



Universidad Autónoma de Madrid.

Programa de Doctorado en Biociencias Moleculares.

**Regulación de la OXPHOS mediada por IF1 y su potencial como
diana terapéutica en cáncer**

Cristina Nuevo Tapioles

Madrid, 2019

Departamento de Biología Molecular.

Facultad de Ciencias.

Universidad Autónoma de Madrid.

**Regulación de la OXPHOS mediada por IF1 y su potencial
como diana terapéutica en cáncer**

Memoria presentada por la graduada en Biotecnología

Cristina Nuevo Tapioles

Para obtener el grado de

Doctor en Biología Molecular

Por la Universidad Autónoma de Madrid

Director de Tesis: José Manuel Cuezva Marcos

Co-Directora de Tesis: Laura Formentini

Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM).

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría comenzar dando las gracias a mis directores de tesis **José M. Cuezva y Laura Formentini** por la oportunidad de llegar hasta aquí cuatro años atrás.

Gracias **Pepe** por la confianza, la presión cuando es necesario aprender y las alegrías compartidas cada vez que te he dicho “al final, siempre tienes razón”.

Gracias **Formen** por las miles de horas que han hecho de este año todos los anteriores. No todo está en todo, pero tú siempre sabes levantarte y hacerlo estar.

Gracias a la familia 326, por encajar tantas personalidades distintas en unos pocos metros cuadrados y hacer que pasar tantas horas aquí sea como estar en casa.

A **Cris**, porque has estado en todo y seguirás estándolo siempre, desde el día del primer examen hasta el que hemos tenido que echarte porque a cabezona a ti no te gana nadie, ¡eh! A **Fulvio**, por las horas dentro y fuera, las charlas, los viajes y tu amistad incondicional. A **Afamada**, por aceptar este “Afi” con esa alegría y por esos aceti-experimentos que nos van a llevar al próximo número de Science. A **Pau**, por todo este tiempo espalda con espalda viendo qué pinta tiene. A **Torresano**, porque no hay mejor piloto/copiloto para este viaje. A **Brenda** por estar siempre dispuesta a ser Brenda blot y saber que siempre se puede contar contigo y **Sonia** por traernos esas risas inacabables e incluso por hacernos sentir tan viejos. A **Cris y Sandra**, últimas incorporaciones que parecen de toda la vida.

A los estudiantes que han ido pasando estos años por el 326, trayendo alegría y un aire nuevo. En especial a **Adrián**, por su inteligencia, sus ganas de aprender y por compartir conmigo más de una desesperación. Aunque en colores vas tan mal como la codi.

A los ex-326. Gracias **Solde**, por la acogida desde el primer día y no soltarme desde entonces. Hay cosas que son para toda la vida. **Pila**, por enseñarnos a hablar asturiano, ¡oh! y sobre todo por compartir tanto con nosotros. **Lucía**, por los momentos juntas en este proyecto. **Javi**, porque si el NADH no se pone amarillo, no es NADH. **Marga**, por todas las veces que has hecho de madre de todos. **María** por todos esos protocolos que te pedimos estés donde estés y **Marek** por tu simpatía y ayudarnos a desempolvar el inglés.

Gracias a la gente del **321** por todas las veces que lo suyo era nuestro y lo nuestro suyo. **Araceli**, por las tardes en las que aparezco de repente en tu sitio, por tu ayuda incondicional y sincera. **Laura**, porque en Star Wars aún quedan disquetes. **Paloma, Inés, Paula e Irene** por haber exprimido los seahorse del viernes a las 9 de la noche, que son los que salen. Gracias también al **320**, por todos los intercambios de anticuerpos que acaban en batallas en las fiestas de primavera y karaokes en las copas de navidad.

Gracias, **Marta**, por tu cariño, por compartir todo conmigo sin pensarlo dos veces y por descubrir juntas la mitocondria y **Eva**, por las risas y las cirugías en el animalario.

Gracias, **Adela y Rocío**, por haber sido el principio de todo, por haberme enseñado tanto en sólo un año que no olvidaré nunca.

Por supuesto, gracias a los **Servicios** del CBMSO, donde tantas horas pasamos y tanta paciencia nos ponen. Gracias a **Kostas** por las horas de IVIS y **Marta** por su amabilidad en el Imdea. Gracias, **Mada**, por tanta ayuda en estas cosas que tan mal se nos dan.

A mis amigas. Gracias, **Mónica**, por ser la otra mitad de mi desde que tengo recuerdos, nada se concibe en la vida sin ti. **Carmen**, por haber llegado a alegrarnos la vida de esta manera, por tu orgullo incondicional de amigas, por haberle dado sentido a Madrid y ser la casa de la que no querer irme jamás. **Natalia**, por haber comenzado esta locura conmigo y salir juntas de cada salto al vacío. **Yolanda, Eva, Ángela, Alba, Elena, Ester, Crisfer, Estefanía, Susana y María**, gracias por haber sido el pilar fundamental desde hace miles de millones de años.

Gracias, **Vicky, Garpar, Curry, Perce, Samu, Alberto, Isa, Agus, Zorno, Estefanía...** por esos años en los que crecimos, por nuestros viajes, por hacer que la universidad no quedase en el olvido, por nuestra amistad. Gracias, **Lazo**, por compartir día a día las penas y las alegrías, por festejar los festejos, por confirmar las confirmaciones, por entender los entendimientos, por hacerlo posible.

Gracias a mi familia. Gracias a mis padres por los valores que me han traído hasta aquí, por su cultura, por su amor, por hacerme quien soy y enseñarme a estar en cualquier situación de la vida. Gracias a mi madre por ser el arranque y apoyo de toda una vida, por ser siempre la primera, por su interés en cada experimento en el laboratorio y en la vida, por entenderme cuando nadie más me puede entender. A mi padre por comprendernos sin necesidad de hablar, por aparecer donde sea que le necesite, por su calma, su templanza y por transmitirme su pasión por cada cosa que hace, incluso cuando hace cien cosas a la vez. A mi hermano, por lo bonito que ha sido vernos crecer y aprender a entendernos y querernos por encima de todo. A mis tíos por darle esa otra visión al mundo, por la diversión y hacer que cada pequeña cosa sea especial. A Nines por el cariño. A la familia al otro lado del AVE, a Mar, que algún día será todo lo que ella quiera ser. Gracias a mis abuelos porque este amor no se compara con nada. A mi abuela Nanica por esa vitalidad que alegra la vida, por transmitirme esa felicidad y esas ganas incondicionales. Abu, has hecho de mi infancia un lugar donde querer vivir para siempre, eres el ejemplo a seguir para no parar nunca, pase lo que pase, venga lo que venga solo quiero seguir a tu lado. Yaya, no existe persona más especial en el mundo que tú, tú haces que quiera ser la persona que soy y dedicarme a lo que me dedico para poder compartirlo todo contigo, eres el apoyo y el amor que le dan sentido a mi vida y todo esto es para ti.

RESUMEN

La mitocondria es el orgánulo encargado de generar ATP mediante el proceso de fosforilación oxidativa (OXPHOS). En este proceso destaca la ATP sintasa, cuello de botella de la OXPHOS y responsable de catalizar la síntesis de ATP. El inhibidor fisiológico de la ATP sintasa (IF1) es una proteína mitocondrial cuya función es inhibir las actividades sintética e hidrolítica de la ATP sintasa. Estudiando la regulación de la actividad de IF1 hemos demostrado que la fosforilación en su residuo S39 impide la unión del inhibidor a la ATP sintasa. Por lo tanto, es la forma defosforilada de IF1 quien inhibe la enzima. Esta fosforilación estaría mediada por la actividad de una PKA mitocondrial que regula la respiración aumentando su eficiencia cuando dicha quinasa está activa. En un cribado de inhibidores de quinasas, también encontramos la quinasa SGK-1 como posible candidata en la fosforilación de IF1. SGK-1 colocaliza parcialmente con la mitocondria y su inhibición química o silenciamiento causan la defosforilación de IF1 inhibiendo la producción de ATP mitocondrial. Otro mecanismo de regulación de la actividad de IF1 es la modulación de su expresión. En este trabajo, hemos demostrado que la proteína de unión a mRNA LRPPRC regula la traducción de IF1 en células HEK293T y cardiomiocitos.

En cáncer, IF1 es una proteína altamente expresada en algunos de los carcinomas humanos más prevalentes. En este trabajo mostramos que la sobreexpresión de IF1, aunque inhibe la producción de ATP mitocondrial, correlaciona con una mejor prognosis en pacientes con cáncer de mama, especialmente en aquellas con cáncer de mama triple negativo. En este contexto, hemos estudiado el efecto de 1018 fármacos aprobados por la FDA sobre la respiración mitocondrial mediante el ensayo de Seahorse en busca de inhibidores de la OXPHOS que puedan ser reposicionados en la terapia del cáncer. Describimos cómo el nebivolol, un antihipertensivo β 1-bloqueante, es capaz de inhibir la OXPHOS promoviendo la sobreexpresión de IF1 y la defosforilación del complejo I mitocondrial (CI). Así mismo, describimos en modelos *xenograft* de cáncer de colon y cáncer de mama que el tratamiento con nebivolol genera una crisis metabólica restringiendo la producción de ATP celular que inhibe la proliferación celular y activa la apoptosis en los tumores. Con ello, demostramos que el tratamiento con nebivolol aumenta la supervivencia *in vivo* de ratones portadores de carcinomas humanos de colon y mama. Por lo tanto, este fármaco conocido en terapia cardiovascular podría ser reposicionado en la terapia antitumoral.

ABSTRACT

Mitochondria are essential organelles playing key roles in bioenergetics by controlling the production of ATP in the process known as oxidative phosphorylation (OXPHOS). The ATP synthase, the bottleneck of the OXPHOS, is a primary hub in the ATP production. The ATPase inhibitory factor 1 (IF1) is a mitochondrial protein that inhibits both the synthetic and hydrolytic activities of the ATP synthase. Studying the regulation of IF1 activity, we have demonstrated that phosphorylation of S39 of the protein impedes IF1 binding and inhibition of the enzyme, concluding that dephosphorylated IF1 is the active molecule that inhibits ATP synthase activities. A mitochondrial PKA activity seems to regulate mitochondrial respiration by improving the efficiency of the ETC when it is activated. A screening of protein kinase inhibitors identified SGK-1 as a promising candidate to phosphorylate IF1. SGK-1 partially colocalized within mitochondria and its chemical inhibition or silencing cause the dephosphorylation of IF1 inhibiting mitochondrial ATP production. On the other hand, the regulation of IF1 expression can also control the activity of the protein. In this work, we have demonstrated that the mRNA binding protein LRPPRC inhibits the translation of IF1 in HEK293T cells and in cardiomyocytes.

In cancer, IF1 is highly overexpressed in some of the most prevalent human carcinomas. Herein, we show that IF1 overexpression, despite inhibiting mitochondrial ATP production, directly correlates with a better prognosis and survival of breast cancer patients bearing triple negative breast carcinomas. In this context, we have screened a library of 1,018 FDA-approved drugs searching for drugs that could be repurposed in cancer by inhibiting OXPHOS. We have found nebivolol, a β_1 -adrenergic blocker, as inhibitor of mitochondrial OXPHOS in colon and breast cancer cells. Nebivolol promotes an upregulation of IF1 amount and the inhibition of complex I activity by the dephosphorylation of the complex, both contributing to the inhibition of the production of ATP by the ATP synthase. Altogether, we show the anti-cancer effect of nebivolol *in vivo* by assessing the tumor growth arrest experienced in mice bearing colon or breast human carcinomas by triggering a metabolic crisis because of the limitations of cellular ATP. We conclude that nebivolol, a classic antihypertensive drug, is a valid candidate to be repurposed in cancer therapy.

ÍNDICE

ÍNDICE	14
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	1
ABREVIATURAS	5
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. La mitocondria: Características y funciones.	9
1.1.1. Estructura y morfología mitocondrial.	9
1.1.2. Función mitocondrial.	11
a) <i>Producción de energía</i>	11
b) <i>Producción de ROS</i>	11
c) <i>Señalización por calcio</i>	12
d) <i>Muerte celular</i>	12
1.1.3. Dinámica mitocondrial.	14
1.2. El sistema OXPHOS.	15
1.2.1. Componentes y organización del sistema OXPHOS.....	15
1.2.1.1. Componentes de la ETC.....	15
1.2.1.2. Organización de la ETC.	18
1.2.2. La ATP sintasa.	21
1.2.2.1. Estructura, ensamblaje y funciones de la ATP sintasa.	21
1.2.2.2. Regulación de la ATP sintasa.....	26
1.2.3. El inhibidor fisiológico de la ATP sintasa: IF1.	27
1.2.3.1 Estructura y relación con la ATP sintasa.....	27
1.2.3.2. Funciones de IF1.	30
1.2.3.3 Regulación de IF1.	32
1.2.4. Regulación del sistema OXPHOS mediado por fosforilación.....	35
1.3. La mitocondria y el metabolismo energético.	38
1.3.1. La mitocondria y el cáncer.	38
1.3.2. El metabolismo mitocondrial como diana terapéutica en cáncer	41
2. OBJETIVOS	45
3. MATERIALES Y MÉTODOS	47
3.1. Materiales.	47
3.1.1. Líneas celulares.	47
3.1.2. Ratones.	47
3.1.3. Cepas bacterianas.	47

Índice

3.1.4. Plásmidos.	48
3.1.5. siRNAs.	48
3.1.6. Anticuerpos.	48
3.1.7. Compuestos e inhibidores.	50
3.2. Métodos.	50
3.2.1. Métodos de Biología molecular.	50
3.2.1.1. Transformación de células <i>E. coli</i> competentes.	50
3.2.1.2. Aislamiento de DNA de cultivos bacterianos.	50
3.2.2. Métodos de Bioquímica.	51
3.2.2.1. Extracción y cuantificación de proteína en muestras biológicas.	51
3.2.2.2. Extracción y purificación de mitocondrias de células en cultivo.	51
3.2.2.3. Electroforesis de proteínas mono (SDS-PAGE) y bi-dimensional (IEF-SDS-PAGE).	52
3.2.2.4. Electroforesis en geles nativos Blue Native.	53
3.2.2.5. Electroforesis en geles nativos Clear Native.	55
3.2.2.6. Medida de actividad en gel.	55
3.2.2.7. Detección inmunológica de proteínas (<i>Western blot</i>).	56
3.2.3. Métodos de Biología celular.	56
3.2.3.1. Cultivo de líneas celulares.	56
3.2.3.2. Tratamientos celulares.	57
3.2.3.3. Defosforilación de proteínas.	57
3.2.3.4. Transfección transitoria de plásmidos y siRNAs.	57
3.2.3.5. Ensayos de consumo de oxígeno en células adheridas: MitoXpress Xtra.	58
3.2.3.6. <i>Screening</i> o cribado de compuestos.	59
3.2.3.7. Medida del consumo de oxígeno en células adheridas a placa: Ensayos Seahorse.	59
a) Titulación del número de células.	59
b) Flujo de trabajo del cribado de fármacos.	59
c) Cribado de compuestos en Seahorse XFe96.	60
d) Cribado de compuestos en Seahorse XF24.	60
e) Medida de consumo de oxígeno en células adheridas a placa con diferentes sustratos.	61
3.2.3.8. Inmunoprecipitación (IP).	61
3.2.3.9. Inmunocaptura de los complejos de la cadena de transporte electrónico.	62
3.2.3.10. Detección de proteínas mediante cromatografía líquida de fase reversa acoplada a espectrometría de masas.	62
3.2.3.11. Medida de producción de ATP por la ATP sintasa y ATP total.	63
3.2.3.12. Medida del flujo glucolítico.	64

3.2.3.13. Medida de actividad de complejos respiratorios por espectrofotometría en mitocondrias asiladas.	65
a) Actividad NADH deshidrogenasa sensible a rotenona (CI).....	65
b) Actividad succinato deshidrogenasa (CII).	66
c) Actividad citocromo C oxidasa (CIV).	66
d) Actividad ATP hidrolasa (ATP sintasa).....	66
3.2.3.14. Citometría de flujo.	67
a) Proliferación celular.	67
b) Muerte celular por tinción con Anexina V.....	68
c) Determinación de la producción de peróxido de hidrógeno.....	68
3.2.3.15. Inmunofluorescencia en células fijadas.....	69
3.2.3.16. Elaboración del anticuerpo contra IF1 fosforilado.....	69
3.2.4. Métodos en ratones.....	70
3.2.4.1. Condiciones generales de cuidado, mantenimiento y manejo de ratones.....	70
3.2.4.2. Proliferación tumoral en ensayos con ratones desnudos “ <i>nude</i> ”.	70
3.2.4.3. Tratamiento antitumoral de los animales.	71
3.2.4.4. Seguimiento del crecimiento tumoral de los animales.	71
3.2.4.5. Extracción de tumores.....	72
3.2.4.6. Medida de ATP total en los tumores.	72
3.2.4.7. Inmunohistoquímica.....	72
3.2.4.8. Inmunofluorescencia.	73
3.2.4.9. Determinación de la carbonilación de proteínas celulares.	73
3.2.5. Métodos estadísticos	74
3.2.5.1. Estadística aplicada.	74
4. RESULTADOS.....	75
4.1. Regulación de la actividad inhibitoria de IF1.	75
4.1.1. La fosforilación de la serina 39 regula la unión de IF1 a la ATP sintasa.	75
4.1.2. La inhibición de la PKA y la hipoxia determinan la unión de IF1 a la ATP sintasa.	78
4.1.3. La regulación de PKA determina la eficiencia de la función mitocondrial.....	79
4.1.4. La respiración mitocondrial está regulada por diversas quinasas.	81
4.1.5. Los anticancerígenos regorafenib, dabrafenib, sorafenib no modifican la fosforilación de IF1.	83
4.1.6. La actividad de la proteína quinasa C (PKC) no modifica la fosforilación de IF1.	84
4.1.7. La inhibición de la quinasa regulada por suero y glucocorticoides 1 (SGK-1) regula el estado de fosforilación de IF1.	85
4.1.8. La quinasa regulada por suero y glucocorticoides 1 (SGK-1) regula la producción de ATP mitocondrial.....	87
4.1.9. Producción de un anticuerpo para la inmunodetección de IF1 fosforilado.	88

4.2. Regulación tejido específica de la expresión de IF1.	89
4.2.1. Regulación por LRPPRC, una proteína de unión al mRNA de IF1.	89
4.2.2. LRPPRC regula la expresión de IF1 y producción de ATP por la ATP sintasa.....	91
4.3. Fármacos reguladores de la actividad respiratoria mitocondrial	93
4.3.1. La sobreexpresión de IF1 en carcinomas de mama predice una mejor prognosis. ...	93
4.3.2. Cribado de 1018 fármacos aprobados por la FDA testados sobre la respiración mitocondrial.	96
4.3.3. Identificación de hits sobre la respiración mitocondrial: Nebivolol.....	97
4.3.3.1. El nebivolol inhibe la respiración mitocondrial en células de cáncer de colon y mama.	100
4.3.3.2. El nebivolol inhibe la producción de ATP por la ATP sintasa mediante la sobreexpresión de IF1.	103
4.3.3.3. El nebivolol inhibe la actividad enzimática del CI y CV sin modificar la estructura o superestructura de los complejos mitocondriales.	106
4.3.3.4. El nebivolol inhibe la fosforilación de proteínas de la cadena respiratoria.	109
4.3.4. El nebivolol retrasa el crecimiento tumoral del cáncer de colon <i>in vivo</i>	114
4.3.5. El nebivolol promueve un aumento en la apoptosis y una disminución en la proliferación celular <i>in vivo</i>	115
4.3.6. El nebivolol promueve un desbalance en el estado redox y una crisis metabólica en los tumores.	116
4.3.7. El tratamiento combinado de nebivolol con 5-fluouracilo aumenta la supervivencia de los ratones <i>xenograft</i> con células de cáncer de colon.	118
4.3.8. El nebivolol retrasa el crecimiento tumoral del cáncer de mama <i>in vivo</i>	119
5. DISCUSIÓN.....	123
5.1. Regulación de la actividad de IF1.	123
5.2. Regulación de la expresión de IF1.	128
5.3. Inhibición de la actividad mitocondrial como diana en el tratamiento del cáncer.	130
6. CONCLUSIONES.....	144
7. BIBLIOGRAFÍA.....	146
8. ANEXO I: PUBLICACIONES	175

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tablas

Tabla 1. Quinasas localizadas en mitocondria

Tabla 2. Anticuerpos utilizados.

Tabla 3. Componentes del gel en gradiente para Blue Native-PAGE 3-13% casero.

Tabla 4. Inhibidores de quinasas.

Tabla 5. Nuevas moléculas de pequeño tamaño aprobadas por la FDA inhibitoras del CI con propiedades anticancerígenas.

Figuras de Introducción

Figura 1. El sistema OXPHOS.

Figura 2. Estructura cristalográfica de los complejos de la ETC.

Figura 3. Composición de los supercomplejos descritos en mamíferos.

Figura 4. Estructura de la ATP sintasa bovina y el sitio de unión de IF1.

Figura 5. El estado de fosforilación de IF1 determina la obtención de ATP por fosforilación oxidativa.

Figura 6. La función oncogénica de IF1 es tejido-específica.

Figuras de Resultados

Figura 7. IF1 se fosforila en la serina 39 impidiendo su unión a la ATP sintasa.

Figura 8. La defosforilación de IF1 permite su unión a la ATP sintasa.

Figura 9. La unión de IF1 a la ATP sintasa es dependiente de PKA y de la hipoxia.

Figura 10. Uso de la sonda MitoXpress Xtra para la medida del consumo de oxígeno en célula adherida en placa.

Figura 11. La modulación de la vía PKA regula el consumo de oxígeno mitocondrial.

Figura 12. Los inhibidores de quinasas Regorafenib, Dabrafenib y Sorafenib inhiben la respiración mitocondrial.

Figura 13. Los inhibidores de quinasas regorafenib, dabrafenib y sorafenib no modifican el punto isoeléctrico de IF1.

Figura 14. La actividad de la quinasa PKC no es responsable de la fosforilación de IF1.

Figura 15. La actividad de la quinasa SGK-1 es responsable de la fosforilación de IF1.

Figura 16. La inhibición de SGK-1 causa una disminución en la producción de ATP dentro de la mitocondria.

Figura 17. Desarrollo del anticuerpo contra IF1 fosforilado.

Figura 18. La proteína LRPPRC se une al mRNA de IF1.

Figura 19. IF1 se sobreexpresa en ausencia de LRPPRC inhibiendo la ATP sintasa.

Figura 20. La sobreexpresión de LRPPRC causa una disminución en la expresión de IF1.

Figura 21. Expresión de IF1 en carcinomas de mama.

Figura 22. Sobreexpresión de IF1 en células BT549

Figura 23. Metabolismo energético en células BT549 que sobreexpresan IF1.

Figura 24. La sobreexpresión de IF1 inhibe la producción de ATP mitocondrial.

Figura 25. Flujo de trabajo del cribado de fármacos.

Figura 26. Optimización del ensayo en Seahorse XFe96 para el cribado de fármacos en células HCT1116.

Figura 27. Identificación de hits mediante Seahorse XFe96 en células HCT116 sobre la OSR.

Figura 28. Identificación de 15 inhibidores de la respiración mitocondrial mediante Seahorse XF24 en células HCT116.

Figura 29. El nebivolol inhibe la respiración mitocondrial en células de cáncer de colon HCT116 y de mama MDA-MB-231.

Figura 30. Inhibición de la respiración mitocondrial dependiente de dosis de nebivolol.

Figura 31. El nebivolol no inhibe la respiración mitocondrial en células no tumorales.

Figura 32. El tratamiento con nebivolol incrementa la expresión de IF1 tras 3h.

Figura 33. El nebivolol promueve la reprogramación metabólica de las células de HCT116 y MDA-MB-231.

Figura 34. El nebivolol no afecta a la proliferación ni muerte celular en células HCT116 y MDA-MB-231.

Figura 35. El nebivolol no modifica el patrón de migración de los complejos y SCs mitocondriales.

Figura 36. El nebivolol inhibe las actividades en gel del CI y CV.

Figura 37. El nebivolol inhibe las actividades enzimáticas del CI y CV.

Figura 38. El nebivolol inhibe parcialmente la fosforilación de los SCs.

Figura 39. El nebivolol modifica el estado de fosforilación de los complejos mitocondriales.

Figura 40. El nebivolol promueve la desfosforilación de la S117 de la subunidad NDUFS7 del CI en células de cáncer de colon.

Figura 41. El nebivolol no promueve la desfosforilación de la subunidad NDUFS7 del CI en células de cáncer de mama.

Figura 42. El nebivolol delecera el crecimiento tumoral *in vivo* en ratones *xenograft* inyectados con células HCT116-luc.

Figura 43. El nebivolol inhibe la proliferación de las células tumorales y aumenta la apoptosis *in vivo*.

Figura 44. El nebivolol provoca un desbalance en el estado redox en los tumores.

Figura 45. El nebivolol causa la sobreexpresión de IF1 y la disminución del contenido de ATP *in vivo*.

Figura 46. El tratamiento combinado de 5-fluouracilo y nebivolol aumenta la supervivencia en ratones *xenograft* inyectados con células HCT116-luc.

Figura 47. El nebivolol delecera el crecimiento tumoral *in vivo* en ratones *xenograft* inyectados con células MDA-MB-231.

Figura 48. El nebivolol promueve una crisis metabólica causando la disminución de la proliferación y aumentando la apoptosis.

Figuras de la Discusión

Figura 49. Regulación de IF1.

Figura 50. Propuesta del mecanismo de acción del nebivolol.

Figura 51. Estructura de las moléculas AG311 y nebivolol.

ABREVIATURAS

- IF1:** Factor inhibidor de la ATPasa 1
- ANT:** Transportador de nucleótidos de adenina
- APS:** Persulfato amónico
- ATP:** Adenosín trifosfato
- AMPK:** proteína quinasa activada por AMP
- BSA:** Seroalbúmina bovina
- CI:** Complejo I mitocondrial
- CII:** Complejo II mitocondrial
- CIII:** Complejo III mitocondrial
- CIV:** Complejo IV mitocondrial
- CV:** Complejo V mitocondrial o ATP sintasa
- Cit c:** Citocromo c
- CO₂:** Dióxido de carbono
- CoQ:** Coenzima Q
- DNA:** Ácido dexosirribonucleico
- mtDNA:** DNA mitocondrial
- nDNA:** DNA nuclear
- DDM:** Dodecyl β-D-maltoside
- FAD:** Dinucleótido de flavina y adenina
- FADH₂:** Dinucleótido de flavina y adenina, reducido
- FDA:** Food and drug administration
- H₂O₂:** Peróxido de hidrógeno
- HER2:** Receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano
- IP:** Inmunocaptura

Abreviaturas

kDa: Kilodalton

MAM: Membranas asociadas a mitocondria

ETC: Cadena de transporte electrónico mitocondrial

mRNA: RNA mensajero

NAD⁺: Dinucleótido de nicotinamida y adenina

NADH: Dinucleótido de nicotinamida y adenina, reducido

NSCLC: Cáncer de pulmón de células no pequeñas

OXPHOS: Fosforilación oxidativa

RET: Transporte reverso de electrones

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida

BN- PAGE: PAGE en presencia de azul de Coomassie (Blue-native)

CN-PAGE: PAGE en presencia de DDM (Clear-native)

SDS- PAGE: PAGE en presencia de dodecilsulfato sódico

1D- PAGE: PAGE en primera dimensión

2D- PAGE: PAGE en segunda dimensión

TEMED: N, N, N', N'- tetrametiletilendiamina

ROS: Especies reactivas de oxígeno

OM: Membrana externa mitocondrial

IM: Membrana interna mitocondrial

RE: Retículo endoplasmático

ERMES: Complejo de unión RE-mitocondria

ECM: Matriz extracelular

EMT: Transición epitelio-mesénquima

IMJC: Uniones intermitocondriales

IBM: Superficie periférica de la membrana

H₂O: Agua

O₂^{•-}: Anión superóxido

[GSH]: Glutathion reducido

[GSSG]: Glutathion oxidado

GPx1: Glutathión peroxidasa 1

Prx: Peroxirredoxina

Trx: Tiorredoxina

sAC: Adenil ciclasa soluble

MOMP: Permeabilización de la membrana externa mitocondrial mitocondrial

$\Delta\Psi_m$: Potencial de membrana

PTP: Poro de permeabilidad transitorio

SC: Supercomplejos

OSCP: Proteína que confiere sensibilidad a oligomicina

DAPIT: Proteína asociada a diabetes en tejidos sensibles a insulina

CaBI: Proteína inhibidora de la ATPasa de unión a calcio

G0S2: Proteína de inducción por hipoxia *G0/G1 switch gene-2*

RBP: Proteína de unión a RNA

AKAPs: Proteínas de anclaje a quinasas-A

PTPMT1: Proteín tirosín-fosfatasa localizada en mitocondria

PKA: Proteín quinasa A

cAMP: Adenosín monofosfato cíclico

BEC: Índice bioenergético celular

OSR: Respiración sensible a oligomicina

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La mitocondria: Características y funciones.

Las mitocondrias son orgánulos de doble membrana que forman parte de la mayoría de las células eucariotas. Se caracterizan por ser orgánulos altamente dinámicos y poder encontrarse en una amplia variedad en número, estructura y función dependiendo del tipo o estadio de desarrollo celular (Pagliarini et al., 2008, Mootha et al., 2003a, Forner et al., 2006, Valcarce et al., 1988, Izquierdo et al., 1995). En los años 60 se describió la que hasta hoy ha sido su principal función fisiológica que consiste en ejercer de central energética produciendo la energía metabólica necesaria para el funcionamiento celular mediante el proceso denominado fosforilación oxidativa (OXPHOS) (Figura 1) (Mitchell, 1961, Attardi and Schatz, 1988). Desde entonces, se ha descrito y estudiado el papel de este orgánulo en diversas funciones que abarcan desde la regulación del metabolismo de glucosa, lípidos y ácidos grasos hasta el control de la apoptosis (Green et al., 2014), la señalización por calcio (Rizzuto et al., 2012) y especies reactivas de oxígeno (ROS) (Sena and Chandel, 2012), la inmunidad celular (Banoth and Cassel, 2018, Formentini et al., 2017b, Weinberg et al., 2015), la producción del grupo hemo o de precursores del ciclo de la urea y la gluconeogénesis. Además, son los únicos orgánulos que posee su propio genoma con su maquinaria de replicación y transcripción que resulta esencial para el correcto mantenimiento de la homeostasis celular (Wallace, 1992).

1.1.1. Estructura y morfología mitocondrial.

Las mitocondrias son orgánulos de origen endosimbionte que residen en el citoplasma celular (Sagan, 1967, Lane, 2008) y que se componen de dos membranas que delimitan con su estructura dos espacios acuosos, el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial. La membrana externa (OM) define el orgánulo y lo separa del citosol, tiene una composición de un 60% de proteínas y un 40% de lípidos y permite el paso de moléculas de menos de 10kDa (Palade, 1953). Entre sus funciones se encuentran el intercambio de metabolitos con el citosol a través del canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC) (Colombini et al., 1996) y el importe y ensamblaje de proteínas codificadas en el núcleo a través de la translocasa TOM y la maquinaria SAM (Pfanner and Wiedemann, 2002). En la OM se localizan además proteínas imprescindibles en la dinámica mitocondrial (Mfn1,2; Fis1) y proteínas relativas al proceso de apoptosis como

la familia Bcl2 (Becker et al., 2009). Además, la OM es imprescindible para la interacción de la mitocondria con otros componentes celulares (Hayashi et al., 2009) como el citoesqueleto (Glater et al., 2006, Hollenbeck and Saxton, 2005), el retículo endoplasmático (RE) a través de los contactos conocidos como membranas mitocondriales asociadas (MAM) (Hayashi et al., 2009) (Marchi et al., 2014) o a través del complejo ERMES que contiene dos proteínas de la OM (Mdm10 y Mdm34) (Kornmann and Walter, 2010), y con otras mitocondrias a través de las uniones intermitocondriales (IMJC) (Picard et al., 2015).

Por otro lado, la membrana interna (IM) está compuesta por un 80% de proteínas y un 20% de lípidos (Palade, 1953) y constituye una barrera muy selectiva siendo impermeable a todo tipo de moléculas incluidos los iones. Esto permite mantener el gradiente electroquímico y la funcionalidad del sistema OXPHOS (Kuhlbrandt, 2015). En la membrana interna podemos distinguir dos compartimentos: la superficie periférica de la membrana (IBM) y las crestas mitocondriales (Zick et al., 2009). En la IBM se encuentran la translocasa TIM encargada de transportar proteínas al interior de la matriz mitocondrial (Pfanner and Meijer, 1997) y otras proteínas como Mia40 y Oxa1, esenciales para el correcto ensamblaje y localización de las proteínas de la membrana interna (Herrmann and Neupert, 2003). En un principio, se postuló que las crestas mitocondriales eran simples invaginaciones de la membrana interna que se proyectan a la matriz mitocondrial (Palade, 1952). Posteriormente se supo que son estructuras casi cerradas, separadas del espacio intermembrana por estrechas uniones tubulares (denominadas en inglés *cristae junction*) y en la que residen la mayor parte de los complejos respiratorios pues su organización limita la difusión de moléculas importantes para el sistema OXPHOS (Mannella, 2000, Perkins and Frey, 2000). Estos contactos dependen del sistema conocido como MICOS (Harner et al., 2011) compuesto por proteínas de la membrana IM que, al oligomerizar, provocan su curvatura (Barbot et al., 2015). A pesar de que la formación y remodelamiento de las crestas mitocondriales depende de muchos factores (Zick et al., 2009), entre ellos, cabe destacar la dimerización de la ATP sintasa o complejo V (CV) de la OXPHOS, que en su forma dimérica puede generar una curvatura de la IM promoviendo así la formación de crestas (Davies et al., 2012, Paumard et al., 2002).

Por último, definida por la IM, se encuentra la matriz mitocondrial. En ella se encuentran las proteínas implicadas en procesos metabólicos como el ciclo de Krebs, la

β -oxidación de ácidos grasos, el ciclo de la urea o la biosíntesis de pirimidinas (Frey and Mannella, 2000, Logan, 2007). Además, en la matriz mitocondrial reside el DNA mitocondrial (mtDNA) y las proteínas necesarias para su replicación y transcripción. El mtDNA contiene la información que codifica para 13 proteínas de la cadena de transporte electrónico y 24 RNAs necesarios para su síntesis (2 RNAs ribosómicos y 22tRNAs) el correcto mantenimiento de este genoma es imprescindible para el funcionamiento de la mitocondria (Schon et al., 2012).

1.1.2. Función mitocondrial.

Desde la descripción de su función bioenergética, se han ido descubriendo nuevos papeles que la mitocondria juega en la fisiología celular y, en especial, en patología. Entre algunas de las funciones más importantes que juega este orgánulo en el funcionamiento celular encontramos (i) el mantenimiento bioenergético y metabólico de las células (Mitchell, 1961, Boyer, 1997), (ii) la señalización intracelular mediada por especies reactivas de oxígeno (ROS) (Murphy, 2009, Scialo et al., 2016, Formentini et al., 2012), (iii) y calcio (Llorente-Folch et al., 2015, Satrustegui et al., 2007), así como (iv) la regulación de la ejecución de la muerte celular (Wang, 2001, Bonora et al., 2014).

a) Producción de energía: La principal función de la mitocondria es la obtención de energía metabólica en forma de ATP en el proceso de OXPHOS. En este proceso, la cadena de transporte electrónico (ETC) genera un gradiente electroquímico oxidando los sustratos generados en distintos procesos catabólicos con la finalidad de reducir el oxígeno molecular en agua en la denominada respiración mitocondrial. Finalmente, el gradiente electroquímico generado en este proceso es utilizado por la ATP sintasa para sintetizar ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (Pi) (Mitchell and Moyle, 1965). Este proceso será detallado en el apartado 1.2. de la Introducción.

b) Producción de ROS: Otro proceso estrechamente ligado con la ETC y el consumo de oxígeno mitocondrial, es la producción de ROS (Holmstrom and Finkel, 2014). El anión superóxido (O_2^*) es la primera especie que se libera en este proceso debido a la reducción indirecta del oxígeno molecular. La producción de superóxido en la cadena de transporte electrónico tiene lugar en los complejos CI y CIII (Balaban et al., 2005), aunque existen descritos hasta 8 sitios productores de O_2^* y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en enzimas donadoras de NADH y FADH₂ (Brand, 2016). Los ROS producidas por CI son liberados a la matriz mitocondrial, mientras que las generados por CIII son liberados mayoritariamente al espacio intermembrana, como sugiere la localización diferencial de

las proteínas oxidadas por uno u otro complejo (Balaban et al., 2005, Bleier et al., 2015). La superóxido dismutasa mitocondrial es la encargada de dismutar el anión O_2^{\bullet} a H_2O_2 . Este derivado es capaz de difundir a través de las membranas biológicas y cumple con una importante función señalizadora (D'Autreaux and Toledano, 2007) en condiciones fisiológicas en las que media procesos como la diferenciación celular, inmunidad, envejecimiento y homeostasis mitocondrial (D'Autreaux and Toledano, 2007). El procesamiento mitocondrial del H_2O_2 tiene lugar en enzimas como la glutatión peroxidasa 1 (GPx-1) que utiliza el glutatión reducido [GSH] como co-sustrato en la reducción del H_2O_2 a H_2O (Esposito et al., 2000). Por otra parte, las peroxirredoxinas 3 y 5 (Prx3 y Prx5) reducen el H_2O_2 utilizando su reacción acoplada con la tiorredoxina 2 (Trx2) (Handy and Loscalzo, 2012). La glutatión reductasa (GR) y Trx reductasa (TrxR) reducen el glutatión [GSSG] y la Trx oxidados para mantener el estado redox mitocondrial (Handy and Loscalzo, 2012). Un desequilibrio en la producción de ROS y su detoxificación dará lugar a un fenómeno de estrés oxidativo que puede acabar en muerte celular y el desarrollo de gran cantidad de patologías (Yun and Finkel, 2014).

c) Señalización por calcio: El calcio mitocondrial (Ca^{2+}) es un factor muy importante en múltiples funciones celulares desde el control del metabolismo y la producción de ATP hasta la regulación de la muerte celular (Rizzuto et al., 2012). En la célula, el principal punto de almacenaje de Ca^{2+} es el RE. Sin embargo, las mitocondrias poseen la capacidad de almacenar y liberar calcio de manera transitoria (Drago et al., 2011, Rizzuto and Pozzan, 2006, Contreras et al., 2010). Existe una relación directa entre la mitocondria y el RE mediante los contactos MAM, encargados de mediar la transferencia de iones, metabolitos, proteínas y fosfolípidos, incluyendo el Ca^{2+} (Lopez-Crisosto et al., 2015). En este contexto, destaca el complejo ERMES (Kornmann et al., 2009) que además de las dos proteínas mitocondriales descritas anteriormente, está compuesto por una proteína del RE y otra citosólica y está directamente relacionado con la síntesis de fosfolípidos y la señalización mediada por Ca^{2+} (Kornmann et al., 2009). Entre sus funciones señalizadoras, destaca la activación de la adenilato ciclasa mitocondrial (sAC) (Di Benedetto et al., 2013) encargada de mediar la activación de quinasas como la PKA y, así, regular la eficiencia de la OXPHOS (Acin-Perez et al., 2009). Estos aspectos serán descritos en el apartado 1.2.4 de la Introducción.

d) Muerte celular: La apoptosis es un proceso de muerte programada que se caracteriza por eventos como la reducción del volumen celular, fragmentación del núcleo,

formación de vesículas en la membrana plasmática y fagocitosis (Kroemer, 2007). Este proceso es necesario para la correcta homeostasis y desarrollo del organismo, participa en el envejecimiento y permite eliminar células dañadas y/o potencialmente tumorigénicas. La principal forma de apoptosis en vertebrados está mediada por la mitocondria y comienza con el proceso de permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP) (Green and Kroemer, 2004) que se considera el punto de no retorno en la sucesión de eventos que dan lugar a la muerte celular por apoptosis (Kroemer, 2007). Dentro de los eventos que tienen lugar tras la permeabilización de la membrana mitocondrial se encuentran la pérdida del potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$), que rápidamente causa una parada en la producción de ATP mitocondrial y otras rutas de biosíntesis de moléculas; así como la translocación de proteínas que residen en el espacio intermembrana mitocondrial hacia el citosol perdiendo sus funciones vitales (ej: Cyt c, Smac/ Diablo; Omi/HtrA2, AIF, EndoG) (Kroemer, 2007, Galluzzi et al., 2008). Una vez que se han liberado, estas proteínas activan mecanismos dependientes e independientes de caspasa ejecutando finalmente la muerte celular (Kroemer, 2007). Las proteínas de la familia Bcl-2 juegan un papel fundamental en la inducción (Bax, Bid, Bad) o represión (Bcl-XL, Bcl-2) del MOMP. Proteínas de la maquinaria de fusión/fisión mitocondrial, metabolitos, p53 y Ca^{2+} también pueden participar en el proceso.

En los últimos años se ha puesto de manifiesto cómo las funciones pro o antiapoptóticas de estas proteínas están directamente relacionadas con la bioenergética mitocondrial. Por ejemplo, se ha descrito que la proteína antiapoptótica Bcl-xL, interacciona con la subunidad βF_1ATP para regular la eficiencia del metabolismo energético (Alavian et al., 2011) y que Bax necesita la ATP sintasa para ejercer su función proapoptótica (Matsuyama et al., 1998). El proceso de MOMP puede suceder acompañado o no de permeabilidad de la membrana interna que se produce por la apertura sostenida del poro de permeabilidad transitorio (PTP) cuya relación con la ATP sintasa y muerte celular (Giorgio et al., 2013) se describirá en el apartado 1.1.2 de la Introducción. La regulación de la apoptosis por parte de la actividad mitocondrial ocurre también a otros niveles: la cantidad de ATP y ROS producidos por la mitocondria. Ambos intervienen directamente en la elección del tipo de programa de muerte celular que se va a ejecutar. Altos niveles de ATP están relacionados con la formación del apoptosoma (Vakifahmetoglu-Norberg et al., 2017) mientras que niveles bajos de ATP activan necrosis (Golstein and Kroemer, 2007) o autofagia (Levine and Kroemer, 2008). En

cuanto a la respuesta celular a ROS, esta depende de su intensidad, pudiendo señalar muerte celular si los niveles son elevados o proliferación si son moderados (Orrenius et al., 2007, Formentini et al., 2012).

1.1.3. Dinámica mitocondrial.

La mitocondria es un orgánulo dinámico y móvil capaz de formar una red heterogénea en función de las necesidades metabólicas y energéticas de la célula sometándose a los procesos conocidos como fisión y fusión (Twig et al., 2008). Ambos procesos son cruciales para mantener (i) la integridad de la mitocondria, (ii) la conectividad bioquímica y eléctrica, (iii) el recambio mitocondrial y (iv) la segregación y protección del mtDNA (Okamoto and Shaw, 2005, Westermann, 2002). Además, el equilibrio entre los procesos de fisión y fusión se ha descrito como capaz de regular diferentes aspectos de la biología de la célula eucariota, desde la viabilidad hasta la senescencia y el envejecimiento (Liesa and Shirihai, 2013, Twig et al., 2008).

Durante la fusión mitocondrial las mitocondrias unen progresivamente sus membranas formando una mitocondria más alargada y fusionando sus 4 compartimentos (Sebastian et al., 2017). En mamíferos se han descrito al menos tres GTPasas localizadas en la mitocondria que regulan la fusión: mitofusina 1 (Mfn1) y mitofusina 2 (Mfn2), encargadas de fusionar las membranas internas; y la proteína de la atrofia óptica-1 (OPA1), encargada de fusionar las membranas externas (Hoppins et al., 2007, Sebastian et al., 2017). Por otra parte, la fisión consiste en la disgregación de una sola mitocondria en dos mitocondrias más pequeñas, con la repartición aleatoria de su contenido en los dos orgánulos nacientes (Sebastian et al., 2017). Este proceso está regulado por proteínas como DRP1, FIS1, MFF, MID49 Y MID 51 y dará lugar a dos mitocondrias con elevado y bajo $\Delta\Psi_m$, respectivamente (Sebastian et al., 2017). Durante este proceso, si la mitocondria de bajo potencial de membrana no llega a fusionarse con otra mitocondria, quedará despolarizada y será eliminada por mitofagia (Twig et al., 2008, Sebastian et al., 2017).

Como se ha mencionado anteriormente, un papel fundamental que tiene la dinámica mitocondrial, entre otros, es su relación con el estado energético de la célula (Cogliati et al., 2013, Pernas and Scorrano, 2016). En una situación en la cual la mitocondria se encuentre en privación de nutrientes, el proceso de fusión creará una red elongada que proteja a las mitocondrias de ser degradadas y aumentará la eficiencia de producción de ATP (Gomes et al., 2011a, Rambold et al., 2011). En la situación

opuesta, con un exceso de nutrientes, las mitocondrias tienden a fisionarse desacoplando el sistema OXPHOS de la producción de ATP (Molina et al., 2009). Estas observaciones han conducido al estudio de la relevancia de la dinámica mitocondrial específica de tejido, ya que la adaptación de la eficiencia bioenergética y de la capacidad de síntesis de ATP, ante la disponibilidad de nutrientes, difiere entre tejidos y está íntimamente ligada a su fisiología específica (Liesa and Shirihai, 2013).

1.2. El sistema OXPHOS.

El sistema OXPHOS se compone, de forma resumida, de una serie de complejos mitocondriales (CI-IV) que conforman la ETC y de la ATP sintasa o complejo V (CV). Estos complejos localizados en la IM tienen como funciones más importantes la producción y mantenimiento del gradiente electroquímico de protones ($\Delta\Psi_m + \Delta pH$) y la síntesis de energía en forma de ATP (Figura 1) (Mitchell and Moyle, 1965).

1.2.1. Componentes y organización del sistema OXPHOS.

1.2.1.1. Componentes de la ETC.

Los complejos mitocondriales de la ETC incluyen 3 enzimas encargadas del transporte de electrones a través de la membrana interna mitocondrial y el simultáneo bombeo de protones al espacio intermembrana: complejo I (CI) (NADH-ubiquinona oxidoreductasa), complejo III (CIII) (ubiquinolcitocromo bc_1 oxidoreductasa) y complejos IV (CIV) (citocromo c oxidasa o COX) (Figura 1). Además del CI existen otras deshidrogenasas reductoras de ubiquinona, que aportan electrones a través de $FADH_2$ a la ETC, aunque no bombean protones al espacio intermembrana. Estas son el complejo II (CII) (succinato-quinona oxidoreductasa), la flavoproteína transferidora de electrones:ubiquinona reductasa (ETF-QO), la glicerol-3- fosfato deshidrogenasa (GPDH) y la dihidroorotato deshidrogenasa (DhD), entre otras (Alcazar-Fabra et al., 2016) (Figura 1). Todas estas enzimas generan una conexión directa entre el sistema OXPHOS y otras rutas metabólicas como son el ciclo de Krebs, la β -oxidación y la síntesis de pirimidinas (Alcazar-Fabra et al., 2016).

Introducción

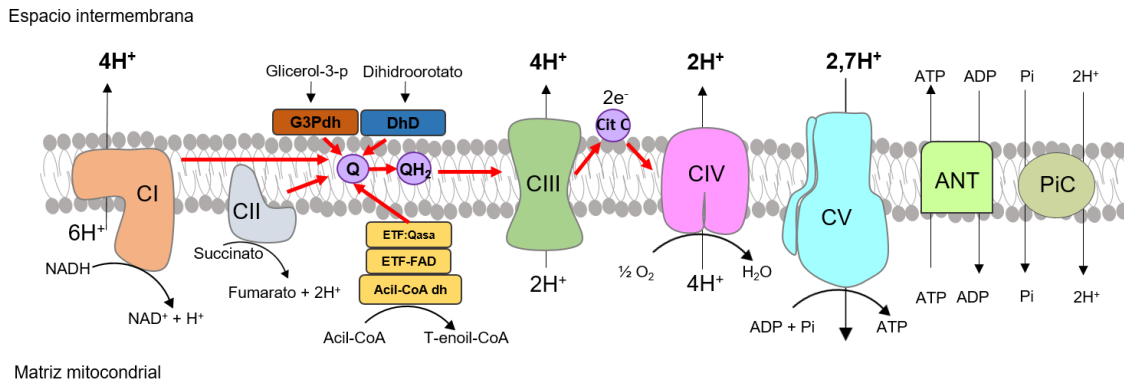


Figura 1. El sistema OXPHOS. El diagrama muestra los 4 complejos (CI-CIV) de la cadena de transporte electrónico (ETC) y la ATP sintasa (CV). La translocación de protones (H^+) hacia el espacio intermembrana por los complejos I, III y IV genera un gradiente electroquímico que la ATP sintasa usa para sintetizar ATP a partir de ADP y Pi. Las flechas rojas indican el consumo de los sustratos NADH, succinato o FADH₂ y el consecuente transporte de electrones por los complejos hasta reducir el O₂ en H₂O. Se muestran la flavoproteína transferidora de electrones:ubiquinona reductasa (ETF-Qo), la glicerol-3- fosfato deshidrogenasa (GPDH) y la dihidroorotato deshidrogenasa (DhD). CI: NADH deshidrogenasa; CII: succinato deshidrogenasa; CIII: citocromo bc₁; CIV: citocromo c oxidasa; CV: ATP sintasa; Cit C: citocromo c; Q: ubiquinona; QH₂: ubiquinol; ANT: translocador de nucleótidos de adenina y PiC: transportador de fosfato.

El proceso por el cual tiene lugar el transporte de electrones a través de la ETC consiste en diferentes fenómenos de óxido-reducción que comienza con la obtención de los electrones de las coenzimas de óxido-reducción NADH o FADH₂ obtenidos en el catabolismo de diferentes rutas bioenergéticas. Esta transferencia de electrones tiene lugar gracias a la presencia de cofactores redox que residen en el interior de los diferentes complejos y los transportadores móviles de electrones ubiquinona (CoQ), embebido en la membrana y responsable del paso de electrones desde el CI o desde distintas deshidrogenasas incluyendo el CII al CIII y el citocromo c (cit c), hidrosoluble y residente en el espacio intermembrana encargado del paso final de electrones del CIII al CIV, donde se produce la reducción de oxígeno molecular a agua (Figura 1). Este proceso, llamado respiración mitocondrial, está directamente ligado a la liberación de energía libre a medida que los electrones pasan por los complejos mitocondriales, que es utilizada para el bombeo de protones por los complejos CI, CIII y CIV a través de la IM hacia el espacio intermembrana, generando el gradiente electroquímico de protones que es fundamental para mantener la homeostasia mitocondrial y celular (Wojtczak et al., 1986).

El CI es el complejo más grande de la ETC. Su función consiste en catalizar la transferencia de dos electrones desde el NADH a la ubiquinona bombeando 4 protones al espacio intermembrana en el proceso (Barja, 1999, Kussmaul and Hirst, 2006). Se han

descrito 45 subunidades en mamífero (7 de ellas codificadas en el mtDNA) organizadas en forma de “L” distribuidas en dos dominios: el brazo periférico e hidrofílico proyectado a la matriz mitocondrial y un brazo hidrofóbico embebido en la membrana interna mitocondrial (Hunte et al., 2010, Zhu et al., 2016). Funcionalmente, en el CI se define el módulo N (NDUFS1, NDUFV1 y NDUFV2) encargado de oxidar el NADH, el módulo Q (NDUFS2, NDUFS3, NDUFS7 y NDUFS8) donde se encuentran los clústeres de Fe-S que transfieren los electrones a la ubiquinona y finalmente, el módulo P (ND1-6 y ND4L, todas ellas codificadas en mDNA) embebido en la membrana y encargado del bombeo de protones (Zhu et al., 2016, Guaras and Enriquez, 2017) (Figura 2).

El CII es el complejo más pequeño de la ETC y una importante enzima del ciclo de Krebs actuando como succinato deshidrogenasa (Lenaz and Genova, 2010). Oxida succinato a fumarato en la matriz mitocondrial reduciendo la ubiquinona en la membrana interna. Está compuesto por 4 subunidades (SDHA, SDHB, SDHC y SDHC) y 4 factores accesorios (SDHAF1-4) todas ellas codificadas por el nDNA (Sun et al., 2005) (Figura 2).

El CIII cataliza la transferencia de electrones del ubiquinol al citocromo c bombeando cuatro protones al espacio intermembrana (Bottani et al., 2017). Su estructura se compone por un homodímero simétrico con una de sus 11 subunidades codificada en el mtDNA (Fernandez-Vizarra and Zeviani, 2015) (Figura 2).

El CIV cataliza el último paso de la respiración mitocondrial tomando los electrones del citocromo c y reduciendo el oxígeno molecular para formar agua bombeando dos protones al espacio intermembrana. Está formado por 13 subunidades. El centro catalítico del complejo está formado por las subunidades MTCO1 y MTCO2 codificadas en el mtDNA que contienen los motivos hemo a y hemo a3 y los centros CuA y CuB necesarios en la transferencia de electrones. MTCO3, la subunidad mitocondrial restante, forma parte del núcleo estructural de la enzima y podría promover la traslocación de protones (Fernandez-Vizarra et al., 2009, Soto et al., 2012) (Figura 2).

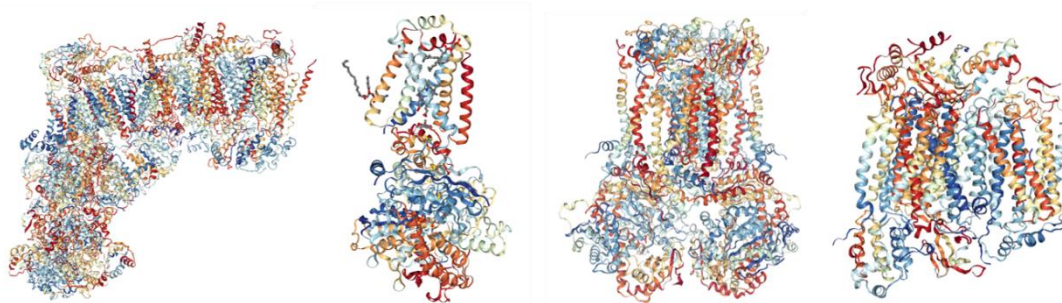


Figura 2. Estructura cristalográfica de los complejos de la ETC. Estructuras cristalográficas del CI (PDB: 5LC5) (Zhu et al., 2016), CII (PDB: 1ZOY) (Sun et al., 2005), CIII (PDB: 1BGY) (Iwata et al., 1998) y CIV (PDB: 2OCC) (Yoshikawa et al., 1998).

