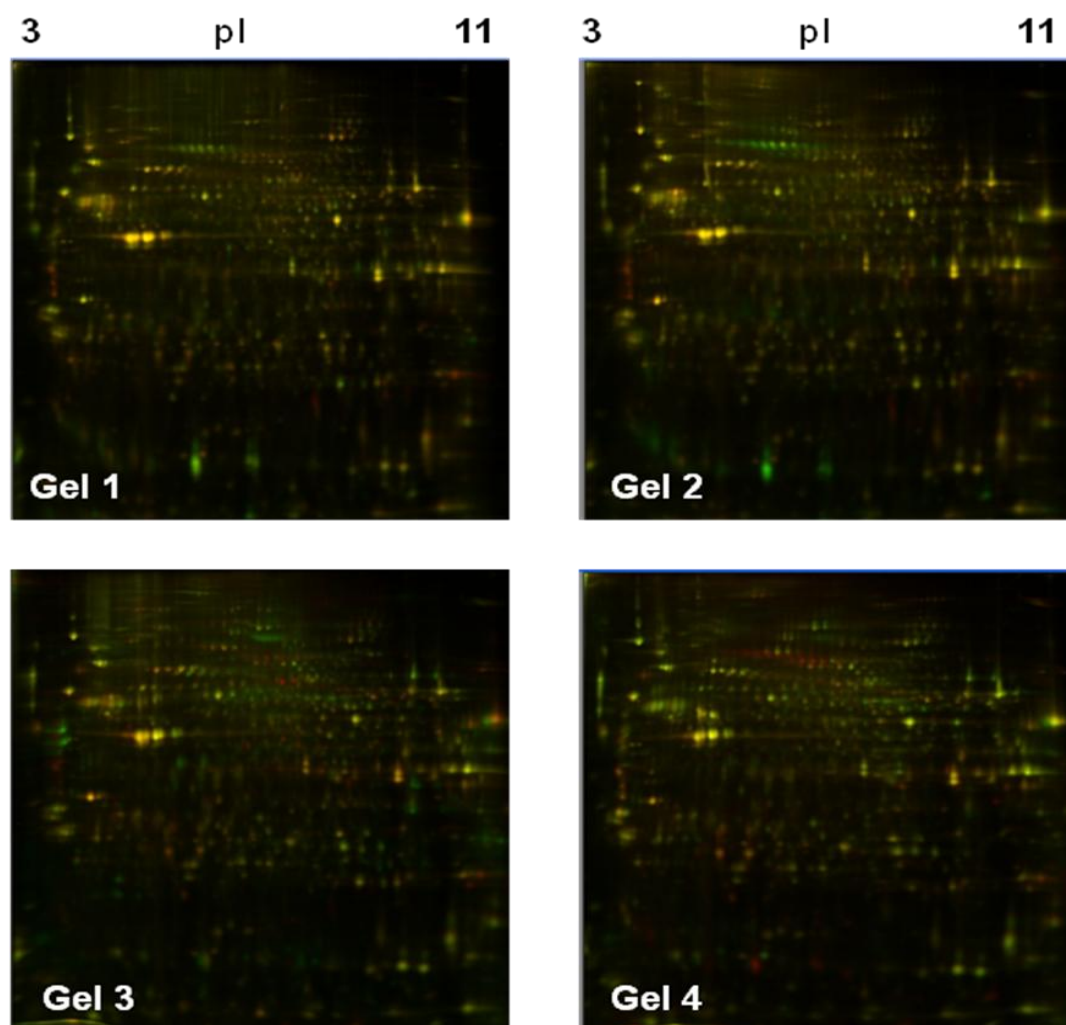


Figura 31. Imágenes de los geles 2D-DIGE de fibroblastos control y mutados en *BCS1L*. Las imágenes reflejan la superposición de las señales de fluorescencia que generan los fluorocromos Cy3/Cy5 en los 4 geles 2D-DIGE, cada uno de ellos correspondiente al emparejamiento de una muestra control y una mutada, según el diseño experimental (Tabla 7).

A continuación, se procedió al emparejamiento de las manchas de todas las réplicas y se realizó el tratamiento estadístico de los datos. Se calculó la ratio respecto al estándar interno (Cy3/Cy2 o Cy5/Cy2) de cada una de las manchas. Se realizó una comparación entre muestras de pacientes frente a controles y se calculó la media de los valores de expresión, así como el valor p del test de *Student's* de cada mancha proteica. De esta manera, se tuvieron en cuenta dos grupos de proteínas de interés: valor >1 (positivo), cuando la abundancia de la mancha proteica estaba aumentada significativamente en las muestras de pacientes respecto a los controles y valor <1 (negativo), cuando la abundancia de la mancha proteica estaba disminuida significativamente en las muestras de pacientes respecto a los controles.

Se tuvieron en cuenta dos criterios para considerar que una proteína tenía una expresión diferencial:

- El primer criterio fue que cada mancha proteica sufriera cambios de expresión de al menos $\pm 1,5$ veces y que la media de sus valores de expresión tuviera un $p < 0,05$ en al menos 3 de las 4 réplicas por cada condición. 34 manchas proteicas cumplieron con este requisito y se les denominó grupo L1.

- El segundo criterio fue que la media de los valores de expresión de cada mancha proteica tuviera un $p < 0,05$ en al menos 3 de las 4 réplicas por condición. Además de las 34 manchas proteicas del grupo L1, 18 manchas proteicas adicionales cumplieron con este requisito. A este conjunto de 52 manchas proteicas se le denominó grupo L2.

La distribución en el mapa proteico de las 52 manchas que se expresan diferencialmente se puede ver en la Figura 32.

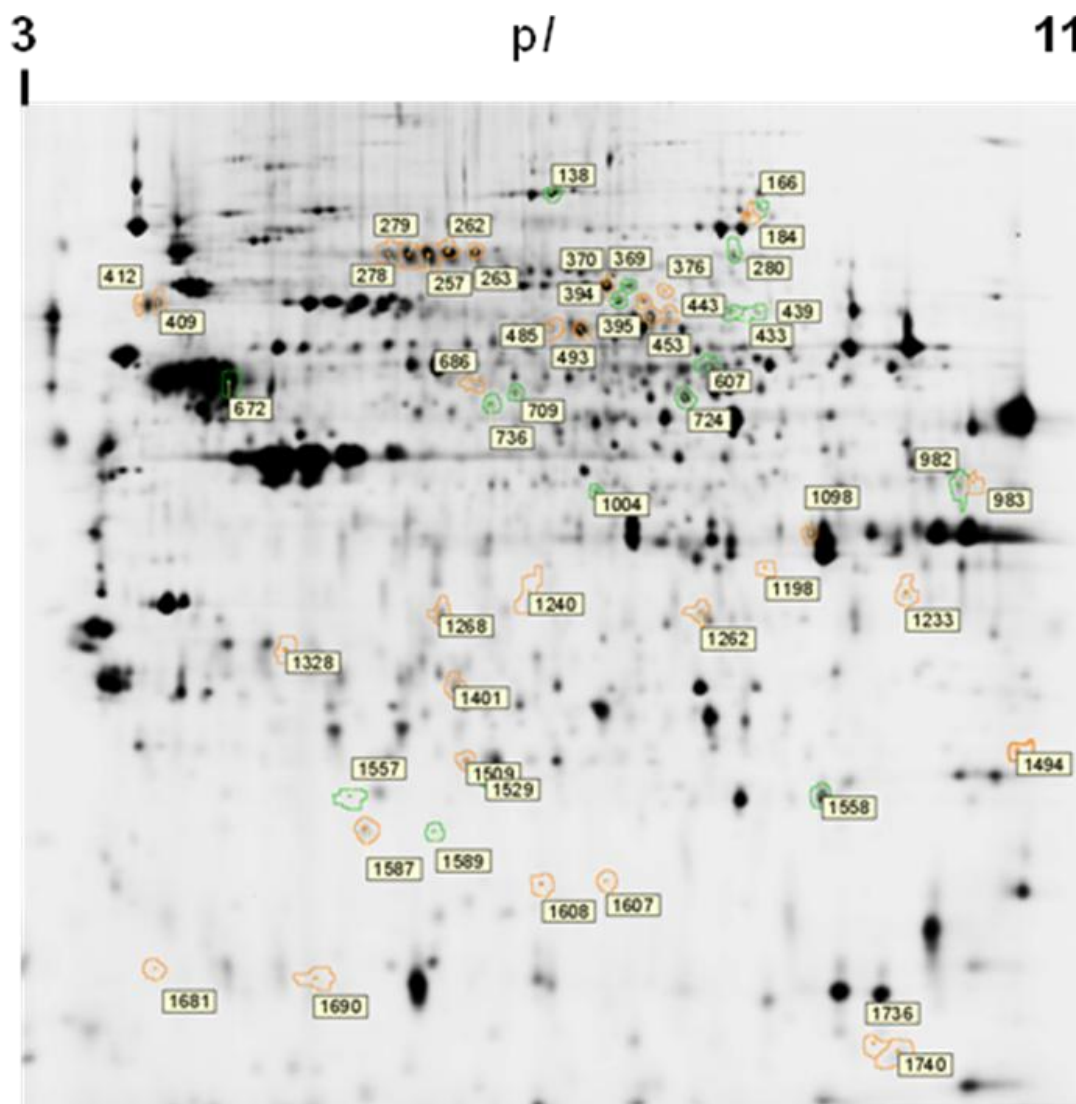


Figura 32. Mapa representativo de la expresión diferencial de los proteomas de fibroblastos control y mutados en *BCSIL*. Imagen representativa de un gel 2D-DIGE (gel de referencia del diseño experimental: Gel 1) sobre el que aparecen señaladas y numeradas las manchas proteicas que se expresan de forma diferencial entre las dos muestras. Los puntos naranjas corresponden al grupo L1 ($p < 0,05$; $\pm 1,5$ veces cambios de expresión). El grupo L2 ($p < 0,05$) está constituido por la suma de los puntos naranjas más los puntos verdes.

3.3 Análisis de los Componentes Principales (ACP)

Como ya se describió en el apartado 3.8.9.3.6., el análisis de los componentes principales (ACP) es un método estadístico de variables múltiples que indentifica patrones en los datos y los expresa de tal manera que se resalten sus similitudes y diferencias. Una vez que se han identificado patrones de datos, éstos se pueden comprimir sin pérdida de información y representar fácilmente de forma gráfica.

En primer lugar se realizó el análisis ACP de todo el proteoma de fibroblastos control y de pacientes con mutaciones en *BCSIL*, utilizando los datos de todas las manchas proteicas detectadas en los geles del experimento DIGE (Figura 33). El primer componente principal (CP1), fue capaz de explicar un 44.9 % de la varianza total entre las muestras. Dicho análisis permitió separar las muestras en dos grupos, correspondientes a las muestras control (mitad izquierda de la elipse) y de pacientes (mitad derecha de la elipse), excepto por la muestra control del gel 1 (C1), que aparecía dentro del cuadrante de los pacientes (Figura 33A). El segundo componente principal (CP2) explicaba un 22.6% adicional de la varianza total entre muestras. Dicho análisis permitió separar las muestras marcadas con Cy3 (mitad inferior de la elipse) de las marcadas con Cy5 (mitad superior de la elipse), excepto por la muestra control del gel 1 (C1), que aparecía en el cuadrante de las muestras marcadas con Cy3. A pesar de estas diferencias, no existió ningún valor extremo o atípico fuera del intervalo de confianza delimitado por la elipse, existiendo un grado razonable de agrupación de los valores, es decir, muestras de fibroblastos de pacientes en el grupo de pacientes y los de controles en el grupo control, salvo por la muestra C1.

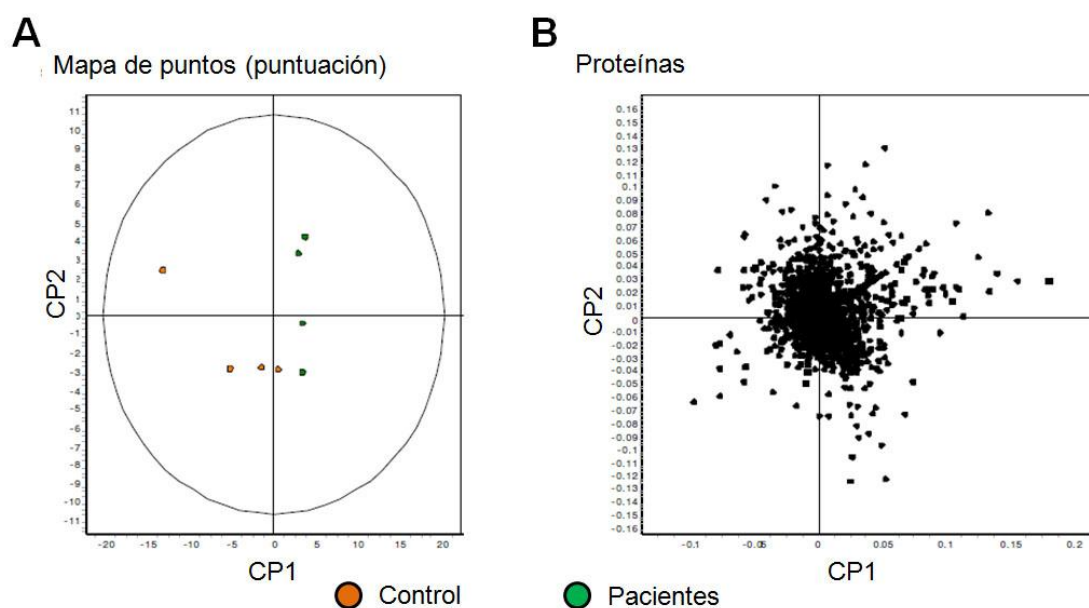


Figura 33. Análisis de componentes principales (ACP) del proteoma de fibroblastos control y de pacientes con mutaciones en *BCSIL*. (A) Gráfica de puntuación. El componente principal 1 (CP1) diferencia las células control (mitad izquierda, en naranja) respecto a las de pacientes (mitad derecha, en verde). El componente principal 2 (CP2) diferencia entre muestras marcadas con Cy3 (mitad inferior) y Cy5 (mitad superior). C1-C4: Controles; P1, P2, P4 y P6: Pacientes 1, 2, 4 y 6 (B) Gráfica de contribución, que muestra el grado de dispersión del proteoma de fibroblastos control y mutados.

En segundo lugar se realizó el análisis ACP de las 52 manchas proteicas del set L2, estadísticamente significativas y consideradas proteínas de interés (POI) (Figura 34). El primer componente principal (CP1), con un 73.9 % de la varianza total, de nuevo permitió separar las muestras entre controles y pacientes. En este caso, la muestra control del gel 1 (C1) aparecía dentro del cuadrante de los controles pero en el límite con el cuadrante de los pacientes (Figura 34A). El segundo componente principal (CP2) explicó un 10.6% adicional de la varianza total entre muestras. Dicho análisis permitió separar las muestras marcadas con Cy3 de las marcadas con Cy5, excepto por el control del gel 1 (C1), que de nuevo apareció en el cuadrante de las muestras marcadas con Cy3. Considerando las 52 manchas proteicas consideradas de interés en el experimento DIGE tampoco se observaron valores extremos fuera del intervalo de confianza de la elipse, agrupando a todos los controles en la mitad izquierda y a los pacientes en la mitad derecha de la misma. Estos resultados indican que el diseño experimental para el ensayo de DIGE es correcto y refuerzan los datos de expresión diferencial.

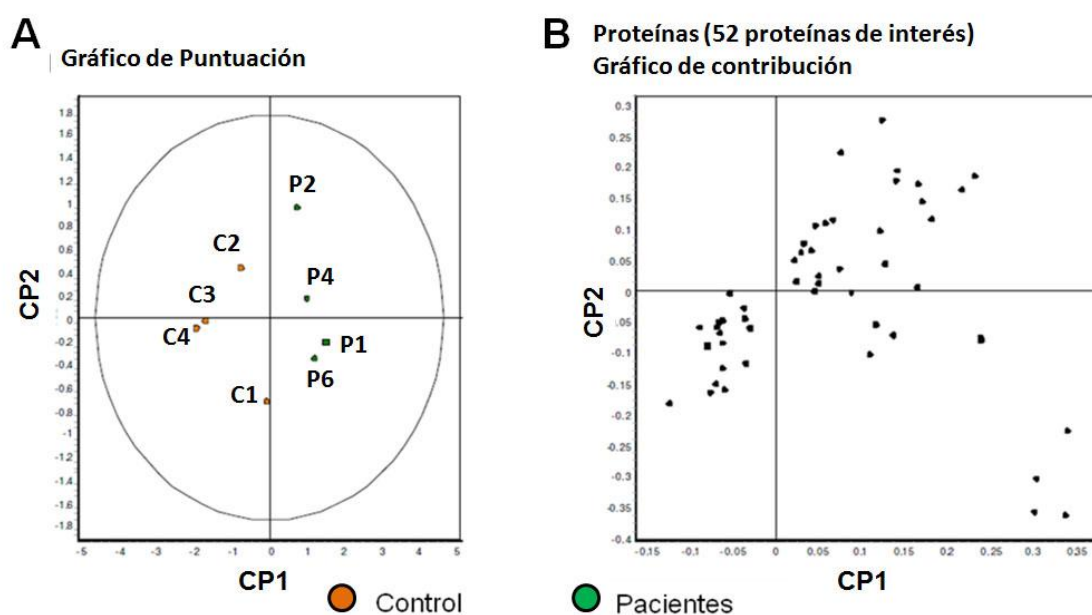


Figura 34. Análisis de componentes principales (ACP) del subconjunto de datos filtrado L2, correspondiente a las 52 manchas proteicas consideradas proteínas de interés. (A) Gráfica de puntuación. El componente principal 1 (CP1) diferencia las células control (mitad izquierda, en naranja) respecto a las de pacientes (mitad derecha, en verde). El componente principal 2 (CP2) diferencia entre muestras marcadas con Cy3 (mitad inferior) y Cy5 (mitad superior). C1-C4: Controles; P1, P2, P4 y P6: Pacientes 1, 2, 4 y 6. **(B)** Gráfica de contribución, que muestra el grado de dispersión de las 52 proteínas consideradas proteínas de interés del set L2 ($p < 0,05$) expresadas diferencialmente en las líneas de fibroblastos control y mutados

3.4 Identificación de las proteínas de expresión diferencial

De las 52 manchas proteicas expresadas diferencialmente en el ensayo DIGE, 36 fueron satisfactoriamente identificadas por análisis de MALDI-TOF/TOF y usando el motor de búsqueda MASCOT 2.2. Seis de estas manchas se identificaron como 2 proteínas distintas, lo que aumentó la lista a 42 manchas proteicas de interés potencial. Las proteínas correspondientes a las 42 manchas proteicas aparecen descritas en la Tabla 8.

Tabla 8. Proteínas expresadas diferencialmente en fibroblastos de pacientes con mutaciones en *BCSIL* respecto a controles

Nº mancha	Ratio	Proteína	PDB	Mowse Score	MM (Da)	pI	C.S. (%)
138	-1.42	Vinculina	P18206	264	124292	5.50	37
184	-1.53	Metilen tetrahidrofolato deshidrogenasa	P11586	176	102180	6.89	31
257	2.97	Gelsolina	P06396	73	86043	5.90	18
262	1.95	Gelsolina	P06396	106	86043	5.90	24
263	1.92	Gelsolina	P06396	77	86043	5.90	16
279	3.39	Gelsolina	P06396	61	86043	5.90	17
280	-1.24	ARN helicasa dependiente de ATP	Q92499	207	83349	6.81	45
369	-1.47	Moesina	P26038	158	67892	6.08	31
370	-1.52	Moesina	P26038	116	67892	6.08	30
394	-1.48	ADN helicasa 2 dependiente de ATP (subunidad 1)	P12956	72	70084	6.23	24
395	-2.11	ADN helicasa 2 dependiente de ATP (subunidad 1)	P12956	106	70084	6.23	23
409	1.67	Proteína de 78 kDa regulada por glucosa	P11021	309	72402	5.07	47
		Proteína disulfuro isomerasa A4	P13667	67	73229	4.96	19
412	2.03	Proteína de 78 kDa regulada por glucosa	P11021	418	72402	5.07	55
433	1.3	α -enolasa	P06733	104	47481	7.01	37
439	1.26	Riboproteína Q heterogénea nuclear	O60506	168	69788	8.68	33

443	-1.64	Lamina-A/C	P02545	158	74380	6.57	15
453	-1.54	Proteína con motivos WD repetidos	O75083	103	66836	6.17	16
493	2.92	Proteína 2 relacionada con Dihidropirimidinasas	Q16555	189	62711	5.95	52
607	-1.35	Dihidrolipoil deshidrogenasa mitocondrial	P09622	70	54713	7.95	7
		Glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa	P11413	58	59675	6.39	6
672	-1.33	Vimentina	P08670	238	53676	5.06	58
		Cadena alfa-1B de la tubulina	P68363	197	50804	4.94	50
686	-1.63	Dihidrolipoamida succiniltransferasa	P36957	154	49041	9.11	31
709	1.2	Proteína 1 activadora de GTPasa Rho	Q07960	108	50461	5.85	33
724	1.39	Septina-11	Q9NVA2	200	49652	6.36	38
	1.2	Nexina-6	Q9UNH7	191	46905	5.81	50
983	-1.79	Fructosa-bis fosfato aldolasa	P04075	144	39851	8.30	59
1004	-1.22	Factor 3 de iniciación de la traducción (subunidad H)	O15372	76	40076	6.09	12
1098	1.86	Anexina A2	P07355	153	38808	7.57	53
		Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	P04406	122	36201	8.57	50
1233	2.06	Anexina A2	P07355	211	38808	7.57	45
1262	1.51	Glucosamina-6-fosfato isomerasa	P46926	82	32819	6.42	38
1268	1.71	Anexina A4	P09525	366	36088	5.84	73
1401	1.55	6-Fosfogluconolactonasa	O95336	133	27815	5.70	36
		Proteína residente en el retículo endoplasmático	P30040	64	29032	6.77	26
1509	1.54	Proteína DJ-1	Q99497	86	20050	6.33	43
1529	1.35	Proteína 14B con dominio abhidrolasa	Q96IU4	68	22446	5.94	34
1557	1.33	Adenina fosforibosil transferasa	P07741	99	19766	5.78	57
1558	1.2	Proteína 1 unidora de fosfatidil etanolamina	P30086	158	21158	7.01	64

1587	2.2	Cadena ligera de la Ferritina	P02792	82	20064	5.51	46
1740	3.83	Proteína de unión a ADN mitocondrial de cadena sencilla	Q04837	93	17249	9.59	61

En la primera columna aparece el número identificativo de cada mancha proteica. Ratio: variación en la expresión de cada proteína: >1 (positivo), cuando la proteína tiene aumentada su expresión en las muestras de pacientes respecto a controles; <1 (negativo), cuando la proteína tiene disminuida su expresión en las muestras de pacientes respecto a controles. *PDB* (*Protein Data Base*): número de acceso en la base de datos UniprotKB/Swiss-Prot. *Mowse Score*: puntuación obtenida por la identificación en el programa MASCOT. *MM* (*Da*): Masa molecular (en Daltons). *pI*: punto isoelectrico. *C.S.* (%): porcentaje de cobertura de secuencia.

