

Universidad Autónoma de Madrid

Departamento de Bioquímica



**IDENTIFICACIÓN DE LA GELSOLINA COMO POSIBLE  
BIOMARCADOR DE LAS ENFERMEDADES MITOCONDRIALES DEL  
SISTEMA OXPHOS**

Tesis Doctoral

Alberto García Bartolomé

Madrid 2016



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**IDENTIFICACIÓN DE LA GELSOLINA COMO POSIBLE  
BIOMARCADOR DE LAS ENFERMEDADES MITOCONDRIALES DEL  
SISTEMA OXPHOS**

Memoria presentada por el Licenciado en Biotecnología

**Alberto García Bartolomé**

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

Directora de Tesis:

**Dra. Cristina Ugalde Bilbao**

Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (i+12)



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

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

CERTIFICA:

Que Don Alberto García Bartolomé, con DNI 71278956-R, licenciado en Biotecnología, ha realizado bajo mi dirección en el Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (i+12) de Madrid, el trabajo titulado:

**IDENTIFICACIÓN DE LA GELSOLINA COMO POSIBLE BIOMARCADOR DE LAS  
ENFERMEDADES MITOCONDRIALES DEL SISTEMA OXPHOS**

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 28 de Noviembre de 2016

Dra. Cristina Ugalde Bilbao

Directora de Tesis

Laboratorio de Enfermedades Raras: Mitocondriales y Neuromusculares

Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (i+12)

Avenida de Córdoba s/n

28041 Madrid



Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a la concesión de una ayuda predoctoral de Formación en Investigación en Salud (PFIS) (expediente número FI12/00071) por parte del Instituto de Salud Carlos III, asignada a Don Alberto García Bartolomé. El presente trabajo ha sido financiado por los proyectos de investigación del Instituto de Salud Carlos III (números FIS 11-00182 y FIS 14-00209), así como por el proyecto del *National Institute of General Medical Sciences* (NIGMS-NIH, número 1R01GM105781-01) concedidos a la Dra. Cristina Ugalde Bilbao.





***A toda mi familia, en especial a mis padres y  
a mi hermana Nuria***



## **AGRADECIMIENTOS.**

*En primer lugar, me gustaría agradecer a mi directora de tesis, la Dra. Cristina Ugalde, el haberme dado la oportunidad de incorporarme a su grupo durante el proyecto de máster y por haberme ofrecido y ayudado a conseguir la beca pFIS, sin la cual este trabajo no habría sido posible. También agradecerle la formación científica y la confianza que me ha brindado estos casi 5 años. En segundo lugar, quiero dar las gracias al director del grupo de "Mitocondriales" el Dr. Miguel Ángel Martín Casanueva y al director de la institución el Dr. Joaquín Arenas Barbero, por permitirme ambos formar parte del Instituto de Investigación del Hospital 12 de Octubre de Madrid, pero sobre todo por su cercanía y ayuda siempre que la he necesitado.*

*Esta tesis es el broche de oro a un largo camino andado, en el que han sido muchas las vivencias y muchas las personas que me han acompañado y ayudado a recorrerlo. A ellas les quiero dedicar estas líneas de agradecimiento.*

*Todo comenzó siendo yo un chico de 16 años, con una hermana mayor estudiando ciencias químicas y unos muy buenos profesores de biología y química en el colegio. Todos ellos hicieron que se despertara en mí el interés por el mundo de la ciencia, aunque también creo que ayudó que no se me diera nada bien el dibujo técnico, la plástica y la música...eso era algo que no había heredado. Por haber estado conmigo desde el principio, a los primeros que quiero dar las gracias es a mis amigos de toda la vida. A los del colegio (Marcos, Edu, David, Guerrero, Barbero, etc.) y a los del fútbol (Lechu, Polanco, Tito, Cueva, Ido, Isma, Juez, Xabi, Mario, Dela, Marti y el resto de Ghetto), porque el Vadillos es un sentimiento. Todos vosotros habéis sido actores principales en este proceso. Hemos crecido y vivido muchas cosas juntos y aunque la vida nos destine a diferentes lugares, con vosotros siempre tendré la sensación de que por mucha que sea la distancia que nos separe o el tiempo que estemos sin vernos, la amistad que nos une seguirá ahí, inquebrantable. Siempre que vuelvo a Burgos me encanta juntarme con vosotros, además ahora ya sí que sí me vais a tener que llamar doctor y tratarme de usted ;).*

*Después del colegio, mi interés por la ciencia me llevó a aterrizar en León para estudiar Biotecnología. Si la etapa universitaria ya de por sí es uno de los mejores momentos de la vida, el haberla vivido en una residencia de estudiantes como "Las Sanchas" ha conseguido que sea inolvidable. Por ello, quiero agradecer a mis amigos de la resi y honorables miembros de la "black list" (Kaste, Sergio, Cubi, Gigas, Fede, Pablo, Landa, Pj, Juanjo, etc.), el haber hecho que los 5 años de la carrera se me pasaran como si hubieran sido 5 días y por hacerme recordar con una gran sonrisa los buenos momentos vividos todos juntos en una gran ciudad como León. Esto va por vosotros y por esas "regiones", cenas de navidad, partidillos de fútbol, viajes de la resi, espichas y por todas esas quedadas que nos quedan. De esta etapa tampoco puedo olvidarme de mis*

*grandes compañeras de clase y amigas, Esther y Rocío (Estherilla y Casillas para mí). Ellas dos, Elvi y yo, hicimos y seguimos siendo un gran equipo!!*

*Después de la etapa universitaria, me tocó enfrentarme al caos de Madrid y a la vida del investigador, la cual es emocionante e ilusionante aunque no exenta de dificultades. Pero todas ellas se superan fácilmente si tienes unos grandísimos compañeros como los que yo he tenido, porque las "fiestitas" en el labo, las salidas a tapapiés, a la fiesta del cine, a tomar cañas,...han contribuido a llevarme un gran recuerdo de todos ellos. Especialmente quiero darles las gracias a Rafa y Teresa, juntos hemos formado un gran equipo durante estos cuatro años, siempre unidos en las duras y en las maduras. Vosotros habéis conseguido que el día a día haya sido mucho más fácil y divertido y que los buenos momentos hayan ganado por goleada a los malos (sois unos monstruos!!). También quiero agradecer a las ELAs, Alexandra y Gabriela, porque han sido partícipes de los grandes momentos de risas. Siempre recordaré que fuisteis las primeras compañeras en acogerme (y bautizarme como pychon) cuando el laboratorio no tenía ni poyatas, pero aún así nos apañábamos perfectamente. Aunque he de decir que a un mesetario como yo le costó un poco acostumbrarse a la jerga argentina, menos mal que Xandra me hacía de traductora. También quiero agradecer de manera sincera a Laura su amabilidad y su predisposición a ayudarme siempre que lo he necesitado. Además, sin las palabras claras de las Rufián el laboratorio no sería lo mismo. Gracias a Elena, el último fichaje del "cuquitim", por estar siempre dispuesta a ayudarme, aunque lo de que te olvides siempre el "timer" no sé si agradecértelo. También darle las gracias a Ana, reciente incorporación en el labo, por ayudarme con los últimos experimentos. Por tu saber estar, personalidad y valía profesional, te auguro un gran futuro.*

*Gracias a Lorena, mi primera profesora en el laboratorio, por sus enseñanzas y dedicación durante mi proyecto de máster. Mil y una gracias a la Dra. María Morán por haber respondido con gran simpatía y una sonrisa las mil preguntas que le habré hecho durante estos 5 años, además de ayudarme con unos cuantos experimentos. Agradecer especialmente a Aitor su ayuda con los análisis bioinformáticos y por responder a mis dudas tecnológicas siempre con tan buena predisposición. Gracias a Alberto Blázquez por tener la paciencia de ayudarme a recabar y explicarme las clínicas de los pacientes, además de darme valiosos consejos. Gracias a Inés por sus buenas prácticas proteómicas y su ayuda con los geles, pero sobre todo agradecerle que siempre me haya ayudado con gran alegría y sentido del humor. Gracias a las chicas del laboratorio de al lado (Pilar, Charo y Sara), porque con su orden y concierto hacen que el laboratorio funcione y con las comidas que organizan no dejan que pasemos hambre. Gracias a Dani por su ayuda con los protocolos de PCR. Gracias al Dr. Francisco Martínez por sus buenos consejos sobre la vida, aunque todavía estoy esperando que monte un partidillo de fútbol con las respectivas cañas de*

*después. También quiero agradecer a las pediatras y a la Dra. Cristina Domínguez el habernos facilitado las muestras de los pacientes para poder llevar a cabo este trabajo.*

*Todo buen proyecto necesita unos pilares fundamentales y ha llegado el momento de mencionarlos y agradecerse. Primero agradecer a toda mi extensa familia, desde mis abuelos hasta mis primos más pequeños. Sé que todos están o estarían muy orgullosos de su Albertete. En especial quiero mencionar a mi primo mayor Edu, mi primer amigo, y a mi tío Alberto (mi tocayo) que seguro que estará muy feliz por esto. Muchísimas gracias a Nuria, por ser tan buena hermana (excepto en tus despertares) y cuidarme todavía mejor que a un hermano pequeño. Por todo lo que vales; has sido, eres y serás siempre un referente para mí en la vida. Mil millones de gracias a mis padres, porque a ellos les debo todo. A ellos y a mi hermana les dedico este trabajo. Gracias a mi padre porque en su mirada reconozco el orgullo que siente por los logros de sus dos hijos, sin tu exigencia y dedicación hacia nosotros no hubieran sido posibles. Gracias a mi madre, ejemplo de bondad, solidaridad con los de alrededor y saber hacer en la vida. Todo este largo proceso has estado ahí, unas veces codo con codo y otras apoyándome en la distancia. Como cuando nos llevabas al colegio de pequeños, que íbamos parte del camino de la mano, pero el último tramo nos adelantábamos porque queríamos hacerlo solos. Aún así, tú siempre seguías estando ahí, detrás de nosotros, para sostenernos si lo necesitábamos.*

*Por último, agradecer muy especialmente a ese pilar fundamental que se empezó a construir unos años atrás. Elvira, cortas se quedan las palabras para mostrarte el agradecimiento que te debo. A ti no te he dedicado la tesis porque desde la primera coma hasta el último punto también es tuya. Mil gracias por conocerme y entenderme tan bien. Juntos hemos vivido el día a día en Madrid con sus buenos y malos momentos, pero con tu apoyo constante, tu eterna sonrisa y tu alegría por las pequeñas cosas (un pisolabis, un vino juntos, una cena rica en casa, un desayuno o un paseo por el parque), todo ha sido realmente fácil, divertido y emocionante. Por el camino que hemos andado y el que nos queda por recorrer.*



## **RESUMEN / SUMMARY**

---





Las mitocondrias son orgánulos intracelulares cuya principal función es generar energía celular en forma de adenosín trifosfato (ATP), a partir de un proceso conocido como fosforilación oxidativa (OXPHOS). El sistema OXPHOS tiene un origen bi-genómico y está formado por cinco complejos enzimáticos multiproteicos, que catalizan la síntesis de ATP acoplada a un potencial electroquímico de protones en la membrana interna mitocondrial. Las enfermedades que afectan al sistema OXPHOS constituyen la primera causa de errores congénitos del metabolismo energético y están asociados a un grupo heterogéneo de enfermedades neuromusculares o multisistémicas de severidad variable, que pueden manifestarse tanto en la infancia como en adultos. Su variabilidad genética, clínica y fenotípica, junto con la inexistencia de biomarcadores suficientemente específicos, dificulta enormemente el diagnóstico de las enfermedades mitocondriales OXPHOS.

Este trabajo se ha centrado en la identificación, validación y caracterización funcional de nuevos biomarcadores proteicos de enfermedades mitocondriales del sistema OXPHOS. Estudios previos revelaron que en células con un déficit enzimático del complejo III, se producía un aumento significativo de una proteína implicada en el mantenimiento del citoesqueleto: la Gelsolina (GSN) citosólica (Marín-Buera *et al.*, 2015). Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la GSN se acumula específicamente en las mitocondrias de células humanas como respuesta a las alteraciones enzimáticas de los complejos de la cadena respiratoria. La GSN se localiza en la membrana externa mitocondrial, donde forma parte de un complejo de 150 kDa e interactúa con la proteína del poro de permeabilidad de membrana VDAC1. La disminución de los niveles de GSN conduce a un aumento específico de la dimerización de VDAC1 y de la liberación del Citocromo *c* mitocondrial al citosol, sin alterar las estructuras supramoleculares de VDAC1 ni la estabilidad de los complejos OXPHOS. Además, el tratamiento con estaurosporina provoca la proteólisis de la GSN específicamente en la mitocondria de células con déficits enzimáticos de cadena respiratoria.

Los niveles de la isoforma plasmática de la GSN disminuyen significativamente, en respuesta a déficits enzimáticos de cadena respiratoria, tanto en modelos celulares como en muestras sanguíneas de pacientes con enfermedad mitocondrial. Por ello, se propone que la ratio entre los niveles de GSN mitocondrial y plasmática podría servir como un nuevo indicador de los cambios moleculares asociados a la disfunción de la cadena respiratoria mitocondrial.



Mitochondria are intracellular organelles that generate most of the cellular energy in the form of adenosine triphosphate (ATP) in a process known as oxidative phosphorylation (OXPHOS). The OXPHOS system, of dual genetic origin, is located in the mitochondrial inner membrane. It consists of five multiprotein enzyme complexes, which are responsible for the transfer of electrons coupled to the generation of the proton gradient in the mitochondrial intermembrane space, which is used by the H<sup>+</sup>-ATP synthase to produce ATP. The OXPHOS system enzyme deficiencies are the leading cause of the inborn errors of energy metabolism. They comprise a heterogeneous group of neuromuscular and multisystemic disorders of variable severity that are present in both childhood and adulthood. Currently, there are very limited means for objectively monitoring disease progression, and non invasive ways to measure respiratory chain disorders based on the use of specific biomarkers are not currently available. Consequently, the diagnosis of these diseases can be challenging.

This work has focused on the identification, validation and functional characterization of novel protein biomarkers for mitochondrial diseases. Previous studies showed that the cytosolic isoform of Gelsolin (GSN), a cytoskeleton maintenance protein, was significantly overexpressed in complex III-deficient cells (Marín-Buera *et al.*, 2015). In this work, we show that the increase in GSN levels occurs specifically in the mitochondria from human cells with respiratory chain enzyme deficiencies. Gelsolin is located in the mitochondrial outer membrane, where it forms a ~150 kDa complex and it interacts with the voltage-dependent anion channel protein 1 (VDAC1). GSN downregulation led to the specific accumulation of VDAC1 dimers and to the mitochondrial Cytochrome *c* release into the cytosol, without a major effect on the levels of larger VDAC1-containing complexes or on the stability of the OXPHOS system. Moreover, cytosolic GSN is specifically proteolyzed in the mitochondrial fraction from OXPHOS-deficient cells upon staurosporine treatment.

In addition, the levels of the plasma isoform of GSN were significantly decreased in the extracellular media from cells with OXPHOS deficiencies and in blood samples from patients biochemically and/or genetically diagnosed with mitochondrial disease. Therefore, the ratio between mitochondrial and plasma GSN is proposed as a novel indicator of the molecular alterations associated with mitochondrial respiratory chain dysfunction.



# ÍNDICES

---



<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>7</b>
<b>1. LA MITOCONDRIA: FUNCIÓN, ESTRUCTURA Y MORFOLOGÍA. ....</b>	<b>9</b>
<b>2. GENOMA MITOCONDRIAL. ....</b>	<b>10</b>
<b>3. SISTEMA DE FOSFORILACIÓN OXIDATIVA (OXPHOS). ....</b>	<b>12</b>
<b>4. ENFERMEDADES MITOCONDRIALES OXPHOS. ....</b>	<b>14</b>
4.1 Patología mitocondrial asociada al complejo I.....	16
4.1.1 Mutaciones en el ADNmt. ....	16
4.1.2 Mutaciones en el ADN nuclear.....	16
4.2 Patología mitocondrial asociada al complejo II.....	17
4.3 Patología mitocondrial asociada al complejo III.....	17
4.3.1 Mutaciones en el ADNmt: gen <i>MT-CYB</i> .....	18
4.3.2 Mutaciones en el ADN nuclear.....	18
4.4 Patología mitocondrial asociada al complejo IV. ....	19
4.4.1 Mutaciones en el ADNmt. ....	19
4.4.2 Mutaciones en el ADN nuclear.....	19
<b>5. DIAGNÓSTICO Y BIOMARCADORES DE LAS ENFERMEDADES MITOCONDRIALES. ....</b>	<b>20</b>
<b>6. INTERACCIÓN MITOCONDRIA-CITOESQUELETO.....</b>	<b>21</b>
<b>7. GELSOLINA (GSN). ....</b>	<b>22</b>
7.1 Genética. ....	22
7.2 Estructura de la gelsolina y relación funcional con el citoesqueleto. ....	24
7.3 Gelsolina y apoptosis.....	26
7.4 Otras funciones de la gelsolina. ....	26
7.5 Gelsolina y enfermedad. ....	27
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
<b>1. PACIENTES Y CONTROLES. ....</b>	<b>35</b>
1.1 Muestras celulares. ....	35

## ÍNDICE GENERAL

1.1.1 Fibroblastos de pacientes con déficit enzimático del complejo III. ....	35
1.1.2 Cíbridos transmitocondriales. ....	36
1.2 Muestras sanguíneas. ....	38
<b>2. MATERIALES. ....</b>	<b>39</b>
2.1 Reactivos, soluciones y tampones. ....	39
2.2 Vectores de expresión génica. ....	39
2.3 Oligonucleótidos. ....	39
2.4 ARNs pequeños de interferencia o de silenciamiento (siRNAs). ....	40
2.5 Anticuerpos. ....	40
<b>3. MÉTODOS. ....</b>	<b>42</b>
3.1 Obtención del plasma a partir de muestras sanguíneas. ....	42
3.2 Cultivos celulares. ....	42
3.2.1 Tratamiento de cultivos celulares con antimicina A. ....	43
3.2.2 Tratamiento de cultivos celulares con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	43
3.2.3 Tratamiento de cultivos celulares con estaurosporina. ....	43
3.3 Medida del consumo de O <sub>2</sub> en células. ....	43
3.4 Medidas espectrofotométricas de las actividades enzimáticas de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial. ....	44
3.4.1 Medida de la actividad succinato deshidrogenasa (Complejo II). ....	44
3.4.2 Medida de la actividad citocromo c reductasa (Complejo III). ....	45
3.4.3 Medida de la actividad citocromo c oxidasa (Complejo IV). ....	45
3.4.4 Normalización de las actividades de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial. Medida de la actividad citrato sintasa. ....	45
3.5 Determinación de especies reactivas del oxígeno (ROS) en células vivas, mediante el uso de la sonda <i>Amplex Red</i> . ....	46
3.6 Inmunofluorescencia. ....	46
3.7 Sobreexpresión de la Gelsolina. ....	47
3.7.1 Amplificación de plásmidos mediante transformación y cultivo bacteriano. ....	47



3.7.2 Verificación de la presencia del ADNc de <i>GSN</i> en el plásmido mediante PCR y electroforesis en geles de agarosa.....	48
3.7.3 Transfección de plásmidos.....	49
3.8 Silenciamiento del ARN mensajero de <i>GSN</i> . ....	49
3.9 Purificación de proteínas.....	50
3.9.1 Fraccionamiento subcelular.....	50
3.9.2 Purificación de las mitocondrias.....	50
3.9.3 Localización submitocondrial de proteínas mediante tratamiento con proteinasa K y detergente Tritón X-100.....	51
3.9.4 Purificación de proteínas secretadas al medio extracelular (secretomas).....	51
3.9.5 Procesamiento de extractos proteicos celulares.....	52
3.10 ELISA.....	52
3.11 Inmunoprecipitación.....	52
3.11.1 Inmunoprecipitación mediante el uso de una fase sólida inmunoabsorbente (proteínas A o G unidas a agarosa).....	53
3.11.2 Inmunoprecipitación mediante el uso de anticuerpos unidos covalentemente a una fase sólida localizada en una columna ( <i>kit</i> comercial de co-inmunoprecipitación (Pierce)). .....	54
3.12 <i>Western blot</i> .....	55
3.12.1 Separación de proteínas mediante electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	55
3.12.2 Transferencia de las proteínas separadas en los geles de acrilamida a filtros de nitrocelulosa e inmunodetección directa.....	55
3.13 Electroforesis azul nativa ( <i>Blue Native Electrophoresis</i> , BNE).....	56
3.13.1 Enriquecimiento de fracciones mitocondriales a partir de cultivos celulares mediante tratamiento con digitonina.....	56
3.13.2 Preparación de muestras para ensayos de BN-PAGE.....	56
3.13.3 Electroforesis bidimensional azul nativa (2D-BN/SDS-PAGE).....	57
3.13.4 Ensayos de actividad en gel del complejo I (IGA: <i>In Gel Activity Assay</i> ).....	58

## ÍNDICE GENERAL

3.14 Técnicas proteómicas.....	59
3.14.1 Electroforesis diferencial bidimensional en gel 2D-DIGE ( <i>Difference Gel Electrophoresis</i> ).....	59
3.14.2 Identificación de proteínas por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS). ....	59
3.14.2.1 Preparación de las muestras. ....	59
3.14.2.2 Análisis LC-MS/MS ( <i>LTQ OrbiTRAP VELOS</i> ).....	59
3.14.2.3 Identificación de proteínas.....	60
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>63</b>
<b>1. LOS NIVELES DE GELSOLINA CITOSÓLICA AUMENTAN EN LA MITOCONDRIA COMO RESPUESTA A LOS DÉFICITS ENZIMÁTICOS DE LA CADENA RESPIRATORIA. ....</b>	<b>65</b>
1.1 La expresión de la Gelsolina citosólica aumenta significativamente en fibroblastos de pacientes con déficit enzimático del complejo III asociado a mutaciones en <i>BCS1L</i> . ....	65
1.2 Los niveles de Gelsolina aumentan preferentemente en las mitocondrias de fibroblastos con mutaciones en <i>BCS1L</i> frente a fibroblastos control. ....	65
1.3 La colocalización mitocondrial de la Gelsolina aumenta en fibroblastos con mutaciones en <i>BCS1L</i> respecto a los controles.....	66
1.4 Los niveles de Gelsolina aumentan en las mitocondrias de cíbridos con déficit enzimático del complejo III asociado a mutaciones en <i>MT-CYB</i> .....	67
1.5 Los niveles de Gelsolina aumentan en las mitocondrias de fibroblastos control y de células 143B-TK <sup>-</sup> tratadas con antimicina A. ....	68
1.5.1 Análisis en fibroblastos control tratados con antimicina A.....	69
1.5.2 Análisis en células 143B-TK <sup>-</sup> tratadas con antimicina A. ....	73
1.6 Los niveles de GSN aumentan en la mitocondria en respuesta a distintos déficits enzimáticos de la cadena respiratoria.....	74
1.7 Análisis de posibles mecanismos moleculares desencadenantes del aumento de la Gelsolina en la mitocondria.....	75
1.7.1 El aumento de los niveles de peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), no desencadena el aumento de Gelsolina en la mitocondria. ....	76

1.7.2 La inducción de la apoptosis por estaurosporina no causa un aumento de los niveles de Gelsolina en la mitocondria.....	78
<b>2. LOS NIVELES DE GELSOLINA PLASMÁTICA DISMINUYEN COMO RESPUESTA A LOS DÉFICITS ENZIMÁTICOS DE LA CADENA RESPIRATORIA.....</b>	<b>80</b>
2.1 Diferenciación de las isoformas secretada y citosólica de la GSN. ....	80
2.2 Los niveles de Gelsolina secretada disminuyen en el medio extracelular de modelos celulares con déficit enzimático de cadena respiratoria.....	81
2.2.1 Análisis de los niveles de Gelsolina secretada por fibroblastos de pacientes con mutaciones en <i>BCS1L</i> . ....	81
2.2.2 Análisis de los niveles de Gelsolina secretada en fibroblastos control tratados con antimicina A.....	82
2.2.3 Análisis de los niveles de Gelsolina secretada en cíbridos transmitocondriales con déficits enzimáticos de cadena respiratoria.....	83
2.3 Relación entre la Gelsolina presente en la mitocondria y la Gelsolina plasmática en modelos celulares de disfunción de cadena respiratoria. ....	84
2.4 Los niveles de Gelsolina plasmática disminuyen significativamente en el plasma sanguíneo de pacientes con patología mitocondrial. ....	86
2.4.1 Análisis de los niveles de Gelsolina plasmática en pacientes pediátricos.....	86
2.4.2 Análisis de los niveles de Gelsolina plasmática en pacientes adultos.....	89
<b>3. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA GELSOLINA EN MODELOS CELULARES DE ENFERMEDAD MITOCONDRIAL.....</b>	<b>94</b>
3.1 La Gelsolina citosólica se localiza en la membrana externa mitocondrial. ....	94
3.2 La Gelsolina forma parte de un complejo de ~150 kDa en la mitocondria, cuyos niveles aumentan en respuesta a déficits enzimáticos de la cadena respiratoria.....	94
3.2.1 Composición del complejo de la Gelsolina mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas ( <i>LTQ OrbitRAP VELOS</i> ). ....	95
3.3 La Gelsolina citosólica interacciona con VDAC en la membrana externa mitocondrial. .	107
3.3.1 Gelsolina y VDAC1 interaccionan en fibroblastos control y de pacientes con mutaciones en <i>BCS1L</i> . ....	107
3.3.2 Gelsolina y VDAC1 interaccionan en cíbridos control y CYB-KO. ....	107

## ÍNDICE GENERAL

3.4 La inhibición de la expresión de la Gelsolina no influye sobre la estabilidad de VDAC1.	109
3.5 El silenciamiento de <i>GSN</i> induce la acumulación de dímeros de VDAC1.....	109
<b>3.6 La inhibición de la expresión de la Gelsolina favorece la liberación del Citocromo c mitocondrial al citoplasma.....</b>	<b>111</b>
3.7 Relación funcional entre la Gelsolina y el sistema OXPPOS.....	112
3.7.1 Silenciamiento de la Gelsolina en los cíbridos ND2-KD.....	112
3.7.2 Silenciamiento de la Gelsolina en los cíbridos CYB-KO. ....	113
3.7.3 Silenciamiento de la Gelsolina en los cíbridos COX1-KO.....	113
3.7.4 Efecto de la sobreexpresión de la Gelsolina sobre el sistema OXPPOS de células control 143B-TK y HEK293T. ....	113
<b>3.8 Implicación de la Gelsolina en la mitocondria en el proceso de apoptosis inducida por estaurosporina. ....</b>	<b>118</b>
3.8.1 La Gelsolina se proteoliza específicamente en la mitocondria de los cíbridos mutantes CYB-KO tratados con estaurosporina.....	119
3.8.2 El complejo de la Gelsolina se degrada en los cíbridos control y mutantes CYB-KO tratados con estaurosporina. ....	121
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>123</b>
<b>1. LOS NIVELES DE GELSOLINA CITOSÓLICA AUMENTAN EN LA MITOCONDRIA COMO RESPUESTA A DÉFICITS ENZIMÁTICOS DE LA CADENA RESPIRATORIA. ....</b>	<b>125</b>
<b>2. IMPLICACIÓN FUNCIONAL DE LA GELSOLINA EN LA MITOCONDRIA. ....</b>	<b>129</b>
<b>3. LOS NIVELES DE GELSOLINA PLASMÁTICA DISMINUYEN EN RESPUESTA A LOS DÉFICITS ENZIMÁTICOS DE LA CADENA RESPIRATORIA. ....</b>	<b>133</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>134</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>134</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>134</b>

**FIGURAS**

Figura 1. Visión general de los procesos relacionados con la mitocondria. .... 10

Figura 2. Representación del ADN mitocondrial (ADNmt) humano. .... 11

Figura 5. Estructura del ADN Complementario (ADNc) para las isoformas citosólica y plasmática de la Gelsolina humana..... 23

Figura 6. Estructura de la gelsolina. .... 24

Figura 7. Funcionamiento de la gelsolina sobre los filamentos de actina. .... 25

Figura 8. Esquema de la medida de la actividad del Complejo II..... 44

Figura 9. Esquema de la medida de la actividad del Complejo III..... 45

Figura 10. Esquema de la medida de la actividad del Complejo IV..... 45

Figura 11. Esquema de la medida de la actividad citrato sintasa. .... 46

Figura 12. Electroforesis bidimensional azul nativa..... 58

Figura 13. Expresión diferencial de la GSN entre fibroblastos control y mutados en *BCS1L*..... 66

Figura 14. Niveles de GSN en fraccionamientos subcelulares de fibroblastos control y con mutaciones en *BCS1L*. .... 67

Figura 15. La GSN colocaliza parcialmente con las mitocondrias de fibroblastos mutados en *BCS1L*..... 68

Figura 16. Niveles de GSN en lisados celulares y fracciones mitocondriales de híbridos control y mutantes *CYB-KO* con un déficit enzimático del complejo III asociado a mutaciones en *MT-CYB*. 69

Figura 17. Funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial en fibroblastos control tratados con antimicina A..... 70

Figura 18. Ensamblaje de los complejos y supercomplejos de la cadena respiratoria en fibroblastos control tratados con antimicina A..... 71

Figura 19. Niveles de GSN en lisados celulares y fracciones mitocondriales de los fibroblastos control tratados con concentraciones crecientes de antimicina A..... 72

Figura 20. Localización mitocondrial de la GSN en fibroblastos control tratados con antimicina A. .... 73

Figura 21. Niveles de GSN en lisados celulares y fracciones mitocondriales de células 143B-TK tratadas con concentraciones crecientes de antimicina A durante 24 y 48 horas. .... 74

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 22. Niveles de GSN en lisados celulares y fracciones mitocondriales de híbridos con diferentes tipos de déficits enzimáticos de cadena respiratoria. ....	76
Figura 23. Niveles de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en híbridos transmitocondriales con déficits enzimáticos de cadena respiratoria. ....	77
Figura 24. Niveles de GSN en lisados celulares y fracciones mitocondriales de células 143B-TK tratadas con concentraciones crecientes de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	78
Figura 25. Niveles de GSN en fracciones subcelulares de híbridos control tratados con estaurosporina. ....	79
Figura 26. Isoformas de la GSN en híbridos CYB-KO y control. ....	81
Figura 27. Niveles de GSN secretada por fibroblastos con mutaciones en <i>BCS1L</i> respecto a fibroblastos control. ....	82
Figura 28. Niveles de GSN secretada en fibroblastos control C1 tratados con antimicina A. ....	83
Figura 29. Niveles de GSN secretada por híbridos transmitocondriales con déficits enzimáticos de cadena respiratoria. ....	84
Figura 30. Relación mGSN/pGSN en modelos celulares con déficits enzimáticos de la cadena respiratoria. ....	85
Figura 31. Niveles de GSN plasmática en pacientes pediátricos con enfermedad mitocondrial OXPHOS respecto a individuos sanos. ....	90
Figura 32. Niveles de GSN plasmática en muestras de pacientes adultos con enfermedad mitocondrial OXPHOS respecto a individuos control. ....	93
Figura 33. Localización submitocondrial de la GSN en híbridos control y CYB-KO. ....	95
Figura 34. Caracterización del complejo GSN en la mitocondria. ....	96
Figura 35. BN-PAGE de células HEK293T que sobreexpresan la GSN unida a Myc-DDK. ....	97
Figura 36. Interacción entre GSN y VDAC1 en mitocondrias purificadas de fibroblastos control y mutados en <i>BCS1L</i> . ....	108
Figura 37. Interacción entre GSN y VDAC1 en mitocondrias de híbridos control y mutantes en el complejo III (CYB-KO). ....	108
Figura 38. Niveles de VDAC1 en híbridos transmitocondriales silenciados en <i>GSN</i> . ....	110
Figura 39. Niveles de los complejos de VDAC1 en híbridos control y CYB-KO. ....	111

Figura 40. Liberación del Citocromo <i>c</i> mitocondrial al citoplasma en cíbridos control y mutantes CYB-KO silenciados en <i>GSN</i> . .....	112
Figura 41. Niveles de los complejos y supercomplejos del sistema OXPHOS en cíbridos ND2-KD y células 143B-TK <sup>-</sup> silenciadas en <i>GSN</i> . .....	114
Figura 42. Niveles de los complejos y supercomplejos del sistema OXPHOS en cíbridos control y CYB-KO silenciados en <i>GSN</i> . .....	115
Figura 43. Niveles de los complejos y supercomplejos del sistema OXPHOS en cíbridos control y COX1-KO silenciados en <i>GSN</i> . .....	116
Figura 44. Sobreexpresión de la <i>GSN</i> recombinante en células control 143B-TK <sup>-</sup> y HEK293T. ....	117
Figura 45. Niveles de los complejos y supercomplejos del sistema OXPHOS en células control HEK293T (A) y 143B-TK <sup>-</sup> (B) que sobreexpresan la <i>GSN</i> . .....	118
Figura 46. Relación entre la <i>GSN</i> y la inducción de apoptosis mediada por estaurosporina en cíbridos control y mutantes CYB-KO. ....	120
Figura 47. Complejo mitocondrial de la <i>GSN</i> en los cíbridos control y mutantes CYB-KO tratados con estaurosporina. ....	121
Figura 48. Estructuras de la $\beta$ -actina en las fracciones citosólicas de los cíbridos control y mutantes CYB-KO tratados con estaurosporina. ....	122

**TABLAS**

Tabla 1. Clasificación genética de las mutaciones causantes de enfermedades OXPHOS. ....	15
Tabla 2. Anticuerpos primarios empleados en este estudio. ....	40
Tabla 3. Anticuerpos secundarios empleados en este estudio. ....	41
Tabla 4. Pacientes pediátricos incluidos en el análisis de los niveles de <i>GSN</i> plasmática. ....	86
Tabla 5. Pacientes adultos incluidos en el análisis de los niveles de <i>GSN</i> plasmática. ....	90
Tabla 6. Listado de proteínas que colocalizan con el complejo de la <i>GSN</i> en geles BN-PAGE. ....	97





## **ABREVIATURAS**

---



- 1D-BN-PAGE** Primera dimensión en condiciones nativas de la electroforesis azul nativa
- 2D-BN/SDS-PAGE** Segunda dimensión en condiciones desnaturalizantes de la electroforesis azul nativa
- ADNc** ADN complementario
- ADNg** ADN genómico
- ADNmt** ADN mitocondrial
- ADNn** ADN nuclear
- ARNm** ARN mensajero
- ARNr** ARN ribosómico
- dsRNA** ARN bicatenario de cadena larga
- siRNA** ARN pequeño de interferencia o ARN de silenciamiento
- ARNt** ARN de transferencia
- ATP** Adenosín trifosfato
- BN-PAGE** Electroforesis azul nativa en geles de poliacrilamida (*Blue Native gel electrophoresis*)
- CI** Complejo I o NADH deshidrogenasa:ubiquinona oxidoreductasa
- CII** Complejo II o succinato:ubiquinona oxidoreductasa
- CIII** Complejo III o ubiquinol:citocromo *c* oxidoreductasa
- CIV** Complejo IV o citocromo *c* oxidasa
- CoQ** Coenzima Q10 o ubiquinona
- CoA** Coenzima A
- CO-IP** Coinmunoprecipitación
- COX** Citocromo *c* oxidasa
- CRM** Cadena respiratoria mitocondrial
- CS** Citrato sintasa
- CV** Complejo V o H<sup>+</sup>-ATP sintasa
- DCPIP** Diclorofenol Indofenol
- DIG** Digitonina
- DIGE** Electroforesis diferencial en gel
- DMEM** Medio *Eagle* modificado por Dulbecco
- DMSO** Dimetil sulfóxido
- DNTB** Ácido 5-5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico
- DQ** Decil Ubiquinona
- DQH<sub>2</sub>** Decil Ubiquinol
- DTT** 1,4-Ditiotreitol

## ABREVIATURAS

**EDTA** Ácido etilendiaminotetracético

**EIM** Espacio intermembrana

**EM** Extracto mitocondrial

**FAD** Flavín adenín dinucleótido, oxidado

**FADH<sub>2</sub>** Flavín adenín dinucleótido, reducido

**FBS** Suero fetal bovino

**FDR** Tasa de falsa detección (*False Detection Rate*)

**Fe-S** Grupo sulfoférico

**FITC** Isotiocianato de fluoresceína o fluoresceína-5-isotiocianato (*Fluorescein IsoTioCyanate*)

**GFP** Proteína fluorescente verde (*Green Fluorescent Protein*)

**GRACILE** Acrónimo de los síntomas: retraso en el crecimiento, aminoaciduria, colestasis, sobrecarga de hierro, acidosis láctica y muerte temprana (*Growth Retardation, lactic Acidosis, Cholestasis, Iron overLoad and Early death*)

**GSN** Gelsolina

**HRP** Peroxidasa de rábano picante (*HorseRadish Peroxidase*)

**HSP** Promotor de la cadena pesada del ADNmt (*Heavy Strand Promoter*)

**IGA** Ensayo de actividad en gel (*In Gel Activity*)

**IP** Inmunoprecipitado

**kDa** KiloDalton

**LC-MS** Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (*Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*)

**LHON** Neuropatía óptica hereditaria de Leber o Atrofia óptica de Leber (*Leber Hereditary Optic Neuropathy*)

**LS** Síndrome de Leigh (*Leigh Syndrome*)

**LSP** Promotor de la cadena ligera del ADNmt (*Light Strand Promoter*)

**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

**MERFF** Síndrome de epilepsia mioclónica asociada a fibras rojas rasgadas (*Myoclonic Epilepsy with Ragged red Fibers*)

**MIM** Membrana interna mitocondrial

**MS** Espectrometría de masas (*Mass Spectrometry*)

- Myc** Epítipo Myc derivado del gen *c-myc*
- NAD<sup>+</sup>** Nicotinamida adenina dinucleótido, oxidado
- NADH** Nicotinamida adenina dinucleótido, reducido
- NARP** Síndrome de neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa (*Neurogenic muscle weakness, Ataxia, and Retinitis Pigmentosa*)
- NTB** Azul de nitrotetrazolio (*Nitrotetrazolium Blue*)
- O<sub>H</sub>** Origen de replicación de la cadena pesada del ADNmt
- O<sub>L</sub>** Origen de replicación de la cadena ligera del ADNmt
- OXPHOS** Fosforilación oxidativa
- PBS** Tampón fosfato salino
- PFA** Paraformaldehído
- (p/p)** Masa de soluto / masa de disolución x 100
- (p/v)** Masa de soluto (g) / volumen de disolución (ml) x 100
- PCR** Reacción en cadena de la polimerasa
- PMSF** Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (*PhenylMethylSulfonyl Fluoride*)
- PKC** Proteína quinasa C
- PTP** Poro de transición de permeabilidad (*Permeability Transition Pore*)
- Q** Ubiquinona
- QH<sub>2</sub>** Ubiquinol
- RISC** Complejo de silenciamiento inducido por ARN (*RNA-Induce Silencing Complex*)
- RISP** Proteína hierro-azufre de Rieske (*Rieske Iron-Sulfur Protein*)
- ROS** Especies reactivas del oxígeno (*Reactive Oxygen Species*)
- SAM** Complejo SAM (*Sorting and Assembly Machinery*)
- SCs** Supercomplejos
- SDS** Dodecilsulfato sódico
- SDS-PAGE** Electroforesis en gel de poliacrilamida y SDS
- siGSN** Silenciamiento del ARNm de *GSN*
- SN** Sobrenadante
- STN** Estaurosporina
- TIM** Translocasa de membrana mitocondrial interna (*Translocase of the Inner Membrane*)
- TMB** 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina
- TNF $\alpha$**  Factor de necrosis tumoral  $\alpha$
- TOM** Translocasa de membrana mitocondrial externa (*Translocase of the Outer Membrane*)
- TOF** Tiempo de vuelo (*Time of Flight*)

## ABREVIATURAS

**TXRD** Fluoróforo rojo Texas (*Texas Red*)

**u.a.** Unidades arbitrarias

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

**VV** Plásmido pCMV6 con los epítomos GFP o Myc (Vector Vacío)

**(v/v)** Volumen / volumen total x 100

# INTRODUCCIÓN

---







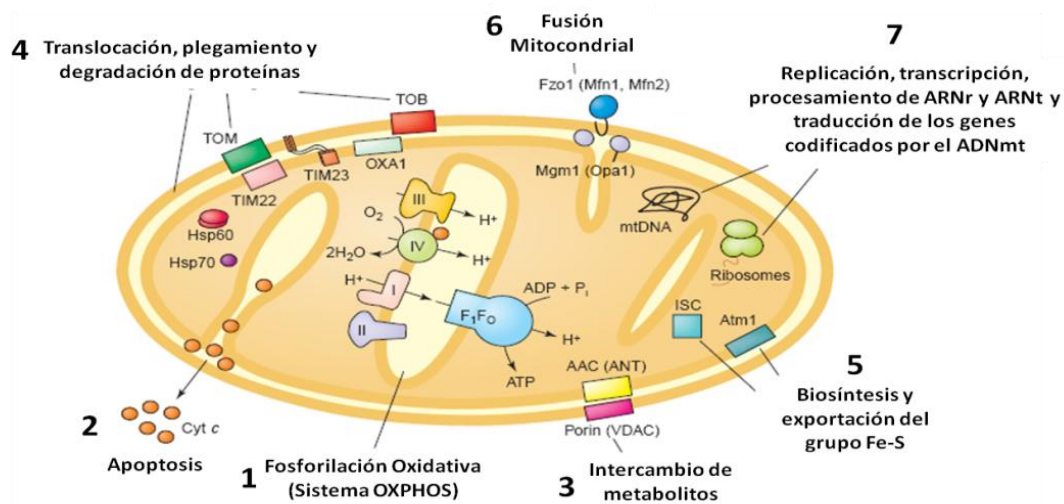
## 1. LA MITOCONDRIA: FUNCIÓN, ESTRUCTURA Y MORFOLOGÍA.

Las mitocondrias son orgánulos subcelulares localizados en el citosol de las células eucariotas, donde intervienen en procesos como (Figura1): el metabolismo lipídico, la biosíntesis de aminoácidos y el grupo hemo, la activación de la apoptosis, la homeostasis del calcio o la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS). Sin embargo, el papel primordial de las mitocondrias es la producción, a través de un proceso conocido como fosforilación oxidativa (OXPHOS), de la principal fuente de energía celular: el ATP.

Estas organelas están constituidas por una membrana externa (MEM) y una membrana interna (MIM), las cuales dividen a la mitocondria en dos compartimentos: el espacio intermembrana (EIM) y la matriz mitocondrial. La membrana externa es una bicapa lipídica similar a la membrana plasmática y contiene mayoritariamente proteínas denominadas porinas o VDAC (*Voltage-Dependent Anion Channel*), las cuales forman poros en la membrana que permiten el intercambio entre la mitocondria y el citosol de metabolitos, iones y de moléculas con pesos moleculares inferiores a 5000 Da (Noskov *et al.*, 2016). Además, la membrana externa contiene los sistemas de translocasas TOM y TOB/SAM, que regulan el importe de las proteínas sintetizadas en el citoplasma con destino mitocondrial (Endo & Yamano, 2010; Neupert, 2015). La membrana interna mitocondrial es altamente selectiva debido a un mayor contenido en proteínas y fosfolípidos como la cardiolipina. Existen numerosos transportadores específicos o translocasas de membrana interna, como el complejo TIM22/TIM23 y la translocasa OXA1, que facilitan el transporte de moléculas al interior de la mitocondria y su procesamiento (Demishtein-Zohary & Azem, 2016; Hennon *et al.*, 2015; Neupert, 2015). Esta membrana se encuentra plegada formando invaginaciones hacia el interior de la matriz, denominadas crestas mitocondriales (Rampelt *et al.*, 2016).

Las mitocondrias pueden alternar estructuras ovoides independientes o alargadas formando una red, ya que se someten a ciclos repetitivos de fisión y fusión en un proceso que se conoce como dinámica mitocondrial (Horbay & Bilyy, 2016). Los procesos de fusión y fisión consisten en la fusión de las membranas mitocondriales externa e interna, así como en la mezcla de los contenidos de la matriz (Malka *et al.*, 2005) y la redistribución de proteínas y lípidos mitocondriales a través de la célula (Nakada *et al.*, 2001). Dichos procesos varían en función de cada tipo celular y dependen de la demanda y estabilidad metabólica de la célula.

## INTRODUCCIÓN



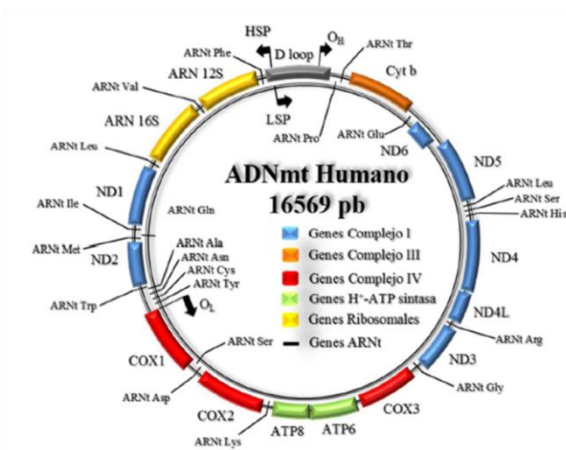
**Figura 1. Visión general de los procesos relacionados con la mitocondria.** (1) Sistema de fosforilación oxidativa (complejos I, II, III, IV y V). (2) Activación de apoptosis mediante la liberación de Citocromo c (Cyt c). (3) Intercambio de metabolitos y nucleótidos a través de canales y moléculas 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) Regulación de la dinámica mitocondrial (Mfn1, Mfn2 y Opa1). (7) Replicación, transcripción, procesamiento de ARNs y traducción de genes mitocondriales (modificado de (Reichert & Neupert, 2004)).

## 2. GENOMA MITOCONDRIAL.

Las mitocondrias se caracterizan por contener su propio material genético denominado ADN mitocondrial (ADNmt) (Nass & Nass, 1963), el cual se replica y se transcribe en la matriz mitocondrial (Clayton, 1991). El genoma mitocondrial se caracteriza por ser una molécula de ADN circular y bicatenario, formado por una cadena pesada (H) y por una cadena ligera (L), que contiene 16.569 pares de bases (Anderson *et al.*, 1981; Andrews *et al.*, 1999).

El ADNmt de mamíferos contiene 37 genes, distribuidos de tal forma que 28 se encuentran en la cadena pesada y los 9 restantes en la ligera. Los genes codifican para: 2 ARN ribosómicos (ARNr) (ARNr 12S y 16S), 22 ARN de transferencia (ARNt) y 13 subunidades de los complejos del sistema OXPHOS mitocondrial. De ellas, siete pertenecen al complejo I (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 y ND6), una al complejo III (Citocromo *b*), tres al complejo IV (COX1, COX2 y COX3) y dos al complejo V (ATP6 y ATP8) (Figura 2). Por tanto, el genoma mitocondrial posee una capacidad codificante limitada y necesita coordinarse con el genoma nuclear para su correcta funcionalidad (Garesse & Vallejo, 2001).

Otra característica del genoma mitocondrial es que es compacto, es decir los genes estructurales no poseen zonas 5' y 3' no traducidas (UTRs), tampoco contienen intrones y además los espacios intergénicos son mínimos, llegando en algunos casos al solapamiento entre genes. Sólo existen dos regiones no codificantes: una es la región de en torno a 1 Kb de longitud denominada como bucle-D, donde se localizan el origen de replicación de la cadena pesada ( $O_H$ ), así como elementos reguladores de la expresión y los promotores a partir de los cuales se inicia la transcripción de las cadenas pesada (HSP) y ligera (LSP). La otra región no codificante es de unos 30 nucleótidos y se localiza a dos tercios de la longitud total del genoma respecto a  $O_H$  (Strachan & Read, 1999); en ella se encuentra situado el origen de replicación de la cadena ligera ( $O_L$ ) (Figura 2).



**Figura 2. Representación del ADN mitocondrial (ADNmt) humano.** Los círculos representan la doble cadena de ADN donde se localizan los genes que codifican las 13 subunidades de cadena respiratoria, los 22 ARN de transferencia (ARNt) y los 2 ARN ribosómicos 12S y 16S. El origen de replicación y la dirección de síntesis vienen marcados por  $O_H$  para la hebra pesada (línea exterior) y por  $O_L$  para la hebra ligera (línea interior).

Dentro de cada mitocondria existen entre 1-10 copias del ADNmt, las cuales se asocian con complejos ribonucleoproteicos en la membrana interna mitocondrial formando los denominados nucleoides (Bogehagen *et al.*, 2003). Dichos nucleoides se consideran la unidad de transmisión y herencia del ADNmt. El ADNmt se hereda exclusivamente por vía materna, debido a la eliminación mediante ubiquitinación de las mitocondrias procedentes del espermatozoide que penetra en el oocito (Sutovsky *et al.*, 2000). Además, esta molécula posee una naturaleza poliploide, existiendo miles de copias de ADNmt por célula. Cuando todas las copias del ADNmt que posee un individuo particular son idénticas, se hablará de homoplasmia. Pero cuando coexisten dos o más genotipos distintos se hablará de heteroplasmia.

### 3. SISTEMA DE FOSFORILACIÓN OXIDATIVA (OXPHOS).

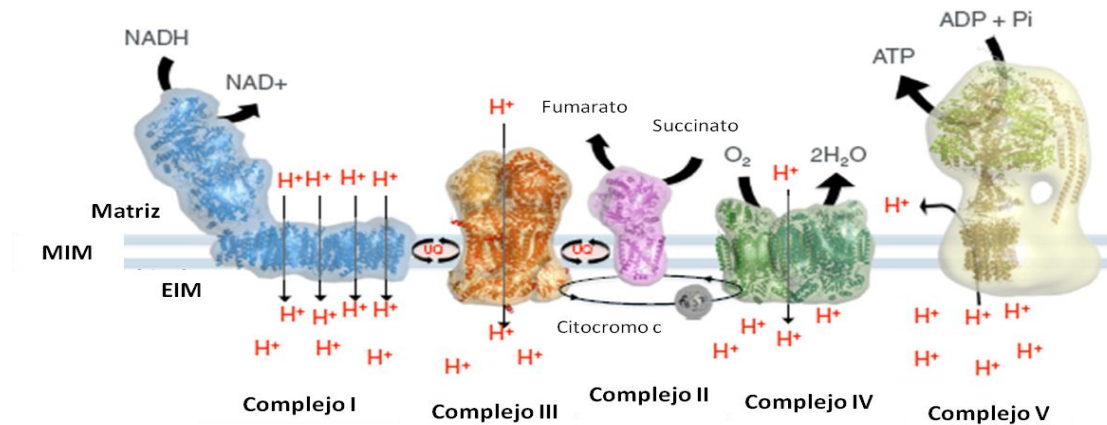
La principal función de la mitocondria es la generación de moléculas de ATP, gracias a la oxidación en la matriz mitocondrial de nutrientes orgánicos. Esta oxidación genera las moléculas  $\text{FADH}_2$  y  $\text{NADH}$ , las cuales tienen un alto poder reductor.

La síntesis de ATP se lleva a cabo a través del sistema OXPHOS (Figura 3), el cual se localiza en la membrana interna mitocondrial. Este sistema está compuesto por el complejo  $\text{H}^+$ -ATP sintasa (complejo V), más los cuatro complejos enzimáticos que forman la cadena respiratoria mitocondrial (CRM): la  $\text{NADH}$  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). Los complejos de la CRM están ligados a través de dos transportadores electrónicos: la Ubiquinona, la cual está embebida en la membrana interna mitocondrial; y el Citocromo c, orientado hacia el espacio intermembrana (Green & Tzagoloff, 1966).

Los complejos de la CRM llevan a cabo una sucesión de reacciones de oxidación-reducción, que comienzan con la captación por parte del complejo I de los electrones provenientes del  $\text{NADH}$ , o bien con el paso de los electrones desde el  $\text{FADH}_2$  al complejo II. Los electrones de ambas procedencias pasan por la Ubiquinona o  $\text{CoQ}$ , el complejo III y el Citocromo c para llegar finalmente al complejo IV, que cederá los electrones al  $\text{O}_2$  molecular generándose moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$ . Este flujo de electrones a través de los complejos de la CRM, está acoplado a un bombeo de protones ( $\text{H}^+$ ) desde la matriz al espacio intermembrana a través de los complejos I ( $4\text{H}^+$ ), III ( $4\text{H}^+$ ) y IV ( $2\text{H}^+$ ). Dicho bombeo genera un potencial electroquímico ( $\Delta\mu$ ) a través de la membrana interna, que proporciona la energía libre necesaria para la síntesis de ATP por parte del complejo V, el cual acopla el flujo de protones a la fosforilación del ADP. Este mecanismo se conoce como acoplamiento quimiosmótico o fosforilación oxidativa (Mitchell, 1976; Reid *et al.*, 1966). Esta reacción es reversible y la ATP sintasa puede mantener el gradiente de  $\text{H}^+$  a expensas de la hidrólisis de ATP (Scheffler, 1999).

Desde el punto de vista genético, el sistema OXPHOS es único debido a su origen bi-genómico. A excepción del complejo II, cuyas subunidades están todas codificadas por el genoma nuclear, los demás complejos están compuestos por subunidades codificadas por el ADNn y por el ADNmt. Las subunidades nucleares se sintetizan en los ribosomas citosólicos y se importan a la mitocondria, donde se ensamblan junto a grupos prostéticos y a las subunidades codificadas por el genoma mitocondrial, formando los complejos OXPHOS con la ayuda de chaperonas o factores de ensamblaje específicos (Ghezzi & Zeviani, 2012). Dichos complejos se encuentran en equilibrio dinámico, pasando de estructuras individuales a asociarse en forma de supercomplejos o respirasomas (Schägger & Pfeiffer, 2000), lo que hipotéticamente permitiría a las células y tejidos

adaptar la demanda energética a los cambios metabólicos y fisiológicos. Este modelo de organización estructural del sistema OXPHOS se ha denominado “modelo de plasticidad” o de “agregación dinámica” (Acín-Pérez *et al.*, 2008; Hochman *et al.*, 1985).

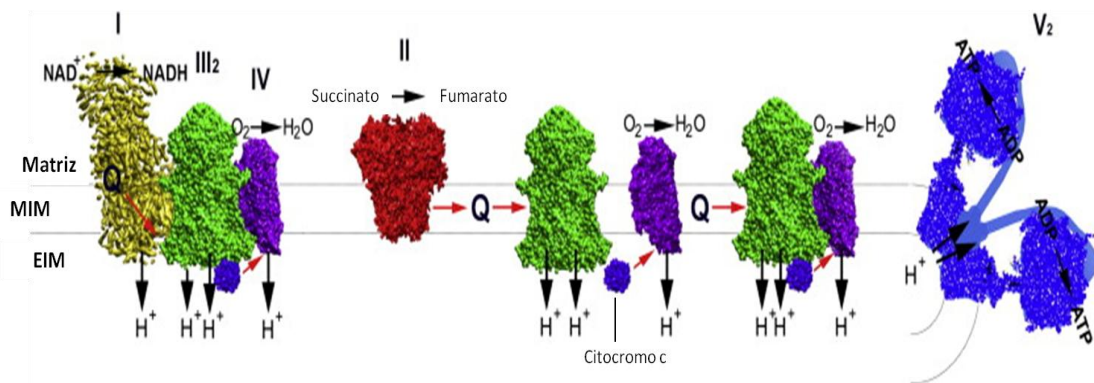


**Figura 3. Sistema de Fosforilación Oxidativa (OXPHOS).** Las coenzimas reducidas NADH y FADH<sub>2</sub>, provenientes del catabolismo de nutrientes celulares, ceden respectivamente sus electrones a los complejos I y II de la cadena respiratoria mitocondrial. Desde estos dos complejos los electrones fluyen a través de la Ubiquinona hasta el complejo III, el cual los cede al Citocromo c que posteriormente es oxidado por el complejo IV. Dicho complejo utiliza al O<sub>2</sub> como aceptor final de los electrones generándose H<sub>2</sub>O. Los complejos I, III y IV bombean protones desde la matriz al espacio intermembrana de manera acoplada al transporte de electrones, generándose un potencial electroquímico que es utilizado por el complejo V para la producción de ATP. **UQ:** Ubiquinona, **MIM:** Membrana interna mitocondrial, **EIM:** Espacio intermembrana (modificado de (Kühlbrandt, 2015)).

Se han descrito varias estructuras de supercomplejos en mamíferos (Figura 4). Por ejemplo, el complejo I puede formar una asociación estable con el dímero del complejo III, formando el supercomplejo I+III<sub>2</sub>, al cual se pueden unir de una a cuatro copias del complejo IV formando el supercomplejo I+III<sub>2</sub>+IV<sub>1-4</sub> o respirasoma (Althoff *et al.*, 2011; Dudkina *et al.*, 2005; Dudkina *et al.*, 2011; Schäfer *et al.*, 2006; Schägger & Pfeiffer, 2000). Recientemente se ha descrito la estructura a alta resolución (entre 5,4 y 7,8 Å) del respirasoma de mamíferos (Gu *et al.*, 2016; Letts *et al.*, 2016). Así mismo, el complejo III dimérico se puede asociar a una o dos copias del complejo IV, dando lugar al supercomplejo III<sub>2</sub>+IV<sub>1-2</sub>, cuya primera estructura detallada se estudió en *Saccharomyces cerevisiae* (Heinemeyer *et al.*, 2007). El complejo II existe mayoritariamente en forma libre sin asociarse a otros complejos de la CRM (Moreno-Lastres *et al.*, 2012). Además, el complejo V forma homodímeros que facilitan el plegamiento de la membrana mitocondrial y la formación de las crestas mitocondriales (Minauro-Sanmiguel *et al.*, 2005; Paumard *et al.*, 2002).

## INTRODUCCIÓN

Se ha propuesto que la formación de los supercomplejos puede tener diversas finalidades como: conferir estabilidad al complejo I (Moreno-Lastres *et al.*, 2012; Schägger *et al.*, 2004), reducir la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Maranzana *et al.*, 2013), aumentar la eficiencia del transporte de electrones (Bianchi *et al.*, 2004) y mediar en la adaptación metabólica celular (Lapiente-Brun *et al.*, 2013).