1.2.1.2. Organización de la ETC.

La organización de los complejos enzimáticos que forman la cadena de transporte electrónico ha supuesto un extenso tema de debate en los últimos años.

La primera teoría fue expuesta en estudios cinéticos realizados en los años 50-60 (Chance and Williams, 1955) y defendía que los complejos respiratorios se encontraban juntos y unidos como una sola entidad en la membrana interna mitocondrial asegurando una rápida catálisis de sustratos (Keilin and Hartree, 1947, Slater, 1953). Esta teoría recibió el nombre de “modelo sólido” (Keilin and Hartree, 1947).

Posteriormente, en 1986 se establecería la siguiente teoría, contrapuesta a la anterior, en la que se defendía que los complejos se encontraban libres, separados unos de otros y con capacidad de moverse a lo largo de la membrana donde el transporte de electrones tendría lugar por colisiones aleatorias entre ellos (Hackenbrock et al., 1986). Esta teoría recibió el nombre de “modelo fluido” (Hackenbrock et al., 1986).

El hecho que marcó un punto de inflexión en este debate y en el estudio de la organización de los complejos mitocondriales fue su resolución en una técnica conocida como Blue Native PAGE (BN-PAGE), una electroforesis nativa, desarrollada por Schägger y colaboradores en el año 2000. Gracias a esta técnica, fue posible describir la existencia de organizaciones supramoleculares de los complejos individuales en supercomplejos (SC) (Schagger and Pfeiffer, 2000). Comenzó así la interpretación de la organización de OXPHOS, gracias a la solubilización con detergentes de las membranas mitocondriales, que ha sido debatida desde argumentos que consideran la aparición de SC (SC) como artefactual hasta la demostración de su existencia y funcionalidad (Enriquez, 2016, Lobo-Jarne and Ugalde, 2018). Este descubrimiento hizo que, en 2008,

Enríquez y colaboradores acuñaron el concepto de “modelo de plasticidad” (Acin-Perez et al., 2008). Este modelo aúna las dos teorías anteriores explicando la coexistencia de complejos libres y SC en una organización dinámica (Acin-Perez et al., 2008, Enríquez, 2016) (Figura 3).

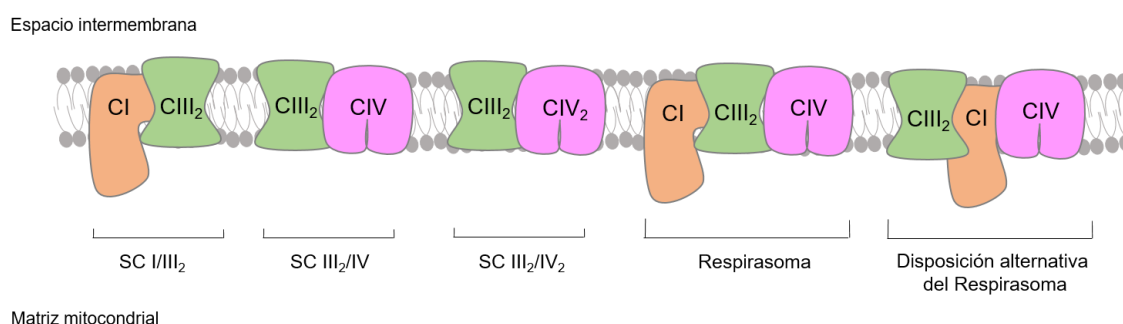


Figura 3. Composición de los supercomplejos descritos en mamíferos. Representación de las estructuras de SC que contienen principalmente el CI (naranja), CIII₂ (verde) y CIV (rosa). Se muestra también una estructura alternativa del respirasoma en la que el CI media la interacción entre CIII₂-CIV (CIII₂/CI/CIV) descrito en (Letts et al., 2016). Imagen modificada de (Cogliati et al., 2018).

Un segundo tema de debate surge en la explicación de la funcionalidad fisiológica o posibles ventajas que la formación de SC pueda conferir a las células. Se han postulado cuatro funciones a la organización supramolecular de la ETC recopiladas en (Enríquez, 2016) que consisten en (i) aumentar la eficiencia del transporte de electrones en función del sustrato disponible, (ii) reducir la formación de ROS, (iii) estabilizar los complejos respiratorios y (iv) proveer un ambiente estructural que permita el ensamblaje y la activación del CI. (Enríquez, 2016).

En 2001, Schägger propuso que la función de los SC sería mejorar la catálisis de reacciones de óxido-reducción que tienen lugar en el proceso de OXPHOS encontrándose los transportadores móviles de electrones, CoQ y cit c, dentro de los SC (Schagger, 2001). Se ha demostrado que la mayoría del CI se encuentra en SC unido al CIII, con o sin el CIV (Schagger and Pfeiffer, 2000). Se ha propuesto que la superorganización dinámica de los complejos en SC que da lugar a dos poblaciones funcionales de CIII según se encuentre o no unido al CI tendría como finalidad adaptar metabólicamente a la mitocondria a diferentes sustratos utilizando para ello los diferentes pools de CoQ y citocromo c (Lapunte-Brun et al., 2013). Además, la ETC cuenta con tres poblaciones de CIV, una en la interacción con los CI y CIII formando el respirasoma que recibe electrones del NADH, otra que interacciona con el CIII que no se asocia a CI y recibe

electrones del FAD, y una tercera población de CIV libre que puede recibir electrones tanto del CI+CIII como el CIII libre. Según la hipótesis propuesta por Lapuente-Brun (Lapuente-Brun et al., 2013) serían las formaciones CI+CIII y CIII+CIV (Figura 3) las que definen las poblaciones funcionales de CoQ y cit c que portan electrones desde el NADH o FADH₂, optimizando la eficiencia del transporte de electrones (Lapuente-Brun et al., 2013).

La proporción de electrones que entran a la ETC desde el NADH y el FADH₂ varían con la fuente de carbono. El metabolismo oxidativo de una molécula de glucosa genera diez electrones de NADH y dos de FADH₂, es decir, una razón NADH:FADH₂ de 5; sin embargo, desde la oxidación de un ácido graso como el palmitato esta razón sería de 2 (Speijer, 2011). Se ha demostrado que la superestructura de la ETC se reorganiza en respuesta al cambio de sustrato de glucosa a ácidos grasos en ratones con diferentes dietas y en ayuno. Cuando el flujo de electrones que proviene del FADH₂ satura la capacidad oxidativa del pool de CoQ, el CI se degrada liberando el CIII de su asociación preferencial por el CI para recibir los electrones derivados del FADH₂ (Lapuente-Brun et al., 2013). Si la adaptación de la ETC a los requerimientos energéticos no tiene lugar, se desencadena una elevada producción de ROS (Speijer, 2011). Recientemente, se ha demostrado que esta adaptación se regula por la ratio de CoQ que pasa de estar reducido a oxidado. La saturación de la capacidad oxidativa del CoQ induce el transporte reverso de electrones (RET) desde el CoQ reducido al CI, esto conlleva un aumento significativo de la producción de ROS en el CI que desencadenan la degradación y desintegración del complejo. Por lo tanto, el estado redox del CoQ funciona como sensor metabólico que regula la organización de la ETC con la finalidad de mantener un equilibrio y optimizar el consumo del sustrato predominante (Guaras et al., 2016).

La hipótesis de que el ensamblaje de SC es capaz de limitar la producción de ROS en la ETC se basa en la capacidad de los SC de crear un ambiente favorable para el mantenimiento de los componentes redox de los complejos en estado oxidado (Panov et al., 2007) para la transferencia de electrones de un complejo a otro (Seelert et al., 2009). Se han descrito al menos diez posibles sitios de producción de ROS en la mitocondria (Quinlan et al., 2013) siendo especialmente relevantes los complejos I y III. Se ha demostrado modulando el superensamblaje de los complejos I y III, en mitocondrias aisladas y preparaciones de liposomas, que la producción de O^{·2} y H₂O₂ por el CI es significativamente menor cuando está superensamblado al CIII. Así mismo, la actividad

de CI+CIII es significativamente mayor en condiciones en las que se preservan los SC (Maranzana et al., 2013). La relación entre el ensamblaje de CI en SC y la producción de ROS se ha demostrado en neuronas y astrocitos. Las neuronas son mucho más dependientes de OXPHOS y presentan el CI predominantemente ensamblado en SC; mientras que, los astrocitos tienen mayor cantidad de CI libre, lo que conlleva a una mayor producción de ROS (Lopez-Fabuel et al., 2016). Además, la sobreexpresión de NDUFS1 en astrocitos, necesaria para el ensamblaje del CI en SC, promueve la formación de SC conteniendo el CI y disminuyendo la producción de ROS (Lopez-Fabuel et al., 2016). La conexión entre la disociación de SC y el incremento en la producción de ROS se ha demostrado mediante la expresión de la forma activada del oncogen K-ras en fibroblastos de ratón lo que produjo una fuerte caída de los SC que contenían CI unido a un incremento significativo en la producción de ROS (Baracca et al., 2010).

Otra hipótesis, apoyada por el estudio de diferentes deficiencias de complejos mitocondriales en pacientes con patologías mitocondriales o en modelos *in vitro* para el estudio de estas enfermedades raras, sugiere que la superorganización de los complejos en SC y la interacción entre ellos pueda jugar un papel en su estabilidad. (Fernandez-Vizarra et al., 2007, Lamantea et al., 2002, Moran et al., 2010). En particular, estudios en pacientes con deficiencia en CIII (Schagger et al., 2004) y en cultivos celulares de fibroblastos murinos con falta de CIII, CIV o Cit c sugieren que la estabilidad de CI es dependiente de la presencia de esos otros tres componentes de la ETC y de su ensamblaje en SC (Acin-Perez et al., 2004, Diaz et al., 2006, Vempati et al., 2009). En consonancia, un modelo *knock out* para la subunidad accesoria del CI, NDUFS4, puso de manifiesto que, a pesar de la pérdida de estabilidad y función del CI aislado, el complejo pudo ser parcialmente estabilizado en ausencia de NDUFS4 formando SC (Calvaruso et al., 2012).

1.2.2. La ATP sintasa.

1.2.2.1. Estructura, ensamblaje y funciones de la ATP sintasa.

La producción de ATP mitocondrial en el proceso de OXPHOS tiene lugar en la ATP sintasa (Figura 1), un complejo cuya función principal es sintetizar ATP a partir de ADP y Pi utilizando el gradiente electroquímico de protones que el proceso de respiración mitocondrial genera. La ATP sintasa humana está constituida por 27 subunidades de 18 tipos, codificadas en el DNA nuclear (nDNA) y 2 codificadas en el mtDNA y que forman

dos dominios principales: el dominio Fo-ATPasa (formado por las subunidades a y 8c), embebido en la membrana interna mitocondrial y el dominio catalítico F1-ATPasa (formado por las subunidades 3 α , 3 β , γ , δ y ϵ) que sobresale en la matriz mitocondrial (Figura 4) (Walker, 2013). Ambos dominios están unidos por el brazo central que componen las subunidades γ , δ y ϵ del dominio F1 y el brazo periférico que contiene las subunidades b, d, F6 y OSCP (Figura 4) (Walker, 2013). Se han descrito otras subunidades adicionales cuando el complejo se purifica en presencia de fosfolípidos: e, f, g, A6L (Terzi et al., 1990, Chen et al., 2007), DAPIT y un proteolípido de 6.8-kDa (6.8PL) (Paivarinne and Kainulainen, 2001) cuyo papel en la actividad de la enzima no está aún esclarecido de manera determinante (Figura 4). El proceso de síntesis de ATP se basa en la asimetría que le confiere a todo el complejo la subunidad γ , que obliga a que cada una de las subunidades β catalíticas adopte una conformación distinta con propiedades catalíticas y de unión a nucleótidos variables (Walker, 2013).

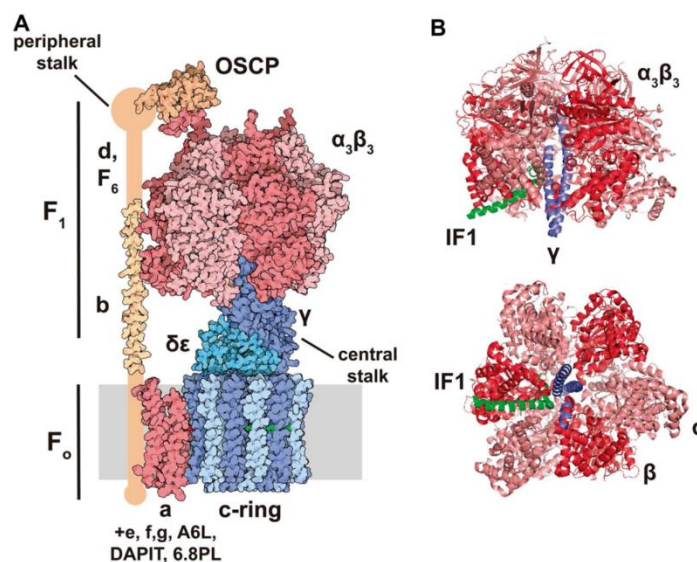


Figura 4. Estructura de la ATP sintasa bovina y el sitio de unión de IF1. **A.** El diagrama muestra los dos dominios de la ATP sintasa: F1 y el Fo. El dominio soluble F1 se compone de las subunidades 3 α 3 β (salmón/rojo) y γ (azul oscuro), δ y ϵ (azul claro), mientras que el dominio Fo embebido en la membrana está formado por las subunidades a (rojo) y el anillo de 8 subunidades c (azul claro/oscuro). Ambos dominios se unen por un brazo central (con las subunidades γ , δ , ϵ del dominio F1) y el brazo periférico (subunidades b, d F6, A6L, OSCP, en naranja) cuya estructura 3D no ha sido resultado del todo. **B.** Visión lateral y basal del dominio F1 bovino (subunidades α en color salmón, β en rojo y γ en azul) junto con un fragmento de IF1 (verde). IF1 se une a la interfaz $\alpha\beta$ a través de los residuos 1-37 y además contacta con la subunidad γ . Imágenes tomadas de (Cabezón et al., 2003) (PDB:1OHH) y creada con PyMOL en (Esparza-Molto et al., 2017).

La síntesis de ATP tiene lugar con la entrada de protones en dirección a la matriz mitocondrial a través de la subunidad a, que promueve la rotación del anillo de

subunidades c y del brazo central que dará lugar al cambio conformacional del dominio F1-ATPasa. La interconversión de subunidades β entre una conformación y otra se da por la rotación mecánica de la subunidad γ . Cada rotación de 360° hace que cada una de las 3 subunidades β pase por 3 estados produciendo la síntesis de 3 moléculas de ATP (Walker, 2013, Lee et al., 2015). El coste de generar un ATP citoplasmático por parte de la mitocondria es de 2.7 protones/molécula de ATP. La ATP sintasa es un complejo enzimático de actividad reversible. Hay que destacar que la función reversa de la ATP sintasa se da en situaciones hipóxicas y de despolarización mitocondrial y tiene como objetivo prevenir la pérdida del potencial de membrana mitocondrial a costa del consumo de ATP producido por glucólisis (Walker, 2013). La hidrólisis de ATP da lugar a la rotación del anillo de subunidades c en sentido contrario a la síntesis, lo cual genera un gradiente de protones a través de la membrana interna mitocondrial (Walker, 2013, Saita et al., 2015).

Se ha descrito que el proceso de ensamblaje de la ATP sintasa en *Saccharomyces cerevisiae* tiene lugar en dos pasos separados y coordinados que constan del (1) ensamblaje con el brazo periférico de Atp6 (homólogo de la subunidad a) y Atp8 (homólogo de la subunidad A6L) y (2) del ensamblaje de anillo de subunidades c con el dominio F1 (Zeng et al., 2007, Rak et al., 2011). Más adelante en el proceso de ensamblaje, participa el complejo conocido como INA, un complejo proteico expuesto en la matriz mitocondrial y contenido en la membrana interna que facilita el ensamblaje del brazo periférico (Lytovchenko et al., 2014). El proceso en humanos es muy similar al que tienen lugar en levadura (Fujikawa et al., 2015). Además, las subunidades DAPIT (Ohsakaya et al., 2011) y 6.8PL (Fujikawa et al., 2014) parecen estar involucradas en el proceso de ensamblaje ya que su silenciamiento en células HeLa produce la pérdida de la ATP sintasa (Ohsakaya et al., 2011). Un estudio reciente ha descrito en detalle este proceso de ensamblaje de la ATP sintasa humana mediante la interferencia de los genes que codifican las subunidades e , f , g , DAPIT y 6.8PL (He et al., 2018). Esto ha permitido identificar que la interferencia de dichos genes da lugar a un subcomplejo de ATP sintasa que consiste en el dominio F1 y 8 subunidades c donde se localiza IF1, y que se encuentra unido al brazo periférico con las subunidades e , f y g asociadas al dominio de membrana del brazo periférico. A este intermediario de la ATP sintasa se unen ATP6 y ATP8, ambos sintetizados en la mitocondria. Su asociación con el complejo se estabiliza gracias a la unión de 6.8PL y en este momento, es posible sintetizar ATP (He et al., 2018). La

estructura dimérica en levadura del dominio F_0 concuerda con este modelo de ensamblaje. El proteolípido 6.8PL (subunidad j en levadura) estabiliza a las subunidades ATP6 y ATP8 en el proceso de ensamblaje y los monómeros pueden dimerizar mediante interacciones entre las subunidades ATP6 y 6.8PL. Los dímeros están entonces enfrentados mediante la subunidad DAPIT formando oligómeros a lo largo de las crestas mitocondriales (He et al., 2018).

En los últimos años, se ha estudiado la importancia de los superensamblajes de la ATP sintasa (Wittig and Schagger, 2008). Se ha descrito que la formación de dímeros de la ATP sintasa son determinantes para la estructura mitocondrial ya que tienen un papel fundamental en la generación de las crestas mitocondriales en la membrana interna (Davies et al., 2011). Se ha demostrado en levadura (Buzhynskyy et al., 2007) y en mamíferos (Strauss et al., 2008) que los dímeros de ATP sintasa generan una curvatura en la membrana interna mitocondrial que promueve la formación de las crestas (Paumard et al., 2002). Estudios recientes sugieren que mientras los heterodímeros e-g promueven la curvatura de la membrana, la subunidad f estabiliza el contacto entre dos monómeros (Hahn et al., 2016). A pesar de que hay estudios que no apoyan esta idea (Dienhart et al., 2002, Tomasetig et al., 2002, Fujikawa et al., 2012), el inhibidor fisiológico de la ATP sintasa (IF1), del que hablaremos en el apartado 1.2.3 de la Introducción, se ha postulado como responsable de promover la dimerización de la ATP sintasa (Santacatterina et al., 2016, Gordon-Smith et al., 2001, Cabezon et al., 2003, Campanella et al., 2008).

Otra función de la ATP sintasa, más allá de la síntesis de ATP es la regulación de la muerte celular (Santamaria et al., 2006, Matsuyama et al., 1998). En los últimos años se ha estudiado el papel de la ATP sintasa en su forma dimérica en la formación del PTP (Giorgio et al., 2013, Bernardi et al., 2015). A pesar de que su composición no está perfectamente esclarecida, se ha postulado que este canal estaría localizado en el anillo de subunidades c de los dominios F_0 de los dímeros y entre sus características se define su alta conductancia dependiente de voltaje y de Ca^{2+} (Giorgio et al., 2018b). Con su apertura prolongada se genera un aumento brusco de permeabilidad de la membrana interna mitocondrial a solutos de baja masa molecular desencadenando la cascada apoptótica (Giorgio et al., 2013). Este proceso conlleva la despolarización mitocondrial, la inhibición de la respiración y la consecuente generación de ROS, con liberación del Ca^{2+} de la matriz y finalmente el hinchamiento de la mitocondria y liberación de proteínas intermembrana, muchas de ellas con función pro-apoptótica (Bernardi et al., 1999, Rasola

and Bernardi, 2007). Otros estudios sugieren que el PTP estaría formado no por todo el complejo sino por el anillo de subunidades c que forma parte del dominio F_0 de la ATP sintasa (Alavian et al., 2014). Se ha sugerido que la baja probabilidad de apertura del PTP a bajos niveles de pH pueda ser debido a la unión del inhibidor fisiológico IF1 a la ATP sintasa (Bernardi et al., 2015) relacionando la proteína directamente con procesos de muerte celular. Sin embargo, otros estudios explican la protección mediada por IF1 ante la muerte celular en células (Formentini et al., 2012, Faccenda et al., 2013) así como en modelo de ratón (Santacatterina et al., 2016, Formentini et al., 2014, Formentini et al., 2017b) debido al papel de IF1 en mitohormesis, término que define una programa de señalización en el cual un estrés mitocondrial leve lidera una respuesta de adaptación y mecanismo de protección celular que mejoran la esperanza de vida (Yun and Finkel, 2014, Ristow and Schmeisser, 2014).

En contraposición a esta teoría, Walker y colaboradores han desarrollado un modelo en células HAP1-A12 que carecen de los genes ATP5G1, ATP5G2 y ATP5G3, responsables de la síntesis de las subunidades c (Liu et al., 2017). En este modelo demuestran que estas células preservan las características del PTP sin ser capaces de formar el anillo de subunidades c concluyendo que no son las responsables de la formación de PTP (Liu et al., 2017). De hecho, células 143B ρ^0 , incapaces de sintetizar las subunidades ATP6 y ATP8 pero que contienen un subcomplejo de la ATP sintasa formando por el dominio F1 y el brazo periférico y las subunidades e, f y g también conservan las características del PTP. Por lo tanto, concluyen que ninguna de las subunidades de la ATP sintasa directamente implicadas en la traslocación de protones a través de la membrana se ve involucrada en la formación del PTP (Liu et al., 2017). Además, se ha propuesto que la apertura del poro se puede inhibir con ciclofilina D que interaccionaría la subunidad OSCP (Giorgio et al., 2013, Giorgio et al., 2018a). Continuando con estos estudios, se generaron las líneas celulares que carecen de la subunidad b (subunidad indispensable en la formación del brazo periférico) y OSCP, HAP1- Δb y HAP1- $\Delta OSCP$, respectivamente (He et al., 2017). De nuevo, ambas líneas celulares mantienen las características del PTP demostrando que el dominio de membrana no está involucrado en el PTP y que la subunidad OSCP no supone el sitio de unión de la ciclofilina D (He et al., 2017). De esta manera las únicas subunidades que podrían estar involucradas serían e, f, g, DAPI o 6.8PL. Aun así, continúa siendo un tema controvertido pues Bernardi y colaboradores sugieren que el análisis de los datos anteriores hace pensar

que el PTP se ve afectado por la eliminación de las subunidades c, b y OSCP y, por lo tanto, las conclusiones finales no quedarían totalmente demostradas (Bernardi, 2018).

1.2.2.2. Regulación de la ATP sintasa.

La actividad de la ATP sintasa se regula por la demanda energética celular, modificaciones covalentes de varias subunidades y diferentes metabolitos y proteínas reguladoras que interaccionan con la enzima (Chin et al., 2014, Das, 2003, Garcia-Bermudez and Cuezva, 2016). La mayor parte de la regulación directa sobre la expresión de la ATP sintasa se ha descrito por mecanismos de control post-transcripcionales en desarrollo (Ostronoff et al., 1995, Cuezva et al., 1997) y en oncogénesis (Willers and Cuezva, 2011). En células de leucemia mieloide crónica, la regulación de la expresión de la subunidad β F1ATPasa depende de la hipermetilación del gen ATP5B que limita la transcripción del mRNA y por lo tanto de la proteína (Li et al., 2010). Se ha descrito al menos una RBP, la proteína G3BP, que, mediante interacción con el 3'UTR del mRNA de β F1ATPasa, reprime su traducción (Ortega et al., 2010). Asimismo, dos miRNAs parecen regular negativamente la eficiencia de traducción de la subunidad β F1ATPasa: el miRNA miR-127-5p en desarrollo fetal humano (Willers et al., 2012) y el miR-101 relacionado con la respuesta antiviral ante HSV-1 (Zheng et al., 2011).

En lo relativo a modificaciones post-traduccionales, se ha descrito que la nitración de las tirosinas 345 y 368 de la subunidad β F1-ATPasa produce una inhibición importante de las actividades hidrolasa y sintasa del complejo (Haynes and Ron, 2010). Esta misma subunidad también se regula negativamente por acetilación de las lisinas 259 y 480 en *Drosophila* (Rahman et al., 2014), mientras que la proteína OSCP contiene un residuo (Lisina139) cuya acetilación también disminuye la actividad de síntesis del complejo en ratón (Vassilopoulos et al., 2014). En cuanto a fosforilaciones, se han descrito 67 sitios de fosforilación en 12 de subunidades del CV en mamíferos (Covian and Balaban, 2012). Sin embargo, aún no se ha determinado su relevancia funcional.

Un importante regulador celular de la ATP sintasa es el Ca^{2+} (Glancy and Balaban, 2012). Como se ha comentado anteriormente, las mitocondrias tienen un papel fundamental es la señalización intracelular mediada por Ca^{2+} (Rizzuto et al., 2012, Llorente-Folch et al., 2015). En este contexto, S100A1, una proteína que actúa como sensor de Ca^{2+} , se expresa predominantemente en músculo cardíaco e interacciona con el

dominio F1-ATPasa incrementando su actividad en presencia de Ca^{2+} (Boerries et al., 2007). En esta línea, el ratón KO para S100A1 muestra una reducción significativa en la actividad sintética de la ATP sintasa (Boerries et al., 2007). Por otro lado, CaBI, otra proteína sensible a Ca^{2+} , se disocia de la ATP sintasa en presencia de altos niveles de Ca^{2+} intracelular regulando su actividad sintética (Yamada and Huzel, 1988).

Otro tema de interés en la regulación de la ATP sintasa es el papel que juegan DAPIT y otras de las proteínas minoritarias. La subunidad DAPIT es una proteína básica e hidrofóbica compuesta por 58 aminoácidos cuyo extremo C-terminal se localiza en el espacio intermembrana (Figura 4) (Terzi et al., 1990, Lee et al., 2015). DAPIT está altamente sobreexpresada en células con un alto metabolismo aeróbico (Kontro et al., 2012). Estudios recientes han puesto de manifiesto que, en células HeLa, el knockdown de DAPIT da lugar a una dramática disminución en la actividad y contenido de la ATP sintasa (Ohsakaya et al., 2011). Por otra parte, la sobreexpresión de DAPIT en células HEK293T perjudica la biogénesis mitocondrial y promueve la generación de ROS dando lugar a un incremento en el flujo glucolítico y la activación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina (Kontro et al., 2015). Destaca también el llamado factor B, una proteína que llegó a considerarse parte de la ATP sintasa de mamíferos y que actuaría regulando de forma positiva su función (Belogradov, 2009). Otro regulador positivo recientemente descrito es la proteína de inducción por hipoxia *G0/G1 switch gene-2* (G0S2) que previene de la depleción de ATP en cardiomiocitos (Kioka et al., 2014). Recientemente, se ha descrito que en neuronas corticales la proteína 7q11.23 DNAJC30 facilita la síntesis de ATP uniéndose a la ATP sintasa y que un número de copias disminuido de 7q11.23 DNAJC30 da lugar a una disfunción mitocondrial en este modelo en cerebro (Tebbenkamp et al., 2018). Por último, destacaremos en el siguiente apartado el papel del inhibidor fisiológico de la ATP sintasa: el factor inhibidor de la ATPasa 1 (IF1).

1.2.3. El inhibidor fisiológico de la ATP sintasa: IF1.

1.2.3.1 Estructura y relación con la ATP sintasa.

IF1 fue descrito por primera vez en mitocondria de corazón bovino como una pequeña proteína que inhibía el dominio soluble F1 de la ATP sintasa (Pullman and Monroy, 1963). Tiene homólogos en plantas (Norling et al., 1990), levaduras (Hashimoto et al., 1981), en otros animales y humanos (Ichikawa et al., 2006, Cintron and Pedersen,

1979, Rouslin and Pullman, 1987). IF1 se codifica en el gen humano *ATP5IF1* localizado en el cromosoma 1 que en ratón se localiza en el cromosoma 4.

El *splicing* alternativo del mRNA primario de IF1 humano puede generar 3 formas de mRNA con distintas longitudes y secuencias que darán lugar a 3 isoformas de la proteína. La isoforma 1, la más larga (12,24 kDa, pI 9,34), proviene de tres exones que contienen una secuencia corta 3'UTR. La isoforma 2 (7,91 kDa, pI 7,96) también contiene tres exones, pero el último da lugar a una proteína más pequeña con una secuencia diferente en su extremo C-terminal. Por último, la isoforma 3 (6,59 kDa, pI 8,34) se traduce en la forma más corta que sólo contiene dos exones y una larga secuencia 3'UTR. Sin embargo, estudios recientes en humano y en ratón han puesto de manifiesto que sólo se expresa de forma significativa la isoforma más larga (Esparza-Moltó and Cuezva, 2018). La proteína es importada a la mitocondria donde se elimina una presecuencia de 25 residuos en el extremo N-terminal (Xu et al., 2009, Garcia-Bermudez and Cuezva, 2016). La proteína madura consta de un dominio N-terminal intrínsecamente desordenado (Gordon-Smith et al., 2001) que interacciona con la ATP sintasa y un dominio C-terminal de dimerización (Cabezón et al., 2001). Estudios bioinformáticos sugieren que los homólogos humano y de ratón de IF1 son proteínas intrínsecamente desordenadas (Esparza-Molto et al., 2017). Se sabe que este tipo de proteínas son componentes importantes de la señalización celular ya que pueden responder a señales intra o extracelular mediante cambios conformacionales hacia una estructura ordenada de la proteína mediando diferentes funciones biológicas (Wright and Dyson, 2015).

Se ha descrito que IF1 es una proteína básica con una capacidad de inhibición favorecida en condiciones de pH ácido. De hecho, ensayos *in vitro* muestran que su capacidad de inhibición óptima es a pH 5.8-7 y disminuye progresivamente por encima de la neutralidad (Cabezón et al., 2000, Panchenko and Vinogradov, 1985, Pullman and Monroy, 1963, Sah et al., 1993). En ensayos *in vitro*, a pH ácido, IF1 dimeriza en el extremo C-terminal con otra molécula de IF1 dejando libres los extremos N-terminales de ambas promoviendo la unión a la ATP sintasa (Figura 4). Sin embargo, a pH más elevado, IF1 se encontraría en forma tetramérica en la que los extremos N-terminales de dos dímeros interactúan impidiendo su unión a la ATP sintasa (Cabezón et al., 2000, Cabezón et al., 2001, Gordon-Smith et al., 2001). Los 5 residuos histidina conservados de la secuencia de IF1 (48, 49, 55, 56 y 70) son los responsables de regulación por pH. Poseen un pKa estimado cercano al rango de la regulación por pH de IF1, dando un papel

potencial a la protonación o desprotonación de estos residuos para el cambio de estructura de IF1 y su posterior interacción. La mutación de cada una de las histidinas 48, 49, 55 o 56 o de todas ellas en el péptido inhibitorio mínimo resulta en una pérdida de actividad y de capacidad de ser regulada por pH (Papa et al., 1996). El mutante H49K ha sido estudiado con detalle. Se ha visto por estudios de *cross-linking* que son los residuos 44-84 los que forman el dímero mientras que en el tetrámero interaccionan los fragmentos de residuos 32-84, estando el residuo H49 implicado en la reorganización de IF1 por cambios en la estructura proteica (Cabezón et al., 2000).

El sitio de unión de IF1 se ha descrito en el dominio catalítico F1 en la interfaz de las subunidades α y β utilizando una forma truncada del IF1 bovino (I1-60His) (Bason et al., 2014, Cabezón et al., 2001) (Figura 4). Cuando tiene lugar esta unión, el extremo N-terminal de I1-60 interacciona con la región en forma de hélice súper-enrollada de la subunidad γ , extendiéndose el péptido en la cavidad acuosa de la F1-ATPasa (Cabezón et al., 2003, Gledhill et al., 2007). De esta manera, IF1 se une a la ATP sintasa bloqueando la rotación del eje inhibiendo su actividad hidrolítica (Suzuki et al., 2014). Sin embargo, la idea de IF1 como un inhibidor unidireccional de la ATP sintasa (Walker, 2013, Campanella et al., 2008) ha cambiado en los últimos años (García-Bermúdez and Cuezva, 2016). En el año 2010, el laboratorio ha descrito la capacidad inhibitoria de IF1 o su mutante constitutivamente activo H49K sobre la actividad sintética de la ATP sintasa (Sanchez-Cenizo et al., 2010). Desde entonces, la inhibición de la actividad sintética de la ATP sintasa mediada por IF1 se ha demostrado en células en cultivo (Formentini et al., 2012, Sanchez-Cenizo et al., 2010, Sanchez-Arago et al., 2013a, García-Ledo et al., 2017) e *in vivo* en modelos de ratón transgénico de sobreexpresión en neuronas (Formentini et al., 2014), hígado (Santacatterina et al., 2016) y colon (Formentini et al., 2017b). En consonancia con estos estudios, se ha descrito que IF1 inhibe la translocación de protones mediada por la ATP sintasa cuando funciona hidrolizando o sintetizando ATP en corazón bovino en partículas submitocondriales y en una reconstrucción en liposomas de los dominios F_0F_1 (Zanotti et al., 2009, Esparza-Molto et al., 2017). La inhibición de la actividad sintética de la ATP sintasa también puede tener lugar mediante la activación de vías de señalización sensibles a la deprivación de energía y la subsecuente activación de la glucólisis (Santacatterina et al., 2016, Formentini et al., 2012, Sanchez-Cenizo et al., 2010, Formentini et al., 2014, Sanchez-Arago et al., 2013a). La evidencia más reciente de la inhibición bidireccional de la ATP sintasa mediada por IF1 se encuentra en la

descripción de su regulación por fosforilación, como se comentará en sucesivos capítulos (García-Bermúdez et al., 2015).

1.2.3.2. Funciones de IF1.

La primera función descrita fue la inhibición de la actividad hidrolítica de la ATP sintasa que tiene como objetivo final preservar los niveles de ATP celular en condiciones de estrés mitocondrial. Cuando el potencial de membrana disminuye debido a hipoxia o a otros estímulos que comprometen el gradiente de protones, la ATP sintasa revierte su actividad hidrolizando ATP para restaurar el gradiente. (Hatefi, 1985). En esta situación, el translocador de nucleótidos de adenina (ANT) también funciona de manera reversa (Metelkin et al., 2006), favoreciendo la entrada de ATP y por lo tanto su hidrólisis de ATP por parte de la ATP sintasa. La inhibición mediada por IF1 de esta actividad hidrolítica impide la depleción de ATP y por tanto tiene un efecto especialmente importante en hipoxia como se ha demostrado en modelos de sobreexpresión y silenciamiento de IF1 en células HeLa (Campanella et al., 2008). Así mismo, la inhibición de la actividad hidrolítica de la ATP sintasa afecta directamente al potencial de membrana. En este contexto, se demostró que, en condiciones de hipoxia, células que sobreexpresaban IF1 mantenían mucho peor el potencial de membrana que células con IF1 silenciado (Campanella et al., 2008). En concordancia con estos estudios, en un *screening* genético en células haploides humanas, se ha descrito que el silenciamiento de IF1 mejoraba la disfunción de la ETC causada por el tratamiento con antimicina A previniendo la muerte celular y manteniendo el $\Delta\Psi_m$ (Chen et al., 2014a). Otro proceso que está directamente relacionado con el $\Delta\Psi_m$ es la mitofagia (Youle and Narendra, 2011). El silenciamiento de IF1 conlleva un mejor mantenimiento del $\Delta\Psi_m$ y esto dificulta la estabilización de PINK1 en mitocondria, el reclutamiento de Parkin y el desencadenamiento del proceso de mitofagia (Lefebvre et al., 2013). Otra función descrita de IF1 es su implicación en la síntesis del grupo hemo por regulación de la actividad del enzima ferroquelatasa, enzima que cataliza la inserción de Fe^{2+} en el anillo de protoporfirina IX. La pérdida de IF1 impide la síntesis de hemoglobina en modelos hematopoyéticos de pez cebra, ratón y humano como consecuencia de la inhibición de la actividad ferroquelatasa y la elevación de pH mitocondrial. (Shah et al., 2012).

En nuestro grupo, nos hemos dedicado principalmente al estudio IF1 en la inhibición de la actividad sintética de la ATP sintasa. Esta inhibición sitúa la proteína

como una herramienta clave en el estudio de inhibición de la OXPHOS ya que hemos demostrado que la sobreexpresión de IF1 da lugar a una reprogramación metabólica celular mediando la inhibición de la OXPHOS que lidera un aumento en el flujo glucolítico celular (Formentini et al., 2014, Formentini et al., 2012, Sanchez-Arago et al., 2013a, Sanchez-Arago et al., 2013c, Sanchez-Cenizo et al., 2010, Garcia-Ledo et al., 2017). En concordancia, el silenciamiento de IF1 produce una menor actividad glucolítica y una mayor capacidad OXPHOS (Formentini et al., 2012, Sanchez-Cenizo et al., 2010). De hecho, otros grupos han demostrado que el silenciamiento de IF1 en células β -pancreáticas da lugar a una respiración mitocondrial y producción de ATP significativamente mayores (Kahancova et al., 2018). Una consecuencia directa de la inhibición de OXPHOS es la señalización mediada por ROS. En el laboratorio se ha demostrado en diversos modelos celulares que la sobreexpresión de IF1 produce una señal de anión superóxido mitocondrial (Formentini et al., 2012, Sanchez-Arago et al., 2013a) que genera una señal retrograda al núcleo que implica a diferentes rutas de señalización dependiendo del tejido que activan programas de proliferación celular y de prevención de la muerte (Formentini et al., 2012, Formentini et al., 2014, Sanchez-Arago et al., 2013a, Santacatterina et al., 2016, Formentini et al., 2017b). En células de carcinoma de colon (Formentini et al., 2012) y de ovario, pulmón y mama (Sanchez-Arago et al., 2013b) la sobreexpresión de IF1 produjo una resistencia significativa a muerte apoptótica inducida por estaurosporina comparado con las células control, todo ello dependiendo de la producción de ROS mitocondriales y de la activación de la proteína anti-apoptótica Bcl-xL.

IF1 juega también un importante papel en diferenciación celular. En un modelo de diferenciación osteogénica la reducción de la expresión de IF1 es progresiva con la diferenciación y con el cambio a un metabolismo más dependiente de OXPHOS (Sanchez-Arago et al., 2013c). El silenciamiento de la proteína en células madre mesenquimales acelera el proceso de diferenciación (Sanchez-Arago et al., 2013c). El proceso contrario de paso de MEFs a células madre pluripotentes inducidas (iPS) en ratón también implica una acumulación de los niveles de IF1 como parte del proceso de reprogramación metabólica con un fenotipo mayoritariamente glucolítico (Vazquez-Martin et al., 2013, Prieto et al., 2018).

En cuanto al papel de IF1 *in vivo*, en el laboratorio se han desarrollado varios modelos de ratón transgénico que sobreexpresan la proteína de manera tejido específica.

Además de observar una inhibición en la actividad sintética de la ATP sintasa, los ratones no presentan un fenotipo aparente en cerebro, hígado o colon (Formentini et al., 2014, Santacatterina et al., 2016, Formentini et al., 2017b). Sin embargo, cuando los ratones son expuestos a un estímulo perjudicial, la respuesta de protección frente a muerte de los ratones que sobreexpresa IF1, es clara. En particular, la sobreexpresión de IF1 palía *in vivo* la muerte apoptótica neuronal inducida por ácido quinolínico gracias a la activación de vías de pre-condicionamiento metabólico y protección neuronal como son p70S6K, c-Fos y el eje NFκB/Bcl-xL (Formentini et al., 2014). En hígado, el daño hepático producido por paracetamol es paliado en los ratones que sobreexpresan IF1 activando vías de protección como el eje NFκB/Bcl-xL y la respuesta antioxidante mediada con Nrf-2 (Santacatterina et al., 2016). En colon, los ratones que sobreexpresan IF1 se ven protegidos frente a la inducción de colitis con dextrano (DSS) activando AMPK, la respuesta antioxidante mediada con Nrf-2 y, muy notoriamente, la respuesta inmune mediada por macrófagos M2 y linfocitos T reguladores (Formentini et al., 2017b). Recientemente, se ha propuesto IF1 como proteína implicada en la regulación del metabolismo lipídico y síndrome metabólico. El estudio de una gran cohorte de pacientes ha revelado un aumento significativo en la razón IF1/βF1-ATPasa en pacientes obesos y diabéticos en comparación con pacientes no obesos ni diabéticos (Formentini et al., 2017a). De hecho, en cultivo primario derivado de células de músculo esquelético de estos pacientes se ha demostrado que la inhibición de la ATP sintasa mediada por IF1 causa alteraciones en la oxidación de ácidos grasos y en la resistencia a insulina en pacientes obesos y diabéticos (Formentini et al., 2017a).

1.2.3.3 Regulación de IF1.

La importancia fisiológica y patológica de IF1 hace de su regulación un importante campo de estudio. Una característica fisiológica fundamental de la proteína es su expresión tejido específica como se ha demostrado recientemente en tejidos de ratón y humano (Esparza-Molto et al., 2018). Estudiando por western blot la expresión cuantitativa de IF1 y de la subunidad βF1-ATPasa en relación a las proteínas recombinantes correspondientes, en humanos se ha descrito que el corazón es el tejido con más cantidad de IF1, seguido de cerebro y de riñón e hígado. Hay que destacar que la cantidad relativa de mRNA de IF1 fue muy similar en hígado, corazón y riñón siendo el doble que en cerebro (Esparza-Molto et al., 2018). En tejidos de ratón, el riñón, cerebro

y colon mostraron la mayor expresión de IF1 siendo casi imperceptible en corazón e hígado. Riñón y cerebro mostraron una expresión similar de mRNA y mayor que en corazón, colon y pulmón y mucho mayor que en riñón e hígado (Esparza-Molto et al., 2018).

Se ha sugerido que la hipoxia, y en concreto el aumento de los niveles de la subunidad α de HIF-1 (HIF-1 α), conlleva un aumento correspondiente de los niveles de mRNA de IF1 y de sus niveles proteicos tanto en hígado séptico de rata como en un modelo *in vitro* aumentando los niveles de HIF-1 α por tratamiento con CoCl₂ (Huang et al., 2011). En cuanto a la estabilidad de IF1 y su degradación, se ha descrito que la proteína humana IER3 (o su homólogo en ratón IEX-1) interacciona directamente con IF1 por el extremo C-terminal de ésta y que la interacción afecta a la estabilidad por un supuesto envío a degradación por una vía de proteasas independiente del proteasoma (Shen et al., 2009). Se ha descrito que la calmodulina (CaM) tiene capacidad de unirse a IF1, regulando así su actividad inhibitoria sobre la ATP sintasa (Contessi et al., 2005, Pagnozzi et al., 2010, Pedersen and Hullihen, 1984). Al parecer, el dominio C-terminal de la CaM interacciona de forma calcio- dependiente y a pH ácido en una estequiometría 1:1 con la región N-terminal de IF1, favoreciendo la disociación de los dímeros (Contessi et al., 2005, Pagnozzi et al., 2010, Pedersen and Hullihen, 1984). Puesto que la CaM se encuentra exclusivamente en el citosol se ha propuesto que el complejo IF1-CaM podría regular el importe de IF1 a la mitocondria (Contessi et al., 2005, Contessi et al., 2007).

Otra manera de regular la expresión de IF1 es mediante proteínas de unión a RNA (RBP). En este contexto, Mourier y colaboradores establecieron un modelo de interferencia de la expresión de la proteína LRPPRC de manera específica en corazón de ratón. Observaron que la carencia de LRPPRC producía una deficiencia en el ensamblaje de la ATP sintasa acompañada de una acumulación significativa de los niveles de IF1 sin cambios en los niveles de mRNA (Mourier et al., 2014), lo que implica a la proteína de unión a mRNA como un regulador de la traducción y/o estabilidad proteica de IF1.

La expresión de IF1 varía significativamente también en patología. Estudios del laboratorio y de otros autores han puesto de manifiesto como IF1 se sobreexpresa significativamente en carcinomas prevalentes como son colon, pulmón, ovario y mama (Sanchez-Arago et al., 2013b, Sanchez-Cenizo et al., 2010). La sobreexpresión de IF1 en estos carcinomas se produce en ausencia de cambios significativos en la expresión de su mRNA (Sanchez-Arago et al., 2013b), lo que sugiere una regulación de tipo

principalmente post-transcripcional. Por esta razón, en los últimos años el laboratorio se ha dedicado al estudio de las modificaciones post-traduccionales de IF1. En el pasado se han descrito modificaciones post-traduccionales de acetilación y la succinilación en IF1, aunque sin ningún estudio de potencial funcionalidad (Rardín et al., 2013, Sol et al., 2012, Lundby et al., 2012, Park et al., 2013). Por otra parte, se describió que IF1 podía encontrarse fosforilado en análisis fosfoproteómicos masivos en sus serinas 39 (S14 según nomenclatura sin el péptido de localización mitocondrial) en músculo esquelético (Zhao et al., 2011) y líneas celulares tumorales (Sharma et al., 2014, Zhou et al., 2013) así como en su S63 (S38) (Zhou et al., 2013, Christensen et al., 2010). Un ensayo de doble-híbrido utilizando proteínas *in vitro* identificó IF1 como un potencial interactor de la proteína-quinasa 1 inducida por suero y glucocorticoides (SGK-1). Ensayos posteriores han confirmado la interacción de IF1 con SGK-1 (O'Keeffe et al., 2013), que, además, se ha localizado en mitocondria (Cordas et al., 2007) y está directamente relacionada con cáncer (Godbole et al., 2018).

Más recientemente, en el laboratorio hemos descrito que IF1 es fosforilado *in vivo* y en células en cultivo por una actividad quinasa dependiente de cAMP o proteína quinasa A (PKA) de la mitocondria (Figura 4) (García-Bermúdez et al., 2015). La fosforilación de IF1 en su residuo S39 impide la unión de la proteína con la ATP sintasa siendo este suceso el interruptor que desencadena la unión de IF1 en su forma defosforilada a la enzima, inhibiendo sus actividades hidrolítica y sintética (Figura 5) (García-Bermúdez et al., 2015). La inhibición de la vía PKA con inhibidores como H89 o la expresión del mutante fosfodeficiente de IF1 (pS39A) causan la unión de IF1 como se ha demostrado en ensayos de co-inmunoprecipitación y geles nativos con la ATP sintasa (García-Bermúdez et al., 2015). IF1 se encuentra en estado defosforilado, y por lo tanto activo inhibiendo la enzima en carcinomas de colon, pulmón y mama, así como en células en hipoxia y en células que se encuentran en progresión en fases S/G2/M del ciclo celular (García-Bermúdez et al., 2015). Además, la defosforilación de IF1 en corazón de ratón causada por la inhibición de la cascada β -adrenérgica provocada por el tratamiento con propranolol provoca la misma inhibición de la enzima poniendo de manifiesto su importancia *in vivo* (Figura 5) (García-Bermúdez et al., 2015). Se ha demostrado también que en tejidos de ratón de manera fisiológica conviven la forma fosfo y defosforilada de IF1 (Esparza-Molto et al., 2018). Además, un estudio en pacientes obesos y/o diabéticos reveló que IF1 se encontraba preferencialmente fosforilado en los pacientes sanos no

obesos en comparación con los pacientes obesos o con diabetes tipo 2 que presentaban IF1 defosforilado e inhibiendo la actividad sintética de la ATP sintasa (Formentini et al., 2017a).

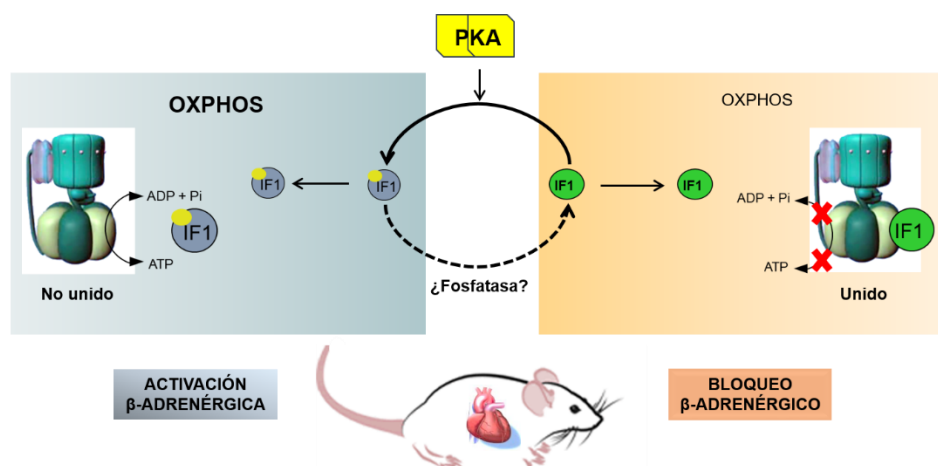


Figura 5. El estado de fosforilación de IF1 determina la eficiencia de la síntesis de ATP por fosforilación oxidativa. La actividad de una PKA mitocondrial (rectángulo amarillo) induce la fosforilación de IF1 (esfera azul y amarilla), regulando su actividad y la de la ATP sintasa. Cuando IF1 se encuentra en su estado fosforilado (esfera azul y amarilla) está libre y no puede unirse a la ATP sintasa que por tanto puede ejercer su actividad sintética de manera normal. Sin embargo, cuando IF1 se encuentra defosforilado (esfera verde) se une a la ATP sintasa inhibiendo sus actividades sintética e hidrolítica. Estas situaciones se han demostrado *in vivo* en corazón de ratón activando e inhibiendo la vía β -adrenérgica. Se desconoce si en el proceso interviene alguna fosfatasa (línea discontinua) cuya acción defosforile IF1. Imagen tomada y modificada de (García-Bermudez et al., 2015).

1.2.4. Regulación del sistema OXPHOS mediado por fosforilación.

Son múltiples las modificaciones post traduccionales que sufren las proteínas mitocondriales y que están relacionadas con la disponibilidad de nutrientes o hasta con las condiciones redox celulares. Además, estas modificaciones modulan las interacciones proteína-proteína regulando sus actividades y función mitocondrial. Entre las más estudiadas, se encuentran la acetilación, succinilación, glicosilación o la fosforilación (Stram and Payne, 2016). Centraremos la atención de este apartado en las modificaciones por fosforilación ya que serán objeto de estudio a lo largo de la tesis doctoral. En la Tabla 1, se enumeran las quinasas que han sido localizadas en mitocondria y la función con la que se relacionan (Lim et al., 2016).

Quinasas	Tipo de quinasa	Método por el que se evidencia su presencia en mitocondria	Funciones que modifica en la mitocondria
Abl	Tyr	Co-IP, WB, IF	Apoptosis
	<i>(Ito et al., 2001b, Qi and Mochly-Rosen, 2008)</i>		
Src	Tyr	WB, IP, Co-IP, array de quinasas	Citocromo c oxidasa, producción de ROS, respiración
	<i>(Miyazaki et al., 2003, Salvi et al., 2002, Itoh et al., 2005, Arachiche et al., 2008, Hebert-Chatelain et al., 2012, Ogura et al., 2012, Acin-Perez et al., 2014)</i>		
EGFR	Receptores de Tyr	WB, IP, IF	Apoptosis, respiración y metabolismo celular
	<i>(Demory et al., 2009, Cao et al., 2011, Dreier et al., 2012, Yue et al., 2008, Ding et al., 2012)</i>		
Akt	Ser/Thr	WB, IP, Co-IP, IF	Supervivencia y regulación de la respiración
	<i>(Bijur and Jope, 2003b, Miyamoto et al., 2008, Yang et al., 2013, Majewski et al., 2004, Barksdale and Bijur, 2009)</i>		
JNK	Ser/Thr	WB, IF	Apoptosis, neuroinflamación y biogénesis mitocondrial
	<i>(Ito et al., 2001a, Chauhan et al., 2004, Rumora et al., 2007, Nijboer et al., 2013, Deng et al., 2001)</i>		
ERK1/2	Ser/Thr	WB, IF	Respiración, producción de ATP, potencial de membrana, mitofagia, autofagia y muerte celular
	<i>(Baines et al., 2002, Rumora et al., 2007, Nowak et al., 2006, Monick et al., 2008, Dagda et al., 2008, Hernandez-Resendiz and Zazueta, 2014, Duarte et al., 2014)</i>		
p38 MAPK	Ser/Thr	WB, IF, GST	Apoptosis
	<i>(Baines et al., 2002, Ballard-Croft et al., 2005, Galli et al., 2008)</i>		
GSK3β	Ser/Thr	WB, Co-IP	MPTP y metabolismo energético
	<i>(Bijur and Jope, 2003a, Nishihara et al., 2007, Xi et al., 2009, Juhaszova et al., 2004)</i>		
PKA	Ser/Thr	WB, IF, DEAE, GST, actividad <i>in vitro</i>	Respiración y división mitocondrial
	<i>(Schwoch et al., 1990, Ma and Thomson, 2012, Acin-Perez et al., 2009, Sardanelli et al., 1996, Technikova-Dobrova et al., 1993, Technikova-Dobrova et al., 1994, Gomez-Chang et al., 2014, Tasken and Aandahl, 2004, Merrill and Strack, 2014, Ryu et al., 2005, Sardanelli et al., 2006, Gerbeth et al., 2013, Garcia-Bermudez et al., 2015)</i>		
PKC	Ser/Thr	WB, IP, IF	Respiración, canales de K ⁺ y apoptosis
	<i>(Ohnuma et al., 2002, Ogbi and Johnson, 2006, Ping et al., 2002, Jaburek et al., 2006, Waza et al., 2014)</i>		
PINK1	Ser/Thr	WB, IF	Traducción de complejos respiratorios
	<i>(Gasser, 2004, Chen et al., 2014b, Lutz et al., 2009, Liu et al., 2012, Gautier et al., 2008, Morais et al., 2009, Vincow et al., 2013, Gehrke et al., 2015)</i>		

Tabla 1. Quinasas localizadas en mitocondria. Se muestra una recolección de las quinasas localizadas en mitocondria y los residuos que fosforilan. Así mismo, se reporta la técnica utilizada en la detección, su función descrita en mitocondria y la referencia donde se describe. Adaptado de (Lim et al., 2016).