3.4.1 Clasificación funcional de las proteínas identificadas

Las 42 manchas proteicas correspondieron a un total de 35 proteínas, las cuales se clasificaron en 5 categorías funcionales distintas (Figura 35):

- **Metabolismo.** Incluye 11 proteínas:
 - 6-Fosfogluconolactonasa (6PGL)
 - Adenina fosforibosil transferasa (APTR)
 - Cadena ligera de la ferritina (FTL)
 - Dihidrolipoamida succinil transferasa (DLST)
 - Dihidrolipoil deshidrogenasa mitocondrial (DLD)
 - Fructosa-bifosfato aldolasa (ALDOA)
 - Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)
 - Glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa (G6PDH)
 - Glucosamina-6-fosfato isomerasa (GNPDA1)
 - Metilen tetrahydrofolato deshidrogenasa (C1TC)
 - α -Enolasa (ENO1)

- **Mantenimiento del citoesqueleto.** Incluye 9 proteínas:
 - Cadena α -1B de la Tubulina
 - Gelsolina
 - Moesina
 - Proteína 1 activadora de GTPasa Rho
 - Proteína 2 relacionada con dihidropirimidinasas (CRMP2)
 - Proteína con motivos WD repetidos
 - Septina-11

- Vimentina
- Vinculina
- **Regulación de la transcripción y la traducción.** Incluye 7 proteínas:
 - ADN helicasa 2 dependiente de ATP (KU70)
 - ARN helicasa dependiente de ATP (DDX1)
 - Factor 3 eucariótico de iniciación de la traducción (subunidad H)
 - Lamina-A/C
 - Proteína 14B con dominio abhidrolasa (ABHEB)
 - Proteína de unión a ADN mitocondrial de cadena simple
 - Ribonucleoproteína Q Heterogénea nuclear
- **Regulación del ciclo celular y transducción de señales.** Incluye 4 proteínas:
 - Anexina 2
 - Anexina 4
 - Nexina 6
 - Proteína 1 unidora de fosfatidil etanolamina (PEBP1/RKIP)
- **Respuesta celular a estrés.** Incluye 4 proteínas:
 - Proteína de 78 kDa regulada por glucosa (GRP78)
 - Proteína disulfuro isomerasa A4 (ERP70)
 - Proteína DJ-1
 - Proteína residente en el retículo endoplasmático 29 (ERP29)

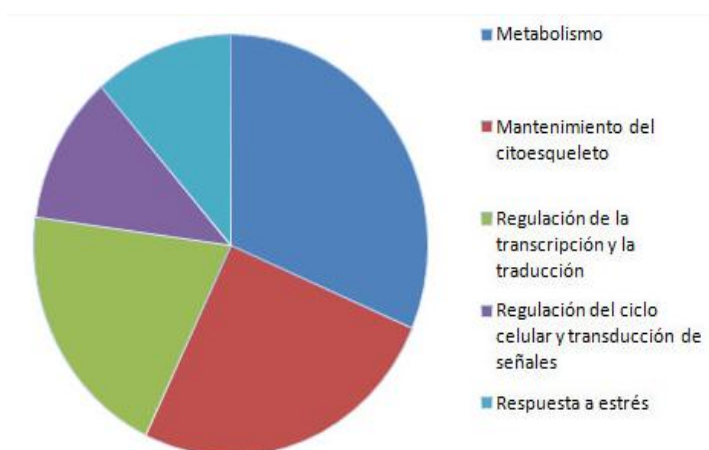


Figura 35. Clasificación según su funcionalidad de las 35 proteínas identificadas en el ensayo 2D-DIGE. Distribución de las proteínas detectadas en 65 categorías funcionales.

3.4.2 Características funcionales de las proteínas identificadas

En la Tabla 9 se resumen las características funcionales de las 35 proteínas identificadas en el ensayo DIGE, de acuerdo con las bases de datos de proteínas PDB (Protein Data Bank) (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) y Uniprot (<http://www.uniprot.org/>).

PROTEÍNA	FUNCIONES
<i>Metabolismo</i>	
6-Fosfogluconolactonasa	Interviene en el ciclo de las pentosas fosfato, ruta que provee a la célula de NADPH y pentosas para la síntesis de ácidos nucleicos. Cataliza la conversión de 6-fosfogluconolactona a 6-fosfogluconato.
Adenina fosforibosil transferasa	Interviene en la ruta de síntesis de purinas. Funciona como catalizadora en la reacción entre adenina y fosforibosil pirofosfato (PRPP) para formar adenosín mono fosfato (AMP).
Cadena ligera de la ferritina	Importante en la homeóstasis del hierro, en particular en el transporte del hierro a las células. Sirve para almacenar hierro soluble de forma no tóxica.
Dihidrolipoamida succinil transferasa	Componente del complejo 2-oxoglutarato deshidrogenasa, que cataliza la conversión de 2-oxoglutarato a succinil CoA y CO ₂ . Cataliza la transferencia del grupo succinilo al coenzima A.
Dihidrolipoil Deshidrogenasa mitocondrial	Componente del complejo 2-oxoglutarato deshidrogenasa. También actúa formando parte del complejo glicina descarboxilasa, en la degradación de la glicina. Además está presente en el complejo piruvato deshidrogenasa, catalizando la oxidación de los grupos dihidrolipoilo de la dihidrolipoamida succiniltransferasa.
Fructosa-bifosfato aldolasa	Juega un papel principal en la glucólisis y en la gluconeogénesis. Cataliza preferentemente la disociación reversible de la fructosa 1,6-difosfato a dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído 3-fosfato. También cataliza la rotura reversible de fructosa 1-fosfato a dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído.
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Implicada en la glucólisis, cataliza la oxidación del gliceraldehído 3-fosfato a 3-fosfo-D-gliceroil fosfato, produciendo NADH.
Glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa	Enzima metabólica implicada en el primer paso del ciclo de las pentosas fosfato. Cataliza la transformación de Glucosa 6 fosfato a 6-fosfogluconolactona reduciendo una molécula de NADP ⁺ . La deficiencia de esta enzima está asociada a la anemia hemolítica.
Glucosamina 6-fosfato isomerasa	Enzima alostérica que participa en el metabolismo de los carbohidratos, concretamente en la ruta de la N-acetil glucosamina. Cataliza la conversión reversible de D-glucosamina-6-fosfato a D-fructosa-6-fosfato y amonio.

Metilentetrahidrofolato deshidrogenasa	Enzima que participa en el metabolismo del folato y la homocisteína, catalizando la conversión del metilen tetrahidrofolato a metil tetrahidrofolato.
α-Enolasa	Enzima multifuncional que tiene un papel importante en la glucólisis, catalizando la conversión reversible de 2-fosfoglicerato a fosfoenol piruvato. También está implicada en el crecimiento celular, tolerancia a hipoxia y respuesta alérgica.
<i>Mantenimiento del citoesqueleto</i>	
Cadena α-1B de la tubulina	Proteína mayoritaria constituyente de los microtúbulos, que son esenciales para mantener la estructura celular, para el transporte intracelular de vesículas y orgánulos como la mitocondria y para la mitosis. Une dos moléculas de GTP, cuya hidrólisis a GDP es fundamental para la formación de los microtúbulos.
Gelsolina	Proteína implicada en el ensamblaje y desensamblaje de los filamentos de actina en el citoesqueleto. También se localiza en la mitocondria, donde se cree que inhibe la apoptosis por vía mitocondrial mediante su unión a VDAC. Su actividad se regula por los niveles de calcio intracelulares y se inhibe por el aumento en la concentración de fosfatidil inositol-4-5-bisfosfato (PIP ₂).
Moesina	Miembro de la familia de proteínas ERM (ezrina/raxidina/moesina), responsables de crear uniones entre las membranas plasmáticas y los filamentos de actina. Se activa a través de la GTPasa Rho.
Proteína 1 activadora de GTPasa Rho	Proteína activadora de las GTPasas Rho, Rac y Cdc42. Interviene en la organización del citoesqueleto, crecimiento, diferenciación, desarrollo neuronal y funciones sinápticas.
Proteína 2 relacionada con dihidropirimidinasas	Juega un papel importante en el desarrollo neuronal y en la migración celular. Es necesaria para la remodelación del citoesqueleto, a través de la cascada de señalización de las semaforinas de clase 3.
Proteína con motivos WD repetidos	Proteína de unión a la actina, que induce el desensamblaje de los filamentos. Contiene 9 repeticiones WD implicadas en interacciones proteína-proteína.
Septina 11	GTPasa formadora de filamentos del citoesqueleto. Polimeriza en complejos homo- y hetero-oligoméricos, asociándose a la membrana plasmática y a filamentos de actina y microtúbulos. Podría jugar un papel importante en la citokinesis, en la citoarquitectura neuronal y en la conectividad sináptica.
Vimentina	Componente mayoritario de los filamentos intermedios que, junto con los microtúbulos de tubulina y los filamentos de actina, componen el citoesqueleto. Se asocia al núcleo, al retículo endoplásmico y las mitocondrias, anclando la posición de los organelos en el citosol.
Vinculina	Proteína que une la membrana plasmática al citoesqueleto, mediante procesos de adhesión focal de integrinas a los filamentos de actina. Podría estar implicada en procesos de morfología y locomoción celular.

Regulación de la transcripción y la traducción

ADN helicasa 2 dependiente de ATP (KU70)	Helicasa dependiente de ATP, requerida para el proceso de recombinación no homóloga durante la reparación del ADN, así como para el mantenimiento del tamaño del telómero y el silenciamiento de genes subteloméricos
ARN helicasa dependiente de ATP	Implicada en el desdoblamiento de los ADN o ARN de doble cadena. Actúa como activador de la actividad transcripcional. Regulador positivo de ciclinas. Se une a ARNs poli(A), por lo que podría estar implicada en procesos de poliadenilación de los pre-ARNs mensajeros.
Factor 3 de iniciación de la traducción (subunidad H)	Proteína citoplasmática requerida en el proceso de iniciación de la síntesis de proteínas.
Lamina-A/C	Componente de la lamina nuclear, consistente en una matriz fibrosa próxima a la membrana interna nuclear, que se cree que sirve de anclaje a la envuelta nuclear y que también interacciona con la cromatina. Relacionada con el mantenimiento de la estructura nuclear, la organización de la cromatina y la estabilidad de los telómeros. Importante para la mitosis y la estabilidad genómica.
Proteína 14B con dominio abhidrolasa	Tiene actividad hidrolasa y podría activar la transcripción.
Proteína de unión a ADN mitocondrial de cadena sencilla	Esta proteína se une al ADN mitocondrial de cadena sencilla, por lo que posiblemente está implicada en la replicación del mismo.
Ribonucleoproteína Q heterogénea nuclear	Proteína de unión a ARN, que interacciona preferentemente con secuencias de poli(A) y poli(U). Implicada en mecanismos de procesamiento y estabilidad de los ARN mensajeros.

Regulación del ciclo celular y transducción de señales

Anexina 2	Es una proteína de unión a fosfolípidos regulada por calcio, que está implicada en los fenómenos de motilidad celular, exocitosis, endocitosis, unión de complejos proteicos a la actina del citoesqueleto, formación de canales iónicos e interacciones con la matriz celular. Podría jugar un papel en respuesta a estrés. Interacciona con las prohibitinas mitocondriales.
Anexina 4	Proteína de unión a fosfolípidos regulada por calcio, que está implicada en procesos de endocitosis y exocitosis. Se expresa mayoritariamente en células epiteliales.
Nexina 6	Implicada en procesos de tráfico intracelular. Interviene en el transporte retrógrado de proteínas desde los endosomas al aparato de Golgi.
Proteína 1 unidora de fosfatidiletanolamina	Se une a ATP y fosfatidiletanolamina, con poca afinidad por el fosfatidil inositol y la fosfatidil colina. Inhibidor de serín proteasas. Inhibe la cascada de MAP kinasas mediante su asociación a RAF1 e inhibición de su actividad kinasa. Es un inhibidor competitivo de la fosforilación de MEK y activa la vía de formación del AMP cíclico (AMPc).

Respuesta celular a estrés

Proteína de 78 kDa regulada por glucosa	Chaperona del retículo endoplásmico, requerida para la integridad del orgánulo y para la autofagia inducida por estrés. Regulador de la respuesta a estrés conocida como <i>Unfolded Protein Response</i> (UPR).
Proteína disulfuro isomerasa A4	Chaperona del retículo endoplasmático, que forma parte de un gran complejo multiproteico que cataliza el ordenamiento de los puentes disulfuro en los residuos de cisteínas de las proteínas, lo que permite su correcto plegamiento.
Proteína DJ-1	Localizada predominantemente en el citosol, aunque se transloca a la mitocondria y posteriormente al núcleo en respuesta a estrés oxidativo. Elimina el peróxido de hidrógeno, protegiendo a las células frente al estrés oxidativo y la muerte celular inducida por ROS. Función importante en la regulación de la expresión o estabilidad de las proteínas desacoplantes mitocondriales en neuronas dopaminérgicas de la <i>substancia nigra</i> y atenúa el estrés celular mediante la entrada de calcio en las neuronas. Implicada en la morfología de la red mitocondrial y en la mitofagia.
Proteína residente en el retículo endoplásmico	Componente de un complejo de chaperonas del retículo endoplásmico que juega un papel importante en el procesamiento de las proteínas de secreción, posiblemente mediante su participación en el plegamiento de dichas proteínas en el retículo.

3.5 Validación de los resultados del ensayo 2D-DIGE: Gelsolina

En este trabajo nos centramos en validar las diferencias de expresión de la proteína gelsolina, por su posible implicación en la función de la cadena respiratoria mitocondrial.

La gelsolina es una proteína dependiente de calcio que ejerce una función reguladora en la formación y estabilidad de los filamentos de actina, desensamblando por un lado dichos filamentos y, por otro, protegiéndolos en sus extremos (*Sun et al., 1999*). La gelsolina tiene varias funciones en la organización del citoesqueleto, movilidad celular (*Cunningham et al., 1991*), crecimiento celular (*Mullauer et al., 1990*) y apoptosis (*Ohtsu et al., 1997*). La gelsolina se expresa en todas las células y aunque su localización es mayoritariamente citosólica, también está presente en la mitocondria, donde ejercería una función protectora (*Koya et al., 2000*). Ello parece deberse a la capacidad de la gelsolina de prevenir cambios mitocondriales relacionados con la apoptosis, como la liberación del citocromo *c* y la pérdida de potencial de membrana, lo que definió a la gelsolina como un factor anti-apoptótico (*Koya et al., 2000*). Esta función la llevaría a cabo mediante su unión a VDAC (*Voltage-Dependent Anion*

Channel), proteína integrante del “poro de transición de permeabilidad mitocondrial” y mediadora esencial de la muerte celular por vía mitocondrial (*Koya et al., 2000*). Además, en plexos coroideos de un modelo murino de enfermedad de Alzheimer, donde existe un déficit acusado de complejo IV mitocondrial, se ha descrito que la sobreexpresión de la gelsolina fue capaz de restaurar la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial (*Antequera et al., 2009; Vargas et al., 2010*). Estos resultados sugieren que la gelsolina podría constituir una buena candidata a biomarcador y posible diana terapéutica de enfermedades mitocondriales asociadas a fallos enzimáticos de la cadena respiratoria mitocondrial.

3.5.1 Diferencias de expresión de la gelsolina entre fibroblastos control y mutados en *BCSIL* en el ensayo 2D-DIGE

El ensayo 2D-DIGE mostró unos valores de expresión elevados de las cuatro especies proteicas correspondientes a la gelsolina en los fibroblastos con mutaciones *BCSIL* respecto a los fibroblastos control (Figura 36). Dichas especies proteicas se correspondieron con las manchas 257, 262, 263 y 279 del gel 2D-DIGE mostrado en la Figura 32, las cuales presentaron una ratio de expresión diferencial de entre 1,92 y 3,77 veces el valor medio de los controles (Tabla 8). Por su posición relativa en geles 2D-DIGE, la mancha 278 podría corresponder a una quinta especie proteica de la gelsolina, aunque la cantidad de proteína presente en dicha mancha no fue suficiente para identificarla satisfactoriamente por análisis de MALDI-TOF/TOF.

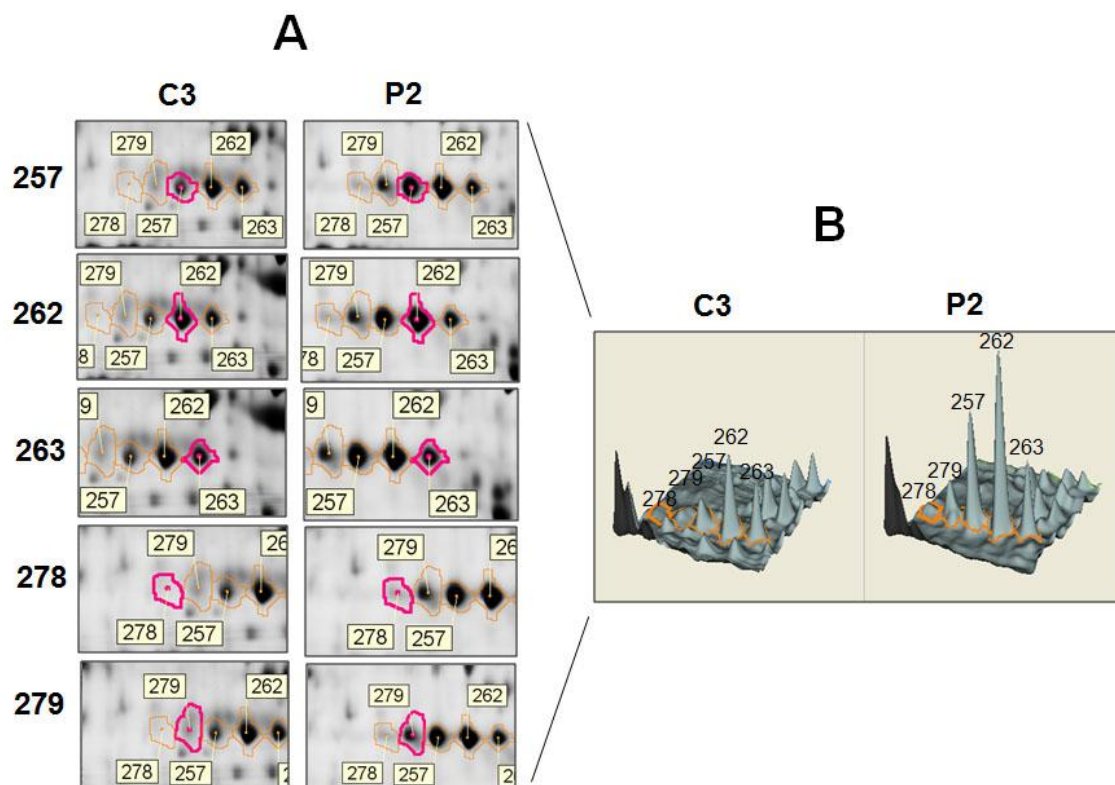


Figura 36. Expresión diferencial de la gelsolina entre fibroblastos control y mutados en *BCSIL*. (A) Especies proteicas correspondientes a la gelsolina detectadas en geles 2D-DIGE. El número en el margen izquierdo indica la mancha proteica que se resalta en la figura: **257, 262, 263, 278 y 279**. (B) Imágenes tridimensionales que genera el programa *DeCyder* a partir de las señales de fluorescencia que se corresponden con las distintas especies proteicas de la gelsolina. Imágenes procedentes del Gel 3. **C3**, Control 3; **P2**, Paciente P2.

3.5.2 Inmunodetección de gelsolina mediante *Western-blot*

La validación de los datos obtenidos en el ensayo 2D-DIGE se realizó en lisados totales, así como en fracciones citosólicas y mitocondriales, de fibroblastos derivados de los 4 pacientes de estudio (P1, P2, P4, P6) y de 4 controles. Para ello, se llevó a cabo una electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) de las distintas fracciones por separado, seguida de un análisis de *Western-blot* en el que se utilizó un anticuerpo específico que reconoce gelsolina (Figura 37). En extractos totales, se observó un ligero aumento en los niveles de gelsolina en los fibroblastos mutados comparados con los controles (Figura 37A). En las fracciones citosólicas no se observaron cambios significativos en los niveles de gelsolina entre los fibroblastos de pacientes y los controles (Figura 37B). Sin embargo, en las fracciones mitocondriales se observó un claro aumento (de aproximadamente 2,5 veces) en los niveles de gelsolina en todas las muestras de pacientes respecto a los controles (Figura 37C). Se cuantificaron las señales

correspondientes a la gelsolina en la fracciones totales, citosólicas y mitocondriales y dichas señales se normalizaron respecto a sus respectivos controles de carga (Figura 36D).