**Figura 4. Organización estructural de la cadena respiratoria mitocondrial.** El complejo I está representado en color amarillo, el complejo II en rojo, el complejo III en verde y el complejo IV en morado. El complejo V se encuentra representado en azul. **Q:** Ubiquinona, **MIM:** Membrana interna mitocondrial, **EIM:** Espacio intermembrana (modificado de (Chaban *et al.*, 2014)).

## 4. ENFERMEDADES MITOCONDRIALES OXPHOS.

Las enfermedades mitocondriales OXPHOS son aquellas provocadas por un defecto genético o mutación en las proteínas implicadas en el mantenimiento, funcionamiento y constitución del sistema OXPHOS. Este conjunto de enfermedades raras afecta a uno de cada 5000 nacidos vivos (Gorman *et al.*, 2015). Las alteraciones del sistema OXPHOS provocan enfermedades multiorgánicas con cuadros clínicos muy variados que pueden aparecer tanto en la infancia como en la edad adulta. Sin embargo, los tejidos y órganos con una alta demanda energética, como el músculo o el sistema nervioso, suelen verse afectados de manera más frecuente.

Debido al origen bi-genómico del sistema OXPHOS, las alteraciones pueden darse en el genoma mitocondrial o en el nuclear. Por tanto, las alteraciones genéticas que causan enfermedades del sistema OXPHOS se pueden clasificar según estén afectando a uno u otro genoma (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación genética de las mutaciones causantes de enfermedades OXPHOS.

Alteraciones genéticas del ADN mitocondrial:
Mutaciones en genes codificantes de subunidades estructurales del sistema OXPHOS
Mutaciones en genes de la maquinaria de traducción mitocondrial (ARNr, ARNt)
Deleciones
Depleciones (disminución del nº de copias de ADNmt)
Mutaciones en el ADN nuclear que afectan a:
Subunidades estructurales de los complejos del sistema OXPHOS
Factores de ensamblaje de los complejos del sistema OXPHOS
Factores de mantenimiento y estabilidad del ADNmt
Factores para la traducción mitocondrial
Factores que regulan la biogénesis del sistema OXPHOS

Aunque existe una gran variabilidad clínica asociada a algunas mutaciones mitocondriales (Blázquez *et al.*, 2016), en general las alteraciones en el ADNmt suelen causar cuadros clínicos definidos, como por ejemplo: síndrome de Kearns-Sayre (KSS); oftalmoplegia externa progresiva crónica (CPEO); encefalopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios tipo accidente cerebrovascular (MELAS); epilepsia mioclónica asociada a fibras rojo rasgadas (MERFF); neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa (NARP); síndrome de Leigh (LS) o la neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON). Cuando una mutación patogénica está presente en todas las copias del genoma mitocondrial se denomina mutación homoplásmica, mientras que cuando afecta a sólo una parte del total de copias se denomina mutación heteroplásmica. El efecto umbral de una mutación heteroplásmica marca el desarrollo de estas enfermedades, ya que se refiere al número mínimo necesario de copias de ADNmt mutado para que dicha mutación conduzca a un efecto fenotípico (Taylor & Turnbull, 2005).

Por el contrario, las alteraciones del sistema OXPHOS debidas a mutaciones en el ADN nuclear suelen presentar fenotipos clínicos muy variados. Hasta la fecha, se han descrito mutaciones causantes de enfermedad en más de 150 genes diferentes. Algunas manifestaciones clínicas frecuentemente asociadas a las distintas mutaciones son: ptosis, miopatía proximal e intolerancia al ejercicio, cardiomiopatía, sordera neurosensorial, atrofia óptica, retinopatía pigmentosa, diabetes *mellitus*, encefalopatía y ataxia (Chinnery, 2014).



## INTRODUCCIÓN

### 4.1 Patología mitocondrial asociada al complejo I.

El complejo I (EC 1.6.5.3) de mamíferos está compuesto por 45 subunidades de las cuales: 7 están codificadas por el ADNmt (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 y ND6) y las 38 subunidades restantes por el ADN nuclear.

Los déficits enzimáticos del complejo I son los más comunes y presentan manifestaciones clínicas muy heterogéneas, asociadas bien a mutaciones en el ADNmt, o bien a mutaciones en genes nucleares (Nouws *et al.*, 2012; Valsecchi *et al.*, 2010).

#### 4.1.1 Mutaciones en el ADNmt.

Se han descrito mutaciones patogénicas en los siete genes mitocondriales que codifican para las subunidades del complejo I. Los cuadros clínicos más comunes dentro de los déficits del complejo I debidos a mutaciones en el ADNmt son: LHON, síndrome MELAS y síndrome de Leigh.

La neuropatía óptica hereditaria de Leber se caracteriza por ser bilateral y a menudo secuencial. En algunos pacientes puede ir acompañada de enfermedad neuromuscular o esclerosis múltiple. El 90% de los casos de LHON se deben a tres mutaciones concretas: m.11778G>A-*MTND4*, m.14484T>C-*MTND6* y m.3460G>A-*MTND1* (Blázquez *et al.*, 2016).

El síndrome MELAS se presenta en la infancia o adolescencia y se caracteriza por retraso mental, deterioro psicomotor, convulsiones y acidosis láctica. El paciente también puede llegar a desarrollar sordera y diabetes en etapas posteriores. El 80% de los casos de MELAS se debe a la mutación m.3243A>G en el gen *MT-TL1*, el cual codifica para el ARNt<sup>leu</sup>. Sin embargo, también se han descrito mutaciones asociadas a MELAS en las subunidades ND1, ND4, ND5 y ND6 del complejo I (DiMauro & Hirano, 1993; Wong, 2007).

El síndrome de Leigh es un desorden neurológico progresivo que se caracteriza por: un retraso en el desarrollo intelectual y motor; y niveles elevados de lactato en sangre y líquido cefalorraquídeo (Rahman *et al.*, 1996). Otros signos clínicos asociados son la atrofia óptica, hipotonía, ataxia y distonía. Se han descrito pacientes con mutaciones en las subunidades ND2 (Hinttala *et al.*, 2006), ND3 (McFarland *et al.*, 2004), ND4 (Komaki *et al.*, 2003; Thorburn & Rahman, 1993), ND5 (Taylor *et al.*, 2002) y ND6 (Solano *et al.*, 2003; Ugalde *et al.*, 2003).

#### 4.1.2 Mutaciones en el ADN nuclear.

Los déficits del complejo I debidos a mutaciones en genes nucleares, suelen manifestarse a edades tempranas y cursan con manifestaciones neurodegenerativas progresivas, como por ejemplo el síndrome de Leigh o la leucodistrofia. Las mutaciones se localizan bien en genes que



codifican para las subunidades estructurales, o bien para factores de ensamblaje que favorecen la correcta inserción de las subunidades dentro del complejo I.

Se han descrito mutaciones asociadas a patogenicidad en los siguientes genes estructurales del complejo I: NDUFV1 (Schuelke *et al.*, 1999), NDUFV2 (Bénil *et al.*, 2003), NDUFS1 (Bénil *et al.*, 2001), NDUFS2 (Loeffen *et al.*, 2001), NDUFS3 (Bénil *et al.*, 2004), NDUFSA (Budde *et al.*, 2000), NDUFSA6 (Kirby *et al.*, 2004), NDUFSA7 (Triepels *et al.*, 1999), NDUFSA8 (Loeffen *et al.*, 1998), NDUFA1 (Loeffen *et al.*, 1998), NDUFA2 (Hoefs *et al.*, 2008), NDUFA10 (Hoefs *et al.*, 2011), NDUFA11 (Berger *et al.*, 2008), , NDUFB3 (Calvo *et al.*, 2012) y NDUFB11 (van Rahden *et al.*, 2015).

Asimismo, se han descrito mutaciones en los siguientes factores de ensamblaje: NDUFAL1 (Fassone *et al.*, 2011), NDUFAL2 (Hoefs *et al.*, 2009), NDUFAL3 y NDUFAL4 (Saada *et al.*, 2009), C20ORF7 (Sugiana *et al.*, 2008), C8ORF38 (McKenzie *et al.*, 2011), NUBPL y FOXRED1 (Calvo *et al.*, 2010) y ACAD9 (Haack *et al.*, 2010; He *et al.*, 2007).

#### 4.2 Patología mitocondrial asociada al complejo II.

El complejo II (EC 1.3.5.1) está compuesto por cuatro subunidades de origen nuclear. Dos de ellas son hidrofílicas: succinato deshidrogenasa subunidad A (SDHA) y subunidad B (SDHB); y las otras dos son hidrofóbicas: subunidad C (SDHC) y subunidad D (SDHD) (Rustin & Rötig, 2002; Sun *et al.*, 2005).

Se han descrito muy pocos casos clínicos de déficits enzimáticos del complejo II asociados a mutaciones en genes estructurales: SDHA (Bourgeron *et al.*, 1995; Parfait *et al.*, 2000), SDHB (Astuti *et al.*, 2001), SDHC (Lemarie & Grimm, 2009; Niemann & Müller, 2000) y SDHD (Astuti *et al.*, 2001; Baysal *et al.*, 2000). Estos pacientes presentan un amplio rango de fenotipos clínicos: epilepsia, atrofia óptica, ataxia, miopatía, cardiomiopatía y leucoencefalopatía. Cabe destacar que varios pacientes desarrollaron paragangliomas hereditarios (Hoekstra & Bayley, 2013).

También se han descrito mutaciones en los factores de ensamblaje del complejo II: SDHAF1 y SDH5 (Ghezzi *et al.*, 2009; Hao *et al.*, 2009). Estas mutaciones se han asociado con presentaciones clínicas varias: síndrome de Leigh, cardiomiopatía y leucodistrofias infantiles.

#### 4.3 Patología mitocondrial asociada al complejo III.

El complejo III (EC 1.10.2.2) de mamíferos es un homodímero funcional en el que cada monómero está formado por once subunidades (Iwata *et al.*, 1998; Xia *et al.*, 1997). Tres de ellas son catalíticas, ya que contienen los grupos prostéticos que participan en el transporte de

## INTRODUCCIÓN

electrones y son: Citocromo *b* (CYB), Citocromo *c*1 (CYC1) y la proteína hierro-azufre de Rieske (RISP). Las ocho subunidades restantes son importantes para la estabilidad del complejo (Hunte *et al.*, 2000). La subunidad CYB es la única codificada por el genoma mitocondrial (Nobrega & Tzagoloff, 1980).

### 4.3.1 Mutaciones en el ADNmt: gen *MT-CYB*.

Las mutaciones en el gen mitocondrial *MT-CYB* constituyen una de las causas más frecuentes del déficit enzimático del complejo III (Fernández-Vizarra & Zeviani, 2015). Estas mutaciones se pueden asociar tanto a un déficit aislado del complejo III, como a un déficit combinado de los complejos I y III (Lamantea *et al.*, 2002).

Los déficits enzimáticos del complejo III asociados a mutaciones en el gen *MT-CYB*, se presentan comúnmente en adultos que cursan con intolerancia al ejercicio, debilidad proximal de extremidades y acidosis láctica (Andreu *et al.*, 1999a; Andreu *et al.*, 1999b; Bénit *et al.*, 2009; Borisov, 2002; Legros *et al.*, 2001; Mourmans *et al.*, 1997). También pueden aparecer en niños que presentan cardiomiopatía asociada a fibras rojo rasgadas (Cormier *et al.*, 1991; Keightley *et al.*, 2000).

### 4.3.2 Mutaciones en el ADN nuclear.

Las mutaciones en el gen *BCS1L* son la principal causa genética de los déficits enzimáticos del complejo III de origen nuclear (Fernández-Vizarra & Zeviani, 2015). La proteína *BCS1L* pertenece a la familia de las AAA-ATPasas y actúa como translocasa de membrana interna mitocondrial (Wagener *et al.*, 2011), ayudando en la inserción de la subunidad catalítica RISP en el pre-complejo III (Cruciat *et al.*, 1999; Fernández-Vizarra *et al.*, 2007; Nobrega *et al.*, 1992).

Se han descrito más de 25 mutaciones que afectan al factor de ensamblaje *BCS1L* y que clínicamente están asociadas a tres fenotipos clínicos: el síndrome de GRACILE, que se caracteriza por el retraso del crecimiento, aminoaciduria, colestasis, sobrecarga de hierro, acidosis láctica y muerte prematura (Fellman, 2002; Kotarsky *et al.*, 2010; Visapää *et al.*, 2002); otro fenotipo intermedio que se presenta en neonatos, niños o adultos, que puede cursar con encefalopatía, acidosis metabólica, sobrecarga de hierro, tubulopatía, hepatopatía, debilidad muscular o atrofia óptica (Blázquez *et al.*, 2009; Fernández-Vizarra *et al.*, 2007; Gil-borlado *et al.*, 2009; Morán *et al.*, 2010); y el síndrome de Björnstad, que cursa con sordera neurosensorial y *pili torti* (Hinson *et al.*, 2007).

Además, se han descrito mutaciones en genes nucleares que codifican para otros factores de ensamblaje del complejo III: TTC19 (Ghezzi *et al.*, 2011), LYRM7 (Invernizzi *et al.*, 2013), UQCC2 (Tucker *et al.*, 2013) y UQCC3 (Wanschers *et al.*, 2014). También, se han descrito mutaciones patogénicas en genes estructurales del complejo III: UQCRQ (Barel *et al.*, 2008), UQCRB (Haut *et al.*, 2003) y UQCRC2 (Miyake *et al.*, 2013); y para la subunidad catalítica CYC1 (Gaignard *et al.*, 2013). Todas estas mutaciones afectan a un amplio rango de tejidos y se asocian con: encefalopatía, retraso psicomotor severo, distonía, signos extrapiramidales, ataxia, neuropatía óptica, sordera neurosensorial, hipoglicemia o hiperglicemia y acidosis láctica (Blázquez *et al.*, 2016; Fernández-Vizarra & Zeviani 2015).

#### 4.4 Patología mitocondrial asociada al complejo IV.

El complejo IV (EC 1.9.3.1) tiene una estructura dimérica formada por 13 subunidades en mamíferos (Tsukihara *et al.*, 1996). Las tres subunidades que conforman el núcleo catalítico están codificadas por el ADNmt y son: COX1, COX2 y COX3. El resto de las subunidades estructurales están codificadas por el ADN nuclear (COX4, COX5A, COX5B, COX6A, COX6B, COX6C, COX7A, COX7B, COX7C y COX8).

##### 4.4.1 Mutaciones en el ADNmt.

Se han descrito mutaciones en las tres subunidades codificadas por el genoma mitocondrial: COX1 (Bruno *et al.*, 1999; Jaksch *et al.*, 1998), COX2 (Clark *et al.*, 1999; Rahman *et al.*, 1999) y COX3 (Hanna *et al.*, 1998; Keightley *et al.*, 1996). Estas mutaciones se asocian con un amplio rango de fenotipos clínicos que incluyen: miopatía, MELAS, encefalomiopatía y fallo neuronal (Barrientos *et al.*, 2002).

##### 4.4.2 Mutaciones en el ADN nuclear.

En torno al 75% de los déficits enzimáticos del complejo IV se deben a mutaciones en el gen nuclear que codifica para el factor de ensamblaje SURF1. Se han descrito más de 40 mutaciones patogénicas en *SURF1* y todas ellas cursan clínicamente como síndrome de Leigh (LS<sub>COX</sub>) (Blázquez *et al.*, 2016). También se han descrito mutaciones en el gen nuclear *LRRPRC*, que provocan la aparición de la variante Franco-Canadiense del Síndrome de Leigh (LSFC) asociada con un déficit de la actividad COX (Merante *et al.*, 1993; Morin *et al.*, 1993; Mootha *et al.*, 2003). La proteína LRRPRC actúa como un factor postranscripcional que estabiliza el ARNm de *COX1* y *COX3* (Xu *et al.*, 2004; Ruzzenente *et al.*, 2012).

## INTRODUCCIÓN

Otros factores de ensamblaje en los que se han descrito mutaciones son: COX10 (Valnot *et al.*, 2000), COX15 (Antonicka *et al.*, 2003), SCO1 (Horvath *et al.*, 2000) y SCO2 (Papadopoulou *et al.*, 1999). Dichas mutaciones se han asociado con tubulopatía, leucodistrofia, síndrome de Leigh, cardiomiopatía hipertrófica, fallo hepático neonatal y cardioencefalomiopatía (DiMauro *et al.*, 2012).

Se han descrito pocas mutaciones en las subunidades estructurales de origen nuclear: COX6A1 (Tamiya *et al.*, 2014), COX6B1 (Massa *et al.*, 2008) y COX7B (Indrieri *et al.*, 2012). Estas mutaciones se asociaron con leucodistrofia, miopatía, retraso en el crecimiento y cardiomiopatía.

### 5. DIAGNÓSTICO Y BIOMARCADORES DE LAS ENFERMEDADES MITOCONDRIALES.

El desarrollo de técnicas genómicas de secuenciación masiva está ampliando considerablemente el conocimiento de la base genética de las enfermedades mitocondriales OXPHOS (Menezes *et al.*, 2014). Sin embargo, debido a la alta heterogeneidad fenotípica de estas enfermedades, su diagnóstico constituye un gran desafío (Wolf & Smeitink, 2002). Los hallazgos clínicos o radiológicos raramente apuntan a la identificación de este tipo de enfermedades y para alcanzar un diagnóstico se suelen requerir evidencias histoquímicas, bioquímicas y genéticas. El procedimiento diagnóstico clave se ha mantenido sin apenas variaciones durante décadas y se basa principalmente en la obtención de biopsias de músculo esquelético, para el análisis histológico y bioquímico de la mitocondria. Dicho procedimiento es invasivo y supone un gasto económico considerable para el sistema sanitario.

Durante mucho tiempo, los marcadores importantes utilizados para el diagnóstico histoquímico de enfermedades OXPHOS han sido las fibras musculares rojo-rasgadas (RRF, *ragged red fibers*), las succinato deshidrogenasa (SDH) y las citocromo c oxidasa (COX) negativas, aunque tan solo se encuentran en una fracción de los pacientes y no son específicas de enfermedad mitocondrial (Siciliano *et al.*, 2007).

Por otro lado, el análisis bioquímico se basa principalmente en la medida de las actividades enzimáticas de los complejos de la CRM (Medja *et al.*, 2009; Spinazzi *et al.*, 2012), las cuales revelan la existencia de déficits enzimáticos del sistema OXPHOS. Sin embargo, su metodología es difícil de estandarizar y con frecuencia las mismas muestras conducen a resultados diferentes (Medja *et al.*, 2009). Además, los valores normales de las actividades de la CRM en músculo esquelético no excluyen un déficit enzimático de cadena respiratoria en otros tejidos.

La carencia de herramientas poco invasivas de diagnóstico y pronóstico, ha promovido en los últimos años la búsqueda de biomarcadores específicos y sensibles fácilmente detectables en

fluidos corporales (Mancuso *et al.*, 2009; Suomalainen, 2011). Los biomarcadores son moléculas asociadas a procesos biológicos o mecanismos reguladores específicos, que sirven como indicadores de procesos o alteraciones fisiológicas y patológicas. Pueden estar representados por pequeños metabolitos, proteínas, ácidos nucleicos y otras biomoléculas. Se han propuesto distintos marcadores para las patologías OXPHOS como el lactato, la alanina, creatina o la ratio lactato:piruvato en suero o en fluido cerebroespinal (Bernier *et al.*, 2002; Morava *et al.*, 2006; Walker *et al.*, 1996; Wolf & Smeitink, 2002). Sin embargo, las variaciones en sus niveles no son exclusivas de este tipo de enfermedades (Haas *et al.*, 2010).

Por otro lado, un estudio retrospectivo que comparaba los niveles del factor de crecimiento FGF-21 en suero y plasma de pacientes con enfermedad mitocondrial, pacientes con patologías neurológicas de origen no mitocondrial e individuos sanos reveló que dicha proteína podría constituir un buen biomarcador para las enfermedades mitocondriales miopáticas (Suomalainen *et al.*, 2011). Por contra, FGF-21 no diferencia las enfermedades mitocondriales no miopáticas como la neuropatía óptica de Leber (LHON) o la sordera neurosensorial (Su *et al.*, 2012), ni la progresión del MELAS (Koene *et al.*, 2014). Además, se han descrito niveles altos en sangre de FGF-21 asociados a patologías más comunes, como la diabetes tipo 2, obesidad o en enfermedad renal crónica, así como en la respuesta al post-trasplante hepático en niños y a la isquemia de miocardio en modelos murinos (Hindricks *et al.*, 2014; Kosola *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2012). Actualmente se considera a FGF-21 como un marcador del perfil metabólico de un individuo, pero no absolutamente específico de enfermedad mitocondrial.

## 6. INTERACCIÓN MITOCONDRIA-CITOESQUELETO.

Los filamentos intermedios junto con los filamentos de actina y los microtúbulos conforman el citoesqueleto de las células. El citoesqueleto es una estructura dinámica y compleja que desempeña importantes funciones en la organización del citoplasma, en el crecimiento y la diferenciación celular, en la transducción de señales y en la migración celular.

Las interacciones entre la mitocondria y el citoesqueleto contribuyen a la regulación de la homeostasis celular, ya que facilitan el desplazamiento de las mitocondrias dentro de la célula para facilitar el suministro energético o en función de la necesidad de regulación del calcio intracelular (Schwarz, 2013; Sheng, 2014).

La distribución y movilidad de las mitocondrias a lo largo del citoplasma, dependen de las interacciones de las proteínas de membrana externa mitocondrial Miro y Sintafilina con los microtúbulos y filamentos de actina (Morris & Hollenbeck, 1995). Los microtúbulos serían los encargados del transporte de largo recorrido de las mitocondrias, mientras que los filamentos de

## INTRODUCCIÓN

actina se encargarían de pequeños movimientos y del correcto acomodamiento de las organelas (Saxton *et al.*, 2012; Schwarz, 2013; Sheng, 2014). Asimismo, los filamentos intermedios tienen una influencia directa sobre la forma, función y la motilidad de las mitocondrias en diferentes tipos celulares (Schwarz & Leube, 2016). Ello se debe a la interacción de diversos componentes proteicos de los filamentos intermedios (neurofilamentos, desmina, vimentina y keratinas tipo 1 y 2) con la mitocondria, mediante adaptadores proteicos como la mitostatina o la plectina (Eckert, 1986; Gentil *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2016; Mose-Larsen *et al.*, 1982; Nekrasova *et al.*, 2011). Además, los filamentos de actina intervienen en la dinámica mitocondrial, ya que son necesarios para el reclutamiento de la proteína Drp1 implicada en los procesos de fisión mitocondrial (Hatch *et al.*, 2016). Este proceso se realiza mediante uniones transitorias de la actina a subpoblaciones de mitocondrias. Esta unión marca los sitios específicos de fisión/fusión en la red mitocondrial (Moore *et al.*, 2016).

Estas interacciones entre el citoesqueleto y la mitocondria no sólo jugarían un papel en la disposición y regulación de la red mitocondrial, sino también en la modulación de la respiración mitocondrial y la apoptosis (Cassimeris *et al.*, 2012; Rostovtseva *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2001). Por ejemplo, la actina es un biosensor que determina el destino celular en levaduras (Smethurst *et al.*, 2014) y la alteración de la relación actina-G/actina-F puede ser un desencadenante del proceso de apoptosis (Franklin-Tong & Gourlay, 2008). Así mismo, se ha demostrado que tanto los filamentos de actina como los microtúbulos se unen a las mitocondrias a través de su interacción directa con el poro de aniones dependiente de voltaje o VDAC, localizado en la membrana externa mitocondrial. Dicha interacción parece ejercer un papel regulador de la homeostasis metabólica de la mitocondria (Carré *et al.*, 2002; Roman *et al.*, 2006).

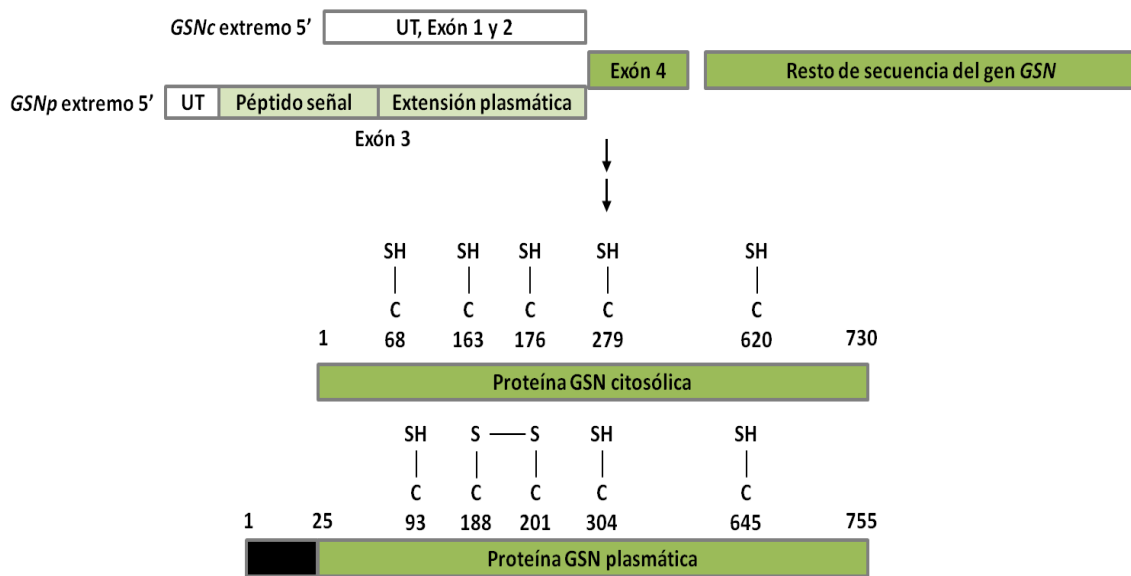
## 7. GELSOLINA (GSN).

La gelsolina es una proteína de unión a actina y dependiente de calcio descrita por primera vez en 1979 (Yin & Stossel, 1979). Su función principal consiste en regular la formación y estabilidad de los filamentos de actina, tanto la nucleación de los monómeros de actina para la elongación del filamento, como su corte y desensamblaje (Sun *et al.*, 1999; Yin & Stull, 1999).

### 7.1 Genética.

El gen que codifica para la Gelsolina humana (*GSM*) (ID: 2934), se encuentra localizado en el cromosoma 9 (Kwiatkowski *et al.*, 1986; Kwiatkowski *et al.*, 1988). Dicho gen codifica para las tres isoformas descritas de la Gelsolina: la isoforma 1 o plasmática y las isoformas 2 y 3, las cuales tienen localización citosólica. El gen está compuesto de 14 exones y se expande una longitud total

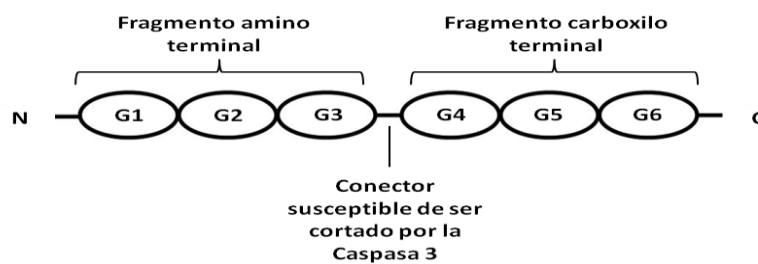
de 70 Kb. Posee dos sitios de inicio de la transcripción repartidos en los exones 1 y 3 (Figura 5). El doble sitio de inicio de la transcripción y el procesamiento o *splicing* alternativo de los ARN mensajeros, marcan la diferencia entre las diferentes isoformas de la Gelsolina. Los ARNm correspondientes a las isoformas citosólicas, tienen su punto de inicio en el exón 1 y mediante un proceso de *splicing*, los exones 1 y 2, que no se traducen, empalman directamente con el 4. Sin embargo, los ARNm de la isoforma plasmática inician su transcripción en el exón 3 y empalman directamente con el exón 4 (Kwiatkowski *et al.*, 1988; Yin *et al.*, 1984). El exón 3 codifica el péptido señal de la isoforma secretada (el cual se procesa cuando la proteína llega a la circulación) y para una cola extra de 24 aminoácidos, que le confiere a la isoforma secretada un peso molecular más alto (83 kDa) que la isoforma citosólica 2 (80 kDa), la cual se expresa de forma ubicua. La isoforma citosólica 3 (81 kDa) es minoritaria y sólo se expresa en los testículos, pulmones y en los oligodendrocitos del cerebro. Se diferencia de la isoforma 2 en que posee 11 aminoácidos adicionales en el extremo amino terminal (Vouyiouklis & Brophy, 1997).



**Figura 5. Estructura del ADN Complementario (ADNc) para las isoformas citosólica y plasmática de la Gelsolina humana.** Se muestra la diferente reordenación del extremo 5' en los ADNc de las isoformas mayoritarias de la GSN, así como el producto resultante de su traducción. Se indican las posiciones de **UT**: región no traducida, **GSNc**: Gelsolina citosólica, **GSNp**: Gelsolina plasmática, **aa**: número de aminoácidos, **SH**: grupos tiol libres (modificado de (Li *et al.*, 2012)).

### 7.2 Estructura de la gelsolina y relación funcional con el citoesqueleto.

La estructura de la gelsolina se basa en la sucesión de seis dominios estructurales de 120-130 aminoácidos cada uno, denominados como G1-G6. Cada uno de estos dominios tiene un sitio de unión a calcio, el cual juega un papel muy importante en la activación y estabilización de la gelsolina (Nag *et al.*, 2009). Los seis dominios se agrupan tres a tres, formando dos estructuras homólogas y que dividen a la proteína en un fragmento N (amino) y un fragmento C (carboxilo). Ambos extremos están separados entre los dominios G3 y G4 por un fragmento conector, el cual es susceptible de ser cortado por la caspasa 3 (Kamada *et al.*, 1998; Kothakota *et al.*, 1997) (Figura 6).



**Figura 6. Estructura de la gelsolina.** La gelsolina consta de seis dominios estructurales de 120-130 aminoácidos, denominados como G1-G6. Dichos dominios se agrupan tres a tres, formando dos estructuras homólogas: extremo N (amino) y extremo C (carboxilo). Ambos extremos están separados por un fragmento conector que puede ser cortado por la caspasa 3.

La gelsolina regula el mantenimiento y la oligomerización de los filamentos de actina de forma dependiente del pH, fosfoinosítoles, ácido lisofosfatídico y concentraciones micromolares de calcio (Meerschaert *et al.*, 1998; Yin and Stossel, 1979) (Figura 7).

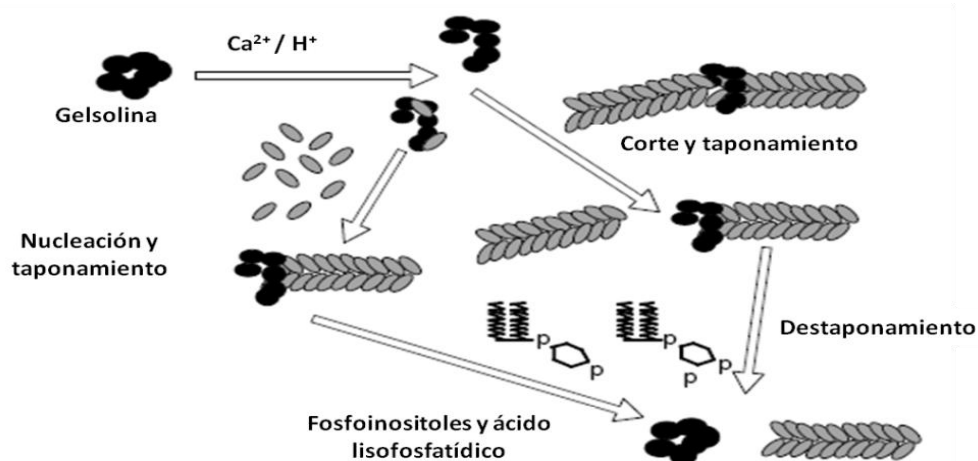
Para que la gelsolina citosólica proceda a ser funcional se necesita un proceso de activación, el cual conlleva un cambio de conformación de la proteína. Para ello, es necesario un aumento de la concentración de calcio o una bajada del pH ( $\text{pH} < 6,5$ ). El proceso de activación de la gelsolina consta de dos pasos: 1) la transición del estado inactivo de la gelsolina a un estado intermedio, para lo cual se requiere una concentración de  $0,1-5 \mu\text{M}$  de calcio; 2) la transición del estado intermedio a un estado activado gracias a la presencia de calcio a una concentración de  $10 \mu\text{M}-1\text{mM}$  (Ashish *et al.*, 2007; Kiselar *et al.*, 2003).

En la conformación inactiva de la gelsolina citosólica, la cola del extremo C-terminal está unida al dominio G2 del extremo N-terminal, impidiendo que éste se pueda unir a los filamentos de actina. En la conformación activa, el dominio G2 queda liberado y junto al dominio G1 se puede unir a los filamentos de actina, lo que dará lugar a la ruptura de las uniones hidrofóbicas



entre dos monómeros del filamento, resultando en su procesamiento (McLaughlin *et al.*, 1993). Después del corte del filamento, la gelsolina se asocia a uno de los fragmentos resultantes para evitar su elongación. Para que la gelsolina se desprege y se de paso a la elongación de los filamentos de actina, es necesaria la presencia de fosfoinositoles (Janmey & Stossel, 1989) o de ácido lisofosfatídico (Meerschaert *et al.*, 1998), los cuales inhiben la unión del extremo N-terminal de la gelsolina a la actina.

Además, la isoforma plasmática de la gelsolina forma parte del sistema extracelular de captación y eliminación de la actina (EASS, *Extracellular Actin-Scavenging System*) (Lee & Galbraith, 1992). Este sistema es de crucial importancia, ya que se encarga de la eliminación de la actina liberada al torrente sanguíneo por parte de células rotas por estrés mecánico o por necrosis. Las condiciones de pH, temperatura, fuerza iónica y composición del plasma sanguíneo son idóneas para la polimerización de los filamentos de actina, lo cual tiene efectos perjudiciales debido al aumento de la viscosidad de la sangre y el taponamiento de pequeñas arterias (Haddad *et al.*, 1990). Por tanto, la función de la gelsolina plasmática es esencial para la despolimerización de los filamentos de actina en monómeros que puedan ser fácilmente eliminados a través de otros componentes del sistema EASS (Peddada *et al.*, 2012).



**Figura 7. Funcionamiento de la gelsolina sobre los filamentos de actina.** En presencia de calcio o de un pH<6,5, la gelsolina sufre un cambio de conformación pasando de un estado inactivo a uno activo, en el cual corta y tapona los filamentos de actina no permitiendo su posterior elongación. Para el destaponamiento de los filamentos es necesaria la presencia de fosfoinositoles o ácido lisofosfatídico, los cuales inhiben la unión de la gelsolina a la actina (modificado de (Kwiatkowski, 1999)).

### 7.3 Gelsolina y apoptosis.

La gelsolina ejerce un papel importante en la regulación de la apoptosis, favoreciendo o inhibiendo este proceso en función de las condiciones patológicas, el tipo celular y los tejidos involucrados (Geng *et al.*, 1998; Kothakota *et al.*, 1997; Koya *et al.*, 2000; Kusano *et al.*, 2000; Qiao *et al.*, 2005).

El efector de la apoptosis caspasa 3 corta a la gelsolina entre los aminoácidos Asp<sup>352</sup> y Gly<sup>353</sup> generando dos fragmentos con pesos moleculares de 39 kDa (amino o N-terminal) y 41 kDa (carboxilo o C-terminal) (Kothakota *et al.*, 1997). Las caspasas 7 y 9 cortan a la gelsolina de forma similar que la caspasa 3 (Azuma *et al.*, 2000; Jänicke *et al.*, 1998). El fragmento N-terminal resultante actúa como un factor proapoptótico, ya que corta a los filamentos de actina de manera independiente de calcio y contribuye a los cambios morfológicos celulares propios de la apoptosis (Kothakota *et al.*, 1997; Geng *et al.*, 1998). Además, el fragmento N-terminal causa la liberación de la desoxiribonucleasa (DNasa 1) de un complejo ternario, promoviendo la degradación del ADN nuclear y el desarrollo del mecanismo de apoptosis (Li *et al.*, 2009; Mannherz *et al.*, 1995).

Por el contrario, tanto el fragmento C-terminal como la gelsolina intacta actúan generalmente como agentes antiapoptóticos. Ambos péptidos se unen a la proteína de la membrana mitocondrial externa VDAC (Kusano *et al.*, 2000; Koya *et al.*, 2000), la cual desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis metabólica de la mitocondria (Baines *et al.*, 2007; Galluzzi & Kroemer, 2007). Dicha unión evita la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la liberación de citocromo *c* al citosol, lo cual evitaría la activación de las caspasas 3, 8 y 9 y el proceso de apoptosis. Así mismo, la sobreexpresión de la gelsolina ejerce un efecto protector en modelos murinos de la enfermedad de Alzheimer, ya que previene el efecto citotóxico inducido por el péptido  $\beta$ -amiloide tanto sobre la función mitocondrial como sobre la muerte celular (Antequera *et al.*, 2009; Qiao *et al.*, 2005; Vargas *et al.*, 2010).

### 7.4 Otras funciones de la gelsolina.

Además de participar en la regulación de los filamentos de actina y en la apoptosis, la gelsolina está implicada funcionalmente en otros procesos celulares.

Se ha descrito que la gelsolina participa en la regulación de la señalización celular en distintas rutas de transducción de señales. Particularmente, la gelsolina actuaría como efector sobre importantes dianas en la señalización celular como son la fosfolipasa C (Brandt *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 1997; Thor *et al.*, 2001) o las GTPasas ras y rac (Azuma *et al.*, 1998; De Corte *et al.*, 2002). Ello hace que la gelsolina sea especialmente relevante en la investigación del cáncer (Thor *et al.*, 2001; Turner *et al.*, 1996).

La gelsolina también juega un papel importante en el proceso de fagocitosis mediada por receptores, como el receptor Fc o las integrinas (Arora *et al.*, 1999; Arora *et al.*, 2004; Serrander *et al.*, 2000; Witke *et al.*, 2001).

Por otro lado, varias proteínas de la familia de la gelsolina regulan la transcripción génica. La propia gelsolina se une al receptor de andrógenos para facilitar su translocación al núcleo, donde actúa como activador transcripcional (Nishimura *et al.*, 2003; Sampson *et al.*, 2001; Ting *et al.*, 2002). Asimismo, la gelsolina interacciona con el receptor  $\beta 1$  de la hormona tiroidea incrementando su actividad transcripcional en el núcleo de células tiroideas (Kim *et al.*, 2007). Además, el factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1) y la gelsolina interactúan en el núcleo celular durante el proceso de hipoxia, lo que induce la activación de la expresión de varios genes, entre ellos la del propio gen *GSN* (Greijer *et al.*, 2005).

### 7.5 Gelsolina y enfermedad.

Las mutaciones en el gen *GSN* que codifica para la Gelsolina humana, constituyen la causa principal de la amiloidosis hereditaria, una enfermedad autosómica dominante de origen finlandés que se caracteriza clínicamente por síntomas neurológicos, oftalmológicos y dermatológicos (Chen *et al.*, 2001; Maury, 1991).

Las alteraciones de los niveles de las distintas isoformas de la Gelsolina se han asociado a diversas enfermedades o condiciones patológicas. Por ejemplo, se ha observado un incremento de la Gelsolina citosólica en tejido cardíaco procedente de pacientes con alteraciones cardiovasculares (Yang *et al.*, 2000), en modelos celulares de estrés oxidativo (Ji *et al.*, 2008) y en células y tejidos senescentes (Ahn *et al.*, 2003). Contrariamente, se ha descrito que los niveles de Gelsolina plasmática están disminuidos en sangre de pacientes con cáncer (Asch *et al.*, 1999; Dosaka-Akita *et al.*, 1998; Prasad *et al.*, 1997; Sagawa *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 1995); artritis reumatoide (Aidinis *et al.*, 2005; Osborn *et al.*, 2008); en casos de fallo hepático agudo, infartos de miocardio, necrosis muscular, shock séptico, daño agudo en los pulmones y trasplantes de tejidos (Christofidou-Solomidou *et al.*, 2002; DiNubile *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2007; Mounzer *et al.*, 1999; Suhler *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2008). Además, se ha establecido una correlación entre los niveles bajos de Gelsolina plasmática y la evolución negativa de diversas enfermedades o cuadros clínicos como: pacientes traumatológicos en la UCI (Lee *et al.*, 2006; Mounzer *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2008), disfunciones renales crónicas (Lee *et al.*, 2009), enfermedades inflamatorias crónicas (Osborn *et al.*, 2008; Kułakowska *et al.*, 2010; Rithidech *et al.*, 2009), enfermedades infecciosas (Smith *et al.*, 1988), isquemia cerebral (Guo *et al.*, 2011) y Alzheimer (Güntert *et al.*, 2010). Por

## INTRODUCCIÓN

ello, los niveles de Gelsolina plasmática se han propuesto como un marcador pronóstico de salud y enfermedad (Peddada *et al.*, 2012).

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

---



Los déficits enzimáticos del sistema OXPHOS mitocondrial comprenden un grupo muy heterogéneo de enfermedades con fenotipos clínicos de severidad variable, que pueden originarse tanto en niños como en adultos. Esta variabilidad clínica, junto a la ausencia de biomarcadores específicos, dificulta enormemente el diagnóstico de estas enfermedades. Desde el punto de vista clínico y genético, estas patologías pueden ser causadas por mutaciones en el genoma nuclear o en el genoma mitocondrial, presentes tanto en subunidades de los complejos como en factores reguladores de su ensamblaje, mantenimiento o funcionamiento.

El principal objetivo de esta tesis ha sido la identificación, validación y caracterización funcional de nuevos biomarcadores de enfermedad mitocondrial OXPHOS, tomando como base estudios previos que revelaron nuevos mecanismos fisiopatológicos asociados al déficit enzimático del complejo III (Marín-Buera *et al.*, 2015). Este trabajo se ha centrado en la caracterización de la función mitocondrial de la proteína Gelsolina, cuya expresión aumentó significativamente en fibroblastos de pacientes con déficit enzimático de complejo III. Los objetivos concretos de esta tesis han sido:

- 1) Discriminar si el incremento de los niveles de Gelsolina citosólica es específico del déficit enzimático de complejo III u ocurre como respuesta general a la disfunción de la cadena respiratoria mitocondrial. Analizar los mecanismos moleculares desencadenantes del aumento de los niveles de la Gelsolina citosólica, e identificar el papel funcional que juega esta proteína en la mitocondria.
- 2) Analizar la relación entre los niveles de las isoformas citosólica y secretada de la Gelsolina en distintos modelos celulares de enfermedad del sistema OXPHOS, a fin de definir su contribución como nuevo indicador de disfunción mitocondrial.
- 3) Cuantificar los niveles de Gelsolina plasmática en sangre de pacientes diagnosticados bioquímica y/o genéticamente con enfermedad mitocondrial del sistema OXPHOS. Establecer si los niveles de Gelsolina plasmática pueden servir como un nuevo biomarcador para el diagnóstico y/o pronóstico de estas enfermedades.





## **MATERIALES Y MÉTODOS**

---





### 1. PACIENTES Y CONTROLES.

En este trabajo se han utilizado muestras celulares y plasmáticas procedentes de pacientes con déficits enzimáticos variables de la cadena respiratoria, así como de individuos control sin patología mitocondrial asociada.

#### 1.1 Muestras celulares.

##### 1.1.1 Fibroblastos de pacientes con déficit enzimático del complejo III.

En primer lugar, se utilizaron fibroblastos primarios procedentes de biopsias de piel de 4 pacientes con mutaciones en el gen *BCS1L*. Previamente, se había detectado un déficit enzimático primario del complejo III aislado o combinado con déficits de los complejos I o IV de la cadena respiratoria mitocondrial, en muestras de músculo esquelético de estos pacientes. Las mutaciones en *BCS1L* fueron caracterizadas genética y bioquímicamente para demostrar su patogenicidad (Blázquez *et al.*, 2009; De Meirleir *et al.*, 2003; Gil-borlado *et al.*, 2009; Lonlay *et al.*, 2001; Morán *et al.*, 2010). A continuación, se resumen brevemente las clínicas de los pacientes de estudio:

- **Paciente 1:** La paciente 1 (P1) era una niña nacida de padres consanguíneos de origen turco y que falleció a los 11 días de edad. 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. En base a las características clínicas descritas de la paciente, el gen *BCS1L* se secuenció directamente sin practicar biopsia muscular y se observó la mutación c.296C>T en homocigosis (Morán *et al.*, 2010).
- **Paciente 2:** El paciente 2 (P2) presentó las mutaciones en heterocigosis c.133C>T y c.166C>T (De Meirleir *et al.*, 2003). En resumen, este paciente presentó acidosis láctica, hipoglucemia, hipotonía, hepatopatía y un meconio grueso. Además, presentó encefalopatía, tubulopatía y fallo en el crecimiento. Las actividades enzimáticas de cadena respiratoria presentaron un déficit aislado del complejo III en músculo y déficits combinados de los complejos I y III en fibroblastos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

- **Paciente 3:** El paciente 3 (P3) presentó las mutaciones en heterocigosis c.166C>T, g.1181A>G y g.1164C>G (Gil-borlado *et al.*, 2009). Este paciente cursó con 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 y un déficit combinado de los complejos III y IV en fibroblastos de piel.
- **Paciente 4:** El paciente 4 (P4) presentó la mutación en homocigosis c.148A>T (Blázquez *et al.*, 2009). Este paciente 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 y fibroblastos reveló un déficit enzimático aislado del complejo III.

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

- 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.
- Fibroblastos provenientes de familiares de pacientes para los que no hubo evidencia de enfermedad mitocondrial, en un rango de edades desde la infancia a la edad adulta. Estas muestras proceden del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre y se han denominado C4 y C5.

### 1.1.2 Cíbridos transmitocondriales.

Debido a la dificultad de realizar mutagénesis dirigida en el ADN mitocondrial (ADNmt), se han desarrollado técnicas para generar cíbridos transmitocondriales. Los cíbridos permiten el estudio de los mecanismos patogénicos asociados a mutaciones en el ADNmt (King & Attardi, 1989), ya que permiten expresar un ADNmt previamente seleccionado en células con un fondo nuclear fijo. Por tanto, estas células se caracterizan por poseer todas ellas el mismo fondo

genético nuclear pero diferente carga genética mitocondrial (King & Attardi 1996; Chalmers *et al.*, 1996).

Para su construcción, se necesita de líneas carentes de ADNmt denominadas *rho zero* (Hayashi *et al.*, 1991; King & Attardi, 1989). Dichas líneas se obtienen a partir de la línea celular de osteosarcoma 143B-TK mediante tratamiento con bromuro de etidio. Estas células pueden ser posteriormente repobladas con mitocondrias mediante fusión, bien con citoplastos enucleados (King & Attardi, 1989), o bien con plaquetas portadoras del ADNmt con la mutación patogénica de estudio (Chomyn *et al.*, 1994). De este modo, utilizando la misma línea *rho zero* y diferentes donantes de ADNmt, se obtienen líneas celulares que comparten el mismo fondo genético nuclear pero difieren en su ADNmt. Así, las diferencias fenotípicas que se puedan observar entre células serán debidas necesariamente a los ADNmt que contienen.

Los cíbridos transmitocondriales han sido utilizados para distintos estudios: el efecto fenotípico de las mutaciones patogénicas en el ADNmt (Brown *et al.*, 2001; D'Aurelio *et al.*, 2001; Hayashi *et al.*, 1991; Trounce *et al.*, 1994; Vergani *et al.*, 1995; Vives-Bauza *et al.*, 2006), las consecuencias bioquímicas y fisiológicas de los haplogrupos mitocondriales (Gomez-Duran *et al.*, 2010; Pello *et al.*, 2008), el efecto del fondo genético nuclear sobre la segregación de las mutaciones patogénicas en el ADNmt (Dunbar *et al.*, 1995), el análisis de la recombinación heteróloga del ADNmt en células humanas (D'Aurelio *et al.*, 2004), la compatibilidad ADNmt-ADN nuclear entre especies (Barrientos *et al.*, 1998; Bayona-Bafaluy *et al.*, 2005) y la biogénesis del sistema OXPHOS (Moreno-Lastres *et al.*, 2012). Sin embargo, su uso posee ciertas limitaciones tales como la heterogeneidad de sus cromosomas, su aneuploidía, su selección mediante agentes mutagénicos, o la dificultad de extrapolación de los resultados a tejidos del organismo (Swerdlow, 2007).

En este trabajo, se utilizaron cíbridos transmitocondriales derivados de células *rho zero* fusionadas en presencia de 50% (p/V) de polietilenglicol con fibroblastos enucleados de los pacientes que presentaban las mutaciones de interés, siguiendo los protocolos establecidos (King & Attardi, 1989). Concretamente, se han utilizado cuatro líneas de cíbridos con alteraciones enzimáticas de la cadena respiratoria debido a las siguientes mutaciones homoplásmicas en el ADN mitocondrial:

- **Cíbridos ND2-KD:** Mutación m.4681T>C en la subunidad ND2 del complejo I, detectada en homoplasmia en un paciente con Síndrome de Leigh y una reducción de la actividad enzimática del complejo I en músculo y fibroblastos, equivalente al 42% del valor del control más bajo (Ugalde *et al.*, 2007).

## MATERIALES Y MÉTODOS

- **Cíbridos CYB-KO:** Deleción de cuatro pares de bases en la región 5' del gen *MT-CYB*, el cual codifica para la subunidad Citocromo *b* del complejo III. Esta mutación se describió en heteroplasmia en un paciente que presentó acidosis láctica, encefalomiopatía y episodios de ictus (Rana *et al.*, 2000). Estos cíbridos fueron cedidos por el Dr. C. Moraes (*University of Miami Miller School of Medicine, Miami, USA*).
- **Cíbridos COX1-KO:** Mutación m.6930G>A en la subunidad COX1 del complejo IV, detectada en heteroplasmia en un paciente con enfermedad mitocondrial multisistémica y una reducción de la actividad del complejo IV o citocromo c oxidasa del 90% en músculo (Bruno *et al.*, 1999). Cedidos por el Dr. G. Manfredi (*Weill Cornell Medical College, New York, USA*).
- **Cíbridos COX2-KO:** Mutación m.7896G>A que afecta a la subunidad COX2 del complejo IV, detectada en heteroplasmia en un paciente que cursó con enfermedad multisistémica de inicio temprano, microcefalia, hipotonía, hipertrofia ventricular, retinitis pigmentaria y una reducción del 87% de la actividad citocromo c oxidasa en tejido muscular (Campos *et al.*, 2001). Cedidos por el Dr. A. Enríquez (Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III, Madrid, España).

Además, se generaron controles isogénicos de cada uno de los cíbridos con mutaciones en el ADN mitocondrial, excepto para la línea ND2-KD. También se utilizaron como controles experimentales la línea celular derivada de osteosarcoma humano 143B-TK<sup>+</sup> y las células embrionarias humanas de riñón HEK293T.

### 1.2 Muestras sanguíneas.

En la realización de este trabajo también se han utilizado muestras de plasma sanguíneo de pacientes pediátricos y adultos con patología mitocondrial, los cuales acudieron a los Servicios de Neuropediatría o de Neurología del Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid). En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado siguiendo la normativa del Comité Ético del Hospital 12 de Octubre, compatible con la Declaración de Derechos Humanos de Helsinki. Las principales características clínicas de los pacientes del estudio se describen en las Tablas 4 y 5 de la sección 2.4 de Resultados.

Como controles del estudio de los pacientes pediátricos, se utilizaron muestras sanguíneas de individuos sin patología mitocondrial recogidas en el laboratorio de 24 horas

(CORE) del Hospital 12 de Octubre. Para el caso de los adultos, se utilizaron muestras sanguíneas recogidas entre los trabajadores del propio hospital.

### 2. MATERIALES.

#### 2.1 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 & Russel, 2001). La composición de los medios y materiales específicos utilizados en cada experimento viene detallada y descrita en el apartado de Métodos o en la bibliografía correspondiente.

#### 2.2 Vectores de expresión génica.

Los vectores plasmídicos utilizados para la sobreexpresión de proteínas, son los siguientes (OriGENE):

- **Vector GSN + Myc:** Plásmido pCMV6 con el ADN complementario (ADNc) de *Gelsolina* (GSN) unido en su extremo carboxilo terminal al epítipo Myc-DDK.
- **Vector GSN + GFP:** Plásmido pCMV6 con el ADNc de *GSN* unido en su extremo carboxilo terminal al epítipo GFP.
- **Vector Vacío (vv):** Plásmido pCMV6 con el epítipo GFP ó con el epítipo Myc-DDK.

#### 2.3 Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos (IDT y OriGENE) para la amplificación del ADNc de la *GSN*, se diseñaron y analizaron con el programa *Oligo Analyzer*. Dicho ADNc es un fragmento de 2719 pb, por lo que se diseñaron 4 oligonucleótidos para amplificarlo en dos fragmentos. Los oligonucleótidos sentido se indican con la letra "F" y los oligonucleótidos antisentido se indican con la letra "R". Estos oligonucleótidos son:

- VP1.5F1. Su secuencia es 5'-GGACTTTCCAAAATGTCG-3' y tiene una temperatura de anillamiento (Tm) de 56°C.

## MATERIALES Y MÉTODOS

- GSNR1. Su secuencia es 5'-TGTTCCACCACCATGCTG-3' y tiene una Tm de 55°C.
- GSNF2: Su secuencia es 5'-CGTCATGCTTCTGGACACC-3' y tiene una Tm de 56°C.
- XL39.R2: Su secuencia es 5'-ATTAGGACAAGGCTGGTGG-3' y tiene una Tm de 58°C.

### 2.4 ARNs pequeños de interferencia o de silenciamiento (siRNAs).

Los siRNAs utilizados para el silenciamiento del ARNm de *GSN* son los siguientes:

- siRNA de *GSN* (NM\_000177) SASI\_Hs01\_00209953 (Sigma), cuya secuencia es: 5'- CUGUUGAGGUAAUUGCCUAAUUAGGCAAUACCUCAACAG-3'.
- siRNA de *GSN* (NM\_000177) SASI\_Hs01\_00209954 (Sigma), cuya secuencia es: 5'- GACUGAAGGCCACACAGGUACCUGUGUGGCCUUCAGUC-3'.
- siRNA control negativo universal #1 *MISSION*<sup>®</sup> (Sigma). N<sup>o</sup> referencia: SIC\_001.

### 2.5 Anticuerpos.

Las principales características técnicas de los anticuerpos primarios utilizados en las inmunoprecipitaciones, inmunofluorescencias y en los análisis de *Western blot*, se detallan en la Tabla 2. En la Tabla 3 se describen las características técnicas de los anticuerpos secundarios utilizados.

**Tabla 2. Anticuerpos primarios empleados en este estudio.**

ANTICUERPO	PESO MOLECULAR	ORIGEN	FABRICANTE	UTILIDAD Y DILUCIÓN
Caspasa 3	35/19/17 kDa	Conejo	Cell signaling technology	WB 1:1000
Citocromo c	15 kDa	Ratón	BD Biosciences	WB 1:1000
CORE 2	48,5 kDa	Ratón	Abcam	WB 1:2000
COX5A	16,8 kDa	Ratón	Abcam	WB 1:1000
Gelsolina	83 kDa	Ratón	Sigma	WB 1:1000



Gelsolina	83 kDa	Conejo	Abcam	IF/IP/WB 1:1000
NDUFA9	39 kDa	Ratón	Abcam	WB 1:1000
NDUFB8	22 kDa	Ratón	Abcam	WB 1:1000
NDUFS1	79 kDa	Conejo	Abcam	WB 1:1000
RISP	29,6 kDa	Conejo	Abcam	WB 1:500
SDHA	70 kDa	Ratón	Abcam	WB 1:10000
TOM20	20 kDa	Ratón	Santa Cruz	WB 1:1000
VDAC1	31 kDa	Ratón	Abcam	IF/IP/WB 1:1000
$\alpha$ - H <sup>+</sup> -ATP sintasa	50 kDa	Ratón	Abcam	WB 1:1000
$\beta$ -Actina	42 kDa	Ratón	Sigma	WB 1:20000

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 3. Anticuerpos secundarios empleados en este estudio.**

ANTICUERPO	ORIGEN	ACOPLADO A	FABRICANTE	UTILIDAD Y DILUCIÓN
Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 anti-IgG de conejo	Cabra	Alexa Fluor 488	Molecular probes	IF 1:1000
FITC anti-IgG1 de ratón	Conejo	FITC	Molecular probes	IF 1:1000
TXRD anti-IgG2b de ratón	Cabra	Texas Red	Molecular probes	IF 1:1000
Anti-IgG de ratón	Cabra	Peroxidasa	ThermoFisher	WB 1:2000
Anti-IgG de conejo	Cabra	Peroxidasa	ThermoFisher	WB 1:2000

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

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 3. MÉTODOS.

#### 3.1 Obtención del plasma a partir de muestras sanguíneas.

De los pacientes e individuos control, previa cumplimentación del consentimiento informado, se extrajeron 4 ml de sangre en tubos con anticoagulante EDTA. Las muestras se centrifugaron a 2280 g durante 5 minutos utilizando el freno progresivo de la centrífuga. Se descartó el sedimento y se obtuvo el plasma sanguíneo, el cual se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos para obtener un plasma pobre en plaquetas. El sobrenadante se dividió en alícuotas de 100 µl y se guardó a -80°C hasta su uso posterior.

#### 3.2 Cultivos celulares.

Las células se cultivaron a una temperatura de 37°C en una atmósfera del 5% CO<sub>2</sub>, 95% aire y 99% de humedad. Para los cultivos primarios de fibroblastos procedentes de pacientes y de controles se utilizó el medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) con 1 g/l glucosa (Invitrogen). Para las líneas de híbridos mitocondriales se usó el mismo medio con 4,5 g/l glucosa. Ambos medios se complementaron con suero fetal bovino (FBS: *fetal bovine serum*) al 10% y 100 U/ml de penicilina/estreptomicina (Lonza). En el caso de los híbridos también se añadieron 50 µg/ml de uridina (Lonza).