En cuanto a la presencia de quinasas no esencialmente mitocondriales dentro o en los alrededores de la mitocondria juegan un papel muy importante las llamadas proteínas de anclaje a quinasas-A (AKAPs) (Wong and Scott, 2004). Existen otras proteínas localizadas exclusivamente dentro de la mitocondria con funciones reguladoras. A nivel de fosforilación es muy llamativa la existencia de la proteína tirosín-fosfatasa localizada en mitocondria (PTPMT1) cuyo silenciamiento afecta a la fosforilación de proteínas mitocondriales (Pagliarini et al., 2005) con una destacada función en la diferenciación hematopoyética (Yu et al., 2013).

En el estudio de las quinasas localizadas en mitocondria (Tabla 1), destaca el papel de la PKA. La actividad PKA fue una de las primeras en ser descritas en el interior de la mitocondria (Papa et al., 1999, Sardanelli et al., 1996, Sardanelli et al., 1995, Technikova-Dobrova et al., 1994). En los últimos 20 años, múltiples estudios describen la relación de esta actividad quinasa con la regulación de la OXPHOS. La primera diana descrita fue la proteína NDUFS4 del CI, en este caso, la fosforilación de su residuo S173 permite su unión a la chaperona Hsp70 y su translocación a la mitocondria (De Rasmio et al., 2008). Además, la fosforilación mediada por PKA intramitocondrial del CI parece modular su degradación por proteasas mitocondriales. La inhibición de la vía PKA, provoca la disminución de expresión de NDUFA9, NDUFV2 y NDUFS4 desestabilizando el complejo y disminuyendo su actividad (De Rasmio et al., 2015). La actividad del CIV también está mediada por la señalización cAMP/PKA (Acin-Perez et al., 2011). De hecho, la actividad del CIV se inhibe en presencia de una razón alta de ATP/ADP (Bender and Kadenbach, 2000). Este proceso es controlado por la fosforilación dependiente de PKA de múltiples subunidades del CIV (Bender and Kadenbach, 2000). De hecho, la fosforilación de S58-COXIV-1 previene la inhibición de la actividad del CIV por ATP (Acin-Perez et al., 2011).

En situaciones de hipoxia, PKA fosforila las subunidades I, IV1 y IVb del CIV induciendo así su degradación e inhibición de la actividad de la enzima (Prabu et al., 2006). El incremento en los niveles de cAMP también induce la fosforilación en tirosina de subunidades del complejo (Lee et al., 2005). Por otra parte, la inhibición con teofilina de la fosfodiesterasa 4 induce la fosforilación de la tirosina 304 de la subunidad I del CIV inhibiendo su actividad enzimática (Lee et al., 2005). La regulación del CV mediada por PKA depende de la anteriormente descrita fosforilación de IF1 en su residuo S39 (Figura 5) (Garcia-Bermudez et al., 2015). La señal intramitocondrial de cAMP modula también

la organización y actividad del CV mediante la acción de proteasas mitocondriales (De Rasmussen et al., 2016). La depleción de cAMP en mitocondrias aisladas o mioblastos en cultivo causa una disminución de los niveles de subunidades de CV y oligómeros del mismo causando una reducción en el potencial de membrana mitocondrial, una menor eficiencia de OXPHOS y producción de ATP (De Rasmussen et al., 2016).

A pesar de todas estas evidencias, el mecanismo por el que estas quinasas son translocadas a la mitocondria son aún un tema controvertido ya que la mayoría de las quinasas localizadas en mitocondria no contienen la clásica secuencia de importe a mitocondria. Esto ha llevado a pensar que quizás estas quinasas no necesiten de tal secuencia para ser importadas por la maquinaria mitocondrial y que existan secuencias aún desconocidas que medien el importe de estas quinasas a la mitocondria o que sean transportadas de manera pasiva (Lim et al., 2016). Desde luego, se necesitarán futuras investigaciones para esclarecer este mecanismo de regulación en la mitocondria

1.3. La mitocondria y el metabolismo energético.

1.3.1. La mitocondria y el cáncer.

Las células cancerígenas experimentan una serie de alteraciones durante la transformación oncogénica que les confieren nuevas características. El metabolismo celular juega un papel esencial en la adquisición de este fenotipo cancerígeno (Vander Heiden et al., 2013, Icard et al., 2018). Un rasgo característico en este cambio es la reprogramación metabólica que experimentan las células cancerígenas hacia un aumento en el flujo glucolítico en presencia de oxígeno, proceso conocido como glucólisis aeróbica (Warburg, 1930). Este proceso permite a las células cancerígenas obtener los precursores metabólicos que utilizarán para la síntesis de aminoácidos, nucleótidos y lípidos; así como poder reductor y ATP. Además, diferentes mutaciones en genes de proteínas mitocondriales contribuyen al desarrollo del cáncer (Gaude and Frezza, 2014, Sciacovelli et al., 2016). En particular, la contribución de la mitocondria a las células cancerígenas pasa a estar más dedicada a la producción de precursores anabólicos a través de ciclo de ácidos tricarboxílicos (TCA) (Zong et al., 2016). Intermediarios producidos en el TCA contribuyen a la señalización tumorigénica (Raimundo et al., 2011) y la producción de ROS mitocondriales activan cascadas de señalización que promueven la proliferación celular y la tumorigénesis (Weinberg et al., 2010, Woo et al., 2012).

En nuestro laboratorio se ha diseñado el conocido como índice bioenergético celular (índice BEC), una aproximación proteómica que permite estudiar el efecto Warburg en tumores. Este índice, que se expresa como la razón β F1ATPasa//GAPDH (Cuezva et al., 2002), estima de manera directa el potencial mitocondrial de la célula. La mayoría (> 97%) de los tumores humanos más prevalentes presentan un índice BEC disminuido, es decir, una disminución de la β F1-ATPasa y un incremento en marcadores glucolíticos (Cuezva et al., 2002, Cuezva et al., 2004), por lo que también se llama huella bioenergética del cáncer.

Además, y en este contexto, se ha demostrado que IF1 se encuentra sobreexpresado en carcinomas humanos (Sanchez-Arago et al., 2013b). En muchos de estos carcinomas la sobreexpresión de IF1 es un factor de mala prognosis dada su correlación con una menor supervivencia en pacientes y mayor recurrencia de la enfermedad. Tal es el caso en cáncer de hígado, vejiga, gástrico y glioma (Figura 6) (Song et al., 2014b, Yin et al., 2015, Wei et al., 2015, Wu et al., 2015). En hígado, IF1 promueve metástasis y angiogénesis a través de la vía no canónica de NF κ B hacia Snai1, mediando la transición epitelio-mesénquima (EMT) y a través de VEGF, que induce angiogénesis (Song et al., 2014a). En cáncer de vejiga, el papel oncogénico de IF1 parece depender de la estimulación de la proliferación mediado por ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas relacionadas con la transición G1/S en el ciclo celular (Wei et al., 2015). En cáncer gástrico (Yin et al., 2015) la situación es muy parecida a la observada en los estudios del laboratorio en células de cáncer de colon (Formentini et al., 2012), donde el papel oncogénico de IF1 implica una mayor proliferación y resistencia a muerte mediada por ROS que señala al núcleo directamente en la vía canónica NF κ B (Formentini et al., 2012).

Sin embargo, cabe destacar que la expresión de IF1 en carcinogénesis es de tipo tejido-específico (Sanchez-Arago et al., 2013b). De manera similar, se ha comprobado que la expresión de IF1 no siempre correlaciona con una mala prognosis en pacientes de cáncer (Figura 6). De hecho, la sobreexpresión de IF1 en pacientes con cáncer de colon y mama correlaciona con una mejor tasa de supervivencia, constituyendo una paradoja que IF1 sea un marcador de buena prognosis en este tipo de cáncer (Figura 6) (Sanchez-Arago et al., 2013b). Estas diferencias podrían ser atribuidas a las diferencias en la fisiología mitocondrial de los tejidos, así como a la expresión diferencial de IF1 según el tejido, como se ha demostrado en ratón y humano (Esparza-Molto et al., 2018).

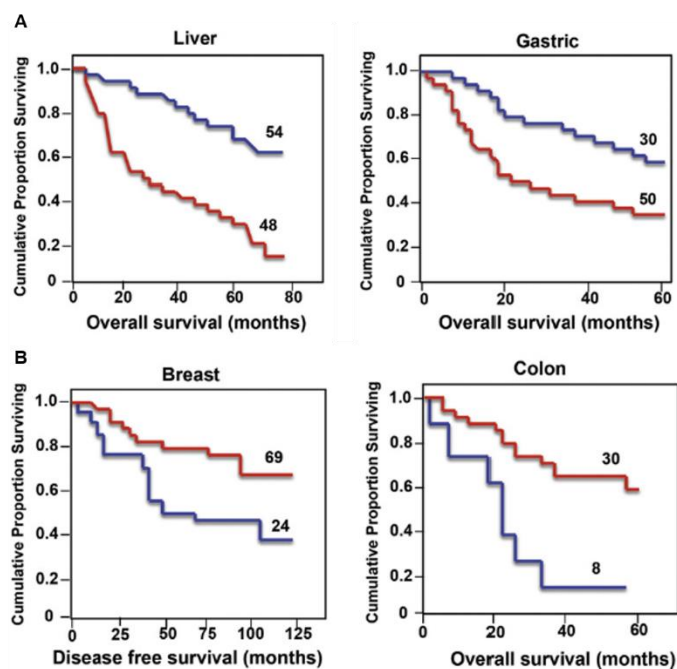


Figura 6. La función oncogénica de IF1 es tejido-específica. Análisis estadístico de supervivencia Kaplan-Meier de pacientes de cáncer seleccionados según el nivel de expresión de IF1 (alto nivel de expresión=rojo; bajo nivel de expresión=azul). **A.** Supervivencia total de pacientes con cáncer de estómago e hígado. **B.** Supervivencia total de pacientes con cáncer de colon y mama. El número de pacientes estudiado en cada caso se incluye en cada curva. Tomado de (Garcia-Bermudez and Cuezva, 2016).

El desarrollo de modelos celulares y de ratón que sobreexpresan IF1 ha permitido estudiar el papel de IF1 en cáncer y contestar parcialmente a estas preguntas. En particular, el ratón que sobreexpresa IF1-H49K (mutante constitutivamente activo de IF1) en hígado, presenta una disminución en la OXPHOS mediada por IF1 que induce el sensor AMPK dando lugar a un fenotipo más propenso a desarrollar cáncer (Santacatterina et al., 2016). De hecho, los animales transgénicos que son tratados con dietilnitrosamina desarrollan un mayor número de tumores y de mayor tamaño que los ratones control (Santacatterina et al., 2016). Estos resultados coinciden con los previamente mostrados sobre la correlación de la sobreexpresión de IF1 en pacientes con cáncer hepático en los que hay más activación de la vía NFκB promoviendo la EMT (Song et al., 2014a). A pesar de que los dímeros de la ATP sintasa son componentes esenciales en la formación de PTP (Giorgio et al., 2013) y que la sobreexpresión de IF1 en hígado *in vivo* favorece la formación de dímeros de la enzima (Santacatterina et al., 2016), hemos observado que la protección frente a muerte celular no está relacionada con diferencias en la apertura y regulación del PTP (Santacatterina et al., 2016). De hecho, creemos que la protección frente a muerte mediada por la sobreexpresión de IF1 en hígado está relacionada con una

señalización mitohormética a través de la inducción de la respuesta antioxidante mediada por Nrf-2 (Santacatterina et al., 2016). En este contexto, se ha demostrado que la sobreexpresión de Nrf-2 es una estrategia para detoxificar los altos niveles de ROS producidos en las células cancerígenas (DeNicola et al., 2011).

En general, estos hallazgos demuestran que IF1 juega un papel fundamental en el origen y progresión del cáncer. Sin embargo, aún no está esclarecido el papel diferencial de IF1 favoreciendo o reprimiendo la progresión del cáncer en diferentes tipos de carcinomas.

1.3.2. El metabolismo mitocondrial como diana terapéutica en cáncer

La vía glucolítica ha servido como diana terapéutica en cáncer durante décadas (Cuezva et al., 2009, Cairns et al., 2011, Kondoh et al., 2007, Vander Heiden et al., 2009, Doherty and Cleveland, 2013, Hamanaka and Chandel, 2012, Hay, 2016, Sanchez-Arago and Cuezva, 2011). Sin embargo, nuevos estudios sobre las dependencias metabólicas de los tumores están postulando nuevas alternativas para explorar posibles mecanismos que frenen el crecimiento tumoral (Luengo et al., 2017, DeBerardinis and Chandel, 2016). Es evidente que existe una dependencia glucolítica preferencial de manera general en las células tumorales. Sin embargo, hay situaciones en las que se ha demostrado una alta dependencia de la fosforilación oxidativa para la supervivencia de las células cancerígenas (Birsoy et al., 2015, Sullivan et al., 2015, Viale et al., 2014, Wheaton et al., 2014). En estos casos, las células tumorales pueden ser erradicadas con inhibidores de la ETC. La inhibición de OXPHOS reduce drásticamente los niveles de ATP producidos induciendo una crisis metabólica que induce la necrosis celular. Así, el metabolismo mitocondrial ha sido propuesto como una diana muy efectiva para combatir a las células cancerígenas debido a su potencial en la producción de ATP (Birsoy et al., 2015, Sullivan et al., 2015, Viale et al., 2014, Wheaton et al., 2014). Además, la respiración mitocondrial juega un papel crucial en células proliferativas proporcionando aceptores de electrones para la síntesis de aspartato (Sullivan et al., 2015). En un screening basado en la tecnología CRISPR, se identificó GOT1, la aminotransferasa de aspartato citosólica, que normalmente consume aspartato para transferir electrones a la mitocondria y que en una situación de restricción de la ETC funciona de manera reversa generando aspartato. En este estudio se demostró que la síntesis de aspartato mitocondrial es fundamental para la proliferación celular (Birsoy et al., 2015).

En un estudio en células adenocarcinoma ductal pancreático se demostró que las células capaces de sobrevivir a una eliminación de los oncogenes eran las responsables de la reincidencia del cáncer dando lugar a células stem cancerígenas que dependían de la OXPHOS para sobrevivir y proliferar (Viale et al., 2014). Se ha relacionado también la importancia de la función y biogénesis mitocondrial mediada por PGC1- α en el proceso de metástasis, ya que existe una correlación en la expresión del factor de transcripción en cánceres invasivos y metástasis distantes, especialmente en melanomas (LeBleu et al., 2014). Estudios recientes han demostrado que el mtDNA es de vital importancia en la progresión tumoral. Células cancerígenas en las que el mtDNA ha sido deplecionando, son capaces de recuperarlo por transferencia horizontal de otras células cancerígenas metastásicas reestableciendo la progresión tumoral (Tan et al., 2015).

Además de las diversas dependencias metabólicas mitocondriales de las células cancerígenas, fue la descripción de la actividad anticancerígena de la metformina lo que desató por primera vez la idea de utilizar la producción de ATP mitocondrial como diana anti-cancerígena (Weinberg and Chandel, 2015). En primera instancia, se observó que los pacientes diabéticos que tomaban metformina eran menos propensos a desarrollar cáncer y presentaban mejores ratios de supervivencia si ya padecían cáncer (Evans et al., 2005). Esto llevó al estudio de las posibles propiedades anti-cancerígenas del fármaco, para concluir que este fármaco antidiabético actuaba inhibiendo de manera reversible el CI de la ETC (Bridges et al., 2014, Owen et al., 2000, Wheaton et al., 2014). En particular, la metformina inhibe la producción de ATP mitocondrial induciendo la muerte de las células cancerígenas cuando los niveles de ATP glucolítico disminuían como resultado de una reserva de glucosa limitada. Además, la metformina inhibe la biosíntesis de macromoléculas que tiene lugar en la mitocondria durante el desarrollo del cáncer (Griss et al., 2015). Por otro lado, un análogo de la metformina denominado fenformina, presenta las mismas características antitumorales inhibiendo la actividad del CI. De hecho, al contrario que la metformina, la fenformina puede ser rápidamente transportada directamente a las células tumorales (Birsoy et al., 2014).

En resumen, el metabolismo del cáncer es un clásico campo de estudio para la identificación de nuevas dianas y tratamientos que ayuden a combatir esta enfermedad. En la última década, el estudio de la OXPHOS como diana terapéutica en cáncer ha permitido la descripción de nuevas moléculas con resultados prometedores. En particular, el reposicionamiento de fármacos ha aportado grandes resultados en el área de la terapia

del cáncer. Esta estrategia consiste en encontrar funciones nuevas y desconocidas de fármacos ya utilizados en clínica (Wang and Byers, 2013). De esta manera el proceso por el que el fármaco tiene que pasar hasta llegar al paciente es mucho más rápido que en el clásico proceso de descubrimiento de fármacos. Además, su uso en clínica asegura la bioseguridad de los compuestos y si cursan con efectos adversos, estos son conocidos lo cual podría mejorar notablemente la calidad de vida de los pacientes que muchas veces reciben tratamientos con efectos adversos muy perjudiciales (Turanli et al., 2018b). En general, este proceso supone una fuente prometedora de investigación que utilizaremos para intentar llegar un poco más lejos en el tratamiento del cáncer.

2. OBJETIVOS

La mitocondria desempeña funciones de vital importancia en la fisiología de los organismos. La obtención de energía producida por OXPHOS juega un papel crucial en la bioenergética celular que se ve alterada en patologías como el cáncer. La ATP sintasa es un complejo enzimático mitocondrial con un papel esencial en la producción de ATP y en la señalización por ROS. Su inhibidor fisiológico IF1 se expresa y/o sobreexpresa en los carcinomas humanos más prevalentes. IF1 es capaz de inhibir tanto la actividad hidrolítica como sintética de la ATP sintasa, dando lugar a una situación de inhibición parcial de la OXPHOS que concluye con una menor producción de ATP mitocondrial y la subsiguiente producción de ROS.

Nuestro grupo ha contribuido al estudio de la regulación de IF1 describiendo la fosforilación de su S39 mediada por la actividad de una quinasa dependiente de cAMP. Esta fosforilación inactiva IF1 imposibilitando su unión con la ATP sintasa, por lo tanto, impidiéndole ejercer su función inhibitoria sobre las actividades hidrolítica y sintética del enzima. Sin embargo, la quinasa o quinasas específicas responsables de esta fosforilación están aún sin esclarecer. Por otro lado, hemos demostrado que IF1 es una proteína de vida media muy corta que tiene controlada su expresión tejido-específica por mecanismos de regulación post-transcripcionales que también están pendientes de esclarecer. Sin lugar a dudas, y como se ha descrito por primera vez en el laboratorio en diversos modelos celulares e *in vivo*, el papel de IF1 como oncogén mitocondrial está claramente demostrado. Sin embargo, la paradoja de IF1 en su relación con la prognosis en diferentes tipos de cáncer es un tema que aún está por esclarecer.

Por ello, el **objetivo principal** de esta tesis doctoral será ahondar en el estudio de la regulación de la actividad y expresión de IF1 como represor de la fosforilación oxidativa, así como en la importancia de la fosforilación oxidativa en la progresión tumoral y el planteamiento de su restricción como diana terapéutica en cáncer.

En base a estas premisas, nos hemos propuesto los siguientes **objetivos específicos**:

1. Contribuir al esclarecimiento de los mecanismos implicados en la regulación de la expresión y actividad de IF1 como inhibidor de la ATP sintasa.
2. Identificar moléculas reguladoras de la OXPHOS que puedan ser empleadas en la terapia del cáncer.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales.

3.1.1. Líneas celulares.

HCT116 (ATCC CCL-247) Línea celular humana de cáncer de colon.

HCT116-luc (Deriva de ATCC CCL-247) Línea celular humana de cáncer de colon con un vector que expresa la proteína luciferasa. Generada en el laboratorio.

MDA-MB-231 (ATCC HTB-26) Línea celular humana de cáncer de mama.

BT549-luc (#JCRB1373) Línea celular humana de cáncer de mama cedida por el Dr. Murakami procedente del “Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank” de la cual se obtuvieron las líneas BT549 control (pCDH-CMV-MCS-EF1-RFP + PURO vector vacío) y BT549-IF1 (pCDH-CMV-MCS-EF1-RFP + PURO-IF1).

HEK 293T (ATCC CRL-1573) Línea celular derivada de células de riñón embrionario humano transformadas con adenovirus 5.

NRK (ATCC CRL-6509) Línea celular de riñón de rata no tumoral.

C2C12 (ATCC CRL-1772) Línea celular de miocitos de ratón no tumoral.

HL-1 Línea celular de cardiomiocitos de ratón no tumoral.

3.1.2. Ratones.

Para los experimentos de crecimiento tumoral *in vivo* se utilizaron ratones de 6 semanas de la cepa de ratones “nude” HsdCpb:NMRI-Foxn1nu (Envigo) machos o hembras para los ensayos con células de cáncer de colon o cáncer de mama, respectivamente.

3.1.3. Cepas bacterianas.

Para la clonación, mantenimiento y amplificación de plásmidos se han utilizado las cepas bacterianas DH5 α . El cultivo de esta cepa se realizó en medio Luria-Bertani (LB) (1% (p/v) bacto triptona, 0.5% (p/v) extracto de levadura y 1% (p/v) NaCl) suplementado con Ampicilina o Kanamicina (100 μ g/ml), según la resistencia del plásmido que portan.

3.1.4. Plásmidos.

Los plásmidos que se han usado en este trabajo son:

- Plásmido pCMV-SPORT6 (ATCC)
- Plásmido pCMV-SPORT6-IF1 (h). Derivado de pCMV-SPORT6. Generado en el laboratorio.
- Plásmido pCMV-SPORT6-IF1-S39A fosfo-mutante con mutación puntual en la serina 39, cambio por alanina. Generado en el laboratorio.
- Plásmido pCMV-SPORT6-IF1-S39E fosfo-mimético con mutación puntual en la serina 39, cambio por ácido glutámico. Generado en el laboratorio.
- Plásmido pCMV-LRPPRC (h) marcado en C-terminal con Myc-DDK (OriGene)

3.1.5. siRNAs.

Los RNAs pequeños interferentes (siRNAs) utilizados en este estudio han sido un triple silenciador siRNA contra la secuencia humana de LRPPRC (siLRPPRC, OriGene) con su correspondiente siRNA ineficiente como control negativo de silenciamiento (siCRL, OriGene) y un siRNA contra la secuencia humana de la quinasa SGK-1 (siSGK-1, Dharmacon) con su correspondiente siRNA ineficiente (siCRL, Dharmacon).

3.1.6. Anticuerpos.

En la Tabla 2 se proporciona una lista de los anticuerpos que se han usado en este trabajo incluyendo su origen y la utilidad que se les ha dado.

Antígeno	Peso molecular	Origen	Referencia	Utilidad/Dilución
IF1	12 kDa	Ratón	(Sanchez-Cenizo et al., 2010)	WB (1:25)/IP (1:25)/IF (1:100)
IF1	12 kDa	Conejo	(Esparza-Moltó et al., 2018)	WB (1:1000)
βF1-ATPasa	52 kDa	Conejo	(Cuezva et al., 2002)	WB/BN (1:20000)
αF1-ATPasa	56 kDa	Ratón	7H10BD4F9 (ThermoFisher)	WB (1:500)
OSCP	23 kDa	Ratón	ab110276 (abcam)	WB (1:500)
NDUFA9	39 kDa	Ratón	ab14713 (abcam)	WB/BN (1:1000)
NDUFS3	30 kDa	Ratón	ab14711 (abcam)	WB/BN (1:1000)
NDUFS4	18 kDa	Ratón	ab87399 (abcam)	WB (1:500)/ IP (1:25)
SDHB	30 kDa	Ratón	21A11AE7 (ThermoFisher)	WB/BN (1:1000)

Core 2	48 kDa	Ratón	ab14745 (abcam)	WB/BN (1:1000)
MTCOII	26 kDa	Ratón	ab91317 (abcam)	WB (1:500)
COX 4 sub I	57 kDa	Ratón	459600 (Invitrogen)	WB/BN (1:1000)
VDAC	31 kDa	Conejo	ab15895 (abcam)	WB/BN (1:1000)
Catalasa	60 kDa	Ratón	12C2DB9 (ThermoFisher)	WB (1:500)
SOD 2	25 kDa	Conejo	FL-222 (Santa Cruz)	WB (1:1000)
Caspasa 3 activa	17-19 kDa	Conejo	#9661 (Cell signaling)	IF (1:400)
Ki67	345 kDa	Conejo	RM-9106 (Thermo Fisher)	IF (1:200)
PYGM	97 kDa	Ratón	ab63158 (Abcam)	WB (1:1000)
Hsp60	60 kDa	Ratón	(Acebo et al., 2009)	WB (1:5000)/IF (1:1000)
GAPDH	36 kDa	Ratón	(Acebo et al., 2009)	WB (1:20000)
SGK-1	49 kDa	Conejo	ab43606 (Abcam)	WB(1:1000)/IF (1:1000)
LRPPRC	130 kDa	Conejo	sc-166178 (Santa cruz)	WB (1:1000)
Anti-FLAG	-	Ratón	F1804 (Sigma)	WB (1:1000)
β-actina	42 kDa	Ratón	A5316 (Sigma)	WB (1:10000)
α-tubulina	50 kDa	Ratón	T9026 (Sigma)	WB (1:2000)
Phospho-Ser	-	Ratón	P5747 (Sigma)	WB (1:100)
Nitrotirosina	varias	Ratón	ab61392 (Abcam)	WB (1:1000)
Malondialdeído	varias	Conejo	Ab6463 (Abcam)	WB (1:1000)
4-hidroxinonenal	varias	Conejo	MAB3249 (R&D system)	WB (1:1000)
Glutation reductasa	58 kDa	Ratón	ab16801 (Abcam)	WB (1:1000)
Prx3	28 kDa	Conejo	ab222807 (Abcam)	WB (1:1000)
Prx6	25 kDa	Conejo	ab59543 (Abcam)	WB (1:1000)

Tabla 2. Anticuerpos utilizados. En la tabla se indica la proteína que reconoce el anticuerpo, el peso molecular aparente que presenta en SDS-PAGE, el origen del anticuerpo, la compañía que lo desarrolló o la referencia donde se generó y/o se describió por primera vez, así como la utilidad que se le ha dado en la tesis y la dilución empleada. WB, western blot; BN, blue native; IP, inmunoprecipitación; IF, inmunofluorescencia.

3.1.7. Compuestos e inhibidores.

Los compuestos utilizados para los cribados forman parte de una librería comercial de 1018 compuestos aprobados por la “Food and Drug Administration” (FDA) (Selleckchem) disueltos en DMSO a una concentración 10 mM. Los inhibidores de los complejos mitocondriales inyectados secuencialmente en los experimentos de Seahorse fueron: oligomicina (OL), dinitrofenol (DNP), rotenona (ROT) y antimicina A (ANT A) (Sigma). Otros compuestos: nebivolol (NEB) (Selleckchem), H89 dihidroclórico hidratado, dibutiril-AMPCíclico (db-cAMP), forskolina (Frsk) y cloruro de cobalto (CoCl₂) (Sigma-Aldrich), Go6976 (Abcam), GSK650394 (Santa Cruz Biotechnologies) y estaurosporina (STS), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), 5-fluorouracilo (5-FU), tamoxifeno (TAM) (Sigma).

3.2. Métodos.

3.2.1. Métodos de Biología molecular.

3.2.1.1. Transformación de células *E. coli* competentes.

Células *E. coli* competentes (100 µl) se incubaron con 50 ng de plásmido. Se realizó un choque térmico a 42°C durante 45 segundos y se volvió a incubar en hielo durante 2 min. Las células se resuspendieron en 950 µl de medio LB y se incubaron durante 1 h a 37°C con agitación. Tras la incubación, se plaquearon 100 µl del cultivo bacteriano en placas de LB-agar con el antibiótico apropiado y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

3.2.1.2. Aislamiento de DNA de cultivos bacterianos.

La preparación del DNA plasmídico para secuenciación o transfección se realizó con los kits Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) o Plasmid MAXI Kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación de DNA se realizó mediante la medida de absorbancia a 260 nm (A₂₆₀) utilizando un espectrofotómetro Nanodrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). Se tuvo en cuenta calidad de las preparaciones de DNA valorando la no contaminación de proteínas (A₂₆₀/A₂₈₀ > 1,9), de polisacáridos (A₂₆₀/A₂₃₀ > 1,9) y no contaminación de RNA.

3.2.2. Métodos de Bioquímica.

3.2.2.1. Extracción y cuantificación de proteína en muestras biológicas.

Las proteínas procedentes de células se extrajeron tras despegar las células de la placa de cultivo con tripsina-EDTA. El sedimento resultante por centrifugación a 1000 x g fue resuspendido en tampón de lisis (Tris 10 mM pH 7.5, NaCl 130 mM y Triton X-100 al 0.5%). Los tubos se agitaron durante 10 segundos con un vórtex, se mantuvieron a 4°C durante 15 minutos y se centrifugaron durante 15 min a 11000 x g y a 4°C. Las proteínas procedentes de los tumores de los ratones se extrajeron a partir de un fragmento de tumor pulverizado con 300 µl de tampón de extracción (Tris 50 mM pH 8, NaCl 1% (v/v), Triton X-100 1%, DTT 1 mM, SDS 0.1% (p/v), EDTA 0.4 mM pH 8, con inhibidores de fosfatasas y proteasas). Los extractos se sometieron a tres ciclos de congelación en N₂ líquido y descongelación a 37°C y se centrifugaron a 12000 x g durante 30 minutos. La cantidad de proteína total se determinó mediante el reactivo de Bradford (Bio-Rad) siguiendo las recomendaciones del fabricante y usando una curva patrón de BSA con concentraciones conocidas.

3.2.2.2. Extracción y purificación de mitocondrias de células en cultivo.

Para la extracción y purificación de mitocondrias de células en cultivo se crecieron al menos 6 placas de 100 mm de diámetro que fueron recogidas y lavadas al menos tres veces con PBS. La ruptura celular para la extracción de mitocondrias se realizó mediante shock hipotónico. Para ello, el pellet celular se resuspendió en tampón hipotónico (sacarosa 83 mM, MOPS 10 mM, pH 7.2), en una proporción aproximada tampón:pellet celular de 7:1 (volumen:volumen). La suspensión de células se incubó durante 2 minutos en hielo, permitiendo de este modo que las células se hincharan facilitando su ruptura mediante homogeneización, realizando entre 8 y 10 pases (“pops”, con los que se busca un cambio brusco en la presión sobre las membranas celulares, tensas por el medio hipotónico, de cara a producir su ruptura) en un homogeneizador de tejidos de vidrio-teflón tipo potter. Rápidamente, el homogenado se diluyó a la mitad con tampón hipertónico (sacarosa 250 mM, MOPS 30 mM, pH 7.2) y, tras mezclar bien, se centrifugó a 1000 x g durante 5 minutos a 4° C, para eliminar los núcleos y las células que no se hubieran roto. Este proceso se repitió hasta dos veces para obtener el mayor rendimiento posible. La purificación de mitocondrias se realizó mediante centrifugación diferencial.

Para ello, los sobrenadantes de las homogenizaciones, se centrifugaron a 12000 x g durante 12 minutos a 4° C. De esta manera, obtenemos la fracción citosólica en el sobrenadante y la mitocondrial queda sedimentada en el pellet. Este pellet de mitocondrias se resuspendió en medio A (sacarosa 0.32 M, Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.4) y la suspensión de mitocondrias se transfirió a tubos eppendorf, los cuales se centrifugaron a 15000 x g durante 3 minutos a 4°C en una microcentrífuga. Los pellets mitocondriales resultantes se resuspendieron en medio A sucesivamente hasta juntar todos los pellets en un mismo tubo para aumentar la pureza de la fracción mitocondrial, siempre volviendo a centrifugar en las mismas condiciones. La determinación de la concentración de proteínas de la muestra se realizó mediante el método Bradford utilizando el reactivo de Bradford como se ha indicado anteriormente. A continuación, se volvió a sedimentar la muestra a 15000 x g durante 3 minutos, a 4°C en una microcentrífuga. El pellet mitocondrial fue congelado o procesado según su finalidad.

3.2.2.3. Electroforesis de proteínas mono (SDS-PAGE) y bi-dimensional (IEF-SDS-PAGE).

Las proteínas se fraccionaron mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-SDS según el método descrito por Laemmli (Sambrook and Russell, 2001). Los extractos proteicos se mezclaron con el tampón de carga de Laemmli y se hirvieron a 95°C durante 5 min antes de cargar el gel. La calibración de la movilidad de las proteínas en los geles se efectuó mediante electroforesis en paralelo de un conjunto de proteínas teñidas de peso molecular conocido: 225, 150, 102, 76, 52, 38, 31, 24, 17 y 12 kDa (Rainbow markers, GE Healthcare).

Para la electroforesis en dos dimensiones, unos 250 µg de proteína celular se diluyeron en 250 µl de tampón de rehidratación DeStreak Rehydration Solution (GE Healthcare) conteniendo 0.5% del tampón IPG del rango de pH 6-11 y se cargaron en tiras de 13-cm Immobiline DryStrips 6-11NL (GE Healthcare) utilizando un equipo Ettan IPGPhor3 (GE Healthcare). Las tiras IPG se rehidrataron y enfocaron a 20°C, empezando con una rehidratación pasiva de 4 h seguido de 12 h de rehidratación activa a 50 V. El enfoque empezó con 15 min a 250 V, 500 V durante 1 h y otra hora a 1000 V, seguido por un aumento lineal hasta 10000 V durante 3 h para luego mantener estos 10000 V hasta que se alcanzaron los 60000 V-h. Después de este isoelectroenfoco, las tiras IPG enfocadas fueron equilibradas con 0.170 M de Tris-HCl pH 6.8 conteniendo urea 6 M,

glicerol 20%, SDS 2% y DTT 130 mM durante 15 minutos, seguido del mismo tampón, pero conteniendo iodoacetamida 135 mM con azul de bromofenol en lugar de DTT y con agitación constante a temperatura ambiente. Las tiras ya equilibradas fueron transferidas a la parte superior de un gel de poliacrilamida del 12% y la electroforesis de proteínas llevada a cabo utilizando un sistema Protean II XI (Bio-Rad) a corriente constante (30 mA/gel a 4°C durante 4 h).

3.2.2.4. Electroforesis en geles nativos Blue Native.

Los geles nativos en gradiente de poliacrilamida fueron descritos por primera vez por Schagger en 1991 (Schagger and von Jagow, 1991) y permiten la resolución electroforética de complejos proteicos formados por más de una proteína (Wittig et al., 2006). Para realizar esta técnica, se partió de un pellet de mitocondrias aisladas como se ha indicado anteriormente. Las mitocondrias se resuspendieron en el volumen necesario de solución de resuspensión (1 M aminocaproico en 50 mM Bis-Tris pH 7.0) para obtener una concentración de proteínas de 10 µg/µl. A continuación, las mitocondrias se lisaron utilizando digitonina al 10% en una proporción de 4g de digitonina por cada gramo de proteína mitocondrial. La digitonina es un detergente suave que permite que los complejos y supercomplejos se mantengan intactos y no se disgreguen las proteínas que los componen. Las muestras se incubaron en hielo durante 5 minutos para favorecer la acción del detergente y se centrifugaron durante 30 minutos a 4°C y 13000 x g, en microcentrífuga. Finalmente, se recogió el sobrenadante y se le añadió un volumen de tampón de carga BN (5% Blue-G Coomassie en 1M aminocaproico) igual a un tercio del volumen final de la muestra.

Las muestras fueron separadas en geles nativos en gradiente de poliacrilamida. Se utilizaron geles comerciales (NativePAGE™ 3-12% Bis-Tris Protein Gels, 1.0 mm, 10-well, Invitrogen) y caseros 3-13% utilizando el montaje Mini Protean III de BioRad según las siguientes indicaciones:

Componente	3%	13%
Acrilamida:Bisacrilamida (48:1.5)	0,305 ml	0,866 ml
Tampón de gel 3x	1,667 ml	1,111 ml
H2O milliQ	Hasta 5 ml	Hasta 3.333 ml
Glicerol	-	0,560 ml
APS 20%	20 μ l	7 μ l
TEMED	4 μ l	3 μ l

Tabla 3. Componentes del gel en gradiente para Blue Native-PAGE 3-13% casero. En la tabla se muestran las cantidades necesarias de cada componente para elaborar un gel de poliacrilamida en gradiente del 3% al 13%.

- Tampón de gel 3x: Bis-Tris 150 mM, ácido aminocaproico 1.5 M, pH=7.0
- Disolución de acrilamida: bisacrilamida (48:1.5) (p/v), que se filtró y se almacenó protegida de la luz a 4° C.

Para la preparación del gel en gradiente lineal, se utilizó un formador de gradientes de metacrilato (compuesto por dos cámaras unidas entre sí) conectado a una bomba peristáltica que bombea la disolución hasta la abertura superior entre los cristales de 1.5mm. Una vez preparadas las mezclas de gel de acrilamida, se vertieron en las cámaras del formador de gradientes, de forma que mientras la mezcla del 13% tenía salida directa hacia los cristales, la mezcla del 3% se conectaba (mediante una llave) con la cámara que contenía la mezcla del 13%. Cuando el gel quedó a una distancia de unos 2 cm del borde superior de los cristales, se interrumpió su bombeo y se añadió una fina capa de agua para impedir la formación de menisco en el gel que se retiró tras la polimerización. En este momento se añadió el gel concentrador al 4% de acrilamida introduciendo después el peine y dejando polimerizar de nuevo a temperatura ambiente.

En ambos casos, la electroforesis transcurrió en la cámara fría con los tampones del cátodo (Tricina 50 mM, Bis-Tris 15 mM pH=7.0, Serva blue G 0.02 %) y del ánodo (Bis-Tris 50 mM pH 7.0). La electroforesis se desarrolló a voltaje constante de 70 V hasta que las muestras hubieron entrado completamente en el gradiente del gel (~30 minutos). En ese momento, se limitó la corriente a 15 mA y se mantuvo así hasta que el colorante azul llegó hasta el final del gel (~1 h).

3.2.2.5. Electroforesis en geles nativos Clear Native.

Para la detección de la actividad de los complejos mitocondriales en gel, se realizaron geles nativos Clear native (CN-PAGE) de mitocondrias (NativePAGE™ 3-12% Bis-Tris Protein Gels, 1.0 mm, 10-well, Invitrogen) siguiendo el proceso indicado en el anterior apartado con las siguientes modificaciones acorde con el protocolo detallado en (Wittig et al., 2006):

Tampón de carga de CN-PAGE: Rojo Ponceau 0.1% y glicerol 0.5%.

Buffer del cátodo: Tricina 50 mM, Bis-Tris 15 mM pH=7.0, Dodecil maltósido 0.01 %.

3.2.2.6. Medida de actividad en gel.

Para determinar la actividad de los complejos de la cadena de transporte electrónico y la ATP sintasa, se incubaron los geles nativos CN-PAGE en una solución de revelado específica como se detalla a continuación a temperatura ambiente.

CI: Tris-HCl 5 mM, pH 7.4, NADH 0,14mM y NitroBlue tetrazolium 1mg/ml. La visualización se realizó gracias al precipitado de color morado producido tras la reducción del NitroBlue tetrazolium por acción de la actividad NADH deshidrogenasa del CI.

CII: Tris-HCl 5 mM, pH 7.4, succinato, fenazina metosulfato y NitroBlue tetrazolium 1mg/ml. La visualización se realizó gracias al precipitado de color morado producido tras la reducción del NitroBlue tetrazolium por acción de la actividad succinato deshidrogenasa del CII.

CIII: Tampón fosfato 50 mM, pH 7.2, diaminobencidina 0.05%. La visualización se realizó gracias al precipitado de color morado producido tras la reducción de la diaminobencidina por acción de la actividad del CIII.

CIV: Tampón fosfato 50 mM, pH 7.2, citocromo c reducido 5 mM, diaminobencidina 0.05%. La visualización se realizó gracias al precipitado de color morado producido tras la reducción de la diaminobencidina por acción de la actividad citocromo c oxidasa del CIV.

CV: Tris-HCl 35 mM, pH 8.3, glicina 270 mM, MgSO₄ 14mM, 0.2% Pb(NO₃)₂, ATP 8mM. La visualización se realizó sobre fondo negro gracias al precipitado blanco de plomo acoplado a la actividad hidrolítica del CV.

3.2.2.7. Detección inmunológica de proteínas (*Western blot*).

Las proteínas fraccionadas en geles monodimensionales, bidimensionales o nativos se transfirieron a membranas de nitrocelulosa o PVDF, según el caso, mediante electrotransferencia húmeda o se tiñeron con Blue Safe (Thermo Fisher) para su detección directa en el gel. La transferencia se efectuó a 100V durante el periodo de tiempo necesario según el peso molecular de la/s proteína/s a detectar utilizando el tampón de transferencia (Glicina 39 mM, Tris-HCl 48 mM, metanol 20% (v/v)) en un equipo Mini Trans Blot de Bio-Rad para los mini-geles y un Trans-Blot Cell de Bio-Rad para los geles de electroforesis bidimensional. A continuación, las membranas se incubaron en solución de bloqueo (leche desnatada liofilizada al 5% p/v diluida en TBS (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM) más 0.1% Tween-20 o BSA 4% diluida en TBS-T para los anticuerpos anti proteínas fosforiladas) durante al menos 1 h con agitación y a temperatura ambiente. La incubación de la membrana con el anticuerpo se efectuó a temperatura ambiente durante 1 h o durante toda la noche a 4°C, dependiendo del anticuerpo. Los anticuerpos fueron diluidos en TBS más albúmina bovina al 3% o al 5% según el anticuerpo y NaN_3 1 mM. Los anticuerpos usados en esta tesis se recopilan en la Tabla 2. A continuación, se realizaron 3 lavados de las membranas en TBS-T durante 5 minutos. Posteriormente, se incubaron con un anticuerpo secundario de cabra contra la región Fc de las IgGs de conejo, o de un anticuerpo de conejo contra la región Fc de las IgGs de ratón o de cabra, dependiendo del anticuerpo primario utilizado, conjugados ambos a peroxidasa (Nordic Immunology, 1:5.000). Las proteínas inmunoreactivas se visualizaron utilizando el método quimioluminiscente del ECL (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación de la intensidad de las bandas resultantes se realizó con el software Image J.

3.2.3. Métodos de Biología celular

3.2.3.1. Cultivo de líneas celulares.

La línea celular HCT116 se cultivó en McCoy's 5A suplementado con suero bovino fetal al 10%, glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 0,1 mg/ml y aminoácidos no esenciales 400 μM (Ala, Asn, Asp, Glu y Pro). Las líneas HEK293T, NRK, C2C12 y MDA-MB-231 se cultivaron en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) con la misma suplementación. Las células BT549 se cultivaron en medio RPMI

(Roswell Park Memorial Institute Medium) con la suplementación anterior además de 2µg/ml de puromicina para mantener la estabilidad de las líneas. Por último, los cardiomiocitos HL-1 se crecieron en medio Claycomb con suero bovino fetal al 10%, glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomina 0,1 mg/ml y 0.1mM norepinefrina en placas pretratadas con gelatina al 0.02% y fibronectina a 5µg/ml. Todas las líneas celulares se mantuvieron en incubadores a 37°C con 5% CO₂ y un 95% de humedad. Para la conservación de las líneas se congelaron de forma gradual (14h a -20°C y 24h a -70°C antes de ser conservadas en N₂ líquido) en alícuotas de 5 millones de células en 1 ml del medio de cultivo con DMSO al 5%. La descongelación de estos viales se realizó a 37°C diluyéndolas inmediatamente en medio de cultivo y centrifugándolas antes de ponerlas a crecer.

3.2.3.2. Tratamientos celulares.

En todos los tratamientos, los compuestos se han añadido en medio fresco según el tipo celular y la placa utilizada en cada experimento. Para desactivar o activar la acción de PKA se usaron respectivamente 10 µM del inhibidor de PKA H89, 1 µM del inhibidor PKI, o bien 100 µM del activador db-cAMP o 40 µM del agonista forskolina. En los experimentos de hipoxia química, las células han sido tratadas también con 200 µM de CoCl₂ durante 12h. Para realizar los cribados de compuestos, las células han sido tratadas durante 3 h, al igual que los casos posteriores con nebulolol.

3.2.3.3. Defosforilación de proteínas.

Para la defosforilación inespecífica de extractos proteicos se utilizó la fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CiP) (New England Biolabs). Se incubó 1 unidad de CiP por microgramo de proteína durante 1 h a 37°C. La reacción se paró hirviendo la muestra a 95°C durante 5 min.

3.2.3.4. Transfección transitoria de plásmidos y siRNAs.

Para la transfección de plásmidos en células eucarióticas se utilizaron preparaciones de alto grado de pureza y filtrados (0.2 µm, Millipore). En estos experimentos se utilizó el agente de transfección Lipofectamina 2000 (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la sobreexpresión de los mutantes S39A y S39E, se mantuvo el medio

de cultivo con los complejos liposoma catiónico-DNA en contacto con las células durante dos horas, se cambió el medio y se analizó el fenotipo a 24 h post-transfección. En el caso de LRPPRC, los complejos liposoma catiónico-DNA se mantuvieron en el medio en contacto con las células durante 72 h, añadiendo medio completo a las 6 h, momento en el que se recogieron las células. En el caso de los siRNAs, éstos se transfectaron a una concentración final de 10 nM (siLRPPRC) o 25 nM (siSGK-1) utilizando el agente de transfección Lipofectamina 2000 (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. En este caso, ambos se mantuvieron 72 h en contacto con las células, añadiendo medio completo a las 6 h.

3.2.3.5. Ensayos de consumo de oxígeno en células adheridas: MitoXpress Xtra.

Esta nueva metodología, MitoXpress Xtra (Agilent), nos permite medir en placa de 96 pocillos el consumo de oxígeno celular mediante fluorescencia utilizando un lector de placas. El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células fueron sembradas el día anterior al experimento y se dejaron en el incubador durante toda la noche. El día del ensayo, se reconstituyó el vial de MitoXpress Xtra en 1 ml de medio de cultivo, este vial contiene una sonda fluorescente que detecta el oxígeno por colisión molecular emitiendo una señal de fluorescencia inversamente proporcional a la cantidad de oxígeno en el pocillo, de manera que puede ser medido en un luminómetro que contenga los filtros de fluorescencia adecuados. Se cambió el medio de la placa añadiendo 90 μ l de medio fresco más 10 μ l de medio conteniendo la sonda descrita. Se selló la superficie con una gota de aceite para evitar la interacción con el oxígeno del ambiente y se realizó la lectura de la placa en el luminómetro FLUOstar Omega (BMG Labtech). La medida se realizó con un filtro Ex 340 ± 50 nm (TR-EXL) Em 655 ± 25 nm (BP-655) que permite el posterior cálculo del “*Lifetime*” de la sonda mediante el software de análisis de datos MARS (BMG Labtech). De esta manera, obtenemos directamente el cálculo de consumo de oxígeno representado inversamente con la emisión de fluorescencia en forma de curva, cuya pendiente nos facilita el cálculo de consumo de oxígeno neto.

3.2.3.6. *Screening* o cribado de compuestos.

Se adquirió una librería comercial de 1018 compuestos aprobados por la FDA, todos ellos diluidos en DMSO a una concentración final de 10 mM y se almacenó a -70°C. Se realizó un stock intermedio en DMSO a una concentración final de 200 µM para realizar los tratamientos en placa para el cribado que también se mantuvo siempre a -70°C para preservar las características de los compuestos. Todos los compuestos han sido aprobados por la FDA en diferentes campos clínicos, por lo que su bioseguridad ha sido probada en ensayos clínicos llegando, en última instancia, a comercializarse. El objetivo de utilizar una librería de estas características es trabajar en el reposicionamiento de fármacos, buscando nuevas funciones para moléculas que ya han sido aprobadas para su uso en clínica. Con esta premisa, se ha probado el efecto de los compuestos sobre la respiración mitocondrial, como se indica en el siguiente apartado, en células HCT116, a una concentración final de 1 µM durante 3 h.

3.2.3.7. Medida del consumo de oxígeno en células adheridas a placa: Ensayos Seahorse.

a) Titulación del número de células.

El primer paso antes de comenzar el cribado de compuestos, consistió en la titulación de la línea celular HCT116 en el lector Seahorse XFe96. Se plaquearon cantidades crecientes de células 24 h antes de la medida de consumo de oxígeno, desde 10000 hasta 60000 células. Se buscó la zona lineal de consumo de oxígeno decidiéndose 35000 como densidad óptima que se utilizó en todo el *screening*.

b) Flujo de trabajo del cribado de fármacos.

Las medidas se realizaron en los equipos de medida de consumo de oxígeno Seahorse XFe96 y XF24 (Agilent technologies) en placas de 96 o 24 pocillos estériles especiales que contienen los dos biosensores fluorescentes (O₂ y pH) así como cuatro puertos diferentes por pocillo útiles para añadir moduladores de la cadena de transporte electrónico a medida que se realiza la lectura de consumo de oxígeno. Los biosensores de los aparatos se calibraron antes de cada experimento con el fin de asegurar una ganancia única del sensor basada en la señal proporcionada por la medida de calibrado en una solución de referencia con valores de oxígeno y pH conocidos. El primer cribado de 1.108

Materiales y métodos

compuestos se realizó en el equipo Seahorse XFe96 que permite la medida simultánea de 96 pocillos. El criterio de selección de este primer cribado fue la respiración sensible a oligomicina (OSR). De esta manera, se puede discernir directamente entre aquellos compuestos que pueden tener un efecto directo sobre la ATP sintasa. Así, se obtuvo la medida de consumo de oxígeno basal y sensible a oligomicina realizando las inyecciones secuenciales de oligomicina 6 μM y rotenona + antimicina 1 μM . De este primer cribado, se seleccionaron aquellos compuestos que modularon la OSR un 40% por encima o por debajo del valor del control, centrándonos en este estudio en los inhibidores. Posteriormente, los compuestos preseleccionados por este método, se llevaron al equipo Seahorse XF24 donde se realizó un estudio en mayor profundidad analizando su efecto sobre la respiración basal, OSR y máxima tras las inyecciones secuenciales de oligomicina 6 μM , DNP 0.75 mM y rotenona + antimicina 1 μM . De nuevo, y con toda la información obtenida en este ensayo, se seleccionaron como “*hits*” aquellos fármacos que modularon todos los parámetros respiratorios un 40% por debajo de los valores control. De los “*hits*” obtenidos se realizó una selección final mediante la literatura disponible eligiéndose un fármaco que se presentará en el presente trabajo.

c) Cribado de compuestos en Seahorse XFe96.

La primera ronda del cribado de 1.018 compuestos en células HCT116 se realizó en células adheridas en placa de 96 pocillos para facilitar el tratamiento con un alto número de compuestos. 24 h antes de la medida, se plaquearon 35000 células en las placas de 96 pocillos en un volumen de 80 microlitos. El día del ensayo, se cambió el medio por 200 μL de medio fresco conteniendo 1 μM de cada compuesto. Se realizó el tratamiento durante 3 horas y se procedió a la medida de consumo de oxígeno en el equipo Seahorse XFe96 incluyendo pocillos control únicamente tratados con DMSO. Se realizaron 3 medidas de consumo de oxígeno basales, 3 tras la inyección de oligomicina y 3 tras la inyección de rotenona + antimicina. Los resultados fueron analizados en el software Wave de Agilent Technologies.

d) Cribado de compuestos en Seahorse XF24.

En este segundo cribado, se seleccionaron los compuestos que fueron capaces de reducir un 40% la OSR respecto al valor del control. De nuevo, 24 h antes de la medida, se plaquearon 35000 células en las placas de 24 pocillos en un volumen de 200 μL . El día del ensayo, se cambió el medio por 700 μL de medio fresco conteniendo 1 μM de los

inhibidores preseleccionados. Se realizó el tratamiento durante 3 horas y se procedió a la medida de consumo de oxígeno en el equipo Seahorse XF24 incluyendo pocillos control únicamente tratados con DMSO. Se realizaron 3 medidas de consumo de oxígeno basales, 2 tras la inyección de oligomicina, 2 tras la inyección de DNP y 4 tras la inyección de rotenona y por último, antimicina. Los resultados fueron analizados en el software Wave de Agilent Technologies.

e) Medida de consumo de oxígeno en células adheridas a placa con diferentes sustratos.

En los ensayos donde se midió la respiración mitocondrial en presencia de glucosa como sustrato se utilizó el medio base de Seahorse (Agilent technologies) suplementado con glucosa 10 mM, glutamina 4 mM y piruvato sódico 1mM, el medio se preparó fresco el día del experimento y unas vez añadidos los suplementos se precalentó a 37°C y se ajustó el pH a 7,4. Una hora antes de la lectura de la placa en cuestión, se cambió el medio a las células por el medio recién preparado y se dejaron reposar una hora en un incubador a 37°C libre de CO₂. Por otra parte, se realizaron ensayos con palmitato como sustrato, con la finalidad de conocer el funcionamiento del proceso metabólico de la β -oxidación. Brevemente, las células se sometieron a 6 horas de medio bajo en glucosa (DMEM; glucosa 0.5mM, glutamina 1mM, FBS 1%). 45 minutos antes de la lectura, se cambia el medio a KHB (NaCl 111 mM, KCl 4.7 mM, CaCl₂ 1.25 mM, MgSO₄ 2mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM, 5mM HEPES, glucosa 2.5 mM, pH 7.4) y justo antes de la lectura se añadió el palmitato, previamente conjugado con BSA para facilitar su permeabilización siendo la concentración final en el pocillo 250:40 μ M palmitato-BSA. Se utilizaron, respectivamente, cartinita 1 mM y etomoxir 400 μ M como control positivo y negativo. De nuevo, se realizaron 3 medidas de consumo de oxígeno basales, 2 tras la inyección de oligomicina, 2 tras la inyección de DNP y 4 tras la inyección de rotenona y por último, antimicina. Los resultados fueron analizados en el software Wave de Agilent Technologies.