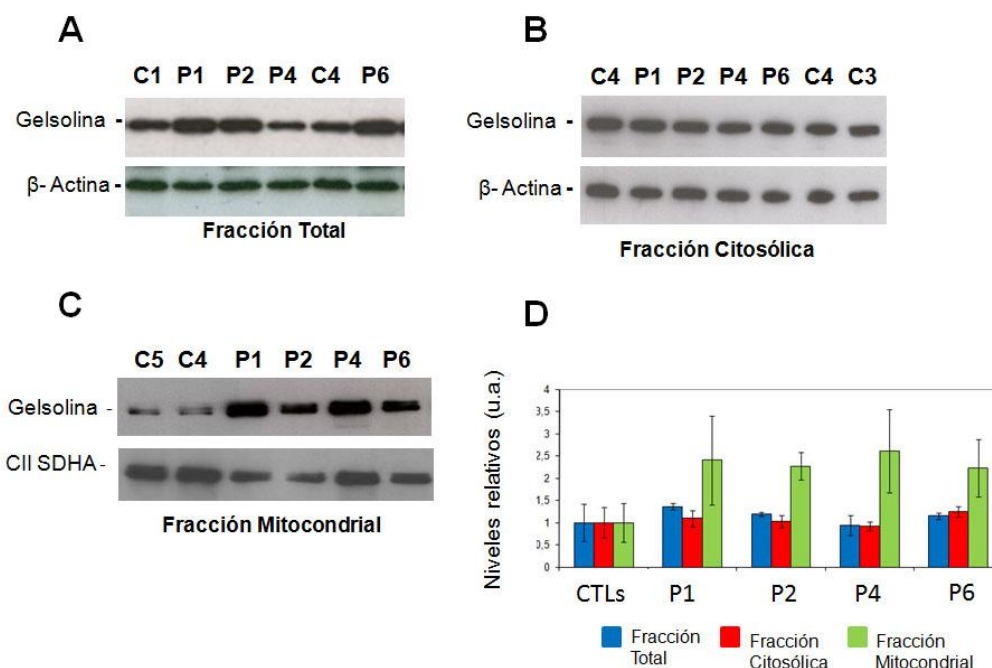


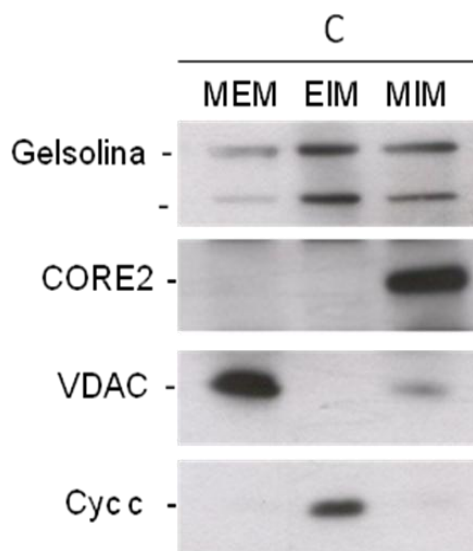
Figura 37. Análisis de los niveles de gelsolina en fraccionamientos subcelulares de fibroblastos con mutaciones en *BCSIL*. Se separaron entre 10-30 μ g de extractos proteicos procedentes de lisados celulares (A), de fracciones citosólicas (B), y de fracciones mitocondriales (C) en geles SDS-PAGE al 10% acrilamida. Los niveles de gelsolina se analizaron por *Western-blot*, utilizando β -actina como control de carga en las fracciones totales y citosólicas, así como la subunidad SDHA del complejo II (CII-SDHA) en las fracciones mitocondriales. (D) Se cuantificaron las señales de tres experimentos independientes para cada fracción y los valores densitometrados se relativizaron frente a las señales de los controles de carga respectivos. (u.a.), unidades arbitrarias. Los datos se presentan como la media \pm DE del análisis de los pacientes y 4 controles diferentes.

3.5.3 Fraccionamiento submitocondrial

Dado que los fibroblastos de pacientes con mutaciones en *BCSIL* mostraron un aumento de los niveles de gelsolina mayoritariamente en las fracciones mitocondriales, se analizó la localización submitocondrial de la gelsolina mediante inmunodetección en distintas fracciones mitocondriales: membrana externa mitocondrial (MEM), espacio intermembrana (EIM) y membrana interna mitocondrial (MIM). Como se muestra en la Figura 38, la gelsolina fue detectada en todas las fracciones mitocondriales analizadas, aunque aparecía mayoritariamente en la membrana interna mitocondrial y en el espacio intermembrana. Como controles de localización se utilizaron: la subunidad CORE2 del complejo III, específica en la membrana interna mitocondrial (MIM), la proteína VDAC, que fue detectada mayoritariamente en la membrana externa mitocondrial y

citocromo c, que aparecía específicamente en el espacio intermembrana, mostrando la pureza de cada fracción analizada.

Figura 38. **Localización de la gelsolina en fraccionamientos submitocondriales de fibroblastos control.** Se subfraccionaron 40 µg de mitocondrias aisladas y las distintas fracciones fueron separadas en geles SDS-PAGE al 15% acrilamida y analizadas mediante *Western-blot*. Como controles de localización submitocondrial se utilizaron anticuerpos que reconocen: CORE2 para la membrana interna mitocondrial (MIM), VDAC (*Voltage-Dependent Anion Channel*) para membrana externa mitocondrial (MEM) y citocromo c para el espacio intermembrana (EIM).



3.5.4 Interacción Gelsolina-VDAC

Posteriormente, se examinó si esta localización mitocondrial estaba relacionada funcionalmente con VDAC, tal como describían estudios previos (*Kusano et al., 2000*).

En primer lugar, se analizó la colocalización de ambas proteínas mediante ensayos de doble inmunofluorescencia con dos anticuerpos que reconocen las proteínas VDAC y gelsolina, en fibroblastos de pacientes y controles (Figura 39). En los fibroblastos mutados en *BCSIL*, se observó un aumento general en los niveles de gelsolina citosólica (fluorescencia verde) respecto a los fibroblastos control. En paralelo se realizó un marcaje con un anticuerpo que reconoce VDAC, proteína integrante de la membrana externa mitocondrial (fluorescencia roja). La colocalización entre ambas proteínas se analizó mediante la fusión de las dos fluorescencias (*merge*) en un plano focal de 0,5 µm, detectándose como una señal amarilla. Esta señal de colocalización se observó claramente aumentada en todas las muestras de pacientes respecto a los controles, lo que confirmaría la mayor presencia en la mitocondria de la gelsolina en los fibroblastos mutados. Además, estos datos sugieren la proximidad física entre gelsolina y VDAC, abriendo la posibilidad de una interacción física entre ambas proteínas.

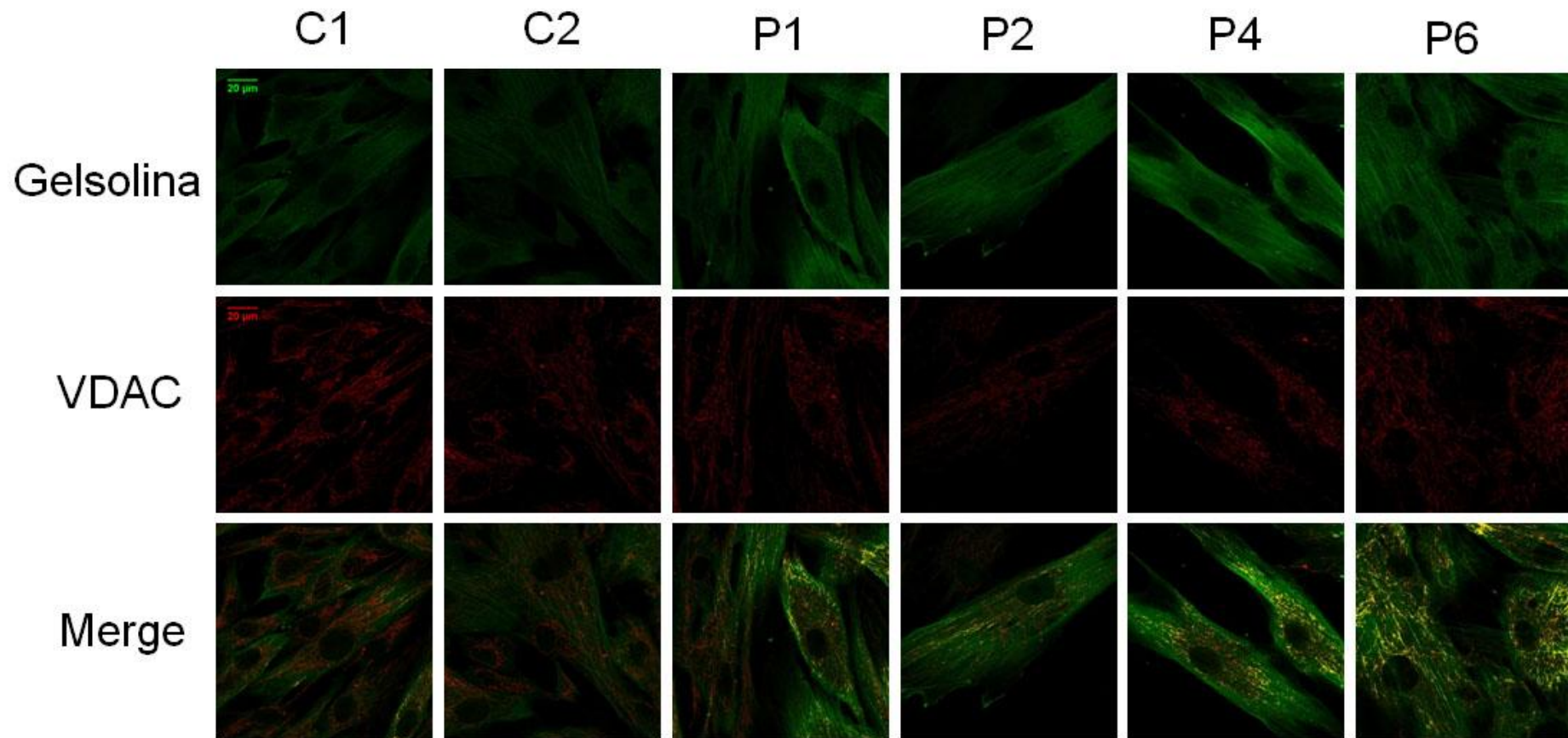


Figura 39. Colocalización entre gelsolina y VDAC mediante microscopía confocal. Se analizó la localización subcelular de la gelsolina y VDAC en células fijadas mediante inmunofluorescencia, utilizando un anticuerpo para detectar gelsolina (fluorescencia verde) y un anticuerpo para VDAC (fluorescencia roja). La colocalización de ambas proteínas (*merge*) se muestra como señal amarilla. **C1, C2:** fibroblastos control. **P1, P2, P4, P6:** fibroblastos de pacientes. Barra de escala = 20 µm.

Para evaluar si existe una interacción física entre gelsolina y VDAC, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación en fibroblastos control y mutados a partir de extractos proteicos derivados de mitocondrias purificadas (Figura 40). Se inmunoprecipitaron extractos mitocondriales de fibroblastos mutados en *BCS1L* (P1, P2, P4 y P6), utilizando el anticuerpo que reconoce gelsolina (GSN) para inmunoprecipitarla (Figura 40). Posteriormente, utilizando un anticuerpo que reconoce la proteína VDAC, se observó claramente la señal de esta proteína en el inmunoprecipitado tanto de extractos mitocondriales de fibroblastos control como fibroblastos de pacientes. Aunque no toda la proteína de VDAC interacciona con gelsolina, como podemos observar en la señal obtenida para VDAC en el sobrenadante (SN). Estos resultados parecen confirmar la interacción directa de VDAC con gelsolina tanto en las mitocondrias control como de pacientes, lo que podría corroborar observaciones previas que sugieren que el papel ejercido por la gelsolina en la mitocondria estaría mediado por su unión a VDAC (*Kusano et al., 2000*).

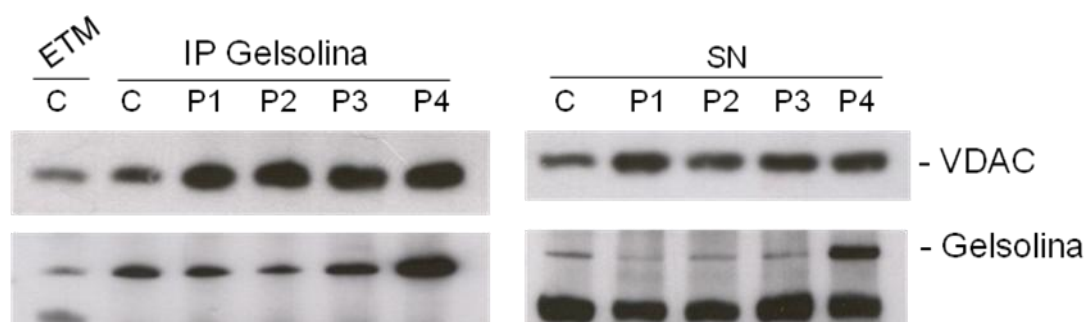


Figura 40. Interacción entre gelsolina y VDAC en mitocondrias de fibroblastos control y mutados en *BCS1L*. Se analizaron extractos mitocondriales de fibroblastos control (C) y de pacientes (P1, P2, P3, P4) mediante inmunoprecipitación con un anticuerpo policlonal que reconoce gelsolina. Posteriormente se realizó un análisis mediante *Western-blot* usando dos anticuerpos monoclonales que reconocen a VDAC y gelsolina. **ETM**, extracto total mitocondrial, obtenido previo a la inmunoprecipitación; **IP**, inmunoprecipitados; **SN**, sobrenadante.

DISCUSIÓN

1. CONSECUENCIAS FISIOPATOLÓGICAS CELULARES DE LAS MUTACIONES EN EL GEN *BCS1L*

El objetivo principal del presente trabajo consistió en caracterizar las alteraciones fisiopatológicas celulares y moleculares asociadas al déficit enzimático del complejo III en fibroblastos de seis pacientes con mutaciones en *BCS1L*. Los resultados obtenidos sugieren que las mutaciones en el gen *BCS1L* pueden afectar a la función mitocondrial a varios niveles: (1) Alteraciones en el importe a la mitocondria de la proteína BCS1L y su posterior ensamblaje en complejos macromoleculares. (2) Disminución en los niveles de la proteína RISP y alteraciones en el ensamblaje de esta subunidad catalítica en el complejo III, lo que explicaría el déficit enzimático de dicho complejo. (3) Fallos adicionales en el ensamblaje o estabilidad de los complejos I y IV de cadena respiratoria, que correlacionan con los déficits enzimáticos detectados en dichos complejos, así como de los supercomplejos mitocondriales. (4) Aumento de las especies reactivas del oxígeno (ROS), así como de las defensas antioxidantes celulares. (5) Inducción de alteraciones estructurales en la morfología de la red mitocondrial. (6) Inducción de la muerte celular por mecanismos independientes de caspasas.

Todos nuestros pacientes con mutaciones en *BCS1L* cursaron con alteraciones hepáticas y acidosis láctica en edad temprana, en concordancia con el modelo murino del síndrome de GRACILE (*Kotarsky et al., 2010*). La severidad del fenotipo clínico de los pacientes se pudo correlacionar con algunas de las alteraciones funcionales presentes en fibroblastos. De hecho, los pacientes P1-P4, que mostraron un curso clínico muy severo y muerte prematura, presentaron los déficits enzimáticos de cadena respiratoria más graves y fallos en el ensamblaje de los complejos y supercomplejos OXPHOS. Dichos déficits enzimáticos se acompañaron de retardos severos en la proliferación celular de los fibroblastos, de un aumento significativo en los niveles de ROS y de las defensas antioxidantes de la célula. Además, las células de los pacientes P1-P3 mostraron una mayor tendencia hacia la apoptosis que los controles y los fibroblastos del resto de pacientes. Estas alteraciones se detectaron en fibroblastos crecidos en un medio de cultivo con 4,5 g/L de glucosa, en contraste con otros estudios en los que es necesaria la inducción de estrés metabólico para provocar los fenotipos fisiopatológicos asociados a defectos funcionales del sistema OXPHOS (*Guillery et al., 2008; Zanna et al., 2008*). En contraste, los pacientes P5 y P6 presentaron manifestaciones clínicas tardías y supervivencia (están todavía vivos a edades de 6 y 5 años, respectivamente).

Los fibroblastos de estos pacientes mostraron las mejores curvas de crecimiento en un medio de cultivo con 4,5 g/L de glucosa, con una leve caída en la actividad de los complejos de cadena respiratoria o incluso con actividades enzimáticas normales, un correcto ensamblaje de los complejos del sistema OXPHOS, niveles normales de ROS y sin mostrar tendencia a la apoptosis.

No se pudieron establecer correlaciones fisiopatológicas entre los anteriores parámetros y las alteraciones estructurales de la red mitocondrial, ya que todas las células mutadas en *BCS1L* presentaron redes mitocondriales fragmentadas de forma independiente a la severidad del déficit enzimático de cadena respiratoria o a los niveles intracelulares de ROS, efecto que podría estar influenciado por la caída en los niveles de Mitofusina 2. Estos resultados apoyan estudios previos que sugieren un papel de *BCS1L* en el mantenimiento de la red mitocondrial (*Tamai et al., 2008*). Tampoco se pudieron establecer correlaciones con el potencial de membrana mitocondrial, ya que no se observaron variaciones significativas entre fibroblastos mutados y controles. Ello podría deberse a que una limitación de este estudio ha sido la utilización de cultivos primarios de fibroblastos como modelo celular de enfermedad, que probablemente son menos vulnerables a los defectos funcionales de *BCS1L* que otros tipos celulares afectados fisiológicamente en pacientes, como hepatocitos, células del tejido nervioso o células del túbulo renal. A pesar de ello, nuestros datos sugieren que cambios acentuados en la morfología de la red mitocondrial pueden ocurrir independientemente de la función de la cadena respiratoria y de los niveles de ROS (*Koopman et al., 2005*).

La localización de las mutaciones en la proteína *BCS1L* podría explicar algunas de las manifestaciones fisiopatológicas descritas en fibroblastos. En todos los pacientes, excepto en P5, las mutaciones están localizadas en el dominio N-terminal de *BCS1L*, que contiene toda la información para la señalización y el procesamiento de la proteína (*Folsch et al., 1996; Stan et al., 2003*). Esta región contiene un único dominio transmembrana, seguido por una hélice alfa anfipática que actúa como anclaje de *BCS1L* a la membrana interna y una región auxiliar de importe que, junto con el segmento anfipático, es esencial para su interacción con la maquinaria de importe mitocondrial del complejo TOM y el correcto procesamiento de *BCS1L*. Una vez importada a la mitocondria, *BCS1L* se integra en la membrana interna como parte de un complejo de ~ 400 kDa (*Fernandez-Vizarra et al., 2009; Tamai et al., 2008*). La mutación p.P99L, presente en el paciente P1, probablemente modifica la estructura terciaria de la proteína *BCS1L* inmediatamente después del dominio auxiliar de

transporte mitocondrial (*Folsch et al., 1996; Petruzzella et al., 1998; Stan et al., 2003*). Los pacientes P2 y P3 portaban la mutación sin sentido p.R56X, que crea un codón de parada prematuro en el dominio de translocación a la membrana, junto con la mutación p.R45C, que cambia un aminoácido muy conservado en la región interna de la hélice anfipática que contiene la señal de reconocimiento (*De Meirleir et al., 2003*). El paciente P4 también portaba la mutación sin sentido p.R56X, además de las mutaciones g.1181A>G y g.1164C>G en la región 5' no traducida (o 5'UTR) del ARN mensajero de *BCS1L*, que afectaba a la estabilidad del mismo (*Gil-Borlado et al., 2009*). Estudios previos de nuestro laboratorio determinaron que, de la cantidad total de transcritos de *BCS1L* expresados en los fibroblastos del paciente P4, aproximadamente el 15% portaban la mutación p.R56X, mientras que el 85% restante portaban las mutaciones en el 5'UTR. La presencia del ARN mensajero que porta la mutación p.R56X sugiere que podría haber una pequeña expresión de la forma truncada de la proteína BCS1L, en la que se ha perdido parte de la región auxiliar de importe a la mitocondria. En levadura, esta región juega un papel importante en la translocación de Bcs1 a través de la membrana externa y mutaciones en dicha región impiden que la proteína precursora se inserte correctamente en la membrana interna (*Folsch et al., 1996*). Por tanto, en los fibroblastos de los pacientes P2, P3 y P4, la forma truncada de BCS1L podría estar compitiendo con la proteína completa, codificada por el segundo alelo, por su interacción con el complejo TOM o su translocación a la membrana interna mitocondrial, lo cual impediría el correcto importe y posterior procesamiento de la proteína. La mutación p.T50A, encontrada en el paciente P6, modifica un aminoácido poco conservado evolutivamente que está localizado al principio de la región auxiliar (*Blazquez et al., 2009*), lo que también parece afectar al importe intramitocondrial de BCS1L. En las células del paciente P5, tanto la internalización como el ensamblaje de BCS1L parecen estar poco afectados, probablemente porque la mutación p.R184C está localizada fuera de la región de importe, en una zona relevante para la actividad y estabilidad de la proteína (*Nouet et al., 2009*). Probablemente, como consecuencia de la localización de las mutaciones en los dominios de importe intramitocondrial de BCS1L, se produzcan fallos en dicho proceso en todos los fibroblastos mutados, excepto en P5, que explicarían la acumulación de BCS1L en el citoplasma. A su vez, las alteraciones estructurales de la proteína mutada provocarían defectos en el ensamblaje o estabilidad del complejo BCS1L, con una acumulación de subcomplejos de bajo peso molecular. Además de afectar a la biosíntesis del propio complejo BCS1L, se observó una caída en

los niveles y actividad del complejo III, probablemente debido a fallos en la incorporación de la subunidad catalítica RISP en dicho complejo. De hecho, las tres líneas de fibroblastos (P1-P3) que presentaron las alteraciones enzimáticas y estructurales del complejo III más severas, mostraron los niveles estacionarios más bajos de RISP. En estas células, es posible que RISP pase a ser degradada al no ser incorporada adecuadamente en el complejo III, lo que podría conducir a alteraciones en la correcta composición, formación o estabilidad de los supercomplejos. Ello explicaría la reducción en los niveles y actividades enzimáticas del complejo I en dichos fibroblastos, posiblemente como resultado de la interdependencia estructural entre ambos complejos (*Acin-Perez et al., 2004; Moreno-Lastres et al., 2012*). Además, se ha observado una caída en los niveles del complejo IV en las células P1 y P4, lo que podría sugerir un papel secundario de BCS1L en el mantenimiento de dicho complejo. Estos datos concuerdan con estudios previos, en los que mutaciones en *BCS1L* provocaron déficits enzimáticos de los complejos III y IV (*Fernandez-Vizarra et al., 2007*). Los fibroblastos P5 y P6 mostraron actividades enzimáticas y un ensamblaje de los complejos de la cadena respiratoria comparables a los controles, de acuerdo con los niveles estacionarios básicamente normales del complejo BCS1L en estos dos casos.