Para la congelación de las células se utilizó una solución de congelación que consta de medio de cultivo DMEM complementado más un 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma). Una vez desagregadas las células con Tripsina-EDTA (0,2 mg/ml tripsina, 0,22 mg/ml EDTA) (Lonza), éstas se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C. A continuación, se resuspendieron en 1 ml de la solución de congelación y se colocaron en criotubos (Nunc, ThermoFisher) dentro de contenedores con 2-propanol (Sigma) a temperatura ambiente. Se depositaron en congeladores de -80°C durante 24 horas y posteriormente se almacenaron en N<sub>2</sub> líquido.

La descongelación de las diferentes líneas se realizó mediante inmersión de criotubos en un baño a 37°C y su posterior cultivo.

Para el subcultivo de las distintas líneas celulares, éstas se desagregaron de la placa mediante un tratamiento con Tripsina-EDTA. Posteriormente se sembraron en botellas o placas de cultivo de diferentes tamaños (Nunc, ThermoFisher), en función del número de células necesarias para cada experimento. Los fibroblastos y híbridos se pasaron cuando alcanzaron el 80-90% de confluencia, mediante dilución 1/6 en controles y 1/3-1/4 en pacientes.

Para la obtención de muestras celulares, los fibroblastos y híbridos se levantaron mediante tratamiento con Tripsina-EDTA durante 2 minutos a 37°C y se centrifugaron a 1500 rpm

a 4°C. Posteriormente, los sedimentos (*pellets*) se lavaron dos veces con PBS (Lonza) y se guardaron a -80°C hasta su uso posterior.

### 3.2.1 Tratamiento de cultivos celulares con antimicina A.

Se partió de una solución madre de antimicina A a una concentración de 47 µM solubilizada en etanol al 98%. Los fibroblastos neonatales control C1 y la línea celular control 143B-TK<sup>-</sup> se cultivaron en un medio DMEM complementado hasta que alcanzaron un 70% de confluencia. En ese momento, se añadió a los cultivos la antimicina A hasta alcanzar concentraciones de 2, 20, 200 y 500 nM. Los fibroblastos se incubaron durante un periodo de 48 horas en presencia del inhibidor y las células 143B-TK<sup>-</sup> durante periodos de 24 y 48 horas.

### 3.2.2 Tratamiento de cultivos celulares con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Las células control 143B-TK<sup>-</sup> se cultivaron en un medio DMEM complementado hasta que alcanzaron un 70% de confluencia. A continuación, se añadió peróxido de hidrógeno (Sigma) hasta alcanzar las concentraciones de 100, 200 y 500 µM. Las células se incubaron durante periodos de 6, 24 y 36 horas, antes de proceder a su recogida.

### 3.2.3 Tratamiento de cultivos celulares con estaurosporina.

Se partió de una solución madre del inductor de apoptosis estaurosporina (Merck Millipore), a una concentración de 1 mM solubilizada en DMSO. Los híbridos control se cultivaron en medio DMEM complementado hasta que alcanzaron un 70% de confluencia. A continuación, se añadió estaurosporina para alcanzar concentraciones finales de 1 y 2 µM. Las células se cultivaron durante periodos de 6, 15 y 24 horas.

### 3.3 Medida del consumo de O<sub>2</sub> en células.

Se plaquearon 9 x 10<sup>4</sup> fibroblastos neonatales control C1 por pocillo y se trataron con antimicina A, como se explica en el apartado 3.2.1, para a continuación medir su respiración basal a través del aparato *XF24 Extracellular Flux Analyzer* (Seahorse Bioscience). Para ello, al finalizar el tratamiento las células se incubaron durante una hora a 37°C en un incubador libre de CO<sub>2</sub> en presencia de un medio DMEM sin tamponar y suplementado con 1 g/l de glucosa, piruvato sódico

## MATERIALES Y MÉTODOS

1 mM y glutamina 2 mM. A continuación, se añadieron los inhibidores mitocondriales rotenona y antimicina A a una concentración final de 1  $\mu\text{M}$  y se calculó la respiración. Las medidas se normalizaron frente a la cantidad de proteína total presente en cada pocillo.

### 3.4 Medidas espectrofotométricas de las actividades enzimáticas de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial.

Las actividades enzimáticas de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial se midieron en homogenados de cultivos celulares de fibroblastos tratados con antimicina A.

El extracto celular se preparó a partir de  $15 \times 10^6$  células que se resuspendieron en 400-700  $\mu\text{l}$  del tampón 225 mM manitol, 75 mM sacarosa, 10 mM Tris-HCl, 0,1 M EDTA a pH 7,2. A continuación, las células se lisaron mediante sonicación (3 ciclos de 10 segundos a una amplitud de 15 micrones) y se midió la concentración de proteína mediante el *kit MicroBCA Protein Assay* (Pierce). Todas las muestras se llevaron a una concentración de 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Las actividades enzimáticas de la cadena respiratoria mitocondrial se midieron mediante espectrofotometría, usando un espectrofotómetro DU-650 (Beckman) con el *software* incorporado para la medida de las reacciones cinéticas.

#### 3.4.1 Medida de la actividad succinato deshidrogenasa (Complejo II).

La actividad de complejo II se midió como el incremento de la absorbancia a 600 nm que se produce debido a la reducción del diclorofenol-indofenol (DCPIP) ( $\epsilon = 19,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), la cual es una reacción acoplada a la actividad succinato deshidrogenasa que existe en el homogenado.

El medio de reacción contenía 500 mM de tampón fosfato a pH de 7,5, 200 mM de succinato, 5 mM de DCPIP, 10 mM de cianuro de potasio (KCN) y 0,2% de BSA-EDTA. A continuación se añadieron 40  $\mu\text{g}$  de proteína del homogenado celular y la actividad succinato deshidrogenasa se registró durante 3 minutos a una temperatura de 37°C, después de añadir 25 mM de decil ubiquinona que actúa como iniciador.

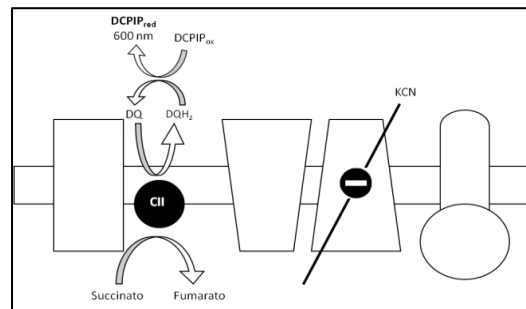


Figura 8. Esquema de la medida de la actividad del Complejo II.

### 3.4.2 Medida de la actividad citocromo *c* reductasa (Complejo III).

La actividad citocromo *c* reductasa se midió por el incremento de la absorbancia a 550 nm debido a la reducción del Citocromo *c* ( $\epsilon = 18,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) en presencia de ubiquinol y *Tween*-20.

El medio de reacción contenía 500 mM de tampón fosfato a un pH de 7,5, 10 mM de KCN, 50 mM de EDTA, 1 mM de Citocromo *c* y 2,5 % (v/v) de *Tween*-20. Se añadieron 20  $\mu\text{g}$  de proteína del homogenado celular y después de añadir 10 mM de decil ubiquinol como iniciador, la actividad citocromo *c* reductasa se registró durante 3 minutos a 37°C.

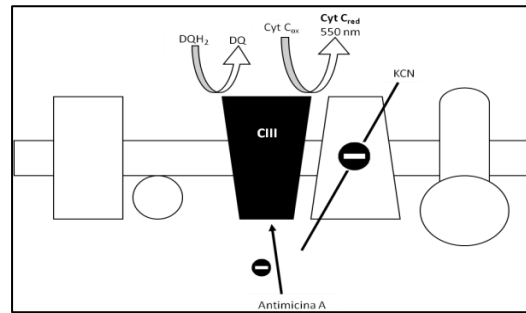


Figura 9. Esquema de la medida de la actividad del Complejo III.

### 3.4.3 Medida de la actividad citocromo *c* oxidasa (Complejo IV).

La actividad citocromo *c* oxidasa se midió como disminución de la absorbancia a 550 nm del Citocromo *c* reducido ( $\epsilon = 18,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), el cual se oxida en la reacción.

El medio de reacción contenía 100  $\mu\text{M}$  de Citocromo *c* (reducido 90-95%) en 50 mM de tampón fosfato a un pH de 7,0. A ello se añadieron 40  $\mu\text{g}$  de proteína del homogenado celular y la reacción se siguió durante 3 minutos a 37°C.

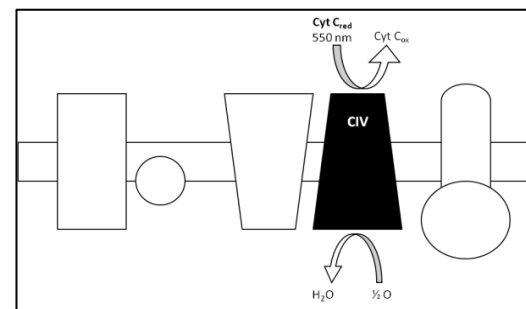


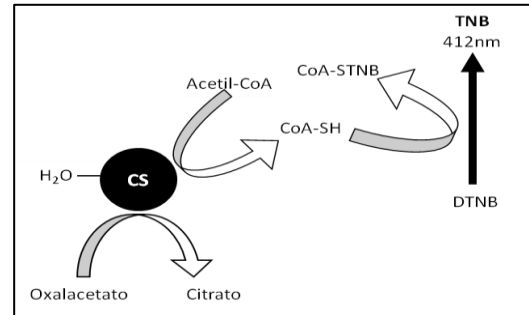
Figura 10. Esquema de la medida de la actividad del Complejo IV.

### 3.4.4 Normalización de las actividades de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial. Medida de la actividad citrato sintasa.

Los valores obtenidos de las actividades de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial se expresaron en relación a la actividad citrato sintasa, enzima de matriz mitocondrial frecuentemente utilizada como marcador intracelular de masa mitocondrial. Los resultados también se normalizaron respecto a la concentración total de proteínas del extracto celular.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La actividad citrato sintasa se cuantificó en función del cambio en la absorbancia a 412 nm por minuto producida por la reacción de 5 mM de DTNB (ácido 5-5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico) con 10 mM de coenzima A libre, formada por la condensación del acetil-CoA (350 µg/ml) con 10 mM de oxalacetato, en una solución tampón 1 mM de Tris-HCl pH de 8,1 y 10 % de Tritón X-100, a la cual se añadieron 40 µg de proteína del homogenado celular.



**Figura 11. Esquema de la medida de la actividad citrato sintasa.**

### 3.5 Determinación de especies reactivas del oxígeno (ROS) en células vivas, mediante el uso de la sonda *Amplex Red*.

La medida de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) se realizó en cíbridos transmitocondriales, utilizando el kit comercial *Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay kit* (Molecular Probes), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido por las células es el sustrato necesario para que la peroxidasa de rábano picante (HRP) transforme el *Amplex red* (N-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina) en resorufina ( $\epsilon = 58, \text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), cuya absorbancia se puede medir a 560 nm.

Se partió de cultivos celulares de cíbridos que se incubaron durante 30 min a 37°C con una solución mezcla donde estaba presente la sonda *Amplex red* y la peroxidasa HRP. A continuación, se midió la absorbancia de las muestras en el lector de placas EPOCH (Biotek). La cantidad relativa de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido se estimó mediante una recta patrón de calibrado previamente elaborada con concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los valores obtenidos se normalizaron frente a la cantidad de proteína total existente en cada muestra.

### 3.6 Inmunofluorescencia.

Esta técnica se basa en el uso de anticuerpos secundarios acoplados a fluorocromos. Gracias a la utilización de varios fluorocromos, la inmunofluorescencia se puede aplicar a distintas proteínas de forma simultánea, pudiendo así evaluar su localización subcelular mediante el análisis de doble o triple colocación entre dichas proteínas.

Los fibroblastos se sembraron en cubreobjetos de vidrio estériles y se colocaron en placas de 24 pocillos (Nunc, ThermoFisher). Cuando la confluencia de las células fue del 60-70% o al finalizar el periodo del tratamiento, los pocillos se lavaron dos veces con tampón fosfato salino

(PBS) (Lonza) durante 5 minutos y se procedió a la fijación, proceso que mantiene las propiedades fisicoquímicas de las células inalteradas. Para ello, se incubaron a 37°C durante 15 minutos en una solución previamente atemperada de paraformaldehído (PFA) (Sigma) al 4% en PBS.

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, las células se permeabilizaron durante 15 minutos con 0,1% Tritón X-100 y seguidamente, se bloquearon con un 10% de suero de cabra en PBS durante 60 minutos a temperatura ambiente.

Después del bloqueo, se incubaron los anticuerpos primarios citados en el apartado 2.5 de Materiales (Tabla 2). En el caso del anticuerpo que reconoce la proteína de membrana externa mitocondrial VDAC1 (*Voltage Dependent Anion-Channel*) se realizó un paso previo a la permeabilización, el cual consistió en hervir los cubreobjetos durante 10 minutos a 95°C con 200-300  $\mu$ L de la solución Tris 100 mM, Urea 5% pH 9.5. Después de este paso previo, se lavaron los cubreobjetos dos veces con 1mL de PBS y se procedió a la permeabilización igual que se ha indicado en el párrafo anterior.

Al cabo de una hora de incubación de los anticuerpos primarios, los cubreobjetos se volvieron a lavar cuatro veces durante 10 minutos con suero de cabra al 1% en PBS y a continuación, se incubaron los anticuerpos secundarios correspondientes (Tabla 3) durante una hora. Se retiró el anticuerpo secundario y los cubreobjetos se lavaron de la misma manera que para el anticuerpo primario. Tras el último lavado se pasaron por agua, se secaron y se montaron sobre el portaobjetos con *ProLong Gold* (Molecular Probes), dejándose secar 24 horas en la oscuridad. Al día siguiente se observaron con un objetivo 63x (Plan-apocromático NA=1.4.) en un microscopio confocal *Zeiss LSM 510 META* (Zeiss).

Las imágenes se obtuvieron a 1024×1024 píxeles (1 pixel=0,14  $\mu$ m) en un plano focal de 0,5  $\mu$ m. La colocalización entre GSN y VDAC1 se analizó usando el programa *ImageJv.1.45g* (Wayne Rasband, NIH). Para ello, se procedió a la separación de los canales de cada imagen original seguido del análisis mediante la aplicación del parámetro 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.

### 3.7 Sobreexpresión de la Gelsolina.

#### 3.7.1 Amplificación de plásmidos mediante transformación y cultivo bacteriano.

Como paso previo a la transformación de los plásmidos, se prepararon placas de LB-agar con kanamicina ó ampicilina utilizando el medio comercial *imMedia™* (Invitrogen) según las

## MATERIALES Y MÉTODOS

indicaciones del fabricante. Las placas se almacenaron a 4°C de forma invertida y protegidas de la luz hasta su uso.

A continuación, se procedió a la transformación de los plásmidos de interés (apartado 2.2 de Materiales) en bacterias competentes *E.Coli One Shot TOP10* (Invitrogen) siguiendo las especificaciones del fabricante. Brevemente, se descongeló en hielo una alícuota de 50 µl de las bacterias competentes (almacenadas a -80°C) por cada transformación. Una vez descongeladas, se añadieron 2 µl de plásmido y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Tras la incubación, se realizó el choque térmico a 42°C durante 35 segundos sin agitación. Rápidamente se transfirieron los viales al hielo donde se mantuvieron durante 2 minutos. Se añadieron 250 µl de medio SOC a cada vial y se incubaron a 37°C durante 1 hora a 250 rpm en agitación horizontal. Finalmente, se sembraron entre 50 y 250 µl de cada vial de transformación en las placas de LB-agar que contienen el antibiótico de selección correspondiente. Las bacterias transformadas se crecieron a 37°C durante la noche y al día siguiente se seleccionaron varias colonias, en las cuales se corroboró la presencia del ADNc de *GSN* mediante su amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) seguida de electroforesis en gel de agarosa (apartado 3.7.2). Las colonias seleccionadas se sembraron en 50 ml de LB con antibiótico de selección correspondiente y se incubaron a 37°C en agitación orbital durante la noche. A partir de estos cultivos bacterianos en medio líquido, se procedió a la purificación del ADN plasmídico mediante el uso del *kit* comercial *PureLink HiPure Plasmid Filter Midiprep* (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Después se determinó la concentración de ADN en cada muestra mediante espectrofotometría en un *Nanodrop® Spectrophotometer ND-1000*.

### **3.7.2 Verificación de la presencia del ADNc de *GSN* en el plásmido mediante PCR y electroforesis en geles de agarosa.**

Para comprobar que las bacterias transformadas contenían el plásmido con el inserto del ADNc de *GSN*, se llevó a cabo la amplificación mediante PCR para a continuación comprobar por electroforesis en geles de agarosa, que el tamaño de los fragmentos amplificados era el correcto.

Para la PCR se preparó una mezcla de reacción que contenía los siguientes reactivos a las concentraciones finales indicadas: 10X *Reaction Buffer* (Applied Biosystems), 50 mM MgCl<sup>2+</sup> (Applied Biosystems), 5 U/µL Taq ADN polimerasa (Applied Biosystems), una mezcla 1 mM de los 2'-Deoxinucleótidos 5'-Trifosfato (timidina, citosina, guanina y adenina) (VWR) y 10 µM de los oligonucleótidos o *primers* utilizados (apartado 2.3 de Materiales). A esta mezcla de reacción se añadió una pequeña muestra de la colonia bacteriana a comprobar. Las condiciones de la PCR



fueron: 5 minutos a 94°C, 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a la T<sub>m</sub> adecuada para cada pareja de oligonucleótidos y 1 minuto a 72°C, posteriormente 10 minutos a 72°C y un paso final a 4°C.

A las muestras amplificadas se les añadió 3 µl de tampón de carga (azul de metileno y sacarosa al 40%) y se sometieron a electroforesis en geles de agarosa (Pronadisa) al 1% con TAE (0,5x). Al gel se le añadió 8 µl de *GelRed™ Nucleid Acid* (BIOTIUM) para marcar al ADN. Terminada la electroforesis, se trasladó el gel al transiluminador de luz UV (Syngene) y el tamaño de los fragmentos amplificados se comprobó con el patrón de pesos moleculares *GeneRuler™ 100 bp Plus* (Life Sciences).

### 3.7.3 Transfección de plásmidos.

Las células se cultivaron en placas *petri* de cultivo de 100x20 mm (Nunc, ThermoFisher) hasta alcanzar un 70-80% de confluencia. A continuación, las células se transfectaron con 13 µg de los plásmidos descritos en el apartado 2.2 de Materiales, utilizando los reactivos *FuGENE* (Promega) ó Lipofectamina 2000 (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las células se recogieron a las 48 horas de la transfección.

### 3.8 Silenciamiento del ARN mensajero de *GSN*.

Los ARN interferentes pequeños o de silenciamiento (siRNAs), son moléculas de ARN bicatenario de aproximadamente 20 ó 21 nucleótidos con dos nucleótidos desemparejados en cada extremo 3'. Esta estructura puede tener un origen endógeno, proveniente del corte de moléculas largas de ARN bicatenario (dsRNA) en varios siRNAs gracias a la enzima Dicer (Bernstein *et al.*, 2001), o pueden ser también introducidos de forma exógena mediante transfección. La hebra antisentido de los siRNAs se ensambla en un complejo proteico denominado RISC (*RNA-induced silencing complex*) y es utilizada por dicho complejo como guía para identificar el ARNm complementario, al cual corta en dos mitades. Estos fragmentos del ARNm son degradados por la maquinaria celular, bloqueándose así la expresión del gen (Rana, 2007).

Se cultivaron las líneas celulares en placas *petri* de cultivo de 100x20 mm (Nunc, ThermoFisher) hasta alcanzar un 70-80% de confluencia. Se transfectó un total de 4 µg de una mezcla de dos siRNAs distintos (descritos en el apartado 2.4 de Materiales). Como control del experimento, el mismo número de células se transfectaron con 4 µg de un siRNA control negativo universal o *scramble* (descrito en el apartado 2.4 de Materiales). Se realizaron dos ciclos de

## MATERIALES Y MÉTODOS

transfección de 48 horas cada uno, para los cuales se utilizó el reactivo *X-tremeGENE siRNA* (Roche) según las especificaciones del fabricante. Las muestras obtenidas se procesaron según se especifica en el apartado 3.9.5.

### 3.9 Purificación de proteínas.

#### 3.9.1 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 realizó con un tampón isotónico (0,25 M Sacarosa, 20 mM Tris-HCl pH 7,8, 0,2 mM EDTA y 0,1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)) en el que se resuspendieron aproximadamente  $4 \times 10^6$  células. Posteriormente, se llevó a cabo la homogenización de la muestra mediante la utilización de homogeneizadores *ReadyPrep™ Minigrinders* (BioRad).

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 *pellet* como fracción mitocondrial.

La fracción citosólica se centrifugó otros 25 minutos a 10000 g y se descartó el *pellet*, el cual corresponde a los restos celulares y restos de la fracción mitocondrial.

La fracción mitocondrial se lavó dos veces con el tampón isotónico (centrifugando a 10000 g durante 25 minutos), para finalmente resuspenderla en 50  $\mu$ l de PBS y 0,1 mM PMSF.

En este punto, las fracciones citosólica y mitocondrial se trataron como se detalla en el apartado 3.9.5.

#### 3.9.2 Purificación de las mitocondrias.

Las mitocondrias procedentes de los diferentes modelos celulares utilizados se purificaron partiendo de un lisado celular, mediante el *kit* comercial *Mitochondria Isolation Kit MACS* (Miltenyi Biotec). Este *kit* se basa en la purificación magnética de mitocondrias, las cuales se marcan con un anticuerpo monoclonal acoplado a partículas metálicas que se une específicamente a la translocasa de membrana externa mitocondrial 22 (TOM22). El lisado celular con las mitocondrias marcadas, 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.

Una vez obtenidas las mitocondrias purificadas, éstas se trataron como se explica en el apartado 3.9.5.

### **3.9.3 Localización submitocondrial de proteínas mediante tratamiento con proteinasa K y detergente Tritón X-100.**

La proteinasa K es una enzima de origen fúngico que posee una actividad serina-proteasa de amplio espectro. Esta proteasa, al ponerla en contacto con fracciones mitocondriales purificadas, digiere la membrana externa mitocondrial y las proteínas presentes en el espacio intermembrana pero no consigue degradar la membrana mitocondrial interna, quedando por tanto las proteínas de la matriz a salvo de su actividad digestiva.

Se partió de fracciones mitocondriales purificadas (apartado 3.9.2), las cuales se resuspendieron y homogenizaron en 200  $\mu$ l del tampón 20 mM HEPES NaOH pH 7,4, 150 mM NaCl, 10% glicerol. A continuación, se midió la concentración de proteína utilizando el *kit Micro BCA Protein Assay* (Pierce) y la muestra se dividió en alícuotas de 30  $\mu$ g de proteína de extracto mitocondrial.

A algunas alícuotas se les añadió el detergente Tritón X-100 1% que se incubó durante una hora en hielo con agitación cada 10 minutos, para facilitar la disgregación de las membranas mitocondriales. Posteriormente, se añadió proteinasa K (Roche) a concentraciones crecientes de 0,01, 0,1 y 1  $\mu$ g / ml y las muestras se digirieron durante una hora en hielo. La digestión de la proteinasa K se paró mediante la adición de 2  $\mu$ l del inhibidor de proteasas PMSF 100 mM (Sigma).

Finalmente, las muestras se mezclaron con un volumen igual de solución comercial *Laemmli 2X* (BioRad) conteniendo un 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma) y se hirvieron a 95°C durante 10 minutos. Las muestras se guardaron a -20°C hasta su uso.

### **3.9.4 Purificación de proteínas secretadas al medio extracelular (secretomas).**

Los cíbridos y los fibroblastos se cultivaron en los medios de cultivo explicados en el apartado 3.2, pero sin complementar con 10% de suero fetal bovino. Se recogieron los medios de cultivo y las proteínas secretadas se concentraron mediante el uso de tubos *Amicon Ultra-15* (Merck Millipore), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Brevemente, se realizó una primera centrifugación a 4000 g y 4°C durante 10 minutos. A continuación se realizaron tres lavados con PBS frío alternados con centrifugaciones en las

## MATERIALES Y MÉTODOS

mismas condiciones que la primera. La fracción enriquecida en proteínas secretadas se procesó como se explica en el apartado 3.9.5.

### 3.9.5 Procesamiento de extractos proteicos celulares.

Los *pellets* celulares o mitocondriales procedentes de los diferentes ensayos, se resuspendieron según su tamaño en un volumen de entre 25-200  $\mu$ l de tampón de extracción de proteínas 20 mM HEPES NaOH pH 7,4, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 1% Tritón X-100 y una mezcla de inhibidores de proteasas *Protease Inhibitor Cocktail Tablets* (Roche). Tras 15 minutos en hielo agitando cada 5 minutos, el homogenado se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C para eliminar los restos celulares.

La concentración de proteínas en el sobrenadante se determinó utilizando el *Kit MicroBCA Protein Assay* (Pierce) según las instrucciones del fabricante. Una vez realizada la cuantificación, el sobrenadante se mezcló con un volumen igual de solución comercial *Laemmli 2X* (BioRad) conteniendo un 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma). A continuación, las muestras se hirvieron a 95°C durante 10 minutos y se guardaron a -20°C hasta su uso.

### 3.10 ELISA.

Para medir los niveles de GSN plasmática en muestras sanguíneas, se utilizó un *kit* de inmunodetección específico para la GSN consistente en placas de ELISA tipo sándwich (Aviscera Bioscience Inc.), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Brevemente, las muestras plasmáticas se diluyeron a 1:8000 y se capturó la GSN presente en ellas por el anticuerpo contra la GSN que está pegado en el fondo de los pocillos de la placa. A continuación se añadió el anticuerpo de detección, que reconoce otro epítipo diferente de la GSN y que está conjugado con la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP, *Horseradish Peroxidase*). Se añadió el sustrato TMB para esta enzima, generándose un producto coloreado que se midió en el lector de placas EPOCH (Biotek) a una absorbancia espectrofotométrica de 450 nm. Los valores de GSN en cada muestra, se extrapolaron gracias a una recta de calibrado elaborada previamente con concentraciones conocidas de GSN humana recombinante.

### 3.11 Inmunoprecipitación.

La coimmunoprecipitación (CO-IP) es una técnica que sirve para analizar las interacciones proteína-proteína. Los protocolos de inmunoprecipitación se fundamentan en la capacidad de los anticuerpos en formar complejos antígeno-anticuerpo al añadirse a un extracto proteico. El

objetivo es conocer qué proteínas interactúan con la proteína objeto de la inmunoprecipitación, por lo tanto el tampón inicial que se utilice siempre tiene que respetar la integridad de las interacciones.

En este trabajo se han utilizado dos formas diferentes de realizar la inmunoprecipitación.

### **3.11.1 Inmunoprecipitación mediante el uso de una fase sólida inmunoabsorbente (proteínas A o G unidas a agarosa).**

Este método se ha utilizado en las muestras de fibroblastos procedentes de pacientes con mutaciones en *BCS1L* y de individuos control. Los datos obtenidos se describen en la sección 3.3.1 de Resultados.

Los complejos antígeno-anticuerpo formados se precipitan gracias a la reacción con una fase sólida inmunoabsorbente. Esta fase se encuentra formada por proteínas (A o G), que tienen gran afinidad por el fragmento Fc de las inmunoglobulinas, 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* (apartado 3.12).

La proteína A/G agarosa (Roche Applied Science) se tiene que equilibrar previamente. Para ello, el tampón en el que se encuentra conservada se sustituyó por el tampón de extracción mediante lavados y centrifugaciones de 15 segundos a 2500 rpm, con el fin de evitar la ruptura de la proteína A o G con la agarosa.

Se partió de *pellets* celulares o mitocondriales que se solubilizaron durante 30 minutos a 4°C en 300 µl de tampón de extracción 20 mM HEPES-NaOH pH 7,4, 150 mM NaCl, 10% glicerol, inhibidores de proteasas *Protease Inhibitor Cocktail Tablets* (Roche) y con 1% Tritón X-100.

Los extractos 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 (esta muestra control se trató como se explica en el apartado 3.9.5). El volumen del sobrenadante se aumentó a 500 µl con tampón de extracción para favorecer la formación de inmunocomplejos. A continuación se realizó el pre-aclarado de las muestras, consistente en una incubación de 2 horas a 4°C en agitación con 20 µl de proteína A o 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 10 µg del anticuerpo específico. Al día siguiente, se añadieron 35 µl de proteína A/G y la muestra se incubó

## MATERIALES Y MÉTODOS

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 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 o sobrenadante, se le añadió solución *Laemmli* 5X para conseguir una concentración final 1X y se hirvió a 95°C durante 5 minutos. 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).

### **3.11.2 Inmunoprecipitación mediante el uso de anticuerpos unidos covalentemente a una fase sólida localizada en una columna (kit comercial de co-inmunoprecipitación (Pierce)).**

El protocolo de co-inmunoprecipitación explicado en el apartado anterior, tiene el inconveniente de que las bandas pesada y ligera del anticuerpo utilizado para inmunoprecipitar la proteína de interés también se encuentran en la fracción del inmunoprecipitado. Por tanto, comigrarán en el gel de electroforesis con las proteínas inmunoprecipitadas pudiendo enmascarar resultados importantes. Este problema se resuelve mediante el uso del *kit* de co-inmunoprecipitación (Pierce), el cual se basa en la unión covalente del anticuerpo a una resina localizada en una columna.

En este trabajo se utilizó este método de CO-IP en los cíbridos CYB-KO y su control isógeno. Los datos obtenidos se muestran en la sección 3.3.2 de Resultados.

Se partió de unos 800 µg de extractos proteicos mitocondriales procesados según el apartado 3.13.1. De estos se separaron 100 µg, los cuales no se sometieron a inmunoprecipitación para utilizarse como control del experimento (esta muestra control a continuación se trató como se explica en el apartado 3.9.5). El resto del extracto proteico se incubó durante 14-16 horas a 4°C en columnas que contienen 25 µg de anticuerpo unido a la resina. Las columnas se centrifugaron a 1000 g durante 1 minuto y así se obtuvo la fracción no inmunoprecipitada o sobrenadante, a la cual se añadió un volumen igual de tampón de carga comercial *Laemmli* 2X (BioRad) conteniendo un 5% de β-mercaptoetanol (Sigma). A continuación, se añadieron 40 µl de tampón de elución a las columnas y se centrifugaron para obtener la fracción inmunoprecipitada, a la cual se añadió

igual volumen del tampón de carga *Lane Marker Sample Buffer* (Pierce) con 100 mM de DTT (Fluka BioChemika). Ambas muestras se hirvieron a 95°C durante 10 minutos.

### 3.12 Western blot.

#### 3.12.1 Separación de proteínas mediante electroforesis desnaturizante 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 a las muestras proteicas del detergente SDS causa la desnaturalización de las proteínas y además les confiere carga negativa de forma proporcional a su masa. También se añade  $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma), que es un agente reductor, para la ruptura de los 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 utilizando cristales separadores de 1,5 mm (BioRad), con un porcentaje de acrilamida del 4% para el gel concentrador y del 6, 8 ó 10% para los geles separadores. Se cargaron entre 10 y 40  $\mu$ g de proteína según el experimento realizado y se separaron en un sistema Mini-PROTEAN 3 (BioRad) a 30 V durante 30 minutos y posteriormente, a 80 V hasta que el frente alcanzó el final del gel. Como marcador de peso molecular se utilizó el *Precision Plus Protein TM Dual Color Standard* (BioRad).

#### 3.12.2 Transferencia de las proteínas separadas en los geles de acrilamida a filtros de nitrocelulosa e inmunodetección directa.

Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa PROTAN® (GE Healthcare) a 30 V y temperatura ambiente durante toda la noche, o bien a 90 V durante 90 minutos a 4°C. A continuación, las membranas se preincubaron en solución de bloqueo (0,1% *Tween-20* y 5% leche desnatada en polvo en PBS) durante 14-16 horas a 4°C, o bien durante 2 horas a temperatura ambiente.

Después del bloqueo, las membranas se hibridaron con anticuerpos primarios específicos (Tabla 2). Acto seguido, se lavaron tres veces con 0,1% *Tween-20* en PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente a una dilución 1:2000 (Tabla 3). Los anticuerpos tanto primarios como secundarios se prepararon en solución de *Tween-20* 0,1% y de leche desnatada

## MATERIALES Y MÉTODOS

en polvo al 2,5% en PBS. Después de la incubación con el anticuerpo secundario, cada membrana se lavó tres veces con *Tween-20* 0,1% en PBS, para a continuación revelar la señal de quimioluminiscencia mediante el aparato analizador de imágenes *ChemiDoc™ MP* (BioRad). Como reactivo de revelado se utilizó el *kit ECL Plus Western Blotting Detection System* (GE Healthcare). La cuantificación de la señal obtenida, se realizó mediante el programa de análisis de imágenes *ImageJv.1.45g* (Wayne Rasband, NIH).

### 3.13 Electroforesis azul nativa (*Blue Native Electrophoresis, BNE*).

La electroforesis azul nativa (*Blue Native Electrophoresis* o BN-PAGE) es una técnica que permite separar complejos proteicos en su conformación nativa en una primera dimensión, que se lleva a cabo en condiciones no desnaturizantes. Posteriormente las subunidades que componen dichos complejos se pueden separar en una segunda dimensión llevada a cabo en condiciones desnaturizantes.

#### 3.13.1 Enriquecimiento de fracciones mitocondriales a partir de cultivos celulares mediante tratamiento con digitonina.

Las líneas celulares se cultivaron hasta alcanzar una confluencia de entre el 70-90% y de estos cultivos se aislaron las membranas mitocondriales, tal como se ha descrito previamente (Nijtmans *et al.*, 2002) con pequeñas modificaciones.

Las células se recogieron mediante tratamiento con tripsina, se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en 100  $\mu$ l de PBS más 100  $\mu$ l de solución de digitonina (4 mg/ml) en PBS. La muestra se homogenizó y se mantuvo en hielo durante 15 minutos para disolver las membranas con agitación suave cada 5 minutos. Después, se añadió 1 ml de PBS frío y se centrifugaron durante 10 minutos a 10000 rpm a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el *pellet* en 1 ml de PBS frío, volviéndose a centrifugar durante 10 minutos a 10000 rpm. Finalmente se eliminó el sobrenadante, obteniéndose un *pellet* correspondiente a la fracción mitocondrial enriquecida que se conservó a -80°C hasta su utilización.

#### 3.13.2 Preparación de muestras para ensayos de BN-PAGE.

Para la separación de los complejos y supercomplejos mitocondriales en condiciones nativas, los *pellets* mitocondriales obtenidos en el apartado anterior se solubilizaron en 50-200  $\mu$ l



de un tampón que contenía 1,5 M ácido 2-aminocaproico (Sigma) y 150 mM Bis-Tris (Sigma) a pH 7,0. Se determinó la concentración de proteína utilizando el *kit Micro BCA Protein Assay* (Pierce).

Posteriormente, para la solubilización de los supercomplejos mitocondriales se añadió digitonina en una proporción de 4 g/g (4 gramos de digitonina por gramo de proteína). El homogenado se incubó en hielo durante 15 minutos con agitación suave cada 5 minutos. Acto seguido, se centrifugó la muestra durante 30 minutos a 13000 rpm y 4°C. Se recogió el sobrenadante, al cual se le añadió 1 µl de tampón de carga (750 mM ácido 2-aminocaproico, 50 mM tricina, 0,5 mM EDTA, 0,02% *Serva Blue G-250* (Serva)) por cada 10 µl de sobrenadante.

### 3.13.3 Electroforesis bidimensional azul nativa (2D-BN/SDS-PAGE).

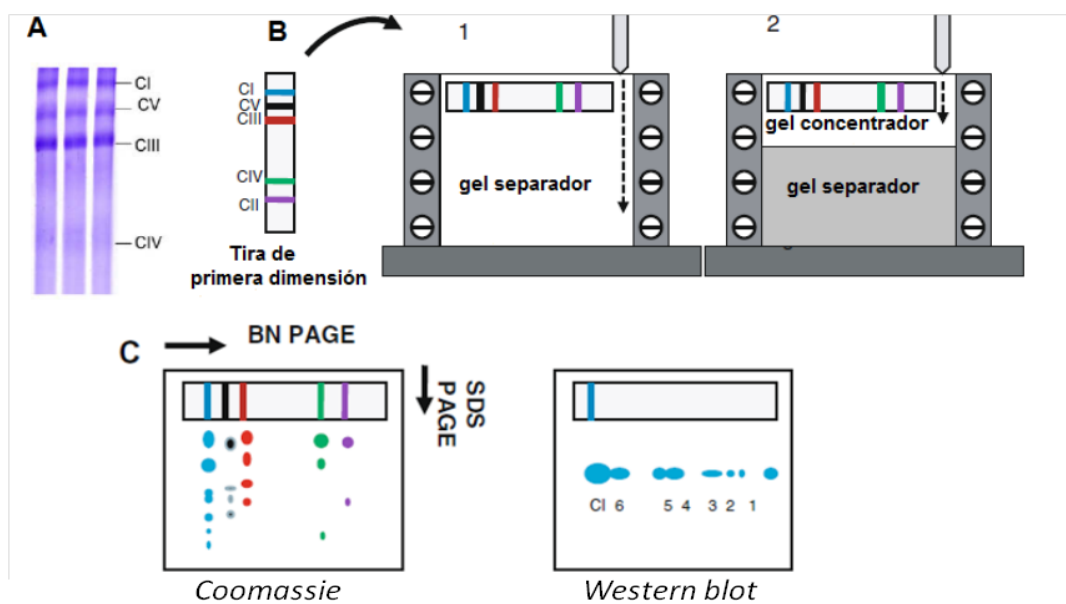
La primera dimensión (1D-BN-PAGE) (Figura 12A) se realizó en geles de bis-tris pre-hechos con un gradiente lineal del 3-12% de acrilamida/bisacrilamida (Novex). Se cargaron entre 60-80 µg de proteína mitocondrial por pocillo, utilizando como ánodo el tampón A (50 mM Bis-Tris pH 7,0) y como cátodo el 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 y posteriormente a 70 V hasta que el frente azul se salió del gel. Previamente, cuando el frente de electroforesis había alcanzado aproximadamente 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.

Parte de los geles de 1D-BN-PAGE se utilizaron para transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (apartado 3.12.2), a fin de poder analizar el ensamblaje de los complejos y supercomplejos en su conformación nativa mediante inmunodetección. Otros geles se procesaron para una electroforesis en segunda dimensión, o se utilizaron para realizar ensayos de actividad enzimática en gel (IGA) del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (apartado 3.13.4).

En la electroforesis en segunda dimensión (2D-BN/SDS-PAGE) (Figuras 12B y 12C), 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-BN-PAGE y se rotó 90° en un cristal. La banda se incubó durante una hora con 200 µl de una solución acuosa desnaturizante (10% SDS, 1% β-mercaptoetanol), cambiando el tampón cada 15 minutos para evitar que se secase. El exceso de solución desnaturizante se eliminó utilizando papel de filtro. Este paso es esencial pues el β-mercaptoetanol inhibe la polimerización de la acrilamida del gel concentrador de 2D-BN/SDS-PAGE.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Posteriormente se montó el sistema de electroforesis utilizando cristales con separadores de 0,75 mm (BioRad). El gel separador se preparó al 10% de acrilamida/bisacrilamida y 0,1% SDS. El gel concentrador se preparó al 4% de acrilamida/bisacrilamida con 0,1% de SDS y se añadió alrededor de la banda de 1D-BN-PAGE. Como ánodo se utilizó el tampón 0,2 M Tris-HCl a pH 8,9 y como cátodo el tampón 0,1 M Bis-Tris, 0,1 M Tricina a pH 8,2 y 0,1% SDS. Las proteínas se separaron a 30 V durante 30 minutos y posteriormente a 80 V hasta que el frente alcanzó el final del gel.



**Figura 12. Electroforesis bidimensional azul nativa. (A)** Muestras mitocondriales separadas mediante *Blue Native Electrophoresis* (BNE) en condiciones nativas. CI-CV: Complejos I al V de la CRM. **(B)** Montaje de electroforesis en segunda dimensión (2D-BN/SDS-PAGE). Para ello se corta una tira de un gel de 1D-BN-PAGE, se rota 90° y se inserta en el gel concentrador. Las proteínas se separan posteriormente en el gel separador, en condiciones desnaturalizantes. **(C)** 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)).

### 3.13.4 Ensayos de actividad en gel del complejo I (IGA: *In Gel Activity Assay*).

Estos ensayos se llevaron a cabo una vez completada la electroforesis en condiciones nativas 1D-BN-PAGE, tal como se indica en el apartado 3.13.3.

Para analizar la actividad en gel del complejo I, los geles se incubaron entre 2-4 horas a temperatura ambiente con una solución de 2 mM Tris-HCl a pH 7,4, 0,1 mg/ml NADH (Roche) y

2,5 mg/ml azul de nitrotetrazolium (Sigma). Los geles se lavaron en agua destilada y se escanearon.

### 3.14 Técnicas proteómicas.

#### 3.14.1 Electroforesis diferencial bidimensional en gel 2D-DIGE (*Difference Gel Electrophoresis*).

Los lisados celulares de fibroblastos procedentes de pacientes con mutaciones en el gen *BCS1L* y de individuos control se separaron mediante la tecnología 2D-DIGE (Marín-Buera *et al.*, 2015). La identificación de las proteínas se llevó a cabo a través de espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF. Los péptidos se analizaron usando el motor de búsqueda *MASCOT 2.2* ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)). Los espectros se compararon respecto a la base de datos *SwissProt Human v.57.15* (20266 secuencias). La expresión proteica diferencial entre pacientes y controles, se analizó estadísticamente utilizando el valor  $p$  en el test  $t$  de *student*, considerando a las variaciones significativas con un intervalo de confianza del 95% ( $p < 0,05$ ).

#### 3.14.2 Identificación de proteínas por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS).

##### 3.14.2.1 Preparación de las muestras.

En primer lugar, se escindieron las bandas de interés de los geles de 1D-BN-PAGE. A continuación las proteínas presentes en cada banda del gel se digirieron con Tripsina. Para ello, la muestra se redujo previamente con 10 mM de DTT a 57°C durante 30 min y entonces se alquiló con 55 mM de iodacetamida durante 20 min en oscuridad. Finalmente se añadió 1 µg de tripsina recombinante de grado secuenciación (Roche) en bicarbonato amónico 25 mM a pH 8.5, en una relación aproximada de 1/20 (p/p) y se incubó durante toda la noche a 37°C.

Los péptidos obtenidos se desalaron y concentraron mediante cromatografía de fase reversa C18 (ZipTip, Millipore) y se resuspendieron en 30 µl de 2% acetonitrilo, 0.1% ácido fórmico. Posteriormente se congelaron a -80°C hasta el momento de su análisis por LC-MS.

##### 3.14.2.2 Análisis LC-MS/MS (*LTQ OrbitRAP VELOS*).

Los péptidos desalados se analizaron por nano cromatografía líquida *nano Easy HPLC* (Proxeon) acoplada a un espectrómetro de masas tipo trampa iónica *LTQ-Orbitrap-Velos-Pro*

## MATERIALES Y MÉTODOS

(ThermoScientific). Los péptidos se concentraron *on-line* por cromatografía de fase reversa (RP) usando una precolumna C18 *Acclaim®PepMap100* (nanoViper) de 0.1 mm × 20 mm y entonces se separaron en una columna C18 *Biosphere* (NanoSeparations) de 0.075 mm x 150 mm operando a un flujo de 0.3 µl/min. Finalmente, los péptidos se eluyeron usando un gradiente total de 90 min (desde el 5% hasta el 25% de tampón A en 68 min y desde el 25% hasta el 40% de tampón B en 22 min). Se utilizó como tampón A una solución de 0.1% de ácido fórmico, 2% ACN en agua y como tampón B, una solución de 0.1% de ácido fórmico en 80% de ACN en agua.

El nano-HPLC esta acoplado *on-line* a la fuente nanoelectrospray (Proxeon) del espectrómetro de masas *LTQ-Orbitrap Velos* con el que se analizaron los péptidos. La entrada de los péptidos se realizó por ionización con electrospray utilizando capilares *Nano-bore emitters Stainless Steel* (Proxeon) de 30 µm de diámetro interno.

Los péptidos se detectaron por la *OrbiTrap* con una resolución de 30.000 en modo *Full scan MS* en un rango de masas *m/z* de 400-1600 amu. En cada *microscan* se seleccionaron hasta 10 precursores, en función de su intensidad, con exclusión dinámica de 30 segundos seguidos de su aislamiento con un ancho de ventana de 2 unidades de *m/z* y fragmentación por CID (*Collision Induced Dissociation*) con una energía de colisión normalizada del 35% en la LTQ. Los espectros MS/MS se adquirieron en modo positivo.

### 3.14.2.3 Identificación de proteínas.

Los espectros MS/MS adquiridos en las muestras, se analizaron con una licencia local del motor de búsqueda *MASCOT v.2.3* ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)) a través del programa *Proteome Discoverer 2.1.4* (ThermoFisher). Los espectros se compararon respecto a la base de datos: *SwissProt Human* (fecha 17/09/15; 43136 secuencias), que contiene las entradas de *Homo sapiens* presentes en la base de datos revisada *SwissProt*.

Los parámetros de las búsquedas fueron: tolerancia del péptido precursor de 20 ppm, tolerancia del fragmento de 0,8 Da, hasta 2 puntos de corte perdidos para la tripsina, carbamidometil cisteína como modificación fija y oxidación de metionina como modificación variable. En todos los casos se utilizó la opción *Decoy* de *MASCOT* para estimar el FDR. Esta herramienta genera una base de datos reversa (con nº de acceso distinguible) de la utilizada en cada caso y repite la búsqueda contra ésta, utilizando exactamente los mismos parámetros. Lo esperable es no tener ninguna identificación positiva contra esta base de datos reversa, de

manera que cuando aparecen péptidos identificados en ella, permite estimar el número de péptidos falsos positivos identificados en la base de datos original.

Los valores de *MASCOT* se ajustaron mediante el algoritmo *percolator*, que consigue discriminar mejor entre las identificaciones correctas e incorrectas de los espectros, logrando alcanzar en todos los casos una estimación del FDR<1%.

Se consideran proteínas correctamente identificadas aquellas que están por debajo de un FDR de un 1 % y tienen al menos 1 péptido identificado con un intervalo de confianza (CI) que supera el 99%. Es decir, para que la probabilidad de que el péptido identificado se deba al azar sea menor del 1% ( $p < 0.01$ ).



## **RESULTADOS**

---







## **1. LOS NIVELES DE GELSOLINA CITOSÓLICA AUMENTAN EN LA MITOCONDRIA COMO RESPUESTA A LOS DÉFICITS ENZIMÁTICOS DE LA CADENA RESPIRATORIA.**

El punto de partida de este trabajo se encuentra en un proyecto previamente desarrollado en nuestro grupo. Dicho proyecto consistió en la identificación de nuevos mecanismos moleculares asociados al déficit enzimático del complejo III, con la finalidad de encontrar posibles biomarcadores o dianas terapéuticas para las enfermedades mitocondriales del sistema OXPHOS. Para ello se llevó a cabo un análisis proteómico, utilizando la tecnología 2D-DIGE en combinación con espectrometría de masas (MS), el cual reveló una lista de 39 proteínas expresadas diferencialmente en fibroblastos de pacientes con déficit enzimático del complejo III asociado a mutaciones en el gen *BCS1L*, en comparación con fibroblastos control (Marín-Buera *et al.*, 2015). Este trabajo se centrará en una de estas 39 proteínas, la Gelsolina (GSN). Ésta, además de ser una proteína implicada en el mantenimiento y la formación de los filamentos de actina, también se ha visto implicada en la regulación de la función mitocondrial (Antequera *et al.*, 2009; Vargas *et al.*, 2010; Koya *et al.*, 2000; Kusano *et al.*, 2000).

### **1.1 La expresión de la Gelsolina citosólica aumenta significativamente en fibroblastos de pacientes con déficit enzimático del complejo III asociado a mutaciones en *BCS1L*.**

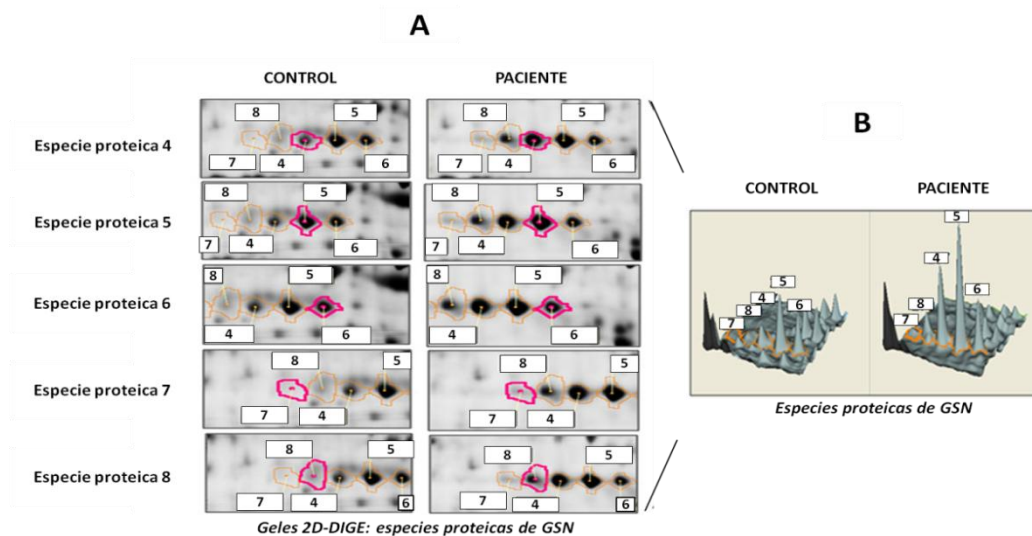
El análisis del proteoma diferencial de fibroblastos derivados de pacientes con déficit enzimático del complejo III debido a mutaciones en el factor de ensamblaje *BCS1L*, mostró unos niveles significativamente elevados de cinco especies proteicas correspondientes a la Gelsolina citosólica en los fibroblastos mutados respecto a los control (Figura 13). Estas especies proteicas presentaron una ratio de expresión diferencial de entre 1,92 y 3,77 veces el valor medio de los controles (Marín-Buera *et al.*, 2015).

### **1.2 Los niveles de Gelsolina aumentan preferentemente en las mitocondrias de fibroblastos con mutaciones en *BCS1L* frente a fibroblastos control.**

Para validar el aumento de los niveles de GSN citosólica, se llevó a cabo un análisis de fraccionamiento subcelular separando las fracciones citosólicas y mitocondriales de los fibroblastos con mutaciones en *BCS1L*. Los extractos proteicos de las distintas fracciones subcelulares, se analizaron mediante electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) seguida de *Western blot* con un anticuerpo específico que reconoce a la GSN (Figura 14). En los extractos totales se observó un aumento significativo de los niveles de GSN en tres de las cuatro líneas de fibroblastos mutados en comparación con los controles (Figura 14A), lo cual confirmaría los

## RESULTADOS

resultados obtenidos en el ensayo de 2D-DIGE. En las fracciones citosólicas, no se observaron cambios significativos en los niveles de GSN entre los fibroblastos de pacientes y los controles (Figura 14B). Sin embargo, en las fracciones mitocondriales los niveles de GSN aumentaron aproximadamente 2,5 veces en todas las muestras de pacientes respecto a los valores medidos en los controles (Figura 14C). Las señales correspondientes a la GSN se cuantificaron en cada una de las fracciones y los valores se normalizaron respecto a sus respectivos controles de carga (Figura 14D).

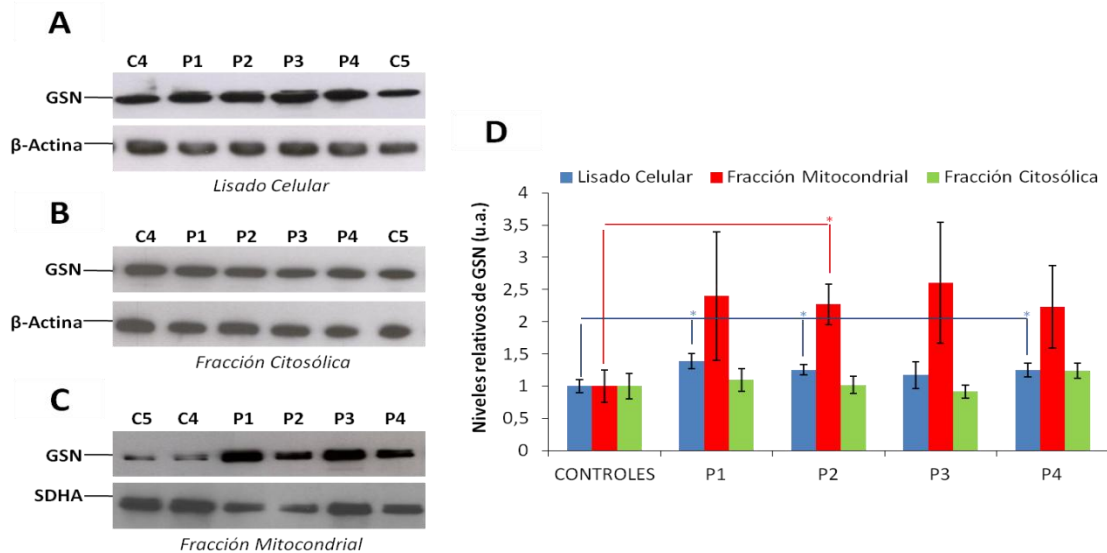


**Figura 13. Expresión diferencial de la GSN entre fibroblastos control y mutados en *BCS1L*.** (A) Especies proteicas de la GSN detectadas mediante separación en geles 2D-DIGE e identificación por espectrometría de masas, las cuales corresponden a las manchas 4, 5, 6, 7 y 8 de los geles. (B) Mapas proteicos tridimensionales que genera el programa *DeCyder* a partir de las señales de fluorescencia emitidas por las distintas especies proteicas de la GSN.

### 1.3 La colocalización mitocondrial de la Gelsolina aumenta en fibroblastos con mutaciones en *BCS1L* respecto a los controles.

El aumento de los niveles de GSN en las mitocondrias de fibroblastos con mutaciones en *BCS1L*, sugería la localización mitocondrial de esta proteína integrante del citoesqueleto. Por ello, se analizó la posible colocalización de la GSN con la proteína de membrana externa mitocondrial VDAC1 (utilizada para marcaje específico de la red mitocondrial), mediante ensayos de doble inmunofluorescencia con dos anticuerpos que reconocen sendas proteínas (Figura 15). En los fibroblastos mutados se observó un aumento general en la señal citosólica de la GSN (fluorescencia verde) respecto a los fibroblastos control. El marcaje en paralelo con el anticuerpo que reconoce a la proteína de membrana externa mitocondrial VDAC1 (fluorescencia roja), reflejó

un aumento de la colocación entre las señales de ambas proteínas en todas las muestras de pacientes respecto a los controles. Sin embargo, siempre se observaron señales de colocación parcial de la GSN con respecto a la red mitocondrial, lo cual podría indicar la presencia de sitios de interacción específicos entre las mitocondrias y el citoesqueleto.



**Figura 14. Niveles de GSN en fraccionamientos subcelulares de fibroblastos control y con mutaciones en *BCS1L*.** Se separaron entre 10-30  $\mu$ g de extractos proteicos procedentes de lisados celulares (A), de fracciones citosólicas (B) y de fracciones mitocondriales (C) en geles SDS-PAGE al 10% de acrilamida. Los niveles de GSN se analizaron por *Western blot*, utilizando la  $\beta$ -actina como control de carga en lisados celulares y fracciones citosólicas; y la subunidad SDHA del complejo II como control de carga para las fracciones mitocondriales. (D) Se cuantificaron las señales de cuatro experimentos independientes para los lisados celulares y de tres experimentos para las fracciones citosólicas y mitocondriales. Los valores se normalizaron frente a los controles de carga respectivos. Los datos se presentan como la media  $\pm$  DE del análisis de cada fibroblasto mutado por separado (P1, P2, P3, P4) respecto a la media  $\pm$  DE de 2 controles diferentes (C4 y C5). (u. a.) Unidades arbitrarias. Análisis estadístico: Test *U* de Mann Whitney, siendo \* ( $p < 0,05$ ).

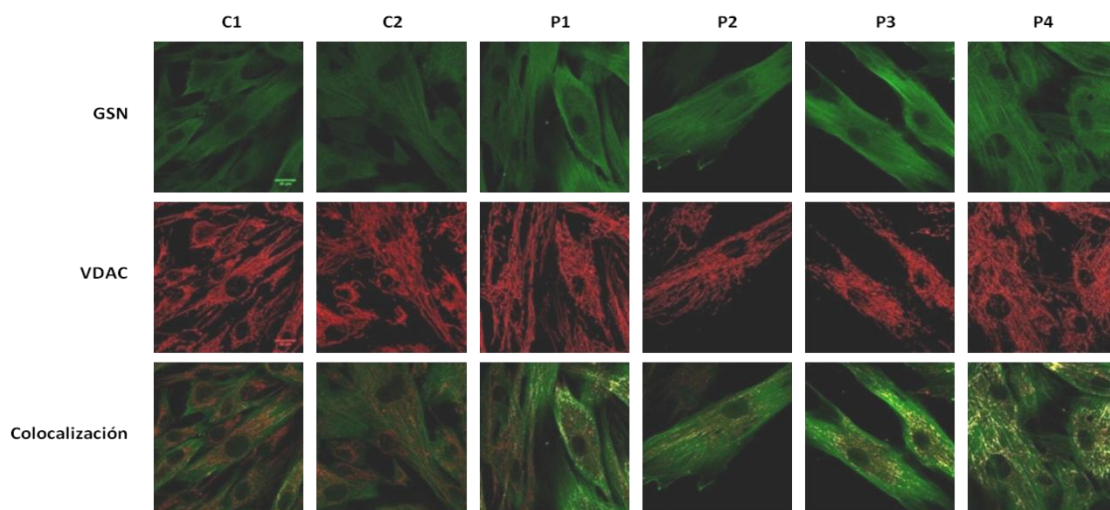
#### 1.4 Los niveles de Gelsolina aumentan en las mitocondrias de híbridos con déficit enzimático del complejo III asociado a mutaciones en *MT-CYB*.