3.2.3.8. Inmunoprecipitación (IP).

Las inmunoprecipitaciones se llevaron a cabo partiendo de 500 μ g de proteína total de los extractos celulares diluidos en Lisis IP (Tris-HCl 50mM, EDTA 5mM, EGTA 5mM, NaCl 150 mM, Nonidet-P40 1%, NaF 20 mM, PMSF 1mM, pH=7.5) con inhibidores de proteasas (Roche) y un cóctel de inhibidores de fosfatasa (Sigma). El

primer lugar, se incubaron los extractos celulares en 1 ml de Lisis IP con inhibidores con 12 µg de IgGs del anticuerpo en cuestión de la proteína a ser detectada anti-IF1 (Sanchez-Cenizo et al., 2010), anti-NDUFS4 (ab87399) durante toda la noche a 4°C en rotación en noria. Se preparó también un control de inmunoprecipitación de extracto proteico incubado con IgGs de ratón no específicas. Tras este paso, se realizó el recubrimiento de la resina de proteína G sepharosa (Sigma) con el complejo anticuerpo-proteína. Para ello, se incubaron 30 µl de resina diluida 1:2 en Lisis IP por punto, previamente hinchada y equilibrada, con los complejos anteriormente establecidos, de nuevo durante toda la noche a 4°C en rotación en noria. Posteriormente, se lavó la resina 5 veces con 200 µl de Lisis IP sin apurar el precipitado. La resina se eluyó con tampón Laemmly de electroforesis 10 min a 95°C, se centrifugó a 12.000 x g y se analizó el material inmunoprecipitado mediante fraccionamiento en gel y subsiguiente fluorografía.

3.2.3.9. Inmunocaptura de los complejos de la cadena de transporte electrónico.

Para el análisis de las posibles modificaciones postraduccionales en los complejos de la cadena de transporte electrónico se realizó una inmunocaptura de cada complejo proteico en mitocondrias aisladas según las indicaciones del fabricante (Abcam; ab109711, ab109799, ab109800, ab109801 y ab109715). Brevemente, las mitocondrias fueron aisladas de células en cultivo con o sin tratamiento, según el procedimiento indicado anteriormente. 500 µg de mitocondrias fueron resuspendidas en PBS y las membranas solubilizadas con n-dodecil β-D-maltosa (DDM) a una concentración final de 1%. Tras centrifugar 10 minutos a 15000 x g a 4°C para eliminar la parte insoluble, las proteínas se incubaron con las bolas que presentan los anticuerpos específicos de cada complejo según el kit utilizado a 4°C durante toda la noche en rotación en noria. Por último, las bolas de afinidad se eluyeron con tampón Laemmly de electroforesis 10 min a 95°C, se centrifugó a 12000 x g y se analizó el material inmunoprecipitado mediante fraccionamiento en gel y subsiguiente fluorografía.

3.2.3.10. Detección de proteínas mediante cromatografía líquida de fase reversa acoplada a espectrometría de masas.

Las proteínas contenidas en la inmunocaptura de CI fueron detectadas mediante digestión de la banda en el gel. Para ello, se recortó la banda de interés en el gel teñido con coomasie utilizando como referencia un gel realizado en paralelo y revelado con el

anticuerpo antifosfoserina. Se secó la banda y se destiñó en acetonitrilo:agua (ACN:H₂O, 1:1), se redujo y alquiló (DTT 10 mM 1h a 56°C; yodoacetamida 50 mM 1h a RT en oscuridad) y fue digerida con tripsina (Promega) y quimiotripsina (Roche) según (Shevchenko et al., 1996) con alguna modificación (Perez et al., 2012). Las bandas se secaron en un *speedvac* y la mitad de la banda fue digeridas en bicarbonato de amonio 50mM pH 8.8 con 12.5 ng/μl de tripsina durante 1 h en un baño con hielo. La otra mitad fue digerida en Tris HCl 100mM, CaCl₂ 10mM pH 8 con 25 ng/μl de quimiotripsina 1 h en un baño con hielo. Las digestiones fueron incubadas con NH₄HCO₃ 50 mM (tripsina) o Tris HCl 100 mM, 10 mM CaCl₂ (quimiotripsina) a 37°C o 25°C, respectivamente, durante 12 h. La digestión se paró añadiendo TFA 1%. Todo el sobrenadante se secó y desaló en ZipTip C18 pipette tips (Millipore) hasta el análisis de espectrometría de masas.

Las proteínas digeridas fueron resuspendidas en 10 μl de ácido fórmico 0,1% y analizadas mediante RP-LC-MS/MS en un sistema Easy-nLC II acoplado a un espectrómetro de masas híbrido LTQ-Orbitrap-Velos-Pro (Thermo Scientific). Los péptidos fueron concentrados mediante cromatografía de fase reversa usando una precolumna 0,1mm × 20 mm C18 RP (Thermo Scientific) y luego fueron separados usando una columna 0.075mm x 250 mm C18 RP (Thermo Scientific) operando a 0.3 μl/min según (Alonso et al., 2015). Finalmente, la identificación de péptidos se llevó a cabo con el software PEAKS Studio 8.5 (Bioinformatics Solutions Inc.) (Zhang et al., 2012) (Han et al., 2011) (Han et al., 2004).

3.2.3.11. Medida de producción de ATP por la ATP sintasa y ATP total.

La medida cinética de síntesis de ATP se llevó a cabo en células permeabilizadas siguiendo el protocolo establecido en el laboratorio (García-Bermúdez, 2016). Para realizar la permeabilización, aproximadamente 3 millones de células HCT116 se mantuvieron durante 1 minuto con agitación en 1 ml de medio de respiración (sacarosa 225 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM, BSA 0.05 % p/v, tampón fosfato-potasio 10 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.4) conteniendo digitonina 50 μg/ml de medio. Tras la permeabilización, las células fueron rápidamente centrifugadas a 1000 x g. durante 5 min y el pellet celular se lavó dos veces con medio de respiración atemperado para eliminar cualquier resto de digitonina. A continuación, 100 μg de células permeabilizadas se resuspendieron en 20 μl de medio de respiración. Las medidas se realizaron en placas de 96 pocillos de borde opaco y fondo transparente, condiciones óptimas para medir

luminiscencia. Por cada pocillo se prepararon 160 μ l de medio de respiración suplementado con succinato 2 mM, rotenona 10 nM, el inhibidor de la adenilato quinasa P^1, P^5 -di(adenosina-5') pentafofato 150 μ M y ADP 5 mM, preparado este último en fresco. Para medir la síntesis de ATP, se preparó un segundo buffer, conteniendo 0.25:0.025 mg/ml de luciferina:luciferasa, para poder medir la reacción de síntesis de ATP como emisión de luminiscencia al acoplarse las reacciones que cataliza la luciferasa ($ATP + D\text{-luciferina} + O_2 \rightarrow \text{oxiluciferina} + PPi + AMP + CO_2 + \text{luz}$). Se añadieron 20 μ l de este segundo buffer por pocillo medido y se lanzó la reacción al añadir los 20 μ l que contenían células permeabilizadas, siendo el volumen final por pocillo de 200 μ l. Se realizó la lectura en un luminómetro FLUOstar Omega (BMG Labtech) mediante un filtro de luminiscencia y midiendo la cinética de emisión cada 10 segundos durante 2-3 minutos hasta que terminan los sustratos. Con el fin de comprobar la especificidad del ensayo, se llevó de manera paralela una medida con OL 30 μ M que bloquea la actividad de la ATP sintasa. Para obtener la producción de ATP en picomoles, se realizó la medida de una curva de ATP con concentraciones conocidas y el mismo buffer de luciferina:luciferasa y se normalizaron los datos por mg de proteína medida. Para medir la cantidad total de ATP presente en las células se utilizó el kit ATP Bioluminescence Assay Kit HS II de Roche siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.2.3.12. Medida del flujo glucolítico.

La determinación del flujo glucolítico se realizó midiendo la velocidad inicial de producción de lactato mediante la determinación de su concentración en el medio de cultivo. Este proceso se monitoriza espectrofotométricamente a una longitud de onda de 340 nm, longitud a la que se mide la conversión de NAD^+ a NADH producto de la catálisis de la conversión de L-lactato a piruvato por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). Para realizar este ensayo, las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos el día anterior. El día del experimento, con las células a un 70% de confluencia, se cambió el medio por 2 ml medio fresco con 0.5% de FBS utilizando como control positivo OL 6 μ M (al inhibir la producción de ATP mitocondrial, obtenemos el máximo rendimiento del flujo glucolítico). Se recogieron alícuotas de 100 μ l de medio a distintos tiempos para comprobar la linealidad del ensayo desde tiempo 0 hasta 2 horas. Las muestras recogidas se precipitaron con 4 volúmenes de ácido perclórico al 6% durante 45 min en hielo y, después de centrifugar 5 min a 11000 x g a 4°C, los sobrenadantes se neutralizaron en

presencia de indicador universal y se usaron para la determinación enzimática del lactato (Cuezva et al., 1982). Se mezclaron en la cubeta de reacción 200 μ l de agua, 500 μ l de la mezcla de reacción (Glicina 1M, Hidracina-SO₄ 0.4M, EDTA 1.3mM, NAD⁺ 7.5 mM, pH=9.5) y en último lugar 300 μ l de muestra y se realizó una prelectura a 340nm en el espectrofotómetro (E0). La adición de sulfato de hidracina permite el secuestro del piruvato formado, desplazando la reacción hacia la producción de piruvato. Por último, se añadieron 10 μ l de la enzima LDH (Roche) y se midió a la misma longitud de onda transcurridos 40 min (E1). Se calculó la concentración de lactato expresado como nmoles de lactato producido por μ g de proteína y hora aplicando la ley de Lambert-Beer ($E1-E0=C * l * \epsilon$).

3.2.3.13. Medida de actividad de complejos respiratorios por espectrofotometría en mitocondrias asiladas.

Todos los ensayos enzimáticos se llevaron a cabo en mitocondrias aisladas siguiendo el proceso anteriormente descrito. Una vez aisladas, las mitocondrias fueron congeladas y descongeladas en N₂ líquido para permitir el acceso de todos los sustratos a los complejos mitocondriales.

a) Actividad NADH deshidrogenasa sensible a rotenona (CI).

La actividad de CI se determinó por la disminución de absorbancia a 340 nm, debida a la oxidación de NADH, cuyo coeficiente de extinción molar (ϵ) es 6,22 mM⁻¹cm⁻¹. Con la finalidad de que la oxidación de NADH debida a otras enzimas NADH deshidrogenasas fuera excluida, se realizó una reacción con rotenona en paralelo. De esta manera, se calculó la disminución en el valor de absorbancia por minuto ($\Delta A/\text{min}$) como la diferencia entre ($\Delta A/\text{min}$)sin rotenona y ($\Delta A/\text{min}$) con rotenona. 100 μ g de mitocondrias resuspendidas en 10 μ l de medio B (sacarosa 250mM, HEPES 2mM, EGTA 0.1mM) fueron resuspendidas en 950 μ l de medio C1/C2 (K₂HPO₄ 25mM, MgCl₂ 5mM, KCN 3mM y BSA 2.5 mg/ml), con 2 μ l de antimicina 1mg/ml y 13 μ l de CoQ1 10mM y 6 μ l de rotenona 500 μ M en el caso del duplicado con rotenona, en una cubeta de espectrofotómetro de 1 cm de longitud de paso de luz y a temperatura ambiente. Sobre la mezcla se añadieron 10 μ l de NADH 13mM. Tras 2 minutos, se midió absorbancia a 340 nm otros 4 minutos.

b) Actividad succinato deshidrogenasa (CII).

La actividad de CII se determinó por la disminución de absorbancia a 600 nm, debida a la reducción del diclorofenol-indofenol (DCPIP) cuyo ϵ es $19,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. 50 μg de mitocondrias resuspendidas en 10 μl de medio B fueron resuspendidas en 800 μl de medio C1/C2 junto con 30 μl de DCPIP 5mM, 2 μl de rotenona 500 μM y 100 μl de succinato 0.5 M en una cubeta de espectrofotómetro de 1 cm de longitud de paso de luz y a temperatura ambiente. Finalmente, se añadieron 80 μl de metosulfato de fenazina 70 mM y se midió la absorbancia a 600 nm durante 5 minutos cada 30 segundos.

c) Actividad citocromo C oxidasa (CIV).

La actividad de CIV se determinó por la disminución de absorbancia a 550 nm, debida a la oxidación del citocromo C reducido. Para su preparación, se pesaron 15 mg de citocromo c, que se disolvieron en 1 ml de tampón KP 10mM pH=7 añadiendo 1 mg de NaBH_4 y enrasando hasta 1.5 ml con agua destilada, todo en hielo donde se mantiene 30 minutos. En una cubeta de espectrofotómetro, se añadieron 100 μl Tampón KP 100 mM pH=7, 795 μl de agua destilada, 5 μl con 100 μg de mitocondrias y se lanzó la reacción con 100 μl de citocromo c reducido 1%, momento en el que se empezó a medir la absorbancia cada 30 segundos durante 5 minutos.

d) Actividad ATP hidrolasa (ATP sintasa).

La actividad ATP hidrolítica de la ATP sintasa se midió mediante un ensayo acoplado utilizando lactato deshidrogenasa (LDH) y la piruvato quinasa (PK) como enzima acoplante (Barrientos et al., 2009) midiendo la disminución de absorbancia a 340 nm debida la oxidación de NADH a NAD^+ por cada molécula de ATP hidrolizada. Esta reacción tiene lugar en la hidrólisis de ATP, donde el ADP generado permite a la PK transformar el fosfoenolpiruvato (PEP) en piruvato el cual a su vez es utilizado por la LDH para generar lactato. La cinética de disminución en la absorbancia se midió en placas de 96 pocillos con un FLUOstar Omega (BMG Labtech) en una suspensión de 50 μg de mitocondria aislada de células tomando una medida cada 15 seg. El tampón de reacción es de 100 μl /reacción y contiene Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, 5 mg/ml BSA, MgCl_2 20 mM, KCl 50 mM, FCCP 15 μM , antimicina A 5 μM , PEP 10 mM, ATP 2.5 mM, 4 U de LDH y de PK, y NADH 1 mM. Cuando la reacción se estuvo produciendo durante al menos 3-5 min, se añadió OL 6 μM y a continuación se siguió midiendo comprobando que se

producía una inhibición casi completa (> 90%) de la actividad ATP hidrolítica. La actividad ATPasa específica se expresó en nanomoles de NADH oxidado/min/miligramo de proteína mitocondrial, calculado según la ecuación de Lambert-Beer: $N = A_{340}/(\epsilon_{340} \times l)$, donde N es la concentración de NADH oxidado, A_{340} el cambio en la absorbancia medida, ϵ_{340} el coeficiente de extinción molar, y l la longitud de paso de placa ($\epsilon_{340} = 6.22/\text{mM}/\text{cm}$).

3.2.3.14. Citometría de flujo.

Una suspensión en PBS de células tripsinizadas se centrifugaron 5 min a 1200 rpm a 4°C y el precipitado se resuspendió en solución de FACS (FBS 1%, NaN_3 0,1 % y PBS 1X). La suspensión celular se analizó en un citómetro de flujo FACS Calibur (Becton Dickinson) utilizando el programa CellQuest suministrado por el fabricante. En cada condición se analizaron al menos 10000 células. Los resultados se analizaron con el programa BD FACScan.

a) Proliferación celular.

La proliferación celular por citometría de flujo se determinó utilizando el kit Click-iT EdU Flow Cytometry Assay Kit (Molecular Probes) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadió a las células al 50-60% de confluencia 5-ethynyl-20deoxyuridine (EdU) 10 μM durante una hora y media para permitir su integración en el DNA celular ya que EdU es un nucleósido análogo de la timina que se incorpora al DNA durante su fase de replicación. Este método se basa en la reacción química covalente catalizada por cobre entre una azida acoplada a Alexa Fluor 555 y un alquino que se encuentra en la fracción etinil de EdU. De esta manera, determinamos el porcentaje de células en fase S en toda la población celular. A continuación, las células se recogieron por tripsinización y se lavaron con PBS conteniendo 1% de BSA, se centrifugaron y se retiró el sobrenadante. El pellet celular se resuspendió en 100 μl de Click-iT fixative para su fijación durante 15 minutos protegidas de la luz y a temperatura ambiente. Se lavaron de nuevo con 1 ml de PBS 1% BSA y se incubaron 15 minutos en 250 μl de Click-iT saponina-wash reagent 1X. Se preparó el buffer del kit denominado Click-it EdU diluyendo la solución stock 10x en 1:10 agua milliQ y se añadió 0.5 ml del cocktail a cada tubo donde se mantuvo 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las muestras

Materiales y métodos

con 1 ml de Click-iT saponina-wash reagent 1X y se llevaron al citómetro en 200 μ l de componente E con DAPI 1 μ g/ml en la mezcla.

b) Muerte celular por tinción con Anexina V.

Este método se fundamenta en la unión entre el conjugado fluorescente AnexinaV-FITC y la fosfatidil-serina, fosfolípido que queda expuesto en la cara externa de la membrana plasmática en fases tempranas del proceso apoptótico y siendo las anexinas un grupo de proteínas capaces de unirse a los fosfolípidos de membrana de manera calcio-dependiente. Se sembraron 50000 células y se dejaron crecer durante toda la noche en el incubador. Al día siguiente, se trataron con estaurosporina 1 μ M (STS), peróxido de hidrógeno 120 μ M (H_2O_2) o tamoxifeno 1 μ M (TAM) durante 48 h. Se tripsinizaron las células y se lavaron dos veces con PBS frío, se resuspendieron en el tampón de unión (HEPES/NaOH 100mM, NaCl 11.4M, $CaCl_2$ 25mM, pH: 7.5), en una proporción de 10 millones de células por ml. Se hicieron alícuotas de 100 μ l de células en tubos de citómetro donde se añadió la Anexina V-FITC (50 μ g/ml). Tras vortexar, se incubaron 15 minutos en hielo y siempre en oscuridad. Se añadieron directamente 380 μ l de tampón de unión y se llevaron al citómetro.

c) Determinación de la producción de peróxido de hidrógeno.

Para medir la producción de H_2O_2 se utilizó la sonda 2',7'-Diacetato de Diclorofluoresceína, H2DCFDA (DCF) (Invitrogen). Tras la oxidación e hidrólisis de este compuesto por las esterasas intracelulares da lugar a carboxi-diclorofluoresceína, que al tener cargas negativas adicionales, impide su difusión fuera de la célula. Posteriormente, su oxidación por peróxido de hidrógeno da lugar a un compuesto fluorescente (2',7'-diclorofluoresceína que será detectado por citometría de flujo al ser excitado a 510 nm emitiendo a 534 nm de longitud de onda. El día previo al experimento se sembraron 40000 células en placa de 12 pocillos que fueron tripsinizadas el día del experimento e incubadas en PBS con DCF 10 μ M durante 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se dejaron los tubos en hielo y se llevaron al citómetro.

3.2.3.15. Inmunofluorescencia en células fijadas.

Con el fin de localizar IF1 o SGK-1 se realizó una inmunofluorescencia en células fijadas. Se sembraron 20000 células en una gota de 100 µl en un cubreobjetos y estéril en placa de 24 pocillos a las que se añadió 0.5 ml de medio una vez estuvieron bien adheridas. El día del experimento, se retiró el medio y se lavaron dos veces con PBS. Se fijaron durante 5 minutos con PFA 2% en PBS cubriendo por completo el cristal a temperatura ambiente seguido de una fijación en PFA 4% en PBS a 4°C. Se retiró el PFA y se lavaron dos veces con PBS. A continuación, para eliminar la autofluorescencia de las células, se cubrieron con una solución de NaBH₄ 1mg/ml en PBS pH 8.0 durante 10 minutos a temperatura ambiente y se volvieron a lavar dos veces con PBS. 1. Las células se permeabilizaron con Tritón x-100 al 0.1% en PBS a temperatura ambiente durante 10 minutos y se incubaron durante 10 minutos con la solución de bloqueo (1%BSA en PBS/0.1% tritón X-100) a temperatura ambiente. Las células permeabilizadas y bloqueadas se incubaron con el anticuerpo primario en cuestión según se indica en la Tabla 2 diluido en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C dentro de una cámara húmeda que impida que se sequen las células. Al día siguiente, se lavaron dos veces con PBS y se incubaron 45 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad con el anticuerpo secundario de conejo anti-ratón conjugado con Alexa 488 (Molecular Probes) o ratón anti-conejo Alexa 555 (Molecular Probes) diluido 1:1000 en solución de bloqueo. Se añadió DAPI 1µg/ml para marcar los núcleos celulares durante los últimos 10 minutos de incubación. Por último, los cubreobjetos se lavaron tres veces con PBS, una con agua y una con etanol 100% y se dejaron secar al aire Los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos (con las células hacia abajo) utilizando Mowiol-DABCO y se secaron toda la noche en la oscuridad y a temperatura ambiente. La fluorescencia celular se registró por microscopía confocal utilizando un microscopio de barrido láser confocal y multifotón LSM710 y LSM510 acoplados a un microscopio invertido AxioObserver y uno vertical AxioImager M1 (Zeiss), respectivamente. Las imágenes fueron procesadas en el software Image J.

3.2.3.16. Elaboración del anticuerpo contra IF1 fosforilado.

Para la elaboración de un anticuerpo que reconozca únicamente la forma fosforilada de IF1, se sintetizó el péptido defosforilado RGAGSIREAGGC (Lot: U0130BC140-1) como

control negativo y el péptido fosforilado RGAG{pSER}IREAGGC (Lot: U9924BC140-1) con el que se inmunizaron conejos New Zealand. Del sangrado de los conejos se purificó el anticuerpo policlonal fosfoespecífico que reconoce IF1 fosforilado mediante el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) (Abyntek Biopharma, S.L.).

3.2.4. Métodos en ratones.

3.2.4.1. Condiciones generales de cuidado, mantenimiento y manejo de ratones.

Los ratones utilizados en este estudio se mantuvieron en una sala de nivel de seguridad p2 en el Animalario del CBMSO, en celdas estancas dotadas de ventilación y en un número apropiado al tamaño de la celda. Los animales dispusieron de libre acceso al agua y a una dieta estándar (23% proteínas, 5% lípidos, 40.8% glúcidos, 4% celulosa, 5.7% sales minerales, 12% agua y vitaminas). La temperatura y la humedad fueron controladas, oscilando entre los 22-24°C y el 40-50% respectivamente, así como los periodos de luz/oscuridad con ciclos de 12h/12h comenzando a las 08.00 am. La estabulación y manejo de los ratones fueron realizados por personal con la formación necesaria y siguiendo la normativa vigente y las directrices institucionales oportunas en cuanto a bienestar animal. Todos los experimentos fueron, además, aprobados por el Comité de Ética de la Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid. Los experimentos fueron realizados con un número de réplicas por condición que minimizase el uso de animales siempre que se garantizara la validez estadística del estudio.

3.2.4.2. Proliferación tumoral en ensayos con ratones desnudos “*nude*”.

Para la implantación de células tumorales en ratones desnudos se utilizaron machos o hembras de 6 semanas de edad. Los ratones se inocularon subcutáneamente con 4 millones de células HCT116-luc o MDA-MB-231, en un volumen de 100 µl de PBS en los flancos posterior derecho e izquierdo del animal. Se practicó una inspección visual de los animales al menos tres veces por semana. Una vez que los tumores resultaron visibles y palpables, el tamaño de los mismos se registró de forma manual con un calibre estándar. Se realizaron en todos los casos dos medidas de cada tumor: ancho y largo. El volumen de los tumores generados se calculó siguiendo la fórmula $0.52 \times (a^2 \times l)$, donde “a” representa dimensión más corta y “l” la más larga (Govindarajan et al., 2007). Por condicionantes éticos y con objeto de aliviar el sufrimiento de los animales, en los ensayos

de crecimiento tumoral los animales fueron sacrificados una vez que el tumor hubo alcanzado un tamaño aproximado de 2000 mm³. Los tumores fueron extraídos inmediatamente después del sacrificio de los animales y congelados hasta su procesamiento.

3.2.4.3. Tratamiento antitumoral de los animales.

Tras la inoculación y seguimiento del crecimiento de las células tumorales, los animales se distribuyeron en diferentes grupos de manera aleatoria al alcanzar los tumores un volumen aproximado de 100 mm³ momento en el que empezó el tratamiento indicado mediante una inyección intraperitoneal diaria 5 días a la semana, según el grupo en el que fueron asignados:

- Grupo control (CRL): recibió 100µl de solución NaCl 0.9%.
- Grupo nebivolol (NEB): recibió una dosis diaria de 10mg/kg de nebivolol.
- Grupo 5-fluorouracilo (5-FU): recibió una dosis diaria de 0.2mg/kg de 5-FU (Sigma).
- Grupo combinado nebivolol y 5-fluorouracilo (NEB+5-FU): recibió una dosis diaria de 10mg/kg de nebivolol más 0.2mg/kg de 5-FU.
- Grupo tamoxifeno (TAM): recibió una dosis diaria de 0.8mg/kg de tamoxifeno (Sigma).
- Grupo combinado nebivolol y tamoxifeno (NEB+TAM): recibió una dosis diaria de 10mg/kg de nebivolol más 0.8mg/kg de tamoxifeno.

3.2.4.4. Seguimiento del crecimiento tumoral de los animales.

Desde el momento en el que comenzó el tratamiento, se realizó un seguimiento del crecimiento tumoral consistente en la medida manual del calibre del tumor 3 veces por semana y, en el caso de los ratones portadores de tumores de HCT116-luc, un seguimiento de la luminiscencia mediante el equipo IVIS Lumina II (Caliper Life Sciences). Este equipo permite seguir el crecimiento del tumor *in vivo* mediante la recepción de una señal luminiscente. Para ello, los ratones portadores de la línea celular que contenía la construcción del gen reportero luciferasa, recibieron una inyección intraperitoneal de luciferina (Perkin Elmer) y fueron anestesiados en cámara de isofluorano. Posteriormente, se obtuvo la intensidad de luminiscencia de las células

tumorales en el equipo IVIS que fue cuantificada con el software Living Image (Perkin Elmer) como la media de fotones emitidos por segundo y superficie del tumor.

3.2.4.5. Extracción de tumores.

Los animales se sacrificaron en cámara de CO₂ y los tumores fueron extraídos, medidos y pesados. Se lavaron en PBS y se procesaron según su uso posterior. Para la extracción de proteínas se pulverizaron en mortero con N₂ líquido y se homogeneizaron y trataron con el medio indicado al comienzo de este apartado. Para realizar los cortes para las inmunofluorescencias, se mantuvieron a 4°C en PFA 4% durante una noche y posteriormente en sacarosa al 30% hasta su congelación en criostato y corte en lonchas de 15 µm en micrótopo en el servicio de histología del Centro Nacional de Biotecnología (CNB, Madrid).

3.2.4.6. Medida de ATP total en los tumores.

Para medir la cantidad total de ATP se utilizó el kit ATP Bioluminescence Assay Kit HS II de Roche siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se pesaron pequeños trozos de los tumores congelados en N₂ líquido y se machacaron en un montero. Se añadieron 9 volúmenes de medio Tris EDTA precalentado a 95°C y se homogeneizaron con un pistón para eppendorf. Se hirvieron las muestras a 100 °C durante 2 minutos, se centrifugaron 5 min a 1000 x g en microcentrífuga y se midieron 50 µl del sobrenadante, donde se encuentra el ATP, junto con 50 µl del buffer de medida del kit en el luminómetro FLUOstar Omega (BMG Labtech). Para obtener la concentración de ATP se midió una curva estándar de concentraciones conocidas de ATP.

3.2.4.7. Inmunohistoquímica

Con el fin de comprobar la estructura celular de los cortes de los tumores, se realizó una tinción de hematoxilina-eosina. Para ello, se embebieron los portas en Hematoxilina de Mayer (Dako) durante 1 minuto antes de pasar los portas por la escala de alcoholes para su deshidratación, según los siguientes pasos: agua destilada, ácido acético 1% en etanol 70%, agua destilada, eosina 0.1%, agua destilada, etanol 70%, etanol 100% terminando en xileno. Tras este paso, se montaron los cubreobjetos sobre los portaobjetos con Mowiol-DABCO y se procesaron las imágenes en un microscopio de campo claro.

3.2.4.8. Inmunofluorescencia.

Los portas que contenían los cortes de los tumores se mantuvieron congelado a -70°C hasta su uso. Para realizar la detección de Ki67 y Caspasa-3 activa mediante inmunofluorescencia, se desenmarcaron los antígenos hirviendo los portas durante 10 minutos en buffer de citrato 10 mM pH=6. Se dejaron enfriar los cortes a temperatura ambiente y se lavaron en agua destilada, se dejaron 5 minutos en etanol 80% y para evitar lo máximo posible la señal propia de autofluorescencia de los cortes se dejaron 10 minutos en H₂O₂ 30%:Metanol en proporción 1:10 dando un último pase en etanol 80%. Tras lavarlos en agua destilada, se pasaron los cortes a la solución de bloqueo BSA 3% y suero de caballo 5% en PBS 1X durante 30 minutos y por último se añadió el anticuerpo primario según se indica en la Tabla 2 en una gota de unos 200 µl con el porta en horizontal en una cámara húmeda donde lo dejamos durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, tras varios lavados en PBS 1X, se preparó la solución de bloqueo con el anticuerpo secundario adecuado Alexa 488 o 555 (Molecular Probes) y DAPI para marcar 1:5000 núcleos que se incubó durante 1 h a temperatura ambiente en oscuridad. Por último, los cortes se lavaron en abundante PBS 1X y se montaron en Mowiol-DABCO. La fluorescencia se registró por microscopía confocal utilizando un microscopio de barrido láser confocal y multifotón LSM710 y LSM510 acoplados a un microscopio invertido AxioObserver y uno vertical AxioImager M1 (Zeiss), respectivamente. Las imágenes fueron procesadas en el software Image J.

3.2.4.9. Determinación de la carbonilación de proteínas celulares.

Para la determinación de la carbonilación de proteínas se utilizó el “Oxyblot Oxidized Protein Detection Kit” (Chemicon Internacional). El método se basa en la detección y cuantificación de proteínas modificadas por radicales libres de oxígeno. Estas modificaciones tienen como consecuencia la introducción de grupos carbonilo en las cadenas laterales de las proteínas que se derivan a DNP-hidrazona por la reacción con DNPH. Las muestras de proteína derivadas a DNP se separan en geles de poliacrilamida seguido del protocolo habitual de *Western blot*. Para ello, se extrajeron las proteínas de los tumores como se ha indicado anteriormente. A continuación, se llevó a cabo la derivatización de las proteínas (20 µg) mediante la incubación con dinitrofenilalanina (DPNH) durante 30 min. Las muestras proteicas así derivadas se fraccionaron en geles al

Materiales y métodos

12% y se procesaron mediante *Western blot*. Junto a las muestras derivadas se fraccionaron muestras control sin derivar. El anticuerpo primario utilizado fue anti-DPN a una dilución 1:500 y el secundario a una dilución 1:300 siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.2.5. Métodos estadísticos

3.2.5.1. Estadística aplicada.

Se aplicó el estadístico de contraste de la t de Student que compara las medias de dos variables que siguen una distribución normal para determinar la significatividad estadística de los resultados, considerándose estadísticamente significativo un $p < 0.05$. Los análisis de supervivencia se llevaron a cabo mediante análisis de Kaplan-Meier aplicando el estadístico log rango con el software IBM SPSS Statistics 24.0.

4. RESULTADOS

4.1. Regulación de la actividad inhibitoria de IF1.

4.1.1. La fosforilación de la serina 39 regula la unión de IF1 a la ATP sintasa.

Estudios del fosfoproteoma humano describen la fosforilación de IF1 (Zhao et al., 2011, Zhou et al., 2013, Christensen et al., 2010, Sharma et al., 2014). Para confirmar la existencia de dicha fosforilación y su relevancia fisiológica, se inmunoprecipitó IF1 en células de cáncer de colon HCT116. El revelado con un anticuerpo que reconoce residuos de serina fosforilados permitió establecer que la fosforilación tenía lugar en residuos de serina (Figura 7A). La fosforilación de IF1 desaparecía al incubar el extracto proteico con una fosfatasa inespecífica (CiP) (Figura 7A) de acuerdo con resultados previos de nuestro laboratorio (Garcia-Bermudez et al., 2015). Además, el tratamiento con activadores e inhibidores de la vía de la proteín quinasa A (PKA) permitieron establecer el papel de una PKA mitocondrial en la fosforilación de IF1 (Garcia-Bermudez et al., 2015).

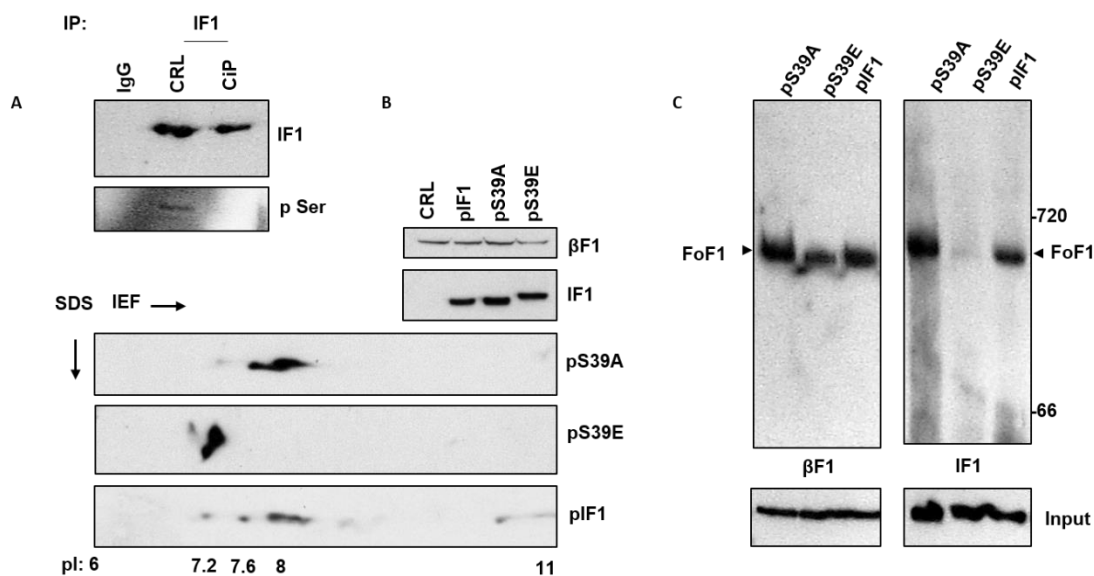


Figura 7. IF1 se fosforila en la serina 39 impidiendo su unión a la ATP sintasa. A. Western blot de la inmunoprecipitación de IF1 en células HCT116 control (CRL) y tratadas con una fosfatasa inespecífica (CiP). Se incluye un control de la técnica con una inmunoglobulina de ratón no específica (IgG). Se ha revelado con IF1 como control de la inmunoprecipitación y con un anticuerpo anti serinas fosforiladas para comprobar el estado de fosforilación de IF1. **B.** Western blot de la sobreexpresión de los plásmidos de IF1 (pIF1) y los mutantes fosfodeficiente (pS39A) y fosfomimético (pS39E) en células NRK (panel de arriba). El panel de abajo muestra los puntos isoeléctricos de IF1, S39A y S39E definidos por electroforesis bidimensional. **C.** BN-PAGE de mitocondrias aisladas de células HCT116 transfectadas con los plásmidos de sobreexpresión de IF1, S39A y S39E. Se muestra la inmunodetección de β F1-ATPasa (panel izquierdo) y de IF1 (panel derecho). Se muestra el input de la expresión.

Resultados

Con el fin de identificar los residuos potencialmente implicados en la fosforilación, se generaron los mutantes fosfo-deficientes (S27A, S39A y S63A) y fosfo-miméticos (S27E, S39E y S63E) correspondientes a los tres residuos de serina presentes en la proteína IF1 (Garcia-Bermudez et al., 2015). Estudios de producción de ATP en células HCT116 permeabilizadas transfectadas revelaron que había un aumento significativo en la producción de ATP en presencia del mutante S39E y una consecuente disminución de la actividad con el mutante S39A (Garcia-Bermudez et al., 2015). Además, el mutante S39A co-inmunoprecipitaba con la fracción F1 de la ATP sintasa, no así el S39E, indicando la interacción de esta forma fosfo-deficiente de IF1 con la ATP sintasa (Garcia-Bermudez et al., 2015).

Con el fin de definir el punto isoelectrico de migración de las formas fosfo y defosforiladas de IF1, se transfectó de manera transitoria la línea celular NRK con los plásmidos que contienen IF1 humano (pIF1) y los mutantes (pS39A y pS39E) (Figura 7B, panel de arriba). Al ser una línea celular de rata podemos detectar la señal específica de los mutantes con secuencia humana sin interferir con el IF1 endógeno. De esta manera, definimos que en tiras de inmobilinas de rango de pH del 6 al 11, el punto isoelectrico en el que encontraremos la forma de IF1 defosforilada de la serina 39 se encuentra entre 7.6 y 8; mientras que la forma fosforilada de la serina 39 se encuentra en un pI de 7.2 (Figura 7B, panel de abajo). Además, la expresión del plásmido no mutado genera formas en ambos pI (puntos en 7.2, 7.6 y 8) (Figura 7B, panel de abajo).

En células HCT116, la inhibición de las actividades sintética e hidrolítica de la ATP sintasa tiene lugar cuando IF1 se encuentra en estado defosforilado (Garcia-Bermudez et al., 2015). Con el objetivo de verificar la interacción de IF1 con la ATP sintasa que explique dicha inhibición, se aislaron mitocondrias de células HCT116 transfectadas con los citados plásmidos y se resolvieron los complejos proteicos mitocondriales utilizando la técnica de electroforesis Blue Native PAGE (BN-PAGE) (Figura 7C). Se observó que la presencia de IF1 se puede detectar en una banda a la misma altura que la ATP sintasa (F_0F_1) en su condición defosforilada (S39A) y en estado basal (pIF1), donde coexisten ambas formas de IF1 (ver Figura 7B). Sin embargo, la forma fosforilada (pS39E) no aparece al realizar esta electroforesis en condiciones nativas (Figura 7C), lo que demuestra la importancia de la fosforilación de la S39 para prevenir la interacción de IF1 con la ATP sintasa.

Para verificar que esta comigración de S39A indica interacción directa del inhibidor con la ATP sintasa y complementado los experimentos de co-inmunoprecipitación presentes en (Garcia-Bermudez et al., 2015) se resolvieron los complejos del BN-PAGE en una segunda dimensión con SDS (Figura 8). Verificamos que el mutante S39A se encuentra unido al monómero de la ATP sintasa (F_0F_1) (ver recuadro en Figura 8A) y a la subunidad βF_1 -ATPasa por su migración electroforética en condiciones desnaturalizantes (Figura 8B), quedando una gran cantidad de la proteína libre de interacción (Figura 8B, panel izquierdo). Por el contrario, el mutante S39E se encuentra prácticamente libre, sin unirse a la ATP sintasa (F_0F_1) (Figura 8A), a excepción de una pequeña fracción que parece co-migrar junto con la subunidad βF_1 -ATPasa (Figura 8B, panel derecho). De esta manera, podemos afirmar que únicamente la forma defosforilada de IF1 es capaz de interactuar con la ATP sintasa.

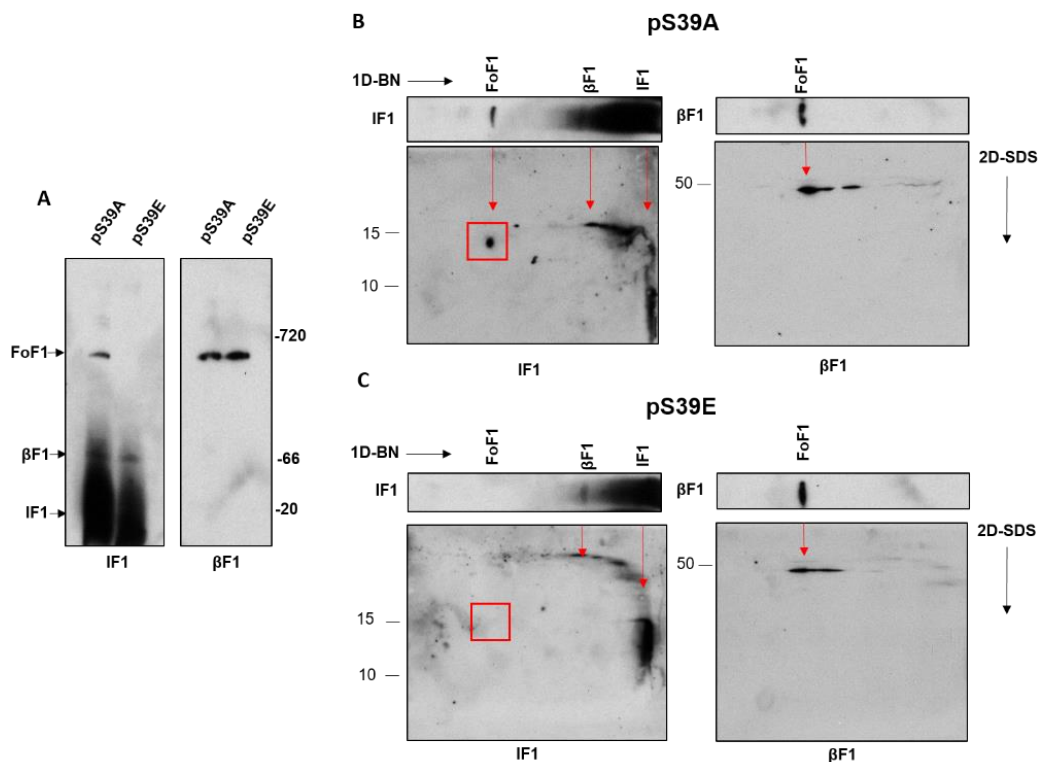


Figura 8. La defosforilación de IF1 permite su unión a la ATP sintasa. A. BN PAGE de mitocondrias aisladas de células NRK transfectadas con pS39A y pS39E. Se muestra la inmunodetección de IF1 (panel izquierdo) y de βF_1 -ATPasa (panel derecho). B-C. Western blot sobre segunda dimensión SDS para la resolución de IF1 y βF_1 -ATPasa contenidos en BN-PAGE del mutante pS39A (B) y pS39E (C). El cuadrado rojo señala la migración en la segunda dimensión de IF1.

4.1.2. La inhibición de la PKA y la hipoxia determinan la unión de IF1 a la ATP sintasa.

El tratamiento de las células con inhibidores de PKA, como es el inhibidor competitivo H89, promueve la defosforilación de IF1 (Garcia-Bermudez et al., 2015). Por el contrario, activadores de PKA como forskolina o el db-cAMP promueven su fosforilación (Garcia-Bermudez et al., 2015). Para comprobar la unión de IF1 a la ATP sintasa en estas condiciones, se trataron células HCT116 con H89 y forskolina y se aislaron las membranas mitocondriales que fueron resueltas en BN-PAGE. Encontramos que las células tratadas con H89 tenían una fracción significativamente mayor de IF1 unido al monómero de la ATP sintasa en comparación con la situación control y con el tratamiento con forskolina (Figura 9A). Por otro lado, vimos que mimetizando un estrés hipóxico con CoCl_2 , un agente que induce la hipoxia química y defosforila IF1 (Garcia-Bermudez et al., 2015), la fracción de IF1 que se encontraba unida a la ATP sintasa era significativamente mayor que cuando las células tenían IF1 fosforilado por tratamiento con forskolina (Figura 9B).

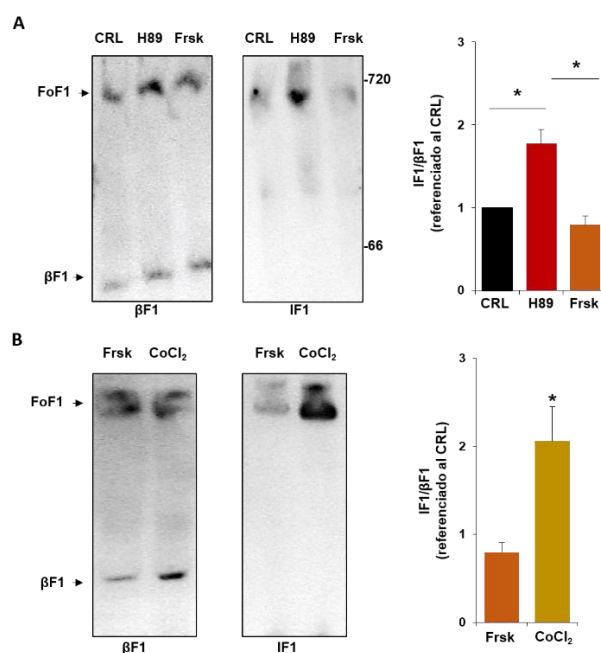


Figura 9. La unión de IF1 a la ATP sintasa es dependiente de PKA y de la hipoxia. A. BN-PAGE de mitocondrias aisladas de células HCT116 controles (CRL), tratadas con el inhibidor específico de PKA (H89) y el activador forskolina (Frsk). Se muestra la inmunodetección de βF1 -ATPasa (panel izquierdo) y de IF1 (panel derecho). El histograma muestra la cuantificación de la cantidad de IF1 unido a la ATP sintasa en las tres condiciones. **B.** BN-PAGE de mitocondrias aisladas de células HCT116 controles (CRL) tratadas con forskolina (Frk) y cloruro de cobalto (CoCl_2). Se muestra la inmunodetección de βF1 -ATPasa (panel izquierdo) y de IF1 (panel derecho). El histograma representa la cuantificación de la cantidad de IF1 unido a la ATP sintasa en las dos condiciones. **A-B.** Los histogramas representan la cuantificación como media \pm SEM de 3 experimentos. * $p < 0.05$ cuando se compara respecto al control por el test de t de Student.

4.1.3. La regulación de PKA determina la eficiencia de la función mitocondrial.

Para estudiar las consecuencias del estado de fosforilación de IF1 sobre la actividad mitocondrial se puso a punto una técnica que determina el consumo de oxígeno de células adheridas en placa mediante la emisión de una sonda fluorescente donde la fluorescencia emitida es inversamente proporcional al consumo de oxígeno (Ver sección Materiales y Métodos Mitoexpress Xtra). Comprobamos la linealidad del ensayo en función del número de células (Figura 10A) y de la respuesta a diferentes agentes moduladores de la cadena de transporte electrónico (Figura 10B). Como era esperado, observamos un aumento lineal en el consumo de oxígeno a medida que aumentamos el número de células (Figura 10A). A su vez, comprobamos que el consumo de oxígeno aumentaba al someter a las células a la acción de un agente desacoplante como el dinitrofenol (DNP) y disminuía al inhibir la ATP sintasa con oligomicina o cuando las células se incubaban con rotenona o antimicina A, inhibidores de CI y CIII, respectivamente.

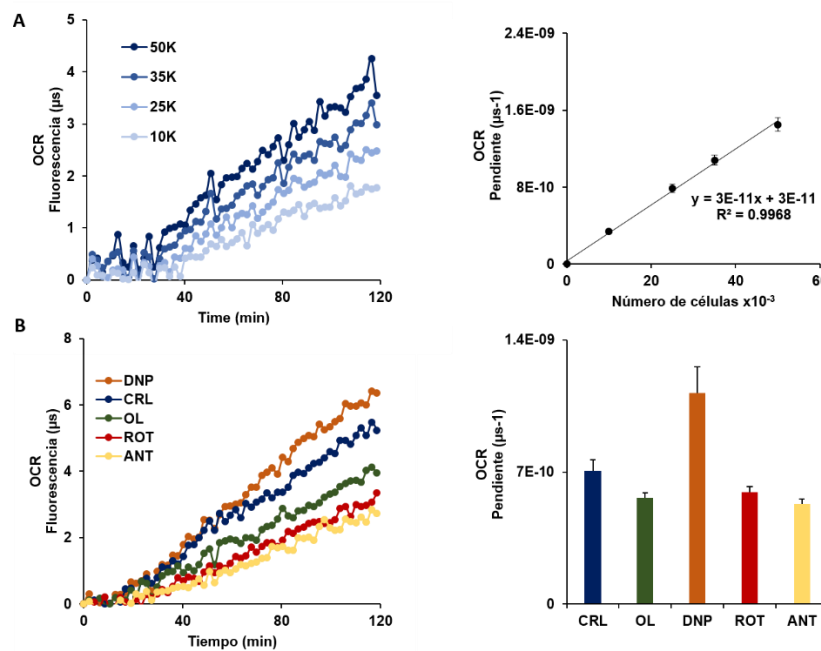


Figura 10. Uso de la sonda MitoXpress Xtra para la medida del consumo de oxígeno en células adheridas. **A.** Emisión de fluorescencia de la sonda MitoXpress Xtra en células HCT116 a lo largo del tiempo que se relaciona directamente con el consumo de oxígeno celular (panel izquierdo). Se muestra un número creciente de células en azul en tonos crecientes: 10000, 25000, 35000 y 50000 células. En el panel derecho se muestra la representación del consumo lineal de oxígeno. **B.** Ensayo de consumo de oxígeno mediante emisión de fluorescencia de la sonda MitoXpress Xtra en células HCT116 en respuesta a diferentes reguladores mitocondriales. Se muestran células control (CRL, azul), tratadas con oligomicina (OL, verde), dinitrofenol (DNP, naranja), rotenona (ROT, rojo) y antimicina A (ANT, amarillo). Los histogramas representan las pendientes del consumo de oxígeno para cada compuesto, cuantificada como media \pm SEM de 3 experimentos.

Resultados

El tratamiento de las células HCT116 con H89 que promueve la defosforilación de IF1 y su unión a la ATP sintasa (Garcia-Bermudez et al., 2015), reduce significativamente la actividad mitocondrial medida por consumo de oxígeno de las células (Figura 11A, línea y barras rojas). Por el contrario, el tratamiento con db-cAMP, activador de PKA permeable a membranas que promueve la fosforilación de IF1 (Garcia-Bermudez et al., 2015) promueve un aumento significativo en el consumo de oxígeno (Figura 11A, línea y barras azules) confirmando la regulación de la actividad mitocondrial mediada por la actividad de PKA.

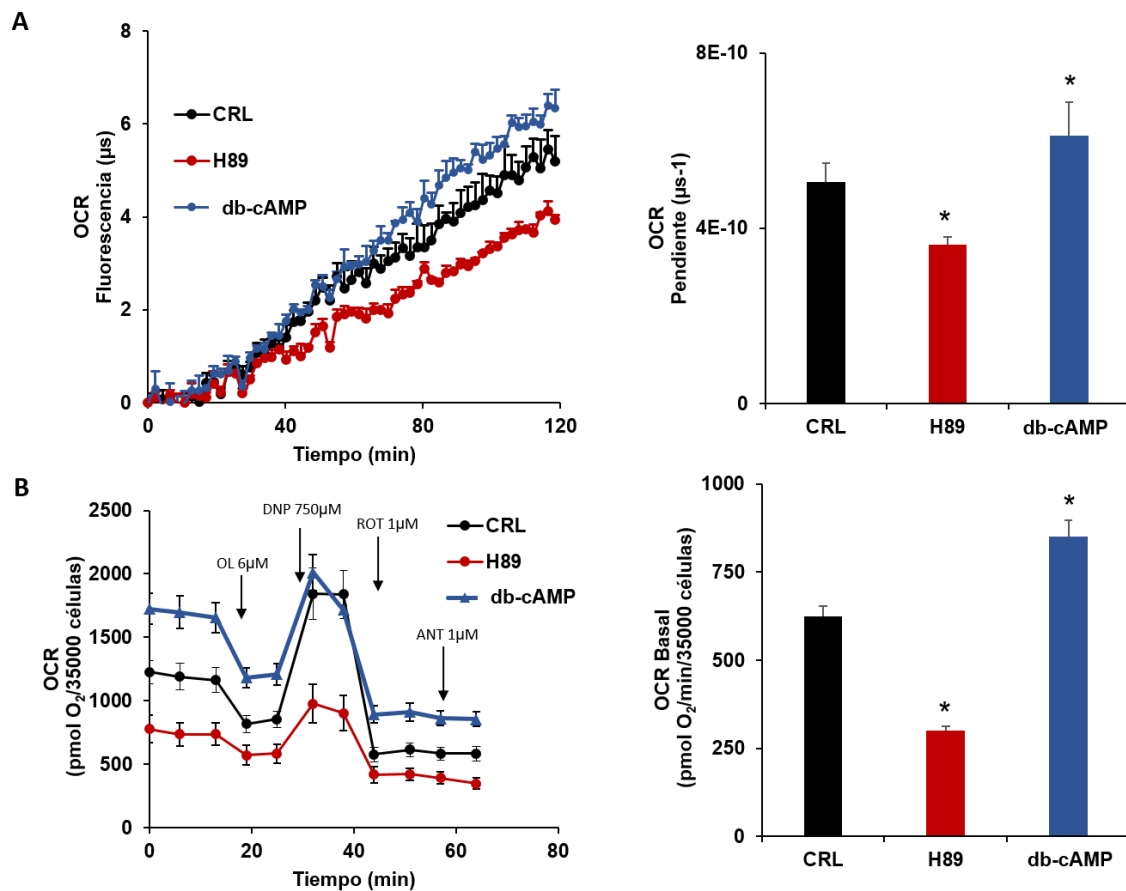


Figura 11. La modulación de la vía PKA regula el consumo de oxígeno mitocondrial. A. Emisión de fluorescencia de la sonda MitoXpress Xtra en células HCT116 en el tiempo como medida de consumo de oxígeno celular (panel izquierdo). **B.** Perfil respiratorio en Seahorse XF24 (panel izquierdo) y cálculo del consumo de oxígeno basal (OCR basal). **A-B.** Se muestran células control (CRL, negro) y tratadas 12h con el inhibidor de PKA (H89, rojo) o con el activador dibutiril-AMP cíclico 12h (db-cAMP, azul). Los histogramas a la derecha representan la cuantificación del consumo de oxígeno para cada tratamiento como media \pm SEM de 3 experimentos. * $p < 0.05$ cuando se compara respecto al control por el test de t de Student.

Estos cambios en la actividad mitocondrial también pueden observarse midiendo el consumo de oxígeno en células adheridas a placa por la tecnología de Seahorse (Figura 11B). En este caso, observamos el perfil respiratorio de las células tratadas con H89 y db-cAMP (Figura 11B, panel izquierdo) donde vemos la modulación del consumo de oxígeno con las inyecciones secuenciales de oligomicina, dinitrofenol, rotenona y antimicina A. Se demostró, de nuevo, una disminución en la respiración mitocondrial en respuesta al tratamiento con H89 (Figura 11B, línea y barras rojas) y un aumento en respuesta al tratamiento con db-cAMP (Figura 11B, línea y barras azules) confirmando la activación e inhibición mitocondrial mediada por el estado de fosforilación de IF1 y la actividad de PKA.