Destaca el hecho de que, tanto en los fibroblastos mutados como en los controles, la subunidad RISP aparezca mayoritariamente representada en la forma del supercomplejo $I+III_2+IV_n$, sin detectarse apenas en el homodímero del complejo III ($CIII_2$), ni en el supercomplejo III_2+IV . Estos datos contrastan con estudios realizados en células humanas de origen tumoral, en los que la subunidad RISP se detecta claramente tanto en los supercomplejos $I+III_2+IV_n$ y III_2+IV , como en el homodímero del complejo III (*Moreno-Lastres et al., 2012*). Es posible pensar que, en tejidos relativamente menos glucolíticos como los fibroblastos humanos, la subunidad RISP se incorpore preferencialmente en las estructuras más estables y energéticamente más rentables para la célula. Para ello se requeriría la acción de uno o varios factores de ensamblaje adicionales encargados de la incorporación de RISP en los supercomplejos. En este sentido, estudios recientes en levadura identificaron la proteína Mzml como un factor implicado en la estabilización e inserción de Rip1 en el complejo III (*Atkinson et al., 2011; Cui et al., 2012*).

Las alteraciones estructurales y funcionales del complejo III podrían conducir al aumento en los niveles de ROS descritos tanto en este estudio como en linfoblastos de pacientes con síndrome de *Björnstad* (*Hinson et al., 2007*). Asimismo, en modelos

animales del síndrome de GRACILE se ha descrito el aumento en los niveles de H_2O_2 y de señales relacionadas con estrés oxidativo en estadios tardíos de la enfermedad (Kotarsky *et al.*, 2012). Probablemente, los fibroblastos de los pacientes traten de compensar la acumulación de H_2O_2 mediante un aumento en los niveles de las defensas antioxidantes. En las células P1-P4, dicho aumento no fue suficiente para compensar los elevados niveles de H_2O_2 . En los fibroblastos P5, la mutación no produjo alteraciones en los niveles de ROS, probablemente porque las actividades de cadena respiratoria eran normales. Aunque los fibroblastos P6 mostraron un déficit enzimático leve del complejo III, sugiriendo un incremento en la generación de ROS a través de este complejo, los altos niveles de superóxido dismutasa probablemente fueron suficientes para mantener niveles normales de H_2O_2 . Nuestros datos apoyan de esta manera una relación directa entre la gravedad del déficit enzimático del complejo III y la producción de ROS. En este respecto, estudios recientes en fibroblastos y neuronas de ratón en los que se ha suprimido la expresión de la subunidad RISP, demostraron un aumento en los niveles de ROS que regularían el ensamblaje y la estabilidad de los supercomplejos mitocondriales (Diaz *et al.*, 2012a; Diaz *et al.*, 2012b).

Actualmente, hay muchas cuestiones no resueltas en lo que se refiere a la relación entre la función y dinámica mitocondrial, la generación de especies reactivas del oxígeno y la apoptosis. En este aspecto, se ha propuesto que la cadena respiratoria modula la apoptosis, posiblemente a través de la generación de ROS (Kwong *et al.*, 2007) y que la maquinaria de fusión-fisión mitocondrial está involucrada en este proceso (Suen *et al.*, 2008). A pesar de que todos los fibroblastos mutados presentaron fragmentación de la red mitocondrial, solamente las células de los pacientes P1-P3 mostraron una mayor tendencia a la apoptosis mediante una vía celular independiente de liberación al citoplasma del citocromo c. En este sentido, la producción de ROS podría jugar un papel importante en la muerte celular independiente de caspasas (Chen *et al.*, 2009). Curiosamente, los fibroblastos del paciente P4 no mostraron un aumento en la muerte celular a pesar de que generaban altos niveles de ROS. Por tanto, de nuestros datos no se puede concluir una correlación clara entre el aumento de los niveles de ROS, las alteraciones morfológicas de la red mitocondrial y la muerte celular.

2. INTERACCIÓN ENTRE BCS1L Y LETM1 EN FIBROBLASTOS CON MUTACIONES EN *BCS1L*

En células HeLa, BCS1L parece interactuar con la proteína LETM1, lo que favorecería la estabilización de LETM1 en un complejo de ~ 250 kDa, de composición desconocida (Tamai et al., 2008). Nuestros datos confirman la interacción directa entre ambas proteínas tanto en fibroblastos control como mutados y sugieren que las mutaciones en *BCS1L* presentes en los mismos no afectarían a dicha interacción.

LETM1 es una proteína multifuncional localizada en la membrana interna mitocondrial (Nowikovsky et al., 2012; Schlickum et al., 2004). Por un lado, se ha relacionado a LETM1 con el intercambio de iones K^+/H^+ (Nowikovsky et al., 2004) (Froschauer et al., 2005; Nowikovsky et al., 2007) y en la homeostasis del Ca^{2+} (Jiang et al., 2009; Waldeck-Weiermair et al., 2011). También se ha descrito la interacción de LETM1 con los ribosomas mitocondriales, participando en la síntesis e importe del citocromo b recién sintetizado a través de la membrana interna (Bauerschmitt et al., 2010; Frazier et al., 2006; Lupu et al., 2011) y además parece tener un importante papel en el mantenimiento de la morfología de la red mitocondrial (Dimmer et al., 2008; Tamai et al., 2008). Distintos estudios demostraron que una caída en los niveles de LETM1 provocaba un hinchamiento o aumento en el volumen mitocondrial, acompañado de una disminución en el número de crestas mitocondriales, que tenía como efecto secundario el desacoplamiento de los supercomplejos de cadena respiratoria (Dimmer et al., 2008; Tamai et al., 2008).

En condiciones nativas, la proteína LETM1 humana se ensambla en tres complejos de alto peso molecular (~250, 350 y 650 kDa), que podrían representar puntos apropiados para el intercambio iónico o para el importe de citocromo b recién traducido a la membrana interna mitocondrial (Dimmer et al., 2008; Tamai et al., 2008). En el caso de BCS1L, esta proteína forma parte de al menos 5 complejos (~100, 250, 400, 450 y 850 kDa) que no colocalizan ni con el complejo III ni con los supercomplejos. Sin embargo, parece existir una clara colocalización de BCS1L y LETM1 en el complejo de 250 kDa, lo que sugiere que es en este punto donde tiene lugar la interacción entre ambas proteínas. En fibroblastos mutados en *BCS1L*, se observó un aumento generalizado en los niveles intramitocondriales de los complejos LETM1, con una reducción relativa del complejo de 250 kDa y un desplazamiento hacia estructuras de mayor peso molecular (incluso por encima de 650 kDa). Una posible explicación es que BCS1L ancle a LETM1 en el complejo de 250 kDa y que, como

consecuencia de las mutaciones en *BCSIL*, LETM1 se desplace hacia estructuras de mayor peso molecular compatibles, por ejemplo, con la maquinaria de traducción mitocondrial. De esta manera, los defectos en la biogénesis del complejo III que provocan las mutaciones en *BCSIL*, inducirían a modo compensatorio la unión de LETM1 a los ribosomas mitocondriales, a fin de favorecer la biosíntesis e importe del citocromo b a través de la membrana interna (*Frazier et al., 2006; Lupo et al., 2011; Piao et al., 2009*).

3. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS EN FIBROBLASTOS CON MUTACIONES EN *BCSIL*

Las alteraciones funcionales de la cadena respiratoria no solo están implicadas en el desarrollo de las patologías mitocondriales, sino también en una gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos, como el desarrollo embrionario, el envejecimiento o en enfermedades neurodegenerativas comunes, como las enfermedades de Parkinson o Alzheimer (*Blass, 2002; Bubber et al., 2005*). El conocimiento de las vías celulares y metabólicas afectadas por los déficits enzimáticos de la cadena respiratoria posibilitaría la detección de nuevos biomarcadores y el desarrollo de dianas terapéuticas para estas enfermedades. Con el fin de estudiar los procesos celulares afectados por el déficit enzimático del complejo III, se estudió el proteoma diferencial de fibroblastos control y derivados de pacientes con mutaciones en *BCSIL* mediante el uso de la tecnología DIGE en combinación con espectrometría de masas. En dicho análisis se identificaron un total de 35 proteínas cuya expresión varía significativamente entre fibroblastos control y mutados, las cuales se agruparon en cinco categorías funcionales: proteínas implicadas en el metabolismo energético, en el mantenimiento del citoesqueleto, en la regulación de la transcripción y la traducción, en la transducción de señales y en la respuesta a estrés oxidativo.

El grupo mayoritario de proteínas que presentó variaciones de expresión entre fibroblastos control y de pacientes lo constituyen aquellas cuya función está relacionada con el metabolismo energético de la célula, principalmente con las rutas de la glucólisis, el ciclo de Krebs y la vía de las pentosas fosfato (Figura 41). Durante la glucólisis, la glucosa se degrada en una serie de reacciones catalizadas enzimáticamente, originando dos moléculas de piruvato y obteniendo energía en forma de ATP. En fibroblastos con mutaciones en *BCSIL*, esta ruta se ve afectada a nivel de tres enzimas: fructosa-1,6-

bifosfato aldolasa (aldolasa A, ALDOA), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y α -enolasa. La aldolasa A cataliza una condensación aldólica reversible a partir de la fructosa-1,6-bifosfato, originando dos triosas: gliceraldehído-3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato (Figura 41 (1)). En fibroblastos con déficits enzimáticos de cadena respiratoria es de esperar que no se produzca suficiente ATP, el cual se requiere en los pasos iniciales de la glucólisis para la obtención de fructosa-1,6-bifosfato. Por tanto, la reducción en los niveles de aldolasa A podría estar provocada por una caída en los niveles de su sustrato, la fructosa-1,6-bifosfato. Ello a su vez conllevaría una reducción drástica de sus productos, por lo que la glucólisis podría verse ralentizada en esta primera fase. Por el contrario, la segunda fase (o fase productiva) de la glucólisis, en la que se produce ATP y NADH, podría verse activada por un aumento en los niveles de las enzimas GAPDH y α -enolasa (Figura 41 (2 y 3)). La GAPDH cataliza la obtención del primer metabolito de alta energía de esta ruta, el 1,3 bisfosfoglicerato, a partir del gliceraldehído-3-fosfato, probablemente obtenido del catabolismo de las ribosas. En la reacción de GAPDH se utiliza NAD^+ y se produce NADH, que será oxidado por el complejo I mitocondrial para iniciar el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria. La α -enolasa (ENO1) cataliza reversiblemente la transformación del 2-fosfoglicerato a 2-fosfoenolpiruvato en un paso posterior. ENO1 es una enzima multifuncional implicada en diversos procesos, como el control del crecimiento y la tolerancia a hipoxia. El aumento en los niveles de GAPDH y ENO1 podría ocurrir de manera compensatoria para aumentar la eficiencia de la glucólisis, favoreciendo la producción de energía en forma de ATP y la formación del piruvato, que en condiciones aeróbicas, será transformado en la mitocondria a través del complejo piruvato deshidrogenasa en acetil coenzima A, el cual entrará en el ciclo de Krebs. De acuerdo con nuestros resultados, el perfil metabólico de muestras de hígado del modelo murino del Síndrome de GRACILE, demostró una disminución en los niveles de algunos metabolitos como las hexosas, hexosas-fosfato y las dos triosas fosfato (gliceraldehído 3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato), así como un aumento en los niveles de AMP (que constituye una señal activadora de la glucólisis) en estadios finales de la enfermedad (Kotarsky *et al.*, 2012). Estos cambios fueron acompañados de un descenso en la actividad del ciclo de Krebs, con una acumulación de metabolitos intermediarios del mismo, como succinato y fumarato, así como un aumento en los niveles de aminoácidos, acilcarnitinas de cadena larga y lípidos (Kotarsky *et al.*, 2012).

El análisis proteómico sugiere que en los fibroblastos con mutaciones en *BCSIL*, se produce una disminución en la actividad del ciclo de Krebs, que estaría provocada por los bajos niveles de dos enzimas mitocondriales claves: dihidrolipoil deshidrogenasa (DLD) (Figura 41 (4)) y dihidrolipoamida succinil transferasa (DLST) (Figura 41 (5)). La DLD es una enzima multifuncional que cataliza la reacción de oxidación del NADH a NAD⁺, por lo que juega un importante papel en el metabolismo redox (Ambrus *et al.*, 2011; Starkov *et al.*, 2004; Tahara *et al.*, 2007; Tretter y Adam-Vizi, 2004; Vaubel *et al.*, 2011). Tanto la enzima DLD como la DLST, forman parte del complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa, que cataliza la conversión global del α -cetoglutarato (o 2-oxoglutarato) a succinil-CoA. Por tanto, la disminución en los niveles de DLD y DLST provocaría una reducción en la actividad de dicho complejo, lo que imposibilitaría el flujo normal del ciclo de Krebs y favorecería la acumulación de metabolitos intermediarios, como el α -cetoglutarato. Ello a su vez, podría inducir la síntesis de aminoácidos procedentes de la transaminación del α -cetoglutarato, como el glutamato y derivados. La enzima DLD también es un componente del complejo piruvato deshidrogenasa, que cataliza la conversión del piruvato a acetil CoA. La baja expresión de DLD induciría una caída en la actividad de dicho complejo, provocando una acumulación de las reservas de piruvato provenientes de la glucólisis y una disminución del acetil CoA. Si se extrapolaran los datos obtenidos en fibroblastos mutados en *BCSIL* a los tejidos principalmente afectados en los pacientes, como el hígado o riñones, posiblemente se observara que para compensar la falta de acetil CoA se produce un aumento en la beta-oxidación de ácidos grasos (Figura 41(6)). Ello proporcionaría acetil CoA para reintroducir en el ciclo de Krebs y poder reductor en forma de NADH y FADH₂, que alimentarían la cadena respiratoria. Sin embargo, la cantidad de acetil-CoA generada en dicho proceso sería probablemente superior a la capacidad de procesamiento del ciclo de Krebs, por lo que el acetil-CoA se usaría para la biosíntesis de cuerpos cetónicos. Esta hipótesis concuerda con los altos niveles de cuerpos cetónicos detectados en la orina de la mayoría de los pacientes con mutaciones en *BCSIL*, así como en el modelo murino del síndrome de GRACILE (Kotarsky *et al.*, 2012). Por otro lado, el aumento en los niveles de piruvato originaría un desplazamiento de las reservas de este metabolito hacia la síntesis de lactato, generando NAD⁺ (Figura 41(7)), lo que explicaría la acidosis láctica presente en los pacientes. A su vez, el exceso de lactato podría inducir la transaminación del piruvato en alanina, como mecanismo para intentar paliar la acidificación del medio. La DLD también es un componente del

complejo 3-metil-2-oxobutanoato deshidrogenasa, que interviene en la degradación de aminoácidos de cadena ramificada (valina, leucina, isoleucina), por lo que el déficit de DLD también conduciría a una acumulación de estos aminoácidos. Todo ello correlacionaría con la aminoaciduria detectada en la orina de pacientes con mutaciones en *BCSIL*. En este sentido, se han descrito mutaciones patogénicas en DLD que provocan cuadros clínicos de acidosis láctica y aminoaciduria, acompañadas de hipoglucemia, hipotonía o ataxia (*Cameron et al., 2006; Grafakou et al., 2003; Sakaguchi et al., 1986; Wang et al., 2012*).

Otras dos enzimas en las que se observaron variaciones de expresión pertenecen a la ruta de las pentosas fosfato: glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) y 6-fosfogluconolactonasa (Figura 41 (8 y 9)). Esta ruta está íntimamente ligada a la glucólisis y en ella se produce NADPH en una fase oxidativa y pentosas en una fase no oxidativa, que serán utilizadas para sintetizar nucleótidos y ácidos nucleicos. En los fibroblastos con mutaciones en *BCSIL* se detectó una disminución en los niveles de la enzima iniciadora de esta ruta, G6PD, posiblemente en un intento de la células por favorecer la glucólisis mediante el bloqueo de la ruta de las pentosas fosfato. La enzima G6PD cataliza el paso de glucosa 6-fosfato (procedente de la glucólisis) a 6-fosfogluconolactona, generando NADPH a partir de NADP^+ . El NADPH producido es reoxidado en el metabolismo del glutatión en un ciclo de oxido-reducción (Figura 41 (10)). En este ciclo, la reacción catalizada por la enzima glutatión peroxidasa (GPx) permite, a través de la oxidación del glutatión (GSH), la detoxificación del peróxido de hidrógeno y el mantenimiento del estado reducido de los grupos sulfhidrilo (SH) de las proteínas, mientras que la enzima glutatión reductasa (GR), cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG). El descenso en los niveles de NADPH derivado de una posible menor actividad de G6PD, bloquearía la reducción del glutatión y por tanto, la detoxificación del peróxido de hidrógeno, e induciría la oxidación de las proteínas, provocando un aumento del estrés oxidativo. Por tanto, aunque el complejo III mitocondrial probablemente constituya el principal punto de generación de ROS en los fibroblastos con mutaciones en *BCSIL*, dicho efecto sería amplificado por el déficit de DLD y las alteraciones en el metabolismo del glutatión. Además, se observó un aumento en los niveles de la enzima que cataliza el siguiente paso de esta ruta, la 6-fosfogluconolactonasa, probablemente como efecto compensatorio ante una disminución en los niveles de su sustrato, 6-fosfogluconolactona. En los fibroblastos mutados, la ralentización de la vía de las pentosas fosfato podría provocar una caída en

la síntesis de ácidos nucleicos y ribonucleicos de forma concomitante a una bajada en los niveles de poder reductor en forma de NADPH. Además, se observó una reducción en los niveles de la metilén tetrahidrofolato sintasa (C1TC) (Figura 41 (11)), enzima que interviene en la síntesis del tetrahidrofolato, cofactor del metabolismo de aminoácidos y en la síntesis de purinas y pirimidinas. Para llevar a cabo esta reacción también se precisa ATP, por lo que el déficit energético probablemente inhiba procesos asociados a la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, como la replicación del ADN para la división celular. A su vez, como mecanismo compensatorio se produciría un aumento en los niveles de la adenina fosforibosiltransferasa (APRT) en los fibroblastos con mutaciones en *BCSIL* (Figura 41 (12)). La APRT cataliza la formación de AMP a partir de la adenina generada en las vías de degradación de ADN y ARN mediante la ruta de rescate de nucleótidos, esencial en tejidos incapaces de realizar la síntesis *de novo* de ácidos nucleicos y ribonucleicos. Un aumento en los niveles de esta enzima explicaría la acumulación en hígado de AMP detectada en los estadios finales de la enfermedad de GRACILE en modelos murinos (Kotarsky *et al.*, 2012). Otra enzima sobreexpresada en fibroblastos de pacientes fue la glucosamina-6-fosfato deaminasa o isomerasa (GNPDA1) (Figura 41 (13)). Esta enzima pertenece a la ruta de las hexosaminas, que tiene como producto final la síntesis de glicosaminoclicanos, proteoglicanos y glucolípidos, relacionados con funciones estructurales en tejido conectivo, epitelial y óseo, así como con el mantenimiento de la matriz extracelular y la formación de la bicapa lipídica de las membranas. La GNPDA1 cataliza la transformación catabólica de la glucosamina-6-fosfato a fructosa-6-fosfato, que puede usarse como sustrato directo tanto en la glucólisis para la síntesis de ATP, como en la ruta de las pentosas fosfato para la formación de ribosas precursoras de ácidos nucleicos. Por tanto, la sobreexpresión de GNPDA1 apuntaría a un mecanismo compensatorio, que podría provocar efectos secundarios sobre la integridad celular de los fibroblastos mutados en *BCSIL*, al sacrificar componentes estructurales de la célula con el fin de obtener energía.