Para excluir que el aumento de los niveles de GSN citosólica en la mitocondria fuera específico de las mutaciones en *BCS1L*, se analizaron mediante SDS-PAGE y *Western blot* los niveles estacionarios de GSN en lisados celulares y fracciones mitocondriales de híbridos con una delección de 4 pares de bases en la posición 14787 del ADNmt. Dicha mutación se localiza en el

## RESULTADOS

extremo 5' del gen *MT-CYB*, que codifica la subunidad Citocromo *b* del complejo III, causando un codón de parada prematuro en la proteína y una pérdida del ensamblaje de dicho complejo (De Coo *et al.*, 1999; Rana *et al.*, 2000).

En los lisados celulares de los híbridos mutados se observó un aumento significativo de los niveles de GSN citosólica respecto al control isogénico (Figura 16A). Al igual que ocurría en los fibroblastos mutados en *BCS1L*, los niveles de GSN aumentaron de forma muy significativa en la fracción mitocondrial de los híbridos con mutaciones en *MT-CYB* (Figura 16B). Se cuantificaron las señales correspondientes a la GSN en los lisados celulares y en las fracciones mitocondriales y los valores se normalizaron respecto a sus respectivos controles de carga (Figura 16C)

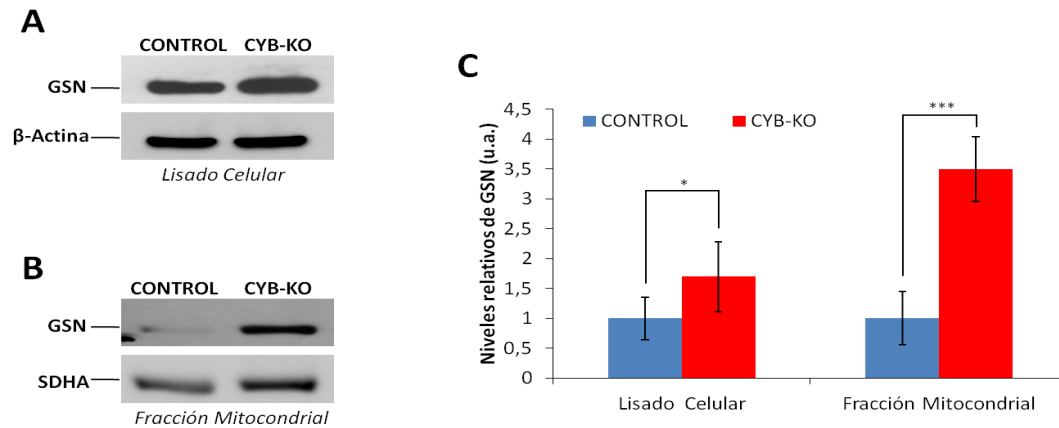


**Figura 15. La GSN colocaliza parcialmente con las mitocondrias de fibroblastos mutados en *BCS1L*.** La colocalización subcelular de la GSN y VDAC1 se analizó mediante doble inmunofluorescencia en células fijadas. Se utilizaron dos anticuerpos: uno para detectar GSN (fluorescencia verde) y otro para VDAC (fluorescencia roja). La colocalización entre las señales de ambas proteínas se realizó en un plano focal de 0,5  $\mu\text{m}$  y se muestra como señal blanca. **C1, C2:** fibroblastos control. **P1, P2, P3, P4:** fibroblastos de pacientes con mutaciones en *BCS1L*. Barra de escala = 20  $\mu\text{m}$ . Las imágenes se tomaron con el objetivo 63 x *plan apochromat*.

### 1.5 Los niveles de Gelsolina aumentan en las mitocondrias de fibroblastos control y de células 143B-TK<sup>-</sup> tratadas con antimicina A.

Nuestros datos sugerían que el aumento de los niveles de GSN citosólica en la mitocondria se produciría en respuesta al déficit enzimático del complejo III. Dado que en ambos modelos celulares el déficit enzimático se debe a fallos en el ensamblaje de dicho complejo, a continuación se determinó si el fallo de la actividad del complejo III por sí solo podría conducir al

aumento de los niveles de GSN en la mitocondria. Para ello, los fibroblastos control C1 se cultivaron a concentraciones crecientes (2, 20, 200 y 500 nM) del inhibidor del complejo III antimicina A durante un periodo de 48 horas. Asimismo, la línea celular control 143B-TK se cultivó a las mismas concentraciones del inhibidor a lo largo de 24 y 48 horas.



**Figura 16. Niveles de GSN en lisados celulares y fracciones mitocondriales de cíbridos control y mutantes CYB-KO con un déficit enzimático del complejo III asociado a mutaciones en *MT-CYB*.** Se separaron 15  $\mu$ g de extractos proteicos procedentes de lisados celulares (**A**) y de fracciones mitocondriales (**B**), en geles SDS-PAGE al 10% de acrilamida. Los niveles de GSN se analizaron por *Western blot*, utilizando la  $\beta$ -actina como control de carga en los lisados celulares y la subunidad SDHA del complejo II en las fracciones mitocondriales. (**C**) Se cuantificaron las señales de cuatro experimentos independientes para cada fracción y los valores se normalizaron respecto a los controles de carga correspondientes. Los datos se presentan como la media  $\pm$  DE del análisis de cada fracción de la línea mutante relativizada frente a su control isogénico. (u. a.) Unidades arbitrarias. Análisis estadístico: Test *U* de Mann Whitney, siendo \* ( $p < 0,05$ ) y \*\*\* ( $p < 0,001$ ).

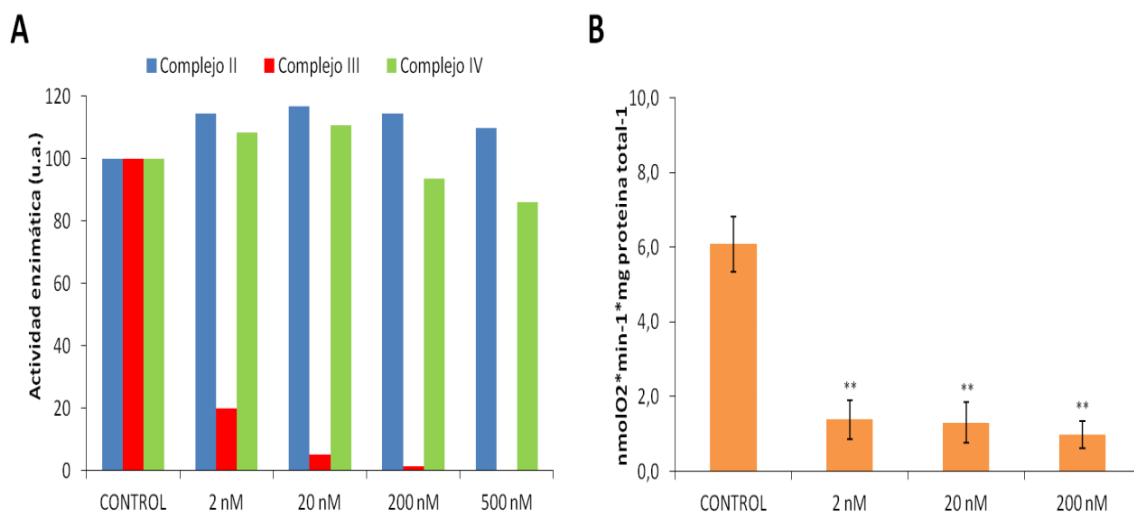
### 1.5.1 Análisis en fibroblastos control tratados con antimicina A.

En primer lugar, se analizó la efectividad del inhibidor del complejo III antimicina A mediante la medición de las actividades enzimáticas de los complejos de la cadena respiratoria en fibroblastos control (Figura 17A). Tal y como se esperaba, se observó un descenso drástico y específico de la actividad del complejo III desde la concentración menor 2nM de antimicina A. Además, dicho descenso en la actividad enzimática del complejo III correlacionó con una caída generalizada de la respiración mitocondrial basal desde las concentraciones más bajas del inhibidor (Figura 17B).

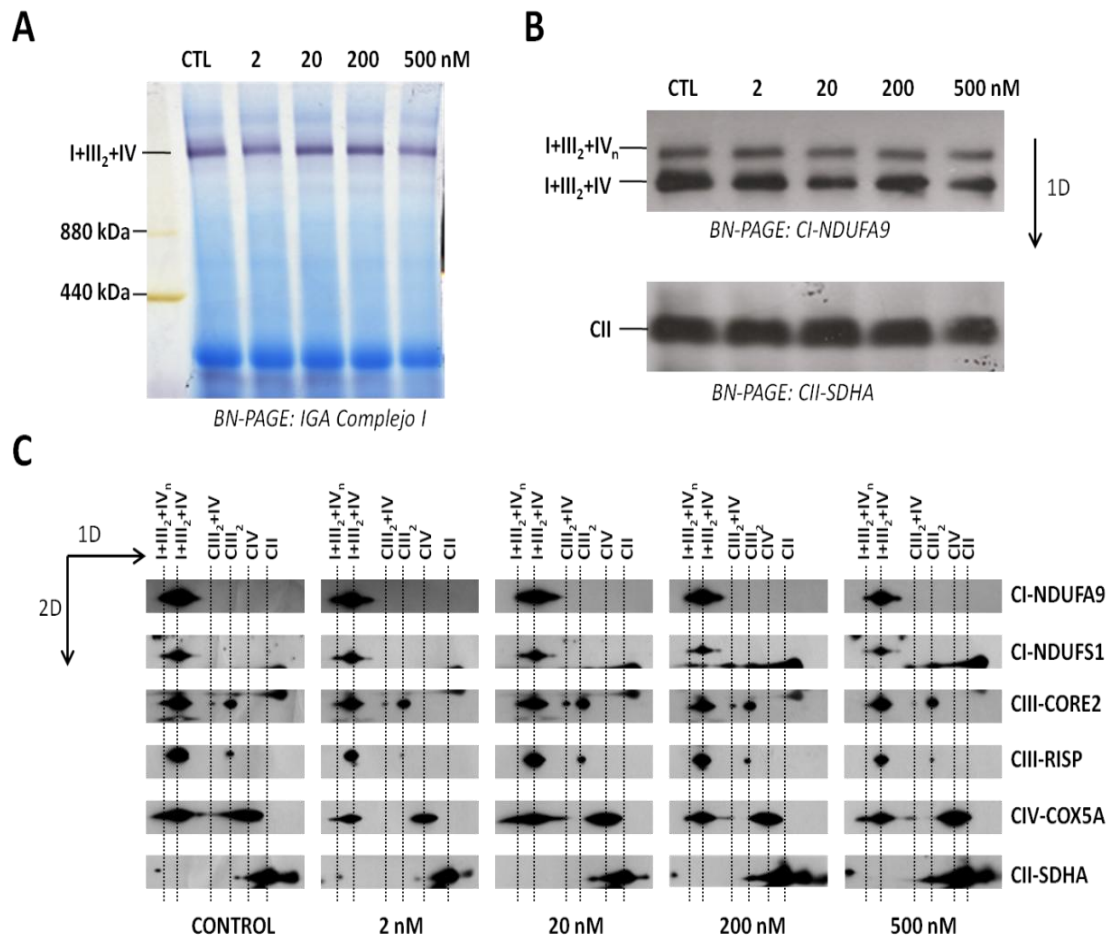
## RESULTADOS

A continuación, se confirmó que el tratamiento con antimicina A no producía alteraciones evidentes en el ensamblaje de los complejos libres ni de los supercomplejos de la cadena respiratoria, mediante electroforesis azul nativa (BN-PAGE) de extractos mitocondriales de los fibroblastos control tratados con el inhibidor (Figura 18).

Por último, se analizaron los niveles de la GSN citosólica mediante SDS-PAGE y *Western blot* en lisados celulares y fracciones mitocondriales de los fibroblastos control tratados con antimicina A durante 48 horas. En los lisados totales se vio un leve aumento no significativo de los niveles de GSN en paralelo a las concentraciones crecientes de antimicina A (Figura 19). Sin embargo, se observó un aumento significativo de los niveles de GSN en las fracciones mitocondriales a las dos concentraciones más altas del inhibidor (200 y 500 nM).



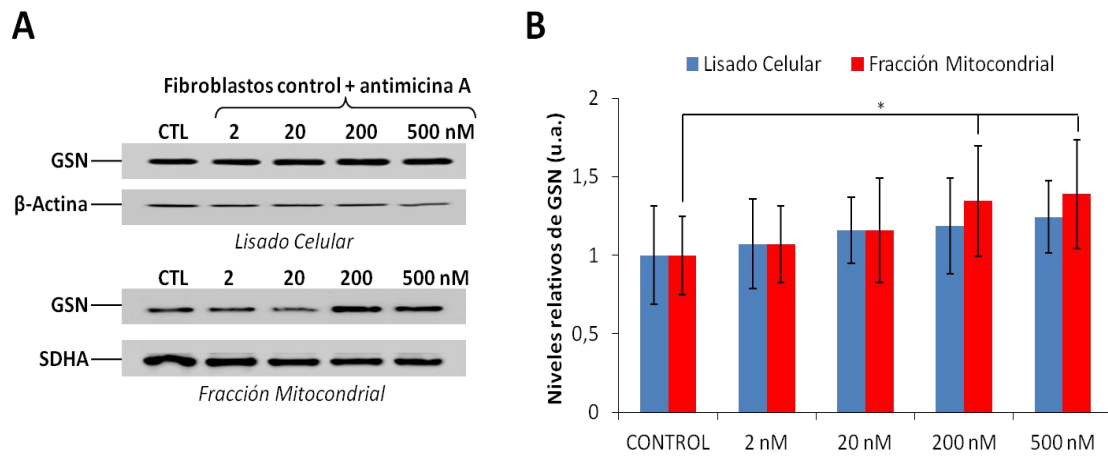
**Figura 17. Funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial en fibroblastos control tratados con antimicina A.** (A) Las actividades enzimáticas de los complejos II, III y IV de la cadena respiratoria se midieron espectrofotométricamente utilizando 300 µg de proteína procedente de extractos celulares de fibroblastos control C1. Las actividades enzimáticas se midieron por duplicado y se normalizaron por la actividad de la citrato sintasa mitocondrial. Los valores se expresan como porcentaje de la condición control (fibroblastos no tratados). (u.a.) Unidades arbitrarias. (B) Se cuantificó el consumo de oxígeno (nmol de O<sub>2</sub>/min) en fibroblastos no tratados (CONTROL) y tratados con concentraciones crecientes de antimicina A (2, 20 y 200 nM). Se tomaron los valores de 6 experimentos independientes y se normalizaron frente a los mg de proteína total en la muestra. Los datos se presentan como la media ± DE de cada condición. Análisis estadístico: Test U de Mann Whitney, siendo \*\* (p < 0,01).



**Figura 18. Ensamblaje de los complejos y supercomplejos de la cadena respiratoria en fibroblastos control tratados con antimicina A.** Se separaron 60  $\mu$ g de proteína mitocondrial mediante electroforesis en una dimensión en condiciones nativas (1D-BN-PAGE), utilizando geles en gradiente del 3-12% de acrilamida. **(A)** Ensayo de actividad en gel (IGA) del complejo I. **(B)** En paralelo se realizó un análisis por *Western blot* utilizando anticuerpos que reconocen la subunidad NDUFA9 del complejo I (CI) y la SDHA del complejo II (CII) como control de carga del experimento. **(C)** Los complejos separados mediante 1D-BN-PAGE, se sometieron a electroforesis desnaturante en segunda dimensión (2D-BN/SDS-PAGE). Las muestras se analizaron mediante *Western blot* con los siguientes anticuerpos: NDUFS1 y NDUFA9 del complejo I (CI); CORE2 y RISP del complejo III (CIII); COX5A del complejo IV (CIV) y SDHA del complejo II (CII). **I+III<sub>2</sub>+IV<sub>n</sub>**, respirasoma; **CIII<sub>2</sub>**, complejo III dimérico; **CIV**, complejo IV monomérico; **CII**, complejo II; **CIII<sub>2</sub>+IV**, supercomplejo III<sub>2</sub>+IV. Las flechas muestran las direcciones de la electroforesis en las dos dimensiones.



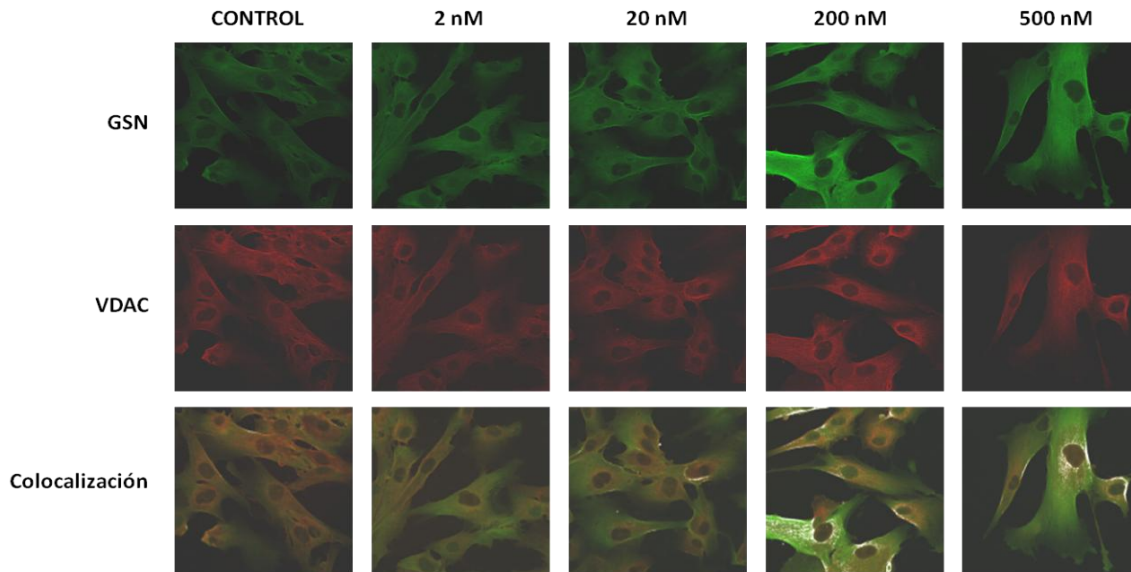
## RESULTADOS



**Figura 19. Niveles de GSN en lisados celulares y fracciones mitocondriales de los fibroblastos control tratados con concentraciones crecientes de antimicina A.** (A) Se separaron 15  $\mu$ g de extractos proteicos de lisados celulares y de fracciones mitocondriales procedentes de fibroblastos control C1 tratados con antimicina A, en geles SDS-PAGE al 10% de acrilamida. Los niveles de GSN se analizaron por *Western blot*, utilizando la  $\beta$ -actina como control de carga en los lisados celulares y la subunidad SDHA del complejo II en las fracciones mitocondriales. (B) Se cuantificaron las señales de cuatro experimentos independientes para cada fracción y los valores se normalizaron frente a los respectivos controles de carga. Los datos se presentan como la media  $\pm$  DE del análisis de las diferentes condiciones del tratamiento por separado, relativizadas frente a la condición control (CTL) (células no tratadas con antimicina A). (u. a.) Unidades arbitrarias. Análisis estadístico: Test *U* de Mann Whitney, siendo \* ( $p < 0,05$ ).

El aumento de los niveles de GSN citosólica en las mitocondrias de fibroblastos control tratados con antimicina A, se corroboró mediante un ensayo de doble inmunofluorescencia usando dos anticuerpos que reconocen a GSN y a VDAC1. Al igual que en el ensayo de *Western blot*, se observó un aumento general de la colocalización entre las señales de GSN y VDAC1 en los fibroblastos tratados con antimicina A, a las concentraciones de 200 y 500 nM (Figura 20).



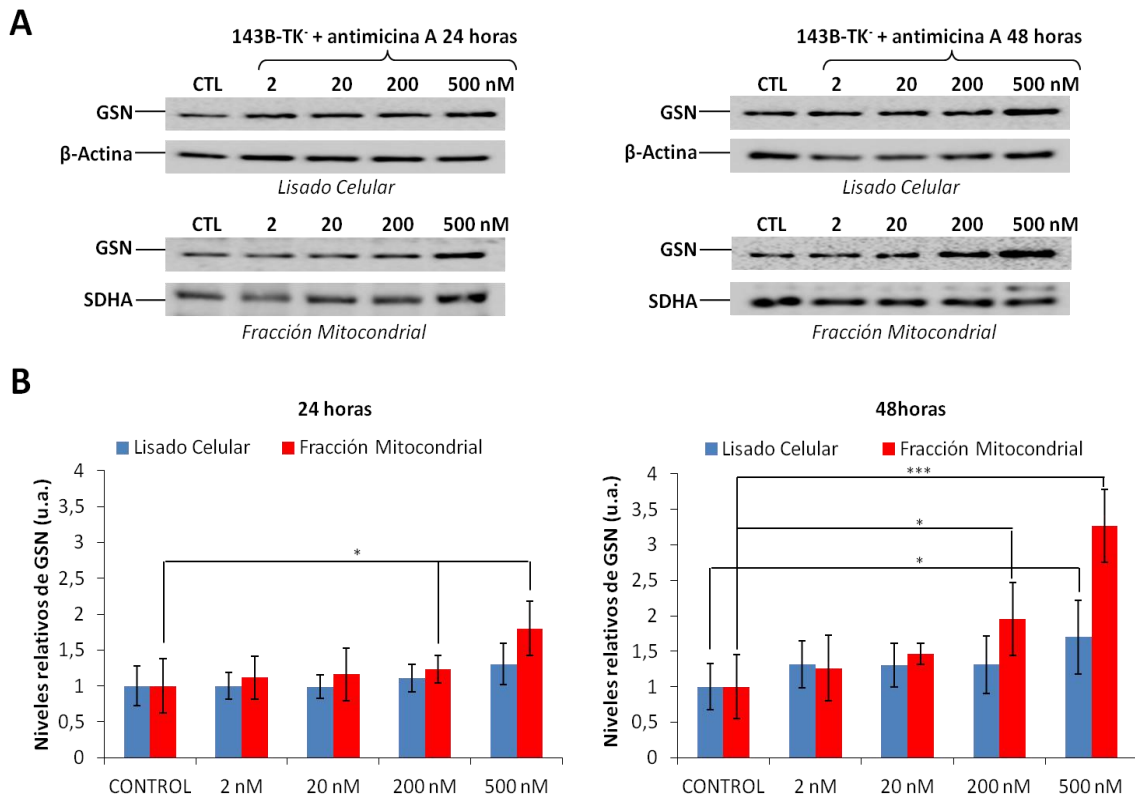


**Figura 20. Localización mitocondrial de la GSN en fibroblastos control tratados con antimicina A.** Se analizó la colocalización subcelular de la GSN y VDAC1 en fibroblastos control no tratados (CONTROL) y tratados con antimicina A, mediante doble inmunofluorescencia utilizando dos anticuerpos para detectar GSN (fluorescencia verde) y VDAC1 (fluorescencia roja). La colocalización entre las señales de ambas proteínas se deriva de la fusión de las dos fluorescencias (señal blanca) en un plano focal de 0,5  $\mu\text{m}$ . Las imágenes se tomaron con el objetivo 63 x *plan apochromat*.

### 1.5.2 Análisis en células 143B-TK tratadas con antimicina A.

A continuación se analizaron los niveles de GSN citosólica en lisados celulares y en las fracciones mitocondriales de células 143B-TK tratadas con antimicina A durante periodos de 24 y 48 horas (Figura 21A). A diferencia de lo observado en fibroblastos control, en los lisados celulares se observó un aumento significativo de los niveles estacionarios de GSN a las 48 horas del tratamiento con una concentración de 500 nM de antimicina A. Además, en las fracciones mitocondriales se observó un aumento significativo de los niveles de GSN a las concentraciones de 200 y 500 nM de antimicina A, tanto a las 24 horas como a las 48 horas del tratamiento. Se cuantificaron las señales de la GSN en los lisados celulares y las fracciones mitocondriales y se normalizaron respecto a sus respectivos controles de carga (Figura 21B).

## RESULTADOS



**Figura 21. Niveles de GSN en lisados celulares y fracciones mitocondriales de células 143B-TK<sup>-</sup> tratadas con concentraciones crecientes de antimicina A durante 24 y 48 horas.** (A) Se separaron 15  $\mu$ g de extractos proteicos de lisados celulares y de fracciones mitocondriales procedentes de células 143B-TK<sup>-</sup> tratadas con antimicina A, en geles SDS-PAGE al 10% de acrilamida. Los niveles de GSN se analizaron por *Western blot*, utilizando la  $\beta$ -actina como control de carga en los lisados celulares y la subunidad SDHA del complejo II en las fracciones mitocondriales. (B) Se cuantificaron las señales de seis experimentos independientes para cada fracción y los valores se normalizaron frente a los respectivos controles de carga. Los datos se presentan como la media  $\pm$  DE del análisis de las diferentes condiciones del tratamiento, relativizadas frente a la condición control (células no tratadas con antimicina A). (u. a.) Unidades arbitrarias. Análisis estadístico: Test *U* de Mann Whitney, siendo \* ( $p < 0,05$ ) y \*\*\* ( $p < 0,001$ ).

### 1.6 Los niveles de GSN aumentan en la mitocondria en respuesta a distintos déficits enzimáticos de la cadena respiratoria.

A continuación se examinó si el aumento de los niveles de GSN citosólica en la mitocondria era exclusivo del déficit enzimático del complejo III, o si ocurría como respuesta a distintas alteraciones de los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria.

Para ello se analizaron, mediante SDS-PAGE y *Western blot*, los niveles de GSN en extractos celulares y fracciones mitocondriales de cuatro líneas de cíbridos transmitocondriales con déficits enzimáticos en los complejos I, III y IV de la cadena respiratoria, así como en sus respectivos controles isogénicos. La línea ND2-KD presentó un déficit aislado del complejo I debido a la mutación homoplásmica m.4681T>C en la subunidad ND2. Esta mutación causa una disminución del 90% en los niveles de complejo I en cíbridos (Ugalde *et al.*, 2007). Dado que no se consiguió obtener un control isogénico para esta línea celular, los resultados de esta línea siempre se compararon con los obtenidos para la línea control parental 143B-TK. La línea CYB-KO con déficit enzimático del complejo III se ha descrito anteriormente en el apartado 1.4. Las otras dos líneas de cíbridos, COX1-KO y COX2-KO, presentaron las mutaciones m.6930G>A y m.7896G>A en las subunidades COX1 y COX2 del complejo IV, respectivamente. Ambas subunidades son esenciales para el ensamblaje temprano del complejo IV y por tanto, dichas mutaciones causan una ausencia total de dicho complejo (Bruno *et al.*, 1999; Campos *et al.*, 2001).

En los lisados totales, se observó un aumento significativo de los niveles de GSN en todos los cíbridos mutantes frente a sus respectivos controles isogénicos (Figura 22A). De nuevo, este aumento fue mucho más evidente en la fracción mitocondrial (Figura 22B). Se cuantificaron las señales de la GSN y los valores se normalizaron respecto a los respectivos controles de carga en cada fracción.

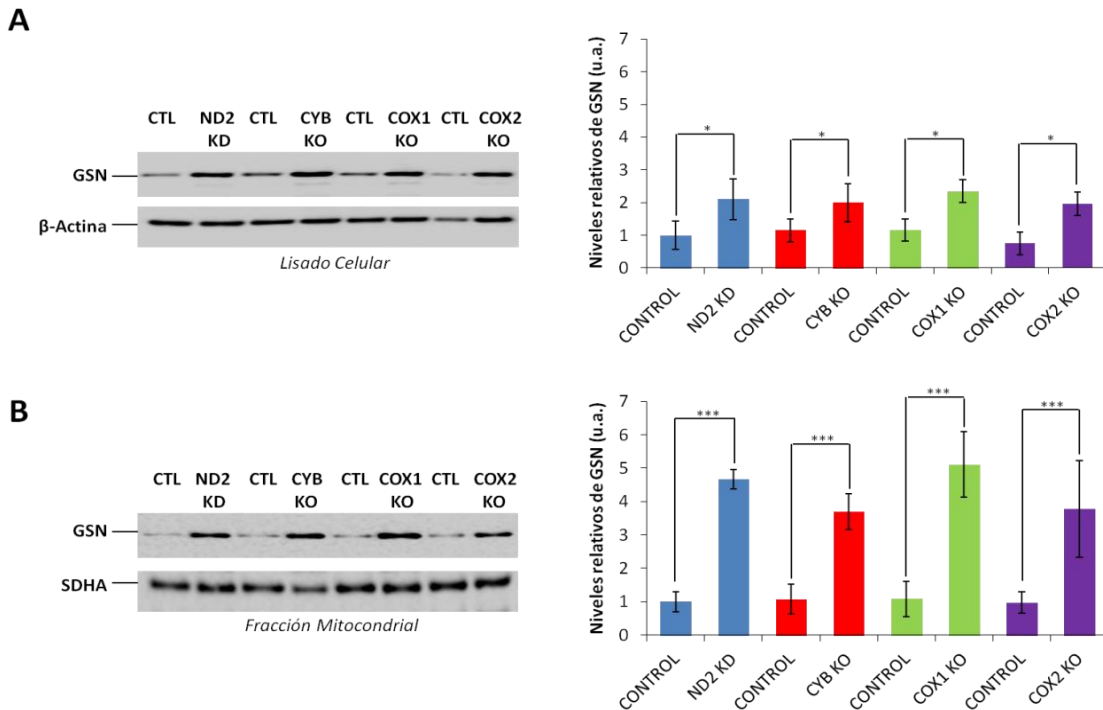
Por tanto, el conjunto de nuestros datos sugiere que la localización mitocondrial de la Gelsolina ocurre como respuesta a un fallo funcional generalizado de la cadena respiratoria mitocondrial.

### **1.7 Análisis de posibles mecanismos moleculares desencadenantes del aumento de la Gelsolina en la mitocondria.**

Todos los modelos celulares utilizados en este trabajo exhiben algún tipo de déficit enzimático de la cadena respiratoria mitocondrial. Por tanto, el mecanismo molecular desencadenante del aumento de los niveles de GSN en la mitocondria debe estar asociado a dicha disfunción de la cadena respiratoria. Entre estos mecanismos se encontrarían: un descenso en el consumo de O<sub>2</sub> y en la producción de ATP, la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, las alteraciones en las oscilaciones del calcio mitocondrial, la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la apoptosis.

## RESULTADOS

Por ello, a continuación se analizaron algunos de los mecanismos que previamente se habían relacionado con la regulación de los niveles de la GSN citosólica (Chauhan *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2015; Ji *et al.*, 2010a; Ji *et al.*, 2010b; Li *et al.*, 2009; Miyamoto & Wu 1990).



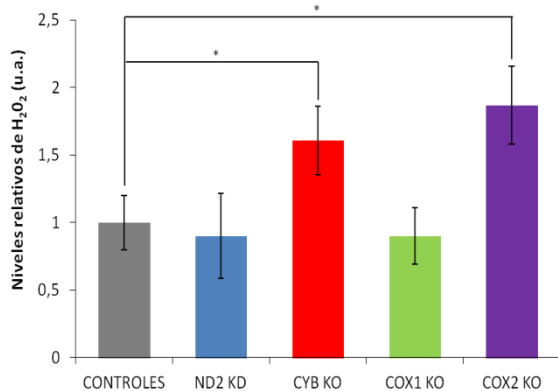
**Figura 22. Niveles de GSN en lisados celulares y fracciones mitocondriales de cíbridos con diferentes tipos de déficits enzimáticos de cadena respiratoria.** Se separaron 15  $\mu$ g de extractos proteicos procedentes de lisados celulares **(A)** y de fracciones mitocondriales purificadas **(B)**, en geles SDS-PAGE al 10% de acrilamida. Los niveles de GSN se analizaron por *Western blot*, utilizando la  $\beta$ -actina como control de carga en los lisados celulares y la subunidad SDHA del complejo II en las fracciones mitocondriales. Se cuantificaron las señales de cuatro experimentos independientes para cada fracción y los valores se normalizaron respecto a los controles de carga correspondientes. Los datos se presentan como la media  $\pm$  DE del análisis de cada línea mutante relativizada frente a su control isogénico. (u. a.) Unidades arbitrarias. Análisis estadístico: Test *U* de Mann Whitney, siendo \* ( $p < 0,05$ ) y \*\* ( $p < 0,01$ ).

### 1.7.1 El aumento de los niveles de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), no desencadena el aumento de Gelsolina en la mitocondria.

Estudios previos describieron que en células humanas MCF-7 la inhibición de la expresión de la GSN producía un aumento en la producción de ROS, lo cual es esencial para activar la muerte celular inducida mediante el tratamiento con el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (Li *et al.*, 2009). Además, se observó un aumento de los niveles de GSN citoplasmática en varias líneas

celulares humanas y de rata tratadas con 200 y 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 12, 24 y 36 horas (Chauhan *et al.*, 2008; Ji *et al.*, 2010b). Además, tanto en los fibroblastos con mutaciones en *BCS1L* (Morán *et al.*, 2010) como en los cíbridos CYB-KO (Rana *et al.*, 2000; Bell *et al.*, 2007), se describió un aumento de los niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  asociado al déficit enzimático de la cadena respiratoria. Por ello, nos planteamos si el tratamiento con  $\text{H}_2\text{O}_2$  podría inducir tanto un aumento de los niveles como la localización mitocondrial de la GSN.

En primer lugar, se midieron los niveles globales de  $\text{H}_2\text{O}_2$  producidos en las cuatro líneas de cíbridos transmitocondriales con déficits enzimáticos de cadena respiratoria, mediante la utilización de la sonda comercial *Amplex Red*. Curiosamente se observó que, a pesar de la severidad del fallo enzimático de cadena respiratoria, las líneas ND2-KD y COX1-KO no presentaron variaciones en los niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  respecto a los cíbridos control (Figura 23). Esto va en consonancia con estudios previos que mostraron que no todas las mutaciones del ADNmt tienen asociado un aumento en la producción de ROS (Vives-Bauza *et al.*, 2006). Sin embargo, se observó un aumento significativo en los niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en las líneas CYB-KO y COX2-KO respecto a sus controles isogénicos (Figura 23). Estos datos sugieren que no existe una correlación entre el aumento en los niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y el aumento de los niveles de GSN en la mitocondria, que tiene lugar en todas las células analizadas (apartado 1.6).

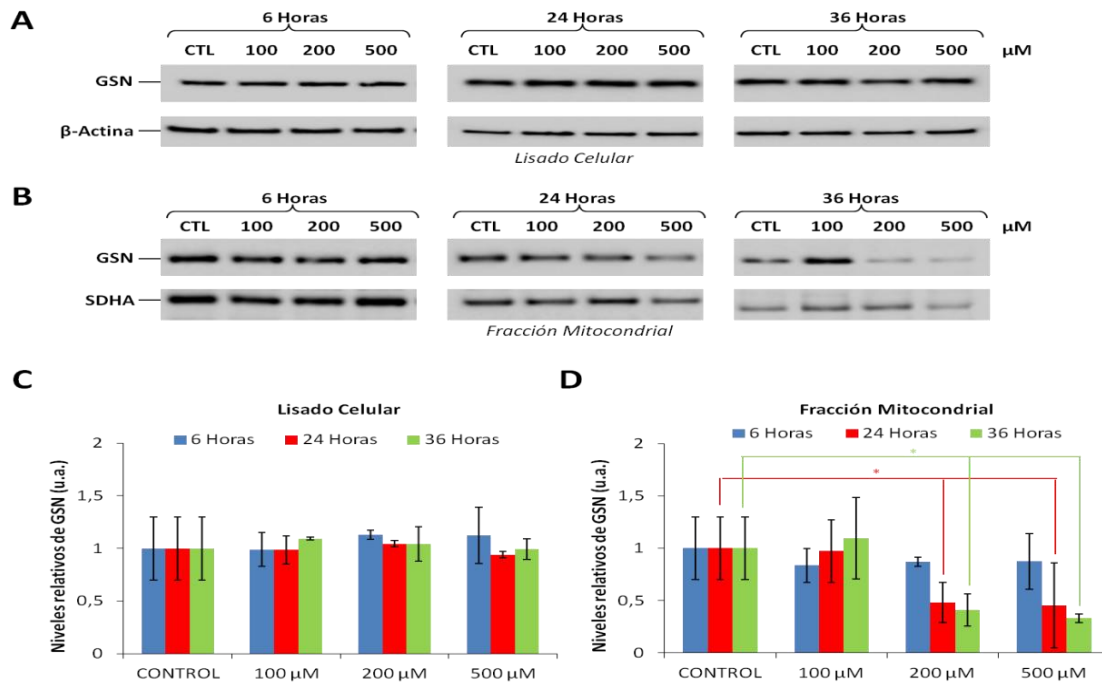


**Figura 23. Niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en cíbridos transmitocondriales con déficits enzimáticos de cadena respiratoria.** Los niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se cuantificaron usando la sonda comercial *Amplex Red*. Los valores de ocho experimentos independientes se normalizaron frente a los mg de proteína total en cada muestra. Los datos se presentan como la media  $\pm$  DE del análisis de cada línea relativizada frente al valor promedio de cuatro controles. (u. a.) Unidades arbitrarias. Análisis estadístico: Test *U* de Mann Whitney, siendo \* ( $p < 0,05$ ).

Para corroborarlo, se trató la línea celular control 143B-TK con concentraciones crecientes de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100, 200 y 500  $\mu\text{M}$ ) durante tiempos de 6, 24 y 36 horas. El tratamiento no afectó a los niveles estacionarios de GSN en los lisados celulares (Figuras 24A y 24C). Curiosamente, los niveles de GSN citosólica disminuyeron de forma significativa en las fracciones

## RESULTADOS

mitocondriales a las dos concentraciones más altas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tanto a las 24 como a las 36 horas del tratamiento (Figuras 24B y 24D). Por tanto, nuestros datos demuestran que el aumento de los niveles de GSN en la mitocondria no se debe a un aumento en los niveles intracelulares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



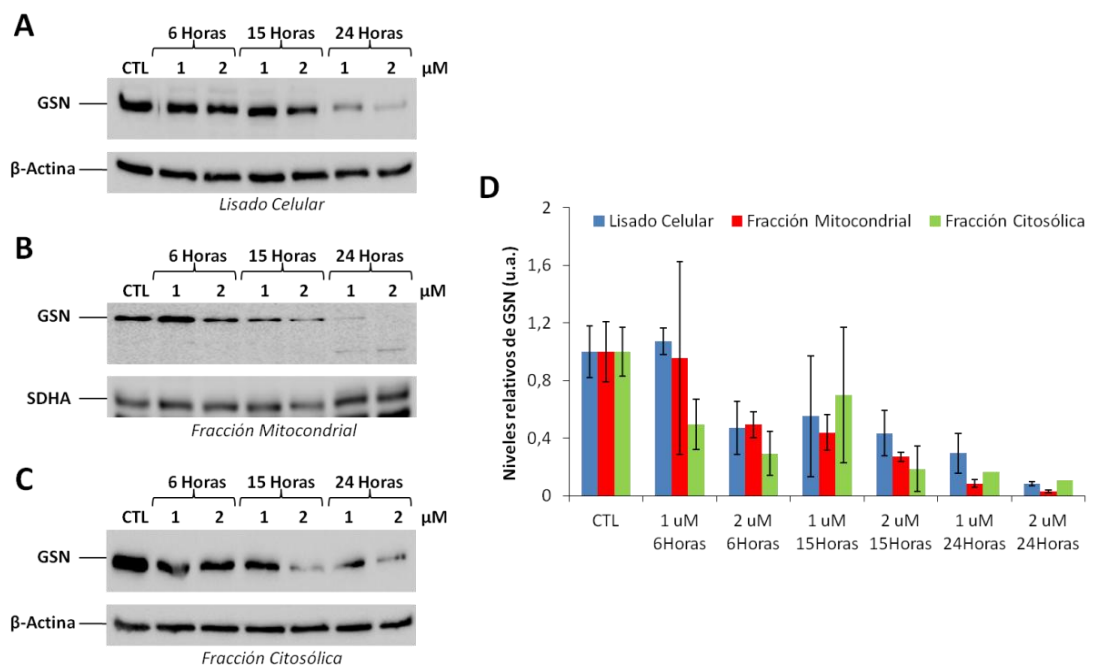
**Figura 24. Niveles de GSN en lisados celulares y fracciones mitocondriales de células 143B-TK<sup>-</sup> tratadas con concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Se utilizaron geles SDS-PAGE al 10% de acrilamida para separar 15 μg de extractos proteicos de lisados celulares (A) y de fracciones mitocondriales (B) procedentes de células 143B-TK<sup>-</sup> tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a las concentraciones de 100, 200 y 500 μM durante 6, 24 y 48 horas. Los niveles de GSN se analizaron por *Western blot*, utilizando la β-actina como control de carga en los lisados celulares y la subunidad SDHA del complejo II en las fracciones mitocondriales. Se cuantificaron las señales de la GSN de cuatro experimentos independientes para los lisados celulares (C) y las fracciones mitocondriales (D); y se normalizaron frente a los controles de carga respectivos. Los datos se presentan como la media ± DE del análisis de cada condición del tratamiento en las diferentes fracciones, relativizada frente a la condición control (CTL) (células no tratadas). (u. a.) Unidades arbitrarias. Análisis estadístico: Test *U* de Mann Whitney, siendo \* (*p* < 0,05).

### 1.7.2 La inducción de la apoptosis por estaurosporina no causa un aumento de los niveles de Gelsolina en la mitocondria.

A continuación, se analizó si las variaciones en los niveles y en la localización mitocondrial de la GSN en nuestros modelos celulares pudieran deberse a la inducción de la apoptosis, que en nuestros modelos celulares podría estar asociada a la disfunción de la cadena respiratoria.

Para comprobarlo, los cíbridos control se trataron con distintas concentraciones (1 y 2  $\mu\text{M}$ ) de estaurosporina durante 6, 15 y 24 horas. A continuación, se analizaron los niveles de GSN en lisados celulares y en las fracciones mitocondriales y citosólicas, mediante SDS-PAGE y *Western blot*. Se observó un descenso gradual en los niveles de la GSN citosólica en todas las fracciones, en paralelo al aumento en la concentración de estaurosporina y el tiempo de tratamiento (Figuras 25A, 25B y 25C). Las señales correspondientes a la GSN se cuantificaron y se normalizaron respecto a los respectivos controles de carga en las diferentes fracciones (Figura 25D).

Estos datos muestran que la inducción de la apoptosis mediante el tratamiento con estaurosporina no provoca un aumento en los niveles de la GSN en la mitocondria.



**Figura 25. Niveles de GSN en fracciones subcelulares de cíbridos control tratados con estaurosporina.** Se utilizaron geles SDS-PAGE al 10% de acrilamida para separar 15  $\mu\text{g}$  de extractos proteicos de lisado celular (A), fracción mitocondrial (B) y fracción citosólica (C). Los niveles de GSN se analizaron por *Western blot*, utilizando la  $\beta$ -actina como control de carga en los lisados celulares y fracciones citosólicas, así como la subunidad SDHA del complejo II en las fracciones mitocondriales. (D) Se cuantificaron las señales de GSN de dos experimentos independientes para cada fracción y los valores se normalizaron respecto a los controles de carga correspondientes. Los datos se presentan como la media  $\pm$  DE del análisis de las diferentes condiciones del tratamiento relativizadas frente a la condición control (CTL) (células no tratadas). (u. a.) Unidades arbitrarias.

## RESULTADOS

### 2. LOS NIVELES DE GELSOLINA PLASMÁTICA DISMINUYEN COMO RESPUESTA A LOS DÉFICITS ENZIMÁTICOS DE LA CADENA RESPIRATORIA.

El gen de la Gelsolina (*GSN*) en humanos se encuentra en el cromosoma 9 y codifica para tres isoformas: dos citosólicas y una isoforma plasmática que se secreta a la circulación. Las tres isoformas tienen una estructura idéntica, salvo pequeñas diferencias entre sus extremos amino terminales, que se deben a que el gen consta de dos sitios diferentes para el inicio de la transcripción: uno para las isoformas citosólicas y otro para la plasmática (Kwiatkowski *et al.*, 1988; Vouyiouklis *et al.*, 1997; Yins *et al.*, 1984). La isoforma 1 ó plasmática posee un péptido señal de secreción de 27 aminoácidos (que se proteoliza para generar la proteína madura) y una cola con 24 aminoácidos más que la isoforma citosólica 2 en su extremo amino terminal (Kwiatkowski *et al.*, 1986). La isoforma 3 es minoritaria, ya que sólo se expresa en oligodendrocitos del cerebro, pulmones y testículos (Vouyiouklis *et al.*, 1997).

Estudios previos han descrito alteraciones de los niveles de *GSN* plasmática en patologías cardiovasculares (Suhler *et al.*, 1997), renales (Lee *et al.*, 2009), inflamatorias (Kulakowska *et al.*, 2008; Osborn *et al.*, 2008) e infecciosas (Bucki *et al.*, 2005). Incluso se ha propuesto que los niveles de *GSN* plasmática pueden constituir un buen marcador pronóstico en el desarrollo de diversas enfermedades, así como un marcador general de salud (Peddada *et al.*, 2012).

Dado que los niveles de la isoforma citosólica de la *GSN* están aumentados en respuesta a déficits enzimáticos de la cadena respiratoria, nos planteamos la existencia de posibles alteraciones en los niveles de la isoforma secretada en nuestros modelos celulares. En caso de existir alteraciones significativas en los niveles de *GSN* plasmática, esta proteína sería un buen candidato a biomarcador de enfermedades mitocondriales.

Por ello, se analizaron los niveles de *GSN* plasmática en el medio extracelular de distintas líneas celulares con déficits enzimáticos de la cadena respiratoria. Así mismo, se procedió a analizar los niveles de *GSN* plasmática en plasma de pacientes pediátricos y adultos previamente diagnosticados con patología mitocondrial.

#### 2.1 Diferenciación de las isoformas secretada y citosólica de la *GSN*.

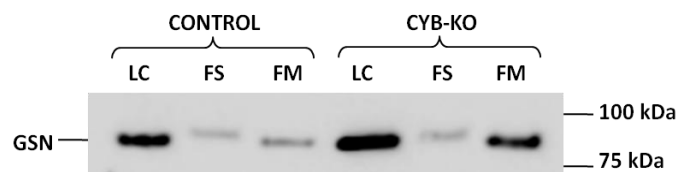
La isoforma plasmática madura de la *GSN* tiene en el extremo N-terminal una cola de 24 aminoácidos más larga que la isoforma citosólica, lo cual hace que ambas isoformas difieran en su movilidad electroforética (83 kDa la isoforma secretada y 80 kDa la citosólica) (Yins *et al.*, 1984).

Para ver si ambas isoformas se podían diferenciar por su peso molecular, se analizaron mediante SDS-PAGE y *Western blot* los extractos proteicos derivados de los lisados celulares y de



las fracciones mitocondriales y del medio extracelular (secretomas), tanto de los híbridos CYB-KO como de su control isogénico. Se observó que las dos isoformas de la GSN se distinguían por leves diferencias en su movilidad electroforética. Mientras que en lisados celulares y en las fracciones mitocondriales sólo se expresaba la isoforma citosólica, en la fracción secretada únicamente se detectó una banda de mayor peso molecular correspondiente a la isoforma plasmática (Figura 26).

Al no existir anticuerpos específicos frente a la isoforma secretada, no se puede descartar completamente que en el medio extracelular pueda existir una contaminación con la isoforma citosólica, derivada de la ruptura celular mecánica como resultado de la manipulación o por la inducción de la apoptosis. Sin embargo, al no apreciarse la aparición de una doble banda en las fracciones secretadas, se excluiría la contaminación en el secretoma por parte de la GSN citosólica



**Figura 26. Isoformas de la GSN en híbridos CYB-KO y control.** Se utilizaron geles SDS-PAGE al 6% de acrilamida, para separar 10 µg de extractos proteicos de lisado celular (**LC**) y fracción mitocondrial (**FM**) y 35 µg del medio extracelular o fracción secretada (**FS**). Las isoformas de GSN se analizaron por *Western blot* utilizando el anticuerpo que reconoce a esta proteína.

## 2.2 Los niveles de Gelsolina secretada disminuyen en el medio extracelular de modelos celulares con déficit enzimático de cadena respiratoria.

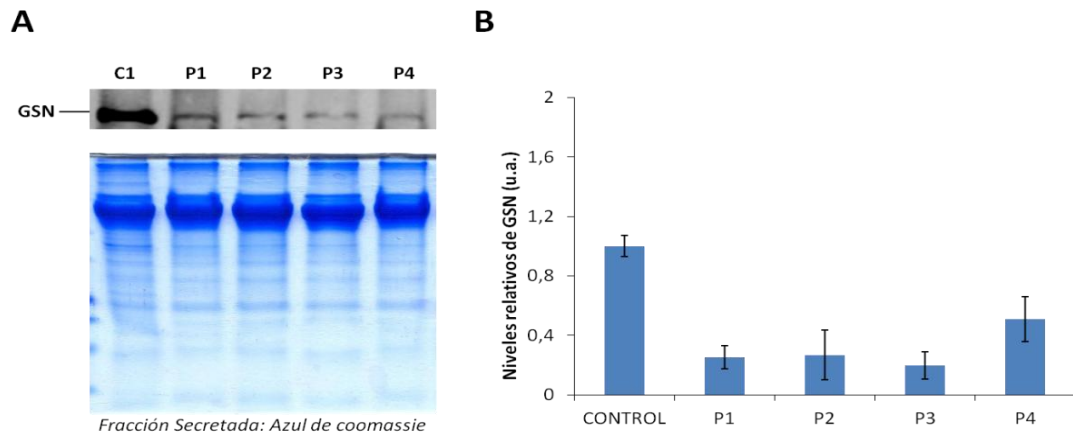
En primer lugar, se analizaron los niveles de GSN secretada en tres modelos celulares distintos: a) fibroblastos con mutaciones en *BCS1L* frente a fibroblastos control, b) fibroblastos control tratados con antimicina A y c) híbridos transmitocondriales con alteraciones enzimáticas de los complejos de la cadena respiratoria frente a sus controles isogénicos.

### 2.2.1 Análisis de los niveles de Gelsolina secretada por fibroblastos de pacientes con mutaciones en *BCS1L*.

Se cultivaron los fibroblastos con mutaciones en *BCS1L* y los fibroblastos control C1 en un medio sin suero durante 24 horas y se recolectó el medio extracelular. Los extractos proteicos de las fracciones secretadas o secretomas se purificaron y se separaron mediante SDS-PAGE, para posteriormente proceder al análisis de los niveles de GSN mediante *Western blot*. Se observó un

## RESULTADOS

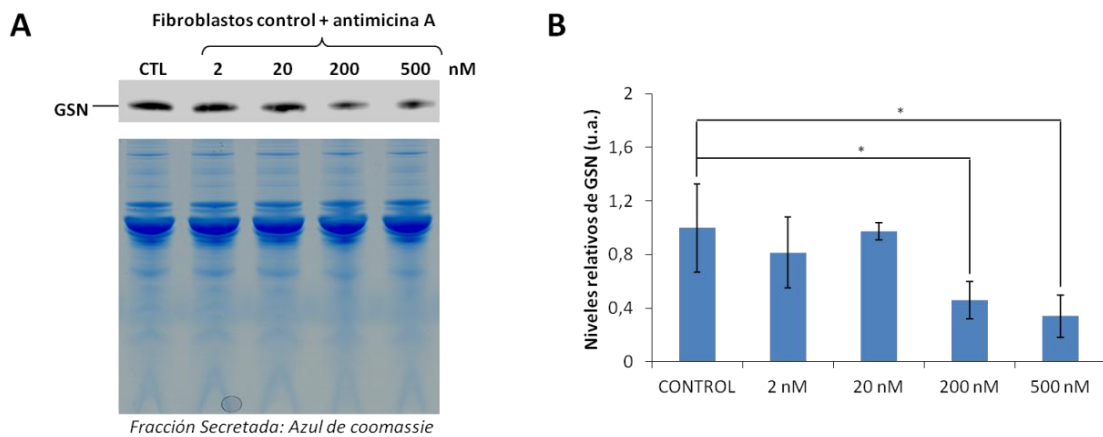
claro descenso de los niveles de la GSN secretada en los secretomas de todos los fibroblastos de pacientes en comparación con los fibroblastos control (Figura 27A). Los niveles de GSN secretada se cuantificaron y los valores se normalizaron frente a la señal total de proteína presente en cada carril de los geles previamente teñidos con azul de *coomassie* (Figura 27B).



**Figura 27. Niveles de GSN secretada por fibroblastos con mutaciones en *BCS1L* respecto a fibroblastos control.** (A) Se separaron 25  $\mu$ g de extractos proteicos procedentes de las fracciones secretadas de fibroblastos control C1 y con mutaciones en *BCS1L*, en geles SDS-PAGE al 10% de acrilamida. Los niveles de GSN secretada se analizaron por *Western blot*, utilizando como control de carga la cantidad de proteína total en cada carril del gel previamente teñido con azul de *coomassie*. (B) Se cuantificaron las señales de GSN de dos experimentos independientes y los valores se normalizaron frente al control de carga. Los datos se presentan como la media  $\pm$  DE del análisis de cada secretoma de fibroblastos mutados relativizados frente al control. (u. a.) Unidades arbitrarias.

### 2.2.2 Análisis de los niveles de Gelsolina secretada en fibroblastos control tratados con antimicina A.

Los fibroblastos control C1 se cultivaron en presencia de concentraciones crecientes de antimicina A (2, 20, 200 y 500 nM) durante 48 horas en un medio sin suero. Se purificaron los extractos proteicos de las fracciones secretadas y se separaron mediante SDS-PAGE. Los niveles de GSN secretada se analizaron por *Western blot*. Se observó un descenso significativo de los niveles de GSN secretada a las dos concentraciones más altas del tratamiento (200 y 500 nM) frente a los fibroblastos sin tratar (Figura 28A). Los niveles de GSN secretada se cuantificaron y los valores se normalizaron frente a la señal total de proteína presente en cada carril de los geles previamente teñidos con azul de *coomassie* (Figura 28B).



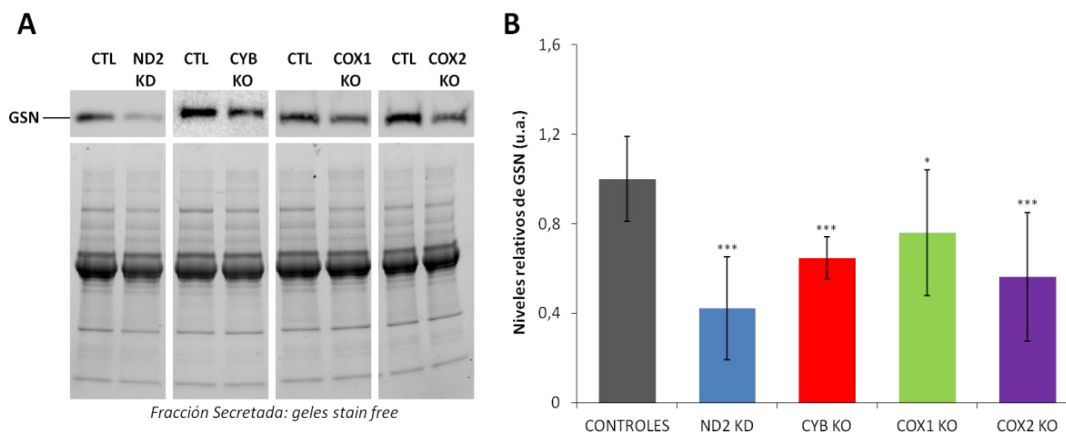
**Figura 28. Niveles de GSN secretada en fibroblastos control C1 tratados con antimicina A.** (A) Se utilizaron geles SDS-PAGE al 10% de acrilamida, para separar 25  $\mu$ g de extractos proteicos procedentes de las fracciones secretadas de fibroblastos control sin tratar (CTL) o tratados con concentraciones crecientes de 2 a 500 nM de antimicina A durante 48 horas. Los niveles de GSN secretada se analizaron por *Western blot* utilizando como control de carga la señal de proteína total en cada carril del gel previamente teñido con azul de *coomassie*. (B) Se cuantificaron las señales de GSN de cuatro experimentos independientes y los valores se normalizaron frente al control de carga. Los datos se presentan como la media  $\pm$  DE del análisis de cada condición del tratamiento respecto a la condición control (células no tratadas con antimicina A). (u. a.) Unidades arbitrarias. Análisis estadístico: Test *U* de Mann Whitney, siendo \* ( $p < 0,05$ ).

### 2.2.3 Análisis de los niveles de Gelsolina secretada en cíbridos transmitocondriales con déficits enzimáticos de cadena respiratoria.

De igual manera que en los fibroblastos con mutaciones en *BCS1L*, se purificaron los secretomas de los cíbridos ND2-KD, CYB-KO, COX1-KO, COX2-KO y de sus respectivos controles isogénicos cultivados durante 24 horas en un medio sin suero. Los extractos proteicos de las fracciones secretadas se separaron mediante SDS-PAGE en geles comerciales “TGX *Stain-free*” (BioRad), los cuales permiten la normalización de cualquier banda frente a la cantidad total de proteína presente en cada carril, gracias a que en su composición incluyen unos fluoróforos que se unen covalentemente al triptófano presente en las proteínas. Estos fluoróforos son posteriormente activados mediante radiación UV, pudiendo así cuantificar la señal total de proteína presente en el gel. Los niveles de GSN secretada se analizaron mediante *Western blot* (Figura 29A). Las señales se cuantificaron y los valores se normalizaron frente a la cantidad de proteína total presente en cada carril del gel (Figura 29B). De nuevo, se observó un descenso

## RESULTADOS

significativo de los niveles de la GSN en los secretomas de todas las líneas de híbridos mutantes respecto a los controles isogénicos.



**Figura 29. Niveles de GSN secretada por híbridos trans mitocondriales con déficits enzimáticos de cadena respiratoria. (A)** Se separaron 30 µg de extractos proteicos procedentes de las fracciones secretadas de los híbridos, en geles "TGX Stain-free" (BioRad) con un gradiente del 4-20% de acrilamida. Los niveles de GSN secretada se analizaron por Western blot. Como control de carga se utilizó la señal fluorescente de proteína total en cada carril de los geles. **(B)** Se cuantificaron las señales de GSN de seis experimentos independientes y se normalizaron respecto al control de carga. Los datos se presentan como la media ± DE del análisis de los secretomas de cada línea mutante relativizados frente a la media de los controles isogénicos. (u. a.) Unidades arbitrarias. Análisis estadístico: Test U de Mann Whitney, siendo \* ( $p < 0,05$ ) y \*\*\* ( $p < 0,001$ ).