4.1.4. La respiración mitocondrial está regulada por diversas quinasas.

Una vez establecidas las técnicas para la identificación de posibles quinasas de IF1, realizamos un cribado de 24 inhibidores de quinasas sobre la actividad respiratoria mitocondrial. Establecimos el ensayo de Seahorse como método más efectivo para el estudio de los inhibidores al proporcionar una lectura completa de la respiración en el mismo pocillo. Decidimos utilizar el efecto de los inhibidores sobre la respiración sensible a oligomicina (OSR) como parámetro de elección en el cribado. La OSR es un parámetro que nos indica la fracción de oxígeno consumido por la cadena de transporte electrónico para la producción de ATP mitocondrial y es, por tanto, una medida de la actividad de la ATP sintasa.

El tratamiento con H89 causa una inhibición del 60% de la OSR (ver Figura 11B y Tabla 4) pero hay que tener en cuenta que su efecto no es específico sobre IF1 ya que H89 también afecta la fosforilación de otras subunidades de la ETC (Acin-Perez et al., 2009). Realizamos los experimentos de consumo de oxígeno tras el tratamiento de las células HCT116 con los 24 inhibidores de quinasas pertenecientes a la librería de 1018 pequeñas moléculas aprobadas por la FDA (Selleckchem). Encontramos 12 que inhibían la OSR entre un 40-90% respecto a la OSR basal en esta primera ronda de selección (Tabla 4).

NOMBRE DEL INHIBIDOR	QUINASA DIANA	RESIDUOS QUE FOSFORILA	OSR (RESPECTO CONTROL)
H89	PKA	Ser/Thr	0.4 ± 0.06
IMATINIB	PDGFR, c-Kit, Bcr-Abl	Tyr	0.8 ± 0.23
GEFITINIB	EGFR	Tyr	1.17 ± 0.12
ERLOTINIB	EGFR	Tyr	1.03 ± 0.6
SUNITINIB	VEGFR, PDGFR, c-Kit, Flt	Tyr	1.04 ± 0.05
NILOTINIB	Bcr-Abl	Tyr	0.99 ± 0.09
PAZOPANIB	VEGFR, PDGFR, c-Kit	Tyr	0.46 ± 0.1
VANDETANIB	VEGFR	Tyr	0.58 ± 0.03
CRIZOTINIB	c-Met	Tyr	0.6 ± 0.14
REGORAFENIB	Pan-VEGFR & c-RET	Todos	0.35 ± 0.08
AXITINIB	Pan-VEGFR	Tyr	0.33 ± 0.08
BOSUTINIB	Src,Abl	Tyr	0.37 ± 0.1
CABOZANTINIB	c-Met	Tyr	0.56 ± 0.07
LAPATINIB	HER2 & Pan-ErbB	Tyr	0.84 ± 0.2
AFATINIB	HER2 & Pan-ErbB	Tyr	0.57 ± 0.13
RUXOLITINIB	JAK	Tyr	0.71 ± 0.08
TOFACITINIB	JAK	Tyr	0.72 ± 0.25
PONATINIB	Abl	Tyr	0.14 ± 0.06
IBRUTINIB	Src	Tyr	0.62 ± 0.19
VANDETANIB	VEGFR	Tyr	0.45 ± 0.18
VEMURAFENIB	B-Raf	Ser/Thr	0.82 ± 0.14
DABRAFENIB	Raf	Ser/Thr	0.67 ± 0.08
SORAFENIB	VEGFR, PDGFR, Raf	Todos	0.35 ± 0.09
GSK650394	SGK-1	Ser/Thr	0.58 ± 0.08
Go6976	PKC	Ser/Thr	0.52 ± 0.02

Tabla 4. Inhibidores de quinasas. Se muestra el nombre de los inhibidores testados sobre la respiración mitocondrial, la diana sobre la que actúan, el tipo de quinasa que inhiben y el valor obtenido de la respiración sensible a oligomicina (OSR) respecto al control. En rojo se muestran aquellos valores por debajo de 0.6 respecto al control.

Dado que la actividad y unión de IF1 a la ATP sintasa está mediada por la fosforilación de la S39 (Figura 8) (Garcia-Bermudez et al., 2015), de los potenciales inhibidores encontrados en el cribado nos centramos en los inhibidores capaces de bloquear la fosforilación en serinas. De esta manera, se seleccionaron 5 compuestos: regorafenib, dabrafenib, sorafenib, GSK650394 y go6976 para un estudio más en detalle.

4.1.5. Los anticancerígenos regorafenib, dabrafenib, sorafenib no modifican la fosforilación de IF1.

Los compuestos regorafenib, dabrafenib y sorafenib son inhibidores de quinasas capaces de fosforilar residuos de serina (Tabla 4), están aprobados por la FDA y actualmente son utilizados en el tratamiento anticancerígeno (Forner et al., 2018, Tucker et al., 2014). Tras una incubación de 3 horas a una concentración final 1 μM , los tres compuestos inhibían la respiración mitocondrial en células HCT116 medida por Seahorse en sus parámetros basal, sensible a oligomicina y máxima (Figura 12).

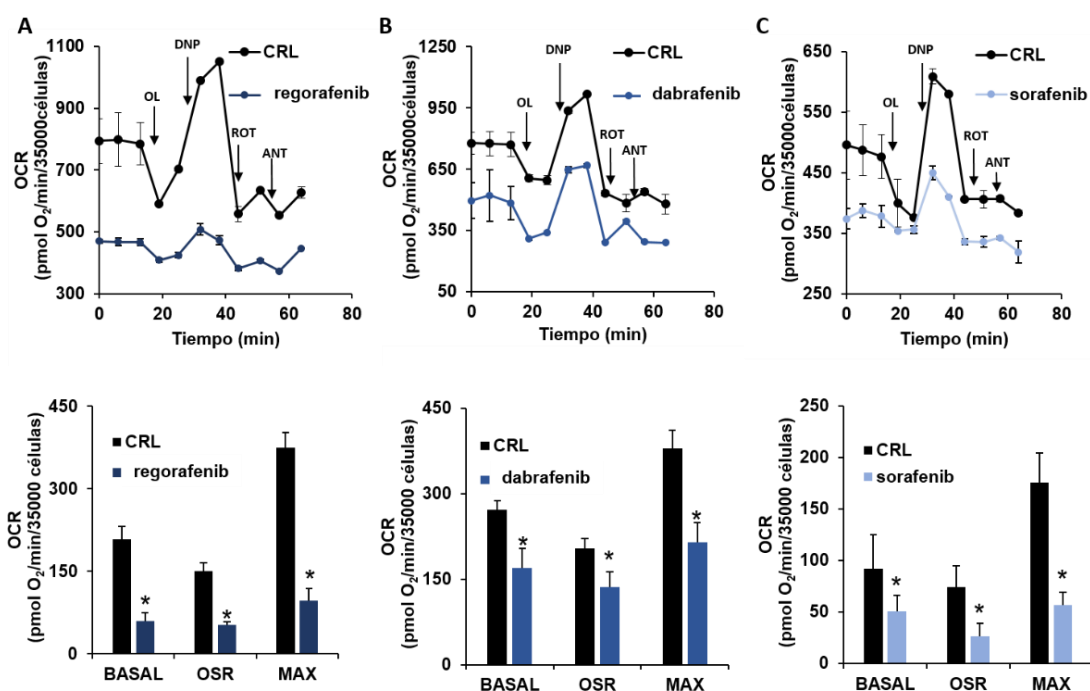


Figura 12. Los inhibidores de quinasas regorafenib, dabrafenib y sorafenib inhiben la respiración mitocondrial. Perfiles respiratorios en Seahorse XF24 (panel de arriba) y parámetros respiratorios (histogramas de abajo) en células HCT116 control (CRL, negro) y tratadas con regorafenib (A) (azul oscuro), dabrafenib (B) (azul), y sorafenib (C) (azul claro) durante 3 h a una concentración final de 1 μM . Los histogramas representan la cuantificación del consumo de oxígeno como media \pm SEM de 3 experimentos. * $p < 0.05$ cuando se compara respecto al control por el test de t de Student.

Resultados

Sin embargo, no se encontraron cambios en el punto isoeléctrico de IF1 al ensayar su estado de fosforilación en células HCT116 mediante electroforesis bidimensional (Figura 13), comprobando que la inhibición de la respiración mediada por estos inhibidores de quinasas no es dependiente de IF1.

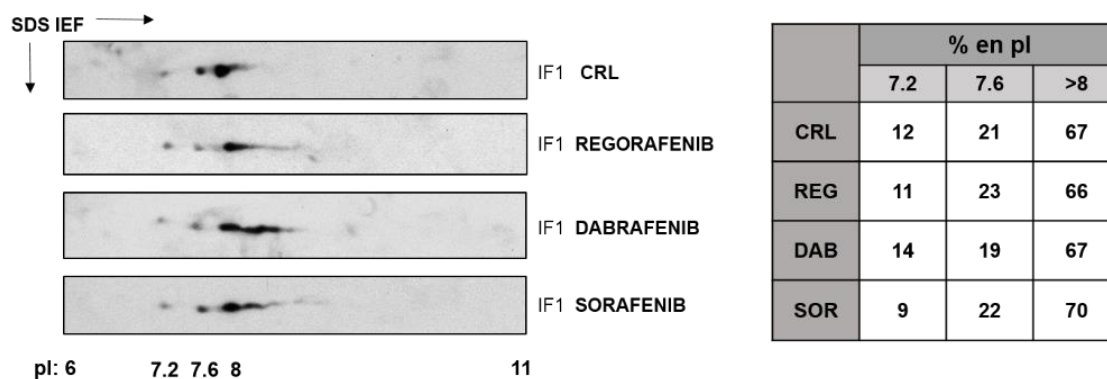


Figura 13. Los inhibidores de quinasas regorafenib, dabrafenib y sorafenib no modifican el punto isoeléctrico de IF1. Análisis de fosforilación de IF1 mediante electroforesis bidimensional en células HCT116 control (CRL) y tratadas durante 3 h con regorafenib, dabrafenib y sorafenib a una concentración final de 1 μ M. La tabla de la derecha muestra el porcentaje de las fracciones fosfo (punto isoeléctrico 7.2) y defosforiladas (punto isoeléctrico 7.6-8) de IF1 en células control (CRL) y tratadas con los tres inhibidores.

4.1.6. La actividad de la proteína quinasa C (PKC) no modifica la fosforilación de IF1.

Go6976 es un inhibidor específico de proteína quinasa C (PKC) (Goekjian and Jirousek, 2001). PKC ha sido descrita como posible candidata de fosforilación de IF1 en un estudio *in silico* de predicción de sitios de fosforilación realizado en la tesis de Javier García Bermúdez, 2015 (GPS 2.0). Go6976 inhibe todos los parámetros respiratorios en células HCT116 tras un tratamiento de 3 horas a una concentración final 1 μ M (Figura 14A). Sin embargo, no encontramos ningún cambio significativo en el estado de fosforilación de IF1 en presencia de Go6976 a 3 h y 12 h por cambios en el pI de la proteína (Figura 14B), indicando que la inhibición de la respiración mitocondrial tras la inhibición de PKC no está mediada por una menor fosforilación de IF1.

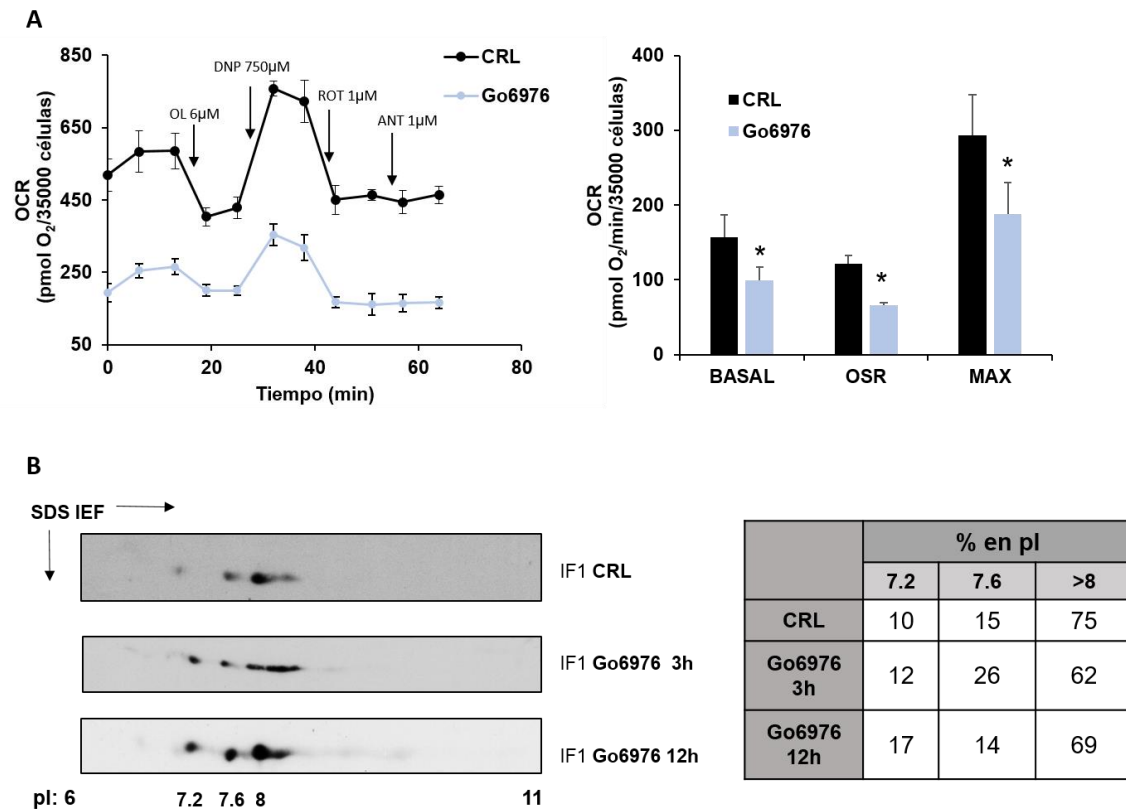


Figura 14. La actividad de la quinasa PKC no es responsable de la fosforilación de IF1. A. Perfil respiratorio en Seahorse XF24 (panel izquierdo) y parámetros respiratorios (histogramas de la derecha) en células HCT116 control (CRL, negro) y tratadas con el inhibidor de PKC (Go6976, azul). Los histogramas representan la cuantificación del consumo de oxígeno como media \pm SEM de 3 experimentos. * $p < 0.05$ cuando se compara respecto al control por el test de t de Student. **B.** Análisis de fosforilación de IF1 mediante electroforesis bidimensional en células HCT116 control (CRL), o tratadas con el inhibidor de PKC durante 3 o 12 h. La tabla de la derecha muestra el porcentaje de las fracciones fosfo (punto isoelectrico 7.2) y defosforiladas (punto isoelectrico 7.6-8) de IF1 en células control (CRL) y tratadas con el inhibidor

4.1.7. La inhibición de la quinasa regulada por suero y glucocorticoides 1 (SGK-1) regula el estado de fosforilación de IF1.

GSK650394 es un inhibidor de la quinasa regulada por suero y glucocorticoides 1 (SGK-1) (Sherk et al., 2008). Fue seleccionada para el estudio por un trabajo en el que se identificó a IF1 como un potencial interactante de esta quinasa (O'Keeffe et al., 2013). Células HCT116 tratadas durante 3 horas con el inhibidor de SGK-1 producen una fuerte inhibición de todos los parámetros respiratorios (Figura 15A). Además, el punto isoelectrico de IF1 a 7,2 en células HCT116 tratadas con el inhibidor de SGK-1 desaparece (Figura 15B), lo que indica un efecto sobre la fosforilación en serinas de IF1. Para confirmar este resultado, silenciamos la quinasa SGK-1 con un siRNA específico y tras 72 horas vimos por electroforesis bidimensional que el silenciamiento de la quinasa

Resultados

causaba la desaparición de la fracción fosforilada de IF1 (Figura 15B), confirmando el papel de SGK-1 en la fosforilación de IF1. El efecto de la quinasa SGK-1 sobre la fosforilación de IF1 por el tratamiento de células HCT116 con el inhibidor GSK650394, así como por su silenciamiento no afectaban a la expresión de IF1 (Figura 15C).

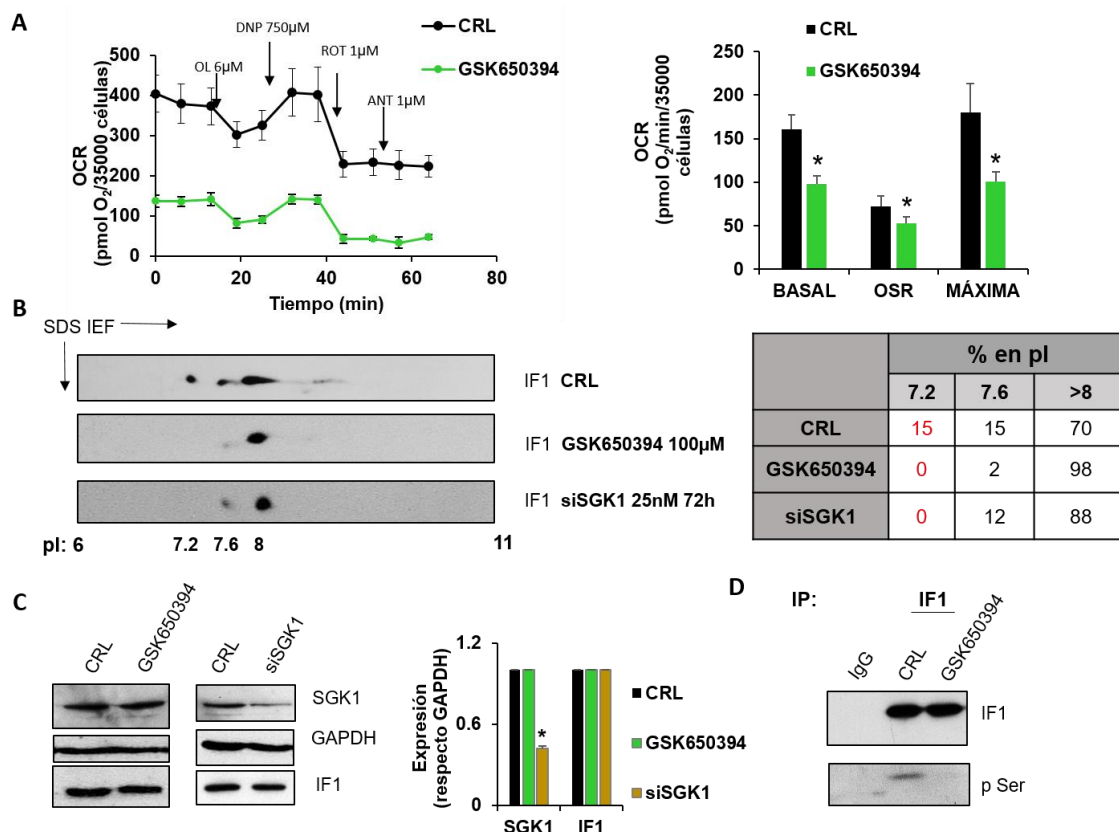


Figura 15. La actividad de la quinasa SGK-1 es responsable de la fosforilación de IF1. A. Perfil respiratorio en Seahorse XF24 (panel izquierdo) y parámetros respiratorios (histogramas de la derecha) en células HCT116 control (CRL, negro) y tratadas con el inhibidor de SGK-1 (GSK650394, verde). Los histogramas a la derecha representan la cuantificación del consumo de oxígeno como media \pm SEM de 3 experimentos. * $p < 0.05$ cuando se compara respecto al control por el test de t de Student. **B.** Análisis de fosforilación de IF1 mediante electroforesis bidimensional en células HCT116 control (CRL), tratadas con el inhibidor de SGK-1 o tras el silenciamiento transitorio de la quinasa (siSGK-1). La tabla de la derecha muestra el porcentaje de las fracciones fosfo (punto isoelectrico 7.2, en rojo) y defosforiladas (punto isoelectrico 7.6-8) de IF1 en células control (CRL) y tras los tratamientos. **C.** Western blot de la expresión de la quinasa SGK-1, GAPDH e IF1 en células HCT116 control (CRL), tratadas con el inhibidor de la quinasa (GSK650394, barra verde) o tras el silenciamiento transitorio de la quinasa (siSGK-1, barra naranja). El histograma muestra la cuantificación de las bandas normalizadas según la expresión de GAPDH representado como media \pm SEM de 3 experimentos. * $p < 0.05$ cuando se compara respecto al control por el test de t de Student. **D.** Inmunoprecipitación de IF1 en células HCT116 sin tratar (CRL) o tratadas con el inhibidor de la quinasa SGK-1 (GSK650394). Se incluye un control de la técnica con una inmunoglobulina de ratón no específica (IgG). Se ha revelado con IF1 como control de la inmunoprecipitación y con un anticuerpo anti serinas fosforiladas para comprobar el estado de fosforilación de IF1.

De manera congruente con el papel de SGK-1 en fosforilación de IF1, observamos que inmunoprecipitados de IF1 de células HCT116 tratadas con el inhibidor GSK650394 no mostraban la presencia de inmureactividad anti-fosfoserina, algo que ocurre en las células control (Figura 15D), indicando la desaparición de la fosforilación de IF1 al inhibir la quinasa SGK-1.

4.1.8. La quinasa regulada por suero y glucocorticoides 1 (SGK-1) regula la producción de ATP mitocondrial.

Consecuentemente, los ensayos de la actividad de la ATP sintasa en células permeabilizadas control y tratadas con el inhibidor GSK650394 revelaron que el inhibidor promueve una disminución muy significativa en la actividad sintética de la enzima (Figura 16A) propia de una situación en la que IF1 se encuentre activo y, por lo tanto, en estado defosforilado.

Por otro lado, estudiamos la posible localización mitocondrial de SGK-1 mediante inmunofluorescencia en células HCT116 (Figura 16B). Los resultados indican que SGK-1 colocaliza parcialmente con la Hsp60 mitocondrial (Figura 16B) y por tanto sugieren que SGK-1 es una quinasa potencial capaz de fosforilar IF1 en alguno de sus residuos de serina.

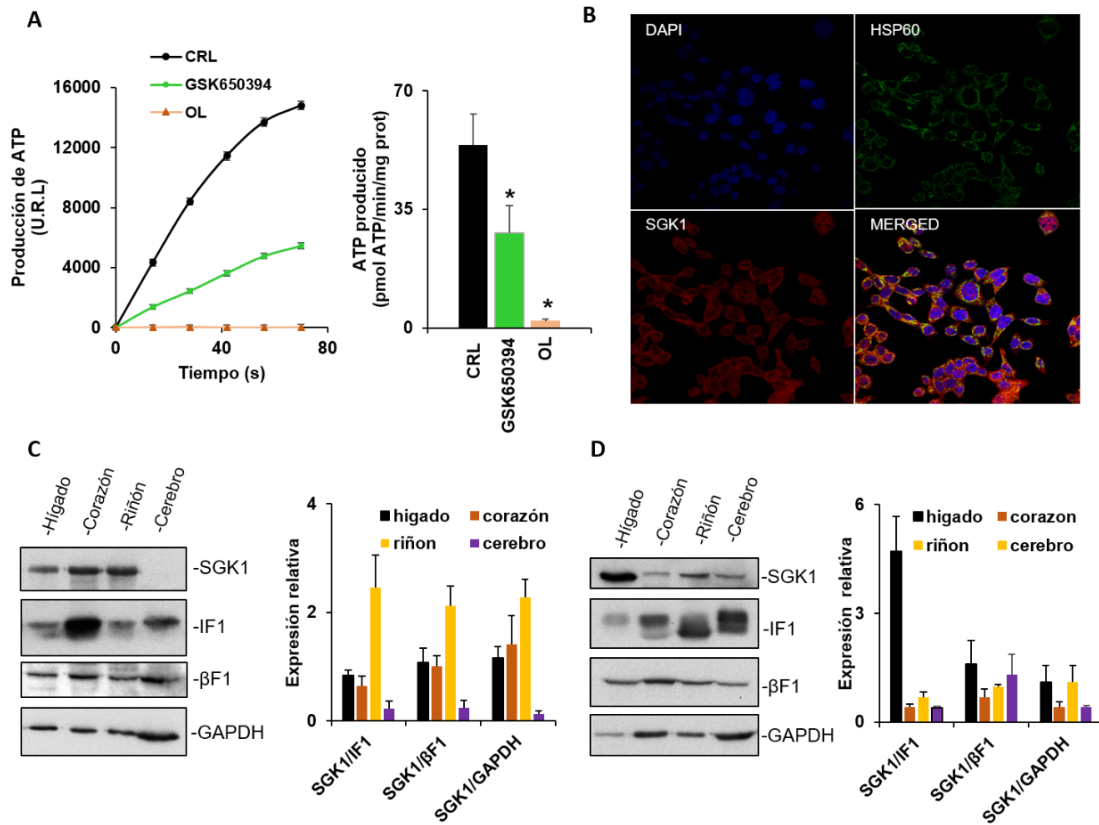


Figura 16. La inhibición de SGK-1 causa una disminución en la producción de ATP dentro de la mitocondria. **A.** Actividad de síntesis de ATP por la ATP sintasa en células permeabilizadas sin tratar (CRL) o tratadas con el inhibidor de la quinasa SGK-1 (GSK650394) o con oligomicina (OL) como control de la especificidad del ensayo. Se representa la cinética de producción en el tiempo (panel izquierdo) y la producción total (panel derecho). **B.** Estudio de colocalización por inmunofluorescencia de SGK-1 (rojo) en la mitocondria marcada por Hsp60 (verde). Los núcleos se muestran teñidos con DAPI (azul) y todos los canales juntos se muestran en el MERGED. Magnificación 60X. **C-D.** Western blot en distintos tejidos de ratón (C) y humano (D) analizando la expresión proteica de SGK1, IF1, β F1-ATPasa y GAPDH. Los histogramas representan la cuantificación como media \pm SEM de 4-6 experimentos. * $p < 0.05$ cuando se compara respecto al control por el test de t de Student.

Así mismo, estudiamos la expresión de SGK-1 en distintos tejidos humanos (Figura 16C) y de ratón (Figura 16D). SGK-1 se expresa de manera tejido-específica en hígado, corazón y riñón en humanos, no encontrándose expresión en cerebro (Figura 16C) uno de los tejidos con mayor expresión de IF1 tras corazón (Esparza-Molto et al., 2018). En tejidos de ratón, SGK-1 se expresa en hígado, corazón, riñón y cerebro (Figura 16D), siendo hígado el tejido con mayor expresión, en especial cuando se compara con la baja cantidad de IF1 que contiene (Esparza-Molto et al., 2018).

4.1.9. Producción de un anticuerpo para la inmunodetección de IF1 fosforilado.

Con el fin de poder estudiar el estado de fosforilación de IF1, el laboratorio desarrolló un anticuerpo contra el péptido que contiene la secuencia fosforilada de IF1 en

S39, RGAG{pSER}IREAGGC, mediante la técnica de inmunodetección por ELISA. El anticuerpo anti-fosfopéptido se conjugó a KHL y se purificó por afinidad utilizando el péptido defosforilado RGAGSIREAGGC como matriz para eliminar anticuerpos no específicos (Abyntek Biopharma S.L.). La gran especificidad de anti-pIF1 para reconocer el epítipo fosforilado de IF1 se ilustra en la Figura 17A. En efecto, este anticuerpo produce una respuesta de intensidad directamente proporcional a la cantidad de péptido IF1 fosforilado en la placa sin detectar el péptido defosforilado en IF1 de forma significativa (Figura 17A). Tapizando la placa de ELISA con el fosfopéptido como control positivo (Figura 17B) hemos comprobado cierta linealidad en la detección de IF1 fosforilado en cantidades crecientes de extracto proteico de células HCT116 (Figura 17C). Sin embargo, aún es necesario aumentar la sensibilidad de la técnica para la puesta a punto de esta herramienta que facilitará el estudio de la fosforilación de IF1.

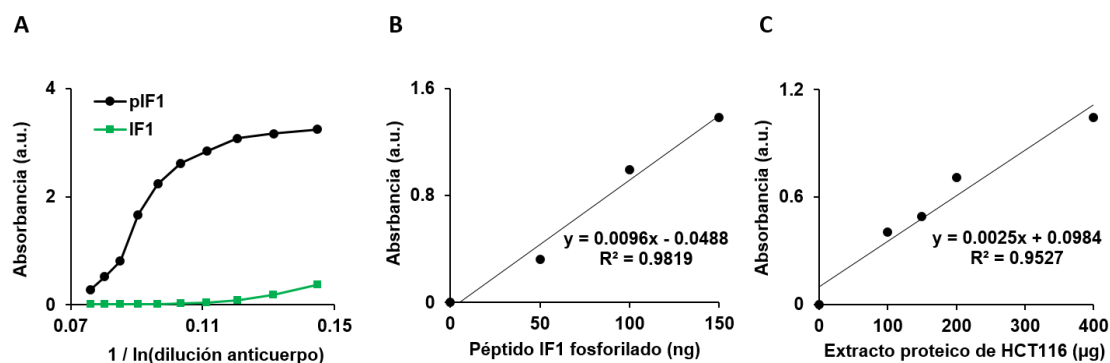


Figura 17. Desarrollo del anticuerpo contra IF1 fosforilado. A. Especificidad del anticuerpo reconociendo el péptido fosforilado (línea negra) frente al péptido no fosforilado (línea verde) B. Se muestra la reactividad lineal por absorbancia del anticuerpo anti-pIF1 reconociendo cantidades crecientes del péptido fosforilado. C. Correlación lineal entre cantidades crecientes de extracto celular de HCT116 y señal del anticuerpo anti-pIF1.

4.2. Regulación tejido específica de la expresión de IF1.

4.2.1. Regulación por LRPPRC, una proteína de unión al mRNA de IF1.

Además de la importancia de la regulación por fosforilación de IF1, resulta de gran interés la regulación post-transcripcional de la proteína. En un reciente trabajo del laboratorio, hemos demostrado la expresión diferencial de IF1 en tejidos de ratón y humano (Esparza-Molto et al., 2018). En particular, hemos observado cómo en algunos tejidos con alta expresión del mRNA de IF1, como corazón, no se produce expresión de la proteína (Esparza-Molto et al., 2018), lo que sugiere la existencia de un control de la traducción del mRNA de IF1 en ese tejido. En este sentido destaca el papel de la proteína

LRPPRC o LRP130 que ha sido descrita como una importante proteína de unión a RNA en los últimos años por su papel en la regulación de proteínas mitocondriales (Gohil et al., 2010, Ruzzenente et al., 2012).

En el laboratorio, se había observado por ensayos de co-inmunoprecipitación RNA-proteína que la proteína LRPPRC interacciona directa y específicamente con el mRNA de IF1 al mismo nivel que el mRNA de COXI, un gen cuyo mRNA está descrito que interacciona con la proteína (Xu et al., 2012) (Figura 18A, Tesis doctoral Javier García Bermúdez, 2015, UAM). Así mismo, se ha demostrado que la proteína IF1 se acumula en corazón en un modelo de ratón que no expresa LRPPRC de forma condicional (Mourier et al., 2014). Por este motivo, estudiamos la expresión de LRPPRC en diferentes tejidos de ratón (Figura 18B) observando que la proteína se expresan casi exclusivamente en corazón cuando se compara con otro tejido que sí expresa IF1 como es el cerebro (Figura 18B) (Esparza-Molto et al., 2018). Este conjunto de resultados parece sugerir que LRPPRC puede actuar como un regulador negativo de la traducción del mRNA de IF1 en corazón de ratón.

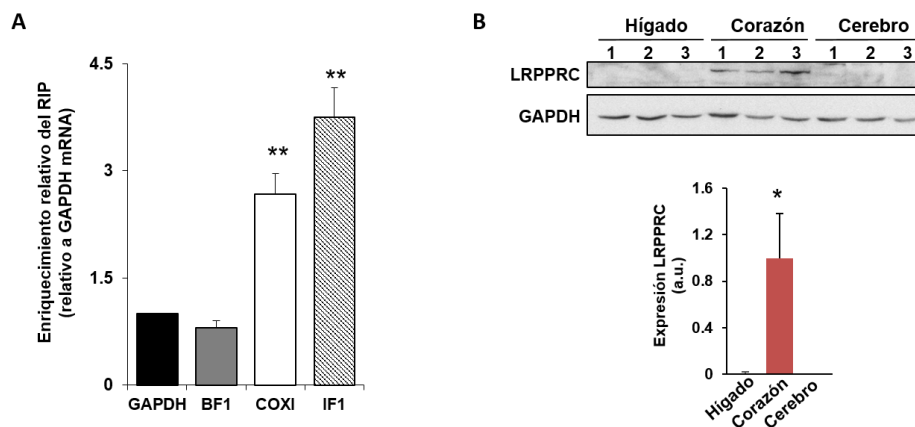


Figura 18. La proteína LRPPRC se une al mRNA de IF1. **A.** Ensayos de RIP (RNA immunoprecipitation) utilizando un anticuerpo policlonal contra LRP130 y un análisis posterior por RT-PCR cuantitativa, mostrando los niveles relativos al mRNA no interaccionante de GAPDH de los mRNAs estudiados de β F1, IF1 y el control positivo COXI. **B.** Western blot de la expresión de LRPPRC en hígado, corazón y cerebro de ratón. Los histogramas representan la cuantificación como media \pm SEM de 9 muestras. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ cuando se compara respecto al control por el test de t de Student. (A) Imagen tomada y modificada de la tesis de Jarvier García-Bermúdez, UAM 2015. (B) Imagen tomada de (Esparza-Molto et al., 2018).

4.2.2. LRPPRC regula la expresión de IF1 y producción de ATP por la ATP sintasa.

Para verificar el efecto de LRPPRC sobre IF1, silenciamos la proteína con un siRNA específico en una línea celular humana (HEK293T) y otra línea de cardiomiocitos de ratón (HL-1) y comprobamos que la disminución de la proteína LRPPRC en ambos tipos celulares daba lugar a un aumento de la expresión de IF1 (Figura 19A). De manera congruente, el silenciamiento de LRPPRC produce una reducción significativa de la actividad de síntesis de ATP de la ATP sintasa en células permeabilizadas (Figura 19B). De acuerdo con lo descrito previamente (Mourier et al., 2014), el silenciamiento de LRPPRC no afecta la expresión de otras subunidades de la ATP sintasa como α -F1-ATPasa y OSCP (Figura 19C).

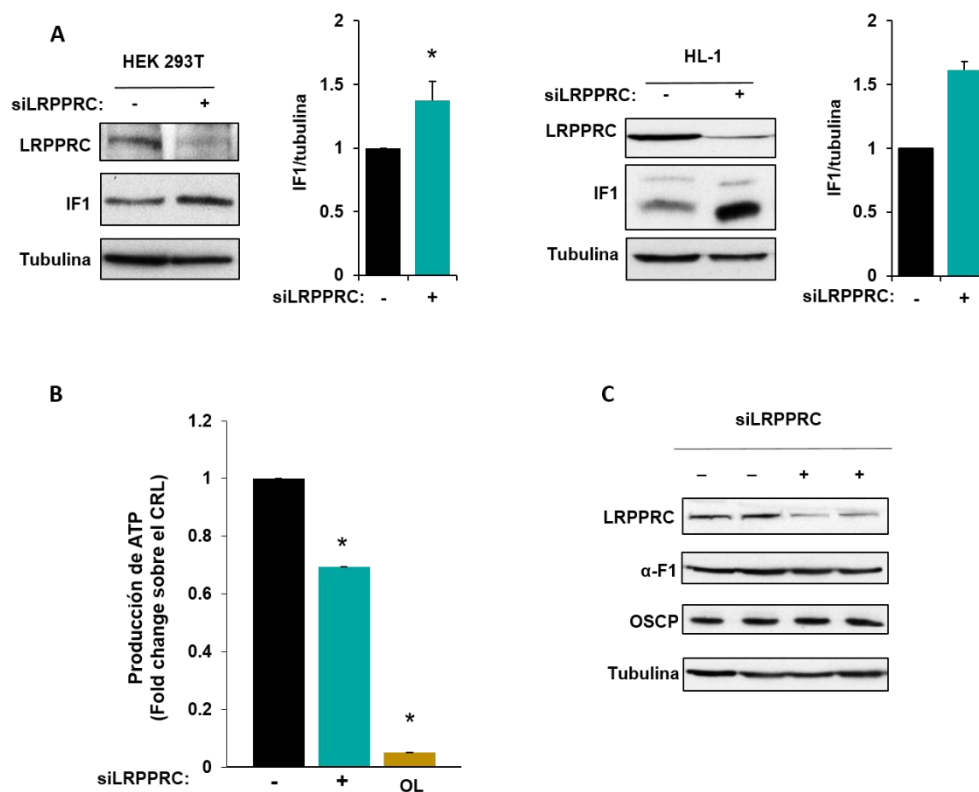


Figura 19. IF1 se sobreexpresa en ausencia de LRPPRC inhibiendo la ATP sintasa. A. Western blot del silenciamiento transitorio de LRPPRC en células HEK293T (panel izquierdo) y cardiomiocitos HL-1 (panel derecho). Se muestra el inmunoblot de LRPPRC, IF1 y tubulina en células control (siLRPPRC -) y con LRPPRC silenciado (siLRPPRC +). Los histogramas representan la razón IF1/tubulina como media \pm SEM de 4 experimentos. * $p < 0.05$ cuando se compara respecto al control por el test de t de Student. **B.** Cuantificación de la producción de ATP mitocondrial en células HEK239T control (siLRPPRC -, barra negra), con LRPPRC silenciado (siLRPPRC +, barra azul) y tratadas con oligomicina (OL, barra naranja). Los histogramas representan la media \pm SEM de 4 experimentos. * $p < 0.05$ cuando se compara respecto al control por el test de t de Student. **C.** Western blot de la expresión de distintas subunidades de la ATP sintasa tras el silencing de LRPPRC. Se muestra el inmunoblot de LRPPRC, α -F1-ATPasa, OSCP y tubulina en células control (siLRPPRC -) y con LRPPRC silenciado (siLRPPRC +).

Resultados

Por otra parte, la sobreexpresión de LRPPRC en estos dos tipos celulares utilizando un plásmido de sobreexpresión de la proteína con la secuencia FLAG como tag demostró que en ambas líneas celulares se producía una disminución en la expresión muy significativa de IF1 (Figura 20A). Consecuentemente, observamos que la sobreexpresión de LRPPRC daba lugar a un aumento de la actividad sintasa de la ATP sintasa en células HEK293T permeabilizadas (Figura 20B). Por otro lado, la sobreexpresión de LRPPRC en células HEK293T no daba lugar a ningún cambio en la expresión de subunidades α -F1-ATPasa y OSCP (Figura 20C). En conjunto, estos resultados apoyan la importancia de la regulación de la traducción del mRNA de IF1 para la expresión tejido específica de IF1 en células de mamífero y en concreto de LRPPRC como un regulador negativo de su traducción en corazón de ratón.

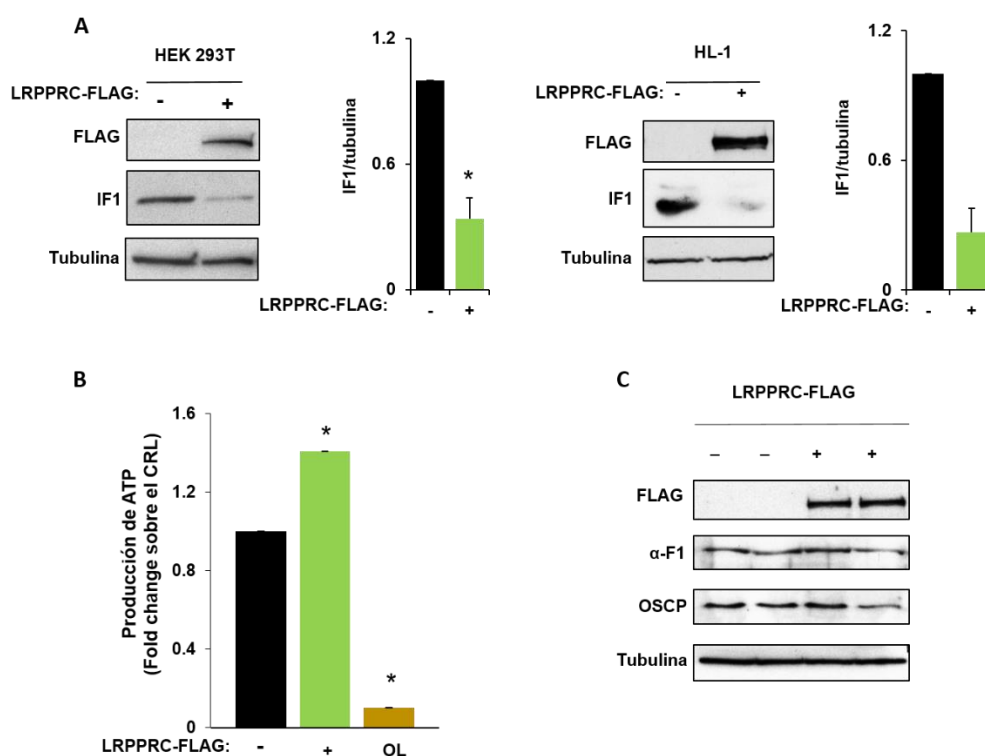


Figura 20. La sobreexpresión de LRPPRC causa una disminución en la expresión de IF1.

A. Western blot de la sobreexpresión transitoria de de LRPPRC en células HEK293T (panel izquierdo) y cardiomiocitos HL-1 (panel derecho). Se muestra el inmunoblot contra el FLAG, IF1 y tubulina en células control (LRPPRC-FLAG -) y con LRPPRC sobreexpresado (LRPPRC-FLAG +). Los histogramas representan la razón IF1/tubulina como media \pm SEM de 4 experimentos. * $p < 0.05$ cuando se compara respecto al control por el test de t de Student. **B.** Cuantificación de la producción de ATP mitocondrial en células HEK293T control (LRPPRC-FLAG -, barra negra), con LRPPRC sobreexpresado (LRPPRC-FLAG +, barra verde) y tratadas con oligomicina (OL, barra naranja). Los histogramas representan la media \pm SEM de 4 experimentos. * $p < 0.05$ cuando se compara respecto al control por el test de t de Student. **C.** Western blot de la expresión de distintas subunidades de la ATP sintasa tras la sobreexpresión de LRPPRC. Se muestra el inmunoblot contra el FLAG, α -F1-ATPasa, OSCP y tubulina en células control (LRPPRC-FLAG -) y con LRPPRC sobreexpresado (LRPPRC-FLAG +).

4.3. Fármacos reguladores de la actividad respiratoria mitocondrial

4.3.1. La sobreexpresión de IF1 en carcinomas de mama predice una mejor prognosis.

IF1 se encuentra sobreexpresado en carcinomas muy prevalentes como de mama, colon y pulmón (Sanchez-Arago et al., 2013b) y, además, en estos tumores se encuentra defosforilado y, por lo tanto, activo como inhibidor de la ATP sintasa (Garcia-Bermudez et al., 2015). Contrariamente con lo esperado, la sobreexpresión de IF1 en cáncer de mama y de colon predice una mejor prognosis para los pacientes (Sanchez-Arago et al., 2013b). En la Figura 21A se ilustra un ejemplo, mediante inmunohistoquímica, de la expresión de IF1 en tejido mamario normal (panel izquierdo) y tumoral (panel derecho) donde se aprecia la alta expresión de IF1 en tejido tumoral frente a la expresión prácticamente indetectable en tejido normal (Figura 21A).

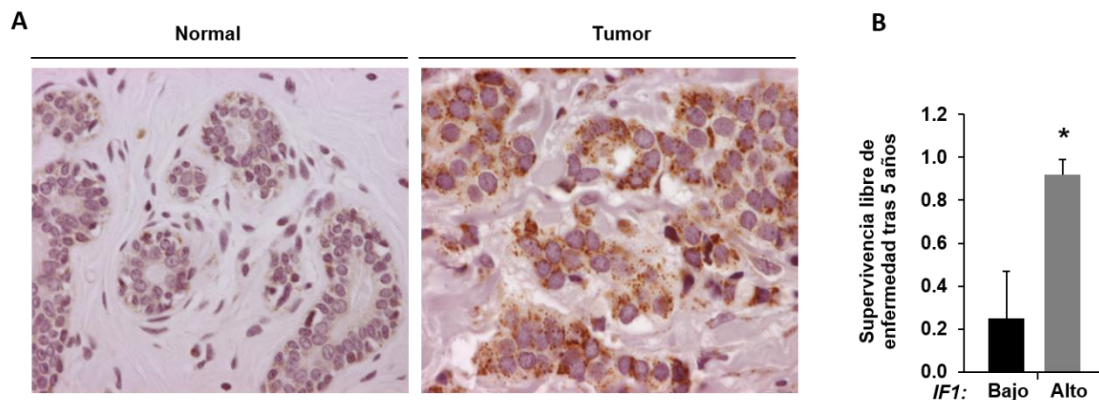


Figura 21. Expresión de IF1 en carcinomas de mama. **A.** Inmunohistoquímica representativa de la expresión de IF1 en tejido normal y tumoral de mama. Magnificación 10X. **B.** Los histogramas muestran el estudio estadístico de supervivencia tras 5 años de una cohorte de 18 pacientes pertenecientes al subgrupo triple negativo para receptores hormonales (media ± SEM) con baja (barra negra) y alta (barra gris) expresión de IF1. El p-valor en el test log-rank de supervivencia es *p = 0.03. Imagen tomada de (Garcia-Ledo et al., 2017).

El análisis de la supervivencia libre de enfermedad a los 5 años de la extirpación del tumor indicó que los pacientes con altos niveles de IF1 tienen una mejor prognosis (Sanchez-Arago et al., 2013b, Garcia-Ledo et al., 2017). Siendo esta diferencia mucho más notable cuando se limitada el estudio de supervivencia libre de enfermedad a las pacientes con peor prognosis clínica, aquellas que portan carcinomas de tipo triple negativo (Figura 21B) (Sanchez-Arago et al., 2013b, Garcia-Ledo et al., 2017). Este hallazgo aumenta la importancia de IF1 como marcador en cáncer ya que estos tipos de carcinomas se caracterizan por no poseer receptores de estrógenos, progesterona y HER2, lo cual dificulta mucho su tratamiento (Foulkes et al., 2010).

Resultados

Con el fin de estudiar el mecanismo por el que la alta expresión de IF1 correlaciona con una mayor supervivencia de los pacientes, se desarrolló una línea celular de cáncer de mama tipo triple negativo que sobreexpresa de manera estable IF1 (BT549-IF1) (Garcia-Ledo et al., 2017). Tras la selección de la línea, se confirmó la sobreexpresión de IF1 mediante western blot (Figura 22A) y por inmunofluorescencia de las células (Figura 22B). En esta línea vemos además la expresión de RFP propia de la línea celular que contiene este gen reportero. Además, mediante fraccionamiento subcelular, vimos que la expresión de IF1 es exclusiva en la mitocondria (Figura 22C). Por otro lado, comprobamos que la sobreexpresión de IF1 no afecta a la expresión de otras proteínas que forman parte de la cadena de transporte electrónico o son elementos estructurales de la mitocondria como VDAC y Hsp60 (Figura 22D).

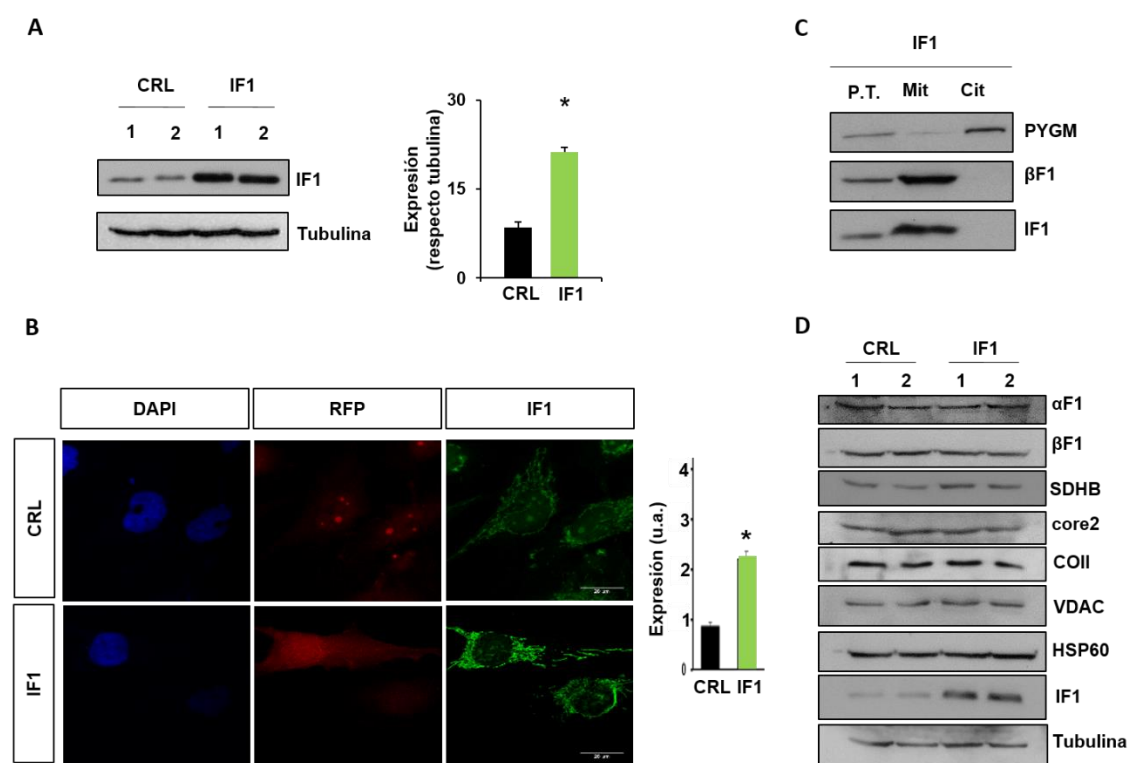


Figura 22. Sobreexpresión de IF1 en células BT549. **A.** Western blot de la sobreexpresión de IF1 en células BT549 control (CRL) o que sobreexpresan la proteína (IF1). Se muestran dos extractos independientes por condición y tubulina como control de carga. **B.** Inmunofluorescencia de células control (CRL) y que sobreexpresan IF1 (IF1). Se ha utilizado DAPI para teñir los núcleos (azul), la señal de RFP propia del plásmido de sobreexpresión (rojo) e IF1 marcado en verde. Magnificación 60x. **A-B.** Los histogramas representan la media \pm SEM de 5 experimentos. * $p < 0.05$ cuando se compara respecto al control por el test de t de Student. **C.** Western blot del fraccionamiento subcelular de células que sobreexpresan IF1 (IF1) para detectar la localización de IF1. Se muestra PYGM como control citoplasmático (Cit) y β F1-ATPasa como control mitocondrial (Mit). P.T: proteína total **D.** Western blot representativo de la expresión de diferentes proteínas mitocondriales en células controles (CRL) o que sobreexpresan IF1 (IF1). Se muestran los blots contra: α y β F1-ATPasa (ATP sintasa), SDHB (complejo II), core2 (complejo III), COII (complejo IV), VDAC y Hsp60 (estructurales) e IF1. Se ha utilizado tubulina como control de carga.

Caracterizamos metabólicamente las líneas celulares BT549-CRL y BT549-IF1 y en el ensayo de Seahorse vimos que la línea BT549-IF1 presentaba menor respiración mitocondrial basal, sensible a oligomicina y máxima que la línea control (Figura 23A). Además, esta menor actividad mitocondrial de la línea BT549-IF1 se correspondía con un aumento en el flujo glucolítico en comparación con las células control (Figura 23B).

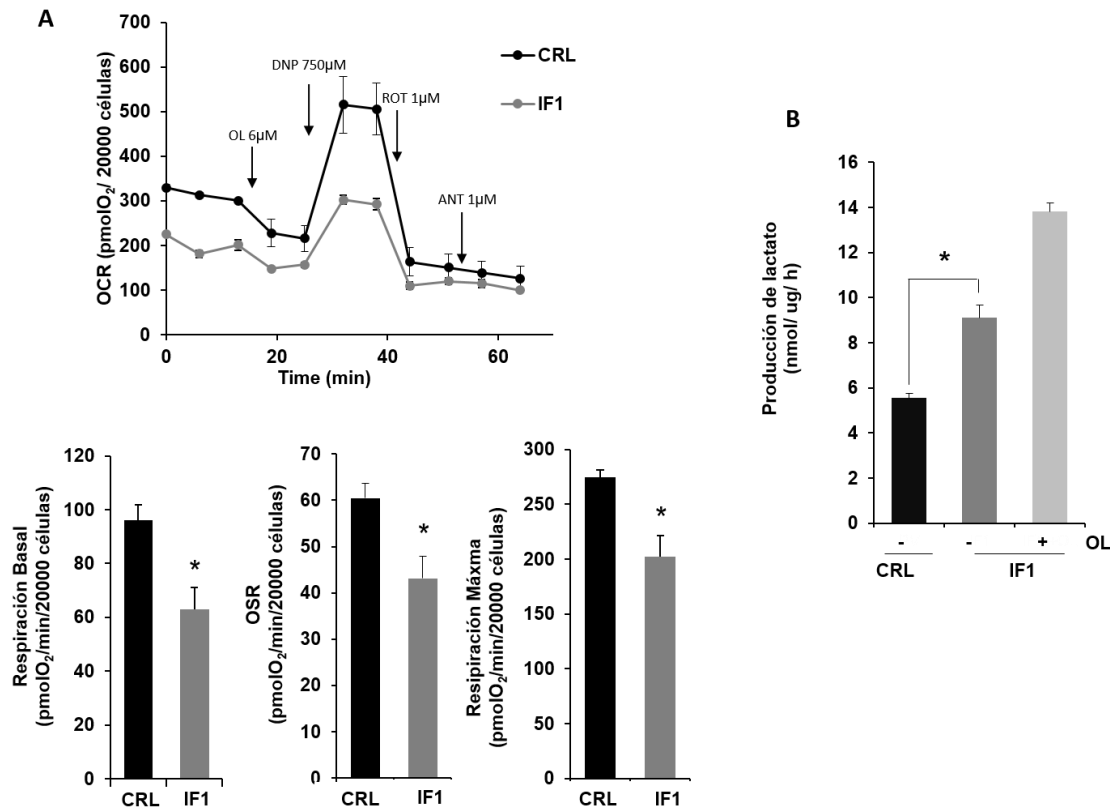


Figura 23. Metabolismo energético en células BT549 que sobreexpresan IF1. **A.** Perfil respiratorio en Seahorse XF24 en células BT549 control (CRL, línea negra) y que sobreexpresan IF1 (IF1, línea gris) (panel alto). Los histogramas en el panel bajo representan la respiración basal, sensible a oligomicina (OSR) y máxima como media \pm SEM de 3 experimentos. * $p < 0.05$ cuando se compara respecto al control por el test de t de Student. **B.** Cuantificación de flujo glucolítico por producción de lactato en células control (CRL), que sobreexpresan IF1 (IF1) y tratadas con oligomicina (OL). Los histogramas representan la cuantificación como media \pm SEM de 4 experimentos. * $p < 0.05$ cuando se compara respecto al control por el test de t de Student.