La cadena ligera de la ferritina (FTL) también presentó niveles elevados en los fibroblastos con mutaciones en *BCSIL*. Esta proteína es la principal fuente de almacenamiento del hierro intracelular en forma soluble (no tóxica), por lo que juega un papel esencial en la homeostasis del hierro, especialmente en hígado (Figura 41 (14)). Los niveles celulares de ferritina están regulados por un aumento en los niveles de hierro libre y el estrés oxidativo (Hintze y Theil, 2005; MacKenzie *et al.*, 2008;

Surguladze et al., 2004). Curiosamente, una buena parte de los pacientes con mutaciones en *BCSIL* presentaron acumulación de hierro en sangre, con altos niveles de ferritina libre y baja capacidad de unión a hierro. El aumento en los niveles de FTL podría constituir una respuesta al estrés oxidativo generado por las mutaciones en *BCSIL*.

El segundo gran grupo de proteínas que presentó variaciones de expresión en los fibroblastos mutados en *BCSIL* correspondió a aquellas relacionadas con el mantenimiento del citoesqueleto (Figura 41 (15)). El citoesqueleto juega un papel muy importante en la organización de las estructuras internas de la célula, así como en los fenómenos de transporte, tráfico, migración y división celular. En células eucariotas, está formado por microfilamentos de actina, filamentos intermedios y microtúbulos. En nuestro ensayo se observaron niveles significativamente reducidos de proteínas implicadas en la formación y mantenimiento de los filamentos de actina, tales como: la vinculina, que forma parte de las placas de adhesión focal, o la moesina, cuya función es la unión de los filamentos de actina a las integrinas de la membrana plasmática; y la proteína con dominios WD repetidos (WDR1), implicada en el desacoplamiento de los filamentos de actina. Asimismo, se detectaron niveles bajos de otros componentes estructurales del citoesqueleto, tales como: la vimentina de los filamentos intermedios, que sirve como soporte para el anclaje de orgánulos intracelulares, incluyendo las mitocondrias o el retículo endoplasmático (*Perkins et al., 2010*); o la cadena α -1B de la tubulina, componente estructural de los microtúbulos. Las mitocondrias se unen y desplazan a lo largo de los microtúbulos mediante la interacción entre tubulina y VDAC, componente del canal iónico mayoritario de la membrana externa mitocondrial (*Guzun et al., 2012; Letierrier et al., 1994; Linden and Karlsson, 1996; Linden et al., 1989*). La posible desestructuración de los microtúbulos como consecuencia de la caída en los niveles de uno de sus componentes, explicaría la fragmentación de la red mitocondrial observada en todos los fibroblastos con mutaciones en *BCSIL*. Dicha fragmentación ocurriría sin alteraciones significativas en las proteínas implicadas en los procesos de fusión-fisión mitocondrial, salvo MFN2, y de forma independiente a una disminución en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$). De acuerdo con esta idea, se ha descrito el papel de la tubulina libre en la hiperpolarización del $\Delta\Psi$ como consecuencia de su unión a VDAC y bloqueo del canal iónico (*Maldonado et al., 2010; Rostovtseva et al., 2008*).

Posiblemente, a fin de compensar la desestructuración del citoesqueleto, se produce una sobreexpresión de proteínas reguladoras del ensamblaje y organización del mismo, tales como: la proteína ARHGAP1 o activadora de GTPasas Rho, implicada en vías celulares que controlan la remodelación de los filamentos de actina (*David et al., 2012; Jaffe y Hall, 2005*); la proteína relacionada con dihidropirimidinasas CRMP2, que regula la organización de los microtúbulos mediante la vía celular de las semaforinas (*Chae et al., 2009; Deo et al., 2004; Uchida et al., 2009*); o la Septina 11, que forma filamentos que interactúan tanto con la actina y los microtúbulos como con la membrana plasmática, por lo que podría estar implicada en la reorganización del citoesqueleto y el mantenimiento de la arquitectura celular (*Hanai et al., 2004; Nagata et al., 2004*).

También se detectó un aumento en los niveles de la gelsolina, proteína dependiente de calcio implicada en la formación y estabilidad de los filamentos de actina (Figura 41 (16)) (*Yin et al., 1984*). Se seleccionó la gelsolina para validación del ensayo DIGE, debido a su implicación directa en la función mitocondrial y a su posible papel como marcador pronóstico de salud (*Peddada et al., 2012*). En un modelo celular de enfermedad de Alzheimer, la sobreexpresión de gelsolina fue capaz de revertir el déficit enzimático del complejo IV de la cadena respiratoria provocado por el tratamiento con péptido β -amiloide (*Vargas et al., 2010*). Además, la gelsolina jugaría un rol protector frente a la apoptosis inducida por estrés oxidativo mediante su unión a VDAC y bloqueo del poro de membrana mitocondrial, estabilizando $\Delta\Psi$ de forma similar a la tubulina y evitando la liberación mitocondrial del citocromo c y la activación del apoptosoma (*Koya et al., 2000; Kusano et al., 2000; Rostovtseva et al., 2008*). En los fibroblastos mutados en *BCSIL*, la gelsolina se acumularía principalmente en las mitocondrias, donde parece interactuar con VDAC. La muerte celular observada en estas células ocurre sin liberación de citocromo c ni activación de caspasas y sin pérdida del potencial de membrana mitocondrial, lo que apoyaría la posible función anti-apoptótica descrita para la gelsolina (*Koya et al., 2000; Kusano et al., 2000*). No obstante, el hecho de que la gelsolina aparezca representada mayoritariamente en el espacio intermembrana y la membrana interna mitocondrial, sugiere que esta proteína se importa a la mitocondria, donde podría ejercer otras funciones. Se requieren estudios funcionales adicionales para corroborar estas hipótesis.

El tercer grupo de proteínas que presentó alteraciones de expresión en los fibroblastos mutados en *BCSIL*, correspondió a aquellas implicadas en la regulación de

la transcripción genética y la traducción del ARNm (Figura 41 (17 y 18)). Por un lado, en las células mutadas se observaron niveles reducidos de la subunidad 1 de la ADN helicasa 2 (KU70), relacionada con la reparación y mantenimiento del ADN nuclear (*Li et al., 2008*), así como la ARN helicasa 2 (DDX1), proteína de función desconocida perteneciente a la familia DEAD box, que modifican la estructura secundaria de los ARN mensajeros para regular procesos como la iniciación de la traducción, el procesamiento de los ARNm o la formación de los ribosomas (*Bleoo et al., 2001*) (*Godbout and Squire, 1993*). Este dato concuerda con los niveles levemente reducidos del factor de iniciación de la traducción EIF3H, que controla la unión entre la subunidad ribosomal 40S y el ARN mensajero (*Zhou et al., 2008*). Asimismo, se detectaron niveles bajos de la lamina-A/C, proteína que forma un entramado en la matriz nuclear relacionado con funciones de estabilidad del núcleo y organización de la cromatina, regulando procesos como el ciclo celular y la apoptosis (*Wilson y Foisner, 2010*). La deficiencia de esta proteína se ha asociado a patologías denominadas laminopatías, que cursan con un amplio espectro de manifestaciones clínicas como la distrofia muscular, cardiomiopatía o lipodistrofia (*Fatkin et al., 1999; Muchir et al., 2000*). Estas proteínas requieren ATP para realizar su función, por lo que el posible déficit energético presente en los fibroblastos mutados podría estar relacionado con sus bajos niveles. Posiblemente para compensar estas alteraciones, se observaron niveles altos de otras proteínas que regulan la expresión génica, tales como: la proteína ABHEB, hidrolasa de localización nuclear que regula la transcripción (*Padmanabhan et al., 2004*); o la ribonucleoproteína Q heterogénea nuclear (HNRPQ), implicada en el procesamiento y estabilidad de los ARN mensajeros (*Weidensdorfer et al., 2009*). También se observaron niveles elevados de la proteína de unión a ADN mitocondrial de cadena sencilla (mtSSB), encargada de la replicación del ADN mitocondrial (*Bogenhagen et al., 2008*), lo que podría reflejar un intento de aumentar la biogénesis mitocondrial como respuesta a los defectos funcionales del complejo III.

Por último, en los fibroblastos de pacientes se detectaron niveles elevados de proteínas que regulan procesos de señalización celular y respuesta a estrés (Figura 41 (19 y 20)). Tal es el caso de la nexina 6, componente del retrómero implicado en el transporte retrógrado de proteínas desde los endosomas al aparato de Golgi, lo que constituye una vía importante para el reciclaje de receptores de la membrana plasmática (*Cullen y Korswagen, 2012; Hong et al., 2009; Wassmer et al., 2007*). Los niveles de las anexinas 2 y 4 también se encontraron elevados en los fibroblastos con mutaciones

en *BCS1L*. Las anexinas son proteínas de unión a Ca^{2+} que se unen a los fosfolípidos de carga negativa presentes en las membranas celulares, manteniendo la arquitectura de la membrana plasmática y controlando procesos celulares como la migración, proliferación y apoptosis (*Geisow et al., 1987*). Actúan como sensores a cambios en la homeostasis del Ca^{2+} , contribuyendo a la adaptación celular al estrés mediante la regulación de vías de señalización celular (*Monastyrskaya et al., 2009*). Concretamente, la anexina 2 se une al fosfatidilinositol 4,5-bifosfato, precursor de los mensajeros secundarios inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG), para controlar la reorganización de los filamentos de actina y la formación de vesículas endosomales en respuesta a estrés (*Hayes et al., 2004; Rescher et al., 2004*). Su sobreexpresión podría compensar la pérdida de otros componentes estructurales del citoesqueleto. Se desconoce la función exacta de la anexina 4. También se detectaron niveles elevados de PEBP1/RKIP, proteína de unión a fosfatidiletanolamina que regula negativamente la vía de las MAP kinasas mediante su unión a C-Raf, actuando como inhibidor competitivo de la fosforilación por MEK (*Yeung et al., 1999*). Ello daría lugar a alteraciones en la transcripción génica, lo que podría explicar la ralentización en la proliferación celular de las células mutadas.

Asimismo, se observó un aumento en los niveles de chaperonas del retículo endoplasmático relacionadas con la respuesta a estrés conocida como *Unfolded Protein Response* (UPR) (*Higa y Chevet, 2012; Wang y Kaufman, 2012*). Entre ellas se encuentran las proteínas GRP78, ERP29 y ERP70, implicadas bien en la reparación de proteínas dañadas o mal plegadas, o bien en su retirada mediante translocación al proteosoma. También se detectaron niveles elevados de la proteína DJ-1/PARK7, cuyas mutaciones causan la enfermedad de Parkinson de herencia recesiva (*Bonifati et al., 2003*). DJ-1 juega un papel importante en la protección frente al estrés oxidativo y la muerte celular (*Canet-Aviles et al., 2004; Sekito et al., 2006; Taira et al., 2004; Zhang et al., 2005*), especialmente en las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra* (*Guzman et al., 2010; Surmeier et al., 2011; Rousseaux et al., 2012*). Se ha descrito que DJ-1 se translocaría a la mitocondria en situaciones de estrés oxidativo, actuando en paralelo a la maquinaria PINK1/parkina para regular la función y la morfología de la red mitocondrial, así como para la promover la autofagia de las mitocondrias disfuncionales (*Irrcher et al., 2010; McCoy y Cookson, 2011; Thomas et al., 2011*). Posiblemente, el estrés oxidativo y metabólico observado en los fibroblastos con

mutaciones en *BCSIL* induzca la expresión de proteínas protectoras frente a los altos niveles de ROS y la muerte celular.

En resumen, la tecnología DIGE ha permitido obtener un perfil proteico específico de fibroblastos con mutaciones en *BCSIL*. Los resultados obtenidos sugieren la presencia de un defecto general en el metabolismo energético de estas células, con un aumento de la fase productiva de ATP de la ruta glucolítica y una disminución de los niveles de enzimas claves del ciclo de Krebs y de la vía de las pentosas fosfato. En su conjunto, es razonable pensar que ello conduzca a un exceso de piruvato y de intermediarios del ciclo de Krebs. Por un lado, el aumento de piruvato provocaría una acumulación de lactato y NAD⁺ para mantener activa la glucólisis. Por otro lado, el bloqueo parcial del ciclo de Krebs conllevaría la activación de rutas catabólicas como medio alternativo de obtención de energía, como por ejemplo la degradación de ácidos grasos. A su vez, existiría una disminución en la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas que conllevaría alteraciones en la expresión génica, lo que podría derivar en fallos de procesos asociados, como la replicación y reparación del ADN y la proliferación celular. Estas alteraciones, junto al aumento del estrés oxidativo y la activación de las vías celulares de respuesta a estrés, podrían en última instancia desembocar en la muerte celular.

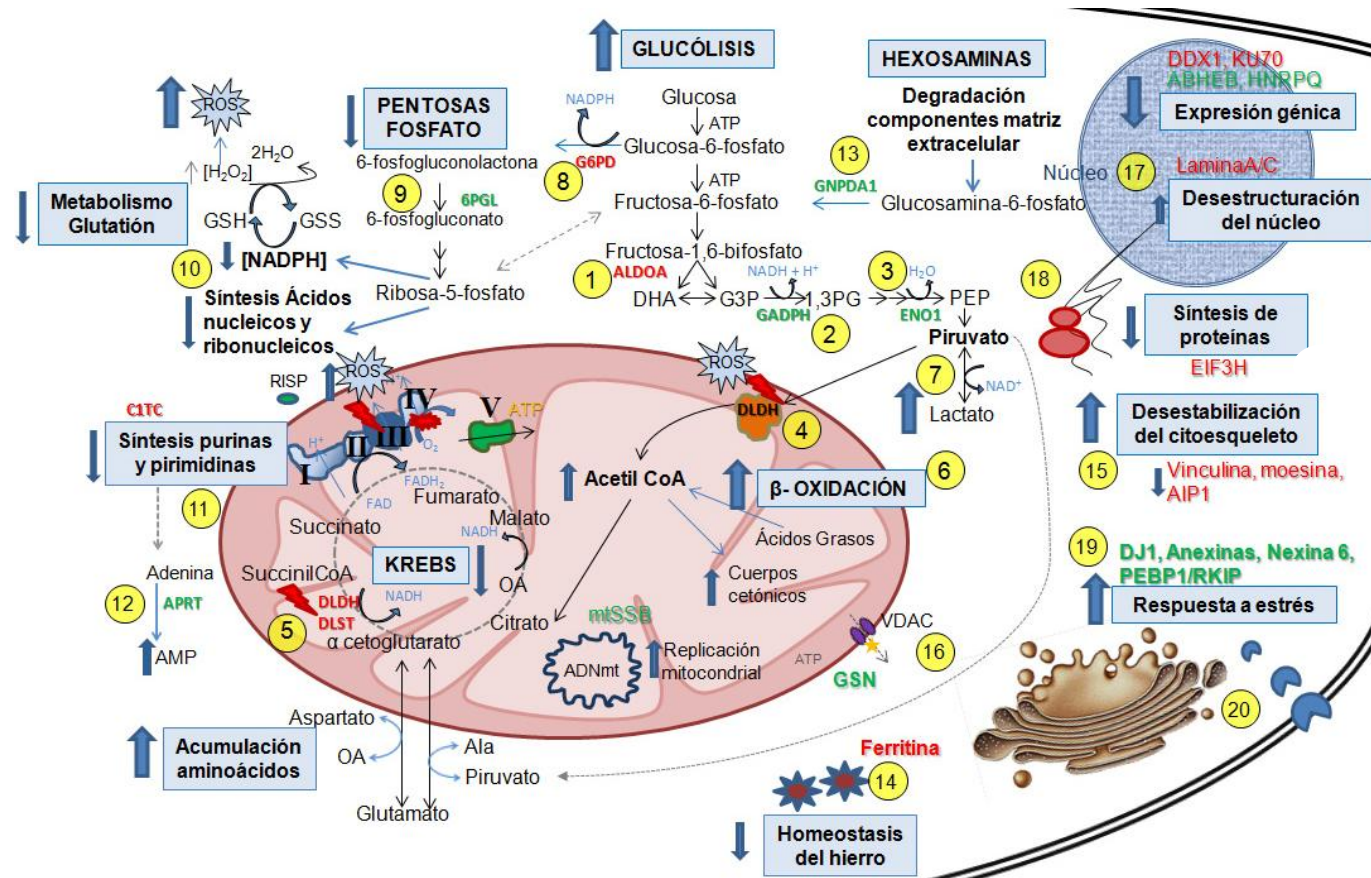


Figura 41. Diagrama hipotético de los procesos celulares alterados en fibroblastos con mutaciones en *BCSIL*. Entre las alteraciones metabólicas, se detectó un aumento de la fase productiva de ATP de la glucólisis (1, 2 y 3) y una disminución de la actividad del ciclo de Krebs (4), que provocaría la acumulación de intermediarios del mismo. Ello derivaría en una acumulación de aminoácidos (5), así como un posible aumento de la β-oxidación (6) y altos niveles de piruvato y lactato (7). También se observó una disminución en la ruta de las pentosas fosfato (8 y 9), lo que afectaría a la síntesis de ácidos nucleicos y ribonucleicos y al metabolismo del glutatión, generando un aumento de ROS (10). Asimismo, estaría afectada la síntesis de purinas y pirimidinas, aumentando el ratio AMP/ATP (11,12). Se produciría la degradación de componentes de la matriz extracelular (13), así como alteraciones en la homeostasis del hierro (14) y la desestructuración del citoesqueleto (15). Ello conduciría a fallos en los procesos reguladores de la expresión génica (17,18), a alteraciones en los mecanismos de transducción de señales (19) y a un aumento de la respuesta celular a estrés oxidativo y metabólico (20). Las proteínas cuyos niveles disminuyeron en los fibroblastos mutados respecto a los controles se indican en color rojo y aquellas cuyos niveles aumentaron, se indican en color verde.

CONCLUSIONES

- 1) Se han analizado las consecuencias fisiopatológicas de las mutaciones en *BCS1L* en fibroblastos de seis pacientes con déficit enzimático primario del complejo III mitocondrial. Dicho estudio ha demostrado que: i) las mutaciones en *BCS1L* no provocan una reducción de los niveles de la proteína BCS1L, pero pueden disminuir los niveles de la subunidad RISP del complejo III a nivel celular; ii) dependiendo de la localización de las mutaciones, existen fallos tanto en el importe intramitocondrial de BCS1L como en el ensamblaje de la proteína en complejos macromoleculares y iii) la variedad de déficits enzimáticos de cadena respiratoria presentes en los fibroblastos de pacientes depende de cada mutación y correlaciona con el ensamblaje anormal de los complejos de la cadena respiratoria, pudiendo manifestarse como un defecto único del complejo III o combinado con los complejos I y IV.
- 2) La gravedad de los síntomas clínicos de los pacientes con mutaciones en *BCS1L* correlacionan con la severidad de dichos déficits enzimáticos de cadena respiratoria mitocondrial presentes en fibroblastos. Así, los fenotipos fisiopatológicos de las mutaciones detectadas en los fibroblastos P1 a P4 son más severos que los observados en los fibroblastos P5 y P6. Dichas mutaciones, además de producir defectos graves en el ensamblaje de la cadena respiratoria, provocan un retraso acusado en la proliferación de los fibroblastos mutados, un aumento de los niveles de ROS, una activación general de las defensas antioxidantes y la activación de mecanismos de muerte celular programada independientes de la activación del apoptosoma y de la liberación al citoplasma del citocromo c mitocondrial.
- 3) En todas las células de pacientes se producen alteraciones en la morfología de la red mitocondrial, de manera independiente a la severidad del déficit enzimático de cadena respiratoria, a los niveles intracelulares de peróxido de hidrógeno y a cambios en el potencial de membrana mitocondrial.
- 4) En fibroblastos humanos, BCS1L interacciona con la proteína LETM1 en el interior de la mitocondria y las mutaciones en *BCS1L* detectadas en los pacientes no afectan a dicha interacción.

- 5) En fibroblastos control, BCS1L forma parte de cinco complejos nativos de 100, 250, 400, 450 y 850 kDa. A su vez, la proteína LETM1 aparece representada en tres complejos de ~250, 350 y 650 kDa. Ambas proteínas colocalizan en el complejo de 250 kDa, lo que indica que la interacción tiene lugar en este punto.
- 6) En fibroblastos mutados en *BCS1L*, se observa un aumento en los niveles intramitocondriales de los complejos LETM1, así como un desplazamiento de la proteína hacia estructuras de peso molecular por encima de los 650 kDa.
- 7) Las mutaciones en *BCS1L* provocan alteraciones específicas en el perfil proteico de los fibroblastos de pacientes. Se ha detectado un total de 35 proteínas cuya expresión varía significativamente entre fibroblastos control y mutados, que se pueden clasificar en cinco categorías funcionales: proteínas relacionadas con el metabolismo energético de la célula, el mantenimiento del citoesqueleto, la regulación de la expresión génica, la regulación del ciclo celular y transducción de señales y la respuesta celular a estrés.
- 8) Se ha validado el aumento en los niveles de gelsolina en los fibroblastos con mutaciones en *BCS1L*, observándose una acumulación preferencial de esta proteína en las mitocondrias. Tanto en fibroblastos control como mutados, se confirma la interacción descrita de la gelsolina con la proteína de membrana externa mitocondrial VDAC.

BIBLIOGRAFIA

Acin-Perez, R., Bayona-Bafaluy, M.P., Fernandez-Silva, P., Moreno-Loshuertos, R., Perez-Martos, A., Bruno, C., Moraes, C.T., and Enriquez, J.A. (2004). Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria. *Mol Cell* 13, 805-815.

Acin-Perez, R., Fernandez-Silva, P., Peleato, M.L., Perez-Martos, A., and Enriquez, J.A. (2008). Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell* 32, 529-539.

Al-Owain, M., Colak, D., Albakheet, A., Al-Younes, B., Al-Humaidi, Z., Al-Sayed, M., Al-Hindi, H., Al-Sugair, A., Al-Muhaideb, A., Rahbeeni, Z., *et al.* (2012). Clinical and biochemical features associated with BCS1L mutation. *J Inherit Metab Dis*. [Epub ahead of print]

Althoff, T., Mills, D.J., Popot, J.L., and Kuhlbrandt, W. (2011). Arrangement of electron transport chain components in bovine mitochondrial supercomplex I₁III₂IV₁. *Embo J* 30, 4652-4664.