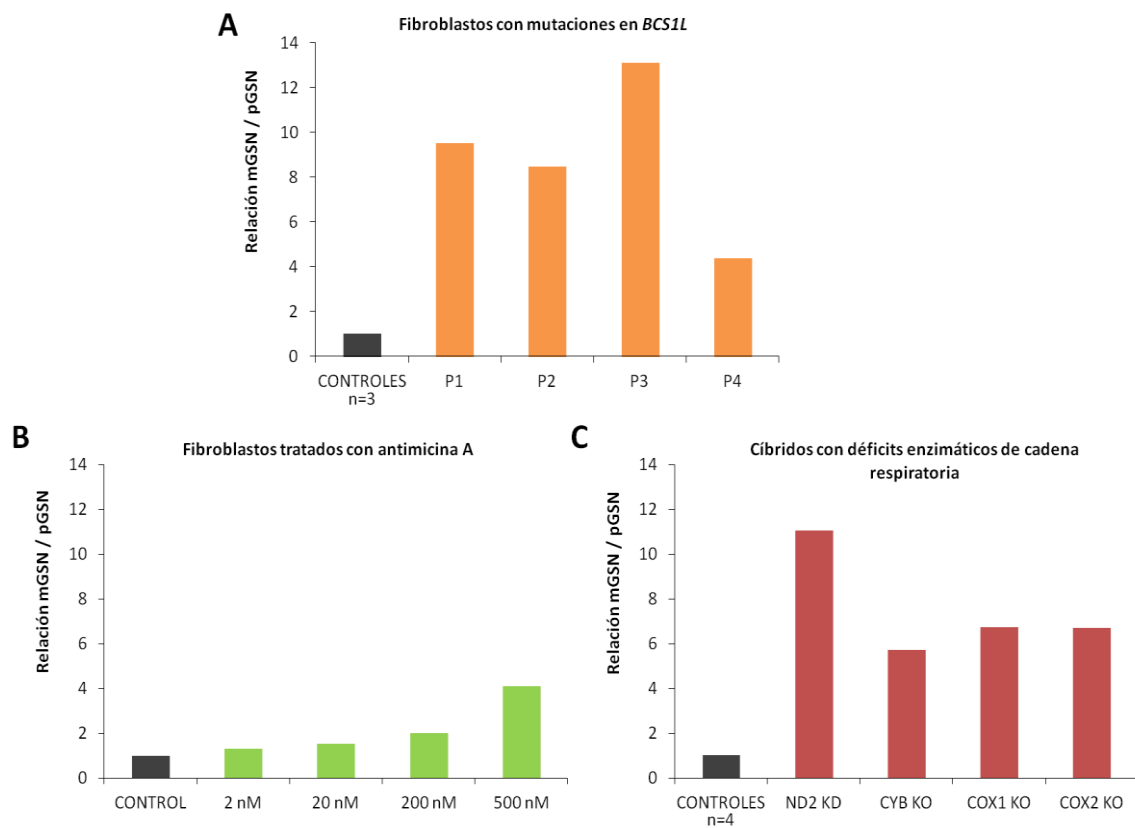
### 2.3 Relación entre la Gelsolina presente en la mitocondria y la Gelsolina plasmática en modelos celulares de disfunción de cadena respiratoria.

A continuación se analizó la ratio de GSN presente en la mitocondria (mGSN) respecto a la GSN plasmática (pGSN), en tres modelos celulares distintos: a) fibroblastos con mutaciones en *BCS1L* respecto a fibroblastos control, b) fibroblastos control tratados con antimicina A y c) híbridos trans mitocondriales con alteraciones enzimáticas de los complejos de cadena respiratoria respecto a sus controles isogénicos.

En los fibroblastos con mutaciones en *BCS1L*, se observó que la ratio mGSN/pGSN era de entre 4 a 13 veces más elevada que la media de los fibroblastos control (Figura 30A). En los fibroblastos control tratados con concentraciones crecientes de antimicina A, se vio que dicha ratio aumentaba de 1,3 a 4 veces respecto a los fibroblastos no tratados (Figura 30B). Como se observó en la Figura 19 del apartado 1.5.1, el aumento de GSN en la mitocondria fue significativo a partir de la concentración de 200 nM de antimicina A. En esta condición, los niveles de GSN en

la mitocondria son exactamente el doble que los niveles de la isoforma secretada (Figura 30B). Estos resultados sugieren que podría estimarse un valor de corte de 2, a partir del cual se desencadenaría el mecanismo molecular de adaptación a un déficit enzimático del sistema OXPPOS, que implica funcionalmente a la Gelsolina. Asimismo, en los cíbridos transmitocondriales con déficits enzimáticos de la cadena respiratoria se observó que la ratio mGSN/pGSN era de entre 6 a 11 veces más elevada que la media de los controles isogénicos (Figura 30C).

Estos datos sugieren que, la relación entre los niveles de GSN localizada en la mitocondria frente a los niveles de GSN plasmática podría servir como un indicador útil para el diagnóstico de las enfermedades mitocondriales asociadas a déficits enzimáticos de la cadena respiratoria.



**Figura 30. Relación mGSN/pGSN en modelos celulares con déficits enzimáticos de la cadena respiratoria.** Los niveles de GSN mitocondrial (mGSN) se cuantificaron en fibroblastos con mutaciones en *BCS1L* (**A**), en fibroblastos control tratados antimicina A (**B**) y en cíbridos transmitocondriales con déficits enzimáticos de la cadena respiratoria (**C**); y se relacionaron con los niveles cuantificados de la GSN plasmática (pGSN). Los datos se presentan como la ratio de mGSN / pGSN en todos los modelos con disfunción de cadena respiratoria y se expresan como porcentaje respecto a la ratio promedio de sus correspondientes controles.

## RESULTADOS

### 2.4 Los niveles de Gelsolina plasmática disminuyen significativamente en el plasma sanguíneo de pacientes con patología mitocondrial.

En segundo lugar, se midieron los niveles de GSN plasmática en muestras de plasma sanguíneo procedentes de pacientes pediátricos y adultos con patología mitocondrial, diagnosticados genética y/o bioquímicamente en el Hospital Universitario 12 de Octubre.

#### 2.4.1 Análisis de los niveles de Gelsolina plasmática en pacientes pediátricos.

Para este estudio, se obtuvieron muestras sanguíneas de 32 pacientes pediátricos diagnosticados bioquímicamente con enfermedad mitocondrial que acudieron a consulta en la unidad de Enfermedades mitocondriales, metabólicas y hereditarias del Hospital Universitario 12 de Octubre. Se obtuvo el plasma sanguíneo de dichas muestras, para posteriormente proceder a la medida de los niveles de GSN plasmática mediante la técnica inmunoquímica de ELISA. Las principales características (edad, sexo, tipo de déficit enzimático y fenotipo clínico) de los pacientes incluidos en este estudio se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Pacientes pediátricos incluidos en el análisis de los niveles de GSN plasmática.

IDENTIFICACIÓN DEL PACIENTE	SEXO	EDAD (años en el momento de recogida muestra)	DÉFICIT ENZIMÁTICO DE CADENA RESPIRATORIA	DIAGNÓSTICO GENÉTICO (Mutación)	CLÍNICA
444	V	3	Complejo I	Mutación heterocigota compuesta en el gen <i>LARS2</i>	Encefalopatía
422	V	6	Complejos II y III	ND	Encefalopatía
413	V	7	Complejo III	ND	Encefalomiopatía
492	V	7	Complejos III y IV	ND	Encefalomiopatía

409	V	7	Complejos I, III y IV	ND	Encefalomiopatía
450	V	8	Complejos I y III	ND	Encefalopatía
427	V	8	Complejo I	ND	Encefalopatía
428	V	9	Complejos I y III	ND	Encefalopatía
400	V	9	Complejo I	ND	Encefalopatía
445	V	12	Complejo III	ND	Encefalomiopatía
442	V	13	Complejo I	ND	Encefalomiopatía
429	V	17	Complejo I	ND	Encefalopatía
687	V	18	ND	Deleción única ADN mitocondrial	Miopatía
460	M	3	Complejo I	ND	Encefalopatía Retraso psicomotor severo
467	M	3	Complejo III	ND	Encefalomiopatía
448	M	3	Complejos I y III	Mutación homocigota c.64T>C en el gen <i>NDUFB3</i>	Acidosis láctica congénita
480	M	5	Complejo I	ND	Encefalopatía Afectación visual Hiperuricemia
329	M	6	Complejo III	ND	Encefalopatía

## RESULTADOS

478	M	7	Complejo I	ND	Encefalomiopatía
463	M	7	Complejo IV	ND	Encefalopatía Afectación visual Sordera neurosensorial
425	M	8	Complejo IV	ND	Encefalomiopatía Afectación intestinal
417	M	8	Complejo IV	ND	Hepatopatía Afectación intestinal
498	M	8	Complejos I, III y IV	ND	Encefalopatía
451	M	9	Complejo I	ND	Encefalopatía Síndrome polimalformativo
411	M	9	Complejo III	Mutación homocigota en el gen <i>FOXRED1</i>	Encefalopatía Acidosis láctica congénita
160	M	10	Complejo IV	ND	Encefalopatía
298	M	10	Complejo IV	ND	Encefalomiopatía
430	M	13	Complejo I	ND	Encefalopatía
390	M	14	Complejos III y IV	ND	Encefalomiopatía
493	M	16	Complejos III y IV	ND	Encefalomiopatía Retraso psicomotor severo



642	M	16	ND	Mutación homoplásmica m.14484T>G en el gen <i>ND6</i>	Hepatomegalia Miopatía
700	M	18	Complejos I, III y IV	Mutación homocigota c.1510C>T en el gen <i>MTO1</i>	Encefalomiopatía Acidosis láctica Miocardiopatía

V: Varón. M: Mujer. ND: No Descrito.

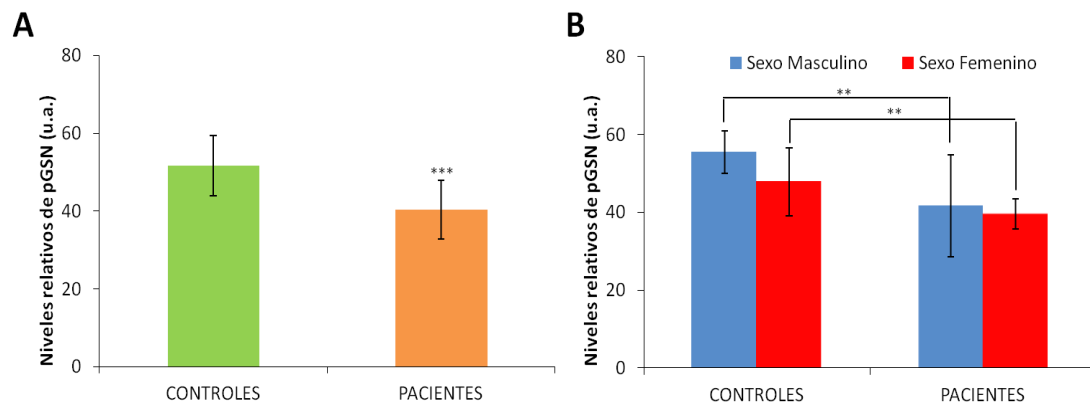
Como controles del estudio se recogieron muestras sanguíneas de 33 individuos sanos cuyos rangos de edad y sexo correlacionaban con el de los pacientes. En concreto, se obtuvieron muestras de 17 varones de edades comprendidas entre 1 y 18 años, así como muestras de 16 mujeres de edades comprendidas entre 1 y 17 años.

En los individuos sanos pediátricos la concentración plasmática promedio de GSN circulante fue de 121,3 µg/ml, mientras que la media en pacientes fue de 94,4 µg/ml de plasma. Las medidas de los niveles de GSN plasmática en los pacientes pediátricos y en los individuos control relativizadas frente a un control interno del experimento, revelaron un descenso muy significativo de los niveles de la isoforma secretada de la GSN en los pacientes respecto a los controles (Figura 31A). La distribución por sexos siguió mostrando diferencias significativas entre controles y pacientes, pero sin hallarse diferencias significativas debidas al sexo (Figura 31B).

#### 2.4.2 Análisis de los niveles de Gelsolina plasmática en pacientes adultos.

Para este estudio, se obtuvieron muestras sanguíneas de 24 pacientes adultos diagnosticados con enfermedad mitocondrial que acudieron a la consulta del Servicio de Neurología del Hospital Universitario 12 de Octubre. Se obtuvo el plasma sanguíneo de dichas muestras para posteriormente proceder a la medida de los niveles de la GSN plasmática mediante ELISA. Las principales características (edad, sexo, tipo de déficit enzimático, mutación y fenotipo clínico) de los pacientes incluidos en este estudio, se muestran en la Tabla 5.

## RESULTADOS



**Figura 31. Niveles de GSN plasmática en pacientes pediátricos con enfermedad mitocondrial OXPHOS respecto a individuos sanos.** Se midieron los niveles de GSN plasmática (pGSN) en diluciones 1:8000 de plasma sanguíneo procedente de pacientes y controles pediátricos. Los valores obtenidos se normalizaron frente a la cantidad de proteína total presente en cada muestra y se relativizaron frente al control interno (mujer sana de 41 años) presente en todos los experimentos. Los datos se presentan como **(A)** la media  $\pm$  DE de los pacientes (n=32) respecto a los controles (n=33) y **(B)** como la media  $\pm$  DE de los pacientes frente a los controles estratificados ambos por sexo. (u. a.) Unidades arbitrarias. Análisis estadístico: Test *U* de Mann Whitney, siendo \*\* ( $p < 0,01$ ) y \*\*\* ( $p < 0,001$ ).

**Tabla 5. Pacientes adultos incluidos en el análisis de los niveles de GSN plasmática.**

IDENTIFICACIÓN DEL PACIENTE	SEXO	EDAD (años en el momento de recogida muestra)	DÉFICIT ENZIMÁTICO DE CADENA RESPIRATORIA	DIAGNÓSTICO GENÉTICO (Mutación)	CLÍNICA
332	V	22	Complejo IV	ND	Encefalopatía Afectación visual
438	V	35	ND	Deleciones múltiples ADN mitocondrial	Miopatía Intolerancia al ejercicio
460	V	37	ND	Mutación heteroplásmica m.8993T>G en el gen <i>ATP6</i>	NARP

401	V	41	ND	Mutación heteroplásmica en el gen <i>MT-TN</i>	Miopatía Intolerancia al ejercicio
638	V	43	ND	Mutación heteroplásmica m.3243A>G en el gen <i>MT-TL1</i>	MELAS Diabetes
498	V	45	ND	Mutación heteroplásmica en el gen <i>MT-TN</i>	Miopatía
967	V	48	Complejo I	Deleciones múltiples ADN mitocondrial	Polineuropatía Ataxia Hipoacusia
113	V	48	Complejos I y IV	Mutación heteroplásmica m.3243A>G en el gen <i>MT-TL1</i>	MELAS
447	V	52	ND	Delección única ADN mitocondrial	Miopatía
404	V	56	Complejos I, III y IV	Mutación heteroplásmica m.8344A>G en el gen <i>MT-TK</i>	MERFF
182	V	58	ND	Mutación heterocigota en el gen <i>C10orf2</i>	Miopatía
482	M	20	Complejo I	Delección única ADN mitocondrial	Kearns-Sayre
399	M	21	Complejos III y IV	ND	Acidosis láctica Hiperglucemia
423	M	29	Complejos I, III y IV	Deleciones múltiples ADN mitocondrial	Miopatía

## RESULTADOS

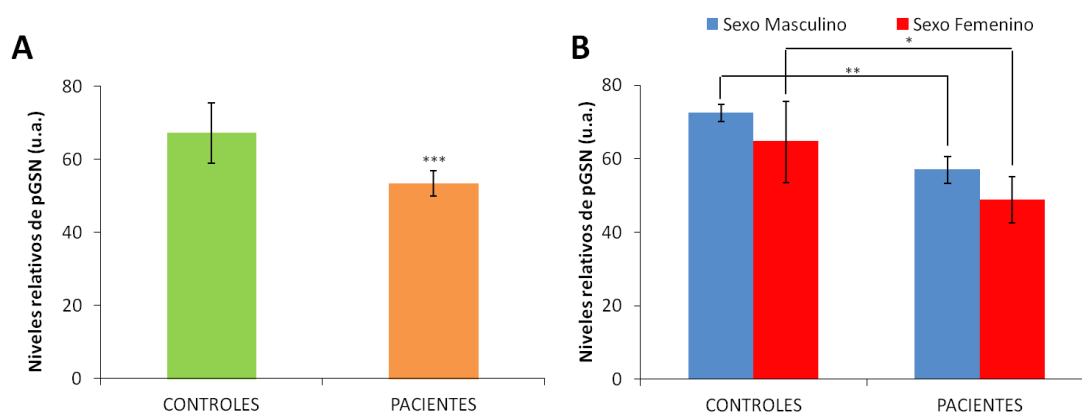
417	M	29	ND	Mutación homoplásmica m.11778G>A en el gen <i>MT-ND4</i>	LHON
471	M	30	ND	Mutación heteroplásmica en el gen <i>MT-CO1</i>	Miopatía
687	M	36	Complejos I, III y IV	Mutación heteroplásmica m.3258T>C en el gen <i>MT-TL1</i>	MELAS
198	M	38	ND	Depleción ADN mitocondrial	Encefalopatía
738	M	38	Complejos I, III y IV	Delección única ADN mitocondrial	Miopatía Intolerancia al ejercicio
636	M	39	ND	Mutación heteroplásmica m.3243A>G en el gen <i>MT-TL1</i>	MELAS Diabetes Hipoacusia
475	M	41	ND	Mutación heteroplásmica m.3243A>G en el gen <i>MT-TL1</i>	Hipoacusia Migrañas
455	M	45	ND	Deleciones múltiples ADN mitocondrial	Miopatía Intolerancia al ejercicio
477	M	45	ND	Mutación heterocigota c.2864A>G en el gen <i>POLG</i>	Miopatía
991	M	53	Complejo I	Deleciones múltiples ADN mitocondrial	Miopatía Intolerancia al ejercicio

V: Varón. M: Mujer. ND: No Descrito.

Como controles del estudio se recogieron muestras sanguíneas de 25 voluntarios sanos, que correlacionaban en edad y sexo con los pacientes. Concretamente, se obtuvieron muestras de 9 varones de edades comprendidas entre 24 y 49 años, así como muestras de 16 mujeres de edades comprendidas entre 27 y 62 años.

En los individuos sanos adultos la concentración plasmática media de GSN circulante fue de 203,7  $\mu\text{g/ml}$ , mientras que la media de pacientes fue de 144,5  $\mu\text{g/ml}$  de plasma. Al analizar los niveles de GSN plasmática en los pacientes adultos mitocondriales respecto a los individuos control, todos ellos relativizados frente al control interno del experimento, se observó de nuevo un descenso significativo de los niveles de la proteína secretada en los pacientes (Figura 32A). La distribución por sexos reveló que las diferencias eran más acusadas entre controles y pacientes masculinos que entre los femeninos, pero sin hallarse diferencias significativas entre ambos sexos (Figura 32B).

En conclusión, los niveles de GSN plasmática o secretada disminuyen significativamente en respuesta a una disfunción de la actividad mitocondrial. Estos resultados sugieren que los niveles de GSN plasmática podrían servir como un biomarcador no invasivo para el diagnóstico de estas enfermedades.



**Figura 32. Niveles de GSN plasmática en muestras de pacientes adultos con enfermedad mitocondrial OXPHOS respecto a individuos control.** Se midieron los niveles de GSN plasmática (pGSN) en diluciones 1:8000 de plasma sanguíneo procedente de pacientes y controles adultos. Los valores obtenidos se normalizaron frente a la cantidad de proteína total presente en cada muestra y se relativizaron frente al control interno (mujer sana de 41 años) presente en todos los experimentos. Los datos se presentan como **(A)** la media  $\pm$  DE de los pacientes (n=24) respecto a los controles (n=25) y **(B)** como la media  $\pm$  DE de los pacientes frente a los controles estratificados por sexo. (u. a.) Unidades arbitrarias. Análisis estadístico: Test U de Mann Whitney, siendo \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ) y \*\*\* ( $p < 0,001$ ).

## RESULTADOS

### 3. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA GELSOLINA EN MODELOS CELULARES DE ENFERMEDAD MITOCONDRIAL.

Dado que nuestros resultados previos (sección 1 de Resultados) mostraron la localización mitocondrial de la GSN como respuesta a los déficits enzimáticos de cadena respiratoria, se procedió a evaluar la implicación funcional de la GSN en la mitocondria.

#### 3.1 La Gelsolina citosólica se localiza en la membrana externa mitocondrial.

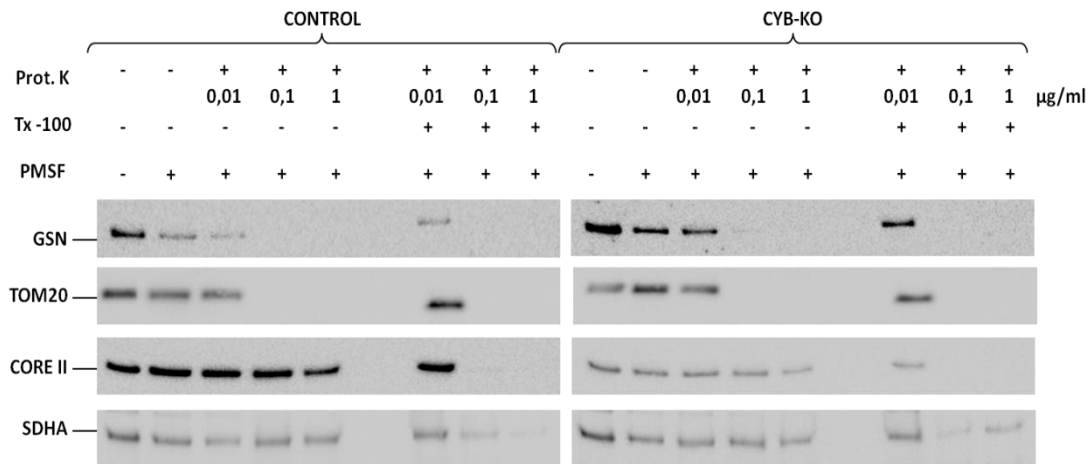
Para conocer la localización exacta de la GSN en la mitocondria, se partió de mitocondrias purificadas tanto de los cíbridos CYB-KO como de su control isogénico. Las mitocondrias se trataron con concentraciones crecientes de proteinasa K en presencia o ausencia del detergente Tritón X-100. La proteinasa K degrada tanto los restos de proteínas citosólicas como las que quedan expuestas en la membrana mitocondrial externa, pero no las proteínas de la membrana interna. La adición posterior del detergente rompe las membranas mitocondriales y permite a la proteinasa K acceder a todo el contenido de proteínas mitocondriales, pudiendo así digerirlas. Los extractos mitocondriales de las diferentes condiciones experimentales se separaron mediante SDS-PAGE. A continuación, se analizaron mediante *Western blot* utilizando anticuerpos contra la GSN y contra proteínas de distinta localización submitocondrial.

El tratamiento con proteinasa K condujo a la degradación en paralelo de la GSN y del marcador de membrana externa TOM20, tanto en la línea control como en la mutante. Sin embargo, las proteínas orientadas hacia la matriz mitocondrial CORE2 y SDHA quedaron protegidas por ambas membranas mitocondriales, siendo solo digeridas una vez que se añadió el detergente Tritón X-100. Estos datos indican que la GSN se localiza en la membrana mitocondrial externa.

#### 3.2 La Gelsolina forma parte de un complejo de ~150 kDa en la mitocondria, cuyos niveles aumentan en respuesta a déficits enzimáticos de la cadena respiratoria.

A continuación, se determinó si la GSN formaba parte de alguna estructura macromolecular en la membrana mitocondrial externa, mediante BN-PAGE de la fracción mitocondrial de células control 143B-TK. Se observó que la GSN formaba parte de un complejo con un peso molecular de alrededor de 150 kDa, el cual colocalizaba con el complejo II de la membrana mitocondrial interna (Figura 34A). Este análisis se extendió a las cuatro líneas de cíbridos mutantes con déficits enzimáticos de los complejos I, III y IV de la cadena respiratoria (Figura 34B). Las señales correspondientes al complejo de la GSN se cuantificaron y se normalizaron respecto al complejo II, utilizado como control de carga (Figura 34C). Se observó un

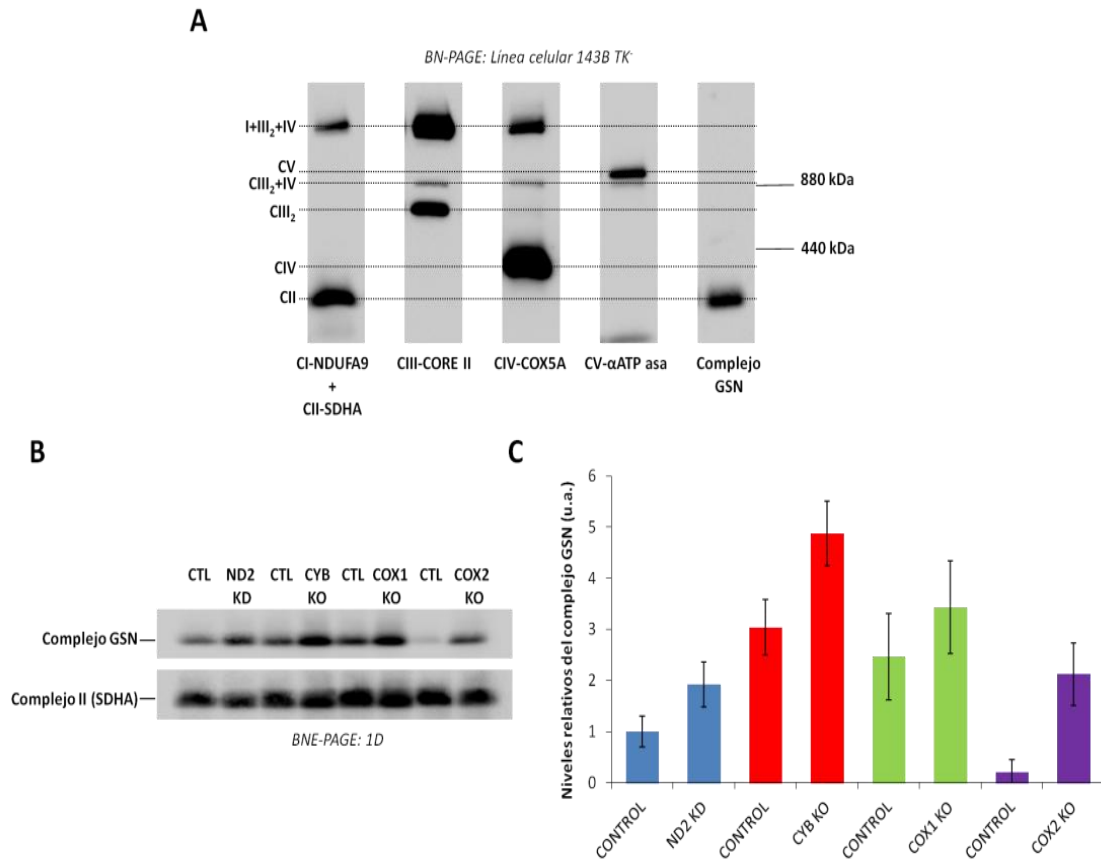
aumento generalizado de los niveles del complejo de la GSN en los cíbridos mutantes, respecto a sus respectivos controles isogénicos. Estos resultados indican que el aumento de los niveles del complejo de la GSN se produce como respuesta a la disfunción de la cadena respiratoria mitocondrial.



**Figura 33. Localización submitocondrial de la GSN en cíbridos control y CYB-KO.** Se purificaron las mitocondrias de ambas líneas y se trataron (+) o no (-) con concentraciones crecientes de proteinasa K, en presencia (+) o no (-) de detergente Tritón X-100 al 1%. Los extractos proteicos mitocondriales se separaron en geles SDS-PAGE al 10% de acrilamida y se analizaron mediante *Western blot* utilizando los anticuerpos descritos. Las señales de GSN se compararon frente al marcador de membrana externa TOM20 y a los marcadores de membrana interna mitocondrial CORE II y SDHA. **PMSF**, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (inhibidor de la proteinasa K que se añade para parar la digestión).

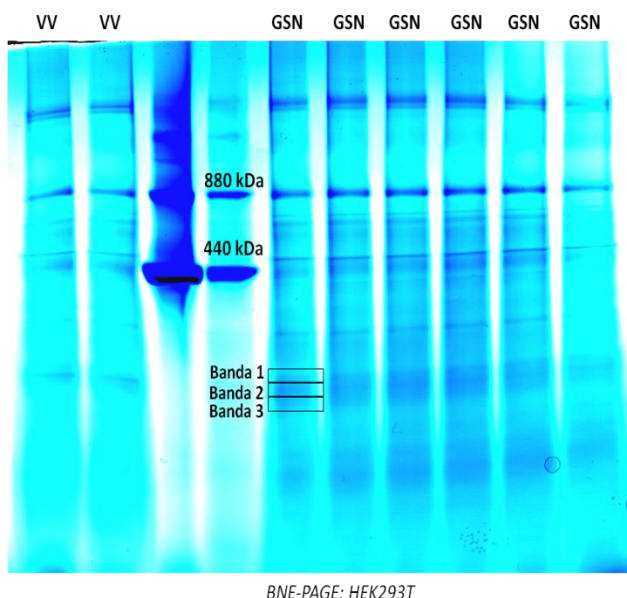
### 3.2.1 Composición del complejo de la Gelsolina mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LTQ OrbitRAP VELOS).

Para conocer la composición del complejo de la GSN, se partió de extractos mitocondriales de la línea celular HEK293T, en la cual se sobreexpresó la GSN unida al epítipo Myc-DDK (ver Figura 44A del apartado 3.7.4). Los extractos mitocondriales se solubilizaron con digitonina y se separaron mediante BN-PAGE. A continuación, los geles se tiñeron con *coomassie brilliant blue G-250* y se identificaron tres bandas de alrededor de 150 kDa cuyos niveles aumentaron respecto a las células transfectadas con el vector vacío (Figura 35). Dichas bandas podrían corresponder al complejo de la GSN, por lo que se cortaron del gel y se digirieron con tripsina. La composición de péptidos se identificó mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (nLC-ESI-MS). Los péptidos identificados mediante esta técnica se contrastaron con la base de datos *SwissProt Human*, usando el motor de búsqueda *MASCOT 3.0*.



**Figura 34. Caracterización del complejo GSN en la mitocondria.** Se analizaron 60  $\mu$ g de proteína mitocondrial en condiciones nativas (1D-BN-PAGE) utilizando geles en gradiente del 3-12% de acrilamida. **(A)** En la línea celular control 143B-TK, se comparó por *Western blot* la localización del complejo GSN en relación con los complejos del sistema OXPHOS mitocondrial. Para ello se utilizaron anticuerpos que reconocen las subunidades NDUFA9 del complejo I (CI), SDHA del complejo II (CII), CORE II del complejo III (CIII), COX5A del complejo IV (CIV), alfa ATPasa del complejo V (CV) y el anticuerpo contra GSN. **I+III<sub>2</sub>+IV**, respirasoma; **CIII<sub>2</sub>+IV**, supercomplejo III<sub>2</sub>+IV; **CV**, complejo V; **CIII<sub>2</sub>**, complejo III dimérico; **CIV**, complejo IV monomérico; **CII**, complejo II. **(B)** Niveles del complejo GSN en híbridos con alteraciones enzimáticas de la cadena respiratoria, respecto a sus controles isogénicos. La subunidad SDHA del complejo II se utilizó como control de carga del experimento. **(C)** Se cuantificaron las señales de dos experimentos independientes y se normalizaron frente al control de carga. Los datos se presentan como la media  $\pm$  DE del análisis de cada línea mutante frente a su control isogénico. (u.a.) Unidades arbitrarias.





**Figura 35. BN-PAGE de células HEK293T que sobreexpresan la GSN unida a Myc-DDK.** Se transfectaron células HEK293T con un vector que sobreexpresa la Gelsolina (GSN) recombinante o con el vector vacío (VV) y se analizaron mediante 1D-BN-PAGE, utilizando geles con un gradiente del 4-16% de acrilamida. Se identificaron tres bandas compatibles con el complejo de la Gelsolina (bandas 1, 2 y 3), las cuales se extrajeron para digerirlas con tripsina y su composición peptídica se analizó mediante nLC-ESI-MS.

Como las tres bandas recortadas mostraron la presencia de GSN colocalizando con el complejo II, se realizó un cribado bioinformático para identificar todas las proteínas comunes a las tres bandas y de localización mitocondrial (según la base de datos Mitocarta). El listado de estas proteínas se muestra en la Tabla 6.

Este análisis mostró la colocalización de la GSN con 13 proteínas de membrana mitocondrial externa, las cuales podrían ser buenos candidatos a formar parte del complejo de la GSN.

**Tabla 6. Listado de proteínas que colocalizan con el complejo de la GSN en geles BN-PAGE.**

Proteína	Gen	PDB	Masa Molecular (Da)	Número de aminoácidos	C.S. (%)
<b>Proteínas de membrana externa mitocondrial</b>					
Acilglicerol quinasa	<i>AGK</i>	Q53H12	47137	422	14 - 18
Isomerasa cis-trans peptidil-proil	<i>FKBP8</i>	Q14318	44562	412	6
Hexoquinasa 1	<i>HK-1</i>	P19367	102486	917	19 - 27

## RESULTADOS

Hexoquinasa 2	<i>HK2</i>	P52789	102380	917	12 - 19
Metaxina 2	<i>MTX2</i>	O75431	29763	263	17 - 21
Proteína 3 de atrofia óptica	<i>OPA3</i>	Q9H6K4	19996	179	4 - 12
Fosfatasa serina/treonina PGAM5	<i>PGAM5</i>	Q96HS1	32004	289	12 - 23
Componente homólogo 50 de la maquinaria de ensamblaje	<i>SAMM50</i>	Q9Y512	51976	469	21 - 31
Receptor de importe mitocondrial TOM22	<i>TOMM22</i>	Q9NS69	15522	142	8
Receptor de importe mitocondrial TOM70	<i>TOMM70</i>	O94826	67455	608	4
Proteína selectiva de aniones 1 voltaje dependiente	<i>VDAC1</i>	P21796	30773	283	22 - 35
Proteína selectiva de aniones 2 voltaje dependiente	<i>VDAC2</i>	P45880	31567	294	19 - 22
Proteína selectiva de aniones 3 voltaje dependiente	<i>VDAC3</i>	Q9Y277	30659	283	16 - 21
<b>Proteínas localizadas del espacio intermembrana</b>					
Factor 1 de inducción de apoptosis	<i>AIFM1</i>	O95831	66901	613	4 - 9
<b>Proteínas de membrana interna mitocondrial</b>					
Subunidad A5 del complejo NADH deshidrogenasa	<i>NDUFA5</i>	Q16718	13459	116	17 - 31
Subunidad B10 del complejo NADH deshidrogenasa	<i>NDUFB10</i>	O96000	20777	172	12 - 19

Subunidad S1 del complejo NADH deshidrogenasa	<i>NDUFS1</i>	P28331	79468	727	18 - 24
Subunidad S2 del complejo NADH deshidrogenasa	<i>NDUFS2</i>	O75306	52546	463	7 - 17
Subunidad S3 del complejo NADH deshidrogenasa	<i>NDUFS3</i>	O75489	30242	264	21 - 43
Subunidad S7 del complejo NADH deshidrogenasa	<i>NDUFS7</i>	O75251	23564	213	4 - 16
Subunidad V1 del complejo NADH deshidrogenasa	<i>NDUFV1</i>	P49821	50817	464	15 - 18
Subunidad V2 del complejo NADH deshidrogenasa	<i>NDUFV2</i>	P19404	27392	249	14 - 18
Subunidad V3 del complejo NADH deshidrogenasa	<i>NDUFV3</i>	P56181	11941	108	5
Factor de ensamblaje 3 del complejo NADH deshidrogenasa	<i>NDUFAF3</i>	Q9BU61	13842	127	9 - 25
Subunidad A del complejo succinato deshidrogenasa	<i>SDHA</i>	P31040	72692	664	33 - 37
Subunidad B del complejo succinato deshidrogenasa	<i>SDHB</i>	P21912	31630	280	41 - 46
Subunidad C del complejo succinato deshidrogenasa	<i>SDHC</i>	Q99643	18610	169	18
Subunidad D del complejo succinato deshidrogenasa	<i>SDHD</i>	O14521	17043	159	14
Citocromo <i>b</i>	<i>MT-CYB</i>	P00156	42718	380	2 - 5
Subunidad 1 del complejo citocromo b-c1	<i>UQCRC1</i>	P31930	52646	480	2 - 5
Subunidad 9 del complejo citocromo b-c1	<i>UQCR10</i>	Q9UDW1	7308	63	11 - 38

## RESULTADOS

Factor de ensamblaje 1 del complejo citocromo b-c1	<i>UQCC1</i>	Q9NVA1	34600	299	11 - 13
Factor de ensamblaje 2 del complejo citocromo b-c1	<i>UQCC2</i>	Q9BRT2	14875	126	15 - 24
Subunidad 4 citocromo c oxidasa	<i>COX4I1</i>	P13073	19577	169	38
Factor de ensamblaje 3 del complejo citocromo c oxidasa	<i>COA3</i>	Q9Y2R0	11731	196	27 - 38
Subunidad alfa del complejo ATP sintasa	<i>ATP5A1</i>	P25705	59751	553	31 - 32
Subunidad beta del complejo ATP sintasa	<i>ATP5B</i>	P06576	56560	529	28 - 31
Subunidad gamma del complejo ATP sintasa	<i>ATP5C1</i>	P36542	32996	298	11 - 15
Subunidad delta del complejo ATP sintasa	<i>ATP5D</i>	P30049	17490	168	8 - 14
Subunidad O del complejo ATP sintasa	<i>ATP5O</i>	P48047	23277	213	5 - 17
Proteína transportadora de tricarboxilato	<i>SLC25A1</i>	P53007	34013	311	7
Proteína transportadora de fosfato	<i>SLC25A3</i>	Q00325	40095	362	6 - 10
Translocasa 1 ADP/ATP	<i>SLC25A4</i>	P12235	33064	298	17 - 22
Translocasa 2 ADP/ATP	<i>SLC25A5</i>	P05141	32852	298	26
Proteína transportadora de 2-oxoglutarato/malato mitocondrial	<i>SLC25A11</i>	Q02978	34062	314	12 - 18
Proteína transportadora de Calcio mitocondrial Aralar1	<i>SLC25A12</i>	O75746	74762	678	16 - 26

Proteína transportadora de Calcio mitocondrial Aralar2	<i>SLC25A13</i>	Q9UJS0	74176	675	29 - 34
Subunidad MIC60 del complejo MICOS	<i>IMMT</i>	Q16891	83678	758	2 - 10
Translocasa Tim23 del complejo de importe de membrana interna mitocondrial	<i>TIMM23</i>	O14925	21943	209	8
Translocasa TIM50 del complejo de importe de membrana interna mitocondrial	<i>TIMM50</i>	Q3ZCQ8	39646	353	8
Tiolasa 3-cetoacil-CoA	<i>ACAA2</i>	P42765	41924	397	17 - 28
Proteína 2 tipo AFG3	<i>AFG3L2</i>	Q9Y4W6	88584	797	10 - 16
Carboxilato sintasa delta-1-pirrolina-5	<i>ALDH18A1</i>	P54886	87302	795	7 - 11
Aldehído graso deshidrogenasa	<i>ALDH3A2</i>	P51648	54848	485	7 - 9
Proteína 3A contenedora del dominio AAA de la familia ATPasa	<i>ATAD3A</i>	Q9NVI7	71369	634	8 - 18
Dihidroorotato deshidrogenasa	<i>DHODH</i>	Q02127	42867	395	11 - 14
Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa	<i>GPD2</i>	P43304	80853	727	3 - 35
Subunidad alfa del enzima trifuncional	<i>HADHA</i>	P40939	83000	763	2 - 8
Hemoliasa tipo Citocromo c	<i>HCCS</i>	P53701	30602	268	9 - 14
Proteína estrés-70	<i>HSPA9</i>	P38646	73680	679	38
LETM1	<i>LETM1</i>	O95202	83354	739	33 - 36

## RESULTADOS

Transportador mitocondrial homólogo 2	<i>MTCH2</i>	Q9Y6C9	33331	303	3 - 10
Proteína homólogo 1 NipSnap	<i>NIPSNAP1</i>	Q9BPW8	33310	284	6 - 9
Proteína de 120 kDa tipo dinamina	<i>OPA1</i>	O60313	111631	960	9 - 23
Proteína de membrana interna mitocondrial OXA1L	<i>OXA1L</i>	Q15070	48548	435	4 - 6
Prohibitina	<i>PHB</i>	P35232	29804	272	7 - 8
Retinol deshidrogenasa 13	<i>RDH13</i>	Q8NBN7	35932	331	8 - 22
Proteína 2 tipo estomatina	<i>STOML2</i>	Q9UJZ1	38534	356	15 - 19
Metaloproteasa de Zinc YME1L1 ATP dependiente	<i>YME1L1</i>	Q96TA2	86455	773	2 - 7
<b>Proteínas localizadas en la matriz mitocondrial</b>					
Subunidad alfa del componente E1 de la piruvato deshidrogenasa	<i>PDHA1</i>	P08559	43296	390	9 - 12
Subunidad beta del componente E1 de la piruvato deshidrogenasa	<i>PDHB</i>	P11177	39233	359	13 - 27
Citrato sintasa	<i>CS</i>	O75390	51712	466	5 - 8
Aconitato hidratasa	<i>ACO2</i>	Q99798	85425	780	3 - 60
Fumarato hidratasa	<i>FH</i>	P07954	54637	510	12 - 16
Malato deshidrogenasa	<i>MDH2</i>	P40926	35503	338	38 - 49

Enzima málica NAD dependiente	<i>ME2</i>	P23368	65444	584	7 - 10
Probable componente DHKTD1 de 2-oxoglutarato deshidrogenasa E1	<i>DHTKD1</i>	Q96HY7	103077	919	1 - 7
Piruvato carboxilasa	<i>PC</i>	P11498	129634	1178	5 - 6
Subunidad alfa de la 2-oxoisovalerato deshidrogenasa	<i>BCKDHA</i>	P12694	50471	445	3 - 20
Subunidad beta de la 2-oxoisovalerato deshidrogenasa	<i>BCKDHB</i>	P21953	43122	392	6 - 23
Glutaminasa (isoforma de riñón)	<i>GLS</i>	O94925	73461	669	10 - 16
Isovaleril-CoA deshidrogenasa	<i>IVD</i>	P26440	46319	423	6 - 26
Metilmalonil-CoA mutasa	<i>MUT</i>	P22033	83134	750	4 - 13
Acil-CoA deshidrogenasa específica de cadena media	<i>ACADM</i>	P11310	46588	421	26 - 37
Acil-CoA deshidrogenasa específica de cadena muy larga	<i>ACADVL</i>	P49748	70390	655	11 - 15
Aldehído deshidrogenasa	<i>ALDH2</i>	P05091	56381	517	5 - 6
Alfa aminoadípico semialdehído deshidrogenasa	<i>ALDH7A1</i>	P49419	58487	539	4 - 14
Aldehído deshidrogenasa X	<i>ALDH1B1</i>	P30837	57206	517	13 - 22
Dihidrolipoil deshidrogenasa	<i>DLD</i>	P09622	54177	509	3 - 6
Superóxido dismutasa	<i>SOD2</i>	P04179	24722	222	21 - 25

## RESULTADOS

ADN polimerasa de la Subunidad 1 gamma	<i>POLG</i>	P54098	139562	1239	2 - 4
Proteína de unión al ADN de cadena única	<i>SSBP1</i>	Q04837	17260	148	27
ARN helicasa DHX30 dependiente de ATP	<i>DHX30</i>	Q7L2E3	133938	1194	2 - 13
Alanina ARNt ligasa	<i>AARS2</i>	Q5JTZ9	107340	985	8 - 17
Aspartato ARNt ligasa	<i>DARS2</i>	Q6PI48	73563	645	3 - 20
Isoleucina ARNt ligasa	<i>IARS2</i>	Q9NSE4	113792	1012	7 - 11
Lisina ARNt ligasa	<i>KARS</i>	Q15046	68048	597	2 - 32
Leucina ARNt ligasa	<i>LARS2</i>	Q15031	101976	903	6 - 16
Valina ARNt ligasa	<i>VAR2</i>	Q5ST30	118490	1063	1 - 6
Factor de elongación Tu	<i>TUFM</i>	P49411	49542	452	5 - 17
Proteína ribosomal L3 39S	<i>MRPL3</i>	P09001	38633	348	3 - 6
Proteína ribosomal L12 39S	<i>MRPL12</i>	P52815	21348	198	5 - 10
Proteína ribosomal L19 39S	<i>MRPL19</i>	P49406	33535	292	13 - 21
Proteína ribosomal L39 39S	<i>MRPL39</i>	Q9NYK5	38712	338	4 - 11
Proteína ribosomal L47 39S	<i>MRPL47</i>	Q9HD33	29450	250	5 - 17
Acetil-CoA acetiltransferasa	<i>ACAT1</i>	P24752	45200	427	34 - 38



Fosfodiesterasa de Zinc ELAC 2	<i>ELAC2</i>	Q9BQ52	92219	826	3 - 8
Factor de elongación G	<i>GFM1</i>	Q96RP9	83471	751	4 - 6
Glicina deshidrogenasa	<i>GLDC</i>	P23378	112730	1020	1 - 3
Aspartato aminotransferasa	<i>GOT2</i>	P00505	47518	430	9 - 15
Serina hidroximetiltransferasa	<i>SHMT2</i>	P34897	55993	504	7 - 39
Cisteína desulfurasa	<i>NFS1</i>	Q9Y697	50196	457	18 - 26
Proteasa Clp dependiente de ATP	<i>CLPX</i>	O76031	69224	633	2 - 4
Proteína no caracterizada C2orf47	<i>C2orf47</i>	Q8WWC4	32545	291	4
Proteína de choque térmico de 10 kDa	<i>HSPE1</i>	P61604	10932	102	9 - 24
Proteína de choque térmico de 60 kDa	<i>HSPD1</i>	P10809	61055	573	33 - 36
Homólogo de la proteasa LON	<i>LONP1</i>	P36776	106489	959	29 - 33
Proteína contenedora del motivo PPR rico en leucina	<i>LRPPRC</i>	P42704	157905	1394	10 - 25
Proteasa de presecuencia	<i>PITRM1</i>	Q5JRX3	117413	1037	16 - 17
Peróxido reductasa tioredoxín dependiente	<i>PRDX3</i>	P30048	27693	256	14 - 18
Proteína de choque térmico de 75 kDa	<i>TRAP1</i>	Q12931	80110	704	14 - 16

## RESULTADOS

Proteínas de localización submitocondrial desconocida					
Acil-CoA tioesterasa 13	<i>ACOT13</i>	Q9NPJ3	14960	140	19
Proteína CCSMST1	<i>CCSMST1</i>	Q4G0I0	15004	132	8
Esterol reductasa delta(24)	<i>DHCR24</i>	Q15392	60101	516	4
Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa	<i>GAPDH</i>	P04406	36053	335	26 - 30
Glutación transferasa 3 microsomal	<i>MGST3</i>	O14880	16516	152	9 - 18
Tetrahidrofolato sintasa C1	<i>MTHFD1</i>	P11586	101559	935	4 - 8
Tetrahidrofolato sintasa C1 monofuncional	<i>MTHFD1L</i>	Q6UB35	105790	978	5 - 8
Proteína 2 contenedora del dominio 5'-nucleotidasa	<i>NT5DC2</i>	Q9H857	60719	520	8 - 11
Proteína ribosomal S15a 40S	<i>RPS15A</i>	P62244	14840	130	24 - 36
Proteína ribosomal S18 40S	<i>RPS18</i>	P62269	17719	152	19 - 32
Proteína ribosomal L34 60S	<i>RPL34</i>	P49207	13293	117	21 - 24
Proteína ribosomal L35a 60S	<i>RPL35A</i>	P18077	12538	110	8 - 15
Transportador 1 de monocarboxilato	<i>SLC16A1</i>	P53985	53944	500	9 - 12
Proteína contenedora del dominio nucleasa de <i>Staphylococcus</i>	<i>SND1</i>	Q7KZF4	101997	910	7 - 34

**PDB (Protein Data Base):** número de acceso en la base de datos *UniprotKB/Swiss-Prot*. **C.S. (%):** porcentaje de cobertura de secuencia.

### 3.3 La Gelsolina citosólica interacciona con VDAC en la membrana externa mitocondrial.

Entre las proteínas que colocalizan en la membrana externa mitocondrial con el complejo de la GSN, se detectaron las 3 isoformas (VDAC 1, 2 y 3) que conforman el poro de membrana mitocondrial (Tabla 6). Estudios previos describieron un papel protector de la GSN frente a la apoptosis mediada por su interacción con VDAC, lo cual bloquearía funcionalmente el poro de membrana, previniendo la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la liberación del Citocromo *c* al citosol (Koya *et al.*, 2000; Kusano *et al.*, 2000). Por ello, se evaluó mediante ensayos de co-inmunoprecipitación la posible interacción física entre la GSN y la isoforma de VDAC más abundante, VDAC1.

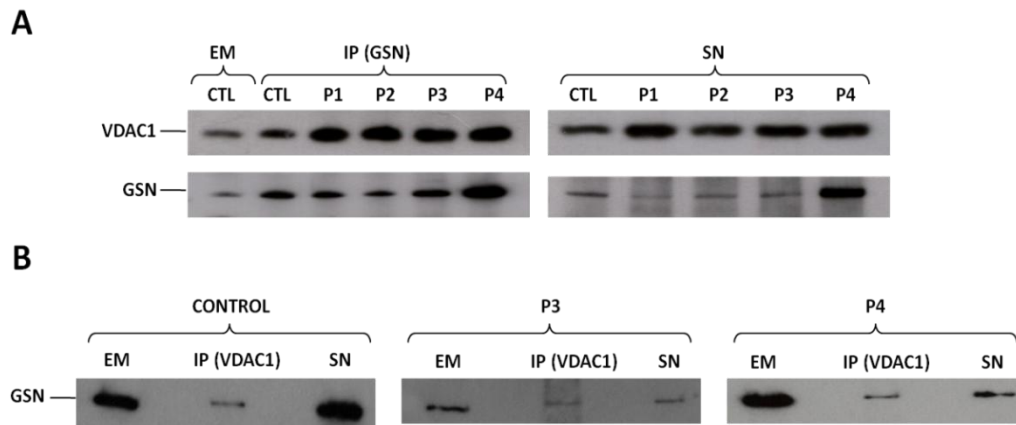
#### 3.3.1 Gelsolina y VDAC1 interaccionan en fibroblastos control y de pacientes con mutaciones en *BCS1L*.

En primer lugar, se inmunoprecipitó la GSN en extractos de mitocondrias purificadas de los fibroblastos con mutaciones en *BCS1L* (P1, P2, P3 y P4) y de fibroblastos control. La fracción del inmunoprecipitado (IP), la fracción no inmunoprecipitada o sobrenadante (SN) y la fracción control correspondiente al extracto mitocondrial sin inmunoprecipitar (EM), se separaron mediante SDS-PAGE. Posteriormente, se analizaron por *Western blot* utilizando los anticuerpos que reconocen a las proteínas GSN y VDAC1. Se observó una clara señal de VDAC1 en los inmunoprecipitados tanto de los fibroblastos control como de los mutados, lo cual indicaría que ambas proteínas interaccionan (Figura 36A). Esta interacción entre GSN y VDAC1 se corroboró mediante co-inmunoprecipitación reversa con el anticuerpo de VDAC1 en los mismos extractos mitocondriales (Figura 36B).

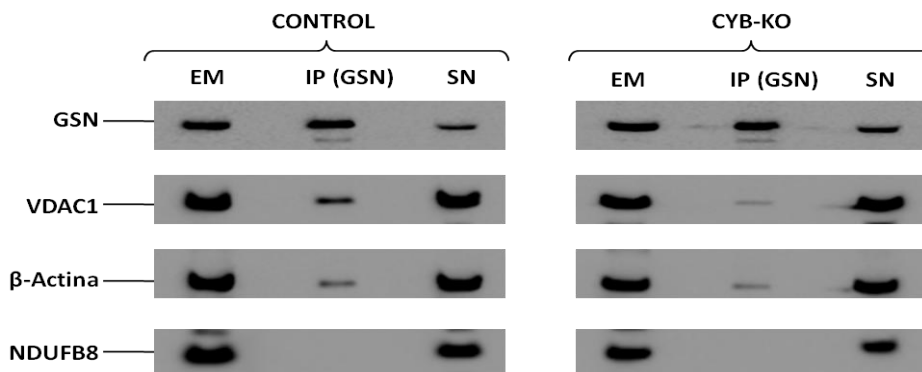
#### 3.3.2 Gelsolina y VDAC1 interaccionan en híbridos control y CYB-KO.

En segundo lugar, se realizó un ensayo de inmunoprecipitación de la GSN en extractos mitocondriales derivados de los híbridos control y mutantes en *MT-CYB* (CYB-KO). De nuevo, se observó que la GSN interaccionaba con VDAC1 en ambas líneas celulares (Figura 37). Como control positivo de la interacción se utilizó un anticuerpo que reconoce la  $\beta$ -actina, ya que la GSN es una proteína de unión a los filamentos de actina. Como control negativo de la co-inmunoprecipitación se usó el anticuerpo que reconoce a la subunidad NDUF8 del complejo I mitocondrial.

## RESULTADOS



**Figura 36. Interacción entre GSN y VDAC1 en mitocondrias purificadas de fibroblastos control y mutados en *BCS1L*.** (A) Las mitocondrias de fibroblastos control (CTL) y de pacientes con mutaciones en *BCS1L* (P1, P2, P3, y P4) se purificaron mediante centrifugación diferencial y los extractos proteicos se sometieron a inmunoprecipitación con 10 µg del anticuerpo que reconoce a la GSN. Posteriormente, se realizó un análisis de *Western blot* con dos anticuerpos que reconocen a VDAC1 y GSN. (B) Los extractos mitocondriales de fibroblastos control y de dos pacientes con mutaciones en *BCS1L* (P3 y P4) se inmunoprecipitaron con 10 µg del anticuerpo que reconoce a VDAC1. A continuación, se analizaron mediante *Western blot* usando el anticuerpo que reconoce a GSN. **EM**, extracto mitocondrial previo a la inmunoprecipitación; **IP**, inmunoprecipitado; **SN**, sobrenadante o fracción no inmunoprecipitada.



**Figura 37. Interacción entre GSN y VDAC1 en mitocondrias de cíbridos control y mutantes en el complejo III (CYB-KO).** Los extractos mitocondriales se sometieron a inmunoprecipitación con un anticuerpo que reconoce a la GSN. Posteriormente, se realizó un análisis mediante *Western blot* usando los anticuerpos que reconocen a VDAC1, β-actina (control positivo), NDUFB8 (control negativo) y GSN. **EM**, extracto mitocondrial previo a la inmunoprecipitación; **IP**, inmunoprecipitado; **SN**, fracción no inmunoprecipitada o sobrenadante.

### 3.4 La inhibición de la expresión de la Gelsolina no influye sobre la estabilidad de VDAC1.

Para evaluar si la GSN ejerce un papel regulador de la función de VDAC, se llevó a cabo el silenciamiento de la expresión del ARNm de *GSN* mediante la transfección de dos ARN de silenciamiento específicos (siRNAs), tanto en los híbridos mutantes ND2-KD, CYB-KO y COX1-KO como en sus respectivos controles. Los extractos proteicos procedentes de lisados celulares se separaron mediante SDS-PAGE y los niveles de GSN y VDAC1 se analizaron por *Western blot*. En todos los experimentos se consiguió una eficiencia de silenciamiento de *GSN* de entre el 55-90% respecto al control negativo.

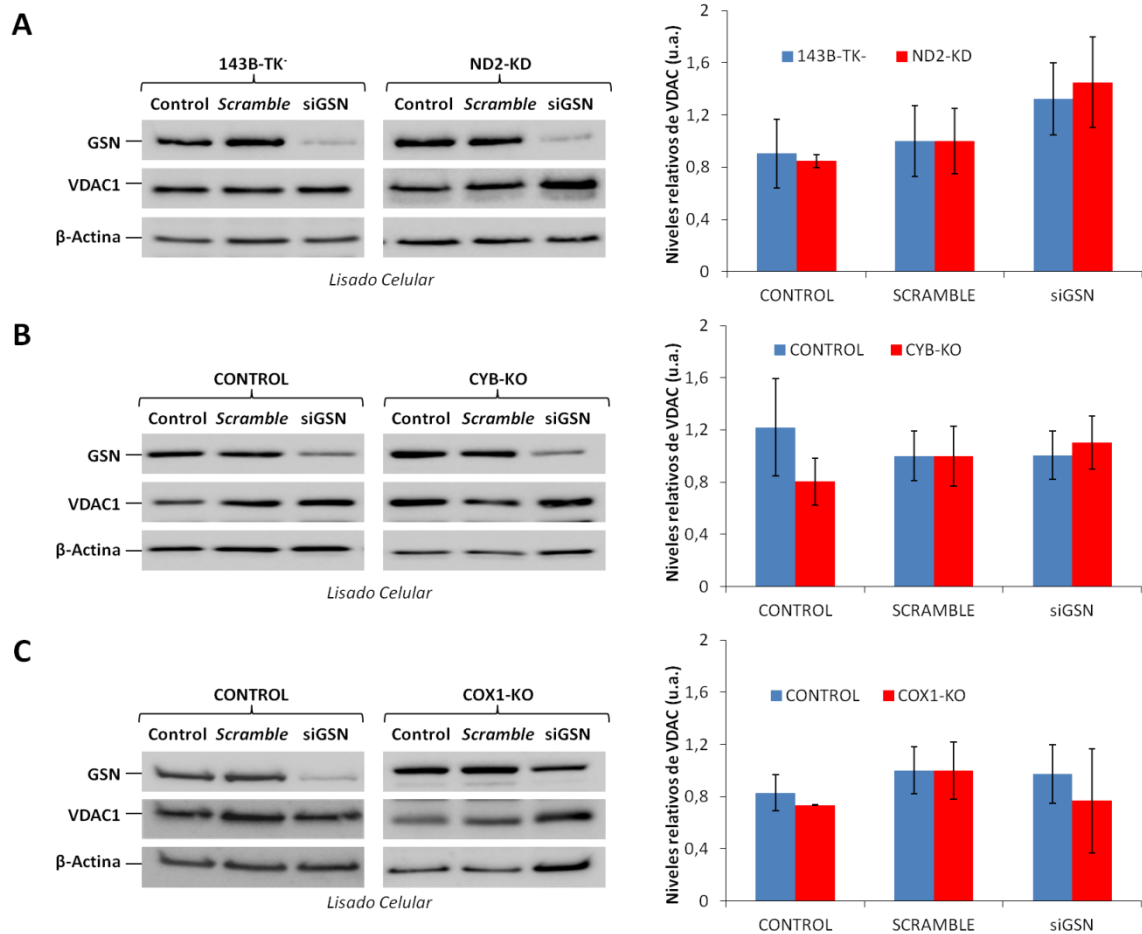
Independientemente de la eficacia del silenciamiento, ninguna línea celular mostró variaciones significativas en los niveles de VDAC1 (Figuras 38A-38C).