De forma congruente, comprobamos que la sobreexpresión de IF1 inhibe la actividad sintética de la ATP sintasa en células permeabilizadas en comparación con las células BT549-CRL (Figura 24A). Así mismo, el nivel de ATP total de las células BT549-IF1 era significativamente menor que el de la línea control (Figura 24B). Estos resultados demuestran la reprogramación metabólica de las células de carcinoma de mama hacia un

Resultados

aumento del flujo glucolítico por la inhibición de la ATP sintasa mitocondrial mediado por la sobreexpresión de IF1.

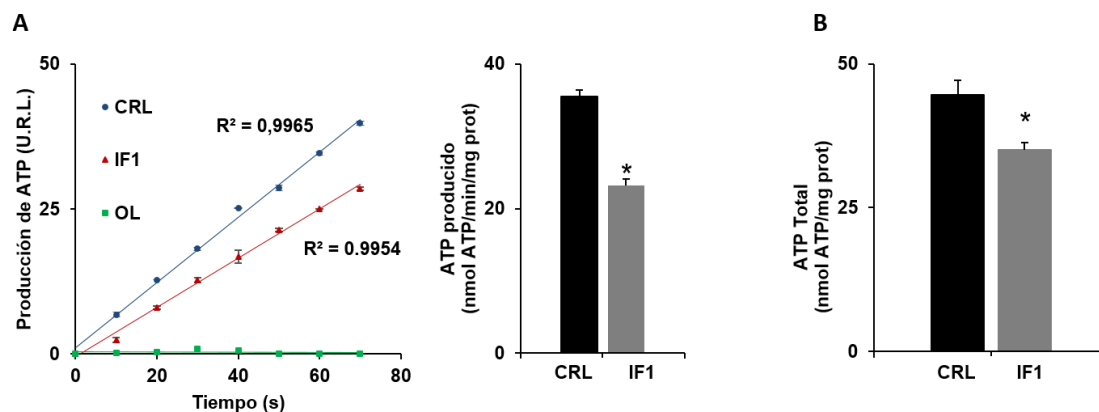


Figura 24. La sobreexpresión de IF1 inhibe la producción de ATP mitocondrial. **A.** Representación cinética de la producción de ATP y su cuantificación en células control (CRL, línea azul, barra negra), que sobreexpresan IF1 (IF1, línea roja, barra gris) y tratadas con oligomicina (OL, línea verde). **B.** Cuantificación de la cantidad total de ATP celular en células control (CRL, barra negra) y que sobreexpresan IF1 (IF1, barra gris). **A-B.** Los histogramas representan la cuantificación como media ± SEM de 4 experimentos. *p < 0.05 cuando se compara respecto al control por el test de t de Student.

El estudio posterior sobre la capacidad invasiva de esta línea celular lo realizó la Dra. García-Ledo y otros miembros del laboratorio y están recopilados en (García-Ledo et al., 2017). Sorprendentemente, a pesar de que IF1 promueve un perfil metabólico pro-oncogénico en la línea BT549-IF1, la línea tiene un transcriptoma, proteoma y a un fenotipo menos metastásico, presentando una menor capacidad de invasión y migración (García-Ledo et al., 2017). A día de hoy, las bases moleculares de la mejor prognosis de pacientes con sobreexpresión de IF1 en carcinomas de mama y colon siguen siendo un reto de investigación de nuestro laboratorio.

4.3.2. Cribado de 1018 fármacos aprobados por la FDA testados sobre la respiración mitocondrial.

Hemos visto que la inhibición mitocondrial que causa la sobreexpresión de IF1 en cáncer de mama promueve un fenotipo menos metastásico (García-Ledo et al., 2017). Con esta idea hemos buscado fármacos en una librería de 1018 compuestos aprobados por la FDA con el objetivo de frenar el crecimiento tumoral. Al utilizar fármacos que ya han sido aprobados por la FDA, nos aseguramos que su bioseguridad ha sido correctamente testada en diferentes ensayos moleculares y clínicos, por lo que nos facilita llegar al objetivo último que es, reposicionar fármacos conocidos que tengan

mecanismos de acción sobre la actividad respiratoria de la mitocondria en cáncer y en otras patologías.

Para realizar un cribado o “screening” de estas características decidimos realizar un tratamiento en células de carcinoma de colon a corto plazo (3 horas) a una concentración final de 1 μ M del fármaco. El flujo de trabajo fue el siguiente: un primer cribado para comprobar el efecto de los fármacos sobre la respiración sensible a oligomicina en el aparato Seahorse XFe96, de manera que sepamos el efecto de los compuestos sobre la ATP sintasa que puedan emular la actividad de IF1. A continuación, se seleccionaron compuestos para una confirmación más detallada en el aparato Seahorse XF24 (Figura 25). De esta manera identificamos hits o compuestos activos que serán posteriormente validados en cáncer *in vitro* e *in vivo* identificando su mecanismo de acción (Figura 25).

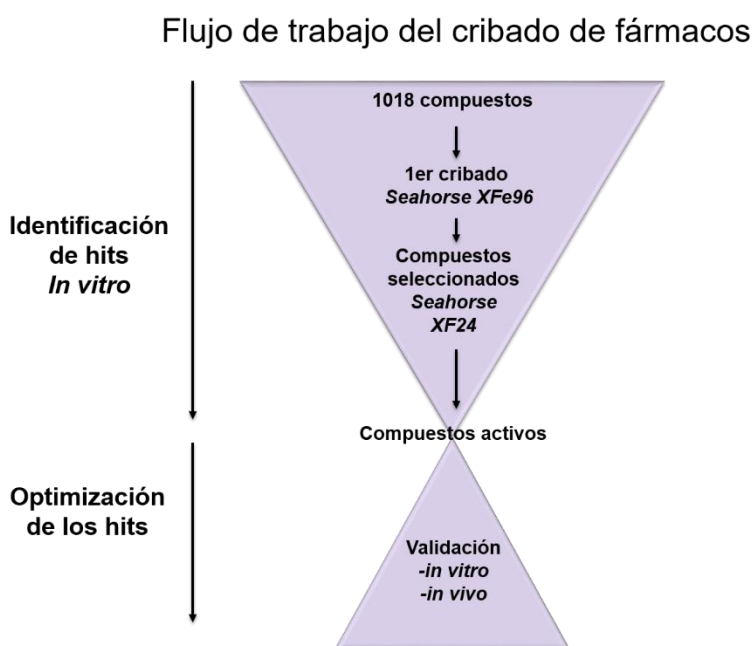


Figura 25. Flujo de trabajo del cribado de fármacos. Esquema resumen del flujo de trabajo para realizar el cribado de 1018 fármacos sobre la respiración mitocondrial. Se distinguen dos fases principales. La primera fase, de identificación de hits mediante la tecnología Seahorse da lugar a la identificación de una serie de compuestos activos que pasan a la segunda fase de optimización donde se validarán los hits *in vitro* e *in vivo*.

4.3.3. Identificación de hits sobre la respiración mitocondrial: Nebivolol.

Con el objetivo de trabajar con el número de células adecuado, realizamos una titulación de células HCT116 en Seahorse XFe96. Plaqueamos de 5000 hasta 40.000 células y vimos el perfil respiratorio (Figura 26A) y la linealidad del consumo de oxígeno

Resultados

basal (Figura 26B) y sensible a oligomicina (Figura 26C). Decidimos trabajar con 35.000 células en todos los experimentos ya que se encuentra en la zona lineal de consumo de oxígeno y nos proporciona un valor de OSR donde era más fácil detectar las diferencias que causen los tratamientos.

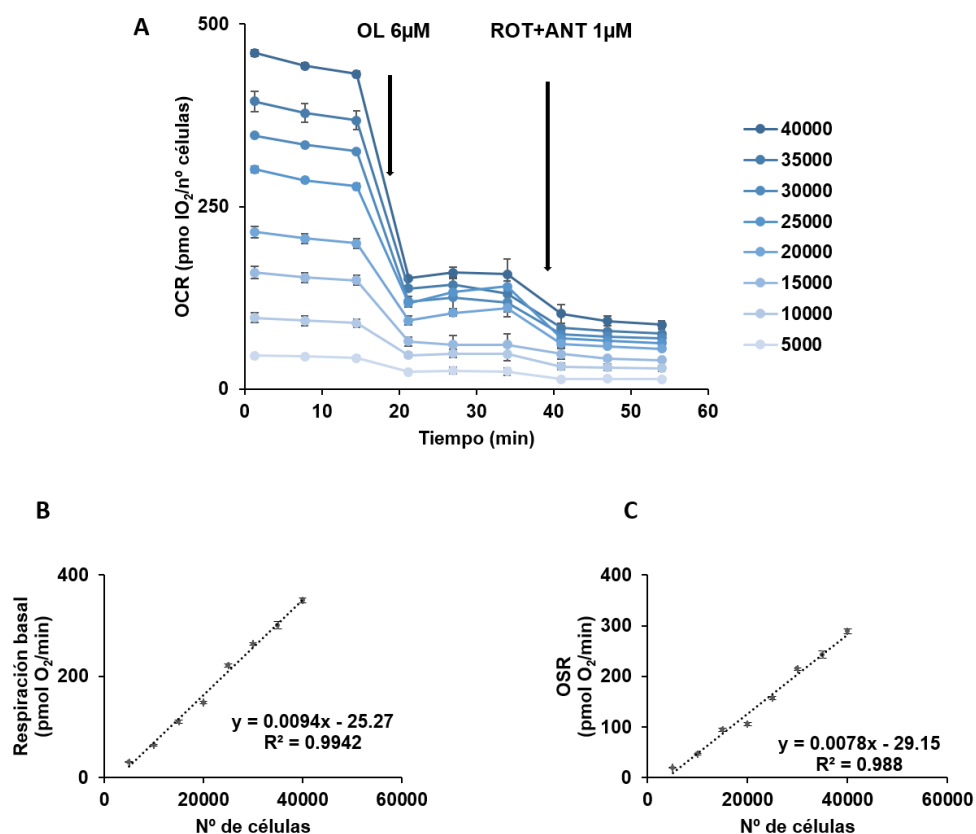


Figura 26. Optimización del ensayo en Seahorse XFe96 para el cribado de fármacos en células HCT1116. A. Perfil respiratorio en Seahorse XFe96 en un número creciente de células (desde 5000 a 40000, en color azul con tonalidades crecientes) (panel alto). Se especifican las inyecciones de 6 μM oligomicina (OL) y 1 μM rotenona + antimicina A (ROT + ANT). B Consumo de oxígeno basal en el mismo número creciente de células presentado en (A). Se especifica la ecuación de la recta y la linealidad del ensayo con su factor R². C. Se representa lo mismo que en (B) con el parámetro de respiración sensible a oligomicina (OSR).

El screening de los 1018 fármacos nos aportó compuestos inhibidores (INH) que inhiben la OSR un 40% o más respecto del valor control; compuestos que consideramos sin efecto (N.E.) porque el efecto de la OSR es mínimo o no supera el 40% establecido como límite en el screening y compuestos activadores (ACT), que activan la OSR un 40% o más respecto del valor control (Figura 27A). Encontramos 856 compuestos sin efecto (N.E. en Figura 27B), 46 activadores (ACT en Figura 21B) y 116 inhibidores (INH en Figura 27B). Las aplicaciones clínicas de los compuestos activadores e inhibidores identificados son múltiples y se encuentran resumidos en la Figura 27C.

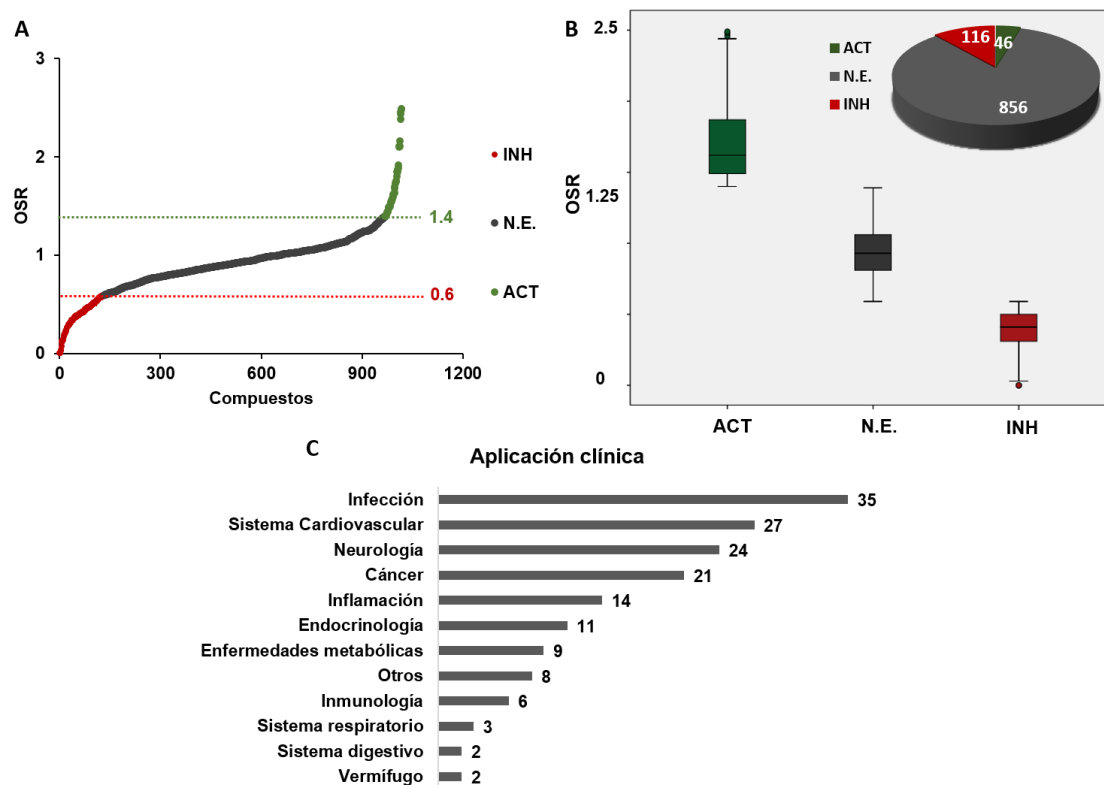


Figura 27. Identificación de hits mediante Seahorse XFe96 en células HCT116 sobre la OSR.

A. Representación de los valores de respiración sensible a oligomicina (OSR) representados en relación al control, considerado 1, de las células HCT116 tratadas con los 1018 fármacos durante 3 horas a una concentración final de 1 μ M. Se indican los límites superior (1.4) e inferior (0.6) donde empezamos a considerar los inhibidores (puntos rojos) y activadores (puntos verdes) de la OSR. **B.** Representación de los 116 inhibidores (INH, quesito y caja roja), 46 activadores (ACT, quesito y caja verde) y compuestos sin efecto (N.E., quesito y caja gris). **C.** Clasificación de los 116 inhibidores de la OSR según su aplicación clínica actual.

El cribado se centró en el estudio de los 116 inhibidores utilizando el equipo Seahorse XF24 y explorando su efecto sobre todos los parámetros respiratorios. Se verificó la existencia de 15 inhibidores de la respiración mitocondrial (Figura 28A) cuyo efecto era mayor de un 60% sobre los parámetros de respiración basal, sensible a oligomicina y máxima (Figura 28B). Dentro de los 15 inhibidores encontramos cinco fármacos que son utilizados para combatir infecciones, cuatro que se utilizan en tratamiento anticancerígenos, tres compuestos utilizados en sistema cardiovascular, dos en endocrinología y uno en inflamación (Figura 28C). Tras revisar la literatura de cada uno de estos compuestos, decidimos seguir adelante con un compuesto en particular, el compuesto 10 o nebivolol (Figura 28B), una beta bloqueante de tercera generación utilizado para tratar la hipertensión (Munzel and Gori, 2009). El nebivolol es un análogo del propranolol que ha sido utilizado en el laboratorio con anterioridad, demostrando que

Resultados

es capaz de promover la defosforilación de IF1 y la inhibición de la actividad de síntesis de ATP de la ATP sintasa en corazón de ratón *in vivo* (Garcia-Bermudez et al., 2015).

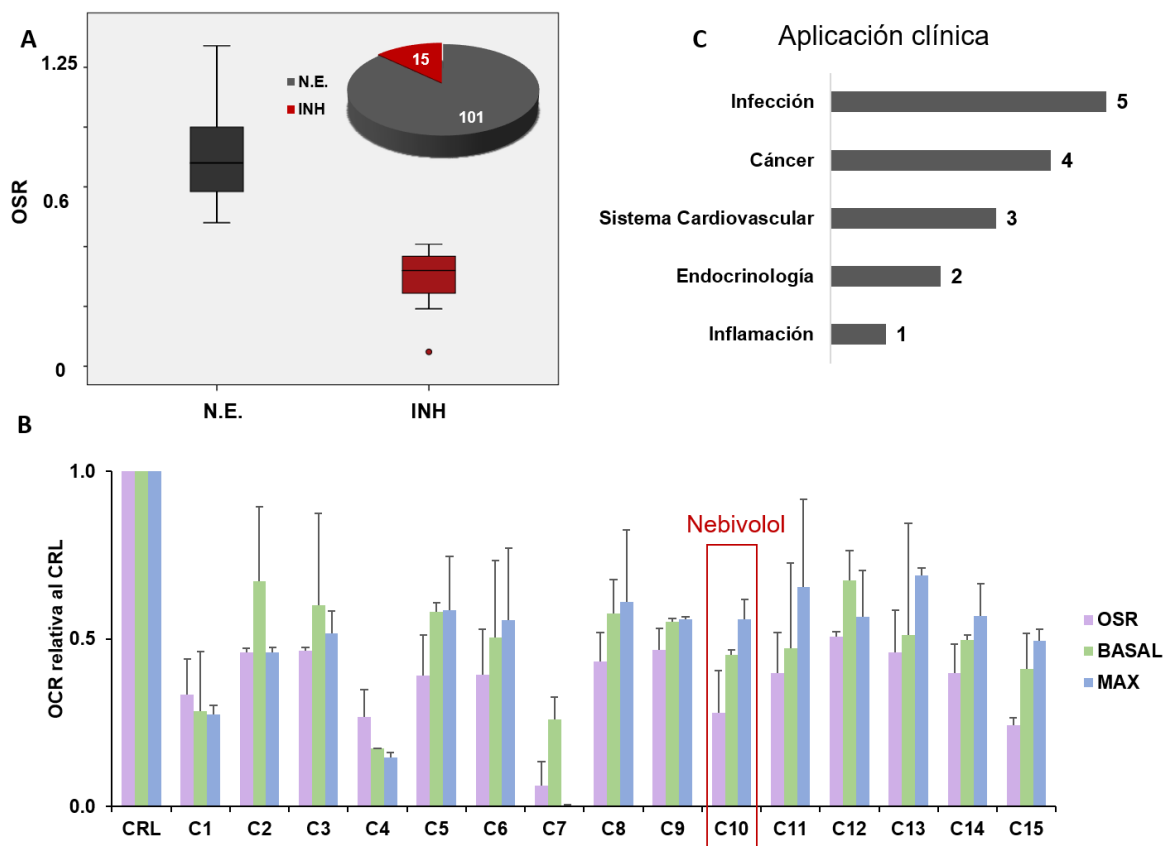


Figura 28. Identificación de 15 inhibidores de la respiración mitocondrial mediante Seahorse XF24 en células HCT116. **A.** Representación de los 15 inhibidores de la respiración mitocondrial (INH, quesito y caja roja, tratamiento de 3 horas a una concentración final de 1 μ M) y 101 compuestos sin efecto (N.E., quesito y caja gris). **B.** Se muestran los parámetros de respiración sensible a oligomicina (barra morada), basal (barra verde) y máxima (barra azul) respecto al control no tratado. Los histogramas indican la media \pm SEM de 3 experimentos. Se destaca en rojo el compuesto elegido para continuar los ensayos: neбиволol **C.** Clasificación de los 15 inhibidores de la OSR según su aplicación clínica actual.

4.3.3.1. El neбиволol inhibe la respiración mitocondrial en células de cáncer de colon y mama.

Un tratamiento a corto plazo de 3 horas a una concentración final de 1 μ M de neбиволol es capaz de inhibir todos los parámetros de la respiración mitocondrial en células de carcinoma de colon HCT116 y de mama MDA-MB-231 utilizando tanto glucosa (Figura 29A) como palmitato (Figura 29B) como sustratos de la cadena de transporte electrónico.

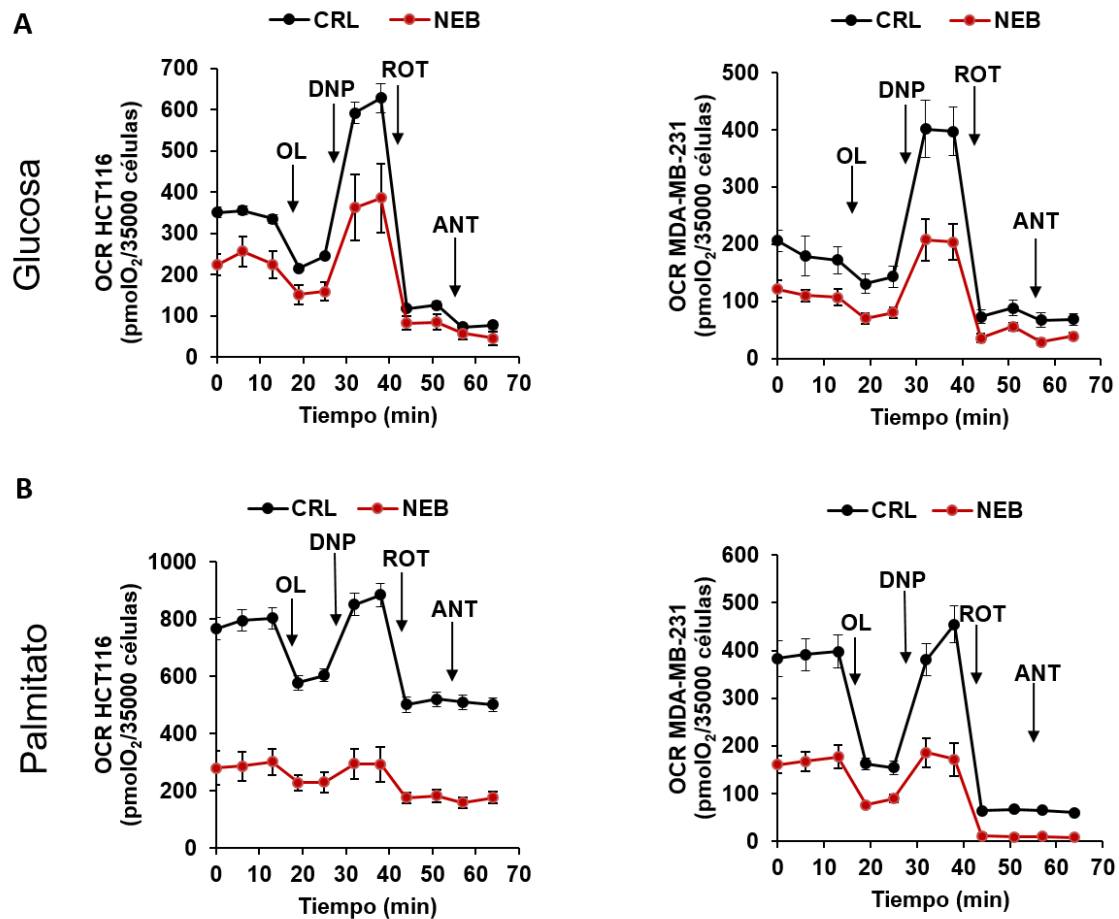


Figura 29. El nebulivol inhibe la respiración mitocondrial en células de cáncer de colon HCT116 y de mama MDA-MB-231. Perfiles respiratorios en Seahorse XF24 en células HCT116 (panel izquierdo) o MDA-MB-231 (panel derecho) no tratadas (CRL, línea negra) o tratadas con nebulivol durante 3 horas a una concentración final de 1 μ M (línea roja). Se muestra la respiración mitocondrial con glucosa (A) o palmitato (B) como sustrato. Los perfiles son representativos de 3 experimentos independientes.

La respuesta inhibitoria del nebulivol incrementaba a medida que aumentaba la dosis del fármaco en ambas líneas celulares afectando a la respiración basal (Figura 30A), sensible a oligomicina (Figura 30B) y máxima (Figura 30C). El IC₅₀ aproximado del nebulivol para cada parámetro respiratorio se encuentra resumido en la Figura 30D para ambas líneas celulares. En base a estos datos, el nebulivol es un inhibidor de la respiración mitocondrial más efectivo en la línea celular de cáncer de colon HCT116 ya que el IC₅₀ es casi de un orden de magnitud menor que en las células MDA-MB-231 (Figura 30D).

Resultados

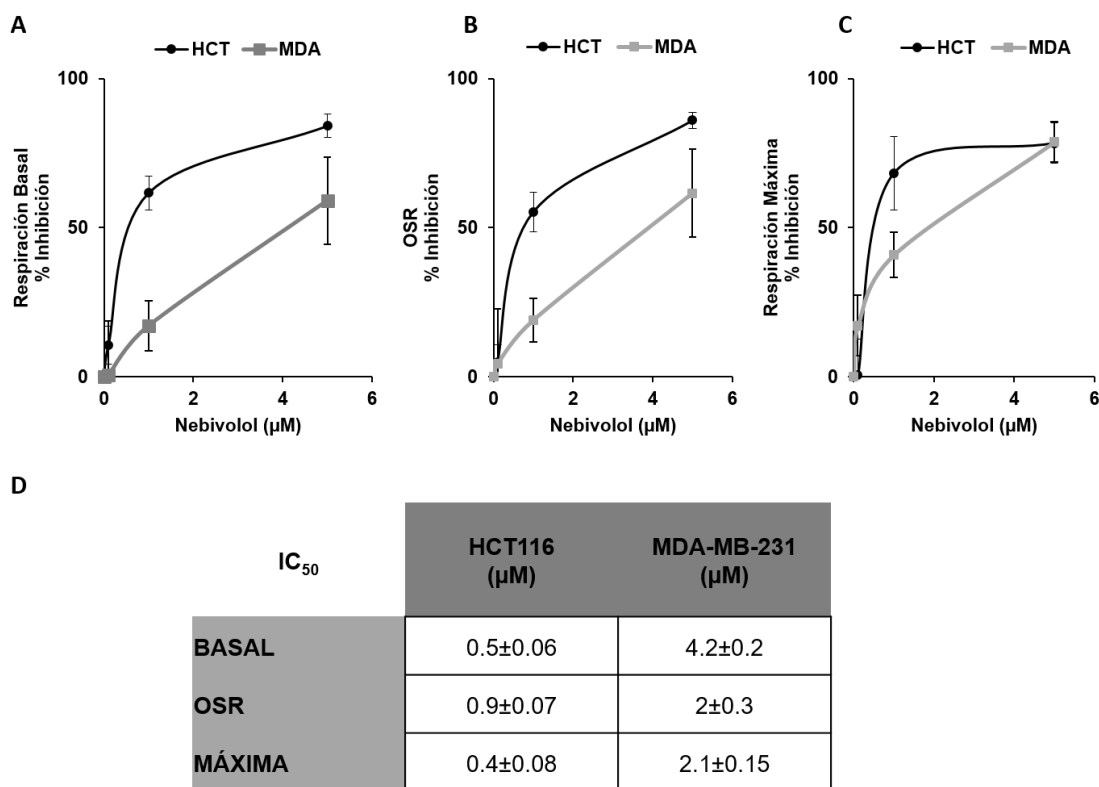


Figura 30. Inhibición de la respiración mitocondrial dependiente de dosis de nebulivolol. **A,B,C.** Representación de la inhibición de la respiración basal (A), sensible a oligomicina (B) y máxima (C) dependiente de dosis crecientes de nebulivolol en células HCT116 (línea negra) y MDA-MB-231 (línea gris) tras 3 h de tratamiento. Las líneas representan la media \pm SEM de 3 experimentos. **D.** La tabla muestra las IC₅₀ para los tres parámetros en ambas líneas celulares representadas como media \pm SEM de 3 experimentos.

Por el contrario, el nebulivolol no produce ningún efecto sobre la respiración mitocondrial en la línea C2C12, una línea celular no tumoral de miocitos de ratón, ni utilizando glucosa como sustrato (Figura 31A), ni palmitato (Figura 31B). Esto indica la especificidad de la acción inhibitoria del nebulivolol sobre la respiración mitocondrial en células cancerígenas.

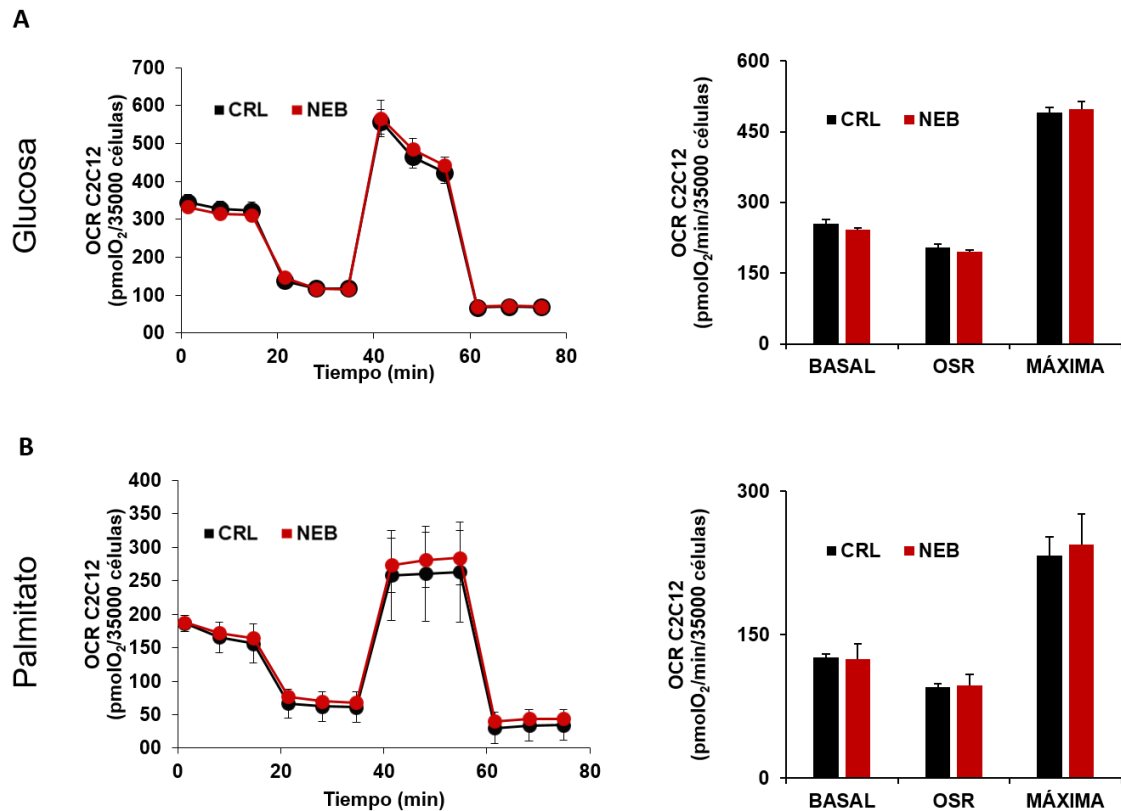


Figura 31. El nebevivolol no inhibe la respiración mitocondrial en células no tumorales. Perfiles respiratorios en Seahorse XF24 (panel izquierdo) y parámetros de respiración mitocondrial (panel derecho) en la línea de miocitos de ratón C2C12 control (línea y barras negras) o tratadas durante 3 horas con 1 μ M nebevivolol (línea y barras rojas). Se ha utilizado glucosa (A) o palmitato (B) como sustrato. Las barras representan la media \pm SEM de 3 experimentos.

4.3.3.2. El nebevivolol inhibe la producción de ATP por la ATP sintasa mediante la sobreexpresión de IF1.

La expresión de diferentes subunidades de la cadena de transporte electrónico, así como de la proteína mitocondrial Hsp60 no se ve alterado por las 3 h de incubación con nebevivolol en células HCT116 (Figura 32A) ni MDA-MB-231 (Figura 32B). Sin embargo, sí encontramos un aumento muy significativo en la expresión de IF1 propiciado por nebevivolol en ambos tipos celulares (Figura 32A y B). A diferencia de otras proteínas mitocondriales, IF1 es una proteína de vida media muy corta (\sim 120 min) (Sanchez-Arago et al., 2012) y, por lo tanto, susceptible de ver modificada su expresión en un tratamiento a corto plazo.

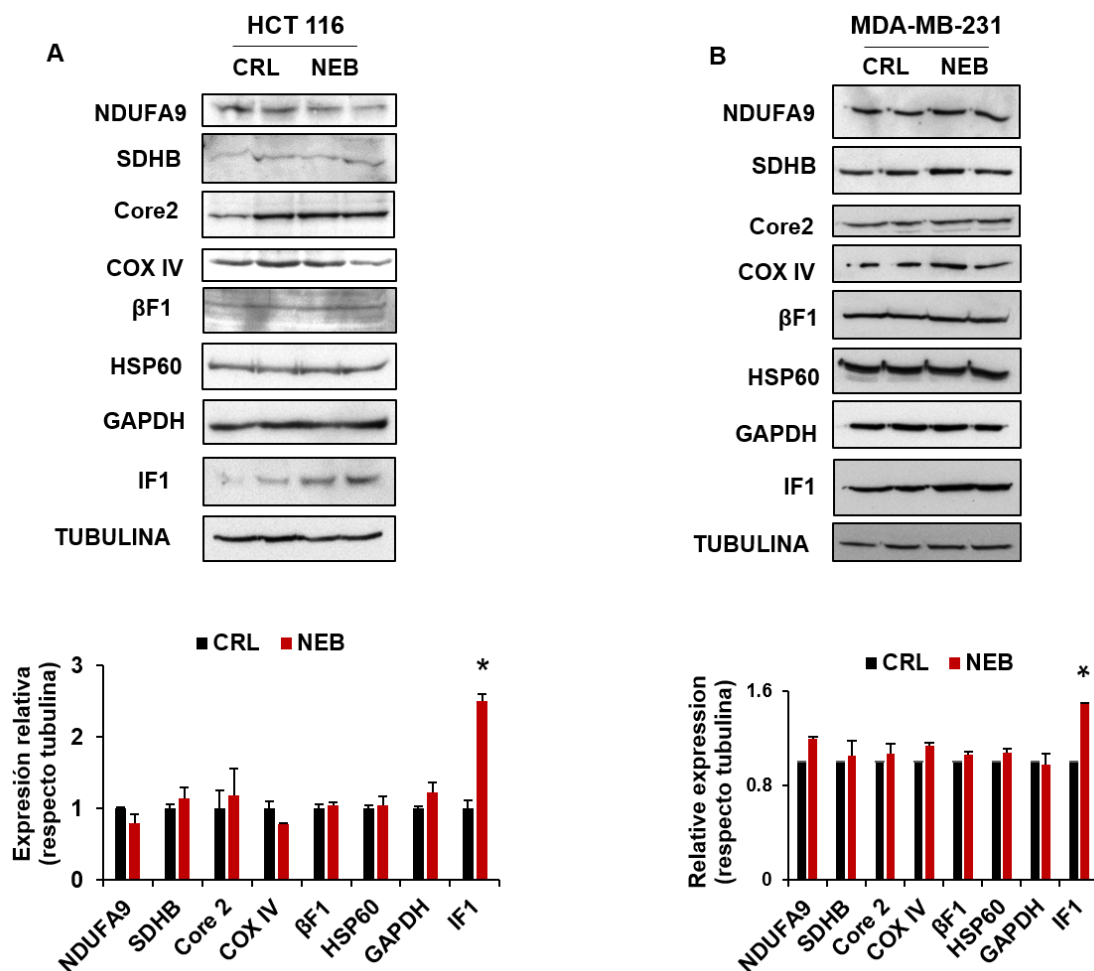


Figura 32. El tratamiento con nebigolol incrementa la expresión de IF1 tras 3 h. Western blot de la expresión de NDUFA9 (complejo I), SDHB (complejo II), core2 (complejo III), COX IV (complejo IV), βF1-ATPasa (complejo V), HSP60, GAPDH e IF1 en células HCT116 (A) o MDA-MB-231 (B) control (CRL) o tratadas durante 3 horas con nebigolol 1 μM. Los histogramas representan la razón respecto a tubulina como media ± SEM de 3 experimentos. *p < 0.05 cuando se compara respecto al control por el test de t de Student.

Para comprobar las consecuencias de la sobreexpresión de IF1 mediada por nebigolol sobre la ATP sintasa, determinamos la actividad sintética del enzima en células permeabilizadas (Figura 33A). Se encontró una disminución muy significativa en la producción de ATP cuando tratamos las células HCT116 y MDA-MB-231 con nebigolol (Figura 33A). En ambos tipos celulares, se observó un aumento pequeño, pero estadísticamente significativo en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en respuesta al nebigolol (Figura 33B). Además, en ambos tipos celulares se observó un aumento del flujo glucolítico en respuesta al nebigolol (Figura 33C). Por tratamiento con oligomicina se apreció que la reserva glucolítica de las células MDA-MB-231 es mucho mayor que en las células HCT116 (Figura 33C). Estos resultados indican que el

tratamiento con nebivolol está mediando una reprogramación metabólica que inhibe el metabolismo mitocondrial, causando un ligero, pero significativo aumento del metabolismo glucolítico y de la producción de ROS.

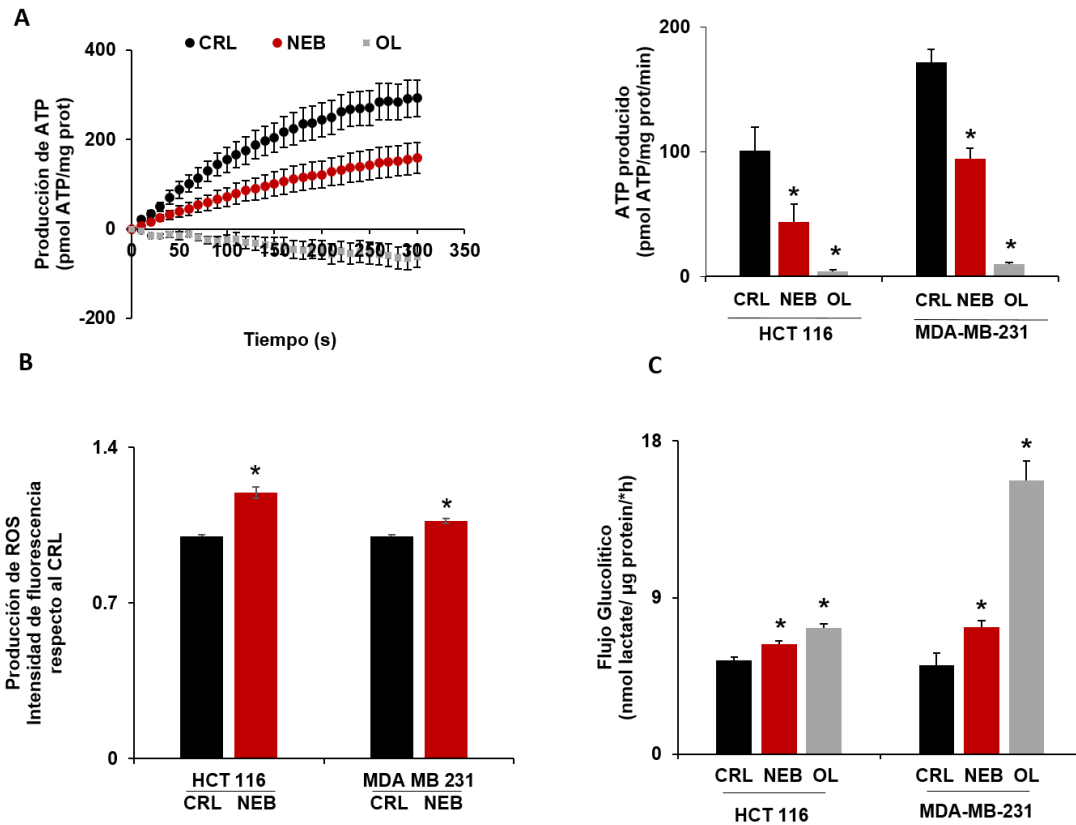


Figura 33. El nebivolol promueve la reprogramación metabólica de las células de HCT116 y MDA-MB-231. Cinética de síntesis de ATP por la ATP sintasa en células permeabilizadas (A), medida del flujo glucolítico (B) y de la producción de ROS (C) en células sin tratar (CRL, línea y barra negras) o tratadas con 1 μ M nebivolol (NEB, línea y barra rojas) durante 3 horas (A,C) o 48 horas (B). Se ha utilizado el tratamiento con oligomicina (OL, línea y barra gris) como control de especificidad del ensayo. Los histogramas representan la cuantificación como media \pm SEM de 6 (A,C) y 3 (B) experimentos. * $p < 0.05$ cuando se compara respecto al control por el test de t de Student.

Con objeto de verificar si el cambio metabólico inducido por nebivolol induce cambios en la proliferación y/o en muerte celular, se estudiaron estos procesos en ambos tipos celulares (Figura 34). Debemos destacar que el nebivolol no alteró la proliferación de células HCT116 ni MDA-MB-231 (Figura 34A). Igualmente, en ambos tipos celulares, el nebivolol no afectó la respuesta a muerte de agentes como el peróxido de hidrógeno, la estaurosporina y el tamoxifeno (Figura 34B).

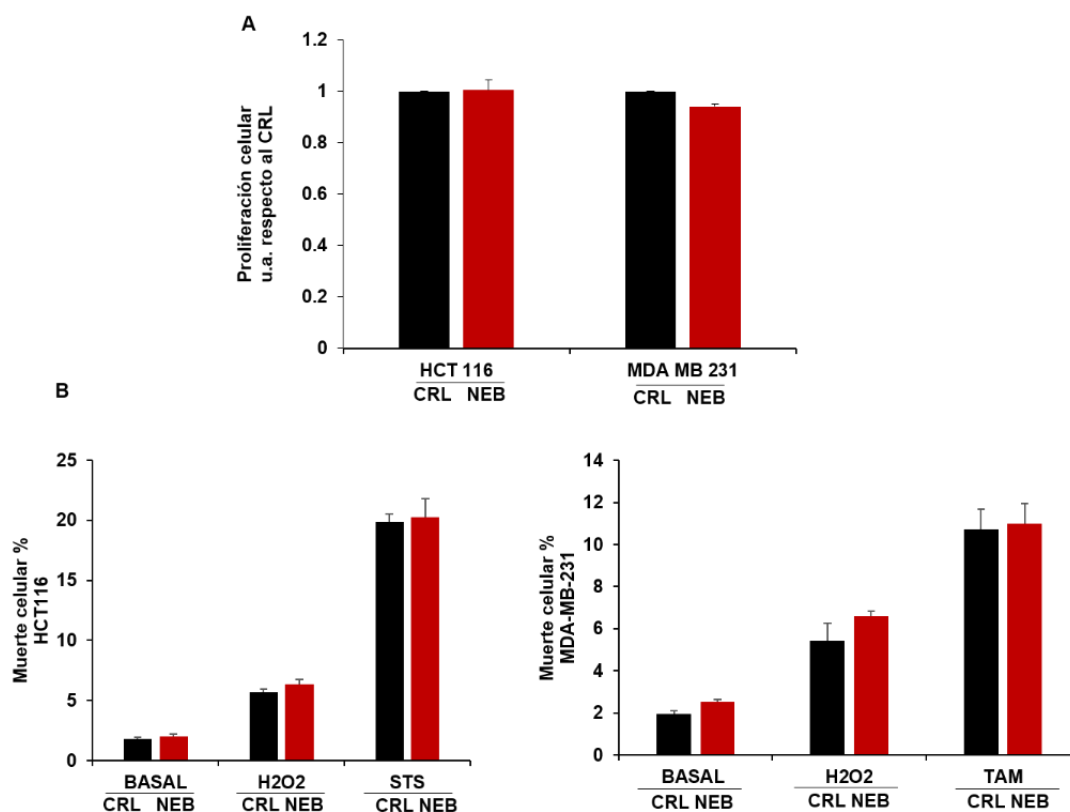


Figura 34. El neбиволол no afecta a la proliferación ni muerte celular en células HCT116 y MDA-MB-231. Representación de la proliferación celular (A) y muerte celular (B) en células HCT116 y MDA-MB-231 no tratadas (CRL, barras negras) y tratadas durante 48 horas con 1 μ M neбиволол (NEB, barra roja). La muerte celular se representa como basal y en respuesta a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o estaurosporina (STS). Los histogramas representan la cuantificación como media \pm SEM de 3 experimentos. * $p < 0.05$ cuando se compara respecto al control por el test de t de Student.

4.3.3.3. El neбиволол inhibe la actividad enzimática del CI y CV sin modificar la estructura o superestructura de los complejos mitocondriales.

Se ha sido descrito que cambios en la actividad mitocondrial pueden estar relacionados con diferentes patrones de organización de los complejos respiratorios (Milenkovic et al., 2017, Enriquez, 2016). Por este motivo, decidimos comprobar el efecto del neбиволол sobre la organización supramolecular de la cadena de transporte electrónico mediante BN-PAGE. Comprobamos que las mitocondrias de las células HCT116 que habían sido tratadas con neбиволол no presentaban cambios significativos en el patrón de migración de los diferentes complejos respiratorios y de la ATP sintasa (Figura 35). Así mismo, no se observaron cambios significativos en la cantidad de las distintas asociaciones de complejos al analizar la intensidad de las distintas bandas (Figura 35), por lo que la disminución de la respiración máxima inducida por neбиволол debe ser causada por mecanismos independientes a la organización de complejos respiratorios.

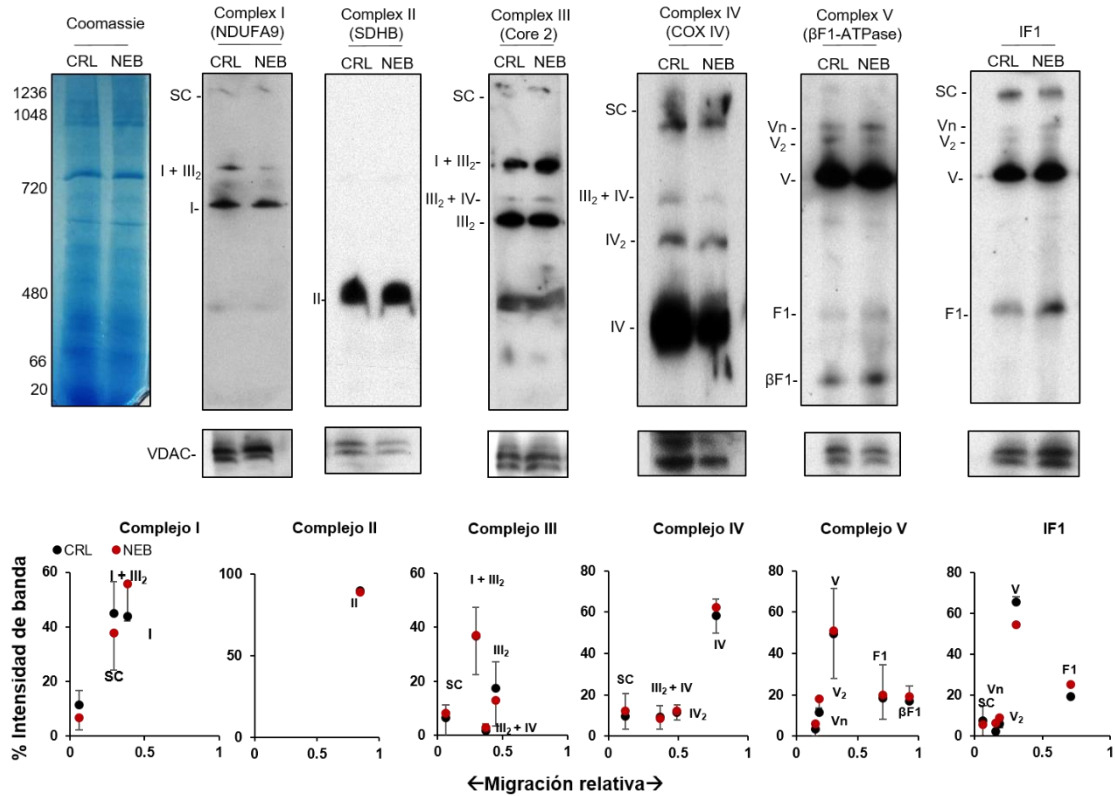


Figura 35. El nebivolol no modifica el patrón de migración de los complejos y SCs mitocondriales. BN-PAGE de mitocondrias de células HCT116 control (CRL, puntos negros) y tratadas durante 3 horas con 1 μM nebivolol (NEB, puntos rojos). Se muestran NDUFA9 (complejo I), SDHB (complejo II), core2 (complejo III), COX IV (complejo IV), $\beta\text{F1-ATPase}$ (complejo V), IF1. VDAC se ha utilizado como control de carga. El gel con tinción de coomassie indica los pesos moleculares. En el panel de abajo se muestran las cuantificaciones de la intensidad de banda en relación a la migración relativa en el gel. Los gráficos de puntos representan la cuantificación como media \pm SEM de 3 experimentos. * $p < 0.05$ cuando se compara respecto al control por el test de t de Student.

Experimentos de actividad en geles “Clear Native” CN-PAGE, sugirieron que el nebivolol induce una deficiencia en la actividad enzimática de consumo de NADH del CI, así como en la actividad hidrolítica de ATP del CV (Figura 36 A y D) sin afectar a las actividades de los complejos II y IV (Figura 36 B y C).

Resultados

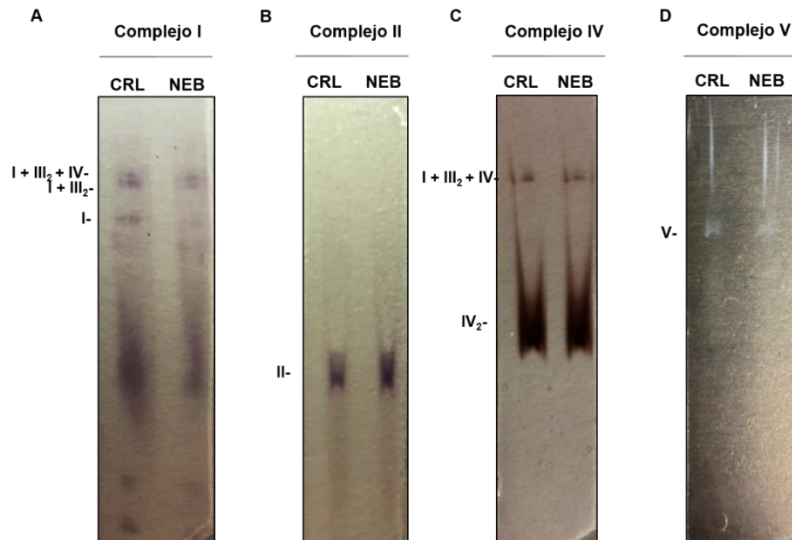


Figura 36. El nebulivol inhibe las actividades en gel del CI y CV. Se muestra la actividad en gel CN-PAGE de los complejos I (A), II (B), IV (C) e hidrolítica del CV (D) en mitocondrias de células HCT116 control (CRL) y tratadas durante 3 horas con 1 μ M nebulivol (NEB).

De manera determinante, el ensayo enzimático específico de cada complejo realizado en mitocondrias aisladas de células HCT116 y MDA-MB-231 reveló que el tratamiento con nebulivol inhibía de manera significativa la actividad del CI y la actividad hidrolítica del CV (Figura 37 A y D) sin afectar la actividad enzimática de los complejos II y IV (Figura 37 B y C). Esto nos indica que la inhibición de OXPHOS inducida por nebulivol se debe específicamente a su acción sobre los complejos I y V de la mitocondria sin afectar su organización supramolecular.