Ambrus, A., Torocsik, B., Tretter, L., Ozohanics, O., and Adam-Vizi, V. (2011). Stimulation of reactive oxygen species generation by disease-causing mutations of lipoamide dehydrogenase. *Hum Mol Genet* 20, 2984-2995.

Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., *et al.* (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290, 457-465.

Andreu, A.L., Bruno, C., Dunne, T.C., Tanji, K., Shanske, S., Sue, C.M., Krishna, S., Hadjigeorgiou, G.M., Shtilbans, A., Bonilla, E., *et al.* (1999a). A nonsense mutation (G15059A) in the cytochrome b gene in a patient with exercise intolerance and myoglobinuria. *Ann Neurol* 45, 127-130.

Andreu, A.L., Bruno, C., Hadjigeorgiou, G.M., Shanske, S., and DiMauro, S. (1999b). Polymorphic variants in the human mitochondrial cytochrome b gene. *Mol Genet Metab* 67, 49-52.

Andrews, R.M., Kubacka, I., Chinnery, P.F., Lightowers, R.N., Turnbull, D.M., and Howell, N. (1999). Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet* 23, 147.

Antequera, D., Vargas, T., Ugalde, C., Spuch, C., Molina, J.A., Ferrer, I., Bermejo-Pareja, F., and Carro, E. (2009). Cytoplasmic gelsolin increases mitochondrial activity and reduces Abeta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 36, 42-50.

Antonicka, H., Ogilvie, I., Taivassalo, T., Anitori, R.P., Haller, R.G., Vissing, J., Kennaway, N.G., and Shoubridge, E.A. (2003). Identification and characterization of a common set of complex I assembly intermediates in mitochondria from patients with complex I deficiency. *J Biol Chem* 278, 43081-43088.

Atkinson, A., Khalimonchuk, O., Smith, P., Sabic, H., Eide, D., and Winge, D.R. (2010). Mzm1 influences a labile pool of mitochondrial zinc important for respiratory function. *J Biol Chem* 285, 19450-19459.

Atkinson, A., Smith, P., Fox, J.L., Cui, T.Z., Khalimonchuk, O., and Winge, D.R. (2011). The LYR protein Mzm1 functions in the insertion of the Rieske Fe/S protein in yeast mitochondria. *Mol Cell Biol* 31, 3988-3996.

Barel, O., Shorer, Z., Flusser, H., Ofir, R., Narkis, G., Finer, G., Shalev, H., Nasasra, A., Saada, A., and Birk, O.S. (2008). Mitochondrial complex III deficiency associated with a homozygous mutation in UQCRCQ. *Am J Hum Genet* 82, 1211-1216.

Bauerschmitt, H., Mick, D.U., Deckers, M., Vollmer, C., Funes, S., Kehrein, K., Ott, M., Rehling, P., and Herrmann, J.M. (2010). Ribosome-binding proteins Mdm38 and Mba1 display overlapping functions for regulation of mitochondrial translation. *Mol Biol Cell* 21, 1937-1944.

Baum, H., Rieske, J.S., Silman, H.I., and Lipton, S.H. (1967). On the mechanism of electron transfer in complex iii of the electron transfer chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 57, 798-805.

Beckmann, J.D., Ljungdahl, P.O., Lopez, J.L., and Trumpower, B.L. (1987). Isolation and characterization of the nuclear gene encoding the Rieske iron-sulfur protein (RIP1) from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 262, 8901-8909.

Benard, G., and Rossignol, R. (2008). Ultrastructure of the mitochondrion and its bearing on function and bioenergetics. *Antioxid Redox Signal* 10, 1313-1342.

Benit, P., Lebon, S., and Rustin, P. (2009). Respiratory-chain diseases related to complex III deficiency. *Biochim Biophys Acta* 1793, 181-185.

Berden, J.A., Nieboer, P., and Hartog, A.F. (1988). Dissociation-reconstitution experiments with NBD-modified F1: support for the presence of two catalytic beta-subunits. *Prog Clin Biol Res* 273, 81-86.

Bernard, D.G., Gabilly, S.T., Dujardin, G., Merchant, S., and Hamel, P.P. (2003). Overlapping specificities of the mitochondrial cytochrome c and c1 heme lyases. *J Biol Chem* 278, 49732-49742.

Bernard, D.G., Quevillon-Cheruel, S., Merchant, S., Guiard, B., and Hamel, P.P. (2005). Cyc2p, a membrane-bound flavoprotein involved in the maturation of mitochondrial c-type cytochromes. *J Biol Chem* 280, 39852-39859.

Bijur, G.N., and Jope, R.S. (2003). Rapid accumulation of Akt in mitochondria following phosphatidylinositol 3-kinase activation. *J Neurochem* 87, 1427-1435.

Blakely, E.L., Mitchell, A.L., Fisher, N., Meunier, B., Nijtmans, L.G., Schaefer, A.M., Jackson, M.J., Turnbull, D.M., and Taylor, R.W. (2005). A mitochondrial cytochrome b mutation causing severe respiratory chain enzyme deficiency in humans and yeast. *Febs J* 272, 3583-3592.

Blass, J.P. (2002). Glucose/mitochondria in neurological conditions. *Int Rev Neurobiol* 51, 325-376.

Blazquez, A., Gil-Borlado, M.C., Moran, M., Verdu, A., Cazorla-Calleja, M.R., Martin, M.A., Arenas, J., and Ugalde, C. (2009). Infantile mitochondrial encephalomyopathy with unusual phenotype caused by a novel BCS1L mutation in an isolated complex III-deficient patient. *Neuromuscul Disord* 19, 143-146.

Bleoo, S., Sun, X., Hendzel, M.J., Rowe, J.M., Packer, M., and Godbout, R. (2001). Association of human DEAD box protein DDX1 with a cleavage stimulation factor involved in 3'-end processing of pre-mRNA. *Mol Biol Cell* 12, 3046-3059.

Bogenhagen, D.F., Rousseau, D., and Burke, S. (2008). The layered structure of human mitochondrial DNA nucleoids. *J Biol Chem* 283, 3665-3675.

Bogenhagen, D.F., Wang, Y., Shen, E.L., and Kobayashi, R. (2003). Protein components of mitochondrial DNA nucleoids in higher eukaryotes. *Mol Cell Proteomics* 2, 1205-1216.

Bonfoco, E., Krainc, D., Ankarcrona, M., Nicotera, P., and Lipton, S.A. (1995). Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7162-7166.

Bonifati, V., Rizzu, P., van Baren, M.J., Schaap, O., Breedveld, G.J., Krieger, E., Dekker, M.C., Squitieri, F., Ibanez, P., Joosse, M., *et al.* (2003). Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 299, 256-259.

Borisov, V.B. (2002). Defects in mitochondrial respiratory complexes III and IV, and human pathologies. *Mol Aspects Med* 23, 385-412.

Bousquet, I., Dujardin, G., and Slonimski, P.P. (1991). ABC1, a novel yeast nuclear gene has a dual function in mitochondria: it suppresses a cytochrome b mRNA translation defect and is essential for the electron transfer in the bc 1 complex. *Embo J* 10, 2023-2031.

Brandt, U., Uribe, S., Schagger, H., and Trumpower, B.L. (1994). Isolation and characterization of QCR10, the nuclear gene encoding the 8.5-kDa subunit 10 of the *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome bc1 complex. *J Biol Chem* 269, 12947-12953.

Bruel, C., Brasseur, R., and Trumpower, B.L. (1996). Subunit 8 of the *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome bc1 complex interacts with succinate-ubiquinone reductase complex. *J Bioenerg Biomembr* 28, 59-68.

Bubber, P., Haroutunian, V., Fisch, G., Blass, J.P., and Gibson, G.E. (2005). Mitochondrial abnormalities in Alzheimer brain: mechanistic implications. *Ann Neurol* 57, 695-703.

Budde, S.M., van den Heuvel, L.P., Janssen, A.J., Smeets, R.J., Buskens, C.A., DeMeirleir, L., Van Coster, R., Baethmann, M., Voit, T., Trijbels, J.M., *et al.* (2000). Combined enzymatic complex I and III deficiency associated with mutations in the nuclear encoded NDUFS4 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 275, 63-68.

Burgoyne, L.A., Hewish, D.R., and Mobbs, J. (1974). Mammalian chromatin substructure studies with the calcium-magnesium endonuclease and two-dimensional polyacrylamide-gel electrophoresis. *Biochem J* 143, 67-72.

Calvaruso, M.A., Smeitink, J., and Nijtmans, L. (2008). Electrophoresis techniques to investigate defects in oxidative phosphorylation. *Methods* 46, 281-287.

Cameron, J.M., Levandovskiy, V., Mackay, N., Raiman, J., Renaud, D.L., Clarke, J.T., Feigenbaum, A., Elpeleg, O., and Robinson, B.H. (2006). Novel mutations in dihydrolipoamide dehydrogenase deficiency in two cousins with borderline-normal PDH complex activity. *Am J Med Genet A* 140, 1542-1552.

Canet-Aviles, R.M., Wilson, M.A., Miller, D.W., Ahmad, R., McLendon, C., Bandyopadhyay, S., Baptista, M.J., Ringe, D., Petsko, G.A., and Cookson, M.R. (2004). The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 9103-9108.

Cipolat, S., Martins de Brito, O., Dal Zilio, B., and Scorrano, L. (2004). OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15927-15932.

Cormier, V., Rotig, A., Tardieu, M., Colonna, M., Saudubray, J.M., and Munnich, A. (1991). Autosomal dominant deletions of the mitochondrial genome in a case of progressive encephalomyopathy. *Am J Hum Genet* 48, 643-648.

Corvest, V., Murrey, D.A., Hirasawa, M., Knaff, D.B., Guiard, B., and Hamel, P.P. (2012). The flavoprotein Cyc2p, a mitochondrial cytochrome c assembly factor, is a NAD(P)H-dependent haem reductase. *Mol Microbiol* 83, 968-980.

Crivellone, M.D. (1994). Characterization of CBP4, a new gene essential for the expression of ubiquinol-cytochrome c reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 269, 21284-21292.

Crivellone, M.D., Wu, M.A., and Tzagoloff, A. (1988). Assembly of the mitochondrial membrane system. Analysis of structural mutants of the yeast coenzyme QH₂-cytochrome c reductase complex. *J Biol Chem* 263, 14323-14333.

Cruciat, C.M., Hell, K., Folsch, H., Neupert, W., and Stuart, R.A. (1999). Bcs1p, an AAA-family member, is a chaperone for the assembly of the cytochrome bc(1) complex. *EMBO J* 18, 5226-5233.

- Cui, T.Z., Smith, P.M., Fox, J.L., Khalimonchuk, O., and Winge, D.R. (2012). Late stage maturation of the Rieske Fe/S protein: Mzm1 stabilizes Rip1 but does not facilitate its translocation by the AAA ATPase Bcs1. *Mol Cell Biol* 32, 4400-4409.
- Cullen, P.J., and Korswagen, H.C. (2012). Sorting nexins provide diversity for retromer-dependent trafficking events. *Nat Cell Biol* 14, 29-37.
- Cunningham, C.C., Stosel, T.P., and Kwiatkowski, D.J. (1991). Enhanced motility in NIH 3T3 fibroblasts that overexpress gelsolin. *Science* 251, 1233-1236.
- Chae, Y.C., Lee, S., Heo, K., Ha, S.H., Jung, Y., Kim, J.H., Ihara, Y., Suh, P.G., and Ryu, S.H. (2009). Collapsin response mediator protein-2 regulates neurite formation by modulating tubulin GTPase activity. *Cell Signal* 21, 1818-1826.
- Chan, D.C. (2006). Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 79-99.
- Chance, B., and Williams, G.R. (1955). A method for the localization of sites for oxidative phosphorylation. *Nature* 176, 250-254.
- Chen, H., and Chan, D.C. (2005). Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Hum Mol Genet* 14 *Spec No. 2*, R283-289.
- Chen, T.Y., Chi, K.H., Wang, J.S., Chien, C.L., and Lin, W.W. (2009). Reactive oxygen species are involved in FasL-induced caspase-independent cell death and inflammatory responses. *Free Radic Biol Med* 46, 643-655.
- D'Aurelio, M., Gajewski, C.D., Lenaz, G., and Manfredi, G. (2006). Respiratory chain supercomplexes set the threshold for respiration defects in human mtDNA mutant cybrids. *Hum Mol Genet* 15, 2157-2169.
- David, M., Petit, D., and Bertoglio, J. (2012). Cell cycle regulation of Rho signaling pathways. *Cell Cycle* 11, 3003-3010.
- Davidson, S.M., Yellon, D., and Duchon, M.R. (2007). Assessing mitochondrial potential, calcium, and redox state in isolated mammalian cells using confocal microscopy. *Methods Mol Biol* 372, 421-430.

de Lonlay, P., and Seta, N. (2009). The clinical spectrum of phosphomannose isomerase deficiency, with an evaluation of mannose treatment for CDG-Ib. *Biochim Biophys Acta* 1792, 841-843.

de Lonlay, P., Valnot, I., Barrientos, A., Gorbatyuk, M., Tzagoloff, A., Taanman, J.W., Benayoun, E., Chretien, D., Kadhon, N., Lombes, A., *et al.* (2001). A mutant mitochondrial respiratory chain assembly protein causes complex III deficiency in patients with tubulopathy, encephalopathy and liver failure. *Nat Genet* 29, 57-60.

De Meirleir, L., Seneca, S., Damis, E., Sepulchre, B., Hoorens, A., Gerlo, E., Garcia Silva, M.T., Hernandez, E.M., Lissens, W., and Van Coster, R. (2003). Clinical and diagnostic characteristics of complex III deficiency due to mutations in the BCS1L gene. *Am J Med Genet A* 121A, 126-131.

De Vos, K.J., Allan, V.J., Grierson, A.J., and Sheetz, M.P. (2005). Mitochondrial function and actin regulate dynamin-related protein 1-dependent mitochondrial fission. *Curr Biol* 15, 678-683.

Deo, R.C., Schmidt, E.F., Elhabazi, A., Togashi, H., Burley, S.K., and Strittmatter, S.M. (2004). Structural bases for CRMP function in plexin-dependent semaphorin3A signaling. *Embo J* 23, 9-22.

Diaz, F., Enriquez, J.A., and Moraes, C.T. (2012a). Cells lacking Rieske iron-sulfur protein have a reactive oxygen species-associated decrease in respiratory complexes I and IV. *Mol Cell Biol* 32, 415-429.

Diaz, F., Garcia, S., Padgett, K.R., and Moraes, C.T. (2012b). A defect in the mitochondrial complex III, but not complex IV, triggers early ROS-dependent damage in defined brain regions. *Hum Mol Genet.* [Epub ahead of print]

Diaz, F., Kotarsky, H., Fellman, V., and Moraes, C.T. (2011). Mitochondrial disorders caused by mutations in respiratory chain assembly factors. *Semin Fetal Neonatal Med* 16, 197-204.

Dimmer, K.S., Navoni, F., Casarin, A., Trevisson, E., Endele, S., Winterpacht, A., Salviati, L., and Scorrano, L. (2008). LETM1, deleted in Wolf-Hirschhorn syndrome is required for normal mitochondrial morphology and cellular viability. *Hum Mol Genet* 17, 201-214.

Dudkina, N.V., Eubel, H., Keegstra, W., Boekema, E.J., and Braun, H.P. (2005). Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 3225-3229.

Dudkina, N.V., Kudryashev, M., Stahlberg, H., and Boekema, E.J. (2011). Interaction of complexes I, III, and IV within the bovine respirasome by single particle cryoelectron tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 15196-15200.

Duke, R.C., Cohen, J.J., and Chervenak, R. (1986). Differences in target cell DNA fragmentation induced by mouse cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells. *J Immunol* *137*, 1442-1447.

Dumont, M.E., Cardillo, T.S., Hayes, M.K., and Sherman, F. (1991). Role of cytochrome c heme lyase in mitochondrial import and accumulation of cytochrome c in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* *11*, 5487-5496.

Dumont, M.E., Ernst, J.F., Hampsey, D.M., and Sherman, F. (1987). Identification and sequence of the gene encoding cytochrome c heme lyase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* *6*, 235-241.

Dumont, M.E., Schlichter, J.B., Cardillo, T.S., Hayes, M.K., Bethlenny, G., and Sherman, F. (1993). CYC2 encodes a factor involved in mitochondrial import of yeast cytochrome c. *Mol Cell Biol* *13*, 6442-6451.

Ellis, R.J., and van der Vies, S.M. (1991). Molecular chaperones. *Annu Rev Biochem* *60*, 321-347.

Eubel, H., Heinemeyer, J., Sunderhaus, S., and Braun, H.P. (2004). Respiratory chain supercomplexes in plant mitochondria. *Plant Physiol Biochem* *42*, 937-942.

Eubel, H., Jansch, L., and Braun, H.P. (2003). New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II. *Plant Physiol* *133*, 274-286.

Fatkin, D., MacRae, C., Sasaki, T., Wolff, M.R., Porcu, M., Frenneaux, M., Atherton, J., Vidaillet, H.J., Jr., Spudich, S., De Girolami, U., *et al.* (1999). Missense mutations in the rod

domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. *N Engl J Med* 341, 1715-1724.

Fellman, V. (2002). The GRACILE syndrome, a neonatal lethal metabolic disorder with iron overload. *Blood cells, molecules & diseases* 29, 444-450.

Fernandez-Vizarra, E., Bugiani, M., Goffrini, P., Carrara, F., Farina, L., Procopio, E., Donati, A., Uziel, G., Ferrero, I., and Zeviani, M. (2007). Impaired complex III assembly associated with BCS1L gene mutations in isolated mitochondrial encephalopathy. *Hum Mol Genet* 16, 1241-1252.

Fernandez-Vizarra, E., Tiranti, V., and Zeviani, M. (2009). Assembly of the oxidative phosphorylation system in humans: what we have learned by studying its defects. *Biochim Biophys Acta* 1793, 200-211.

Folsch, H., Guiard, B., Neupert, W., and Stuart, R.A. (1996). Internal targeting signal of the BCS1 protein: a novel mechanism of import into mitochondria. *Embo J* 15, 479-487.

Fontanesi, F., Soto, I.C., and Barrientos, A. (2008). Cytochrome c oxidase biogenesis: new levels of regulation. *IUBMB Life* 60, 557-568.

Frazier, A.E., Taylor, R.D., Mick, D.U., Warscheid, B., Stoepel, N., Meyer, H.E., Ryan, M.T., Guiard, B., and Rehling, P. (2006). Mdm38 interacts with ribosomes and is a component of the mitochondrial protein export machinery. *J Cell Biol* 172, 553-564.

Frickey, T., and Lupas, A.N. (2004). Phylogenetic analysis of AAA proteins. *J Struct Biol* 146, 2-10.

Froschauer, E., Nowikovsky, K., and Schweyen, R.J. (2005). Electroneutral K⁺/H⁺ exchange in mitochondrial membrane vesicles involves Yol027/Letm1 proteins. *Biochim Biophys Acta* 1711, 41-48.

Gampel, A., and Cech, T.R. (1991). Binding of the CBP2 protein to a yeast mitochondrial group I intron requires the catalytic core of the RNA. *Genes Dev* 5, 1870-1880.

Gampel, A., Nishikimi, M., and Tzagoloff, A. (1989). CBP2 protein promotes in vitro excision of a yeast mitochondrial group I intron. *Mol Cell Biol* 9, 5424-5433.

- Garesse, R., and Vallejo, C.G. (2001). Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. *Gene* 263, 1-16.
- Geisow, M.J., Walker, J.H., Boustead, C., and Taylor, W. (1987). Annexins--new family of Ca²⁺-regulated-phospholipid binding protein. *Biosci Rep* 7, 289-298.
- Ghezzi, D., Arzuffi, P., Zordan, M., Da Re, C., Lamperti, C., Benna, C., D'Adamo, P., Diodato, D., Costa, R., Mariotti, C., *et al.* (2011). Mutations in TTC19 cause mitochondrial complex III deficiency and neurological impairment in humans and flies. *Nat Genet* 43, 259-263.
- Gil-Borlado, M.C., Gonzalez-Hoyuela, M., Blazquez, A., Garcia-Silva, M.T., Gabaldon, T., Manzanares, J., Vara, J., Martin, M.A., Seneca, S., Arenas, J., *et al.* (2009). Pathogenic mutations in the 5' untranslated region of BCS1L mRNA in mitochondrial complex III deficiency. *Mitochondrion* 9, 299-305.
- Glatigny, A., Mathieu, L., Herbert, C.J., Dujardin, G., Meunier, B., and Mucchielli-Giorgi, M.H. (2011). An in silico approach combined with in vivo experiments enables the identification of a new protein whose overexpression can compensate for specific respiratory defects in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Syst Biol* 5, 173.
- Godbout, R., and Squire, J. (1993). Amplification of a DEAD box protein gene in retinoblastoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7578-7582.
- Gorg, A., Postel, W., and Gunther, S. (1988). The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 9, 531-546.
- Grafakou, O., Oexle, K., van den Heuvel, L., Smeets, R., Trijbels, F., Goebel, H.H., Bosshard, N., Superti-Furga, A., Steinmann, B., and Smeitink, J. (2003). Leigh syndrome due to compound heterozygosity of dihydrolipoamide dehydrogenase gene mutations. Description of the first E3 splice site mutation. *Eur J Pediatr* 162, 714-718.
- Graham, L.A., Brandt, U., and Trumpower, B.L. (1994). Protease maturation of the Rieske iron-sulphur protein after its insertion into the mitochondrial cytochrome bc₁ complex of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Soc Trans* 22, 188-191.