### 3.5 El silenciamiento de *GSN* induce la acumulación de dímeros de VDAC1.

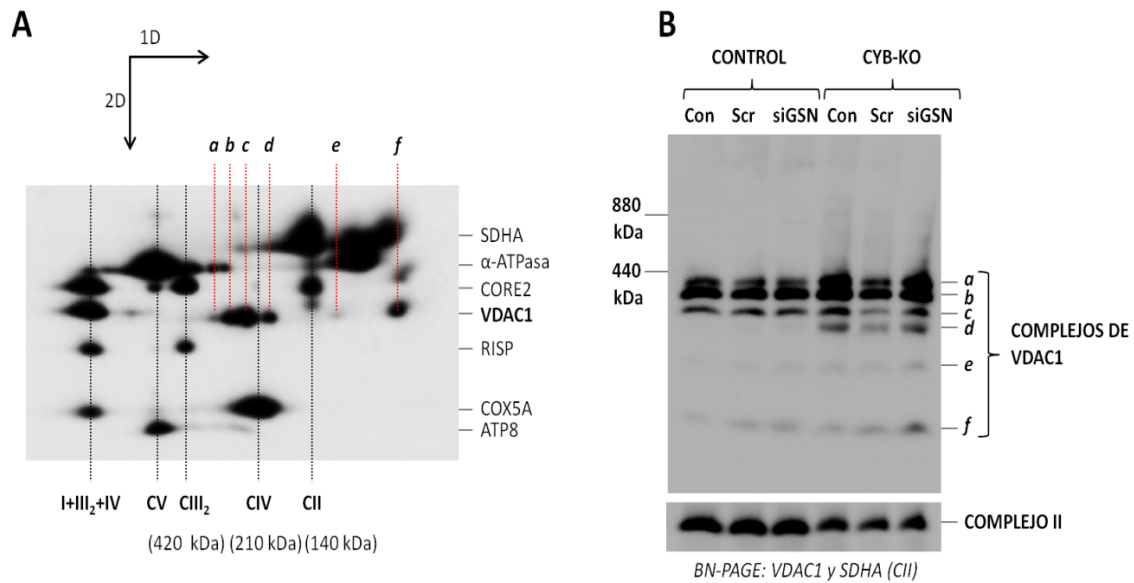
A continuación, se analizó la distribución en complejos de VDAC1 mediante 2D-BN/SDS-PAGE y *Western blot* de fracciones mitocondriales de híbridos control. Los pesos moleculares aproximados de los complejos que contienen a VDAC1, se calcularon gracias a su comparación con los complejos del sistema OXPHOS de tamaño conocido. Se observó que la proteína VDAC1 principalmente formaba parte de 6 complejos, los cuales tenían un peso molecular aproximado de 370, 310, 250, 180, 125 y 60 kDa (bandas *a*, *b*, *c*, *d*, *e* y *f*) (Figura 39A). Dado que el peso molecular promedio de las tres isoformas de VDAC es de 30,8 kDa, los complejos en los que se detecta VDAC1 podrían estar compuestos respectivamente por 12, 10, 8, 6, 4 y 2 copias de estas proteínas.

Para finalizar, se analizó el efecto de la inhibición de *GSN* sobre la formación de los complejos que contienen a VDAC1, en los híbridos mutantes CYB-KO y en su control isogénico (Figura 39B). En los híbridos control, la inhibición de *GSN* no produjo cambios apreciables ni en los niveles ni en la distribución de los complejos de VDAC1, pero se observó una acumulación leve del complejo de menor peso molecular (banda *f*). Los híbridos CYB-KO sin silenciar mostraron un aumento de los niveles de los oligómeros de VDAC1 de alto peso molecular (bandas *a*, *b*, *c* y *d*) en comparación con el control. El silenciamiento de la *GSN* en los híbridos CYB-KO indujo una acumulación específica de la banda *f* de 60 kDa, sin afectar a los complejos oligoméricos de mayor peso molecular (bandas *a-e*). Estos resultados inducían la acumulación de homo- o heterodímeros de VDAC1 como consecuencia de la inhibición de la GSN.

## RESULTADOS



**Figura 38. Niveles de VDAC1 en cíbridos transmitocondriales silenciados en GSN.** Se separaron 15  $\mu\text{g}$  de extractos proteicos de lisados celulares en geles SDS-PAGE al 10% de acrilamida y se analizaron los niveles de GSN y VDAC1 mediante *Western blot* de células no silenciadas (control), tratadas con un ARN interferente universal como control negativo (*Scramble*) y líneas celulares silenciadas con dos siRNAs específicos de GSN (siGSN). Los niveles de VDAC1 se cuantificaron en tres experimentos independientes y se normalizaron frente a las señales del control de carga,  $\beta$ -actina. Los datos se presentan como la media  $\pm$  DE de los valores relativizados frente al control negativo. (u. a.) Unidades arbitrarias. **(A)** Silenciamiento de GSN en células control 143B-TK y mutantes ND2-KD. **(B)** Silenciamiento de GSN en cíbridos mutantes CYB-KO y su correspondiente control isogénico. **(C)** Silenciamiento de GSN en cíbridos mutantes COX1-KO y su correspondiente control isogénico.



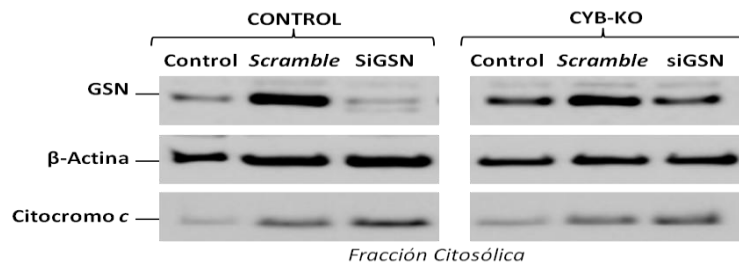
**Figura 39. Niveles de los complejos de VDAC1 en cíbridos control y CYB-KO. (A)** Se utilizaron geles de 1D-BN-PAGE con un gradiente del 3-12% de acrilamida, para separar 60 µg de proteína mitocondrial procedente de cíbridos control. Los complejos separados, se sometieron a electroforesis desnaturalizante en segunda dimensión (2D-BN/SDS-PAGE) y se analizaron por *Western blot* utilizando los anticuerpos que reconocen las subunidades SDHA del complejo II, CORE II y RISP del complejo III, COX5A del complejo IV, αATPasa y ATP8 del complejo V y el anticuerpo contra VDAC1. Las flechas muestran las direcciones de la electroforesis en las dos direcciones. **I+III<sub>2</sub>+IV**, respirasoma; **CV**, complejo V; **CIII<sub>2</sub>**, complejo III dimérico; **CIV**, complejo IV monomérico; **CII**, complejo II; **a-f**, Complejos formados por VDAC1. **(B)** Se separaron en las mismas condiciones nativas 60 µg de proteína mitocondrial procedente de cíbridos control y CYB-KO silenciados en *GSN*. Posteriormente, se realizó un análisis por *Western blot* utilizando los anticuerpos que reconocen a la subunidad SDHA del complejo II (CII) y a la proteína VDAC1. **Con**, control sin silenciar; **Scr**, *scramble*; **siGSN**, células silenciadas con siRNAs de *GSN*; **a-f**, Complejos formados por VDAC1.

### 3.6 La inhibición de la expresión de la Gelsolina favorece la liberación del Citocromo c mitocondrial al citoplasma.

A continuación, se analizó el posible efecto de la inhibición de la *GSN* sobre la liberación del Citocromo c al citosol mediante *Western blot*. Tanto en las células control como en los mutantes CYB-KO, se observó un claro aumento de los niveles del Citocromo c mitocondrial en el citosol al silenciarse la expresión de *GSN* (Figura 40).

## RESULTADOS

El conjunto de nuestros resultados sugieren que la GSN podría ejercer un papel protector frente a la inducción de la apoptosis mediada por la disfunción del sistema OXPHOS, posiblemente a través de la regulación del estado oligomérico de VDAC1.



**Figura 40. Liberación del Citocromo c mitocondrial al citoplasma en cíbridos control y mutantes CYB-KO silenciados en GSN.** Se utilizaron geles SDS-PAGE al 10% de acrilamida, para separar 15 µg de extractos proteicos citosólicos de células no silenciadas (control), tratadas con un ARN interferente universal como control negativo (*Scramble*) y de células transfectadas con dos siRNAs específicos de *GSN* (*siGSN*). A continuación, se analizaron mediante *Western blot* los niveles de la GSN y del Citocromo c. Se usó la β-actina como control de carga.

### 3.7 Relación funcional entre la Gelsolina y el sistema OXPHOS.

Estudios previos en modelos murinos de enfermedad de Alzheimer, sugerían que los cambios en la expresión de la GSN citosólica podían modular la función del sistema OXPHOS a través de la regulación de la actividad del complejo IV (Antequera *et al.*, 2009; Qiao *et al.*, 2005; Vargas *et al.*, 2010). Por ello, se evaluó si la disminución de los niveles de GSN tenía alguna implicación sobre la formación o estabilidad del sistema OXPHOS en nuestros modelos experimentales.

#### 3.7.1 Silenciamiento de la Gelsolina en los cíbridos ND2-KD.

En primer lugar, se llevó a cabo el silenciamiento de la expresión de *GSN* tanto en los cíbridos ND2-KD, con déficit enzimático aislado del complejo I, como en la línea control 143B-TK. La eficiencia del silenciamiento se analizó en extractos proteicos de las dos líneas celulares mediante SDS-PAGE y *Western blot*. En ambas líneas se observó un descenso similar en los niveles de GSN de alrededor del 80-90% (Figura 41A y 41B). Como era de esperar, en los dos tipos celulares también se observó una disminución drástica de los niveles del complejo de la GSN de 150 kDa en geles de BN-PAGE (Figura 41C).

A continuación, se analizaron los niveles de los diferentes complejos y supercomplejos del sistema OXPHOS, a través de BN-PAGE seguida de *Western blot* (Figura 41C). La reducción de los



niveles de la GSN no condujo a variaciones aparentes en los niveles de ninguno de los complejos del sistema OXPHOS analizados dentro de la misma línea.

### **3.7.2 Silenciamiento de la Gelsolina en los cíbridos CYB-KO.**

A continuación, se silenció la expresión de *GSN* en los cíbridos CYB-KO que carecen de complejo III y en su control isogénico. La eficiencia del silenciamiento se analizó por *Western blot*. En la línea mutante, los niveles de GSN citosólica disminuyeron de media un 70%, mientras que en la línea control la disminución fue de un 80% (Figura 42A y 42B). Dicha reducción fue acompañada de una disminución comparable del complejo de la GSN. El análisis de los complejos y supercomplejos del sistema OXPHOS mediante BN-PAGE, de nuevo no reveló alteraciones significativas en los niveles de las diferentes estructuras dentro de una misma línea tras el silenciamiento de la GSN (Figura 42C).

### **3.7.3 Silenciamiento de la Gelsolina en los cíbridos COX1-KO.**

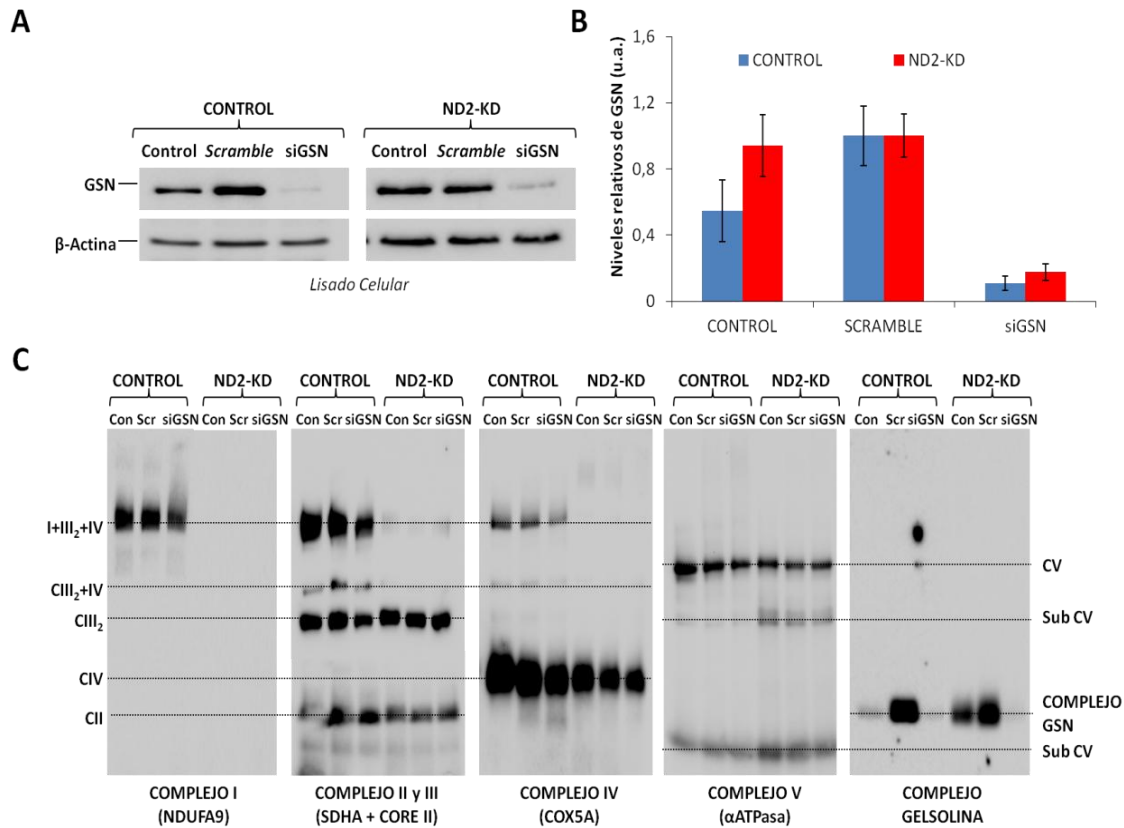
Por último, se silenció la expresión de *GSN* en los cíbridos COX1-KO, que carecen de complejo IV, así como en su control isogénico. En este caso, se alcanzó una eficiencia del silenciamiento de alrededor de un 85% en la línea control y de un 55% en la línea mutante (Figura 43A y 43B). El análisis de las estructuras mediante BN-PAGE, de nuevo reveló una fuerte disminución de los niveles del complejo de la GSN, que no condujo a variaciones apreciables en los niveles de los complejos y supercomplejos del sistema OXPHOS dentro de una misma línea celular (Figura 43C).

### **3.7.4 Efecto de la sobreexpresión de la Gelsolina sobre el sistema OXPHOS de células control 143B-TK y HEK293T.**

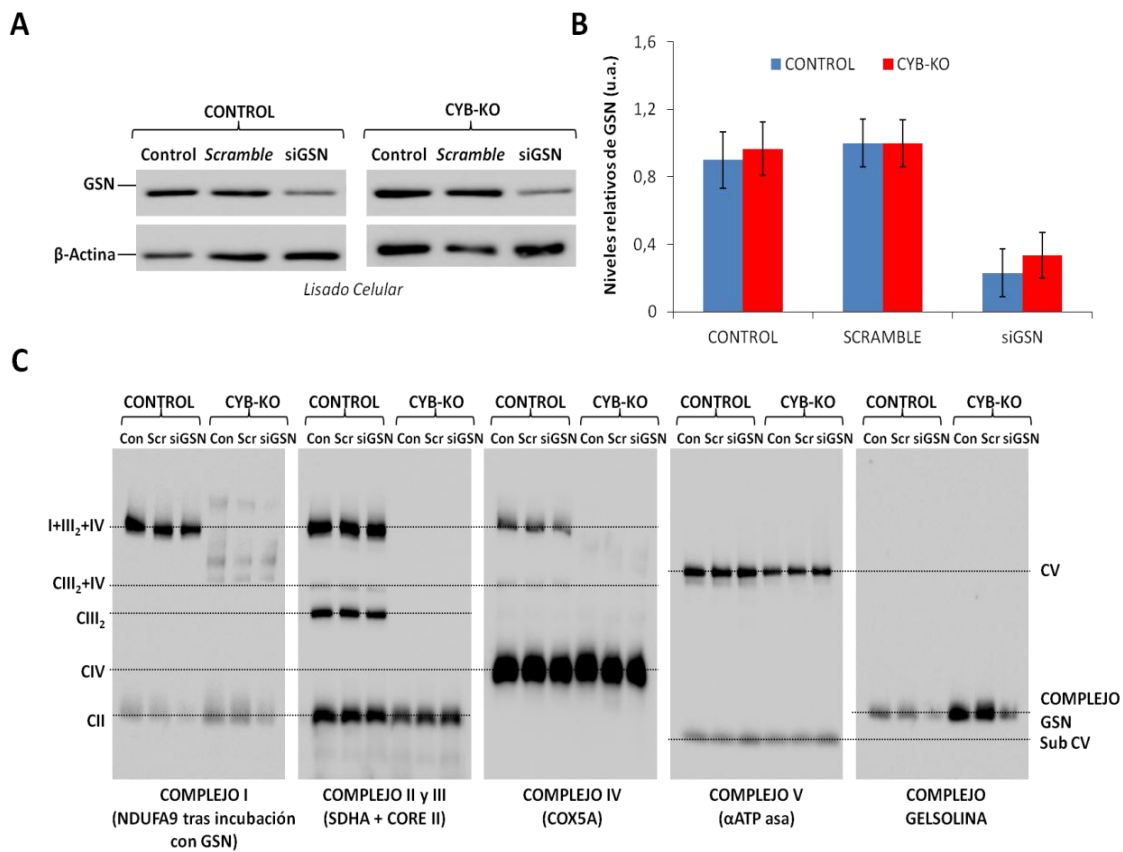
A continuación se analizó el posible efecto de la sobreexpresión de la GSN sobre la formación del sistema OXPHOS. Para ello, se transfectaron las células control 143B-TK y HEK293T con dos vectores que expresaban el ADN complementario (ADNc) de *GSN* asociado a los epítomos GFP y Myc-DDK. La eficiencia de sobreexpresión de las proteínas recombinantes se analizó mediante SDS-PAGE y *Western blot*. En la línea celular HEK293T se observó un aumento en los niveles de expresión de la GSN recombinante de entre 7,5 a 8,5 veces los niveles de la GSN endógena, independientemente del epítomo asociado. Sin embargo, en la línea 143B-TK se

## RESULTADOS

alcanzaron unos niveles de expresión de la GSN recombinante de 1,3 a 1,5 veces respecto a los niveles de la proteína endógena (Figura 44).

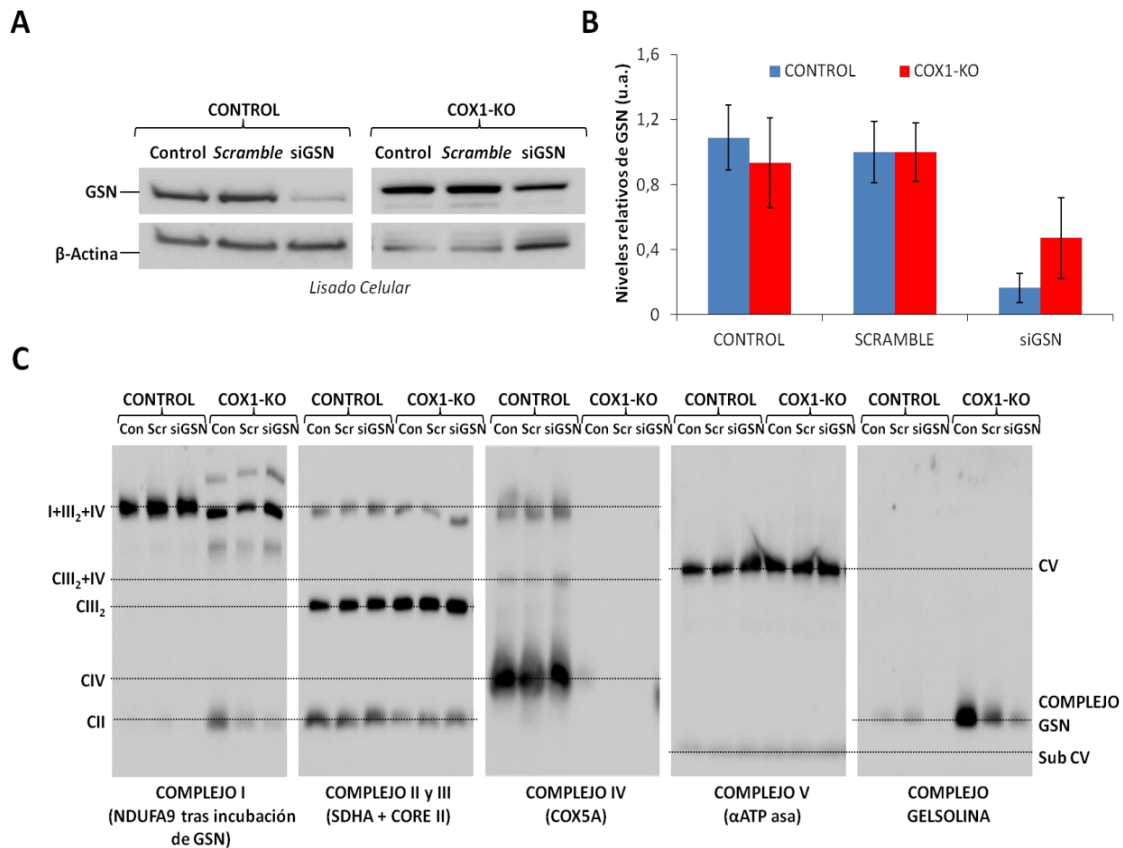


**Figura 41. Niveles de los complejos y supercomplejos del sistema OXPHOS en cíbridos ND2-KD y células 143B-TK<sup>-</sup> silenciadas en GSN.** (A) Se utilizaron geles SDS-PAGE al 10% de acrilamida para separar 15  $\mu$ g de extractos proteicos de lisados celulares. Los niveles de GSN se analizaron mediante *Western blot* en células no silenciadas (control), tratadas con un ARN interferente universal como control negativo (*Scramble*) y en las células transfectadas con dos siRNAs específicos de *GSN* (siGSN). (B) Se cuantificaron los niveles de GSN en tres experimentos independientes y se normalizaron frente a las señales del control de carga  $\beta$ -actina. Los datos se presentan como la media  $\pm$  DE de los valores relativizados frente al control negativo (*Scramble*). (u. a.) Unidades arbitrarias. (C) Se separaron 60  $\mu$ g de proteína mitocondrial en condiciones nativas en geles con un gradiente del 3-12% de acrilamida. Posteriormente, se realizó un análisis por *Western blot* utilizando anticuerpos que reconocen las subunidades NDUFA9 del complejo I, SDHA del complejo II, CORE II del complejo III, COX5A del complejo IV,  $\alpha$ ATPasa del complejo V y el anticuerpo contra la GSN. I+III<sub>2</sub>+IV, respirasoma; CIII<sub>2</sub>+IV, supercomplejo III<sub>2</sub>+IV; CV, complejo V; Sub CV, subcomplejos del complejo V; CIII<sub>2</sub>, complejo III dimérico; CIV, complejo IV monomérico; CII, complejo II; Con, control sin silenciar; Scr, *scramble*; siGSN, células silenciadas con siRNAs de *GSN*.

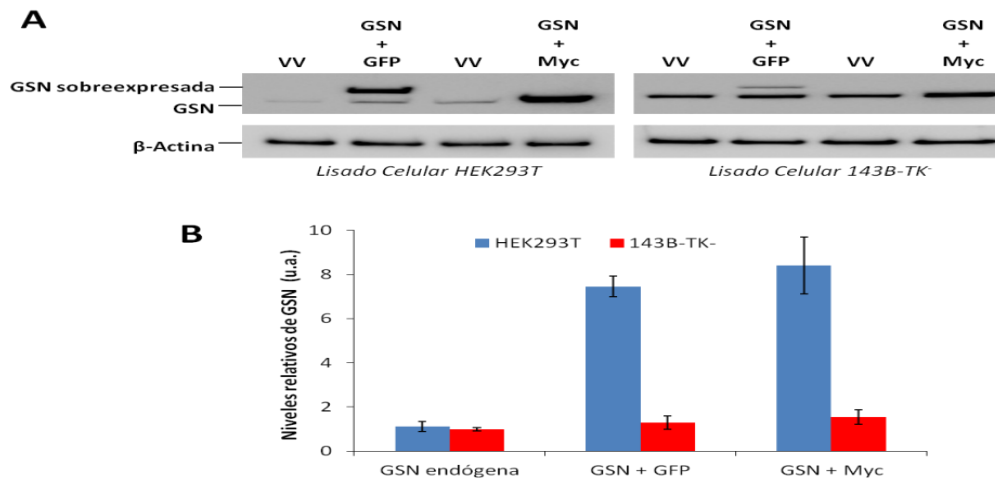


**Figura 42. Niveles de los complejos y supercomplejos del sistema OXPHOS en cíbridos control y CYB-KO silenciados en GSN.** (A) Se utilizaron geles SDS-PAGE al 10% de acrilamida para separar 15  $\mu$ g de extractos proteicos de lisados celulares. Los niveles de GSN se analizaron mediante *Western blot* en células no silenciadas (control), tratadas con un ARN interferente universal como control negativo (*Scramble*) y en las células transfectadas con dos siRNAs específicos de *GSN* (siGSN). (B) Se cuantificaron los niveles de GSN en tres experimentos independientes y se normalizaron frente a las señales del control de carga  $\beta$ -actina. Los datos se presentan como la media  $\pm$  DE de los valores relativizados frente al control negativo (*Scramble*). (u. a.) Unidades arbitrarias. (C) Se separaron 60  $\mu$ g de proteína mitocondrial en condiciones nativas en geles con un gradiente del 3-12% de acrilamida. Posteriormente, se realizó un análisis por *Western blot* utilizando anticuerpos que reconocen las subunidades NDUFA9 del complejo I, SDHA del complejo II, CORE II del complejo III, COX5A del complejo IV,  $\alpha$ ATPasa del complejo V y el anticuerpo contra la GSN. I+III<sub>2</sub>+IV, respirasoma; CIII<sub>2</sub>+IV, supercomplejo III<sub>2</sub>+IV; CV, complejo V; Sub CV, subcomplejos del complejo V; CIII<sub>2</sub>, complejo III dimérico; CIV, complejo IV monomérico; CII, complejo II; Con, control sin silenciar; Scr, scramble; siGSN, células silenciadas con siRNAs de GSN.

## RESULTADOS



**Figura 43. Niveles de los complejos y supercomplejos del sistema OXPHOS en cíbridos control y COX1-KO silenciados en GSN.** (A) Se usaron geles SDS-PAGE al 10% de acrilamida para 15  $\mu$ g de extractos proteicos de lisados celulares. Los niveles de GSN se analizaron mediante *Western blot* en células no silenciadas (control), tratadas con un ARN interferente universal como control negativo (*Scramble*) y en las células transfectadas con dos siRNAs específicos de *GSN* (siGSN). (B) Se cuantificaron los niveles de GSN en tres experimentos independientes y se normalizaron frente a las señales del control de carga  $\beta$ -actina. Los datos se presentan como la media  $\pm$  DE de los valores relativizados frente al control negativo (*Scramble*). (u. a.) Unidades arbitrarias. (C) Se separaron 60  $\mu$ g de proteína mitocondrial en condiciones nativas en geles con un gradiente del 3-12% de acrilamida. Posteriormente, se realizó un análisis por *Western blot* utilizando anticuerpos que reconocen las subunidades NDUFA9 del complejo I, SDHA del complejo II, CORE II del complejo III, COX5A del complejo IV,  $\alpha$ ATPasa del complejo V y el anticuerpo contra la GSN. I+III<sub>2</sub>+IV, respirasoma; CIII<sub>2</sub>+IV, supercomplejo III<sub>2</sub>+IV; CV, complejo V; Sub CV, subcomplejos del complejo V; CIII<sub>2</sub>, complejo III dimérico; CIV, complejo IV monomérico; CII, complejo II; Con, control sin silenciar; Scr, *scramble*; siGSN, células silenciadas con siRNAs de *GSN*.

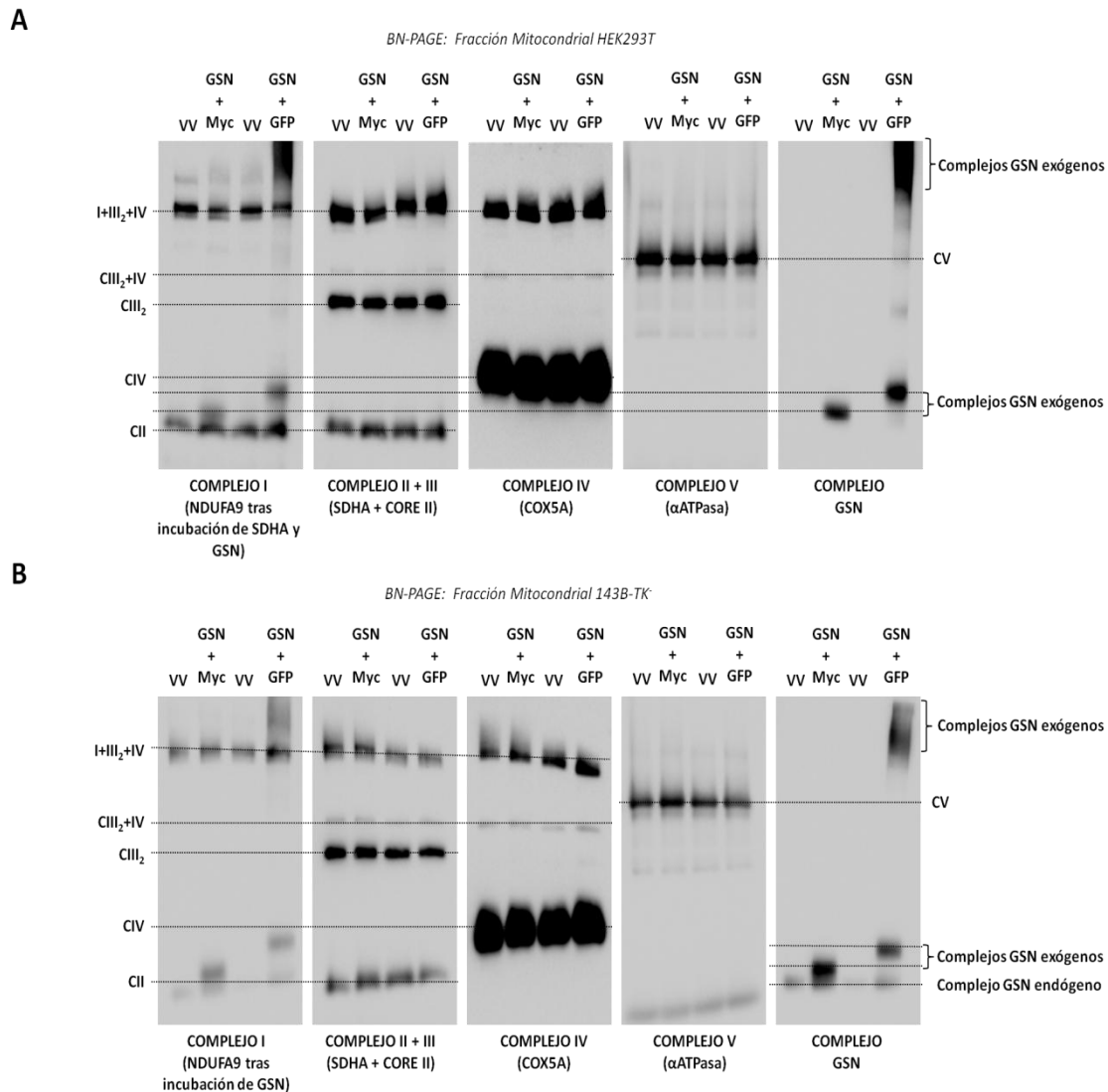


**Figura 44. Sobreexpresión de la GSN recombinante en células control 143B-TK<sup>-</sup> y HEK293T.** Ambas líneas se transfecaron con dos plásmidos: uno que expresaba la GSN recombinante asociada a uno de los epítomos GFP o Myc (GSN+GFP ó GSN+Myc), el otro correspondiente al vector vacío (VV). **(A)** Se separaron 15  $\mu$ g de extractos proteicos de lisados celulares en geles SDS-PAGE al 10% de acrilamida y los niveles de GSN se analizaron por *Western blot*. **(B)** Se cuantificaron los niveles de GSN endógena y recombinante en tres experimentos independientes y se normalizaron las señales frente al control de carga,  $\beta$ -actina. Los datos se presentan como la media  $\pm$  DE de los niveles de la GSN sobreexpresada respecto a los niveles de la proteína endógena. (u. a.) Unidades arbitrarias.

Posteriormente, se analizaron los complejos de la GSN y del sistema OXPHOS mediante BN-PAGE y *Western blot*. La sobreexpresión de la GSN asociada al epítomo Myc-DDK indujo un aumento en los niveles del complejo de la GSN, el cual mostró un peso molecular levemente superior al complejo de la GSN endógena en ambas líneas celulares. La sobreexpresión de la GSN asociada a GFP, indujo la formación de un complejo de la GSN de un tamaño de 50-100 kDa mayor que el endógeno. Además, produjo la acumulación de macroestructuras en la parte superior de los geles de carácter desconocido. Independientemente del grado de sobreexpresión, el aumento en los niveles del complejo de la GSN no produjo variaciones ni en los niveles ni en la distribución de las diferentes estructuras del sistema OXPHOS en las líneas celulares analizadas (Figura 45A y 45B).

Por tanto, los resultados obtenidos sugieren que en nuestros modelos celulares, la GSN no desempeña ningún papel esencial para la formación o estabilidad de los complejos del sistema OXPHOS.

## RESULTADOS



**Figura 45. Niveles de los complejos y supercomplejos del sistema OXPPOS en células control HEK293T (A) y 143B-TK (B) que sobreexpresan la GSN.** Ambas líneas se transfectaron con dos plásmidos: uno que expresa la GSN recombinante asociada a uno de los dos epítopos GFP o Myc (GSN+GFP ó GSN+Myc), el otro correspondiente vector vacío (VV). Se analizaron 60 µg de proteína mitocondrial mediante BN-PAGE y *Western blot* utilizando anticuerpos que reconocen las subunidades NDUFA9 del complejo I, SDHA del complejo II, CORE II del complejo III, COX5A del complejo IV, αATPasa del complejo V y el anticuerpo contra GSN. **I+III<sub>2</sub>+IV**, respirasoma; **CIII<sub>2</sub>+IV**, supercomplejo III<sub>2</sub>+IV; **CV**, complejo V; **CIII<sub>2</sub>**, complejo III dimérico; **CIV**, complejo IV monomérico; **CII**, complejo II.

### 3.8 Implicación de la Gelsolina en la mitocondria en el proceso de apoptosis inducida por estaurosporina.

Existen numerosas evidencias sobre el papel regulador de la GSN en los procesos de apoptosis en diferentes modelos celulares, tejidos y patologías. La Caspasa 3 activada corta a la

GSN entre los aminoácidos Asp<sup>352</sup> y Gly<sup>353</sup>, generando dos fragmentos: el N-terminal de 39 kDa y el C-terminal de 41 kDa (Kothakota *et al.*, 1997). El fragmento N-terminal es proapoptótico, ya que corta los filamentos de actina de una manera independiente de calcio y propicia los cambios morfológicos celulares necesarios para el desarrollo del proceso de la apoptosis (Kothakota *et al.*, 1997; Geng *et al.*, 1998). Sin embargo, tanto el fragmento C-terminal de la GSN como la proteína completa, tienen un carácter inhibitorio de la apoptosis (Ohtsu *et al.*, 1997), probablemente debido a que ambas interactúan con VDAC, bloqueando la liberación del Citocromo *c* a través del poro de membrana externa (Kusano *et al.*, 2000; Koya *et al.*, 2000). Dado que en nuestros modelos celulares de disfunción de la cadena respiratoria mitocondrial se observó tanto la interacción de GSN con VDAC1, como la liberación del Citocromo *c* en ausencia de GSN, a continuación se analizó el posible papel de la GSN en la regulación de la apoptosis inducida por estaurosporina.

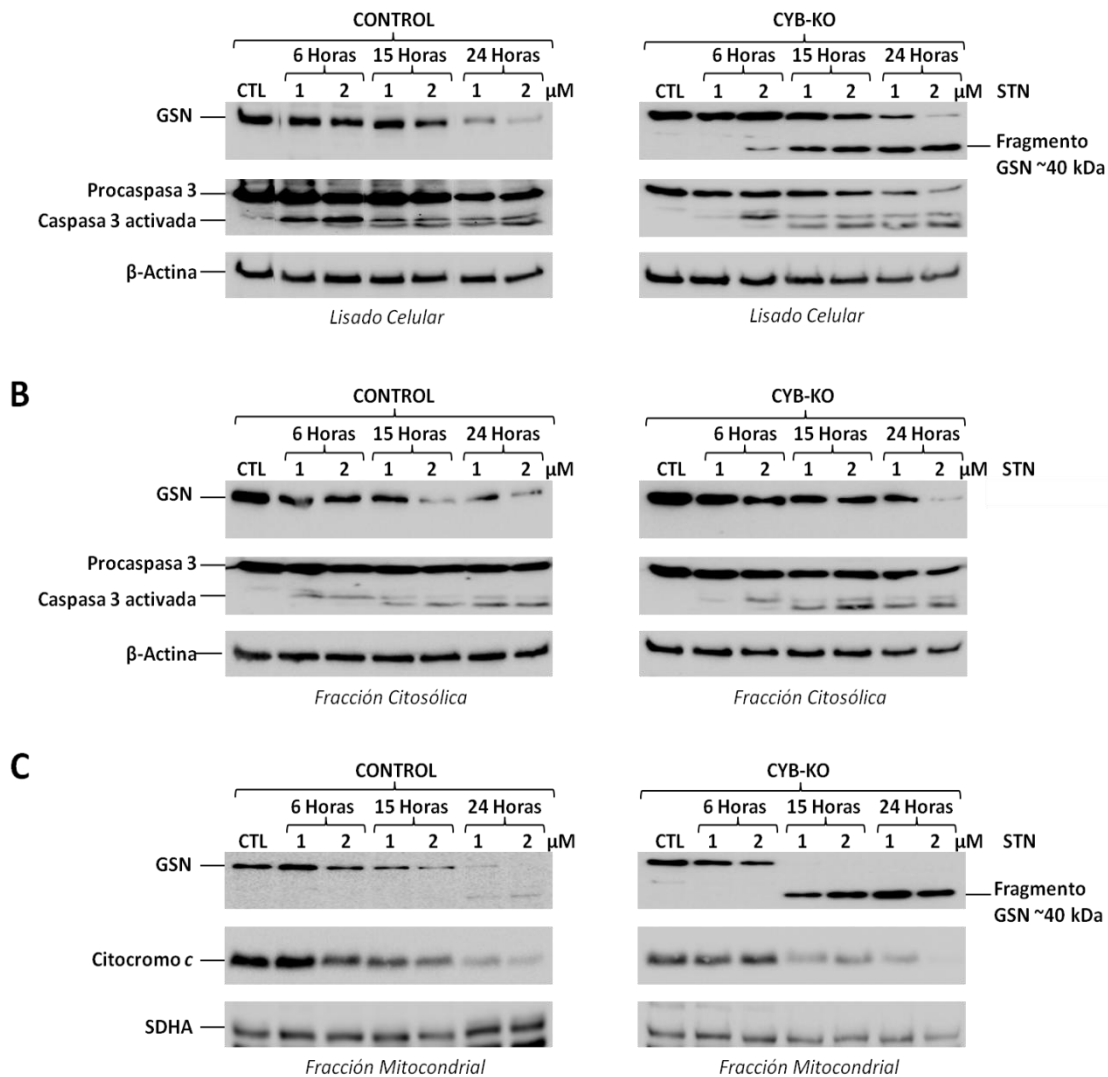
### **3.8.1 La Gelsolina se proteoliza específicamente en la mitocondria de los híbridos mutantes CYB-KO tratados con estaurosporina.**

Los híbridos control y mutantes CYB-KO se cultivaron en un medio que contenía concentraciones de 1 y 2  $\mu$ M del inductor de apoptosis estaurosporina durante periodos de 6, 15 y 24 horas. Los extractos proteicos derivados de los lisados celulares, así como de las fracciones citosólicas y mitocondriales de ambas líneas se analizaron por SDS-PAGE y *Western blot*. En las fracciones citosólicas de las dos líneas celulares, a las 6-15 horas del tratamiento se observó la activación de la Caspasa 3 mediante la proteólisis de la procaspasa 3 (Figura 46A y 46B). Hacia las 6-15 horas del tratamiento, se observó una bajada de los niveles de Citocromo *c* en la fracción mitocondrial (Figura 46B y 46C), en paralelo a la activación de la Caspasa 3. Estos datos indican que la liberación del Citocromo *c* mitocondrial al citoplasma y la inducción de la apoptosis ocurren de forma paralela en ambas líneas celulares. Sin embargo, el tratamiento con estaurosporina indujo notables diferencias en la respuesta de la GSN entre células control y mutantes. En células control, se observó una bajada gradual de los niveles de la GSN completa de 80 kDa en todas las fracciones a partir de las 15-24 horas del tratamiento con estaurosporina (Figura 46B y 46C), lo que sugiere la degradación progresiva de la GSN como consecuencia de la activación de la apoptosis (Figura 46A). En los híbridos mutantes CYB-KO se observó una bajada en los niveles de la GSN en la fracción citosólica hacia las 24 horas del tratamiento, similar a la de las células control (Figura 46A y 46B). Sin embargo, la GSN presente en las mitocondrias de los híbridos mutantes se proteolizó completamente a las 15 horas del tratamiento, generando la acumulación de un fragmento de GSN de unos 40 kDa que se mantuvo estable durante todo el tratamiento (Figura



## RESULTADOS

46C). Dicho fragmento correspondería al extremo C-terminal de la GSN, ya que los anticuerpos utilizados se generaron específicamente contra un epítipo de dicho fragmento.



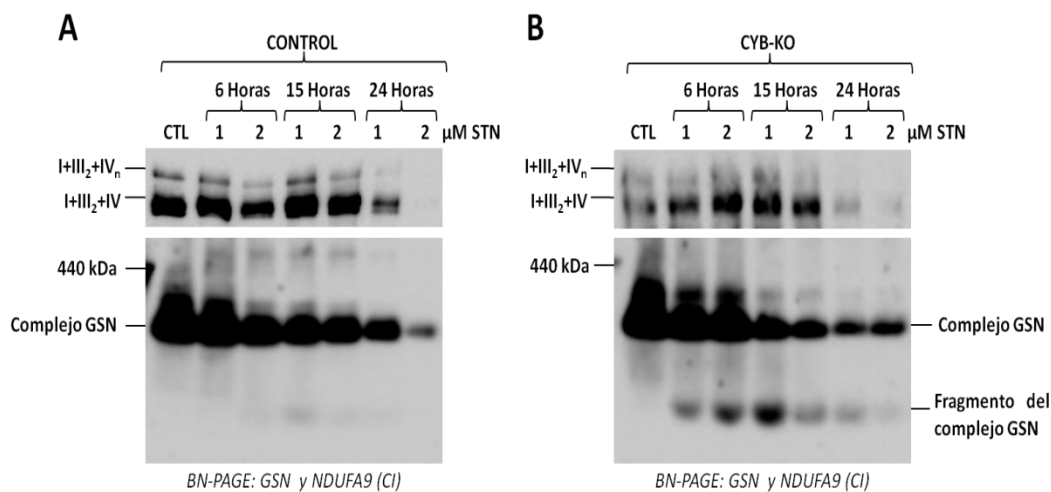
**Figura 46. Relación entre la GSN y la inducción de apoptosis mediada por estaurosporina en cíbridos control y mutantes CYB-KO.** Las células se cultivaron en un medio que contenía 1 ó 2  $\mu\text{M}$  de estaurosporina durante 6, 15 y 24 horas. Se utilizaron geles SDS-PAGE al 10% de acrilamida, para separar 15  $\mu\text{g}$  de extractos proteicos derivados de lisados celulares (A), fracciones citosólicas (B) y fracciones mitocondriales (C). Los niveles de GSN, Caspasa 3 y Citocromo c se analizaron mediante *Western blot*. En los lisados celulares y fracciones citosólicas se utilizó la  $\beta$ -actina como control de carga. La subunidad SDHA del complejo II se utilizó como control de carga para las fracciones mitocondriales. STN, estaurosporina; CTL, células no tratadas.



**3.8.2 El complejo de la Gelsolina se degrada en los cíbridos control y mutantes CYB-KO tratados con estaurosporina.**

A continuación se analizó cómo la proteólisis de la GSN afectaba a la formación del complejo de ~150 kDa que forma la GSN en la mitocondria.

Para ello, los cíbridos control y los mutantes CYB-KO se cultivaron en un medio suplementado con concentraciones de 1 y 2  $\mu$ M de estaurosporina durante 6, 15 y 24 horas. Las fracciones mitocondriales se solubilizaron con digitonina y se analizaron mediante BN-PAGE y *Western blot*. En las células control, los niveles del complejo mitocondrial de la GSN disminuyeron gradualmente a partir de las 15 horas del tratamiento sin observarse la acumulación de productos de degradación (Figura 47A). Igualmente, en las células mutantes los niveles del complejo de la GSN disminuyeron rápidamente a partir de las 15 horas de tratamiento. Sin embargo, se observó la acumulación paralela de una banda de bajo peso molecular (Figura 47B), compatible con el fragmento C-terminal de la GSN de 40 kDa observado previamente en los geles de SDS-PAGE (Figura 46C).



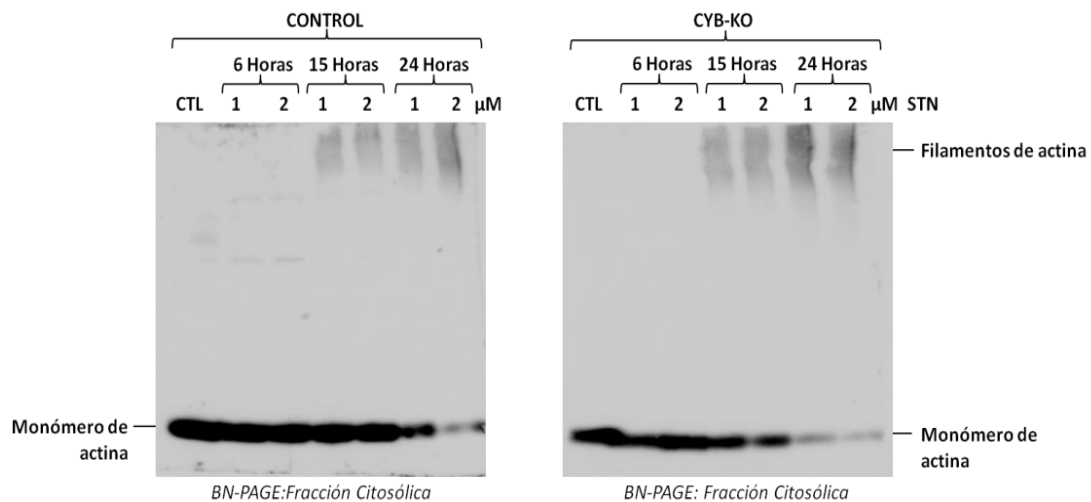
**Figura 47. Complejo mitocondrial de la GSN en los cíbridos control y mutantes CYB-KO tratados con estaurosporina.** Se separaron 60  $\mu$ g de proteína mitocondrial en geles de BN-PAGE con un gradiente del 3-12 % de acrilamida. Posteriormente se analizó mediante *Western blot* el complejo de la GSN. La subunidad NDUFA9 del complejo I (CI) se utilizó como control de carga. **STN**, estaurosporina; **CTL**, células no tratadas.

Como la  $\beta$ -actina es la diana principal de interacción de la GSN en el citoesqueleto, para finalizar se analizó el efecto del tratamiento con estaurosporina sobre la  $\beta$ -actina mediante

## RESULTADOS

BN-PAGE de los extractos proteicos citosólicos. A las 15 horas de tratamiento se observó un cambio de localización de la  $\beta$ -actina en ambas líneas celulares, la cual pasó de estar mayoritariamente en su forma monomérica a formar parte de estructuras de alto peso molecular compatibles con los filamentos de actina (Figura 48).

Estos cambios sugieren que la oligomerización de los monómeros de actina ocurre como consecuencia de la inducción de la apoptosis y podría estar mediada por la degradación del complejo mitocondrial de la GSN que tiene lugar en paralelo. Sin embargo, la oligomerización de la actina en estructuras de alto peso molecular ocurriría de forma independiente a la acumulación del fragmento C-terminal de la GSN, cuyo papel en nuestros modelos celulares queda pendiente de dilucidar.



**Figura 48. Estructuras de la  $\beta$ -actina en las fracciones citosólicas de los cíbridos control y mutantes CYB-KO tratados con estaurosporina.** Se separaron 60  $\mu$ g de proteína citosólica en geles de BN-PAGE con un gradiente del 3-12 % de acrilamida. Posteriormente, se realizó un análisis, mediante *Western blot*, de los complejos que forma la  $\beta$ -actina. **STN**, estaurosporina; **CTL**, células no tratadas.

## **DISCUSIÓN**

---





## 1. LOS NIVELES DE GELSOLINA CITOSÓLICA AUMENTAN EN LA MITOCONDRIA COMO RESPUESTA A DÉFICITS ENZIMÁTICOS DE LA CADENA RESPIRATORIA.

El objetivo principal de esta tesis ha consistido en la caracterización funcional de la Gelsolina humana y su validación como posible biomarcador de las enfermedades OXPHOS. Este trabajo se ha basado en un estudio previo desarrollado en nuestro laboratorio, en el cual se analizó el proteoma diferencial de fibroblastos control y derivados de pacientes con déficit enzimático del complejo III asociado a mutaciones en el factor de ensamblaje *BCS1L*. El análisis mediante la técnica proteómica 2D-DIGE reveló nuevos mecanismos fisiopatológicos asociados al déficit enzimático del complejo III (Marín-Buera *et al.*, 2015), los cuales incluían alteraciones en el metabolismo energético, en la regulación y mantenimiento del citoesqueleto, en la regulación de la expresión génica, en el transporte y señalización intracelular y en la respuesta a estrés celular.

Este trabajo se ha centrado en el estudio de una de las 39 proteínas expresadas diferencialmente entre los fibroblastos con déficit enzimático del complejo III y los fibroblastos control: la Gelsolina (GSN). La isoforma citosólica de esta proteína se encontraba sobreexpresada significativamente en los fibroblastos mutados en *BCS1L* respecto a los fibroblastos control. Aunque la función principal de la GSN es el mantenimiento de los filamentos de actina del citoesqueleto, también se ha asociado con procesos relacionados con la apoptosis y con la regulación de la función mitocondrial a través del sistema OXPHOS. Concretamente, en células humanas Jurkat tratadas con cuatro inductores de apoptosis diferentes, la sobreexpresión de la GSN anuló la liberación de Citocromo *c* y la pérdida del potencial de membrana mitocondrial asociados al proceso de apoptosis; esta función protectora la realizaría mediante su unión a la proteína de membrana externa mitocondrial VDAC (Koya *et al.*, 2000; Kusano *et al.*, 2000). Además, parte de la GSN sobreexpresada copurificó con las fracciones mitocondriales, sugiriendo la localización mitocondrial de la proteína. Asimismo, la sobreexpresión de la GSN citosólica restauró la actividad del complejo IV del sistema OXPHOS y el efecto citotóxico del péptido  $\beta$ -amiloide en modelos murinos de enfermedad de Alzheimer (Antequera *et al.*, 2009; Vargas *et al.*, 2010).

Por tanto, en primer lugar se procedió a estudiar la relación de la GSN con la mitocondria en los fibroblastos con déficit del complejo III asociado a mutaciones en *BCS1L*. Los datos obtenidos validaron los resultados del 2D-DIGE (Marín-Buera *et al.*, 2015), ya que se observó un aumento de los niveles totales de GSN en los fibroblastos mutados. Además, se observó que los niveles de GSN aumentaban de forma muy significativa en las fracciones mitocondriales (pero no en las citosólicas) de los fibroblastos con mutaciones en *BCS1L* (Figura 14). Este aumento de la

## DISCUSIÓN

GSN en la mitocondria también se observó en cíbridos transmitocondriales con un déficit enzimático del complejo III debido a una mutación en el gen *MT-CYB* (Figura 16). Este resultado descartó que el aumento de los niveles de GSN en la mitocondria fuera específico de los fibroblastos o de las mutaciones en *BCS1L*.

Los fibroblastos con mutaciones en *BCS1L* presentan defectos de ensamblaje del complejo III, lo que conlleva a la acumulación de intermediarios proteicos de dicho complejo (Morán *et al.*, 2010). Ello se debe a que el factor *BCS1L* es esencial para la inserción en el precomplejo III de la subunidad catalítica RISP (Cruciat *et al.*, 1999; Fernández-Vizarrá *et al.*, 2007; Nobrega *et al.*, 1992). Asimismo, los cíbridos mutados *CYB-KO* carecen por completo de la subunidad catalítica Citocromo *b* y por tanto, del complejo III (Rana *et al.*, 2000). Ello es debido a que la traducción de la subunidad *CYB* constituye la señal que dispara el ensamblaje de dicho complejo (Gruschke *et al.*, 2011; Hildenbeutel *et al.*, 2014). A fin de conseguir un modelo celular con fallos en la actividad enzimática del complejo III, pero con dicho complejo completamente ensamblado, se trataron los fibroblastos control y la línea celular de osteosarcoma 143B-TK<sup>-</sup> con concentraciones crecientes del inhibidor antimicina A. Este tratamiento indujo un aumento significativo de los niveles de la GSN en la mitocondria, lo cual indicaría que la alteración enzimática de la actividad del complejo III por sí sola, es capaz de inducir dicho aumento. Además, el aumento de la GSN en la mitocondria fue dependiente de la concentración del inhibidor y de la duración del tratamiento. En los fibroblastos se observó un aumento significativo de la GSN en la mitocondria sólo a las concentraciones más altas del tratamiento (200 y 500 nM), en las cuales la actividad del complejo III es nula (Figuras 17 y 19). Sin embargo a las concentraciones más bajas (2 y 20 nM) no se observó dicho aumento en los fibroblastos, los cuales mostraron una actividad del complejo III residual. Esto significaría que en fibroblastos, la actividad residual del complejo III podría contrarrestar el aumento de la GSN en la mitocondria. En la línea control 143B-TK<sup>-</sup> se observó que el aumento de la GSN en la mitocondria era dependiente no sólo de la concentración de antimicina A sino también de la duración del tratamiento, ya que a las 48 horas de éste, los niveles de la GSN en la mitocondria fueron mucho más altos que a las 24 horas de tratamiento con las mismas concentraciones del inhibidor (200 y 500 nM) (Figura 21). Además, el tratamiento con antimicina A indujo un aumento de la GSN en la mitocondria mucho más pronunciado en la línea celular 143B-TK<sup>-</sup> que en los fibroblastos control. Esto se podría deber a que la línea 143B-TK<sup>-</sup> consiste en células inmortalizadas que derivan de osteosarcoma, por lo cual exhiben un crecimiento mayor que el de los fibroblastos y un metabolismo altamente glucolítico. Estos resultados demostrarían que el aumento de los niveles de la GSN en la mitocondria en respuesta a un déficit enzimático de la cadena respiratoria mitocondria, sería un mecanismo celular tardío.

Al extender este análisis a cíbridos transmitocondriales con alteraciones enzimáticas de los complejos I ó IV de la cadena respiratoria, también se observó un aumento significativo de los niveles de la GSN en la mitocondria, sin observarse diferencias apreciables en cuanto al tipo de complejo afectado (Figura 22). Por tanto, el aumento de los niveles de la GSN en la mitocondria no es específico del déficit enzimático del complejo III, sino que se produce como respuesta general a la disfunción de la cadena respiratoria mitocondrial.

Se desconocen cuáles son los mecanismos moleculares que disparan la localización mitocondrial de la GSN. De hecho, el aumento de los niveles de la GSN en la mitocondria podría no ser desencadenado por el fallo funcional de la cadena respiratoria en sí mismo, sino que podría ocurrir en respuesta a un mecanismo asociado a la incorrecta función mitocondrial común a todos nuestros modelos celulares. Entre los mecanismos asociados a un mal funcionamiento del sistema OXPHOS se encontrarían: 1) Un descenso en la respiración mitocondrial y 2) en la producción de ATP (Korzeniewski, 2015; Torraco *et al.*, 2015); 3) una pérdida del potencial de membrana mitocondrial (Bird *et al.*, 2014); 4) oscilaciones en los niveles de calcio mitocondrial (Valsecchi *et al.*, 2009); 5) un aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS)(Wallace, 2001) o 6) un aumento de la apoptosis (Wallace, 2001).