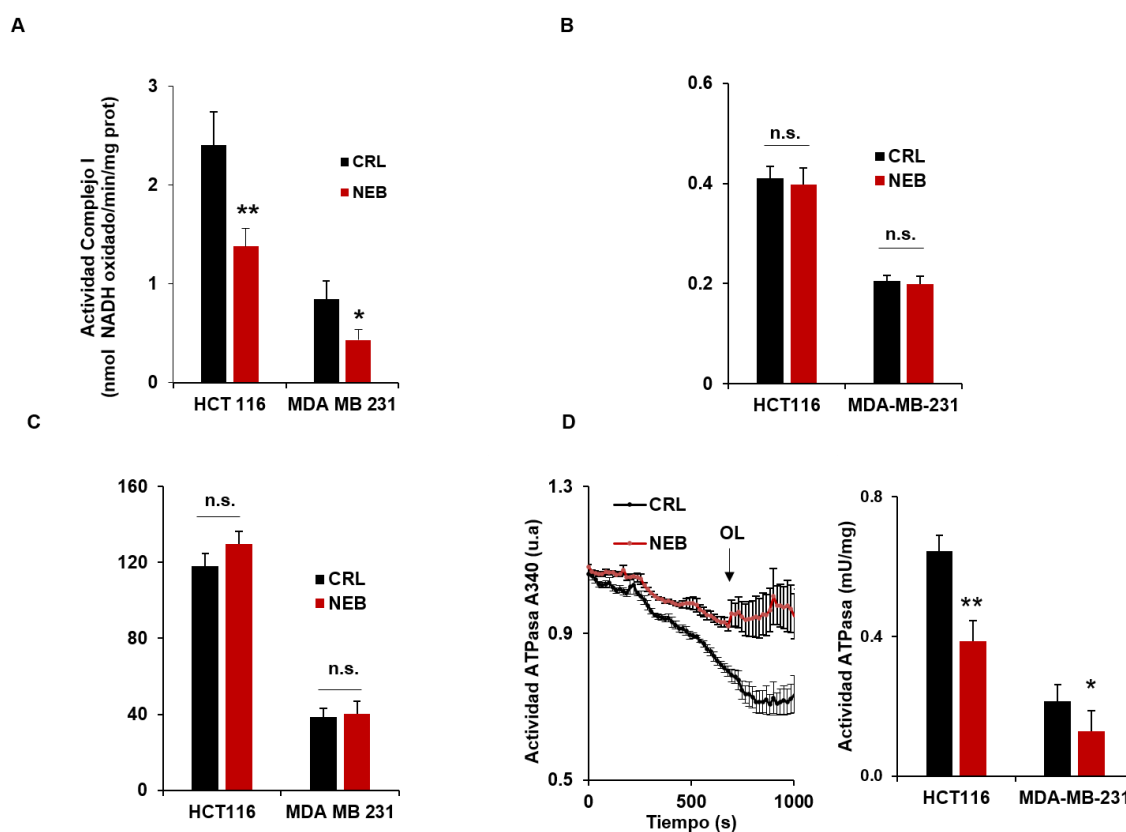


Figura 37. El neбиволol inhibe las actividades enzimáticas del CI y CV. Se muestra la actividad enzimática medida por espectrofotometría de los complejos I (A), II (B), IV (C) y de la ATP hidrolasa (D) en mitocondrias de células HCT116 y MDA-MB-231 control (CRL, barras negras) y tratadas durante 3 horas con 1 μ M neбиволol (NEB, barras rojas). En D se ha utilizado el tratamiento con oligomicina (OL) para inhibir la actividad hidrolítica del complejo CV. Los histogramas representan la cuantificación como media \pm SEM de 6 experimentos. * $p < 0.05$ cuando se compara respecto al control por el test de t de Student.

4.3.3.4. El neбиволol inhibe la fosforilación de proteínas de la cadena respiratoria.

La actividad de la OXPHOS también está regulada por modificaciones covalentes por fosforilación de diferentes subunidades de la cadena de transporte electrónico (Acin-Perez et al., 2011, Acin-Perez et al., 2014, Papa et al., 2012). Detectamos la presencia de proteínas fosforiladas en serinas en complejos y supercomplejos en BN-PAGE (Figura 38A) y encontramos una disminución de casi el 50% en la cantidad de proteínas fosforiladas correspondientes a la banda de mayor peso molecular mientras que no encontramos cambios en la banda presente a una altura de 600 kDa (Figura 38A). En la banda cuya fosforilación está afectada por neбиволol podemos encontrar tanto superformaciones de la ATP sintasa con o sin IF1 asociado o diferentes complejos de la cadena de transporte electrónico formando supercomplejos.

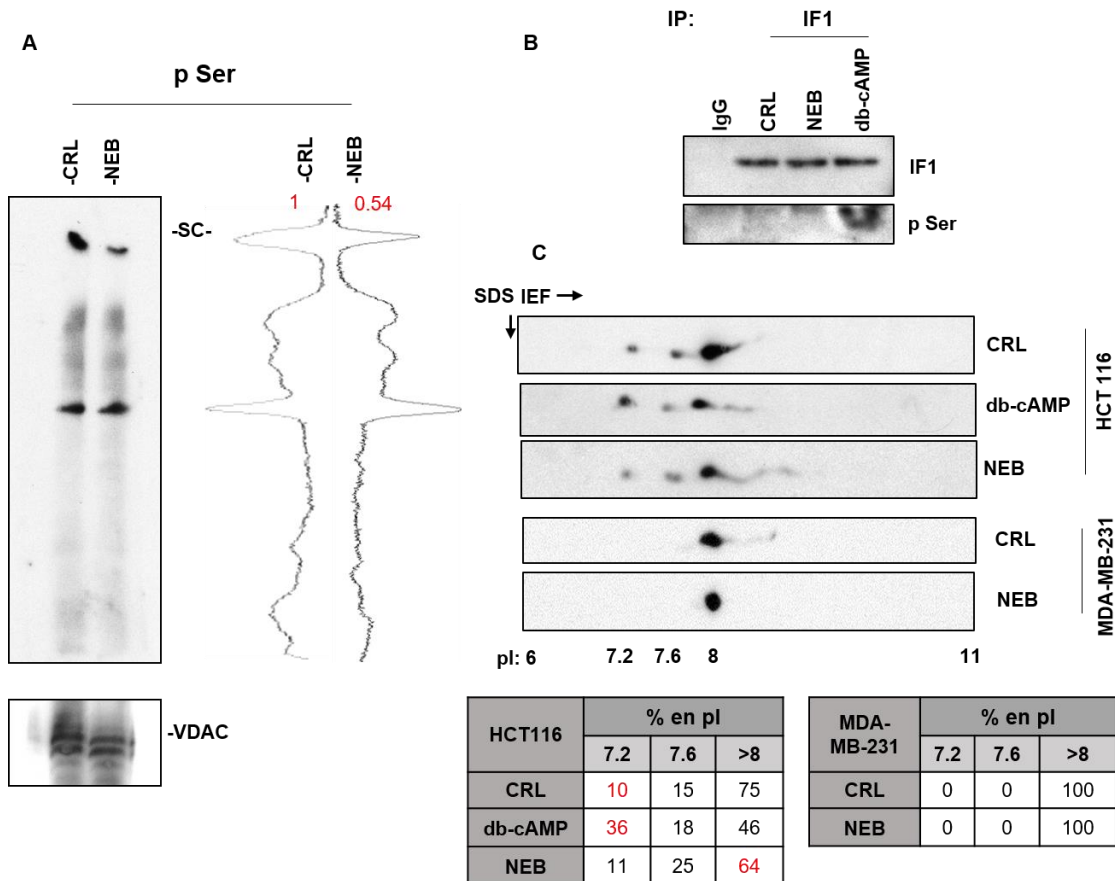


Figura 38. El neбиволол inhibe parcialmente la fosforilación de los SCs. **A.** BN-PAGE de mitocondrias de células HCT116 control (CRL) y tratadas durante 3 horas con 1 μ M neбиволол durante 3 h (NEB) (panel izquierdo). Se ha revelado con el anticuerpo que reconoce proteínas fosforiladas en serina y se ha cuantificado la intensidad de las bandas prioritarias (panel derecho) identificando una reducción de la fosforilación (0.54 sobre 1, en rojo) en las células tratadas con NEB. Se muestra el inmunoblot de VDAC como control de carga. **B.** Western blot de la inmunoprecipitación de IF1 en células HCT116 control (CRL) tratadas con neбиволол (NEB) o con dibutilil-AMP cíclico (db-cAMP). Se incluye como control una inmunoglobulina de ratón no específica (IgG). Se ha revelado con IF1 como control de la inmunoprecipitación y con el anticuerpo anti serinas fosforiladas para comprobar el estado de fosforilación de IF1. **C.** Análisis de fosforilación de IF1 mediante electroforesis bidimensional en células HCT116 control (CRL) y tratadas con neбиволол (NEB) o con dibutilil-AMP cíclico (db-AMPc). Las tablas de abajo muestran el porcentaje de las fracciones fosfo (punto isoelectrico 7.2) y defosforiladas (punto isoelectrico 7.6-8) de IF1 en los dos tipos celulares y con los diferentes tratamientos.

Inmunoprecipitamos IF1 en células HCT116 control y tratadas con neбиволол utilizando, además, como control positivo de fosforilación, células tratadas con db-cAMP. El revelado de los inmunoprecipitados con un anticuerpo que reconoce serinas fosforiladas, reveló que la proteína de células control y tratadas con neбиволол se encuentra mayoritariamente defosforilada (Figura 38B) sobre todo cuando se compara con las células tratadas con db-cAMP (Figura 38B). La cantidad relativa de IF1 en su estado defosforilado por efecto del neбиволол se estableció por enfoque de la proteína en

geles 2D (Figura 38C). Comprobamos que el nebivolol tiene un efecto muy pequeño sobre el estado de fosforilación de IF1 (si lo tiene) en células HCT116 (Figura 38C) y no afecta a la fosforilación de IF1 en células MDA-MB-231 ya que la mayoría de la proteína se encuentra defosforilada (Figura 38C). En su conjunto, estos resultados sugieren que los cambios en la actividad de síntesis de ATP inducidos por nebivolol no se deben a un efecto sobre su estado de fosforilación siendo quizás debidos al fuerte aumento de su expresión en respuesta al fármaco.

Con objeto de explorar la implicación de la cadena de transporte de electrones en la pérdida de la capacidad respiratoria máxima inducida por nebivolol (Figura 29), inmunocapturamos los diferentes complejos a partir de mitocondrias aisladas de células control o tratadas con nebivolol (Figura 39). El revelado con el anticuerpo que detecta proteínas fosforiladas en serina mostró una clara inhibición en la fosforilación de subunidades del CI a una altura de 10-20 kDa (Figura 39A) así como la presencia de una fosforilación a la altura de 25 kDa en el CII (Figura 39B). No se encontraron cambios relevantes en la fosforilación de subunidades inmunocapturadas del CIV (Figura 39C) y sí una ligera defosforilación de una subunidad entre 15-20 kDa inmunocapturada del CV (Figura 39D), que, en conjunto, podrían explicar la inhibición en la actividad enzimática de los complejos I y V en ambos tipos celulares (Figura 37 Ay D).

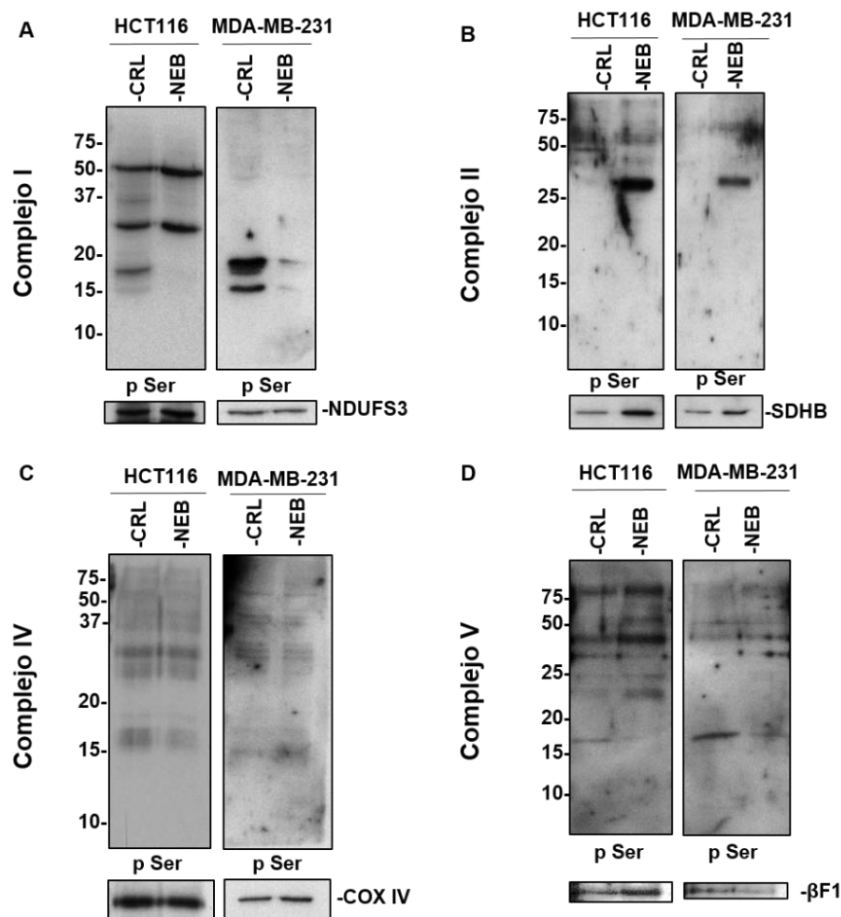


Figura 39. El nebulivolol modifica el estado de fosforilación de los complejos mitocondriales. Western blot de la inmunocaptura de los complejos I (A), II (B), IV (C) y V (D) en células HCT116 y MDA-MB231 control (CRL) y tratadas con nebulivolol (NEB). Se ha revelado con el anticuerpo anti serinas fosforiladas para comprobar el estado de fosforilación de las subunidades de los cuatros complejos. Se muestran NDUFS3 (complejo I), SDHB (complejo II), COX IV (complejo IV) y β F1-ATPasa (complejo V) como input del experimento.

Se ha descrito que la defosforilación de la subunidad accesoria del CI NDUFS4 (17 kDa), en la zona C-terminal RVSTK, está ligada con la desestabilización del complejo y una consecuente disminución de su actividad (De Rasmio et al., 2015). Sin embargo, el nebulivolol no altera la estabilidad del CI (Figura 29) ni produce cambios en la fosforilación de NDUFS4 como revela el anticuerpo contra serinas fosforiladas en la proteína inmunoprecipitada (Figura 40A). Por este motivo se procedió a un análisis por espectrometría de masas de las bandas modificadas en la inmunocaptura del CI (Figura 40B). De los péptidos correspondientes a las proteínas del CI detectadas en común, únicamente se encontró un espectro de masas diferencial de un péptido de NDUFS7 (Figura 40C) resaltando la fosforilación de la serina 117 en el péptido de las células control que está defosforilado en respuesta al tratamiento con nebulivolol (Figura 40 C y D).

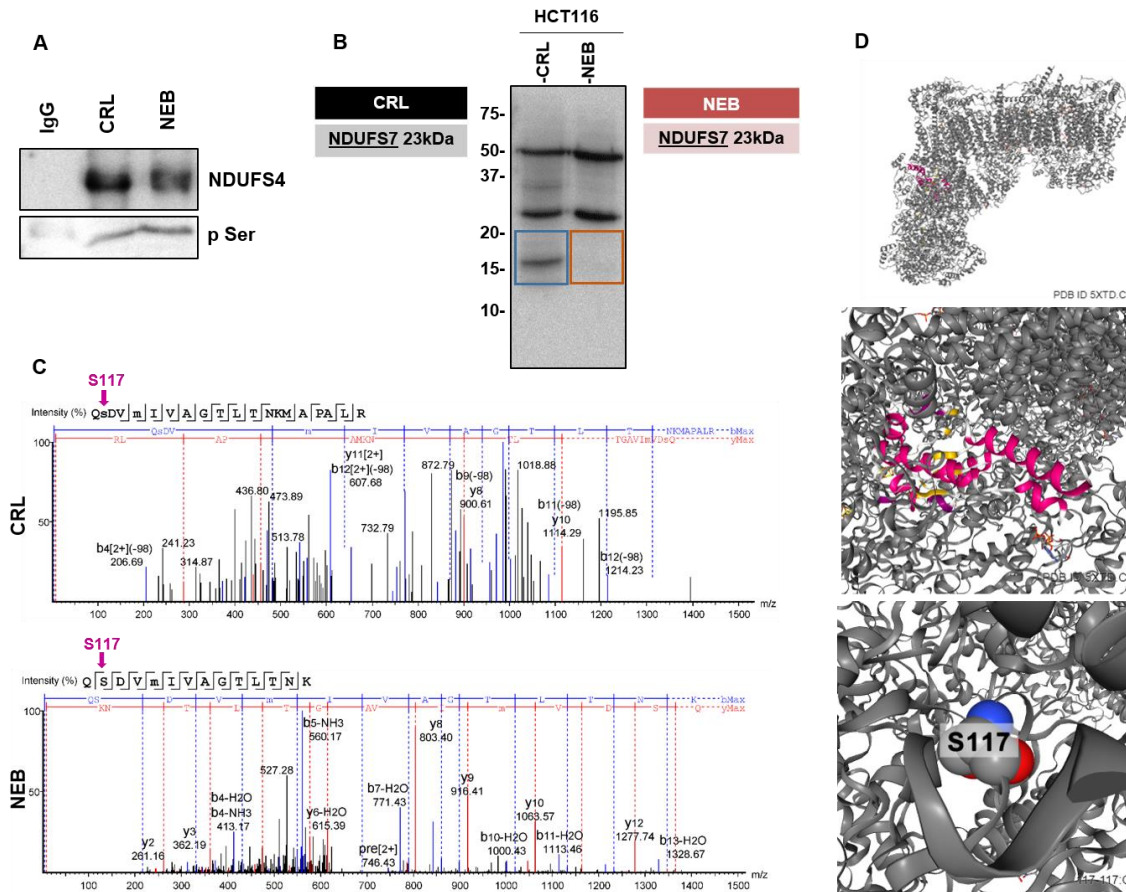


Figura 40. El nebevólol promueve la desfosforilación de la S117 de la subunidad NDUFS7 del CI en células de cáncer de colon. A. Western blot de la inmunoprecipitación de la subunidad NDUFS4 en células HCT116 control (CRL) y tratadas con nebevólol (NEB). Se incluye como control una inmunoglobulina de ratón no específica (IgG). Se ha revelado con NDUFS4 como control de la inmunoprecipitación y con el anticuerpo anti serinas fosforiladas para comprobar el estado de fosforilación de esta subunidad. **B.** Subunidad del CI detectadas por espectrometría de masas en común en células control (cuadrado azul) y tratadas con nebevólol (cuadrado naranja). **C.** Espectro de masas del péptido donde se detecta la S117 fosforilada. **D.** Cristalografía del CI mitocondrial humano con la subunidad NDUFS7 y S117 localizadas. Estructura tomada de (Guo et al., 2017) (PDB: 5XTD).

En el mismo estudio en células MDA-MB-231 (Figura 41A), a pesar de que se detectaron péptidos de 16 subunidades del CI en las células control y de 12 subunidades en las células tratadas con nebevólol, no identificó cambios significativos en fosforilación a pesar de ser esta evidente con anti-fosfoserina (Figura 39A). Es más, a pesar de encontrar el péptido de la subunidad NDUFS7, éste no se encontró fosforilado en S117 (Figura 41B). En su conjunto, estos resultados sugieren que el efecto del nebevólol sobre la fosforilación de subunidades del CI, entre ellas la proteína NDUFS7, es tipo celular específico y causa una inhibición en la actividad de dicho complejo que genera un fenómeno de deficiencia en el metabolismo mitocondrial.

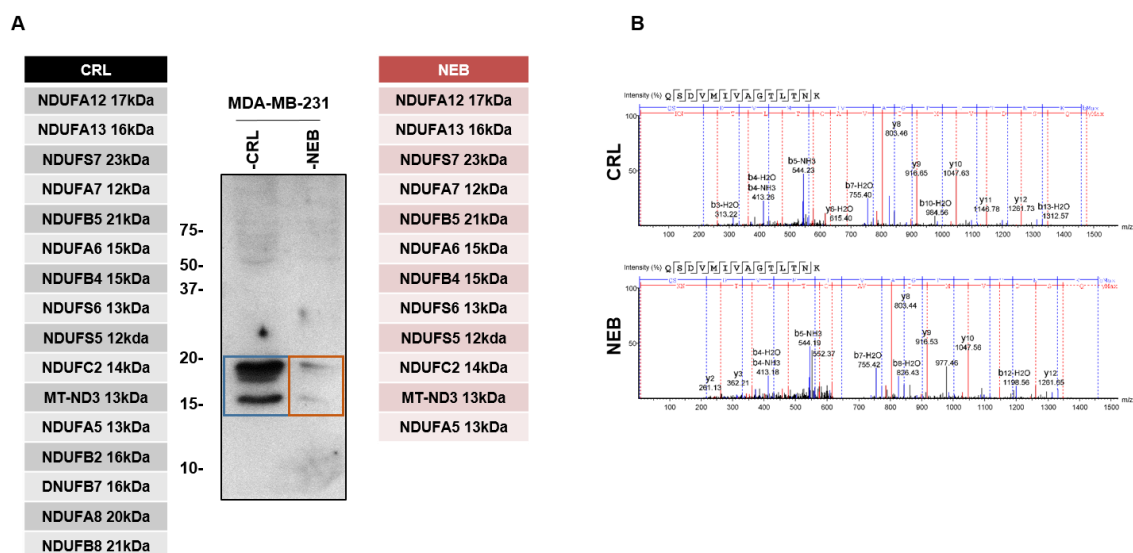


Figura 41. El nebiivolol no promueve la desfosforilación de la subunidad NDUFS7 del CI en células de cáncer de mama. A. Subunidades del CI detectadas por espectrometría de masas en células MDA-MB-231 control (cuadrado azul) y tratadas con nebiivolol (cuadrado naranja). **C.** Espectro de masas del péptido donde se detecta la S117.

4.3.4. El nebiivolol retrasa el crecimiento tumoral del cáncer de colon *in vivo*.

A pesar de que el nebiivolol no mostró tener ningún efecto sobre la proliferación y muerte en células tumorales en cultivo (Figura 34) decidimos comprobar el efecto de la inhibición de la OXPHOS *in vivo* en un modelo de crecimiento tumoral en ratones inmunodeprimidos. Tras 6 días de tratamiento, los ratones tratados con nebiivolol (n=6) en una dosis de 10 mg/kg presentaban un menor crecimiento, medido por la señal de bioluminiscencia de las células HCT116-luc inyectadas en los flancos, en comparación con los ratones control (n=7) tratados con suero salino (Figura 42A). Esta disminución se vio reflejada al medir el calibre de los tumores tras 6, 15 y 30 días de tratamiento mostrando los ratones tratados con nebiivolol una significativa reducción en la cinética de crecimiento tumoral en comparación con los ratones control (Figura 42B). De hecho, la curva de supervivencia Kaplan-Meier mostró un aumento muy significativo en la supervivencia de los ratones tratados con nebiivolol en comparación con los ratones control (Figura 42C). En otras palabras, el tratamiento con nebiivolol aumenta la supervivencia de los ratones por enlentecer la velocidad de crecimiento tumoral.

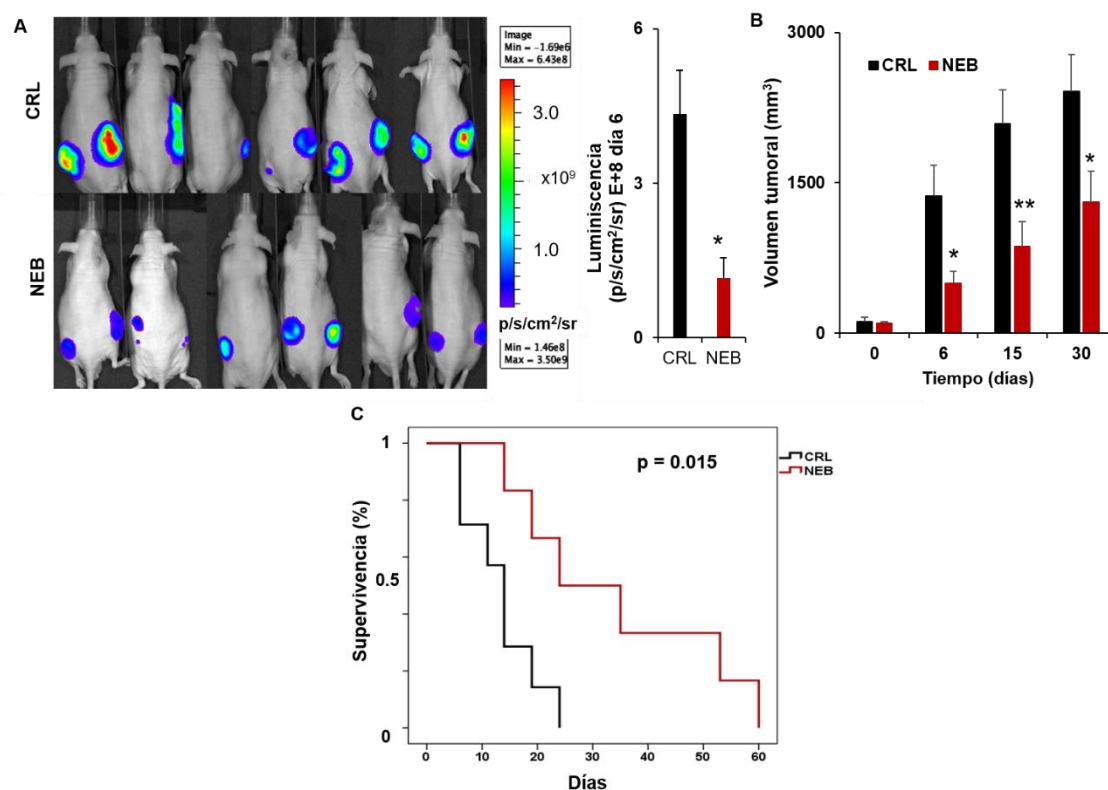


Figura 42. El nebulinol delecera el crecimiento tumoral *in vivo* en ratones *xenograft* inyectados con células HCT116-luc. Se muestran los resultados de los ratones control tratados con suero salino (CRL; barras y línea negras) o con nebulinol (NEB; barras y línea rojas) **A**. Imágenes representativas de los ratones con los tumores generados con células HCT116-luc tras 6 días de tratamiento pseudocoloreados según la intensidad de bioluminiscencia por el software “Living image”. **B**. Crecimiento tumoral medido en volumen del tumor tras 6, 15 y 30 días del tratamiento. **A-B**. Los histogramas muestran la cuantificación de la luminiscencia como media \pm SEM de 6-7 animales. * $p < 0.05$ cuando se compara respecto al control por el test de t de Student. **D**. Análisis estadístico de supervivencia Kaplan-Meier de los ratones control (CRL, $n=7$) y tratados con nebulinol (NEB, $n=6$). Se muestra el p-valor del test log-rank.

4.3.5. El nebulinol promueve un aumento en la apoptosis y una disminución en la proliferación celular *in vivo*.

Al teñir los cortes de los tumores extraídos con hematoxilina-eosina, comprobamos dos zonas claras en todos los tumores independientemente del tratamiento. Por una parte, una zona de células redondeadas y vivas y otra zona de necrosis sin cambios significativos propia del avanzado estado del crecimiento tumoral (Figura 43A). Ensayos de inmunofluorescencia revelaron un aumento significativo en la expresión de caspasa 3 activa (Figura 43B) y una disminución significativa del marcador de proliferación celular Ki67 (Figura 43B) en los tumores de los ratones tratados con nebulinol en comparación con los controles. Indicando que el tratamiento con nebulinol está activando la apoptosis

Resultados

e inhibiendo la proliferación de las células tumorales, explicando así las diferencias en el ritmo de crecimiento tumoral (Figura 42) entre ambas condiciones.

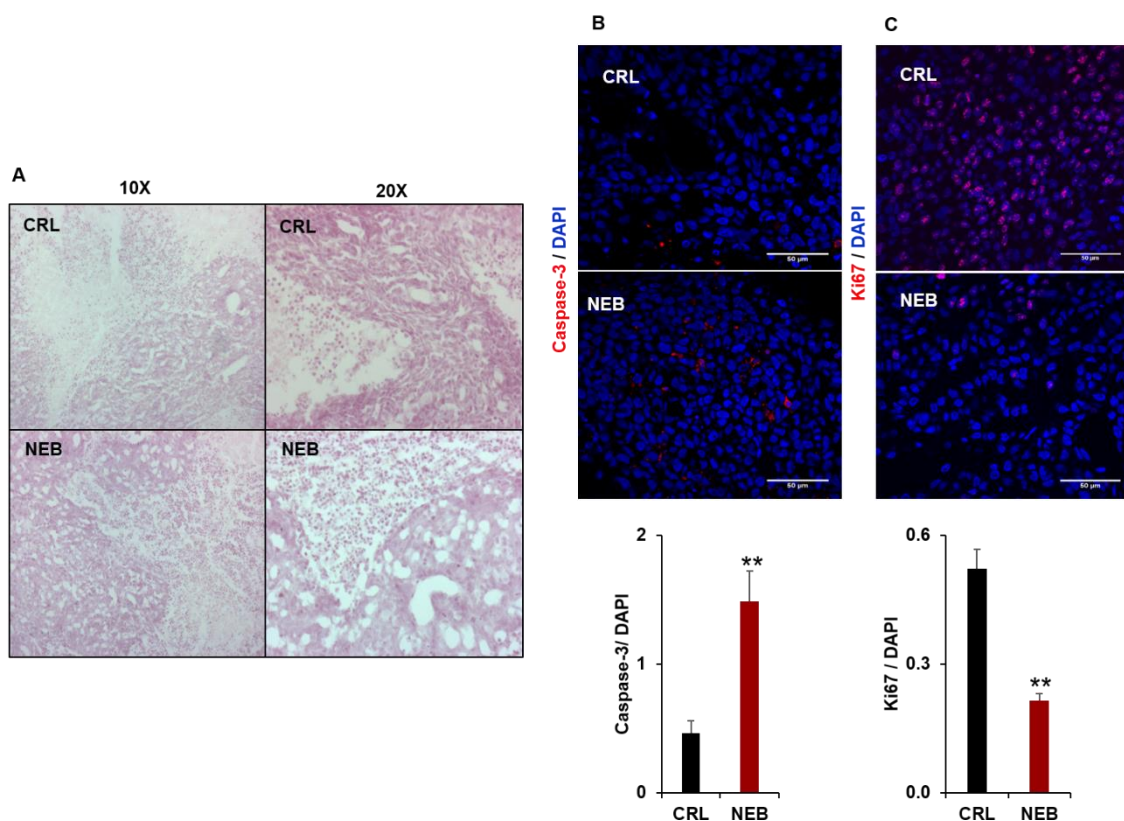


Figura 43. El nebevicol inhibe la proliferación de las células tumorales y aumenta la apoptosis *in vivo*. Se muestran los tumores de ratones control (CRL) y tratados con nebevicol (NEB). **A.** Imágenes representativas de los tumores con tinción H&E. Magnificación 10x y 20x **B.** Inmunofluorescencia de caspasa 3 activa (rojo) y DAPI (nucleos, azul). Magnificación 60x. Los histogramas muestran la cuantificación de la intensidad de fluorescencia calculada como razón de caspasa3 activada/ DAPI en cortes de tumor. **C.** Inmunofluorescencia de Ki67 (rojo) y DAPI (nucleos, azul). Magnificación 60x. Los histogramas muestran la cuantificación de la intensidad de fluorescencia calculada como razón de Ki67/ DAPI en cortes de tumor. Se representa la media \pm SEM de todas las muestras. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ cuando se compara respecto al control por el test de t de Student.

4.3.6. El nebevicol promueve un desbalance en el estado redox y una crisis metabólica en los tumores.

El estudio del estado redox de los tumores reveló un aumento significativo en los marcadores 4-hidroxinonanal (4-HNE) en los tumores de los ratones tratados con nebevicol (Figura 44A). Estos resultados sugieren que el nebevicol causa una mayor peroxidación lipídica (Figura 44A). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en carbonilación de proteínas (Figura 44B).

Este desbalance en el estado redox de los tumores tratados con nebigolol también se vio reflejado en el aumento de expresión de enzimas de la respuesta antioxidante como peroxirredoxina 3 (PRx3), glutatión reductasa (GR) y la superóxido dismutasa 2 (SOD2) (Figura 44C). Así mismo, observamos una disminución en las enzimas citosólicas glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y peroxirredoxina 6 (Prx6) (Figura 44C) sin cambios en la expresión de la enzima citosólica catalasa (Figura 44C). En su conjunto, el tratamiento con nebigolol exacerba el estrés oxidativo en los tumores.

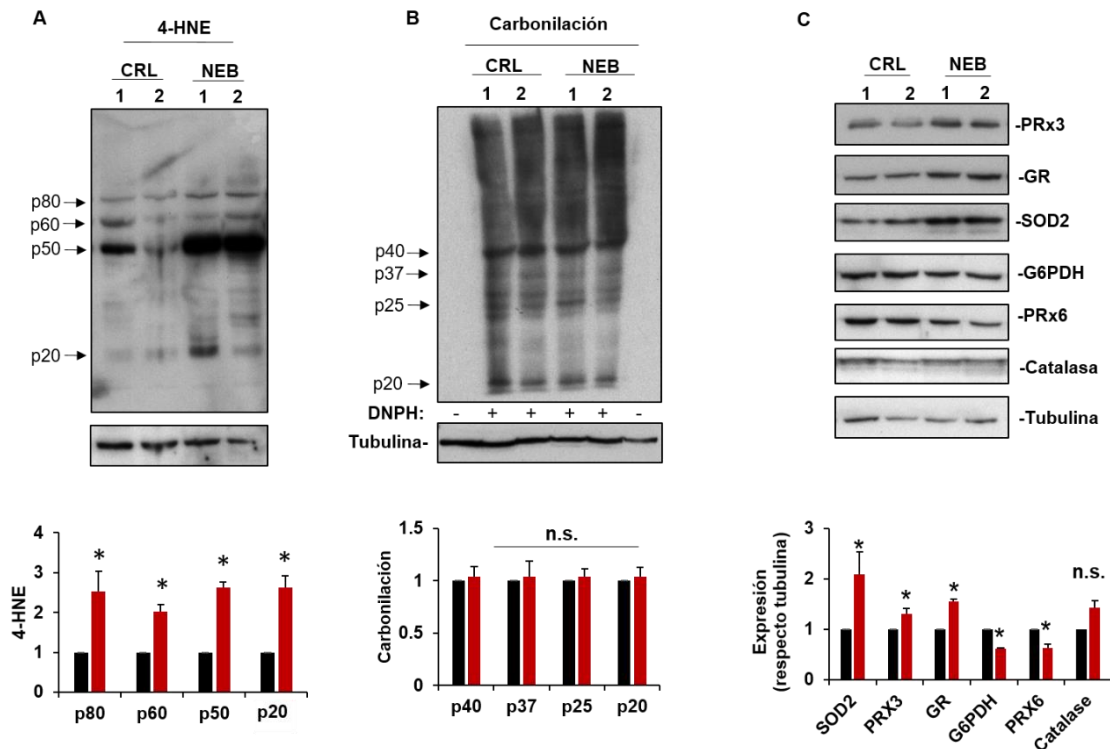


Figura 44. El nebigolol provoca un desbalance en el estado redox en los tumores. Western blot de los tumores de ratones control (CRL) y tratados con nebigolol (NEB). Se muestran dos muestras por cada condición. **A.** Se representa el inmunoblot de peroxidación lipídica medida como positividad de las proteínas hacia el anticuerpo que reconoce el 4-hidroxinonal (4-HNE) **B.** Se representa el inmunoblot de carbonilación de proteínas, expresada como positividad después del tratamiento con dinitrofenol (DNPH+). **C.** Se representa el inmunoblot de los enzimas redox peroxirredoxina 3 (Prx3), glutatión reductasa (GR), superóxido dismutasa 2 (SOD2), glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), peroxirredoxina 6 (Prx6) y catalasa. Se ha utilizado la tubulina como control de carga. **A-C.** Los histogramas representan la cuantificación de la expresión relativa a α -tubulina como media \pm SEM de 4 experimentos. * $p < 0.05$ cuando se compara respecto al control por el test de t de Student.

En concordancia con los resultados previamente mostrados en células tratadas con nebigolol (Figura 26), se encontró una sobreexpresión muy significativa de IF1 en los tumores de los ratones tratados con nebigolol (Figura 45A) sin cambios en la huella bioenergética (razón β -F1-ATPasa/GAPDH) del carcinoma (Cuezva et al., 2002) (Figura

Resultados

45A). Además, los tumores de los ratones tratados con nebivolol presentan una cantidad significativamente menor de ATP (Figura 45B). Estos resultados indican que el nebivolol genera una restricción de ATP en las células tumorales provocando una crisis metabólica y de estrés oxidativo que tiene su origen en la mitocondria, lo que explica la disminución del crecimiento tumoral *in vivo*.

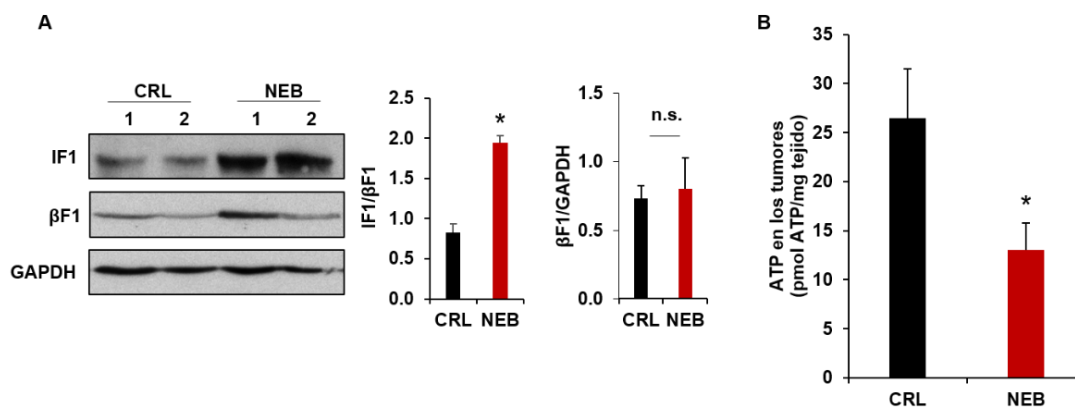


Figura 45. El nebivolol causa la sobreexpresión de IF1 y la disminución del contenido de ATP *in vivo*. Western blot de tumores de ratones control (CRL) y tratados con nebivolol (NEB). Se muestran dos muestras por cada condición. **A.** Expresión de IF1, β F1-ATPasa y GAPDH en **B.** Contenido total de ATP. **A-B.** Los histogramas representan la cuantificación como media \pm SEM de todas las muestras. * $p < 0.05$ cuando se compara respecto al control por el test de t de Student.

4.3.7. El tratamiento combinado de nebivolol con 5-fluouracilo aumenta la supervivencia de los ratones *xenograft* con células de cáncer de colon.

El 5-fluouracilo (5-FU) es el tratamiento quimioterapéutico clásico del cáncer de colon (Longley et al., 2003, Wagner et al., 2006). Tras 6 días de tratamiento, los ratones tratados con 5-FU 0.2mg/kg (n=6) presentaban un volumen tumoral significativamente menor que los ratones controles tratados con suero salino (n=7), que era aún más acusado en el tratamiento combinado con nebivolol 10mg/kg y 5-FU 0.2 mg/kg (n=7) (Figura 46A). El estudio estadístico de supervivencia Kaplan-Meier reveló un aumento significativo de la supervivencia en los ratones tratados con 5-FU y los de los ratones que recibieron el tratamiento combinado en comparación con los ratones control (Figura 46B). Es más, el tratamiento combinado resultó en una supervivencia significativamente mayor de los ratones que recibieron el tratamiento convencional con 5-FU (Figura 46C), sugiriendo fuertemente que el nebivolol puede ser utilizado como una terapia prometedora para el tratamiento del cáncer de colon.

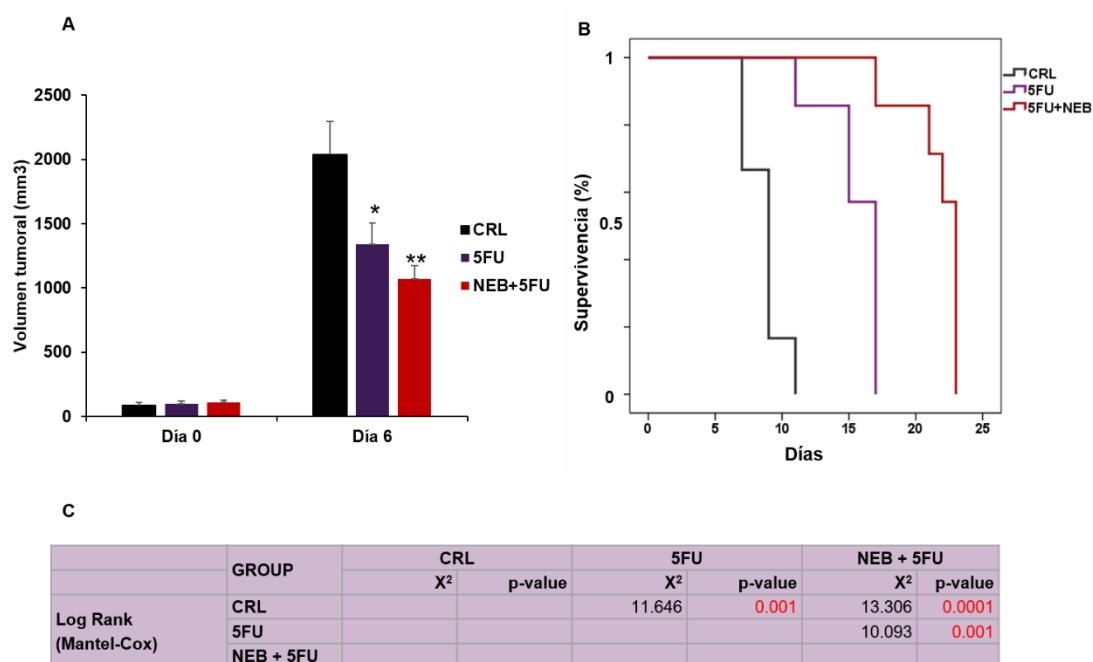


Figura 46. El tratamiento combinado de 5-fluouracilo y nebivolol aumenta la supervivencia en ratones *xenograft* inyectados con células HCT116-luc. Se muestran los resultados en ratones control (CRL, barras y línea negra; n=7), tratados con 5-fluouracilo (5-FU, barras y línea morada; n=6) y tratados con 5-fluouracilo + nebivolol (5-FU + NEB, barras y línea roja; n=7) **A.** Medida del volumen tumoral el día del comienzo del tratamiento y tras 6 días de tratamiento. Los histogramas representan la cuantificación como media \pm SEM de todos los animales. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ cuando se compara respecto al control por el test de t de Student. **B.** Análisis estadístico de supervivencia Kaplan-Meier. **C.** Se muestra el valor del estadístico X^2 y el p-valor del test log-rank.

4.3.8. El nebivolol retrasa el crecimiento tumoral del cáncer de mama *in vivo*.

Con objeto de comprobar el efecto de la inhibición de la OXPHOS mediada por el nebivolol en un modelo de cáncer de mama *in vivo*, inoculamos ratones inmunodeprimidos con células MDA-MB-231. Tras 6 días de tratamiento, los ratones tratados con nebivolol (n=5) en una dosis de 10 mg/kg presentaban un menor crecimiento tumoral, medido por el calibre del tumor en comparación con los ratones control (n=5) tratados con suero salino (Figura 48A). El tamoxifeno constituye un tratamiento convencional en el cáncer de mama; sin embargo, sólo el 6% de los tumores de cáncer de mama triple negativo son sensibles a esta terapia (Dowsett et al., 2010). Tanto los ratones tratados con tamoxifeno 0.8 mg/kg (n=5) como los tratados con el tratamiento combinado de tamoxifeno y nebivolol presentaron un volumen significativamente menor en comparación con los ratones control (Figura 47A). El análisis estadístico de supervivencia Kaplan-Meier demostró que el tratamiento con nebivolol, el tratamiento con tamoxifeno y el tratamiento combinado, aumentaban significativamente la supervivencia de los

Resultados

ratones en comparación con los ratones control (Figura 47B). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Figura 47C), quizás debido a una cantidad insuficiente de animales en el ensayo. Estos resultados demuestran que el nebivolol no sólo presenta resultados prometedores en la terapia de cáncer de colon, sino que también podría utilizarse en el tratamiento del cáncer de mama.

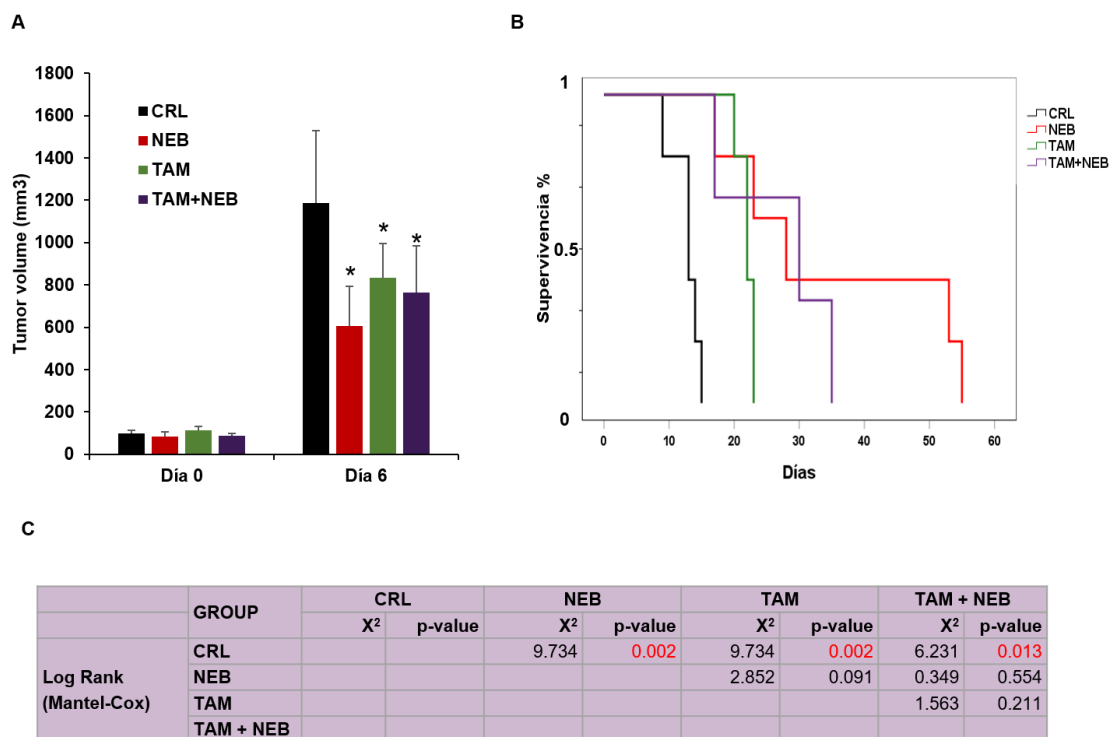


Figura 47. El nebivolol delecera el crecimiento tumoral *in vivo* en ratones *xenograft* inyectados con células MDA-MB-231. Se muestran los resultados de los ratones control tratados con suero salino (CRL; barras y línea negras; n=5) y tratados con nebivolol (NEB; barras y línea rojas; n=5), tamoxifeno (TAM; barras y línea verdes; n=5) y con tamoxifeno + nebivolol (TAM + NEB; barras y línea moradas; n=5). **A.** Medida del volumen tumoral el día del comienzo del tratamiento y tras 6 días de tratamiento. Los histogramas representan la cuantificación como media \pm SEM de todos los animales. * $p < 0.05$ cuando se compara respecto al control por el test de t de Student. **B.** Análisis estadístico de supervivencia Kaplan-Meier. **C.** Se muestra el valor del estadístico X² y el p-valor del test log-rank.

Al igual que en el caso de los carcinomas de colon encontramos que el tratamiento de los ratones con nebivolol producía un aumento significativo de células positivas para el marcador de apoptosis caspasa-3 (Figura 48A) y una disminución significativa de la proliferación de células Ki67 positivas (Figura 48B). Comprobamos que, en coherencia con el modelo de colon, los tumores de los ratones tratados con nebivolol presentaban una sobreexpresión de IF1 (Figura 48C) y tenían una cantidad significativamente menor de ATP (Figura 48D). Por lo tanto, podemos concluir que el tratamiento con nebivolol desencadena una crisis metabólica en las células de cáncer de mama *in vivo* que explica

la menor velocidad de crecimiento tumoral y contribuye a alargar la supervivencia de los ratones tratados.

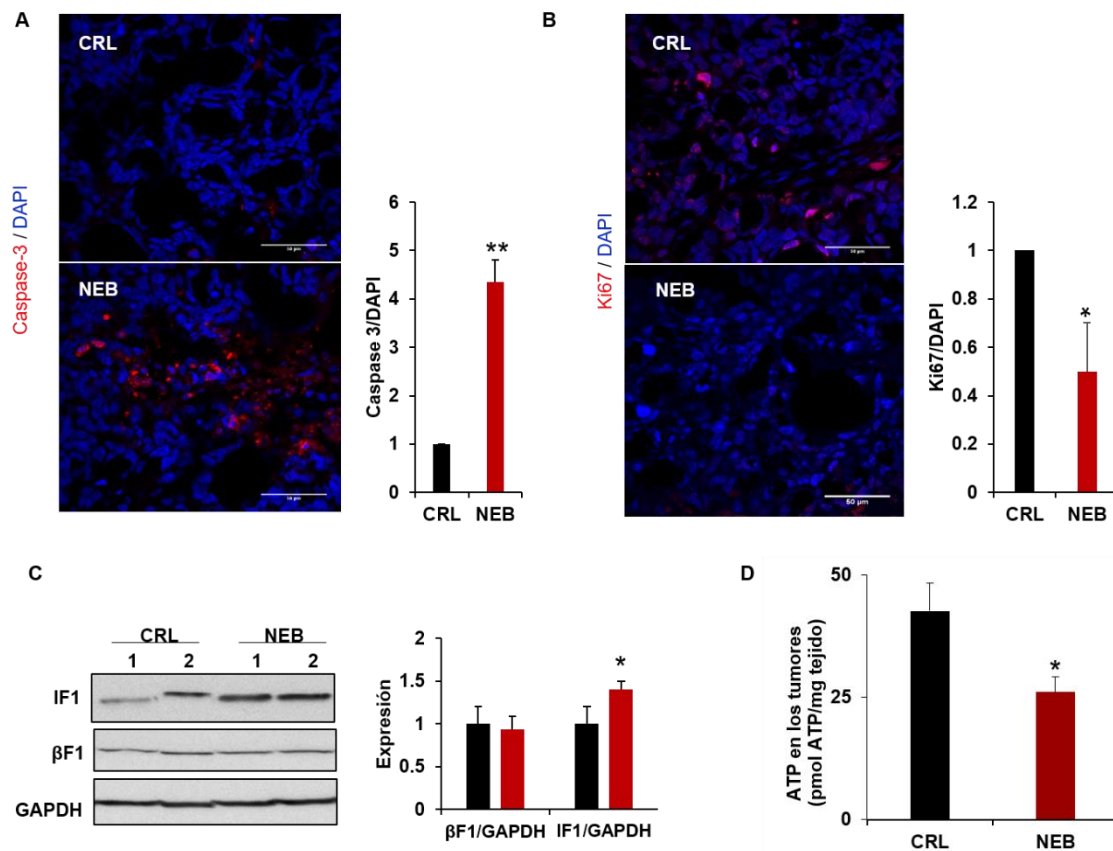


Figura 48. El nebivolol promueve una crisis metabólica causando la disminución de la proliferación y aumentando la apoptosis Se muestran los tumores de ratones control (CRL) y tratados con nebivolol (NEB). **A.** Inmunofluorescencia de caspasa 3 activa (rojo) y DAPI (nucleos, azul). Magnificación 60x. Los histogramas muestran la cuantificación de la intensidad de fluorescencia calculada como razón de caspasa3 activada/ DAPI en cortes de tumor. **B.** Inmunofluorescencia de Ki67 (rojo) y DAPI (nucleos, azul). Magnificación 60x. Los histogramas muestran la cuantificación de la intensidad de fluorescencia calculada como razón de Ki67/ DAPI en cortes de tumor. **C.** Western blot de la expresión de IF1, β F1-ATPasa y GAPDH. **D.** Contenido total de ATP en los tumores. **A-D.** Se representa la media \pm SEM de 5 animales por grupo. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ cuando se compara respecto al control por el test de t de Student.

5. DISCUSIÓN

5.1. Regulación de la actividad de IF1.

Desde que en el laboratorio fue demostrado por primera vez que IF1 podía inhibir la actividad sintética de la ATP sintasa (Sanchez-Cenizo et al., 2010, Formentini et al., 2012), hemos querido esclarecer el mecanismo regulatorio que determina esta inhibición. Hasta ese momento, la hipótesis más aceptada era que IF1 se unía al interfaz α - β del dominio catalítico de la ATP sintasa (Gledhill et al., 2007) mediante un cambio conformacional hacia una α -hélice en el extremo N-terminal (Bason et al., 2014) bloqueando la rotación de la ATP sintasa únicamente en la dirección reversa, es decir, de hidrólisis de ATP (Suzuki et al., 2014). Sin embargo, estos datos se basaban exclusivamente en estudios *in vitro*. De hecho, existen otras evidencias que describen que IF1 inhibe la translocación de protones a través de la ATP sintasa en sentido hidrolítico y sintético (Zanotti et al., 2009) y, en los últimos años, integrando estudios en células e *in vivo*, hemos demostrado que la unión de IF1 a la ATP sintasa no sólo bloquea la actividad hidrolítica (Walker, 2013, Campanella et al., 2008), sino que también bloquea la sintética (Sanchez-Cenizo et al., 2010, Formentini et al., 2012, Garcia-Bermudez et al., 2015). Uno de los objetivos de esta tesis doctoral ha sido contribuir a elucidar cuáles son los mecanismo de regulación de IF1.

Estudios previos han descrito la fosforilación de la S39 y la S63 del IF1 humano (Christensen et al., 2010, Sharma et al., 2014, Zhao et al., 2011, Zhou et al., 2013), que corresponden a la S14 y S38 de la proteína madura humana, respectivamente. De acuerdo con estos resultados y complementando el trabajo presentado en (Garcia-Bermudez et al., 2015), hemos demostrado mediante ensayos de BN-PAGE 1D y 2D que la defosforilación en el residuo S39 de IF1 permite su unión a la ATP sintasa e inhibición de la actividad enzimática. Estudiando la migración de IF1 en electroforesis 2D-SDS, hemos demostrado en células HCT116 que no toda la cantidad de la proteína IF1 se encuentra en estado defosforilado. En particular, una fracción de un 15% se encuentra fosforilada. Por lo tanto, proponemos que, ante diferentes situaciones metabólicas de la célula, IF1 es fosforilado para facilitar la síntesis de ATP (Garcia-Bermudez et al., 2015). En otras palabras, en la mitocondria hay una fracción de ATP sintasa activa y otra inactiva mediada por la unión de la cantidad de IF1 que se encuentra defosforilado.