Graham, L.A., and Trumpower, B.L. (1991). Mutational analysis of the mitochondrial Rieske iron-sulfur protein of *Saccharomyces cerevisiae*. III. Import, protease processing, and assembly into the cytochrome bc1 complex of iron-sulfur protein lacking the iron-sulfur cluster. *J Biol Chem* 266, 22485-22492.

Green, D.E., and Tzagoloff, A. (1966). The mitochondrial electron transfer chain. *Arch Biochem Biophys* 116, 293-304.

Grivell, L.A. (1989). Nucleo-mitochondrial interactions in yeast mitochondrial biogenesis. *Eur J Biochem* 182, 477-493.

Gruschke, S., Kehrein, K., Rompler, K., Grone, K., Israel, L., Imhof, A., Herrmann, J.M., and Ott, M. (2011). Cbp3-Cbp6 interacts with the yeast mitochondrial ribosomal tunnel exit and promotes cytochrome b synthesis and assembly. *J Cell Biol* 193, 1101-1114.

Gruschke, S., Rompler, K., Hildenbeutel, M., Kehrein, K., Kuhl, I., Bonnefoy, N., and Ott, M. (2012). The Cbp3-Cbp6 complex coordinates cytochrome b synthesis with bc1 complex assembly in yeast mitochondria. *J Cell Biol* 199, 137-150.

Guillery, O., Malka, F., Landes, T., Guillou, E., Blackstone, C., Lombes, A., Belenguer, P., Arnoult, D., and Rojo, M. (2008). Metalloprotease-mediated OPA1 processing is modulated by the mitochondrial membrane potential. *Biol Cell* 100, 315-325.

Guzman, J.N., Sanchez-Padilla, J., Wokosin, D., Kondapalli, J., Ilijic, E., Schumacker, P.T., and Surmeier, D.J. (2010). Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1. *Nature* 468, 696-700.

Guzun, R., Gonzalez-Granillo, M., Karu-Varikmaa, M., Grichine, A., Usson, Y., Kaambre, T., Guerrero-Roesch, K., Kuznetsov, A., Schlattner, U., and Saks, V. (2012). Regulation of respiration in muscle cells in vivo by VDAC through interaction with the cytoskeleton and MtCK within Mitochondrial Interactosome. *Biochim Biophys Acta* 1818, 1545-1554.

Hackenbrock, C.R., Chazotte, B., and Gupte, S.S. (1986). The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J Bioenerg Biomembr* 18, 331-368.

Hanai, N., Nagata, K., Kawajiri, A., Shiromizu, T., Saitoh, N., Hasegawa, Y., Murakami, S., and Inagaki, M. (2004). Biochemical and cell biological characterization of a mammalian septin, Sept11. *FEBS Lett* 568, 83-88.

Haut, S., Brivet, M., Touati, G., Rustin, P., Lebon, S., Garcia-Cazorla, A., Saudubray, J.M., Boutron, A., Legrand, A., and Slama, A. (2003). A deletion in the human QP-C gene causes a complex III deficiency resulting in hypoglycaemia and lactic acidosis. *Hum Genet* 113, 118-122.

Hayes, M.J., Rescher, U., Gerke, V., and Moss, S.E. (2004). Annexin-actin interactions. *Traffic* 5, 571-576.

Heinemeyer, J., Braun, H.P., Boekema, E.J., and Kouril, R. (2007). A structural model of the cytochrome C reductase/oxidase supercomplex from yeast mitochondria. *J Biol Chem* 282, 12240-12248.

Hemrika, W., Berden, J.A., and Grivell, L.A. (1993). A region of the C-terminal part of the 11-kDa subunit of ubiquinol-cytochrome-c oxidoreductase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* contributes to the structure of the Qout reaction domain. *Eur J Biochem* 215, 601-609.

Herrero, A., and Barja, G. (1997). Sites and mechanisms responsible for the low rate of free radical production of heart mitochondria in the long-lived pigeon. *Mech Ageing Dev* 98, 95-111.

Higa, A., and Chevet, E. (2012). Redox signaling loops in the unfolded protein response. *Cell Signal* 24, 1548-1555.

Hinson, J.T., Fantin, V.R., Schonberger, J., Breivik, N., Siem, G., McDonough, B., Sharma, P., Keogh, I., Godinho, R., Santos, F., *et al.* (2007). Missense mutations in the BCS1L gene as a cause of the Bjornstad syndrome. *N Engl J Med* 356, 809-819.

Hintze, K.J., and Theil, E.C. (2005). DNA and mRNA elements with complementary responses to hemin, antioxidant inducers, and iron control ferritin-L expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 15048-15052.

- Hochli, M., and Hackenbrock, C.R. (1976). Fluidity in mitochondrial membranes: thermotropic lateral translational motion of intramembrane particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 1636-1640.
- Hochman, J., Ferguson-Miller, S., and Schindler, M. (1985). Mobility in the mitochondrial electron transport chain. *Biochemistry* 24, 2509-2516.
- Hong, Z., Yang, Y., Zhang, C., Niu, Y., Li, K., Zhao, X., and Liu, J.J. (2009). The retromer component SNX6 interacts with dynactin p150(Glued) and mediates endosome-to-TGN transport. *Cell Res* 19, 1334-1349.
- Horvath, R., Reilmann, R., Holinski-Feder, E., Ringe lstein, E.B., and Klopstock, T. (2008). The role of complex I genes in MELAS: a novel heteroplasmic mutation 3380G>A in ND1 of mtDNA. *Neuromuscul Disord* 18, 553-556.
- Hovius, R., Lambrechts, H., Nicolay, K., and de Kruijff, B. (1990). Improved methods to isolate and subfractionate rat liver mitochondria. Lipid composition of the inner and outer membrane. *Biochim Biophys Acta* 1021, 217-226.
- Hunte, C., Koepke, J., Lange, C., Rossmanith, T., and Michel, H. (2000). Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome bc(1) complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment. *Structure* 8, 669-684.
- Hunte, C., Palsdottir, H., and Trumpower, B.L. (2003). Protonmotive pathways and mechanisms in the cytochrome bc1 complex. *FEBS Lett* 545, 39-46.
- Irrcher, I., Aleyasin, H., Seifert, E.L., Hewitt, S.J., Chhabra, S., Phillips, M., Lutz, A.K., Rousseaux, M.W., Bevilacqua, L., Jahani-Asl, A., *et al.* (2010). Loss of the Parkinson's disease-linked gene DJ-1 perturbs mitochondrial dynamics. *Hum Mol Genet* 19, 3734-3746.
- Iwata, S., Lee, J.W., Okada, K., Lee, J.K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T.A., Ramaswamy, S., and Jap, B.K. (1998). Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex. *Science* 281, 64-71.
- Jaffe, A.B., and Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 247-269.

Jiang, D., Zhao, L., and Clapham, D.E. (2009). Genome-wide RNAi screen identifies Letm1 as a mitochondrial Ca²⁺/H⁺ antiporter. *Science* 326, 144-147.

Jung, H.J., Kim, K.H., Kim, N.D., Han, G., and Kwon, H.J. (2011). Identification of a novel small molecule targeting UQCRB of mitochondrial complex III and its anti-angiogenic activity. *Bioorg Med Chem Lett* 21, 1052-1056.

Keightley, J.A., Anitori, R., Burton, M.D., Quan, F., Buist, N.R., and Kennaway, N.G. (2000). Mitochondrial encephalomyopathy and complex III deficiency associated with a stop-codon mutation in the cytochrome b gene. *Am J Hum Genet* 67, 1400-1410.

Koopman, W.J., Verkaart, S., Visch, H.J., van der Westhuizen, F.H., Murphy, M.P., van den Heuvel, L.W., Smeitink, J.A., and Willems, P.H. (2005). Inhibition of complex I of the electron transport chain causes O₂- mediated mitochondrial outgrowth. *Am J Physiol Cell Physiol* 288, C1440-1450.

Koopman, W.J., Verkaart, S., Visch, H.J., van Emst-de Vries, S., Nijtmans, L.G., Smeitink, J.A., and Willems, P.H. (2007). Human NADH:ubiquinone oxidoreductase deficiency: radical changes in mitochondrial morphology? *Am J Physiol Cell Physiol* 293, C22-29.

Kotarsky, H., Karikoski, R., Morgelin, M., Marjavaara, S., Bergman, P., Zhang, D.L., Smet, J., van Coster, R., and Fellman, V. (2010). Characterization of complex III deficiency and liver dysfunction in GRACILE syndrome caused by a BCS1L mutation. *Mitochondrion* 10, 497-509.

Kotarsky, H., Keller, M., Davoudi, M., Leveen, P., Karikoski, R., Enot, D.P., and Fellman, V. (2012). Metabolite profiles reveal energy failure and impaired beta-oxidation in liver of mice with complex III deficiency due to a BCS1L mutation. *PLoS One* 7, e41156.

Koya, R.C., Fujita, H., Shimizu, S., Ohtsu, M., Takimoto, M., Tsujimoto, Y., and Kuzumaki, N. (2000). Gelsolin inhibits apoptosis by blocking mitochondrial membrane potential loss and cytochrome c release. *J Biol Chem* 275, 15343-15349.

Kronekova, Z., and Rodel, G. (2005). Organization of assembly factors Cbp3p and Cbp4p and their effect on bc(1) complex assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 47, 203-212.

Kusano, H., Shimizu, S., Koya, R.C., Fujita, H., Kamada, S., Kuzumaki, N., and Tsujimoto, Y. (2000). Human gelsolin prevents apoptosis by inhibiting apoptotic mitochondrial changes via closing VDAC. *Oncogene* 19, 4807-4814.

Kwong, J.Q., Henning, M.S., Starkov, A.A., and Manfredi, G. (2007). The mitochondrial respiratory chain is a modulator of apoptosis. *J Cell Biol* 179, 1163-1177.

Lamantea, E., Carrara, F., Mariotti, C., Morandi, L., Tiranti, V., and Zeviani, M. (2002). A novel nonsense mutation (Q352X) in the mitochondrial cytochrome b gene associated with a combined deficiency of complexes I and III. *Neuromuscul Disord* 12, 49-52.

Lazarou, M., McKenzie, M., Ohtake, A., Thorburn, D.R., and Ryan, M.T. (2007). Analysis of the assembly profiles for mitochondrial- and nuclear-DNA-encoded subunits into complex I. *Mol Cell Biol* 27, 4228-4237.

Lee, S.Y., Raha, S., Nagar, B., and Robinson, B.H. (2001). The functional role of conserved acidic residues of the Qcr7 protein of the cytochrome bc(1) complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys* 393, 207-214.

Legros, F., Chatzoglou, E., Frachon, P., Ogier De Baulny, H., Laforet, P., Jardel, C., Godinot, C., and Lombes, A. (2001). Functional characterization of novel mutations in the human cytochrome b gene. *Eur J Hum Genet* 9, 510-518.

Legros, F., Lombes, A., Frachon, P., and Rojo, M. (2002). Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol Biol Cell* 13, 4343-4354.

Lenaz, G., and Genova, M.L. (2010). Structure and organization of mitochondrial respiratory complexes: a new understanding of an old subject. *Antioxid Redox Signal* 12, 961-1008.

Leterrier, J.F., Rusakov, D.A., Nelson, B.D., and Linden, M. (1994). Interactions between brain mitochondria and cytoskeleton: evidence for specialized outer membrane domains involved in the association of cytoskeleton-associated proteins to mitochondria in situ and in vitro. *Microsc Res Tech* 27, 233-261.

Leveen, P., Kotarsky, H., Morgelin, M., Karikoski, R., Elmer, E., and Fellman, V. (2011). The GRACILE mutation introduced into Bcs1l causes postnatal complex III deficiency: a viable mouse model for mitochondrial hepatopathy. *Hepatology* 53, 437-447.

Li, L., Monckton, E.A., and Godbout, R. (2008). A role for DEAD box 1 at DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol* 28, 6413-6425.

Linden, M., and Karlsson, G. (1996). Identification of porin as a binding site for MAP2. *Biochem Biophys Res Commun* 218, 833-836.

Linden, M., Nelson, B.D., Loncar, D., and Leterrier, J.F. (1989). Studies on the interaction between mitochondria and the cytoskeleton. *J Bioenerg Biomembr* 21, 507-518.

Ljungdahl, P.O., Pennoyer, J.D., Robertson, D.E., and Trumpower, B.L. (1987). Purification of highly active cytochrome bc₁ complexes from phylogenetically diverse species by a single chromatographic procedure. *Biochim Biophys Acta* 891, 227-241.

Lupo, D., Vollmer, C., Deckers, M., Mick, D.U., Tews, I., Sinning, I., and Rehling, P. (2011). Mdm38 is a 14-3-3-like receptor and associates with the protein synthesis machinery at the inner mitochondrial membrane. *Traffic* 12, 1457-1466.

Lynn, A.M., King, R.I., Mackay, R.J., Florkowski, C.M., and Wilson, C.J. (2012). BCS1L gene mutation presenting with GRACILE-like syndrome and complex III deficiency. *Ann Clin Biochem* 49, 201-203.

MacKenzie, E.L., Ray, P.D., and Tsuji, Y. (2008). Role and regulation of ferritin H in rotenone-mediated mitochondrial oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 44, 1762-1771.

Maldonado, E.N., Patnaik, J., Mullins, M.R., and Lemasters, J.J. (2010). Free tubulin modulates mitochondrial membrane potential in cancer cells. *Cancer Res* 70, 10192-10201.

Malka, F., Guillery, O., Cifuentes-Diaz, C., Guillou, E., Belenguer, P., Lombes, A., and Rojo, M. (2005). Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes. *EMBO Rep* 6, 853-859.

Mathieu, L., Marsy, S., Saint-Georges, Y., Jacq, C., and Dujardin, G. (2011). A transcriptome screen in yeast identifies a novel assembly factor for the mitochondrial complex III. *Mitochondrion* 11, 391-396.

McCoy, M.K., and Cookson, M.R. (2011). DJ-1 regulation of mitochondrial function and autophagy through oxidative stress. *Autophagy* 7, 531-532.

McKenzie, M., and Ryan, M.T. Assembly factors of human mitochondrial complex I and their defects in disease. (2010). *IUBMB Life* 62(7), 497-502.

Mitchell, P. (1976). Possible molecular mechanisms of the protonmotive function of cytochrome systems. *J Theor Biol* 62, 327-367.

Monastyrskaya, K., Babiychuk, E.B., and Draeger, A. (2009). The annexins: spatial and temporal coordination of signaling events during cellular stress. *Cell Mol Life Sci* 66, 2623-2642.

Moran M, Marín-Buera L, Gil-Borlado MC, Rivera H, Blázquez A, Seneca S, Vázquez-López M, Arenas J, Martín MA, Ugalde C. (2010a) Cellular pathophysiological consequences of BCS1L mutations in mitochondrial complex III enzyme deficiency. *Hum Mutat.* 31, 930-941.

Moran, M., Rivera H., Sánchez-Aragó M., Blázquez A., Merinero B., Ugalde C., Arenas J., Cuezva J.M., Martín M.A. (2010b) Mitochondrial bioenergetics and dynamics interplay in complex I-deficient fibroblasts. *Biochim Biophys Acta.* 1802, 443-453.

Moreno-Lastres, D., Fontanesi, F., Garcia-Consuegra, I., Martin, M.A., Arenas, J., Barrientos, A., and Ugalde, C. (2012). Mitochondrial complex I plays an essential role in human respirasome assembly. *Cell Metab* 15, 324-335.

Mourmans, J., Wendel, U., Bentlage, H.A., Trijbels, J.M., Smeitink, J.A., de Coo, I.F., Gabreels, F.J., Sengers, R.C., and Ruitenbeek, W. (1997). Clinical heterogeneity in respiratory chain complex III deficiency in childhood. *J Neurol Sci* 149, 111-117.

Muchir, A., Bonne, G., van der Kooi, A.J., van Meegen, M., Baas, F., Bolhuis, P.A., de Visser, M., and Schwartz, K. (2000). Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B). *Hum Mol Genet* 9, 1453-1459.

- Mulkidjanian, A.Y. (2005). Ubiquinol oxidation in the cytochrome bc1 complex: reaction mechanism and prevention of short-circuiting. *Biochim Biophys Acta* 1709, 5-34.
- Mullauer, L., Fujita, H., Suzuki, H., Katabami, M., Hitomi, Y., Ogiso, Y., and Kuzumaki, N. (1990). Elevated gelsolin and alpha-actin expression in a flat revertant R1 of Ha-ras oncogene-transformed NIH/3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 171, 852-859.
- Nagata, K., Asano, T., Nozawa, Y., and Inagaki, M. (2004). Biochemical and cell biological analyses of a mammalian septin complex, Sept7/9b/11. *J Biol Chem* 279, 55895-55904.
- Nakada, K., Inoue, K., and Hayashi, J. (2001). Interaction theory of mammalian mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 288, 743-746.
- Nass, M.M., and Nass, S. (1963). Intramitochondrial Fibers with DNA Characteristics. I. Fixation and Electron Staining Reactions. *J Cell Biol* 19, 593-611.
- Nett, J.H., and Trumpower, B.L. (1999). Intermediate length Rieske iron-sulfur protein is present and functionally active in the cytochrome bc1 complex of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 274, 9253-9257.
- Nijtmans, L.G., Henderson, N.S., and Holt, I.J. (2002). Blue Native electrophoresis to study mitochondrial and other protein complexes. *Methods* 26, 327-334.
- Nobrega, F.G., Nobrega, M.P., and Tzagoloff, A. (1992). BCS1, a novel gene required for the expression of functional Rieske iron-sulfur protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 11, 3821-3829.
- Nobrega, F.G., and Tzagoloff, A. (1980). Assembly of the mitochondrial membrane system. DNA sequence and organization of the cytochrome b gene in *Saccharomyces cerevisiae* D273-10B. *J Biol Chem* 255, 9828-9837.
- Nouet, C., Truan, G., Mathieu, L., and Dujardin, G. (2009). Functional analysis of yeast bcs1 mutants highlights the role of Bcs1p-specific amino acids in the AAA domain. *J Mol Biol* 388, 252-261.

Nowikovsky, K., Froschauer, E.M., Zsurka, G., Samaj, J., Reipert, S., Kolisek, M., Wiesenberger, G., and Schweyen, R.J. (2004). The LETM1/YOL027 gene family encodes a factor of the mitochondrial K⁺ homeostasis with a potential role in the Wolf-Hirschhorn syndrome. *J Biol Chem* 279, 30307-30315.

Nowikovsky, K., Pozzan, T., Rizzuto, R., Scorrano, L., and Bernardi, P. (2012). Perspectives on: SGP symposium on mitochondrial physiology and medicine: the pathophysiology of LETM1. *J Gen Physiol* 139, 445-454.

Nowikovsky, K., Reipert, S., Devenish, R.J., and Schweyen, R.J. (2007). Mdm38 protein depletion causes loss of mitochondrial K⁺/H⁺ exchange activity, osmotic swelling and mitophagy. *Cell Death Differ* 14, 1647-1656.

Ohtsu, M., Sakai, N., Fujita, H., Kashiwagi, M., Gasa, S., Shimizu, S., Eguchi, Y., Tsujimoto, Y., Sakiyama, Y., Kobayashi, K., *et al.* (1997). Inhibition of apoptosis by the actin-regulatory protein gelsolin. *Embo J* 16, 4650-4656.

Padmanabhan, B., Adachi, N., Kataoka, K., and Horikoshi, M. (2004). Crystal structure of the homolog of the oncoprotein gankyrin, an interactor of Rb and CDK4/6. *J Biol Chem* 279, 1546-1552.

Panaretakis, T., Shabalina, I.G., Grander, D., Shoshan, M.C., and DePierre, J.W. (2001). Reactive oxygen species and mitochondria mediate the induction of apoptosis in human hepatoma HepG2 cells by the rodent peroxisome proliferator and hepatocarcinogen, perfluorooctanoic acid. *Toxicol Appl Pharmacol* 173, 56-64.

Pearce, D.A., Cardillo, T.S., and Sherman, F. (1998). Cyc2p is required for maintaining ionic stability and efficient cytochrome c import and mitochondrial function in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 439, 307-311.

Peddada, N., Sagar, A., Ashish, and Garg, R. (2012). Plasma gelsolin: a general prognostic marker of health. *Med Hypotheses* 78, 203-210.

Perkins, G.A., Tjong, J., Brown, J.M., Poquiz, P.H., Scott, R.T., Kolson, D.R., Ellisman, M.H., and Spiro, G.A. (2010). The micro-architecture of mitochondria at active zones: electron tomography reveals novel anchoring scaffolds and cristae structured for high-rate metabolism. *J Neurosci* 30, 1015-1026.

Petruzzella, V., Tiranti, V., Fernandez, P., Ianna, P., Carrozzo, R., and Zeviani, M. (1998). Identification and characterization of human cDNAs specific to BCS1, PET112, SCO1, COX15, and COX11, five genes involved in the formation and function of the mitochondrial respiratory chain. *Genomics* 54, 494-504.

Phillips, J.D., Schmitt, M.E., Brown, T.A., Beckmann, J.D., and Trumpower, B.L. (1990). Isolation and characterization of QCR9, a nuclear gene encoding the 7.3-kDa subunit 9 of the *Saccharomyces cerevisiae* ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase complex. An intron-containing gene with a conserved sequence occurring in the intron of COX4. *J Biol Chem* 265, 20813-20821.

Piao, L., Li, Y., Kim, S.J., Byun, H.S., Huang, S.M., Hwang, S.K., Yang, K.J., Park, K.A., Won, M., Hong, J., *et al.* (2009). Association of LETM1 and MRPL36 contributes to the regulation of mitochondrial ATP production and necrotic cell death. *Cancer Res* 69, 3397-3404.