Respecto a la respiración mitocondrial, estudios previos de nuestro grupo mostraron un descenso significativo en las tasas de consumo de oxígeno de los fibroblastos con mutaciones en *BCS1L* frente a los fibroblastos control (Marín-Buera *et al.*, 2015). Además, tanto en los cíbridos COX1-KO (D'Aurelio *et al.*, 2001) como en los cíbridos CYB-KO (Bell *et al.*, 2007; Rana *et al.*, 2000), también se describió un descenso en el consumo de oxígeno basal de la mitocondria respecto a sus respectivos controles isogénicos. Por tanto, se podría pensar que el descenso en el consumo de oxígeno provocado por los fallos enzimáticos de la cadena respiratoria podría desencadenar el aumento de los niveles de la GSN en la mitocondria. Sin embargo, el tratamiento con concentraciones crecientes de antimicina A en los fibroblastos control condujo a un marcado descenso en el consumo de O<sub>2</sub> desde las concentraciones menores del inhibidor (2 y 20 nM) (Figura 17). Dicho descenso no correlacionó con el aumento de los niveles de GSN en la mitocondria, el cual empezó a ser significativo a las concentraciones más altas del inhibidor (200 y 500 nM) (Figura 19). Por tanto, no existe una correlación directa entre la bajada del consumo de oxígeno y el aumento de los niveles de GSN en la mitocondria debido al tratamiento con antimicina A. Estos datos descartarían que el descenso en la respiración mitocondrial sea el mecanismo molecular causante del aumento de la GSN en la mitocondria.

## DISCUSIÓN

Por otro lado, nuestros datos sugieren que el aumento de los niveles de ROS tampoco constituye el mecanismo desencadenante del aumento de los niveles de GSN en la mitocondria. A pesar de que en los cíbridos CYB-KO (Bell *et al.*, 2007; Rana *et al.*, 2000) y en los fibroblastos con mutaciones en *BCS1L* (Morán *et al.*, 2010) se ha descrito previamente un aumento en la producción de ROS, nuestros datos reflejan que no todos los cíbridos con déficits enzimáticos de la cadena respiratoria tienen asociado un aumento de ROS celular (Figura 23). Estos datos van en la línea de estudios previos que sugieren que algunas mutaciones patogénicas del ADN mitocondrial no tendrían asociado un aumento en la producción de ROS (Vives-Bauza *et al.*, 2006). Concretamente, este grupo observó que en cíbridos transmitocondriales con mutaciones en los genes que codifican para el ARNt<sup>Leu</sup> y para el ARNt<sup>Lys</sup> existía un aumento en los niveles de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), similar al que se observa en nuestros cíbridos con mutaciones en *MT-CYB* y *MT-CO2*. Sin embargo, ambos grupos hemos observado que en los cíbridos con la mutación m.6930G>A en la subunidad COX1 del complejo IV, no existe un incremento de los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lo que descartaría variaciones en la producción de ROS.

Así mismo, en la línea celular control 143B-TK tratada con concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no se observaron alteraciones significativas en los niveles estacionarios de la GSN (Figura 24). Estos resultados contradicen trabajos publicados que describían un aumento de los niveles totales de GSN en células humanas (SH-SY5Y y HEK293T) y de rata (PC-12), tratadas con 200 y 500 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 12, 24 y 36 horas (Ji *et al.*, 2010b). Estas diferencias podrían deberse a la utilización de modelos celulares distintos. Además, en las células 143B-TK tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se observó una clara disminución de los niveles de la GSN localizada en la fracción mitocondrial a las mayores concentraciones de dicho tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 24). Dado que se ha descrito que un aumento en los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> propicia el desarrollo de los procesos de apoptosis (Edmondson, 2014; Lennicke *et al.*, 2015), este descenso de la GSN en la fracción mitocondrial podría ser causado por un aumento general de la degradación proteica al incrementarse la muerte celular, inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Redza-Dutordoir & Averill-Bates, 2016).

Un tercer mecanismo molecular común a los modelos celulares con alteraciones del sistema OXPHOS podría ser la inducción de apoptosis. Por ejemplo, en fibroblastos con diferentes mutaciones en *BCS1L* se observó un aumento de los núcleos apoptóticos respecto a los fibroblastos control (Morán *et al.*, 2010). Sin embargo, la inducción de apoptosis mediante el tratamiento con estaurosporina en cíbridos control no solo no produjo un aumento en los niveles de GSN ni su localización mitocondrial, sino que redujo los niveles de la proteína en ambas fracciones (Figura 25). Este descenso de los niveles de GSN podría ser de nuevo consecuencia de la degradación proteica causada por la activación del proceso de apoptosis inducida por estaurosporina (Bertrand *et al.*, 1994; Yue *et al.*, 1998). También podría ser debido a que la



estaurosporina compete con el ATP por los sitios de unión en las proteínas quinasas, causando por tanto una inhibición de la actividad de la proteína quinasa C (PKC), la cual se ha descrito que sería necesaria para la síntesis *de novo* de la propia GSN (Ji *et al.*, 2010a; Miyamoto & Wu, 1990). Por tanto, en futuros estudios sería conveniente la utilización de otro inductor de apoptosis con un mecanismo de acción diferente, como la taspigargina, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) o el anticuerpo frente al receptor Fas, a fin de descartar definitivamente a la inducción de la apoptosis como el detonante del aumento de la GSN en la mitocondria.

Los tres mecanismos moleculares restantes (pérdida del potencial de membrana mitocondrial, descenso en la síntesis de ATP y alteraciones de los niveles del calcio mitocondrial), no se pueden descartar como posibles desencadenantes del aumento de los niveles de la GSN en la mitocondria, ya que no se han analizado experimentalmente en los modelos celulares utilizados. De estos tres mecanismos, sería de especial importancia ahondar en el estudio de la relación entre la homeostasis del calcio y los niveles de GSN en la mitocondria, ya que es una proteína cuya actividad se ve regulada por los niveles de calcio citosólico (Yin & Stossel, 1979). Además, también se ha descrito un aumento de los niveles estacionarios de GSN al tratar las líneas celulares humanas HEK293T y SH-SY5Y con el ionóforo del calcio A23187 (Ji *et al.*, 2010a).

En conclusión, los datos presentados muestran que los niveles de la GSN citosólica aumentan significativamente en la mitocondria en respuesta a las alteraciones enzimáticas de la cadena respiratoria, pero queda por dilucidar el mecanismo molecular asociado que lo desencadena.

## 2. IMPLICACIÓN FUNCIONAL DE LA GELSOLINA EN LA MITOCONDRIA.

En trabajos previos, se ha descrito que la GSN mantiene una relación con la función mitocondrial, ya que la proteína sobreexpresada juega un papel importante en la regulación de la apoptosis por vía mitocondrial (Koya *et al.*, 2000; Kusano *et al.*, 2000) y en el funcionamiento del sistema OXPHOS (Antequera *et al.*, 2009; Vargas *et al.*, 2010), además se observó que parte de la GSN sobreexpresada colocalizaba con las fracciones mitocondriales (Koya *et al.*, 2000). Sin embargo, la mayor parte de los modelos experimentales utilizados analizaron la función de la GSN exógena y existen pocos estudios que muestran variaciones en los niveles de la GSN endógena en respuesta a estímulos fisiológicos. Además, el aumento de los niveles de la GSN citosólica en las mitocondrias de células humanas con déficit enzimático de la cadena respiratoria no se ha descrito previamente.

Por ello, el siguiente objetivo de este trabajo fue caracterizar la implicación funcional de la GSN en la mitocondria de modelos celulares con un déficit enzimático de la cadena respiratoria.

## DISCUSIÓN

Para ello, en primer lugar se determinó la localización submitocondrial de la GSN y las posibles dianas proteicas con las que podría estar interaccionando. Los datos reflejan que la GSN se encontraría mayoritariamente en la membrana externa mitocondrial (Figura 33), formando parte de un complejo de unos 150 kDa (Figura 34). En concordancia con el aumento de los niveles de GSN en la fracción mitocondrial, también se observó un aumento de los niveles del complejo del que forma parte la GSN en respuesta a déficits enzimáticos de la cadena respiratoria (Figura 34).

A continuación, se analizó la composición proteica del complejo de la GSN mediante la identificación proteómica de las bandas escindidas de geles de BN-PAGE, las cuales contenían a dicho complejo. De entre todas las proteínas identificadas se prestó principal atención a las proteínas localizadas en la membrana mitocondrial externa (Tabla 6), ya que son las principales candidatas a establecer una interacción con la GSN en la mitocondria. Entre ellas, se observó la presencia de las tres isoformas de la porina: VDAC1, VDAC2 y VDAC3, integrantes del canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC). La suma de los pesos moleculares de estas tres proteínas más el de la GSN (~170 kDa), podría corresponder con el tamaño del complejo de GSN. Esto concuerda con los trabajos anteriores que describen la interacción de la GSN con VDAC en células humanas (Jurkat y HeLa) y de ratón (NIH3T3). Dicha interacción ejercería un efecto protector frente a la apoptosis, evitando la liberación del Citocromo *c* y la pérdida del potencial de membrana mitocondrial (Koya *et al.*, 2000; Kusano *et al.*, 2000).

Mediante ensayos de coimmunoprecipitación (CO-IP), se confirmó la interacción directa de la GSN con VDAC1 tanto en células control como en células con alteraciones enzimáticas del sistema OXPHOS. (Figuras 36 y 37). Estos datos indican que la interacción entre GSN y VDAC1 no se induce de forma específica en respuesta al déficit enzimático de la cadena respiratoria. En este sentido, cabe destacar que los ensayos de co-inmunoprecipitación también muestran la interacción entre GSN y  $\beta$ -actina en mitocondrias aisladas. Por ello, podría pensarse que la GSN interviene en la regulación de la dinámica mitocondrial, ya que la interacción transitoria de los filamentos de actina con subpoblaciones mitocondriales favorece el reclutamiento de Drp1 y el proceso de fusión de la red mitocondrial en puntos específicos de la célula (Moore *et al.*, 2016). En esta línea, se encontrarían los análisis de inmunolocalización subcelular mediante microscopía confocal, los cuales mostraron un patrón irregular de localización de la GSN con VDAC1 en las mitocondrias (Figuras 15 y 20), sugiriendo que la GSN podría interaccionar con puntos específicos de la red mitocondrial. Por otro lado, la GSN no es la única proteína del citoesqueleto que interacciona con la mitocondria a través de VDAC. Se ha descrito la interacción directa entre la tubulina y VDAC en modelos celulares humanos (Carré *et al.*, 2002). En mitocondrias de hígado de rata, se ha observado que el extremo C-terminal de la tubulina interaccionaría con VDAC pudiendo bloquear el transporte de moléculas a través del poro que forma (Rostovtseva *et al.*,

2008). Además, en levaduras se ha descrito que la actina monomérica puede interactuar con VDAC para modular el transporte de metabolitos entre la mitocondria y el citosol (Roman *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2001).

Aunque la GSN y VDAC1 interactúan en la membrana mitocondrial externa, parece no existir una relación dependiente de VDAC1 con la GSN. Ello se debe a que la disminución de los niveles de GSN mediante la interferencia de su ARNm, no provocó alteraciones ni en los niveles estacionarios de VDAC1, ni en las estructuras de alto peso molecular de las que forma parte (Figuras 38 y 39). Sin embargo, la disminución de los niveles de GSN provocó la acumulación de una banda de un peso molecular en torno a 60 kDa (Figura 39), la cual podría corresponder a la estructura dimerica de VDAC1. Asimismo, el silenciamiento de la GSN provocó un aumento en los niveles de Citocromo *c* mitocondrial en el citosol (Figura 40), sugiriendo la inducción de la apoptosis. Por tanto, nuestros resultados apoyarían estudios previos que sugerían que la oligomerización de las isoformas de VDAC, induce la formación de un poro en la membrana externa mitocondrial lo suficientemente grande y flexible, como para permitir el paso de Citocromo *c* (Keinan *et al.*, 2013; Zalk *et al.*, 2005). Estos resultados también van en consonancia con trabajos previos que le otorgan a la GSN una función antiapoptótica gracias a su unión a VDAC, la cual evitaría la liberación del Citocromo *c* y la pérdida del potencial de membrana (Koya *et al.*, 2000; Kusano *et al.*, 2000). Sin embargo, el taponamiento de VDAC puede suponer una alteración en la homeostasis de los metabolitos mitocondriales, lo que podría conducir a una muerte celular prematura (Baines *et al.*, 2007; Galluzzi & Kroemer, 2007). También se ha descrito que VDAC puede interactuar con varios miembros de la familia de proteínas Bcl-2, las cuales regulan el proceso de apoptosis mediante la permeabilización de la membrana mitocondrial externa. Por un lado, VDAC1 podría estar involucrada mediante su unión a Bax en un proceso proapoptótico (Tajeddine *et al.*, 2008). Pero por otro lado, VDAC1 puede interactuar con las proteínas Bcl-xl y Bcl-2, modulando su carácter antiapoptótico (Arbel & Shoshan-Barmatz, 2010; Zheng *et al.*, 2004). Por tanto, el mecanismo de regulación de la apoptosis a través de la proteína VDAC no está del todo claro y es objeto de debate (McCommis & Baines, 2012). Los futuros estudios deberán ahondar en los mecanismos que coordinan el papel del citoesqueleto ante los procesos fisiológicos que regulan la homeostasis mitocondrial.

En cuanto a la posible regulación del funcionamiento del sistema OXPHOS por parte de la GSN, nuestros datos reflejaron que las variaciones en los niveles de la GSN no provocaron alteraciones estructurales de los complejos y supercomplejos del sistema OXPHOS (Figuras 40-44). Esto contrastaría con los trabajos previos que describían una restauración de la actividad del complejo IV, gracias a la sobreexpresión de la isoforma citosólica de la GSN en modelos murinos

## DISCUSIÓN

de Alzheimer (Antequera *et al.*, 2009; Vargas *et al.*, 2010). Estas diferencias podrían explicarse porque en los modelos de enfermedad de Alzheimer, el péptido  $\beta$ -amiloide es el causante del descenso de la actividad del complejo IV (Canevari *et al.*, 1999; Mancuso *et al.*, 2003). Al sobreexpresarse la GSN, la actividad mitocondrial se restauraría de manera indirecta, gracias a la capacidad que posee la GSN de reducir la carga de dicho péptido (Antequera *et al.*, 2009; Hirko *et al.*, 2007; Matsuoka *et al.*, 2003).

Por tanto, nuestros resultados junto con gran parte de los trabajos previos, sugerirían que la interacción entre la GSN y la mitocondria ejerce un papel regulador sobre el proceso de apoptosis celular. Por ello, el siguiente objetivo de este trabajo consistió en determinar el papel de la GSN en la apoptosis inducida por estaurosporina en cíbridos control y con un déficit enzimático del complejo III de la CRM. La caspasa 3 activa es capaz de cortar a la GSN en dos fragmentos de tamaños comparables (Kamada *et al.*, 1998; Kothakota *et al.*, 1997). El extremo C-terminal posee función antiapoptótica, ya que su sobreexpresión evita la pérdida del potencial de membrana y la liberación del Citocromo *c* al citosol, lo cual inhibe la activación de las caspasas 3, 8 y 9 (Koya *et al.*, 2000). Por el contrario, el extremo N-terminal de la GSN exhibe una función proapoptótica, ya que corta a los filamentos de actina de manera independiente de calcio y contribuye a los cambios morfológicos celulares característicos de la apoptosis (Kothakota *et al.*, 1997; Geng *et al.*, 1998). Además, promueve la liberación de la desoxiribonucleasa (DNasa 1) y la degradación del ADN nuclear, clave para el desarrollo de la apoptosis (Li *et al.*, 2009; Mannherz *et al.*, 1995).

El tratamiento con estaurosporina condujo a una activación de la Caspasa 3, comparable entre la línea CYB-KO y su control isogénico (Figura 46). En la línea control, el tratamiento condujo a la degradación gradual de la GSN sin provocar la acumulación de formas intermedias. Sin embargo, en la línea celular que carece de complejo III se apreció la acumulación de un fragmento de 40 kDa de GSN proteolizada en las fracciones mitocondriales (Figura 46). La acumulación de este fragmento ocurría específicamente en las mitocondrias de las células mutantes, ya que no se observó en las fracciones citosólicas (Figura 46). Este fragmento correspondería al extremo C-terminal de la GSN, ya que los anticuerpos utilizados en este trabajo reconocen específicamente a un epítipo de dicho extremo y su peso molecular corresponde con el tamaño de dicho fragmento. De acuerdo con estos datos, el tratamiento con estaurosporina indujo la proteolización y degradación del complejo de la GSN con la acumulación específica del fragmento C-terminal en las fracciones mitocondriales de la línea mutante, sin observarse la aparición de este fragmento en la línea control (Figura 47). No se puede discernir si el extremo N-terminal se estaría o no degradando, ya que no se consigue detectar en nuestros ensayos. Aunque en paralelo a la degradación del complejo de la GSN en la mitocondria, se observó la oligomerización de la

actina citosólica en estructuras polimerizadas de alto peso molecular (Figura 48). Este dato sugiere que el extremo N-terminal se estaría degradando, ya que este fragmento teóricamente cortaría y despolimerizaría los filamentos de actina de forma independiente del calcio intracelular (Kothakota *et al.*, 1997; Geng *et al.*, 1998).

Por tanto, el conjunto de nuestros resultados sugiere que el aumento de los niveles de GSN citosólica en la mitocondria provocado en respuesta al déficit enzimático de cadena respiratoria, podría estar desempeñando un papel protector frente a la apoptosis. Sin embargo, se necesitan más ensayos funcionales para conocer la función concreta de la GSN en la mitocondria y su papel en la regulación de los mecanismos fisiopatológicos inducidos por la disfunción del sistema OXPHOS.

### **3. LOS NIVELES DE GELSOLINA PLASMÁTICA DISMINUYEN EN RESPUESTA A LOS DÉFICITS ENZIMÁTICOS DE LA CADENA RESPIRATORIA.**

Uno de los principales objetivos de este trabajo ha consistido en la identificación y validación de posibles biomarcadores de enfermedades mitocondriales OXPHOS. Las razones por las que se puso el foco de atención sobre la GSN, fueron tanto su posible implicación en la función mitocondrial, como en la existencia de una isoforma plasmática de dicha proteína. Por tanto, cumplía uno de los requisitos imprescindibles para definirla como biomarcador, que es el de ser fácilmente detectable y cuantificable en muestras de sencilla obtención.

En todos los modelos celulares utilizados, se observó un descenso significativo de los niveles de la GSN plasmática secretada al medio extracelular, que contrastaba con el aumento paralelo de los niveles de la GSN citosólica en la mitocondria. Esta doble observación no se ha descrito previamente para ningún tipo de enfermedad, por lo que se propone establecer una relación cuantitativa entre las dos isoformas de la GSN. La ratio podría constituir un buen indicador de los cambios fisiopatológicos que se producirían en la célula en respuesta a un déficit enzimático del sistema OXPHOS, lo cual podría asociarse con la severidad del déficit enzimático. Si se utilizan como referentes los valores significativos obtenidos para ambas isoformas de la GSN en los fibroblastos control tratados con la antimicina A, se podría establecer un valor de corte para la ratio de dos (Figura 30). Es decir, cuando los niveles de GSN en la mitocondria fueran el doble que los valores de la GSN plasmática respecto a un control, se podría establecer que se ha desencadenado el mecanismo molecular que implica a la GSN en la respuesta al déficit enzimático del sistema OXPHOS.

## DISCUSIÓN

El descenso de los niveles de la isoforma plasmática de la GSN secretada al medio extracelular en células con disfunción de la cadena respiratoria, se ha podido extrapolar a muestras sanguíneas procedentes de pacientes diagnosticados bioquímica y/o genéticamente con enfermedad mitocondrial OXPHOS. Tanto en pacientes adultos como en pediátricos se observó un descenso significativo de los niveles de la GSN plasmática, sin apreciarse diferencias significativas entre sexos. Por tanto, la medida de los niveles de GSN en el plasma de pacientes podría ser un buen indicador para el diagnóstico de las enfermedades mitocondriales. Sin embargo, otro requisito esencial para que la GSN se pudiera considerar un buen biomarcador, es que la disminución de sus niveles en plasma debería ser específica de las enfermedades OXPHOS. En este caso la GSN no cumpliría este requisito, ya que se ha descrito que los niveles de GSN plasmática se encuentran disminuidos en un amplio rango de patologías, entre ellas: enfermedades cardiovasculares (Suhler *et al.*, 1997), renales (Lee *et al.*, 2009), inflamatorias (Kulakowska *et al.*, 2008; Osborn *et al.*, 2008) e infecciosas (Bucki *et al.*, 2005). Además, en el caso de que se quisiera establecer un valor de corte en los niveles de GSN plasmática para considerar a un paciente como sospechoso de enfermedad mitocondrial, se necesitaría establecer primero la especificidad de la GSN como biomarcador. Es decir, analizar si existen diferencias significativas en los niveles de GSN plasmática entre pacientes con enfermedades neuromusculares de origen no mitocondrial y pacientes con enfermedades mitocondriales.

Así mismo, se ha descrito que a mayores niveles de GSN plasmática existe una mejor evolución en pacientes traumatológicos o con quemaduras en la UCI (Lee *et al.*, 2006; Mounzer *et al.*, 1999; Xianhui *et al.*, 2014), pacientes con disfunción renal crónica (Lee *et al.*, 2009), pacientes con artritis reumatoide (Osborn *et al.*, 2008), con esclerosis múltiple (Kulakowska *et al.*, 2008; Kulakowska *et al.*, 2010) o con malaria (Smith *et al.*, 1988). Por ello, se ha propuesto que los niveles de GSN plasmática podrían constituir un buen marcador pronóstico en el desarrollo de diversas enfermedades, así como un marcador general de salud (Peddada *et al.*, 2012). Se ha descrito que el valor promedio de GSN plasmática en mamíferos está entre el rango de 200-300 µg/ml (Bucki *et al.*, 2008). Sin embargo, en todos estos trabajos en los que se han medido los niveles de GSN plasmática en grupos de pacientes con diversas patologías frente a individuos sanos, se observó una gran variabilidad entre los niveles promedio medidos por los diferentes laboratorios. Dichos valores de GSN plasmática en los grupos control oscilaban desde 126 µg/ml hasta 517 µg/ml (Peddada *et al.*, 2012). En nuestro caso, los valores promedio de GSN en sangre que se calcularon en individuos control fueron de 203,7 µg/ml en el caso de los adultos y de 121,3 µg/ml en el caso de individuos menores de 18 años. Esta variabilidad de los niveles medidos podría deberse a las diferentes técnicas utilizadas entre los distintos laboratorios, así como a una

posible contaminación por parte de la GSN citosólica liberada al plasma sanguíneo en el proceso de necrosis celular. Por ello, si se pretende utilizar los niveles de GSN plasmática como un marcador pronóstico, es completamente necesario establecer un método universal de detección de la GSN plasmática, a través del cual se establezcan los valores promedios de la GSN plasmática respecto a la edad, sexo, raza, etc.

Además, sería interesante mirar si en pacientes con enfermedad mitocondrial también existe una correlación entre la evolución y la gravedad de la patología respecto a los niveles de la GSN plasmática. Si existiera esta correlación, la medida de los niveles plasmáticos de GSN se podría utilizar como un buen indicador pronóstico dentro de las enfermedades mitocondriales y podría combinarse con el uso de otros biomarcadores de enfermedad más específicos, como FGF21 (Suomalainen *et al.*, 2011).





## **CONCLUSIONES**

---



- 1) Los niveles de la Gelsolina citosólica aumentan significativamente en las mitocondrias de células con déficits enzimáticos de la cadena respiratoria mitocondrial.
- 2) En células control, el tratamiento con antimicina A es suficiente para inducir la sobreexpresión y localización mitocondrial de la Gelsolina. Sin embargo, los tratamientos con peróxido de hidrógeno o con estaurosporina no inducen un aumento significativo de los niveles de la GSN citosólica ni su localización mitocondrial.
- 3) La Gelsolina citosólica de localización mitocondrial se sitúa en la membrana externa, donde interacciona con la proteína del canal aniónico dependiente de voltaje, VDAC1.
- 4) El silenciamiento del ARN mensajero de *GSN* provoca un aumento de la dimerización de VDAC1 y la liberación del Citocromo *c* mitocondrial al citosol, sin afectar estructuralmente a los complejos del sistema OXPHOS.
- 5) Los niveles de la Gelsolina plasmática se encuentran disminuidos significativamente en el medio extracelular de células humanas con déficits enzimáticos de la cadena respiratoria.
- 6) Así mismo, los valores de Gelsolina plasmática se encuentran disminuidos significativamente en muestras de plasmas sanguíneos derivados de pacientes adultos y pediátricos diagnosticados con enfermedad mitocondrial OXPHOS.
- 7) El valor medio de la Gelsolina plasmática calculado en las muestras sanguíneas de individuos sanos adultos es de 203,7 µg/ml, mientras que en pacientes con enfermedad OXPHOS es de 144,5 µg/ml. Dicho valor en los controles menores de edad es de 121,3 µg/ml y en los pacientes pediátricos es de 94,4 µg/ml.



## **BIBLIOGRAFÍA**

---



- Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Peleato, M. L., Pérez-Martos, A., Enriquez, J. A. (2008). Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Molecular Cell*, 32(4), 529–39.
- Ahn, J. S., Jang, I.-S., Kim, D.-I., Cho, K. A., Park, Y. H., Kim, K., Kwak, C. S., Chul Park, S. (2003). Aging-associated increase of gelsolin for apoptosis resistance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 312(4), 1335–41.
- Aidinis, V., Carninci, P., Armaka, M., Witke, W., Harokopos, V., Pavelka, N., Koczan, D., Argyropoulos, C., Thwin, M., Möller, S., Waki, K., Kazunori, W., Gopalakrishnakone, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Thiesen, H. J., Hayashizaki, Y., Kollias, G. (2005). Cytoskeletal rearrangements in synovial fibroblasts as a novel pathophysiological determinant of modeled rheumatoid arthritis. *PLoS Genetics*, 1(4), e48.
- Althoff, T., Mills, D. J., Popot, J.-L., Kühlbrandt, W. (2011). Arrangement of electron transport chain components in bovine mitochondrial supercomplex I1III2IV1. *The EMBO Journal*, 30(22), 4652–64.
- 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., Schreier, P. H., Smith, A. J., Staden, R., Young, I. G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290(5806), 457–65.
- Andreu, A. L., Bruno, C., Dunne, T. C., Tanji, K., Shanske, S., Sue, C. M., Krishna, S., Hadjigeorgiou, G. M., Shtilbans, A., Bonilla, E., DiMauro, S. (1999). A nonsense mutation (G15059A) in the cytochrome b gene in a patient with exercise intolerance and myoglobinuria. *Annals of Neurology*, 45(1), 127–30.
- Andreu, A. L., Bruno, C., Hadjigeorgiou, G. M., Shanske, S., DiMauro, S. (1999). Polymorphic variants in the human mitochondrial cytochrome b gene. *Molecular Genetics and Metabolism*, 67(1), 49–52.
- Andrews, R. M., Kubacka, I., Chinnery, P. F., Lightowlers, R. N., Turnbull, D. M., Howell, N. (1999). Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature Genetics*, 23(2), 147.
- Antequera, D., Vargas, T., Ugalde, C., Spuch, C., Molina, J. A., Ferrer, I., Bermejo-Pareja, F., Carro, E. (2009). Cytoplasmic gelsolin increases mitochondrial activity and reduces A $\beta$  burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, 36(1), 42–50.

## BIBLIOGRAFÍA

Antonicka, H., Mattman, A., Carlson, C. G., Glerum, D. M., Hoffbuhr, K. C., Leary, S. C., Kennaway, N. G., Shoubridge, E. A. (2003). Mutations in COX15 Produce a Defect in the Mitochondrial Heme Biosynthetic Pathway, Causing Early-Onset Fatal Hypertrophic Cardiomyopathy. *The American Journal of Human Genetics*, 72(1), 101–114.

Arbel, N., & Shoshan-Barmatz, V. (2010). Voltage-dependent Anion Channel 1-based Peptides Interact with Bcl-2 to Prevent Antiapoptotic Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 285(9), 6053–6062.

Arora, P. D., Glogauer, M., Kapus, A., Kwiatkowski, D. J., McCulloch, C. A. (2004). Gelsolin mediates collagen phagocytosis through a rac-dependent step. *Molecular Biology of the Cell*, 15(2), 588–99.

Arora, P. D., Janmey, P. A., McCulloch, C. A. (1999). A role for gelsolin in stress fiber-dependent cell contraction. *Experimental Cell Research*, 250(1), 155–67.

Asch, H. L., Winston, J. S., Edge, S. B., Stomper, P. C., Asch, B. B. (1999). Down-regulation of gelsolin expression in human breast ductal carcinoma in situ with and without invasion. *Breast Cancer Research and Treatment*, 55(2), 179–88.

Ashish, Paine, M. S., Perryman, P. B., Yang, L., Yin, H. L., Krueger, J. K. (2007). Global structure changes associated with Ca<sup>2+</sup> activation of full-length human plasma gelsolin. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(35), 25884–92.

Astuti, D., Douglas, F., Lennard, T. W., Aligianis, I. A., Woodward, E. R., Evans, D. G., Eng, C., Latif, F., Maher, E. R. (2001). Germline SDHD mutation in familial pheochromocytoma. *Lancet (London, England)*, 357(9263), 1181–2.

Astuti, D., Latif, F., Dallol, A., Dahia, P. L., Douglas, F., George, E., Sköldbberg, F., Husebye, E. S., Eng, C., Maher, E. R. (2001). Gene mutations in the succinate dehydrogenase subunit SDHB cause susceptibility to familial pheochromocytoma and to familial paraganglioma. *American Journal of Human Genetics*, 69(1), 49–54.

Azuma, T., Kohts, K., Flanagan, L., Kwiatkowski, D. (2000). Gelsolin in complex with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate inhibits caspase-3 and -9 to retard apoptotic progression. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(6), 3761–6.



- Azuma, T., Witke, W., Stossel, T. P., Hartwig, J. H., Kwiatkowski, D. J. (1998). Gelsolin is a downstream effector of rac for fibroblast motility. *The EMBO Journal*, 17(5), 1362–70.
- Baines, C. P., Kaiser, R. A., Sheiko, T., Craigen, W. J., Molkentin, J. D. (2007). Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nature Cell Biology*, 9(5), 550–5.
- Barel, O., Shorer, Z., Flusser, H., Ofir, R., Narkis, G., Finer, G., Shalev, H., Nasasra, A., Saada, A., Birk, O. S. (2008). Mitochondrial complex III deficiency associated with a homozygous mutation in UQCRCQ. *American Journal of Human Genetics*, 82(5), 1211–6.
- Barrientos, A., Barros, M. H., Valnot, I., Rötig, A., Rustin, P., Tzagoloff, A. (2002). Cytochrome oxidase in health and disease. *Gene*, 286(1), 53–63.
- Barrientos, A., Kenyon, L., Moraes, C. T. (1998). Human xenomitochondrial cybrids. Cellular models of mitochondrial complex I deficiency. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(23), 14210–7.
- Bayona-Bafaluy, M. P., Müller, S., Moraes, C. T. (2005). Fast adaptive coevolution of nuclear and mitochondrial subunits of ATP synthetase in orangutan. *Molecular Biology and Evolution*, 22(3), 716–24.
- Baysal, B. E., Ferrell, R. E., Willett-Brozick, J. E., Lawrence, E. C., Myssiorek, D., Bosch, A., van der Mey, A., Taschner, P. E., Rubinstein, W. S., Myers, E. N., Richard, C. W., Cornelisse, C. J., Devilee, P., Devlin, B. (2000). Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5454), 848–51.
- Bell, E. L., Klimova, T. A., Eisenbart, J., Moraes, C. T., Murphy, M. P., Budinger, G. R. S., Chandel, N. S. (2007). The Qo site of the mitochondrial complex III is required for the transduction of hypoxic signaling via reactive oxygen species production. *Journal of Cell Biology*, 177(6), 1029–1036.
- Bénil, P., Beugnot, R., Chretien, D., Giurgea, I., De Lonlay-Debeney, P., Issartel, J.-P., Corral-Debrinski, M., Kerscher, S., Rustin, P., Rötig, A., Munnich, A. (2003). Mutant NDUFV2 subunit of mitochondrial complex I causes early onset hypertrophic cardiomyopathy and encephalopathy. *Human Mutation*, 21(6), 582–586.

## BIBLIOGRAFÍA

Bénil, P., Chretien, D., Kadhom, N., de Lonlay-Debeney, P., Cormier-Daire, V., Cabral, A., Peudenier, S., Rustin, P., Munnich, A., Rötig, A. (2001). Large-Scale Deletion and Point Mutations of the Nuclear NDUFV1 and NDUFS1 Genes in Mitochondrial Complex I Deficiency. *The American Journal of Human Genetics*, 68(6), 1344–1352.

Bénil, P., Lebon, S., Rustin, P. (2009). Respiratory-chain diseases related to complex III deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1793(1), 181–185.

Bénil, P., Slama, A., Cartault, F., Giurgea, I., Chretien, D., Lebon, S., Marsac, C., Munnich, A., Rötig, A., Rustin, P. (2004). Mutant NDUFS3 subunit of mitochondrial complex I causes Leigh syndrome. *Journal of Medical Genetics*, 41(1), 14–7.

Berger, I., HersHKovitz, E., Shaag, A., Edvardson, S., Saada, A., Elpeleg, O. (2008). Mitochondrial complex I deficiency caused by a deleterious NDUFA11 mutation. *Annals of Neurology*, 63(3), 405–408.

Bernier, F. P., Boneh, A., Dennett, X., Chow, C. W., Cleary, M. A., Thorburn, D. R. (2002). Diagnostic criteria for respiratory chain disorders in adults and children. *Neurology*, 59(9), 1406–11.

Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409(6818), 363–6.

Bertrand, R., Solary, E., O'Connor, P., Kohn, K. W., Pommier, Y. (1994). Induction of a Common Pathway of Apoptosis by Staurosporine. *Experimental Cell Research*, 211(2), 314–321.

Bianchi, C., Genova, M. L., Parenti Castelli, G., Lenaz, G. (2004). The Mitochondrial Respiratory Chain Is Partially Organized in a Supercomplex Assembly: KINETIC EVIDENCE USING FLUX CONTROL ANALYSIS. *Journal of Biological Chemistry*, 279(35), 36562–36569.

Bird, M. J., Thorburn, D. R., Frazier, A. E. (2014). Modelling biochemical features of mitochondrial neuropathology. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840(4), 1380–92.

Blázquez, A., Arenas, J., Martín, M. A. (2016). Molecular Genetics of OXPHOS Disorders. *eLS*, 1–10.

Blázquez, A., Gil-borlado, M. C., Morán, M., Verdú, A., Cazorla-calleja, M. R., Martín, M. A., Arenas, J., Ugalde, C. (2009). Neuromuscular Disorders Infantile mitochondrial encephalomyopathy with unusual phenotype caused by a novel BCS1L mutation in an isolated complex III-deficient patient. *NEUROMUSCULAR DISORDERS*.

- Boekema, E. J., Braun, H.-P. (2007). Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(1), 1–4.
- Bogenhagen, D. F., Wang, Y., Shen, E. L., Kobayashi, R. (2003). Protein components of mitochondrial DNA nucleoids in higher eukaryotes. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 2(11), 1205–16.
- Borisov, V. B. (2002). Defects in mitochondrial respiratory complexes III and IV, and human pathologies. *Molecular Aspects of Medicine*, 23(5), 385–412.
- Bourgeron, T., Rustin, P., Chretien, D., Birch-Machin, M., Bourgeois, M., Viegas-Péquignot, E., Munnich, A., Rötig, A. (1995). Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nature Genetics*, 11(2), 144–9.
- Brandt, B. H., Roetger, A., Dittmar, T., Nikolai, G., Seeling, M., Merschjann, A., Nofer, J. R., Dehmer-Möller, G., Junker, R., Assmann, G., Zaenker, K. S. (1999). c-erbB-2/EGFR as dominant heterodimerization partners determine a motogenic phenotype in human breast cancer cells. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 13(14), 1939–49.
- Brown, M. D., Allen, J. C., Van Stavern, G. P., Newman, N. J., Wallace, D. C. (2001). Clinical, genetic, and biochemical characterization of a Leber hereditary optic neuropathy family containing both the 11778 and 14484 primary mutations. *American Journal of Medical Genetics*, 104(4), 331–8.
- Bruno, C., Martinuzzi, a, Tang, Y., Andreu, a L., Pallotti, F., Bonilla, E., Shanske, S., Fu, J., Sue, C. M., Angelini, C., DiMauro, S., Manfredi, G. (1999). A stop-codon mutation in the human mtDNA cytochrome c oxidase I gene disrupts the functional structure of complex IV. *American Journal of Human Genetics*, 65(3), 611–620.
- Bucki, R., Georges, P. C., Espinassous, Q., Funaki, M., Pastore, J. J., Chaby, R., Janmey, P. A. (2005). Inactivation of endotoxin by human plasma gelsolin. *Biochemistry*, 44(28), 9590–7.
- Bucki, R., Levental, I., Kulakowska, A., Janmey, P. A. (2008). Plasma Gelsolin: Function, Prognostic Value, and Potential Therapeutic Use. *Current Protein and Peptide Science*, 9(July 2016), 541–551.

## BIBLIOGRAFÍA

Budde, S. M. S., van den Heuvel, L. P. W. J., Janssen, A. J., Smeets, R. J. P., Buskens, C. A. F., DeMeirleir, L., Van Coster, R., Baethmann, M., Smeitink, J. A. M. (2000). Combined Enzymatic Complex I and III Deficiency Associated with Mutations in the Nuclear Encoded NDUFS4 Gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 275(1), 63–68.

Calvaruso, M. A., Smeitink, J., Nijtmans, L. (2008). Electrophoresis techniques to investigate defects in oxidative phosphorylation. *Methods (San Diego, Calif.)*, 46(4), 281–7.

Calvo, S. E., Compton, A. G., Hershman, S. G., Lim, S. C., Lieber, D. S., Tucker, E. J., Laskowski, A., Garone, C., Liu, S., Jaffe, D. B., Christodoulou, J., Fletcher, J. M., Bruno, D. L., Goldblatt, J., DiMauro, S., Thorburn, D. R., Mootha, V. K. (2012). Molecular Diagnosis of Infantile Mitochondrial Disease with Targeted Next-Generation Sequencing. *Science Translational Medicine*, 4(118), 118ra10-118ra10.

Calvo, S. E., Tucker, E. J., Compton, A. G., Kirby, D. M., Crawford, G., Burt, N. P., Rivas, M., Guiducci, C., Bruno, D. L., Goldberger, O. A., Redman, M. C., Wiltshire, E., Wilson, C. J., Altshuler, D., Gabriel, S. B., Daly, M. J., Thorburn, D. R., Mootha, V. K. (2010). High-throughput, pooled sequencing identifies mutations in NUBPL and FOXRED1 in human complex I deficiency. *Nature Genetics*, 42(10), 851–858.

Campos, Y., García-Redondo, A., Fernández-Moreno, M. A., Martínez-Pardo, M., Goda, G., Rubio, J. C., Martín, M. A., del Hoyo, P., Cabello, A., Bornstein, B., Garesse, R., Arenas, J. (2001). Early-onset multisystem mitochondrial disorder caused by a nonsense mutation in the mitochondrial DNA cytochrome C oxidase II gene. *Annals of Neurology*, 50(3), 409–13.

Canevari, L., Clark, J. B., Bates, T. E. (1999). beta-Amyloid fragment 25-35 selectively decreases complex IV activity in isolated mitochondria. *FEBS Letters*, 457(1), 131–4.

Carré, M., André, N., Carles, G., Borghi, H., Brichese, L., Briand, C., Braguer, D. (2002). Tubulin is an inherent component of mitochondrial membranes that interacts with the voltage-dependent anion channel. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(37), 33664–9.

Cassimeris, L., Silva, V. C., Miller, E., Ton, Q., Molnar, C., Fong, J. (2012). Fueled by microtubules: Does tubulin dimer/polymer partitioning regulate intracellular metabolism? *Cytoskeleton*, 69(3), 133–143.

- Chaban, Y., Boekema, E. J., Dudkina, N. V. (2014). Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilisation. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1837(4), 418–426.
- Chalmers, R. M., Brockington, M., Howard, R. S., Lecky, B. R., Morgan-Hughes, J. A., Harding, A. E. (1996). Mitochondrial encephalopathy with multiple mitochondrial DNA deletions: a report of two families and two sporadic cases with unusual clinical and neuropathological features. *Journal of the Neurological Sciences*, 143(1–2), 41–5.
- Chauhan, V., Ji, L., Chauhan, A. (2008). Anti-amyloidogenic, anti-oxidant and anti-apoptotic role of gelsolin in Alzheimer's disease. *Biogerontology*, 9(6), 381–389.
- Chen, C.-D. (2001). Furin initiates gelsolin familial amyloidosis in the Golgi through a defect in Ca<sup>2+</sup> stabilization. *The EMBO Journal*, 20(22), 6277–6287.
- Chen, Z.-Y., Wang, P.-W., Shieh, D.-B., Chiu, K.-Y., Liou, Y.-M. (2015). Involvement of gelsolin in TGF-beta 1 induced epithelial to mesenchymal transition in breast cancer cells. *Journal of Biomedical Science*, 22, 90.
- Chinnery, P. F. (2014). *Mitochondrial Disorders Overview*. GeneReviews®.
- Chomyn, A., Lai, S. T., Shakeley, R., Bresolin, N., Scarlato, G., Attardi, G. (1994). Platelet-mediated transformation of mtDNA-less human cells: analysis of phenotypic variability among clones from normal individuals--and complementation behavior of the tRNA<sup>Lys</sup> mutation causing myoclonic epilepsy and ragged red fibers. *American Journal of Human Genetics*, 54(6), 966–74.
- Christofidou-Solomidou, M., Scherpereel, A., Solomides, C. C., Muzykantov, V. R., Machtay, M., Albelda, S. M., DiNubile, M. J. (2002). Changes in plasma gelsolin concentration during acute oxidant lung injury in mice. *Lung*, 180(2), 91–104.
- Clark, K. M., Taylor, R. W., Johnson, M. A., Chinnery, P. F., Chrzanowska-Lightowlers, Z. M. A., Andrews, R. M., Nelson, I. P., Wood, N. W., Lamont, P. J., Hanna, M. G., Lightowlers, R. N., Turnbull, D. M. (1999). An mtDNA Mutation in the Initiation Codon of the Cytochrome C Oxidase Subunit II Gene Results in Lower Levels of the Protein and a Mitochondrial Encephalomyopathy. *The American Journal of Human Genetics*, 64(5), 1330–1339.
- Clayton, D. A. (1991). Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. *Annual Review of Cell Biology*, 7, 453–78.

## BIBLIOGRAFÍA

Cormier, V., Rotig, A., Tardieu, M., Colonna, M., Saudubray, J. M., Munnich, A. (1991). Autosomal dominant deletions of the mitochondrial genome in a case of progressive encephalomyopathy. *American Journal of Human Genetics*, 48(4), 643–8.

Cruciat, C. M., Hell, K., Fölsch, H., Neupert, W., Stuart, R. A. (1999). Bcs1p, an AAA-family member, is a chaperone for the assembly of the cytochrome bc(1) complex. *The EMBO Journal*, 18(19), 5226–33.

D'Aurelio, M., Gajewski, C. D., Lin, M. T., Mauck, W. M., Shao, L. Z., Lenaz, G., Moraes, C. T., Manfredi, G. (2004). Heterologous mitochondrial DNA recombination in human cells. *Human Molecular Genetics*, 13(24), 3171–9.

D'Aurelio, M., Pallotti, F., Barrientos, A., Gajewski, C. D., Kwong, J. Q., Bruno, C., Beal, M. F., Manfredi, G. (2001). In Vivo Regulation of Oxidative Phosphorylation in Cells Harboring a Stop-codon Mutation in Mitochondrial DNA-encoded Cytochrome c Oxidase Subunit I. *Journal of Biological Chemistry*, 276(50), 46925–46932.

De Coo, I. F., Renier, W. O., Ruitenbeek, W., Ter Laak, H. J., Bakker, M., Schägger, H., Van Oost, B. A., Smeets, H. J. (1999). A 4-base pair deletion in the mitochondrial cytochrome b gene associated with parkinsonism/MELAS overlap syndrome. *Annals of Neurology*, 45(1), 130–3.

De Corte, V., Bruyneel, E., Boucherie, C., Mareel, M., Vandekerckhove, J., Gettemans, J. (2002). Gelsolin-induced epithelial cell invasion is dependent on Ras-Rac signaling. *The EMBO Journal*, 21(24), 6781–90.

Demishtein-Zohary, K., Azem, A. (2016). The TIM23 mitochondrial protein import complex: function and dysfunction. *Cell and Tissue Research*.

DiMauro, S., & Hirano, M. (1993). MELAS. *GeneReviews*(®).

DiMauro, S., Tanji, K., Schon, E. A. (2012). The many clinical faces of cytochrome c oxidase deficiency. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 748, 341–57.

DiNubile, M. J., Stossel, T. P., Ljunghusen, O. C., Ferrara, J. L. M., Antin, J. H. (2002). Prognostic implications of declining plasma gelsolin levels after allogeneic stem cell transplantation. *Blood*, 100(13), 4367–71.

- Dosaka-Akita, H., Hommura, F., Fujita, H., Kinoshita, I., Nishi, M., Morikawa, T., Katoh, H., Kawakami, Y., Kuzumaki, N. (1998). Frequent loss of gelsolin expression in non-small cell lung cancers of heavy smokers. *Cancer Research*, 58(2), 322–7.
- Dudkina, N. V, Eubel, H., Keegstra, W., Boekema, E. J., Braun, H.-P. (2005). Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(9), 3225–9.
- Dudkina, N. V, Kudryashev, M., Stahlberg, H., Boekema, E. J. (2011). Interaction of complexes I, III, and IV within the bovine respirasome by single particle cryoelectron tomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(37), 15196–200.
- Dunbar, D. R., Moonie, P. A., Jacobs, H. T., Holt, I. J. (1995). Different cellular backgrounds confer a marked advantage to either mutant or wild-type mitochondrial genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(14), 6562–6.
- Eckert, B. S. (1986). Alteration of the distribution of intermediate filaments in PtK1 cells by acrylamide. II: Effect on the organization of cytoplasmic organelles. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 6(1), 15–24.
- Edmondson, D. E. (2014). Hydrogen peroxide produced by mitochondrial monoamine oxidase catalysis: biological implications. *Current Pharmaceutical Design*, 20(2), 155–60.
- Endo, T., & Yamano, K. (2010). Transport of proteins across or into the mitochondrial outer membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1803(6), 706–714.
- Eubel, H., Heinemeyer, J., Sunderhaus, S., Braun, H.-P. (2004). Respiratory chain supercomplexes in plant mitochondria. *Plant Physiology and Biochemistry : PPB / Société Française de Physiologie Végétale*, 42(12), 937–42.
- Fassone, E., Taanman, J.-W., Hargreaves, I. P., Sebire, N. J., Cleary, M. A., Burch, M., Rahman, S. (2011). Mutations in the mitochondrial complex I assembly factor NDUFAF1 cause fatal infantile hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of Medical Genetics*, 48(10), 691–697.
- Fellman, V. (2002). The GRACILE syndrome, a neonatal lethal metabolic disorder with iron overload. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, 29(3), 444–50.

## BIBLIOGRAFÍA

Fernandez-Vizarra, E., Bugiani, M., Goffrini, P., Carrara, F., Farina, L., Procopio, E., Donati, A., Uziel, G., Ferrero, I., Zeviani, M. (2007). Impaired complex III assembly associated with BCS1L gene mutations in isolated mitochondrial encephalopathy. *Human Molecular Genetics*, *16*(10), 1241–52.

Fernández-Vizarra, E., & Zeviani, M. (2015). Nuclear gene mutations as the cause of mitochondrial complex III deficiency. *Frontiers in Genetics*, *6*, 134.

Franklin-Tong, V. E., & Gourlay, C. W. (2008). A role for actin in regulating apoptosis/programmed cell death: evidence spanning yeast, plants and animals. *The Biochemical Journal*, *413*(3), 389–404.

Gaignard, P., Menezes, M., Schiff, M., Bayot, A., Rak, M., Ogier de Baulny, H., Su, C-H., Gilleron, M., Lombes, A., Abida, H., Tzagoloff, A., Riley, L., Cooper, S. T., Mina, K., Sivadurai, P., Davis, M. R., Allcock, R. J. N., Kresoje, N., Laing, N. G., Thorburn, D. R., Slama, A., Christodoulou, J., Rustin, P. (2013). Mutations in CYC1, encoding cytochrome c1 subunit of respiratory chain complex III, cause insulin-responsive hyperglycemia. *American Journal of Human Genetics*, *93*(2), 384–9.

Galluzzi, L., & Kroemer, G. (2007). Mitochondrial apoptosis without VDAC. *Nature Cell Biology*, *9*(5), 487–9.

Garesse, R., & Vallejo, C. G. (2001). Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. *Gene*, *263*(1–2), 1–16.

Geng, Y.-J., Azuma, T., Tang, J. X., Hartwig, J. H., Muszynski, M., Wu, Q., Libby, P., Kwiatkowski, D. J. (1998). Caspase-3-induced gelsolin fragmentation contributes to actin cytoskeletal collapse, nucleolysis, and apoptosis of vascular smooth muscle cells exposed to proinflammatory cytokines. *European Journal of Cell Biology*, *77*(4), 294–302.

Gentil, B. J., Minotti, S., Beange, M., Baloh, R. H., Julien, J.-P., Durham, H. D. (2012). Normal role of the low-molecular-weight neurofilament protein in mitochondrial dynamics and disruption in Charcot-Marie-Tooth disease. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *26*(3), 1194–203.

Ghezzi, D., Arzuffi, P., Zordan, M., Da Re, C., Lamperti, C., Benna, C., D'Adamo, P., Diodato, D., Costa, R., Mariotti, C., Uziel, G., Smiderle, C., Zeviani, M. (2011). Mutations in TTC19 cause mitochondrial complex III deficiency and neurological impairment in humans and flies. *Nature Genetics*, *43*(3), 259–263.



- Ghezzi, D., Goffrini, P., Uziel, G., Horvath, R., Klopstock, T., Lochmüller, H., D'Adamo, P., Gasparini, P., Strom, T. M., Prokisch, H., Invernizzi, F., Ferrero, I., Zeviani, M. (2009). SDHAF1, encoding a LYR complex-II specific assembly factor, is mutated in SDH-defective infantile leukoencephalopathy. *Nature Genetics*, 41(6), 654–656.
- Ghezzi, D., & Zeviani, M. (2012). Assembly Factors of Human Mitochondrial Respiratory Chain Complexes: Physiology and Pathophysiology (pp. 65–106).
- Gil-borlado, M. C., González-hoyuela, M., Blázquez, A., García-silva, M. T., Gabaldón, T., Manzanares, J., Vara, J., Martín, M. A., Seneca, S., Arenas, J., Ugalde, C. (2009). Mitochondrion Pathogenic mutations in the 5' untranslated region of BCS1L mRNA in mitochondrial complex III deficiency. *Mitochondrion*, 1–7.
- Gomez-Duran, A., Pacheu-Grau, D., Lopez-Gallardo, E., Diez-Sanchez, C., Montoya, J., Lopez-Perez, M. J., Ruiz-Pesini, E. (2010). Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups. *Human Molecular Genetics*, 19(17), 3343–3353.
- Gorman, G. S., Schaefer, A. M., Ng, Y., Gomez, N., Blakely, E. L., Alston, C. L., Feeney, C., Horvath, R., Yu-Wai-Man, P., Chinnery, P. F., Taylor, R. W., Turnbull, D. M., McFarland, R. (2015). Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. *Annals of Neurology*, 77(5), 753–9.
- Green, D. E., & Tzagoloff, A. (1966). The mitochondrial electron transfer chain. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 116(1), 293–304.
- Greijer, A. E., van der Groep, P., Kemming, D., Shvarts, A., Semenza, G. L., Meijer, G. A., van de Wiel, M. A., Belien, J. A. M., van Diest, P. J., van der Wall, E. (2005). Up-regulation of gene expression by hypoxia is mediated predominantly by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). *The Journal of Pathology*, 206(3), 291–304.
- Gruschke, S., Kehrein, K., Römpler, K., Gröne, K., Israel, L., Imhof, A., Herrmann, J. M., Ott, M. (2011). Cbp3–Cbp6 interacts with the yeast mitochondrial ribosomal tunnel exit and promotes cytochrome *b* synthesis and assembly. *The Journal of Cell Biology*, 193(6), 1101–1114.
- Gu, J., Wu, M., Guo, R., Yan, K., Lei, J., Gao, N., Yang, M. (2016). The architecture of the mammalian respirasome. *Nature*, 537(7622), 639–643.

## BIBLIOGRAFÍA

Güntert, A., Campbell, J., Saleem, M., O'Brien, D. P., Thompson, A. J., Byers, H. L., Ward, M. A., Lovestone, S. (2010). Plasma gelsolin is decreased and correlates with rate of decline in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 21(2), 585–96.

Guo, X.-C., Luo, B.-Y., Li, X.-F., Yang, D.-G., Zheng, X.-N., Zhang, K. (2011). Plasma gelsolin levels and 1-year mortality after first-ever ischemic stroke. *Journal of Critical Care*, 26(6), 608–12.

Haack, T. B., Danhauser, K., Haberberger, B., Hoser, J., Strecker, V., Boehm, D., Uziel, G., Lamantea, E., Invernizzi, F., Poulton, J., Rolinski, B., Iuso, A., Biskup, S., Schmidt, T., Mewes, H-W., Wittig, I., Meitinger, T., Zeviani, M., Prokisch, H. (2010). Exome sequencing identifies ACAD9 mutations as a cause of complex I deficiency. *Nature Genetics*, 42(12), 1131–1134.

Haas, R. H., Parikh, S., Falk, M. J., Russell, P., Wolf, N. I., Darin, N., Wong, L-J., Bruce, H., Naviaux, R. K. (2010). The In-Depth Evaluation of Suspected Mitochondrial Disease: The Mitochondrial Medicine Society's Committee on Diagnosis. *Mol Genet Metab*, 94(1), 16–37.

Haddad, J. G., Harper, K. D., Guoth, M., Pietra, G. G., Sanger, J. W. (1990). Angiopathic consequences of saturating the plasma scavenger system for actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(4), 1381–5.

Hanna, M. G., Nelson, I. P., Rahman, S., Lane, R. J. M., Land, J., Heales, S., Cooper, M. J., Schapira, A. H. V., Morgan-Hughes, J. A., Wood, N. W. (1998). Cytochrome c Oxidase Deficiency Associated with the First Stop-Codon Point Mutation in Human mtDNA. *The American Journal of Human Genetics*, 63(1), 29–36.

Hao, H.-X., Khalimonchuk, O., Schradars, M., Dephoure, N., Bayley, J.-P., Kunst, H., Devilee, P., Cremers, C. W. R. J., Schiffman, J. D., Bentz, B. G., Gygi, S. P., Winge, D. R., Kremer, H., Rutter, J. (2009). SDH5, a Gene Required for Flavination of Succinate Dehydrogenase, Is Mutated in Paraganglioma. *Science*, 325(5944), 1139–1142.

Hatch, A. L., Ji, W.-K., Merrill, R. A., Strack, S., Higgs, H. N. (2016). Actin filaments as dynamic reservoirs for Drp1 recruitment. *Molecular Biology of the Cell*.

Haut, S., Brivet, M., Touati, G., Rustin, P., Lebon, S., Garcia-Cazorla, A., Saudubray, J. M., Boutron, A., Legrand, A., Slama, A. (2003). A deletion in the human QP-C gene causes a complex III deficiency resulting in hypoglycaemia and lactic acidosis. *Human Genetics*, 113(2), 118–22.

- Hayashi, J., Ohta, S., Kikuchi, A., Takemitsu, M., Goto, Y., Nonaka, I. (1991). Introduction of disease-related mitochondrial DNA deletions into HeLa cells lacking mitochondrial DNA results in mitochondrial dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(23), 10614–8.
- He, M., Rutledge, S. L., Kelly, D. R., Palmer, C. A., Murdoch, G., Majumder, N., Nicholls, R. D., Pei, Z., Watkins, P. A., Vockley, J. (2007). A New Genetic Disorder in Mitochondrial Fatty Acid  $\beta$ -Oxidation: ACAD9 Deficiency. *The American Journal of Human Genetics*, 81(1), 87–103.
- Heinemeyer, J., Braun, H.-P., Boekema, E. J., Kouril, R. (2007). A structural model of the cytochrome C reductase/oxidase supercomplex from yeast mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(16), 12240–8.
- Hennon, S. W., Soman, R., Zhu, L., Dalbey, R. E. (2015). YidC/Alb3/Oxa1 Family of Insertases. *Journal of Biological Chemistry*, 290(24), 14866–14874.
- Hildenbeutel, M., Hegg, E. L., Stephan, K., Gruschke, S., Meunier, B., Ott, M. (2014). Assembly factors monitor sequential hemylation of cytochrome *b* to regulate mitochondrial translation. *The Journal of Cell Biology*, 205(4), 511–524.
- Hindricks, J., Ebert, T., Bachmann, A., Kralisch, S., Lössner, U., Kratzsch, J., Stolzenburg, J.-U., Dietel, A., Beige, J., Anders, M., Bast, I., Blüher, M., Stumvoll, M., Fasshauer, M. (2014). Serum levels of fibroblast growth factor-21 are increased in chronic and acute renal dysfunction. *Clinical Endocrinology*, 80(6), 918–24.
- Hinson, J. T., Fantin, V. R., Schönberger, J., Breivik, N., Siem, G., McDonough, B., Sharma, P., Keogh, I., Godinho, R., Santos, F., Esparza, A., Nicolau, Y., Selvaag, E., Cohen, B. H., Hoppel, C. L., Tranebjaer, L., Eavey, R. D., Seidman, J. G., Seidman, C. E. (2007). Missense mutations in the BCS1L gene as a cause of the Björnstad syndrome. *The New England Journal of Medicine*, 356(8), 809–19.
- Hinttala, R., Smeets, R., Moilanen, J. S., Ugalde, C., Uusimaa, J., Smeitink, J. A. M., Majamaa, K. (2006). Analysis of mitochondrial DNA sequences in patients with isolated or combined oxidative phosphorylation system deficiency. *Journal of Medical Genetics*, 43(11), 881–886.
- Hirko, A. C., Meyer, E. M., King, M. A., Hughes, J. A. (2007). Peripheral transgene expression of plasma gelsolin reduces amyloid in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 15(9), 1623–9.