Pillar, T., Lang, B.F., Steinberger, I., Vogt, B., and Kaudewitz, F. (1983). Expression of the "split gene" cob in yeast mtDNA. Nuclear mutations specifically block the excision of different introns from its primary transcript. *J Biol Chem* 258, 7954-7959.

Ramabadran, R.S., and Beattie, D.S. (1992). Processing of the intermediate form of the iron-sulfur protein of the BC1 complex to the mature form after import into yeast mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 296, 279-285.

Ramos-Arroyo, M.A., Hualde, J., Ayechu, A., De Meirleir, L., Seneca, S., Nadal, N., and Briones, P. (2009). Clinical and biochemical spectrum of mitochondrial complex III deficiency caused by mutations in the BCS1L gene. *Clin Genet* 75, 585-587.

Reichert, A.S., and Neupert, W. (2004). Mitochondriomics or what makes us breathe. *Trends Genet* 20, 555-562.

Reid, R.A., Moyle, J., and Mitchell, P. (1966). Synthesis of adenosine triphosphate by a protonmotive force in rat liver mitochondria. *Nature* 212, 257-258.

Rescher, U., Ruhe, D., Ludwig, C., Zobiack, N., and Gerke, V. (2004). Annexin 2 is a phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate binding protein recruited to actin assembly sites at cellular membranes. *J Cell Sci* 117, 3473-3480.

Rodel, G. (1986). Two yeast nuclear genes, CBS1 and CBS2, are required for translation of mitochondrial transcripts bearing the 5'-untranslated COB leader. *Curr Genet* 11, 41-45.

Rodel, G. (1997). Translational activator proteins required for cytochrome b synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 31, 375-379.

Rojo, M., Legros, F., Chateau, D., and Lombes, A. (2002). Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J Cell Sci* 115, 1663-1674.

Rostovtseva, T.K., Sheldon, K.L., Hassanzadeh, E., Monge, C., Saks, V., Bezrukov, S.M., and Sackett, D.L. (2008). Tubulin binding blocks mitochondrial voltage-dependent anion channel and regulates respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 18746-18751.

Rousseaux, M.W., Marcogliese, P.C., Qu, D., Hewitt, S.J., Seang, S., Kim, R.H., Slack, R.S., Schlossmacher, M.G., Lagace, D.C., Mak, T.W., *et al.* (2012). Progressive dopaminergic cell loss with unilateral-to-bilateral progression in a genetic model of Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 15918-15923.

Rutter, J., Winge, D.R., and Schiffman, J.D. (2010). Succinate dehydrogenase - Assembly, regulation and role in human disease. *Mitochondrion* 10, 393-401.

Ryan, M.T., and Hoogenraad, N.J. (2007). Mitochondrial-nuclear communications. *Annu Rev Biochem* 76, 701-722.

Saada, A., Edvardson, S., Shaag, A., Chung, W.K., Seigel, R., Miller, C., Jalas, C., and Elpeleg, O. (2012) Combined OXPHOS complex I and IV defect, due to mutated complex I assembly factor C20ORF7. *J Inherit Metab Dis.* 35, 125-131

Saint-Georges, Y., Bonnefoy, N., di Rago, J.P., Chiron, S., and Dujardin, G. (2002). A pathogenic cytochrome b mutation reveals new interactions between subunits of the mitochondrial bc1 complex. *J Biol Chem* 277, 49397-49402.

Sakaguchi, Y., Yoshino, M., Aramaki, S., Yoshida, I., Yamashita, F., Kuhara, T., Matsumoto, I., and Hayashi, T. (1986). Dihydrolipoyl dehydrogenase deficiency: a therapeutic trial with branched-chain amino acid restriction. *Eur J Pediatr* 145, 271-274.

- Sambrook, J. y Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanchez, N.S., Pearce, D.A., Cardillo, T.S., Uribe, S., and Sherman, F. (2001). Requirements of Cyc2p and the porin, Por1p, for ionic stability and mitochondrial integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys* 392, 326-332.
- Santamaria, G., Martinez-Diez, M., Fabregat, I., and Cuezva, J.M. (2006). Efficient execution of cell death in non-glycolytic cells requires the generation of ROS controlled by the activity of mitochondrial H⁺-ATP synthase. *Carcinogenesis* 27, 925-935.
- Scaglia, F., Towbin, J.A., Craigen, W.J., Belmont, J.W., Smith, E.O., Neish, S.R., Ware, S.M., Hunter, J.V., Fernbach, S.D., Vladutiu, G.D., *et al.* (2004). Clinical spectrum, morbidity, and mortality in 113 pediatric patients with mitochondrial disease. *Pediatrics* 114, 925-931.
- Schafer, E., Seelert, H., Reifschneider, N.H., Krause, F., Dencher, N.A., and Vonck, J. (2006). Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem* 281, 15370-15375.
- Schagger, H. (2001). Respiratory chain supercomplexes. *IUBMB Life* 52, 119-128.
- Schagger, H., de Coo, R., Bauer, M.F., Hofmann, S., Godinot, C., and Brandt, U. (2004). Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I. *J Biol Chem* 279, 36349-36353.
- Schagger, H., and Pfeiffer, K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *Embo J* 19, 1777-1783.
- Scheffler (1999). *Mitochondria* (New York, John Wiley&Sons, Inc).
- Scherrer, T., Mittal, N., Janga, S.C., and Gerber, A.P. (2010). A screen for RNA-binding proteins in yeast indicates dual functions for many enzymes. *PLoS One* 5, e15499.
- Schlickum, S., Moghekar, A., Simpson, J.C., Steglich, C., O'Brien, R.J., Winterpacht, A., and Endele, S.U. (2004). LETM1, a gene deleted in Wolf-Hirschhorn syndrome, encodes an evolutionarily conserved mitochondrial protein. *Genomics* 83, 254-261.

Schoppink, P.J., Hemrika, W., Reynen, J.M., Grivell, L.A., and Berden, J.A. (1988). Yeast ubiquinol: cytochrome c oxidoreductase is still active after inactivation of the gene encoding the 17-kDa subunit VI. *Eur J Biochem* 173, 115-122.

Sekito, A., Koide-Yoshida, S., Niki, T., Taira, T., Iguchi-Arigo, S.M., and Ariga, H. (2006). DJ-1 interacts with HIPK1 and affects H₂O₂-induced cell death. *Free Radic Res* 40, 155-165.

Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68, 850-858.

Shi, G., Crivellone, M.D., and Edderkaoui, B. (2001). Identification of functional regions of Cbp3p, an enzyme-specific chaperone required for the assembly of ubiquinol-cytochrome c reductase in yeast mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1506, 103-116.

Smeitink, J., van den Heuvel, L., and DiMauro, S. (2001). The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. *Nat Rev Genet* 2, 342-352.

Smith, P.M., Fox, J.L., and Winge, D.R. (2012). Biogenesis of the cytochrome bc(1) complex and role of assembly factors. *Biochim Biophys Acta* 1817, 276-286.

St-Pierre, J., Buckingham, J.A., Roebuck, S.J., and Brand, M.D. (2002). Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 277, 44784-44790.

Stach, R.W., Garian, N., and Olender, E.J. (1979). Biological activity of the beta nerve growth factor: the effects of various added proteins. *J Neurochem* 33, 257-261.

Stan, T., Brix, J., Schneider-Mergener, J., Pfanner, N., Neupert, W., and Rapaport, D. (2003). Mitochondrial protein import: recognition of internal import signals of BCS1 by the TOM complex. *Mol Cell Biol* 23, 2239-2250.

Starkov, A.A., Fiskum, G., Chinopoulos, C., Lorenzo, B.J., Browne, S.E., Patel, M.S., and Beal, M.F. (2004). Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *J Neurosci* 24, 7779-7788.

Strachan, T., and Read, A.P. (1999). *Human Molecular Genetics 2*, 2nd edn (New York and London).

Suen, D.F., Norris, K.L., and Youle, R.J. (2008). Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev* 22, 1577-1590.

Sun, H.Q., Yamamoto, M., Mejillano, M., and Yin, H.L. (1999). Gelsolin, a multifunctional actin regulatory protein. *J Biol Chem* 274, 33179-33182.

Surguladze, N., Thompson, K.M., Beard, J.L., Connor, J.R., and Fried, M.G. (2004). Interactions and reactions of ferritin with DNA. *J Biol Chem* 279, 14694-14702.

Surmeier, D.J., Guzman, J.N., Sanchez-Padilla, J., Schumacker, P.T. (2011) The role of calcium and mitochondrial oxidant stress in the loss of substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Neuroscience* 198, 221-31

Sutovsky, P., Moreno, R.D., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C., and Schatten, G. (2000). Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos. *Biol Reprod* 63, 582-590.

Suzuki, H., Hosokawa, Y., Nishikimi, M., and Ozawa, T. (1989). Structural organization of the human mitochondrial cytochrome c 1 gene. *J Biol Chem* 264, 1368-1374.

Tahara, E.B., Barros, M.H., Oliveira, G.A., Netto, L.E., and Kowaltowski, A.J. (2007). Dihydrolipoyl dehydrogenase as a source of reactive oxygen species inhibited by caloric restriction and involved in *Saccharomyces cerevisiae* aging. *FASEB J* 21, 274-283.

Taira, T., Saito, Y., Niki, T., Iguchi-Ariga, S.M., Takahashi, K., and Ariga, H. (2004). DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *EMBO Rep* 5, 213-218.

Tamai, S., Iida, H., Yokota, S., Sayano, T., Kiguchiya, S., Ishihara, N., Hayashi, J., Mihara, K., and Oka, T. (2008). Characterization of the mitochondrial protein LETM1, which maintains the mitochondrial tubular shapes and interacts with the AAA-ATPase BCS1L. *J Cell Sci* 121, 2588-2600.

Taylor, R.W., and Turnbull, D.M. (2005). Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet* 6, 389-402.

Terui, Y., Furukawa, Y., Kikuchi, J., and Saito, M. (1995). Apoptosis during HL-60 cell differentiation is closely related to a G0/G1 cell cycle arrest. *J Cell Physiol* *164*, 74-84.

Thomas, K.J., McCoy, M.K., Blackinton, J., Beilina, A., van der Brug, M., Sandebring, A., Miller, D., Maric, D., Cedazo-Minguez, A., and Cookson, M.R. (2011). DJ-1 acts in parallel to the PINK1/parkin pathway to control mitochondrial function and autophagy. *Hum Mol Genet* *20*, 40-50.

Tretter, L., and Adam-Vizi, V. (2004). Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *J Neurosci* *24*, 7771-7778.

Tuppen, H.A., Fehmi, J., Czermin, B., Goffrini, P., Meloni, F., Ferrero, I., He, L., Blakely, E.L., McFarland, R., Horvath, R., *et al.* (2010). Long-term survival of neonatal mitochondrial complex III deficiency associated with a novel BCS1L gene mutation. *Mol Genet Metab* *100*, 345-348.

Tzagoloff, A. (1995). Ubiquinol-cytochrome-c oxidoreductase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol* *260*, 51-63.

Tzagoloff, A., Wu, M.A., and Crivellone, M. (1986). Assembly of the mitochondrial membrane system. Characterization of COR1, the structural gene for the 44-kilodalton core protein of yeast coenzyme QH₂-cytochrome c reductase. *J Biol Chem* *261*, 17163-17169.

Uchida, Y., Ohshima, T., Yamashita, N., Ogawara, M., Sasaki, Y., Nakamura, F., and Goshima, Y. (2009). Semaphorin3A signaling mediated by Fyn-dependent tyrosine phosphorylation of collapsin response mediator protein 2 at tyrosine 32. *J Biol Chem* *284*, 27393-27401.

Ugalde, C., Janssen, R.J., van den Heuvel, L.P., Smeitink, J.A., and Nijtmans, L.G. (2004). Differences in assembly or stability of complex I and other mitochondrial OXPHOS complexes in inherited complex I deficiency. *Hum Mol Genet* *13*, 659-667.

Usui, S., Yu, L., and Yu, C.A. (1990). The small molecular mass ubiquinone-binding protein (QPc-9.5 kDa) in mitochondrial ubiquinol-cytochrome c reductase: isolation, ubiquinone-binding domain, and immunoinhibition. *Biochemistry* *29*, 4618-4626.

- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 44-84.
- Vargas, T., Antequera, D., Ugalde, C., Spuch, C., and Carro, E. (2010). Gelsolin restores A beta-induced alterations in choroid plexus epithelium. *J Biomed Biotechnol* 2010, 805405.
- Vaubel, R.A., Rustin, P., and Isaya, G. (2011). Mutations in the dimer interface of dihydrolipoamide dehydrogenase promote site-specific oxidative damages in yeast and human cells. *J Biol Chem* 286, 40232-40245.
- Vempati, U.D., Han, X., and Moraes, C.T. (2009). Lack of cytochrome c in mouse fibroblasts disrupts assembly/stability of respiratory complexes I and IV. *J Biol Chem* 284, 4383-4391.
- Verkaart, S., Koopman, W.J., van Emst-de Vries, S.E., Nijtmans, L.G., van den Heuvel, L.W., Smeitink, J.A., and Willems, P.H. (2007). Superoxide production is inversely related to complex I activity in inherited complex I deficiency. *Biochim Biophys Acta* 1772, 373-381.
- Visapaa, I., Fellman, V., Vesa, J., Dasvarma, A., Hutton, J.L., Kumar, V., Payne, G.S., Makarow, M., Van Coster, R., Taylor, R.W., *et al.* (2002). GRACILE syndrome, a lethal metabolic disorder with iron overload, is caused by a point mutation in BCS1L. *Am J Hum Genet* 71, 863-876.
- Vogel, R.O., Smeitink, J.A., and Nijtmans, L.G. (2007). Human mitochondrial complex I assembly: a dynamic and versatile process. *Biochim Biophys Acta* 1767, 1215-1227.
- Von Jagow, G., Link, T.A., and Ohnishi, T. (1986). Organization and function of cytochrome b and ubiquinone in the cristae membrane of beef heart mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 18, 157-179.
- Vonck, J., and Schafer, E. (2009). Supramolecular organization of protein complexes in the mitochondrial inner membrane. *Biochim Biophys Acta* 1793, 117-124.
- Wagener, N., Ackermann, M., Funes, S., and Neupert, W. (2011). A pathway of protein translocation in mitochondria mediated by the AAA-ATPase Bcs1. *Mol Cell* 44, 191-202.

Wakabayashi, S., Takao, T., Shimonishi, Y., Kuramitsu, S., Matsubara, H., Wang, T., Zhang, Z., and King, T.E. (1985). Complete amino acid sequence of the ubiquinone binding protein (QP-C), a protein similar to the 14,000-dalton subunit of the yeast ubiquinol-cytochrome c reductase complex. *J Biol Chem* 260, 337-343.

Waldeck-Weiermair, M., Jean-Quartier, C., Rost, R., Khan, M.J., Vishnu, N., Bondarenko, A.I., Imamura, H., Malli, R., and Graier, W.F. (2011). Leucine zipper EF hand-containing transmembrane protein 1 (Letm1) and uncoupling proteins 2 and 3 (UCP2/3) contribute to two distinct mitochondrial Ca²⁺ uptake pathways. *J Biol Chem* 286, 28444-28455.

Wallace, D.C. (2005). A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* 39, 359-407.

Wang, S., and Kaufman, R.J. (2012). The impact of the unfolded protein response on human disease. *J Cell Biol* 197, 857-867.

Wang, Y.P., Qi, M.L., Li, T.T., and Zhao, Y.J. (2012). Two novel mutations in the BCKDHB gene (R170H, Q346R) cause the classic form of maple syrup urine disease (MSUD). *Gene* 498, 112-115.

Wassmer, T., Attar, N., Bujny, M.V., Oakley, J., Traer, C.J., and Cullen, P.J. (2007). A loss-of-function screen reveals SNX5 and SNX6 as potential components of the mammalian retromer. *J Cell Sci* 120, 45-54.

Weidensdorfer, D., Stohr, N., Baude, A., Lederer, M., Kohn, M., Schierhorn, A., Buchmeier, S., Wahle, E., and Huttelmaier, S. (2009). Control of c-myc mRNA stability by IGF2BP1-associated cytoplasmic RNPs. *RNA* 15, 104-115.

Wibrand, F., Ravn, K., Schwartz, M., Rosenberg, T., Horn, N., and Vissing, J. (2001). Multisystem disorder associated with a missense mutation in the mitochondrial cytochrome b gene. *Ann Neurol* 50, 540-543.

Wilson, K.L., and Foisner, R. (2010). Lamin-binding Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a000554.

Wittig, I., and Schagger, H. (2009). Supramolecular organization of ATP synthase and respiratory chain in mitochondrial membranes. *Biochim Biophys Acta* 1787, 672-680.

- Wu, M., and Tzagoloff, A. (1989). Identification and characterization of a new gene (CBP3) required for the expression of yeast coenzyme QH₂-cytochrome c reductase. *J Biol Chem* 264, 11122-11130.
- Xia, D., Yu, C.A., Kim, H., Xia, J.Z., Kachurin, A.M., Zhang, L., Yu, L., and Deisenhofer, J. (1997). Crystal structure of the cytochrome bc₁ complex from bovine heart mitochondria. *Science* 277, 60-66.
- Yang, M., and Trumpower, B.L. (1994). Deletion of QCR6, the gene encoding subunit six of the mitochondrial cytochrome bc₁ complex, blocks maturation of cytochrome c₁, and causes temperature-sensitive petite growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 269, 1270-1275.
- Yeung, K., Seitz, T., Li, S., Janosch, P., McFerran, B., Kaiser, C., Fee, F., Katsanakis, K.D., Rose, D.W., Mischak, H., *et al.* (1999). Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature* 401, 173-177.
- Yin, H.L., Kwiatkowski, D.J., Mole, J.E., and Cole, F.S. (1984). Structure and biosynthesis of cytoplasmic and secreted variants of gelsolin. *J Biol Chem* 259, 5271-5276.
- Yu, L., Deng, K., and Yu, C.A. (1995). Cloning, gene sequencing, and expression of the small molecular mass ubiquinone-binding protein of mitochondrial ubiquinol-cytochrome c reductase. *J Biol Chem* 270, 25634-25638.
- Yu, L., Tso, S.C., Shenoy, S.K., Quinn, B.N., and Xia, D. (1999). The role of the supernumerary subunit of *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome bc₁ complex. *J Bioenerg Biomembr* 31, 251-257.
- Zanna, C., Ghelli, A., Porcelli, A.M., Karbowski, M., Youle, R.J., Schimpf, S., Wissinger, B., Pinti, M., Cossarizza, A., Vidoni, S., *et al.* (2008). OPA1 mutations associated with dominant optic atrophy impair oxidative phosphorylation and mitochondrial fusion. *Brain* 131, 352-367.
- Zara, V., Conte, L., and Trumpower, B.L. (2009). Evidence that the assembly of the yeast cytochrome bc₁ complex involves the formation of a large core structure in the inner mitochondrial membrane. *Febs J* 276, 1900-1914.

Zara, V., Palmisano, I., Conte, L., and Trumpower, B.L. (2004). Further insights into the assembly of the yeast cytochrome bc1 complex based on analysis of single and double deletion mutants lacking supernumerary subunits and cytochrome b. *Eur J Biochem* 271, 1209-1218.

Zhang, L., Shimoji, M., Thomas, B., Moore, D.J., Yu, S.W., Marupudi, N.I., Torp, R., Torgner, I.A., Ottersen, O.P., Dawson, T.M., *et al.* (2005). Mitochondrial localization of the Parkinson's disease related protein DJ-1: implications for pathogenesis. *Hum Mol Genet* 14, 2063-2073.

Zhang, Z., Huang, L., Shulmeister, V.M., Chi, Y.I., Kim, K.K., Hung, L.W., Crofts, A.R., Berry, E.A., and Kim, S.H. (1998). Electron transfer by domain movement in cytochrome bc1. *Nature* 392, 677-684.

Zhou, M., Sandercock, A.M., Fraser, C.S., Ridlova, G., Stephens, E., Schenauer, M.R., Yokoi-Fong, T., Barsky, D., Leary, J.A., Hershey, J.W., *et al.* (2008). Mass spectrometry reveals modularity and a complete subunit interaction map of the eukaryotic translation factor eIF3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 18139-18144.

Zollner, A., Rodel, G., and Haid, A. (1992). Molecular cloning and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* CYT2 gene encoding cytochrome-c1-heme lyase. *Eur J Biochem* 207, 1093-1100.

Zollner, A., Rodel, G., and Haid, A. (1994). Expression of the *Saccharomyces cerevisiae* CYT2 gene, encoding cytochrome c1 heme lyase. *Curr Genet* 25, 291-298.

ANEXOS

Durante la realización del presente trabajo, se han publicado los siguientes artículos:

Cellular pathophysiological consequences of BCS1L mutations in mitochondrial complex III enzyme deficiency.

Morán M*, **Marín-Buera L***, Gil-Borlado MC, Rivera H, Blázquez A, Seneca S, Vázquez-López M, Arenas J, Martín MA, Ugalde C.

Hum Mutat. 2010 Aug;31(8):930-41.

(***Primera autoría compartida**)

Impact of the mitochondrial genetic background in complex III deficiency.

Gil Borlado MC, Moreno Lastres D, Gonzalez Hoyuela M, Moran M, Blazquez A, Pello R, **Marín Buera L**, Gabaldon T, Garcia Peñas JJ, Martín MA, Arenas J, Ugalde C. PLoS One. 2010 Sep 17;5(9). pii: e12801.

Mitochondrial respiratory chain dysfunction: implications in neurodegeneration.

Morán M, Moreno-Lastres D, **Marín-Buera L**, Arenas J, Martín MA, Ugalde C.

Free Radic Biol Med. 2012 Aug 1;53(3):595-609.