## BIBLIOGRAFÍA

Hochman, J., Ferguson-Miller, S., Schindler, M. (1985). Mobility in the mitochondrial electron transport chain. *Biochemistry*, 24(10), 2509–16.

Hoefs, S. J. G., Dieteren, C. E. J., Distelmaier, F., Janssen, R. J. R. J., Epplen, A., Swarts, H. G. P., Forkink, M., Rodenburg, R. J., Nijtmans, L. G., Willems, P. H., Smeitink, J. A. M., van den Heuvel, L. P. (2008). NDUFA2 Complex I Mutation Leads to Leigh Disease. *The American Journal of Human Genetics*, 82(6), 1306–1315.

Hoefs, S. J. G., Dieteren, C. E. J., Rodenburg, R. J., Naess, K., Bruhn, H., Wibom, R., Wagena, E., Willems, P. H., Smeitink, J. A. M., Nijtmans, L. G., van den Heuvel, L. P. (2009). Baculovirus complementation restores a novel NDUFAF2 mutation causing complex I deficiency. *Human Mutation*, 30(7), E728-36.

Hoefs, S. J. G., van Spronsen, F. J., Lenssen, E. W. H., Nijtmans, L. G., Rodenburg, R. J., Smeitink, J. A. M., van den Heuvel, L. P. (2011). NDUFA10 mutations cause complex I deficiency in a patient with Leigh disease. *European Journal of Human Genetics*, 19(3), 270–274.

Hoekstra, A. S., & Bayley, J.-P. (2013). The role of complex II in disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1827(5), 543–51.

Horbay, R., & Bilyy, R. (2016). Mitochondrial dynamics during cell cycling. *Apoptosis*, 21(12), 1327–1335.

Horvath, R., Lochmüller, H., Stucka, R., Yao, J., Shoubridge, E. A., Kim, S.-H., Gerbitz, K-D., Jaksch, M. (2000). Characterization of Human SCO1 and COX17 Genes in Mitochondrial Cytochrome-c-Oxidase Deficiency. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 276(2), 530–533.

Hunte, C., Koepke, J., Lange, C., Rossmann, T., Michel, H. (2000). Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome bc<sub>1</sub> complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment. *Structure (London, England: 1993)*, 8(6), 669–84.

Indrieri, A., van Rahden, V. A., Tiranti, V., Morleo, M., Iaconis, D., Tammaro, R., D'Amato, I., Conte, I., Maystadt, I., Demuth, S., Zvulunov, A., Kutsche, K., Zeviani, M., Franco, B. (2012). Mutations in COX7B cause microphthalmia with linear skin lesions, an unconventional mitochondrial disease. *American Journal of Human Genetics*, 91(5), 942–9.

- Invernizzi, F., Tigano, M., Dallabona, C., Donnini, C., Ferrero, I., Cremonese, M., Ghezzi, D., Lamperti, C., Zeviani, M. (2013). A homozygous mutation in LYRM7/MZM1L associated with early onset encephalopathy, lactic acidosis, and severe reduction of mitochondrial complex III activity. *Human Mutation*, 34(12), 1619–22.
- Iwata, S., Lee, J. W., Okada, K., Lee, J. K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T. A., Ramaswamy, S Jap, B. K. (1998). Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex. *Science (New York, N.Y.)*, 281(5373), 64–71.
- Jaksch, M., Hofmann, S., Kleinle, S., Liechti-Gallati, S., Pongratz, D. E., Müller-Höcker, J., Jedele, K. B., Meitinger, T., Gerbitz, K. D. (1998). A systematic mutation screen of 10 nuclear and 25 mitochondrial candidate genes in 21 patients with cytochrome c oxidase (COX) deficiency shows tRNA(Ser)(UCN) mutations in a subgroup with syndromal encephalopathy. *Journal of Medical Genetics*, 35(11), 895–900.
- Jänicke, R. U., Ng, P., Sprengart, M. L., Porter, A. G. (1998). Caspase-3 is required for alpha-fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(25), 15540–5.
- Janmey, P. A., & Stossel, T. P. (1989). Gelsolin-polyphosphoinositide interaction. Full expression of gelsolin-inhibiting function by polyphosphoinositides in vesicular form and inactivation by dilution, aggregation, or masking of the inositol head group. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(9), 4825–31.
- Ji, L., Chauhan, A., Chauhan, V. (2008). Cytoplasmic gelsolin in pheochromocytoma-12 cells forms a complex with amyloid beta-protein. *Neuroreport*, 19(4), 463–6.
- Ji, L., Chauhan, A., Chauhan, V. (2010a). Calcium induces expression of cytoplasmic gelsolin in SH-SY5Y and HEK-293 cells. *Neurochemical Research*, 35(7), 1075–1082.
- Ji, L., Chauhan, A., Chauhan, V. (2010b). Upregulation of cytoplasmic gelsolin, an amyloid-beta-binding protein, under oxidative stress conditions: involvement of protein kinase C. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 19(3), 829–38.
- Kamada, S., Kusano, H., Fujita, H., Ohtsu, M., Koya, R. C., Kuzumaki, N., Tsujimoto, Y. (1998). A cloning method for caspase substrates that uses the yeast two-hybrid system: cloning of the antiapoptotic gene gelsolin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(15), 8532–7.

## BIBLIOGRAFÍA

Keightley, J. A., Anitori, R., Burton, M. D., Quan, F., Buist, N. R., Kennaway, N. G. (2000). Mitochondrial encephalomyopathy and complex III deficiency associated with a stop-codon mutation in the cytochrome b gene. *American Journal of Human Genetics*, 67(6), 1400–10.

Keightley, J. A., Hoffbuhr, K. C., Burton, M. D., Salas, V. M., Johnston, W. S. W., Penn, A. M. W., Buist, N. R.M., Kennaway, N. G. (1996). A microdeletion in cytochrome c oxidase (COX) subunit III associated with COX deficiency and recurrent myoglobinuria. *Nature Genetics*, 12(4), 410–416.

Keinan, N., Pahima, H., Ben-Hail, D., Shoshan-Barmatz, V. (2013). The role of calcium in VDAC1 oligomerization and mitochondria-mediated apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1833(7), 1745–1754.

Kim, C. S., Furuya, F., Ying, H., Kato, Y., Hanover, J. A., Cheng, S. (2007). Gelsolin: a novel thyroid hormone receptor-beta interacting protein that modulates tumor progression in a mouse model of follicular thyroid cancer. *Endocrinology*, 148(3), 1306–12.

King, M. P., & Attardi, G. (1989). Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science (New York, N.Y.)*, 246(4929), 500–3.

King, M. P., & Attardi, G. (1996). Isolation of human cell lines lacking mitochondrial DNA. *Methods in Enzymology*, 264, 304–13.

Kirby, D. M., Salemi, R., Sugiana, C., Ohtake, A., Parry, L., Bell, K. M., Kirk, Edwin P., Boneh, A., Taylor, R. W., Dahl, H-H. M., Ryan, M. T., Thorburn, D. R. (2004). NDUF5 mutations are a novel cause of lethal neonatal mitochondrial complex I deficiency. *Journal of Clinical Investigation*, 114(6), 837–845.

Kiselar, J. G., Janmey, P. A., Almo, S. C., Chance, M. R. (2003). Visualizing the Ca<sup>2+</sup>-dependent activation of gelsolin by using synchrotron footprinting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), 3942–7.

Koene, S., de Laat, P., van Tienoven, D. H., Vriens, D., Brandt, A. M., Sweep, F. C. G. J., Rodenburg, R. J. T., Donders, A. R. T., Janssen, M. C. H., Smeitink, J. A. M. (2014). Serum FGF21 levels in adult m.3243A>G carriers: Clinical implications. *Neurology*, 83(2), 125–133.

Komaki, H., Akanuma, J., Iwata, H., Takahashi, T., Mashima, Y., Nonaka, I., Goto, Y. (2003). A novel mtDNA C11777A mutation in Leigh syndrome. *Mitochondrion*, 2(4), 293–304.

Koopman, W. J. H., Nijtmans, L. G. J., Dieteren, C. E. J., Roestenberg, P., Valsecchi, F., Smeitink, J. A. M., Willems, P. H. G. M. (2010). Mammalian mitochondrial complex I: biogenesis, regulation, and reactive oxygen species generation. *Antioxidants & Redox Signaling*, *12*(12), 1431–70.

Korzeniewski, B. (2015). Effects of OXPHOS complex deficiencies and ESA dysfunction in working intact skeletal muscle: implications for mitochondrial myopathies. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1847*(10), 1310–9.

Kosola, S., Lampela, H., Gylling, H., Jalanko, H., Nissinen, M. J., Lauronen, J., Mäkisalo, H., Vaaralahti, K., Miettinen, T. A., Raivio, T., Pakarinen, M. P. (2012). Cholesterol Metabolism Altered and FGF21 Levels High After Pediatric Liver Transplantation Despite Normal Serum Lipids. *American Journal of Transplantation*, *12*(10), 2815–2824.

Kotarsky, H., Karikoski, R., Mörgelin, M., Marjavaara, S., Bergman, P., Zhang, D.-L., Smet, J., van Coster, R., Fellman, V. (2010). Characterization of complex III deficiency and liver dysfunction in GRACILE syndrome caused by a BCS1L mutation. *Mitochondrion*, *10*(5), 497–509.

Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T. J., Kirschner, M. W., Kohts, K., Kwiatkowski, D. J., Williams, L. T. (1997). Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science (New York, N.Y.)*, *278*(5336), 294–8.

Koya, R. C., Fujita, H., Shimizu, S., Ohtsu, M., Takimoto, M., Tsujimoto, Y., Kuzumaki, N. (2000). Gelsolin inhibits apoptosis by blocking mitochondrial membrane potential loss and cytochrome c release. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(20), 15343–15349.

Kühlbrandt, W. (2015). Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biology*, *13*(1), 89.

Kułakowska, A., Ciccarelli, N. J., Wen, Q., Mroczko, B., Drozdowski, W., Szmitkowski, M., Janmey, P. A., Bucki, R. (2010). Hypogelsolinemia, a disorder of the extracellular actin scavenger system, in patients with multiple sclerosis. *BMC Neurology*, *10*, 107.

Kulakowska, A., Drozdowski, W., Sadyński, A., Bucki, R., Janmey, P. A. (2008). Gelsolin concentration in cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis and other neurological disorders. *European Journal of Neurology*, *15*(6), 584–8.

## BIBLIOGRAFÍA

Kumar, V., Bouameur, J.-E., Bär, J., Rice, R. H., Hornig-Do, H.-T., Roop, D. R., Schwarz, N., Brodesser, S., Thiering, S., Leube, R. E., Wiesner, R. J., Vijayaraj, P., Brazel, C. B., Heller, S., Binder, H., Löffler-Wirth, H., Seibel, P., Magin, T. M. (2016). Correction: A keratin scaffold regulates epidermal barrier formation, mitochondrial lipid composition, and activity. *The Journal of Cell Biology*, 212(7), 877.

Kusano, H., Shimizu, S., Koya, R. C., Fujita, H., Kamada, S., Kuzumaki, N., Tsujimoto, Y. (2000). Human gelsolin prevents apoptosis by inhibiting apoptotic mitochondrial changes via closing VDAC. *Oncogene*, 19(42), 4807–14.

Kwiatkowski, D. J. (1999). Functions of gelsolin: motility , signaling , apoptosis , cancer, 103–108.

Kwiatkowski, D. J., Mehl, R., Yin, H. L. (1988). Genomic organization and biosynthesis of secreted and cytoplasmic forms of gelsolin. *The Journal of Cell Biology*, 106(2), 375–84.

Kwiatkowski, D. J., Stossel, T. P., Orkin, S. H., Mole, J. E., Colten, H. R., Yin, H. L. (1986). Plasma and cytoplasmic gelsolins are encoded by a single gene and contain a duplicated actin-binding domain. *Nature*, 323(6087), 455–8.

Lamantea, E., Carrara, F., Mariotti, C., Morandi, L., Tiranti, V., Zeviani, M. (2002). A novel nonsense mutation (Q352X) in the mitochondrial cytochrome b gene associated with a combined deficiency of complexes I and III. *Neuromuscular Disorders: NMD*, 12(1), 49–52.

Lapiente-Brun, E., Moreno-Loshuertos, R., Acín-Pérez, R., Latorre-Pellicer, A., Colás, C., Balsa, E., Perales-Clemente, E., Quirós, P. M., Calvo, E., Rodríguez-Hernández, M. A., Navas, P., Cruz, R., Carracedo, A., López-Otín, C., Pérez-Martos, A., Fernández-Silva, P., Fernández-Vizarra, E., Enríquez, J. A. (2013). Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science (New York, N.Y.)*, 340(6140), 1567–70.

Lee, P.-S., Drager, L. R., Stossel, T. P., Moore, F. D., Rogers, S. O. (2006). Relationship of plasma gelsolin levels to outcomes in critically ill surgical patients. *Annals of Surgery*, 243(3), 399–403.

Lee, P.-S., Sampath, K., Karumanchi, S. A., Tamez, H., Bhan, I., Isakova, T., Gutierrez, O. M., Wolf, M., Chang, Y., Stossel, T. P., Thadhani, R. (2009). Plasma gelsolin and circulating actin correlate with hemodialysis mortality. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 20(5), 1140–8.



- Lee, P.-S., Waxman, A. B., Cotich, K. L., Chung, S. W., Perrella, M. A., Stossel, T. P. (2007). Plasma gelsolin is a marker and therapeutic agent in animal sepsis. *Critical Care Medicine*, 35(3), 849–55.
- Lee, W. M., & Galbraith, R. M. (1992). The extracellular actin-scavenger system and actin toxicity. *The New England Journal of Medicine*, 326(20), 1335–41.
- Legros, F., Chatzoglou, E., Frachon, P., Ogier De Baulny, H., Laforêt, P., Jardel, C., Godinot, C., Lombès, A. (2001). Functional characterization of novel mutations in the human cytochrome b gene. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 9(7), 510–8.
- Lemarie, A., & Grimm, S. (2009). Mutations in the heme b-binding residue of SDHC inhibit assembly of respiratory chain complex II in mammalian cells. *Mitochondrion*, 9(4), 254–60.
- Lenaz, G., & Genova, M. L. (2010). Structure and organization of mitochondrial respiratory complexes: a new understanding of an old subject. *Antioxidants & Redox Signaling*, 12(8), 961–1008.
- Lennicke, C., Rahn, J., Lichtenfels, R., Wessjohann, L. A., Seliger, B. (2015). Hydrogen peroxide - production, fate and role in redox signaling of tumor cells. *Cell Communication and Signaling: CCS*, 13, 39.
- Letts, J. A., Fiedorczuk, K., Sazanov, L. A. (2016). The architecture of respiratory supercomplexes. *Nature*, 537(7622), 644–648.
- Li, G. H., Arora, P. D., Chen, Y., McCulloch, C. A., Liu, P. (2012). Multifunctional roles of gelsolin in health and diseases. *Medicinal Research Reviews*, 32(5), 999–1025.
- Li, G. H., Shi, Y., Chen, Y., Sun, M., Sader, S., Maekawa, Y., Arab, S., Dawood, F., Chen, M., De Couto, G., Liu, Y., Fukuoka, M., Yang, S., Da Shi, M., Kirshenbaum, L. A., McCulloch, C. A., Liu, P. (2009). Gelsolin regulates cardiac remodeling after myocardial infarction through DNase I-mediated apoptosis. *Circulation Research*, 104(7), 896–904.
- Li, Q., Ye, Z., Wen, J., Ma, L., He, Y., Lian, G., Wang, Z., Wei, L., Wu, D., Jiang, B. (2009). Gelsolin, but not its cleavage, is required for TNF-induced ROS generation and apoptosis in MCF-7 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 385(2), 284–289.

## BIBLIOGRAFÍA

Lin, Y., Xiao, Y., Zhu, H., Xu, Q., Qi, L., Wang, Y., Li, X., Zheng, M., Zhong, R., Zhang, Y., Xu, X., Wu, B., Xu, Z., Lu, X. (2014). Serum Fibroblast Growth Factor 21 Levels Are Correlated with the Severity of Diabetic Retinopathy. *Journal of Diabetes Research*, 2014, 1–6.

Liu, S. Q., Tefft, B. J., Roberts, D. T., Zhang, L.-Q., Ren, Y., Li, Y. C., Huang, Y., Zhang, D., Phillips, H. R., Wu, Y. H. (2012). Cardioprotective proteins upregulated in the liver in response to experimental myocardial ischemia. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, 303(12), H1446–H1458.

Loeffen, J., Elpeleg, O., Smeitink, J., Smeets, R., Stöckler-Ipsiroglu, S., Mandel, H., Sengers, R. C., Trijbels, F., van den Heuvel, L. (2001). Mutations in the complex I NDUFS2 gene of patients with cardiomyopathy and encephalomyopathy. *Annals of Neurology*, 49(2), 195–201.

Loeffen, J., Smeets, R., Smeitink, J., Ruitenbeek, W., Janssen, A., Mariman, E., Sengers, R. C., Trijbels, F., van den Heuvel, L. (1998). The X-chromosomal NDUFA1 gene of complex I in mitochondrial encephalomyopathies: tissue expression and mutation detection. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 21(3), 210–5.

Loeffen, J., Smeitink, J., Triepels, R., Smeets, R., Schuelke, M., Sengers, R., Trijbels, F., Hamel, B., Mullaart, R., van den Heuvel, L. (1998). The First Nuclear-Encoded Complex I Mutation in a Patient with Leigh Syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, 63(6), 1598–1608.

Lonlay, P. De, Valnot, I., Barrientos, A., Gorbatyuk, M., Tzagoloff, A., Taanman, W., Benayoun, E., Chrétien, D., Kadhom, N., Lombès, A., Baulny, O., Niaudet, P., Munnich, A., Rustin, P., Rötig, A. (2001). A mutant mitochondrial respiratory chain assembly protein causes complex III deficiency in patients with tubulopathy, encephalopathy and liver failure, 29(september), 57–60.

Malka, F., Guillery, O., Cifuentes-Diaz, C., Guillou, E., Belenguer, P., Lombès, A., Rojo, M. (2005). Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes. *EMBO Reports*, 6(9), 853–859.

Mancuso, M., Filosto, M., Bosetti, F., Ceravolo, R., Rocchi, A., Tognoni, G., Manca, M. L., Solaini, G., Siciliano, G., Murri, L. (2003). Decreased platelet cytochrome c oxidase activity is accompanied by increased blood lactate concentration during exercise in patients with Alzheimer disease. *Experimental Neurology*, 182(2), 421–6.

Mancuso, M., Orsucci, D., Coppedè, F., Nesti, C., Choub, A., Siciliano, G. (2009). Diagnostic approach to mitochondrial disorders: the need for a reliable biomarker. *Current Molecular Medicine*, 9(9), 1095–107.

- Mannherz, H. G., Peitsch, M. C., Zanotti, S., Paddenberg, R., Polzar, B. (1995). A new function for an old enzyme: the role of DNase I in apoptosis. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 198, 161–74.
- Marín-Buera, L., García-Bartolomé, A., Morán, M., López-Bernardo, E., Cadenas, S., Hidalgo, B., Sánchez, R., Séneca, S., Arenas, J., Martín, M. A., Ugalde, C. (2015). Differential proteomic profiling unveils new molecular mechanisms associated with mitochondrial complex III deficiency. *Journal of Proteomics*, 113, 38–56.
- Maranzana, E., Barbero, G., Falasca, A. I., Lenaz, G., Genova, M. L. (2013). Mitochondrial Respiratory Supercomplex Association Limits Production of Reactive Oxygen Species from Complex I. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(13), 1469–1480.
- Massa, V., Fernandez-Vizarra, E., Alshahwan, S., Bakhsh, E., Goffrini, P., Ferrero, I., Mereghetti, P., D'Adamo, P., Gasparini, P., Zeviani, M. (2008). Severe infantile encephalomyopathy caused by a mutation in COX6B1, a nucleus-encoded subunit of cytochrome c oxidase. *American Journal of Human Genetics*, 82(6), 1281–9.
- Matsuoka, Y., Saito, M., LaFrancois, J., Saito, M., Gaynor, K., Olm, V., Wang, L., Casey, E., Lu, Y., Shiratori, C., Lemere, C., Duff, K. (2003). Novel therapeutic approach for the treatment of Alzheimer's disease by peripheral administration of agents with an affinity to beta-amyloid. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(1), 29–33.
- Maury, C. P. (1991). Gelsolin-related amyloidosis. Identification of the amyloid protein in Finnish hereditary amyloidosis as a fragment of variant gelsolin. *Journal of Clinical Investigation*, 87(4), 1195–1199.
- McCommis, K. S., & Baines, C. P. (2012). The role of VDAC in cell death: Friend or foe? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1818(6), 1444–1450.
- McFarland, R., Kirby, D. M., Fowler, K. J., Ohtake, A., Ryan, M. T., Amor, D. J., Fletcher, Janice M., Dixon, J. W., Collins, F. A., Turnbull, D. M., Taylor, R. W., Thorburn, D. R. (2004). De novo mutations in the mitochondrialND3 gene as a cause of infantile mitochondrial encephalopathy and complex I deficiency. *Annals of Neurology*, 55(1), 58–64.

## BIBLIOGRAFÍA

McKenzie, M., Tucker, E. J., Compton, A. G., Lazarou, M., George, C., Thorburn, D. R., Ryan, M. T. (2011). Mutations in the Gene Encoding C8orf38 Block Complex I Assembly by Inhibiting Production of the Mitochondria-Encoded Subunit ND1. *Journal of Molecular Biology*, 414(3), 413–426.

McLaughlin, P. J., Gooch, J. T., Mannherz, H. G., Weeds, A. G. (1993). Structure of gelsolin segment 1-actin complex and the mechanism of filament severing. *Nature*, 364(6439), 685–92.

Medja, F., Allouche, S., Frachon, P., Jardel, C., Malgat, M., de Camaret, B. M., Slama, A., Lunardi, J., Mazat, J.P., Lombès, A. (2009). Development and implementation of standardized respiratory chain spectrophotometric assays for clinical diagnosis. *Mitochondrion*, 9(5), 331–339.

Meerschaert, K., De Corte, V., De Ville, Y., Vandekerckhove, J., Gettemans, J. (1998). Gelsolin and functionally similar actin-binding proteins are regulated by lysophosphatidic acid. *The EMBO Journal*, 17(20), 5923–32.

Meirleir, L. De, Seneca, S., Damis, E., Sepulchre, B., Hoorens, A., Gerlo, E., Marti, E., Lissens, W., Coster, R. Van. (2003). Clinical and Diagnostic Characteristics of Complex III Deficiency Due to Mutations in the BCS1L Gene, 131, 126–131.

Menezes, M. J., Riley, L. G., Christodoulou, J. (2014). Mitochondrial respiratory chain disorders in childhood: Insights into diagnosis and management in the new era of genomic medicine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(4), 1368–1379.

Merante, F., Petrova-Benedict, R., MacKay, N., Mitchell, G., Lambert, M., Morin, C., De Braekeleer, M., Laframboise, R., Gagné, R., Robinson, B. H. (1993). A biochemically distinct form of cytochrome oxidase (COX) deficiency in the Saguenay-Lac-Saint-Jean region of Quebec. *American Journal of Human Genetics*, 53(2), 481–7.

Minauro-Sanmiguel, F., Wilkens, S., García, J. J. (2005). Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: novel F0 bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(35), 12356–12358.

Mitchell, P. (1976). Possible molecular mechanisms of the protonmotive function of cytochrome systems. *Journal of Theoretical Biology*, 62(2), 327–67.

- Miyake, N., Yano, S., Sakai, C., Hatakeyama, H., Matsushima, Y., Shiina, M., Watanabe, Y., Bartley, J., Abdenur, J. E., Wang, R. Y., Chang, R., Tsurusaki, Y., Doi, H., Nakashima, M., Saitsu, H., Ogata, K., Goto, Y., Matsumoto, N. (2013). Mitochondrial complex III deficiency caused by a homozygous UQCRC2 mutation presenting with neonatal-onset recurrent metabolic decompensation. *Human Mutation*, *34*(3), 446–52.
- Miyamoto, S., & Wu, J. M. (1990). Effect of staurosporine on the induction of actin/gelsolin in PMA-treated HL-60 cells. *Biochemistry International*, *22*(3), 427–33.
- Moore, A. S., Wong, Y. C., Simpson, C. L., Holzbaur, E. L. F. (2016). Dynamic actin cycling through mitochondrial subpopulations locally regulates the fission–fusion balance within mitochondrial networks. *Nature Communications*, *7*, 12886.
- Mootha, V. K., Lepage, P., Miller, K., Bunkenborg, J., Reich, M., Hjerrild, M., Delmonte, T., Villeneuve, A., Sladek, R., Xu, F., Mitchell, G. A., Morin, C., Mann, M., Hudson, T. J. Robinson, B., Rioux, J. D., Lander, E. S. (2003). Identification of a gene causing human cytochrome c oxidase deficiency by integrative genomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(2), 605–10.
- Morán, M., Marín-Buera, L., Carmen Gil-Borlado, M., Rivera, H., Blázquez, A., Seneca, S., Vázquez-López, M., Martín, M. A., Arenas, J., Ugalde, C. (2010). Cellular pathophysiological consequences of BCS1L mutations in mitochondrial complex III enzyme deficiency. *Human Mutation*, *31*(8), 930–941.
- Morava, E., van den Heuvel, L., Hol, F., de Vries, M. C., Hogeveen, M., Rodenburg, R. J., Smeitink, J. A. M. (2006). Mitochondrial disease criteria: Diagnostic applications in children. *Neurology*, *67*(10), 1823–1826.
- Moreno-Lastres, D., Fontanesi, F., García-Consuegra, I., Martín, M. A., Arenas, J., Barrientos, A., Ugalde, C. (2012). Mitochondrial complex I plays an essential role in human respirasome assembly. *Cell Metabolism*, *15*(3), 324–335.
- Morin, C., Mitchell, G., Larochelle, J., Lambert, M., Ogier, H., Robinson, B. H., De Braekeleer, M. (1993). Clinical, metabolic, and genetic aspects of cytochrome C oxidase deficiency in Saguenay-Lac-Saint-Jean. *American Journal of Human Genetics*, *53*(2), 488–96.
- Morris, R. L., & Hollenbeck, P. J. (1995). Axonal transport of mitochondria along microtubules and F-actin in living vertebrate neurons. *The Journal of Cell Biology*, *131*(5), 1315–26.

## BIBLIOGRAFÍA

Mose-Larsen, P., Bravo, R., Fey, S. J., Small, J. V., Celis, J. E. (1982). Putative association of mitochondria with a subpopulation of intermediate-sized filaments in cultured human skin fibroblasts. *Cell*, 31(3 Pt 2), 681–92.

Mounzer, K. C., Moncure, M., Smith, Y. R., Dinubile, M. J. (1999). Relationship of admission plasma gelsolin levels to clinical outcomes in patients after major trauma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 160(5 Pt 1), 1673–81.

Mourmans, J., Wendel, U., Bentlage, H. A., Trijbels, J. M., Smeitink, J. A., de Coo, I. F., Gabreëls, F. J., Sengers, R. C., Ruitenbeek, W. (1997). Clinical heterogeneity in respiratory chain complex III deficiency in childhood. *Journal of the Neurological Sciences*, 149(1), 111–7.

Nag, S., Ma, Q., Wang, H., Chumnarnsilpa, S., Lee, W. L., Larsson, M., Kannan, B., Hernandez-Valladares, M., Burtnick, L. D., Robinson, R. C. (2009). Ca<sup>2+</sup> binding by domain 2 plays a critical role in the activation and stabilization of gelsolin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(33), 13713–8.

Nakada, K., Inoue, K., Hayashi, J. (2001). Interaction theory of mammalian mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 288(4), 743–6.

Nass, M. M., & Nass, S. (1963). Intramitochondrial fibers with dna characteristics. i. fixation and electron staining reactions. *The Journal of Cell Biology*, 19, 593–611.

Nekrasova, O. E., Mendez, M. G., Chernouvanenko, I. S., Tyurin-Kuzmin, P. A., Kuczmariski, E. R., Gelfand, V. I., Goldman, R. D., Minin, A. A. (2011). Vimentin intermediate filaments modulate the motility of mitochondria. *Molecular Biology of the Cell*, 22(13), 2282–9.

Neupert, W. (2015). A Perspective on Transport of Proteins into Mitochondria: A Myriad of Open Questions. *Journal of Molecular Biology*, 427(6), 1135–1158.

Niemann, S., & Müller, U. (2000). Mutations in SDHC cause autosomal dominant paraganglioma, type 3. *Nature Genetics*, 26(3), 268–70.

Nijtmans, L. G. J., Henderson, N. S., Holt, I. J. (2002). Blue Native electrophoresis to study mitochondrial and other protein complexes. *Methods (San Diego, Calif.)*, 26(4), 327–34.

- Nishimura, K., Ting, H.-J., Harada, Y., Tokizane, T., Nonomura, N., Kang, H.-Y., Chang, H.-C., Yeh, S., Miyamoto, H., Shin, M., Aozasa, K., Okuyama, A., Chang, C. (2003). Modulation of androgen receptor transactivation by gelsolin: a newly identified androgen receptor coregulator. *Cancer Research*, *63*(16), 4888–94.
- Nobrega, F. G., Nobrega, M. P., Tzagoloff, A. (1992). BCS1, a novel gene required for the expression of functional Rieske iron-sulfur protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, *11*(11), 3821–9.
- Nobrega, F. G., & Tzagoloff, A. (1980). Assembly of the mitochondrial membrane system. DNA sequence and organization of the cytochrome b gene in *Saccharomyces cerevisiae* D273-10B. *The Journal of Biological Chemistry*, *255*(20), 9828–37.
- Noskov, S. Y., Rostovtseva, T. K., Chamberlin, A. C., Teijido, O., Jiang, W., Bezrukov, S. M. (2016). Current state of theoretical and experimental studies of the voltage-dependent anion channel (VDAC). *Biochimica et Biophysica Acta*, *1858*(7), 1778–1790.
- Nouws, J., Nijtmans, L. G. J., Smeitink, J. A., Vogel, R. O. (2012). Assembly factors as a new class of disease genes for mitochondrial complex I deficiency: cause, pathology and treatment options. *Brain*, *135*(1), 12–22.
- Ohtsu, M., Sakai, N., Fujita, H., Kashiwagi, M., Gasa, S., Shimizu, S., Eguchi, Y., Tsujimoto, Y., Sakiyama, Y., Kobayashi, K., Kuzumaki, N. (1997). Inhibition of apoptosis by the actin-regulatory protein gelsolin. *EMBO Journal*, *16*(15), 4650–4656.
- Osborn, T. M., Verdrengh, M., Stossel, T. P., Tarkowski, A., Bokarewa, M. (2008). Decreased levels of the gelsolin plasma isoform in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, *10*(5), R117.
- Papadopoulou, L. C., Sue, C. M., Davidson, M. M., Tanji, K., Nishino, I., Sadlock, J. E., Krishna, S., Walker, W., Selby, J., Glerum, D. M., Coster, R. V., Lyon, G., Scalais, E., Lebel, R., Kaplan, P., Shanske, S., De Vivo, D. C., Bonilla, E., Hirano, M., DiMauro, S., Schon, E. A. (1999). Fatal infantile cardioencephalomyopathy with COX deficiency and mutations in *SCO2*, a COX assembly gene. *Nature Genetics*, *23*(3), 333–7.
- Parfait, B., Chretien, D., Rötig, A., Marsac, C., Munnich, A., Rustin, P. (2000). Compound heterozygous mutations in the flavoprotein gene of the respiratory chain complex II in a patient with Leigh syndrome. *Human Genetics*, *106*(2), 236–43.

## BIBLIOGRAFÍA

Paumard, P., Vaillier, J., Couly, B., Schaeffer, J., Soubannier, V., Mueller, D. M., Brèthes, D., Di Rago, J. P., Velours, J. (2002). The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO Journal*, 21(3), 221–230.

Peddada, N., Sagar, A., & Garg, R. (2012). Plasma gelsolin: A general prognostic marker of health. *Medical Hypotheses*, 78(2), 203–210.

Pello, R., Martin, M. A., Carelli, V., Nijtmans, L. G., Achilli, A., Pala, M., Torroni, A., Gomez-Duran, A., Ruiz-Pesini, E., Martinuzzi, A., Smeitink, J. A., Arenas, J., Ugalde, C. (2008). Mitochondrial DNA background modulates the assembly kinetics of OXPHOS complexes in a cellular model of mitochondrial disease. *Human Molecular Genetics*, 17(24), 4001–4011.

Prasad, S. C., Thraves, P. J., Dritschilo, A., Kuettel, M. R. (n.d.). Protein expression changes associated with radiation-induced neoplastic progression of human prostate epithelial cells. *Electrophoresis*, 18(3–4), 629–37.

Qiao, H., Koya, R. C., Nakagawa, K., Tanaka, H., Fujita, H., Takimoto, M., Kuzumaki, N. (2005). Inhibition of Alzheimer's amyloid- $\beta$  peptide-induced reduction of mitochondrial membrane potential and neurotoxicity by gelsolin. *Neurobiology of Aging*, 26(6), 849–855.

Rahman, S., Blok, R. B., Dahl, H. H., Danks, D. M., Kirby, D. M., Chow, C. W., Christodoulou, J., Thorburn, D. R. (1996). Leigh syndrome: clinical features and biochemical and DNA abnormalities. *Annals of Neurology*, 39(3), 343–51.

Rahman, S., Taanman, J.-W., Cooper, J. M., Nelson, I., Hargreaves, I., Meunier, B., Hanna, Michael G., García, J. J., Capaldi, R. A., Lake, B. D., Leonard, J. V., Schapira, A. H. V. (1999). A Missense Mutation of Cytochrome Oxidase Subunit II Causes Defective Assembly and Myopathy. *The American Journal of Human Genetics*, 65(4), 1030–1039.

Rampelt, H., Zerbes, R. M., van der Laan, M., Pfanner, N. (2016). Role of the mitochondrial contact site and cristae organizing system in membrane architecture and dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*.

Rana, M., De Coo, I., Diaz, F., Smeets, H., Moraes, C. T. (2000). An out-of-frame cytochrome b gene deletion from a patient with parkinsonism is associated with impaired complex III assembly and an increase in free radical production. *Annals of Neurology*, 48(5), 774–781.



- Rana, T. M. (2007). Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(1), 23–36.
- Redza-Dutordoir, M., & Averill-Bates, D. A. (2016). Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*.
- Reichert, A. S., & Neupert, W. (2004). Mitochondriomics or what makes us breathe. *Trends in Genetics*, 20(11), 555–562.
- Reid, R. A., Moyle, J., Mitchell, P. (1966). Synthesis of adenosine triphosphate by a protonmotive force in rat liver mitochondria. *Nature*, 212(5059), 257–8.
- Rithidech, K. N., Honikel, L., Milazzo, M., Madigan, D., Troxell, R., Krupp, L. B. (2009). Protein expression profiles in pediatric multiple sclerosis: potential biomarkers. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 15(4), 455–64.
- Roman, I., Figys, J., Steurs, G., Zizi, M. (2006). Direct measurement of VDAC–actin interaction by surface plasmon resonance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758(4), 479–486.
- Rostovtseva, T. K., Sheldon, K. L., Hassanzadeh, E., Monge, C., Saks, V., Bezrukov, S. M., Sackett, D. L. (2008). Tubulin binding blocks mitochondrial voltage-dependent anion channel and regulates respiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(48), 18746–18751.
- Rustin, P., & Rötig, A. (2002). Inborn errors of complex II—unusual human mitochondrial diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1553(1–2), 117–22.
- Ruzzenente, B., Metodiev, M. D., Wredenberg, A., Bratic, A., Park, C. B., Cámara, Y., Milenkovic, D., Zickermann, V., Wibom, R., Hultenby, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Brandt, U., Stewart, J. B., Gustafsson, C. M., Larsson, N.-G. (2012). LRPPRC is necessary for polyadenylation and coordination of translation of mitochondrial mRNAs. *The EMBO Journal*, 31(2), 443–456.
- Saada, A., Vogel, R. O., Hoefs, S. J., van den Brand, M. A., Wessels, H. J., Willems, P. H., Venselaar, H., Shaag, A., Barghuti, F., Reish, O., Shohat, M., Huynen, M. A., Smeitink, J. A. M., van den Heuvel, L. P., Nijtmans, L. G. (2009). Mutations in NDUFAF3 (C3ORF60), Encoding an NDUFAF4 (C6ORF66)-Interacting Complex I Assembly Protein, Cause Fatal Neonatal Mitochondrial Disease. *The American Journal of Human Genetics*, 84(6), 718–727.

## BIBLIOGRAFÍA

Sagawa, N., Fujita, H., Banno, Y., Nozawa, Y., Katoh, H., Kuzumaki, N. (2003). Gelsolin suppresses tumorigenicity through inhibiting PKC activation in a human lung cancer cell line, PC10. *British Journal of Cancer*, 88(4), 606–12.

Sambrook, J. y Russell, D.W. (2001). Molecular cloning, a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*.

Sampson, E. R., Yeh, S. Y., Chang, H. C., Tsai, M. Y., Wang, X., Ting, H. J., Chang, C. (2001). Identification and characterization of androgen receptor associated coregulators in prostate cancer cells. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 15(2), 123–9.

Saxton, W. M., Hollenbeck, P. J., Adams, R. J., Akhmanova, A., Hammer, J. A., Ally, S., ... Senderek, J. (2012). The axonal transport of mitochondria. *Journal of Cell Science*, 125(Pt 9), 2095–104.

Schäfer, E., Seelert, H., Reifschneider, N. H., Krause, F., Dencher, N. A., Vonck, J. (2006). Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(22), 15370–5.

Schägger, H., de Coo, R., Bauer, M. F., Hofmann, S., Godinot, C., Brandt, U. (2004). Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(35), 36349–53.

Schägger, H., & Pfeiffer, K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *The EMBO Journal*, 19(8), 1777–83.

Scheffler (1999). Mitochondria (New York, *John Wiley&Sons, Inc*).

Schuelke, M., Smeitink, J., Mariman, E., Loeffen, J., Plecko, B., Trijbels, F., Stöckler-Ipsiroglu, S., van den Heuvel, L. (1999). Mutant NDUFV1 subunit of mitochondrial complex I causes leukodystrophy and myoclonic epilepsy. *Nature Genetics*, 21(3), 260–1.

Schwarz, N., & Leube, R. (2016). Intermediate Filaments as Organizers of Cellular Space: How They Affect Mitochondrial Structure and Function. *Cells*, 5(3), 30.

Schwarz, T. L. (2013). Mitochondrial Trafficking in Neurons. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(6), a011304–a011304.

- Serrander, L., Skarman, P., Rasmussen, B., Witke, W., Lew, D. P., Krause, K. H., Stendahl, O., Nüsse, O. (2000). Selective inhibition of IgG-mediated phagocytosis in gelsolin-deficient murine neutrophils. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 165(5), 2451–7.
- Sheng, Z.-H. (2014). Mitochondrial trafficking and anchoring in neurons: New insight and implications. *The Journal of Cell Biology*, 204(7), 1087–98.
- Siciliano, G., Volpi, L., Piazza, S., Ricci, G., Mancuso, M., Murri, L. (2007). Functional Diagnostics in Mitochondrial Diseases. *Bioscience Reports*, 27(1–3), 53–67.
- Smethurst, D. G. J., Dawes, I. W., Gourlay, C. W. (2014). Actin - a biosensor that determines cell fate in yeasts. *FEMS Yeast Research*, 14(1), 89–95.
- Smith, D. B., Janmey, P. A., Sherwood, J. A., Howard, R. J., Lind, S. E. (1988). Decreased plasma gelsolin levels in patients with Plasmodium falciparum malaria: a consequence of hemolysis? *Blood*, 72(1), 214–8.
- Solano, A., Roig, M., Vives-Bauza, C., Hernandez-Peña, J., Garcia-Arumi, E., Playan, A., Lopez-Perez, M. J., Andreu, A. L., Montoya, J. (2003). Bilateral striatal necrosis associated with a novel mutation in the mitochondrial ND6 gene. *Annals of Neurology*, 54(4), 527–530.
- Spinazzi, M., Casarin, A., Pertegato, V., Salviati, L., Angelini, C. (2012). Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nature Protocols*, 7(6), 1235–1246.
- Su, S.-L., Wang, W.-F., Wu, S.-L., Wu, H.-M., Chang, J.-C., Huang, C.-S., Cheng, W.-L., Soong, B.-W., Lee, Y.-C., Li, J.-Y., Kuo, S.-J., Chen, M., Huang, C.-N., Liu, C.-S. (2012). FGF21 in ataxia patients with spinocerebellar atrophy and mitochondrial disease. *Clinica Chimica Acta*, 414, 225–227.
- Sugiana, C., Pagliarini, D. J., McKenzie, M., Kirby, D. M., Salemi, R., Abu-Amero, K. K., Dahl, H.-H. M., Hutchison, W. M., Vascotto, K. A., Smith, S. M., Newbold, R. F., Christodoulou, J., Calvo, S., Mootha, V. K., Ryan, M. T., Thorburn, D. R. (2008). Mutation of C20orf7 Disrupts Complex I Assembly and Causes Lethal Neonatal Mitochondrial Disease. *The American Journal of Human Genetics*, 83(4), 468–478.
- Suhler, E., Lin, W., Yin, H. L., Lee, W. M. (1997). Decreased plasma gelsolin concentrations in acute liver failure, myocardial infarction, septic shock, and myonecrosis. *Critical Care Medicine*, 25(4), 594–8.

## BIBLIOGRAFÍA

Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., Bartlam, M., Rao, Z. (2005). Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell*, 121(7), 1043–57.

Sun, H. Q., Yamamoto, M., Mejillano, M., Yin, H. L. (1999). Gelsolin, a multifunctional actin regulatory protein. *Journal of Biological Chemistry*, 274(47), 33179–33182.

Sun, H. q, Lin, K. m, Yin, H. L. (1997). Gelsolin modulates phospholipase C activity in vivo through phospholipid binding. *The Journal of Cell Biology*, 138(4), 811–20.

Suomalainen, A. (2011). Biomarkers for mitochondrial respiratory chain disorders. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 34(2), 277–282.

Suomalainen, A., Elo, J. M., Pietiläinen, K. H., Hakonen, A. H., Sevastianova, K., Korpela, M., Isohanni, P., Marjavaara, S. K., Tyni, T., Kiuru-Enari, S., Pihko, H., Darin, N., Öunap, K., Kluijtmans, L. A. J., Paetau, A., Buzkova, J., Bindoff, L. A., Annunen-Rasila, J., Uusimaa, J., Rissanen, A., Yki-Järvinen, H., Hirano, M., Tulinius, M., Smeitink, J., Tyynismaa, H. (2011). FGF-21 as a biomarker for muscle-manifesting mitochondrial respiratory chain deficiencies: a diagnostic study. *The Lancet Neurology*, 10(9), 806–818.

Sutovsky, P., Moreno, R. D., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C., Schatten, G. (2000). Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos. *Biology of Reproduction*, 63(2), 582–90.

Swerdlow, R. H. (2007). Mitochondria in cybrids containing mtDNA from persons with mitochondrialopathies. *Journal of Neuroscience Research*, 85(15), 3416–28.

Tajeddine, N., Galluzzi, L., Kepp, O., Hangen, E., Morselli, E., Senovilla, L., Araujo, N., Pinna, G., Larochette, N., Zamzami, N., Modjtahedi, N., Harel-Bellan, A., Kroemer, G. (2008). Hierarchical involvement of Bak, VDAC1 and Bax in cisplatin-induced cell death. *Oncogene*, 27(30), 4221–4232.

Tamiya, G., Makino, S., Hayashi, M., Abe, A., Numakura, C., Ueki, M., Tanaka, A., Ito, C., Toshimori, K., Ogawa, N., Terashima, T., Maegawa, H., Yanagisawa, D., Tooyama, I., Tada, M., Onodera, O., Hayasaka, K. (2014). A mutation of COX6A1 causes a recessive axonal or mixed form of Charcot-Marie-Tooth disease. *American Journal of Human Genetics*, 95(3), 294–300.

Tanaka, M., Müllauer, L., Ogiso, Y., Fujita, H., Moriya, S., Furuuchi, K., Harabayashi, T., Shinohara, N., Koyanagi, T., Kuzumaki, N. (1995). Gelsolin: a candidate for suppressor of human bladder cancer. *Cancer Research*, 55(15), 3228–32.

- Taylor, R. W., Morris, A. A., Hutchinson, M., Turnbull, D. M. (2002). Leigh disease associated with a novel mitochondrial DNA ND5 mutation. *European Journal of Human Genetics*, 10(2), 141–144.
- Taylor, R. W., & Turnbull, D. M. (2005). Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nature Reviews. Genetics*, 6(5), 389–402.
- Thor, A. D., Edgerton, S. M., Liu, S., Moore, D. H., Kwiatkowski, D. J. (2001). Gelsolin as a negative prognostic factor and effector of motility in erbB-2-positive epidermal growth factor receptor-positive breast cancers. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 7(8), 2415–24.
- Thorburn, D. R., & Rahman, S. (1993). *Mitochondrial DNA-Associated Leigh Syndrome and NARP*. GeneReviews(®). University of Washington, Seattle.
- Ting, H.-J., Yeh, S., Nishimura, K., Chang, C. (2002). Supervillin associates with androgen receptor and modulates its transcriptional activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(2), 661–6.
- Torraco, A., Peralta, S., Iommarini, L., Diaz, F. (2015). Mitochondrial Diseases Part I: mouse models of OXPHOS deficiencies caused by defects in respiratory complex subunits or assembly factors. *Mitochondrion*, 21, 76–91.
- Triepels, R. H., van den Heuvel, L. P., Loeffen, J. L., Buskens, C. A., Smeets, R. J., Rubio Gozalbo, M. E., Budde, S. M., Mariman, E. C., Wijburg, F. A., Barth, P. G., Trijbels, J. M., Smeitink, J. A. (1999). Leigh syndrome associated with a mutation in the NDUFS7 (PSST) nuclear encoded subunit of complex I. *Annals of Neurology*, 45(6), 787–90.
- Trounce, I., Neill, S., Wallace, D. C. (1994). Cytoplasmic transfer of the mtDNA nt 8993 T-&G (ATP6) point mutation associated with Leigh syndrome into mtDNA-less cells demonstrates cosegregation with a decrease in state III respiration and ADP/O ratio. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(18), 8334–8.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yoshikawa, S. (1996). The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science (New York, N.Y.)*, 272(5265), 1136–44.

## BIBLIOGRAFÍA

Tucker, E. J., Wanschers, B. F. J., Szklarczyk, R., Mountford, H. S., Wijeyeratne, X. W., van den Brand, M. A. M., Leenders, A. M., Rodenburg, R. J., Reljić, B., Compton, A. G., Frazier, A. E., Bruno, D. L., Christodoulou, J., Endo, H., Ryan, M. T., Nijtmans, L. G., Huynen, M. A., Thorburn, D. R. (2013). Mutations in the UQCC1-Interacting Protein, UQCC2, Cause Human Complex III Deficiency Associated with Perturbed Cytochrome b Protein Expression. *PLoS Genetics*, 9(12), e1004034.

Turner, T., Chen, P., Goodly, L. J., Wells, A. (1996). EGF receptor signaling enhances in vivo invasiveness of DU-145 human prostate carcinoma cells. *Clinical & Experimental Metastasis*, 14(4), 409–18.

Ugalde, C., Hinttala, R., Timal, S., Smeets, R., Rodenburg, R. J. T., Uusimaa, J., van Heuvel, Lambert P., Nijtmans, L. G. J., Majamaa, K., Smeitink, J. A. M. (2007). Mutated ND2 impairs mitochondrial complex I assembly and leads to Leigh Syndrome. *Molecular Genetics and Metabolism*.

Ugalde, C., Triepels, R. H., Coenen, M. J. H., Van Den Heuvel, L. P., Smeets, R., Uusimaa, J., Briones, P., Campistol, J., Majamaa, K., Smeitink, J. A. M., Nijtmans, L. G. J. (2003). Impaired complex I assembly in a Leigh syndrome patient with a novel missense mutation in the ND6 gene. *Annals of Neurology*, 54(5), 665–669.

Valnot, I., von Kleist-Retzow, J. C., Barrientos, A., Gorbatyuk, M., Taanman, J. W., Mehaye, B., Rustin, P., Tzagoloff, A., Munnich, A., Rötig, A. (2000). A mutation in the human heme A:farnesyltransferase gene (COX10 ) causes cytochrome c oxidase deficiency. *Human Molecular Genetics*, 9(8), 1245–9.

Valsecchi, F., Esseling, J. J., Koopman, W. J. H., Willems, P. H. G. M. (2009). Calcium and ATP handling in human NADH:ubiquinone oxidoreductase deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1792(12), 1130–7.

Valsecchi, F., Koopman, W. J. H., Manjeri, G. R., Rodenburg, R. J., Smeitink, J. A. M., Willems, P. H. G. M. (2010). Complex I disorders: Causes, mechanisms, and development of treatment strategies at the cellular level. *Developmental Disabilities Research Reviews*, 16(2), 175–182.

van Rahden, V. A., Fernandez-Vizarra, E., Alawi, M., Brand, K., Fellmann, F., Horn, D., Zeviani, M., Kutsche, K. (2015). Mutations in NDUFB11, Encoding a Complex I Component of the Mitochondrial Respiratory Chain, Cause Microphthalmia with Linear Skin Defects Syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, 96(4), 640–650.

- Vargas, T., Antequera, D., Ugalde, C., Spuch, C., Carro, E. (2010). Gelsolin restores A $\beta$ -Induced alterations in choroid plexus epithelium. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010.
- Vergani, L., Martinuzzi, A., Carelli, V., Cortelli, P., Montagna, P., Schievano, G., Carrozzo, R., Angelini, C., Lugaresi, E. (1995). MtDNA mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy: studies on cytoplasmic hybrid (cybrid) cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 210(3), 880–8.
- Visapää, I., Fellman, V., Vesa, J., Dasvarma, A., Hutton, J. L., Kumar, V., Payne, G. S., Makarow, M., Van Coster, R., Taylor, R. W., Turnbull, D. M., Suomalainen, A., Peltonen, L. (2002). GRACILE syndrome, a lethal metabolic disorder with iron overload, is caused by a point mutation in BCS1L. *American Journal of Human Genetics*, 71(4), 863–76.
- Vives-Bauza, C., Gonzalo, R., Manfredi, G., Garcia-Arumi, E., Andreu, A. L. (2006). Enhanced ROS production and antioxidant defenses in cybrids harbouring mutations in mtDNA. *Neuroscience Letters*, 391(3), 136–141.
- Vouyiouklis, D. A., & Brophy, P. J. (1997a). A novel gelsolin isoform expressed by oligodendrocytes in the central nervous system. *Journal of Neurochemistry*, 69(3), 995–1005.
- Vouyiouklis, D. A., & Brophy, P. J. (1997b). A novel gelsolin isoform expressed by oligodendrocytes in the central nervous system. *Journal of Neurochemistry*, 69(3), 995–1005.
- Vouyiouklis, D. A., & Brophy, P. J. (1997c). A novel gelsolin isoform expressed by oligodendrocytes in the central nervous system. *Journal of Neurochemistry*, 69(3), 995–1005.
- Wagener, N., Ackermann, M., Funes, S., Neupert, W. (2011). A Pathway of Protein Translocation in Mitochondria Mediated by the AAA-ATPase Bcs1. *Molecular Cell*, 44(2), 191–202.
- Walker, U. A., Collins, S., Byrne, E. (1996). Respiratory chain encephalomyopathies: a diagnostic classification. *European Neurology*, 36(5), 260–7.
- Wallace, D. C. (2001). A mitochondrial paradigm for degenerative diseases and ageing. *Novartis Foundation Symposium*, 235, 247-63–6.
- Wang, H., Cheng, B., Chen, Q., Wu, S., Lv, C., Xie, G., Jin, Y., Fang, X. (2008). Time course of plasma gelsolin concentrations during severe sepsis in critically ill surgical patients. *Critical Care (London, England)*, 12(4), R106.

## BIBLIOGRAFÍA

Wanschers, B. F. J., Szklarczyk, R., van den Brand, M. A. M., Jonckheere, A., Suijskens, J., Smeets, R., Rodenburg, R. J., Stephan, K., Helland, I. B., Elkamil, A., Rootwelt, T., Ott, M., van den Heuvel, L., Nijtmans, L. G., Huynen, M. A. (2014). A mutation in the human CBP4 ortholog UQCC3 impairs complex III assembly, activity and cytochrome b stability. *Human Molecular Genetics*, *23*(23), 6356–6365.

Witke, W., Li, W., Kwiatkowski, D. J., Southwick, F. S. (2001). Comparisons of CapG and gelsolin-null macrophages: demonstration of a unique role for CapG in receptor-mediated ruffling, phagocytosis, and vesicle rocketing. *The Journal of Cell Biology*, *154*(4), 775–84.

Wolf, N. I., & Smeitink, J. A. M. (2002). Mitochondrial disorders: a proposal for consensus diagnostic criteria in infants and children. *Neurology*, *59*(9), 1402–5.

Wong, L.-J. C. (2007). Pathogenic mitochondrial DNA mutations in protein-coding genes. *Muscle & Nerve*, *36*(3), 279–93.

Xia, D., Yu, C. A., Kim, H., Xia, J. Z., Kachurin, A. M., Zhang, L., Yu, L., Deisenhofer, J. (1997). Crystal structure of the cytochrome bc<sub>1</sub> complex from bovine heart mitochondria. *Science (New York, N.Y.)*, *277*(5322), 60–6.

Xianhui, L., Pinglian, L., Xiaojuan, W., Wei, C., Yong, Y., Feng, R., Peng, S., Gang, X. (2014). The association between plasma gelsolin level and prognosis of burn patients. *Burns: Journal of the International Society for Burn Injuries*, *40*(8), 1552–5.

Xu, F., Morin, C., Mitchell, G., Ackerley, C., Robinson, B. H. (2004). The role of the LRPPRC (leucine-rich pentatricopeptide repeat cassette) gene in cytochrome oxidase assembly: mutation causes lowered levels of COX (cytochrome c oxidase) I and COX III mRNA. *The Biochemical Journal*, *382*(Pt 1), 331–6.

Xu, X., Forbes, J. G., Colombini, M. (2001). Actin modulates the gating of *Neurospora crassa* VDAC. *The Journal of Membrane Biology*, *180*(1), 73–81.

Yang, J., Moravec, C. S., Sussman, M. A., DiPaola, N. R., Fu, D., Hawthorn, L., Mitchell, C. A., Young, J. B., Francis, G. S., McCarthy, P. M., Bond, M. (2000). Decreased SLIM1 expression and increased gelsolin expression in failing human hearts measured by high-density oligonucleotide arrays. *Circulation*, *102*(25), 3046–52.



- Yin, H. L., Kwiatkowski, D. J., Mole, J. E., Cole, F. S. (1984). Structure and biosynthesis of cytoplasmic and secreted variants of gelsolin. *The Journal of Biological Chemistry*, 259(8), 5271–6.
- Yin, H. L., & Stossel, T. P. (1979). Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin, a calcium-dependent regulatory protein. *Nature*, 281(5732), 583–6.
- Yin, H. L., & Stull, J. T. (1999). Proteins that regulate dynamic actin remodeling in response to membrane signaling minireview series. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(46), 32529–30.
- Yins, H. L., Kwiatkowskis, D. J., Moletij, J. E., Cole, F. S. (1984). and secreted variants of gelsolin . Structure and Biosynthesis of Cytoplasmic and Secreted Variants of Gelsolin.
- Yue, T. L., Wang, C., Romanic, A. M., Kikly, K., Keller, P., DeWolf, W. E., Hart, T. K., Thomas, H. C., Storer, B., Gu, J. L., Wang, X., Feuerstein, G. Z. (1998). Staurosporine-induced apoptosis in cardiomyocytes: A potential role of caspase-3. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 30(3), 495–507.
- Zalk, R., Israelson, A., Garty, E. S., Azoulay-Zohar, H., Shoshan-Barmatz, V. (2005). Oligomeric states of the voltage-dependent anion channel and cytochrome c release from mitochondria. *The Biochemical Journal*, 386(Pt 1), 73–83.
- Zheng, Y., Shi, Y., Tian, C., Jiang, C., Jin, H., Chen, J., Almasan, A., Tang, H., Chen, Q. (2004). Essential role of the voltage-dependent anion channel (VDAC) in mitochondrial permeability transition pore opening and cytochrome c release induced by arsenic trioxide. *Oncogene*, 23(6), 1239–1247.



## **ANEXOS**

---



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

- Blázquez, A., Marín-Buera, L., Morán, M., **García-Bartolomé, A.**, Arenas, J., Martín, M.A., Ugalde, C. (2013). Mitochondrial complex III deficiency of nuclear origin: molecular basis, pathophysiological mechanisms and animal models. In *Mitochondrial disorders caused by nuclear genes*. XII, pp. 219 - 238. *Springer Science+Business media*, LLC. New York, USA., 2013.
  
- Marín-Buera, L.,\* **García-Bartolomé, A.**,\* Morán, M., López-Bernardo, E., Cadenas, S., Hidalgo, B., Sánchez, R., Séneca, S., Arenas, J., Martín, M.A., Ugalde, C. (2015). Differential proteomic profiling unveils new molecular mechanisms associated with mitochondrial complex III deficiency. *Journal of Proteomics*, 113, 38–56.  
**(\*Primera autoría compartida).**
  
- Pérez-Pérez, R., Lobo-Jarne, T., Milenkovic, D., Mourier, D., Bratic, A., **García-Bartolomé, A.**, Fernández-Vizarra, E., Cadenas, S., Delmiro, A., García-Consuegra, I., Arenas, J., Martín, M.A., Larsson, N.G., Ugalde, C. (2016). COX7A2L is a mitochondrial complex III-binding protein that stabilizes the III<sub>2</sub>+IV supercomplex without affecting respirasome formation *Cell Rep.* 2016 August 30; 16(9): 2387–2398.