IF1 es una proteína intrínsecamente desordenada (Gordon-Smith et al., 2001) y dado que la fosforilación es un fenómeno que puede cambiar la conformación de una proteína de estas características (Bah et al., 2014), proponemos que la fosforilación de S39 de IF1 sea la señal que promueva el cambio conformacional de su extremo N-terminal impidiendo su unión con la ATP sintasa (Garcia-Bermudez et al., 2015). Otra posibilidad es que el impedimento estérico y/o las repulsiones electrostáticas de la S39 fosforilada puedan impedir la unión de IF1 al interfaz α - β del dominio catalítico de la ATP sintasa (Gledhill et al., 2007, Garcia-Bermudez et al., 2015). En cualquier caso, la fosforilación de la S39 de IF1 supone un mecanismo regulatorio de la actividad de la proteína además de la ya descrita inhibición por pH (Cabezón et al., 2000, Cabezón et al., 2001) y de otras uniones descritas como la interacción con la subunidad OSCP (Zanotti et al., 2004) o con una pequeña proteína de la membrana mitocondrial interna no identificada (Lopez-Mediavilla et al., 1993) que obstaculizan su actividad inhibitoria (Figura 49). El estudio de las implicaciones biológicas de otras modificaciones covalentes descritas en IF1, como acetilaciones (Rardin et al., 2013, Sol et al., 2012), succinilaciones (Lundby et al., 2012) y glicosilaciones (Kurbasic et al., 2015) será necesario para dilucidar su implicación en la regulación de la actividad (Garcia-Bermudez and Cuezva, 2016) (Figura 49).

En el estudio de la fosforilación de IF1, la implicación de la actividad de una PKA mitocondrial (Figura 49) se demostró ensayando la actividad de la ATP sintasa en presencia de inhibidores y activadores de la vía PKA observando, por ejemplo, que el tratamiento con el inhibidor H89 disminuía significativamente la actividad de la ATP sintasa en células HCT116 (Garcia-Bermudez et al., 2015). A pesar de que diversos estudios describen esta PKA y su actividad en mitocondria (Papa et al., 1999, Sardanelli et al., 1996, Sardanelli et al., 1995, Technikova-Dobrova et al., 1994, Pagliarini and Dixon, 2006), la relevancia fisiológica, sustratos mitocondriales y el sitio de acción de PKA son motivo de debate (Di Benedetto et al., 2013, Valsecchi et al., 2013). En esta tesis doctoral, hemos ahondado en la implicación de la PKA demostrando que su inhibición promueve la co-migración de IF1 junto a la ATP sintasa en electroforesis nativa BN-PAGE mientras que su activación impide esta co-migración. Esto apoya y complementa los datos de co-inmunoprecipitación y actividad presentes en (Garcia-Bermudez et al., 2015), concluyendo que la fosforilación de IF1 mediada por una PKA mitocondrial regula la unión de IF1 a la ATP sintasa. Desgraciadamente, no hemos podido

demostrar la fosforilación *in vitro* de IF1 por PKA (Tesis de Javier García Bermúdez, UAM, 2015).

Otros estudios relacionan la actividad de esta PKA mitocondrial con la regulación de diferentes funciones mitocondriales como la apoptosis (Danial et al., 2003, Dohi et al., 2007, Harada et al., 1999), mitofagia (Dagda et al., 2011, Gomes et al., 2011b), procesos de fisión y fusión mitocondrial (Hu et al., 2017, Cribbs and Strack, 2007, Dickey and Strack, 2011) y metabolismo (Danial et al., 2003, Dyson et al., 2009) apoyando su papel central en la regulación de la actividad mitocondrial. Además, en nuestras manos, la activación de PKA con db-cAMP promueve un aumento significativo en la respiración mitocondrial de células adheridas en placa, mientras que la inhibición con H89 causa una disminución significativa de la función de la ETC. Estos resultados concuerdan con otros estudios que relacionan directamente la actividad de PKA con una mejora en la función de OXPHOS por fosforilación de proteínas mitocondriales de la ETC como son la subunidad NDUSF4 del complejo I (Papa et al., 2008) y las subunidades del complejo IV COXII (Bender and Kadenbach, 2000) y COXIV-1 (Acin-Perez et al., 2011) regulando así la capacidad de síntesis de ATP (Di Benedetto et al., 2013).

En una búsqueda de nuevas quinasas implicadas en la fosforilación de IF1 por su efecto sobre la actividad respiratoria hemos seleccionado una serie de inhibidores de quinasas que inhiben significativamente la respiración mitocondrial. Entre estos inhibidores encontramos que los fármacos antitumorales regorafenib, sorafenib y dabrafenib inhiben significativamente la respiración mitocondrial, aunque su efecto sobre la respiración tenía lugar sin modificar el estado de fosforilación de IF1. Estudios recientes revelan que la actividad anticancerígena de estos fármacos reside en su toxicidad mitocondrial (Weng et al., 2015, Paech et al., 2018), lo cual explica la inhibición mitocondrial observada en nuestros ensayos de Seahorse en células de cáncer de colon. En particular, se ha descrito en hepatocitos primarios que el regorafenib desacopla la OXPHOS, provocando una caída en el $\Delta\psi_m$ y una inhibición significativa del ATP celular que concluye con la apertura del PTP y la necrosis celular (Weng et al., 2015). En células de hepatocarcinoma HepG2 el regorafenib y el sorafenib inhiben la actividad de los complejos mitocondriales causando una producción de ROS que termina activando programas de apoptosis y/o necrosis dependiendo de la disponibilidad de ATP celular (Paech et al., 2018). Sin embargo, no encontramos evidencias en otros estudios que relacionen el dabrafenib con una inhibición en la respiración mitocondrial, aunque sí hay

estudios que utilizan el dabrafenib en combinación con inhibidores de la respiración mitocondrial como la metformina para potenciar su efecto anticancerígeno y mejorar la supervivencia de pacientes de melanoma que cursan con metástasis (Livingstone et al., 2015).

Por otra parte, el inhibidor de la PKC Go6976, inhibe significativamente la respiración mitocondrial sin modificar el estado de fosforilación de IF1 a pesar de que en un ensayo *in silico* se determinó que los residuos serina de IF1 serían susceptibles de ser fosforilados por PKC (Tesis Javier García Bermúdez, UAM 2015). La PKC ha sido localizada en mitocondria y se relaciona directamente con el PTP (Ping et al., 2002) o con canales de K^+ dependientes de ATP en corazón (Jaburek et al., 2006). Entre sus sustratos se encuentra COX IV (Ogbi and Johnson, 2006) cuya fosforilación activa significativamente su actividad (Ogbi and Johnson, 2006), lo cual explicaría por qué la inhibición de la quinasa resulta en una inhibición significativa de la respiración mitocondrial.

Finalmente, hemos demostrado que el inhibidor de la quinasa SGK-1, GSK650394, inhibe significativamente la respiración mitocondrial y promueve la defosforilación de la fracción fosforilada de IF1, al igual que sucede con el silenciamiento de la quinasa (Figura 49). De hecho, hemos comprobado en ensayos en células HCT116 permeabilizadas que la inhibición de SGK-1 causa una inhibición significativa en la producción de ATP mitocondrial que corresponden con una situación de defosforilación y activación de IF1 (Garcia-Bermudez et al., 2015). Estudios previos sugerían a IF1 como un interactor de la quinasa SGK-1 (O'Keeffe et al., 2013). Esta interacción tendría lugar a pH neutro con la región catalítica de SGK-1 constituida por la región de aminoácidos 122-176 (O'Keeffe et al., 2013). Cabe destacar que SGK-1 es una serina/treonina quinasa que pertenece a la familia de las quinasas AGC siendo inducida por estímulos externos como suero y glucocorticoides y teniendo un 50% de similitud en su secuencia de aminoácidos con quinasas dependientes de cAMP (Webster et al., 1993). Además, su activación se debe también a hormonas y citoquinas como hormonas mineralocorticoides (Sun et al., 2016), insulina (Mansley et al., 2016), vasopresina y factores de crecimiento (Arteaga and Canessa, 2005). Se ha demostrado que SGK-1 también se activa mediante señales de Ca^{2+} siendo necesaria su activación para el mantenimiento de la función mitocondrial (Brickley et al., 2013). Estos resultados resultan congruentes con nuestras observaciones previas en las que la fosforilación de IF1 depende de una sAC mitocondrial

que puede ser activada por Ca^{2+} (Di Benedetto et al., 2013), en respuesta a situaciones metabólicas (García-Bermudez and Cuezva, 2016).

Al igual que IF1 (Sanchez-Arago et al., 2012), SGK-1 se caracteriza por ser una proteína con una vida media muy corta de unos 28 minutos ya que tiene un recambio muy rápido siendo ubiquitinada y degradada por el proteasoma (Brickley et al., 2002). Por otra parte, mediante inmunofluorescencia en células HCT116 hemos determinado que una parte de la proteína total de la célula colocaliza con el marcador mitocondrial Hsp60 y, por lo tanto, sugerimos una localización mitocondrial para esta quinasa. En consonancia, estudios previos han descrito SGK-1 en el interior de la mitocondria y, en particular, que la región de aminoácidos 17-32 tiene como función que SGK-1 pueda anclarse a la OM. Otros estudios de fraccionamiento subcelular han determinado que SGK-1 se encuentra predominantemente en la mitocondria (Engelsberg et al., 2006) reforzando nuestra hipótesis. Por otra parte, hemos comprobado que la expresión de SGK-1, como ocurre con IF1 es específica de tejido (Esparza-Moltó and Cuezva, 2018). De hecho, esta quinasa se caracteriza por tener diversas funciones en diferentes células y órganos (Waldegger et al., 1997).

SGK-1 se encuentra sobreexpresada en tejidos tumorales como es el caso del cáncer de colon (Liang et al., 2017) o pulmón (Tang et al., 2017). Se ha demostrado que la inhibición de SGK-1 en cáncer de colon inhibe la proliferación y crecimiento tumoral (Liang et al., 2017). Por el contrario, se ha descrito recientemente que la sobreexpresión SGK-1 es un marcador de buena prognosis en cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) (Tang et al., 2017). Sin embargo, esta sobreexpresión no es común a todos los tipos de cáncer ya que no ocurre en cáncer de próstata (Rauhala et al., 2005), ovario (Chu et al., 2002), hígado (Nasir et al., 2009) y tumores de glándulas adrenales (Ronchi et al., 2012), por lo que su papel específico de tejido y, en particular su intervención en cáncer, resulta aún un tema controvertido, al igual que sucede con IF1 (Esparza-Molto et al., 2019, Sanchez-Arago et al., 2013b).

En conjunto, estos estudios sugieren que IF1 pueda ser rápidamente fosforilado por SKG-1 en la mitocondria ante un estímulo de necesidad de producción de ATP mitocondrial. A pesar de haber demostrado la defosforilación de IF1 en ausencia o inhibición de la quinasa, futuros ensayos de fosforilación *in vitro* e *in vivo* serán necesarios para determinar el papel de SGK-1 sobre IF1 (Figura 49). En este contexto, cabe sugerir también que la defosforilación de IF1, y por lo tanto la activación de su

función inhibitoria, puede ser fruto de la actividad de una fosfatasa mitocondrial aún no identificada. Sin embargo, el hecho de que IF1 sea una proteína de vida media muy corta (~ 2 h) (Sanchez-Arago et al., 2013c) también deja abierta la posibilidad de que la alta tasa de renovación proteica reestablezca el potencial inhibitorio de IF1 sobre la ATP sintasa (Figura 49).

5.2. Regulación de la expresión de IF1.

Para poder comprender el papel de una proteína en patología es necesario caracterizar el mecanismo regulatorio no solo de su actividad sino de su expresión. A pesar de que estudios previos sugerían que IF1 se expresa de manera ubicua (Faccenda et al., 2017), en el laboratorio hemos demostrado que IF1 se caracteriza por tener una expresión específica de tejido (Esparza-Molto et al., 2019). En este trabajo de tesis doctoral hemos intentado comprender la regulación de la expresión de IF1 en función de las necesidades que requiere cada tejido. En particular, hemos observado que, en corazón de ratón, IF1 se expresa de manera prácticamente indetectable mientras que sí se expresa su mRNA (Esparza-Molto et al., 2019) por lo que debe existir un mecanismo de control traduccional que reprima la traducción del mRNA de IF1 en corazón. En este contexto, destaca la proteína de unión a RNA LRPPRC (o LRP130) ya que en el laboratorio hemos comprobado que existe una interacción directa de LRPPRC con el mRNA de IF1 (Tesis doctoral Javier García-Bermúdez, UAM 2015). Esta proteína está altamente conservada en metazoos y posee una secuencia de localización mitocondrial (Sterky et al., 2010). Su funcionalidad se puso de manifiesto con el descubrimiento de que mutaciones en el gen LRPPRC causan la variante Franco-Canadiense del síndrome de Leigh, un desorden metabólico caracterizado por la pérdida de subunidades y actividad del CIV mitocondrial (Mootha et al., 2003b). Posteriormente, se ha confirmado la importancia de LRPPRC en la regulación de la expresión de prácticamente todos los mRNAs codificados por el mtDNA (Gohil et al., 2010) sin afectar a la tasa de transcripción en la mitocondria (Harmel et al., 2013).

Estudios *in vivo* en un modelo de ratón de ausencia de LRPPRC en hígado han desvelado su importancia en múltiples funciones mitocondriales más allá de OXPHOS, encontrando anormalidades en la ultraestructura mitocondrial, inhibición en el metabolismo lipídico y desregulaciones del PTP y la producción de ROS (Cuillerier et al., 2017). Mientras que, en un modelo de ratón condicional en corazón que no expresa

LRPPRC se ha demostrado una clara acumulación de IF1 en corazón sin cambios en los niveles de mRNA que cursan con una deficiencia de ensamblaje de la ATP sintasa (Mourier et al., 2014). En este contexto, y en consonancia con nuestras observaciones, hemos demostrado que el silenciamiento de LRPPRC en cardiomiocitos HL-1 y células HEK293T causa una acumulación de IF1 que conlleva a una inhibición significativa de la actividad sintética de la ATP sintasa sin encontrar cambios en la expresión de otras subunidades de la enzima. Por contra, la sobreexpresión de LRPPRC en estos modelos celulares da lugar a una pérdida de expresión de IF1 que resulta en una mayor actividad sintética de la ATP sintasa. Estos resultados concuerdan con las observaciones en el ratón condicional de corazón en el cual el aumento de la expresión de IF1 mediante LRPPRC resulta letal por causar una cardiomiopatía debido a la inhibición en la formación de oligómeros de la ATP sintasa promovidos por IF1 (Mourier et al., 2014). En consonancia con estas observaciones, se ha demostrado que ratones que no expresan IF1 en corazón están protegidos frente al aumento de presión sanguínea al inducir una hipertrofia cardíaca (Yang et al., 2017). Además, el nivel en plasma de IF1 se ha demostrado como marcador de riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular (Genoux et al., 2016). Con toda esta información podemos concluir que LRPPRC se une directamente al mRNA de IF1 regulando negativamente su traducción (Figura 49). Este mecanismo se suma a observaciones previas de regulación del mRNA de IF1 en las que se ha demostrado que el microRNA miR-24-3p se une al 3'UTR del mRNA de IF1 inhibiendo su traducción (Tesis Doctoral Javier García Bermúdez, UAM 2015) (Figura 49).

Cabe destacar que la expresión de IF1 no siempre está relacionada con cambios significativos en la cantidad de su mRNA (Sanchez-Arago et al., 2013b), por lo que modificaciones post-traduccionales de IF1 podrían jugar un papel en el recambio y la vida media de la proteína. De hecho, se ha demostrado que IF1 defosforilado y unido a la ATP sintasa aumenta su vida media de 2 h (Sanchez-Arago et al., 2013b) a unas 15 h (Tesis Javier García Bermúdez, UAM 2015). Por lo tanto, el estado de fosforilación podría regular directamente la expresión de la proteína, que unida a la ATP sintasa, retrasaría su degradación. En cáncer de mama también se han descrito otras modificaciones como la glicosilación (Kurbasic et al., 2015). Sin embargo, la implicación de estas modificaciones en la estabilidad de la proteína no ha sido investigada hasta el momento. Estudios futuros serán necesarios para terminar de dilucidar las implicaciones de las diferentes modificaciones post-traduccionales de IF1.

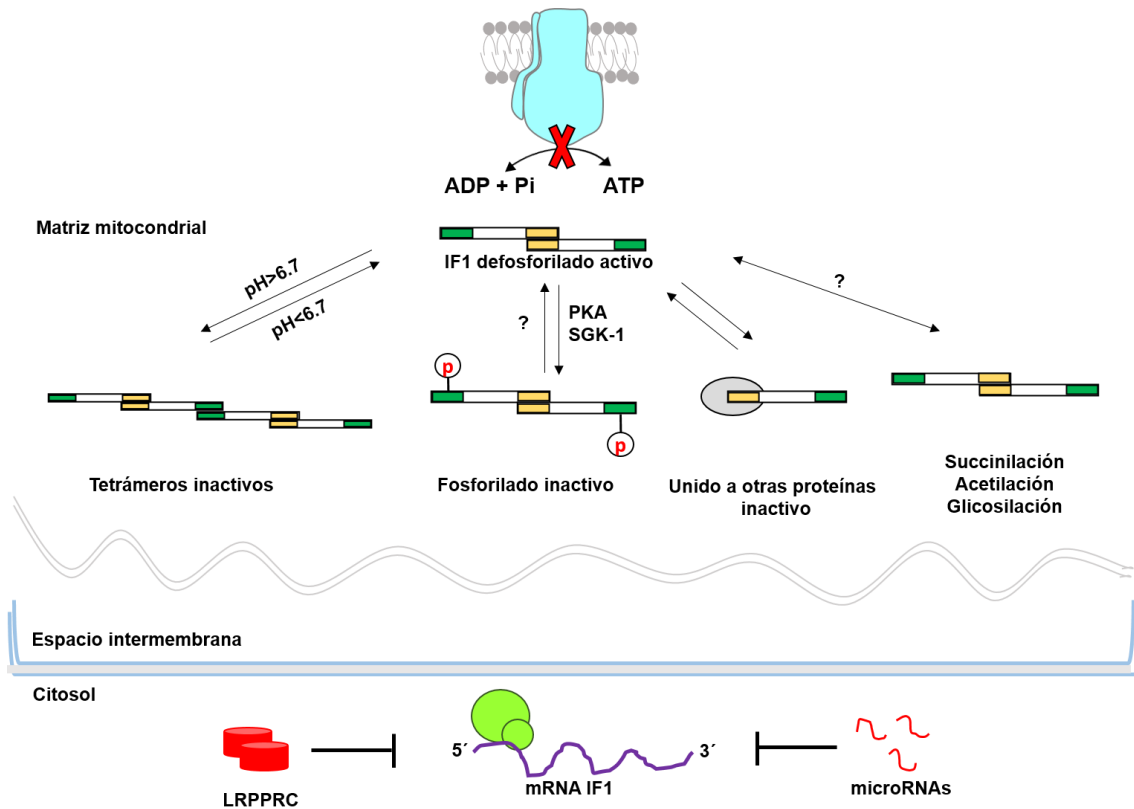


Figura 49. Regulación de IF1. La traducción del mRNA de IF1 se regula por proteínas de unión al mRNA como LRPPRC y microRNAs. Post-traduccionalmente, IF1 puede ser inhibido por oligomerización a $\text{pH} > 6.7$, por fosforilación en S39 por una PKA mitocondrial y por SGK-1 o siendo secuestrado por una proteína de membrana mitocondrial. IF1 también es sustrato de acetilaciones, glicosilaciones y succinilaciones a pesar de que las consecuencias fisiológicas de estas modificaciones no han sido descritas. La regulación de IF1 determina la población de ATP sintasa activa e inactiva.

5.3. Inhibición de la actividad mitocondrial como diana en el tratamiento del cáncer.

El cáncer constituye un gran problema de salud en todo el mundo (Torre et al., 2015). En particular, el cáncer de colon (CRC) es la tercera causa de muerte por cáncer independientemente del sexo de los pacientes (Torre et al., 2015, Cunningham et al., 2010); mientras que, el cáncer de mama supone la primera causa de muerte por cáncer en mujeres (Torre et al., 2015, Harbeck and Gnant, 2017). A pesar de que existen tratamientos establecidos para la terapia de ambos tipos de cáncer, la obtención de nuevas terapias resulta de vital importancia para minimizar el impacto social y económico de estas enfermedades (Torre et al., 2015, Harbeck and Gnant, 2017, Cunningham et al., 2010, Gellad and Provenzale, 2010).

La regulación de la actividad y expresión de IF1 resulta de gran importancia en patología como es en el caso del cáncer. En esta tesis doctoral, hemos ahondado en el hecho de que la sobreexpresión de IF1 en pacientes de cáncer de mama correlaciona directamente con una mejor tasa de supervivencia, en especial de los carcinomas receptor hormonal triple negativo (Sanchez-Arago et al., 2013b, Garcia-Ledo et al., 2017). Los carcinomas de mama de tipo triple negativo se caracterizan por que carecen de receptores de estrógenos, progesterona y del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2) (Foulkes et al., 2010). Este tipo de tumores representa entre el 15-20% de los tumores en mujeres con cáncer de mama (Foulkes et al., 2010). Normalmente cuentan con un mal pronóstico ya que no responden a terapias hormonales ni a HER2 (Foulkes et al., 2010). En principio, la correlación de una alta expresión de IF1 con una mejor supervivencia resultaba contraria a lo esperado ya que, como hemos demostrado, la sobreexpresión de IF1 lidera una reprogramación metabólica hacia un mayor flujo glucolítico inhibiendo la OXPHOS, fenotipo clásico de células proliferativas e invasivas (Formentini et al., 2012, Sanchez-Arago et al., 2013a, Kondoh et al., 2007). Además, en los últimos años se ha demostrado que la alta expresión de IF1 es un marcador de mala prognosis en hepatocarcinoma (Song et al., 2014b), cáncer de pulmón (Gao et al., 2016), vejiga (Wei et al., 2015), estómago (Yin et al., 2015) y gliomas (Wu et al., 2015). De hecho, en el laboratorio hemos desarrollado un modelo de hepatocarcinogénesis en ratones transgénicos que sobreexpresan IF1 humano en hígado comprobando que la sobreexpresión favorece la formación de tumores en mayor número y tamaño (Santacatterina et al., 2016).

Numerosos estudios se han centrado en la inhibición de la OXPHOS en la terapia del cáncer en los últimos años (Weinberg et al., 2010, Fogal et al., 2010, Guo et al., 2011). Tras elaborar una línea celular de cáncer de mama triple negativo que sobreexpresa IF1 (BT549-IF1), comprobamos que estas células presentaban una menor capacidad de OXPHOS y un aumento en el flujo glucolítico, así como un aumento significativo en la producción basal de ROS en comparación con las células control (Garcia-Ledo et al., 2017). Sin embargo, y a diferencia de los modelos previamente descritos, esta reprogramación metabólica lidera una respuesta menos invasiva y con menor capacidad migratoria (Garcia-Ledo et al., 2017) que atribuimos a la especificidad de IF1 en la respuesta tisular (Sanchez-Arago et al., 2013b, Esparza-Molto et al., 2019). Estudios de transcriptómica que se encuentran recogidos en (Garcia-Ledo et al., 2017) demuestran

que las células que sobreexpresan IF1 tienen sobreexpresados genes relacionados con la represión de la destrucción de la matriz extracelular (ECM) y de su mantenimiento (Garcia-Ledo et al., 2017). En particular, miembros de la familia Serpin B están sobreexpresados en las células BT549-IF1 estando estos directamente relacionados con la inhibición de la migración y capacidad de invasión en cáncer de mama (Chou et al., 2012). Por el contrario, su baja expresión está relacionada con la agresividad que presentan los carcinomas de células escamosas (Papagerakis et al., 2014, Shiiba et al., 2010). Por otra parte, la expresión del mRNA de ACTA2, POSTN y VCAN se encuentra drásticamente disminuida en células que sobreexpresan IF1 en comparación con las células control (Garcia-Ledo et al., 2017). Las proteínas codificadas por estos genes están directamente relacionadas con un incremento en la movilidad e invasión celular (Jeon et al., 2016, Gillan et al., 2002, Du et al., 2012). En este contexto, encontramos una sobreexpresión significativa de la cadherina-E en comparación con las células BT549 control. La pérdida de cadherina-E es un marcador de la EMT (Thiery, 2002, Cano et al., 2012) y puede ser el origen de la pérdida de las uniones estrechas y desmosomas durante el fenómeno de EMT (Kalluri and Weinberg, 2009). Además, la cadherina-E es un elemento fundamental en la polaridad ápico-basal de las células epiteliales (Perez-Moreno et al., 2003). Por lo tanto, la recuperación de la cadherina-E en las células que sobreexpresan IF1 en comparación con las células BT549 control podría explicar la menor capacidad metastática de estas (Sarrío et al., 2009). En líneas generales, nuestros resultados están en consonancia con la idea de que las células metastásicas de cáncer de mama son aquellas que presentan una menor expresión de IF1 (Garcia-Ledo et al., 2017). De hecho, se ha observado que la expresión de IF1 en células de nódulos linfáticos metastásicos está significativamente disminuida en comparación con la expresión de IF1 en tumores primarios (Kurbasic et al., 2015).

En conclusión, la inhibición de la ATP sintasa mediante la sobreexpresión de IF1 y la consecuente disminución en la producción de ATP en los carcinomas de mama de tipo triple negativo suponen una nueva diana terapéutica que ha de ser investigada con la finalidad de obtener nuevas terapias en pacientes. De hecho, recientemente se ha demostrado que la molécula ONC201 es capaz de matar células de cáncer de mama actuando directamente sobre la respiración mitocondrial y promoviendo una crisis en la producción de ATP que permite combatir este tipo de cáncer de manera muy similar a la que hipotetizamos con IF1 (Greer et al., 2018).

En este contexto, hemos realizado un cribado de 1018 fármacos aprobados por la FDA con el objetivo de encontrar moléculas que tenga como diana, hasta la fecha desconocida, la mitocondria. El reposicionamiento de fármacos es una estrategia basada en encontrar nuevas indicaciones y dianas terapéuticas para compuestos ya conocidos (Sleire et al., 2017). Esta estrategia presenta un alto potencial en clínica dado que los fármacos ya conocidos y aprobados por la FDA han sido introducidos y testados en la terapia para humanos con efectos secundarios conocidos y aceptables (Zhang et al., 2016). Es sabido que la mayoría de los tratamientos quimioterapéuticos tradicionales en la terapia del cáncer cursan con numerosos efectos secundarios que hacen disminuir la calidad de vida de los pacientes de cáncer (Zhang et al., 2016). Es por esto que el uso de alternativas ya conocidas podría mejorar la calidad de vida de los pacientes bien en la sustitución de la quimioterapia tradicional o en la combinación de fármacos clásicos y nuevos que permitan disminuir los tiempos de tratamiento con resultados más efectivos (Zhang et al., 2016, Wang and Byers, 2013, Turanli et al., 2018a).

En este trabajo, identificamos 115 inhibidores de la OSR mitocondrial y 46 activadores de la misma. Los activadores de la OSR mitocondrial no son presentados en este trabajo, pero forman parte de otros estudios en los que buscamos mejorar la actividad mitocondrial para ser reposicionados en enfermedades raras que cursan con deficiencia mitocondrial como es el caso de Charcot-Marie-Tooth (CMT) (Braathen et al., 2011, Soldevilla et al., 2017).

Con el objetivo de encontrar posibles tratamientos en la terapia del cáncer, identificamos 15 inhibidores de todos los parámetros de la respiración mitocondrial. A pesar de la indudable importancia del flujo glucolítico en las células cancerígenas y su potencial como diana terapéutica en cáncer (Warburg, 1956, Cuezva et al., 2009, Vander Heiden et al., 2009, Cairns et al., 2011), estudios recientes han mostrado que el metabolismo mitocondrial es esencial para en el proceso de tumorigénesis (Weinberg et al., 2010, Fogal et al., 2010, Guo et al., 2011). Esta nueva aproximación en el tratamiento del cáncer comenzó en los años 90 cuando se demostró que las proteínas antiapoptóticas localizadas en mitocondria podían ser dianas muy efectivas en la terapia del cáncer (Fesik, 2005). Sin embargo, no ha sido hasta hoy cuando el metabolismo mitocondrial ha surgido de manera más convincente como diana para la terapia del cáncer, siendo considerada la mitocondria como un orgánulo central en el metabolismo requerido en el proceso de tumorigénesis. En consonancia, hemos demostrado que la sobreexpresión de IF1 en

cáncer, que causa la inhibición de la OXPHOS y la reprogramación metabólica a una activa glucólisis (Sanchez-Cenizo et al., 2010, Formentini et al., 2012), es un biomarcador de prognosis del cáncer (Sanchez-Arago et al., 2013b, Garcia-Ledo et al., 2017, Song et al., 2014b, Gao et al., 2016, Wei et al., 2015, Yin et al., 2015, Wu et al., 2015). En este contexto, distintos fármacos que tienen como diana la mitocondria se han sumado a los ya conocidos para el tratamiento del cáncer que tienen como diana el metabolismo glucolítico como la 2-desoxiglucosa (2DG) (Wick et al., 1957, Maschek et al., 2004), el 3-bromopiruvato (3BrP) y el yodoacetato (IA) (Sanchez-Arago and Cuezva, 2011). Entre ellos encontramos el MKT-077 que actúa sobre el potencial de membrana y reduce el metabolismo mitocondrial (Britten et al., 2000); el trióxido de arsénico, inhibidor del CIII que ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda (Lo-Coco et al., 2013) y la metformina o su análogo fenformina que inhiben el CI como se ha mencionado en el apartado de Introducción (Wheaton et al., 2014, Kordes et al., 2015).

De los 15 compuestos inhibidores de la respiración mitocondrial, hemos investigado el potencial del nebivolol como inhibidor del crecimiento y progresión tumoral del cáncer de mama y colon *in vivo*. El nebivolol es un β -bloqueante de tercera generación usado en el tratamiento de la hipertensión (Munzel and Gori, 2009). La elección de estudiar los efectos del nebivolol radica en que recientemente hemos demostrado que, en corazón de ratón, la cascada β -adrenérgica es la responsable de la fosforilación y de la inactivación de IF1 como regulador de la ATP sintasa (Garcia-Bermudez et al., 2015). Además, en los últimos años se ha demostrado que la activación de receptores β -adrenérgicos mediante catecolaminas promueven procesos de tumorigénesis. En este contexto, las catecolaminas provocan un aumento en la proliferación celular y en la angiogénesis (Yang et al., 2006, Thaker et al., 2006) y metástasis (Sloan et al., 2010). Si bien el nebivolol no tiene efecto sobre la proliferación de células de cáncer de colon y de mama en cultivo, sí encontramos diferencias significativas en el crecimiento de los tumores *in vivo*. Esto concuerda con otros estudios *in vivo* que describen cómo el bloqueo de los receptores β -adrenérgicos puede inducir una respuesta anti-proliferativa y anti-migratoria aumentando la supervivencia de ratones portadores de cáncer de páncreas (Partecke et al., 2016) y colon (Masur et al., 2001, Chin et al., 2016) tratados con propranolol. En concreto, observamos una menor proliferación celular en los tumores tratados con nebivolol en comparación con los tumores de los

ratones control. En la misma línea, un estudio clínico ha relacionado el tratamiento anti hipertensivo con β -bloqueantes con una mayor prevención en la progresión del cáncer de mama en mujeres (n=43) (Powe et al., 2010). En particular, se ha demostrado que el tratamiento con β -bloqueantes mejoraba la supervivencia sin recaída en mujeres que tenían carcinomas del tipo triple negativo (Melhem-Bertrandt et al., 2011). De hecho, un estudio en neuroblastoma ha demostrado que la combinación de los β -bloqueantes carvedilol, nebivolol y propranolol presentan propiedades anticancerígenas cuando se usan en combinación con quimioterapéuticos como la vincristina disminuyendo la progresión tumoral e inhibiendo la angiogénesis tumoral (Pasquier et al., 2013). En definitiva, sugerimos que estos resultados apoyan el reposicionamiento del nebivolol para el tratamiento en adyuvancia de distintas neoplasias.

Hemos demostrado que el nebivolol causa un rápido aumento en la expresión de IF1, lo que produce la inhibición de la ATP sintasa y, simultáneamente promueve la defosforilación del CI inhibiendo su actividad, causando así una crisis metabólica que retrasa el crecimiento de los tumores (Figura 50).

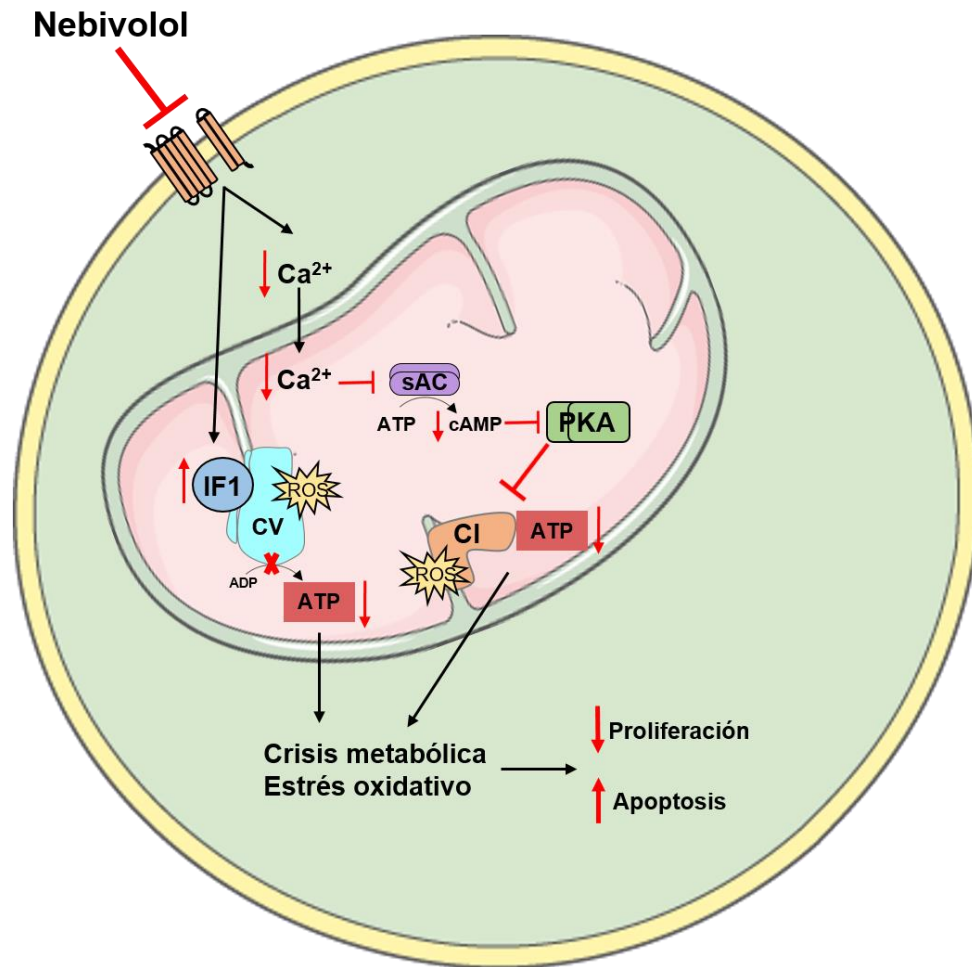


Figura 50. Propuesta del mecanismo de acción del nebivolol. El nebivolol bloquea los receptores β -adrenérgicos desde el exterior de la célula. Por una parte, esto inhibe la disponibilidad de Ca^{2+} celular y, por lo tanto, mitocondrial. La adenilato ciclasa soluble (sAC), cuya actividad es dependiente de Ca^{2+} ve reducida su actividad disminuyendo la producción de AMP cíclico (cAMP). Esto hace disminuir la actividad PKA en la mitocondria impidiendo fosforilar el CI e inhibiendo su actividad. Por otra parte, tiene lugar un estímulo que lleva a la acumulación/sobreexpresión de IF1 que inhibe la actividad sintética de la ATP sintasa (CV). En conjunto, esta inhibición da lugar a una crisis metabólica y de estrés oxidativo que, *in vivo*, inhibe la proliferación y aumenta la apoptosis en los tumores para, finalmente, aumentar la supervivencia de ratones portadores de tumores de cáncer de colon y mama.

Dado que el efecto anti-hipertensivo del nebivolol está directamente relacionado con una disminución en la disponibilidad de Ca^{2+} (Cseplo et al., 2016, Khan et al., 2013), proponemos que la falta de Ca^{2+} en las células tratadas con nebivolol cause una inhibición de la adenilato ciclasa soluble (sAC) dependiente de Ca^{2+} (Di Benedetto et al., 2013). De esta manera, una baja disponibilidad de cAMP mitocondrial inhibiría la actividad de PKA y otras quinasas dependientes de cAMP (Di Benedetto et al., 2013, Garcia-Bermudez and Cuezva, 2016) (Figura 50).

A pesar de no encontrar cambios en el estado de fosforilación de IF1, sí encontramos un aumento significativo de su expresión en células en cultivo e *in vivo* en respuesta al tratamiento con nebivolol. Como se ha comentado anteriormente, IF1 es una proteína con una vida media corta, de aproximadamente 2 h (Sanchez-Arago et al., 2013b); por ello, es posible que un estímulo de corta duración como el tratamiento de 3 h con nebivolol, pueda estimular la sobreexpresión/acumulación de IF1, ya sea por regulación de la transcripción del gen y/o por cambios en la estabilidad de la proteína.

Por otro lado, parte del efecto anticancerígeno del nebivolol es debido a su acción sobre la defosforilación del CI y a la consiguiente inhibición de la actividad de este complejo mitocondrial. Existe una relación directa entre la actividad del CI y el cáncer. Se ha descrito que mutaciones en genes nucleares que codifican subunidades de este complejo son causantes de diversas patologías como enfermedades neurodegenerativas (Rodenburg, 2016), diabetes (Elango et al., 2014) y cáncer (Iommarini et al., 2013, Kurelac et al., 2013). En este sentido, se ha descrito que mutaciones en genes del CI promueven la progresión tumoral en cáncer de próstata (Philly et al., 2016), tiroides (Evangelisti et al., 2015), mama (Yu et al., 2015), pulmón (Su et al., 2016), colon (Akouchekian et al., 2011) y riñón (Kim et al., 2016). Sin embargo, el papel que juegan la expresión y actividad del CI en cáncer presenta resultados controvertidos porque también existen estudios que demuestran que subunidades del CI actúan como supresores tumorales (Iommarini et al., 2014, Calabrese et al., 2013, Li et al., 2015).

Se ha descrito que la mitocondria y en particular el CI está directamente relacionado con la proliferación celular aportando aceptores de electrones y regenerando cofactores oxidados (Birsoy et al., 2015, Sullivan et al., 2015). La actividad del CI mantiene el pool del NAD⁺ celular, así como la razón NAD⁺/NADH necesarios para mantener la actividad de la malato deshidrogenasa y la generación de aspartato (Birsoy et al., 2015, Sullivan et al., 2015). De hecho, la inhibición del CI con metformina, rotenona o piericidina afecta la razón NAD⁺/NADH, produciendo una inhibición en los aceptores de electrones. Esto limita la síntesis de aspartato, precursor de la síntesis de purinas y pirimidinas (Ahn and Metallo, 2015), requerido para la biosíntesis de ácidos nucleicos y macromoléculas imprescindibles en el proceso de proliferación celular (Birsoy et al., 2015, Sullivan et al., 2015). De acuerdo con estos datos, hemos encontrado una disminución en la proliferación celular *in vivo* causada por el tratamiento con nebivolol que podría ser causada la inhibición de la actividad del CI.

Estudios previos han demostrado que la actividad de la PKA en mitocondria se encarga de promover el aumento de la eficiencia de la OXPHOS por fosforilación de proteínas mitocondriales de la CTE como son la subunidad NDUSF4 del complejo I (Papa et al., 2008) y las subunidades del complejo IV COXII (Bender and Kadenbach, 2000) y COXIV-1 (Acin-Perez et al., 2011), así como por fosforilación del inhibidor de la ATP sintasa (Garcia-Bermudez et al., 2015) regulando así la capacidad de síntesis de ATP (Di Benedetto et al., 2013, García-Bermúdez, 2016). En nuestro caso no encontramos diferencias en la expresión de subunidades de CI o de su ensamblaje y superensamblaje. Sin embargo, el neбиволол promueve la defosforilación del complejo I y la inhibición de su actividad. En particular, promueve en células de cáncer de colon la defosforilación de la S117 de la subunidad NDUFS7. Por ello, podemos atribuir la menor actividad del CI a su defosforilación (no necesariamente en S117), lo que resulta en una disminución general en la eficiencia de la OXPHOS. Esta inhibición genera crisis metabólica por falta de ATP que sería directamente responsable del aumento de la muerte celular en los carcinomas, de la disminución en su proliferación resultando en una mayor supervivencia de los ratones que han sido tratados con neбиволол (Figura 50).

A pesar de que encontramos pequeños cambios en la producción de ROS en células tratadas con neбиволол en cultivo, sí encontramos un aumento muy significativo en la modificación de proteínas por 4-HNE en los tumores de los ratones tratados con neбиволол, lo que sugiere la existencia de un estrés oxidativo en respuesta al tratamiento en los tumores in vivo. De hecho, se produce un aumento muy significativo de distintos marcadores de estrés oxidativo mitocondrial como son la SOD2, PRx3 y GR. No ocurre lo mismo con los marcadores citosólicos G6PDH, PRx6 y catalasa, lo que enfatiza el origen mitocondrial de la producción de ROS. Se ha descrito que tanto la inhibición del CI (Balaban et al., 2005), como la inhibición de la ATP sintasa mediada por IF1 (Formentini et al., 2012, Sanchez-Arago et al., 2013a) son responsables directos de la producción de ROS mitocondriales. Una hipótesis que podría explicar este fenómeno en nuestro modelo sería la existencia de transporte reverso de electrones (RET) (Scialo et al., 2017). De hecho, en este proceso se produce una caída en la actividad de CI, así como una menor respiración ligada al CI (Scialo et al., 2016) tal y como vemos en nuestro caso, en favor del CII que utiliza el pool de CoQ para continuar el transporte de electrones (Guaras et al., 2016). Si bien este fenómeno cursa con una degradación del CI (Guaras et al., 2016) y reorganización de la ETC (Lapiente-Brun et al., 2013), nosotros no

observamos este efecto en nuestro modelo celular, aunque no podemos descartar que esté teniendo lugar *in vivo* en el carcinoma tratado. Otros estudios sugieren que la inhibición en la producción de ATP por la ATP sintasa también es responsable del RET (Mills et al., 2016, Chin et al., 2014) en concordancia con nuestras observaciones al ver sobreexpresado IF1. Por lo tanto, aunque no podemos afirmar que este fenómeno esté teniendo lugar en nuestro modelo, intentaremos dilucidar su implicación en estudios futuros.

En los últimos años se han descubierto diferentes compuestos con estructuras diversas que inhiben la actividad del complejo I que no habían sido relacionadas hasta la fecha por su posible interacción con el mismo (Miyoshi et al., 1997). La Tabla 5 resume los compuestos aprobados por la FDA que inhiben la actividad del CI y presentan efectos anticancerígenos con un mecanismo de acción muy similar al descrito en esta Tesis doctoral. Los inhibidores clásicos del CI, y algunas moléculas nuevas como el AG311 (Bastian et al., 2017) (Figura 51A), se caracterizan por ser pequeñas moléculas que no poseen carga y son de estructura aromática, altamente hidrofóbicos, permitiendo una inhibición competitiva directa con el sitio de unión a la ubiquinona (Bridges et al., 2014, Urra et al., 2016). La metformina y otras biguanidinas suponen una nueva clase de inhibidores de CI caracterizados por ser relativamente hidrofílicos y estar cargados positivamente, produciendo una inhibición no competitiva del complejo por unirse a la región anfipática cercana a la subunidad ND3 en brazo que se embebe en la membrana mitocondrial (Bridges et al., 2014). En ambos casos, se ha descrito que estos pequeños compuestos pueden ser utilizados en la terapia del cáncer (Vatrinet et al., 2015, Xu et al., 2015). A pesar de no haber probado una interacción directa el nebivolol con el CI, suponemos que ésta pueda tener lugar ya que, como se observa de su estructura, el nebivolol es una molécula similar al AG311: pequeña, sin carga, de estructura aromática e hidrofóbica (Figura 51).

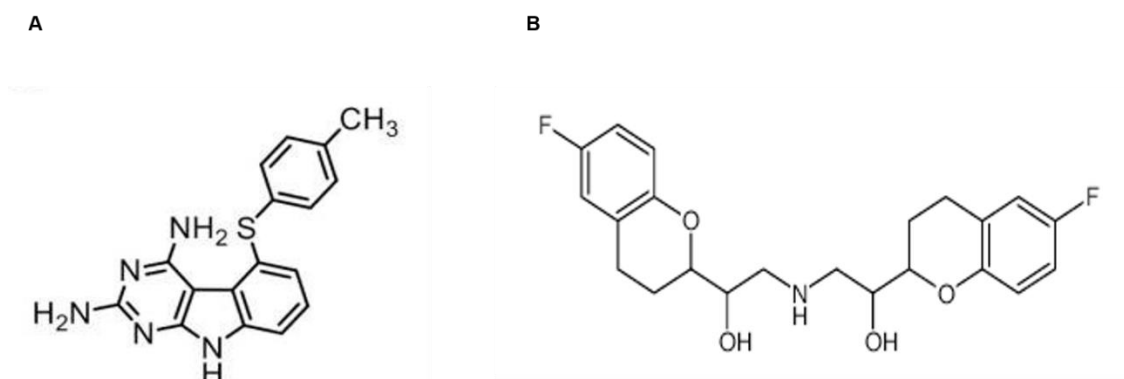


Figura 51. Estructura de las moléculas AG311 y nebivolol. El AG311 (A) y el nebivolol (B) son dos moléculas de pequeño tamaño, sin carga, de estructura aromática e hidrofóbicas. Imágenes tomadas de (Bastian et al., 2015) (A) y Pubchem (B).

El mecanismo de acción de inhibidores como el BAY 87-2243, el fenofibrato, la metformina, la canagliflozina y el AG311 consiste en provocar una despolarización mitocondrial con una consecuente depleción de ATP y un incremento en la producción de ROS que activa la cascada de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) (Chen et al., 2011, Schockel et al., 2015, Zhang et al., 2015, Wilk et al., 2015). De acuerdo con estos resultados, hemos comprobado que el nebivolol causa un aumento en la producción de ROS especialmente *in vivo*, y genera una inhibición muy significativa en la producción de ATP celular. De manera similar, se ha descrito que el celastrol, el BAY 87-2243 y el xanthohumol inducen la muerte celular mediante mecanismos que implican un aumento en la producción de ROS (Chen et al., 2011, Schockel et al., 2015, Zhang et al., 2015). Igualmente, *in vivo* hemos demostrado que el tratamiento con nebivolol produce un aumento muy significativo en la apoptosis celular de los carcinomas posiblemente causada por el fuerte desequilibrio en el estado redox celular y la crisis metabólica por falta de ATP.

COMPUESTO	MECANISMO DE ACCIÓN	TIPO CELULAR	REF.
JCI-206779	Disminución de la proliferación tumoral.	39 líneas de cáncer diferentes	(Akatsuka et al., 2016)
Celastrol	Acumulación citotóxica de ROS	Células de cáncer de pulmón e hígado.	(Chen et al., 2011)
AG311	Inhibición de la estabilización de HIF1, pérdida de $\Delta\psi_m$, inhibición en el contenido de ATP y de la proliferación celular y aumento de muerte celular.	Células de cáncer de mama triple negativo.	(Bastian et al., 2017)
Kalkitoxina	Inhibición de la señalización celular promovida por hipoxia y de la angiogénesis	Células de cáncer de mama T47D	(Morgan et al., 2015)
BAY 87-2243	Inhibición de la respiración mitocondrial, despolarización parcial de la mitocondria, producción de ROS, activación de AMPK y reducción de la viabilidad celular.	Células de melanoma mutantes de BRAF	(Schockel et al., 2015)
Xanthohumol	Producción de ROS que lidera el proceso de apoptosis.	Células de cáncer de pulmón y cervix.	(Zhang et al., 2015)
Verrucosidin	Inducción de muerte celular en ausencia de glucosa	Células de cáncer de mama	(Thomas et al., 2013)
Canaglifozin	Limita la proliferación de las células cancerígenas reduciendo drásticamente la producción de ATP activando AMPK.	Células de cáncer de pulmón y próstata	(Villani et al., 2016)
Metformina	Inhibición de la proliferación celular en medio con alta glucosa e inducción de la muerte celular en privación de glucosa.	Células de cáncer de colon, recto y pulmón.	(Wheaton et al., 2014)
Fenofibrato	Causa una crisis metabólica y muerte celular, inhibiendo el crecimiento tumoral.	Células de glioblastoma.	(Wilk et al., 2015)
Nebivolol	Inhibición de la OXPHOS a través de los complejos CI y CV. Inhibe la proliferación e induce la muerte celular <i>in vivo</i> causando una crisis metabólica en el tumor.	Células de cáncer de colon y mama	(Nuevo-Tapioles et al., 2019, <i>En preparación.</i>)

Tabla 5. Nuevas moléculas de pequeño tamaño aprobadas por la FDA inhibidoras del CI con propiedades anticancerígenas. Se muestra el nombre del compuesto, su mecanismo de acción, el tipo celular donde se ha demostrado dicho mecanismo en la terapia del cáncer y la referencia de la publicación donde aparece. Tomado y modificado de (Urrea et al., 2017).

En las últimas décadas el 5FU (Longley et al., 2003, Wagner et al., 2006) y el tamoxifeno (Dowsett et al., 2010) han sido la primera opción en el tratamiento del cáncer de colon y mama, respectivamente. Sin embargo, la gran mayoría de los tratamientos con tamoxifeno se llevan a cabo en pacientes ER-positivos (Early Breast Cancer Trialists'

Collaborative, 2005). Únicamente, entre un 5-10% de pacientes con cáncer de mama triple negativo responde adecuadamente a la terapia con tamoxifeno (Johnston et al., 1992, Noguchi et al., 1989). En cualquier caso, urge obtener tratamientos alternativos que garanticen una mejora en la efectividad y seguridad de la terapia de estos tipos de cáncer. El tratamiento clásico con 5FU acaba cursando con resistencia al propio fármaco y efectos secundarios que causan toxicidad celular y en consecuencia, disminuyen la calidad de vida de los pacientes (Longley et al., 2003, Wagner et al., 2006). Por otro lado, se ha descrito que tratamiento prolongado con tamoxifeno con pacientes de cáncer de mama acaban cursando con hiperplasia y carcinomas de ovarios y endometrio, así como posibles trombosis y embolismo pulmonar (Petrelli et al., 2013, Musgrove and Sutherland, 2009). En este trabajo, mostramos que el tratamiento con nebivolol disminuye muy significativamente el crecimiento tumoral en comparación con los ratones que reciben el tratamiento control, pero también en comparación con el tratamiento clásico de 5FU y tamoxifeno. De hecho, hemos demostrado que la combinación de los tratamientos supone una mejora en la supervivencia en comparación con el tratamiento clásico para en cáncer de colon. Así mismo, el nebivolol puede ser utilizado para el tratamiento del cáncer de mama tipo triple negativo que cursa con un fenotipo muy agresivo y mala prognosis en la supervivencia de las pacientes (Perou et al., 2000, Cleator et al., 2007) sin tratamientos bien establecidos (Lebert et al., 2018). Esto supone que el nebivolol podría ser utilizado en clínica al menos en combinación con los tratamientos clásicos de manera que sea posible aumentar la supervivencia y calidad de vida de los pacientes al disminuir el tiempo de tratamiento. Futuros estudios clínicos serán necesarios para demostrar estos efectos o las posibles consecuencias en pacientes.

En definitiva, hemos demostrado que un fármaco utilizado en clínica para el tratamiento de la hipertensión y como tal, aprobado por la FDA, es capaz de inhibir la OXPHOS en células de cáncer de colon y mama. Proponemos que esta inhibición es causada por un mecanismo de acción combinada sobre la ATP sintasa y el CI que, en conjunto, causan una crisis metabólica que lidera un aumento en la supervivencia *in vivo* de los ratones al verse inhibida la proliferación y activada la apoptosis celular en los carcinomas (Figura 50). Nuestros resultados concuerdan con otros estudios que muestran fármacos que inhiben la actividad mitocondrial liderando procesos de respuesta antitumoral y sitúan al nebivolol en el punto de mira de posibles nuevas terapias y terapias combinadas que puedan ser llevadas en un futuro al ámbito clínico.

6. CONCLUSIONES

1. La fosforilación en el residuo S39 de IF1 previene su unión e inhibición de la actividad de la ATP sintasa.
2. La activación/inhibición de PKA regula (activa/inhíbe) la actividad de la fosforilación oxidativa en células de cáncer de colon.
3. La serina/treonina quinasa SGK-1 regula la fosforilación de IF1, inhibiendo la fosforilación oxidativa y la actividad de la ATP sintasa en células de cáncer de colon.
4. La proteína de unión a mRNA LRPPRC, que se une al mRNA de IF1, reprime la traducción de IF1 en células humanas y de ratón.
5. La sobreexpresión de IF1 promueve la reprogramación metabólica de células BT549 por inhibición de la OXPHOS. Paradójicamente, pacientes con carcinomas de mama receptor hormonal tipo triple negativo tienen una mejor prognosis, aparentemente por mediar IF1 un fenotipo menos metastásico.
6. El nebivolol inhibe la OXPHOS promoviendo la sobreexpresión de IF1 y la defosforilación e inhibición del CI de la ETC en células de cáncer de colon y de mama.
7. El nebivolol retrasa el crecimiento tumoral *in vivo* de carcinomas de colon y mama por estimular la muerte y frenar la proliferación de los tumores. Este fenómeno tiene lugar debido a una crisis metabólica y de estrés oxidativo en los tumores de los ratones tratados con nebivolol.
8. El nebivolol aumenta la tasa de supervivencia en ratones como consecuencia al generar una crisis metabólica y de estrés oxidativo restringiendo la disponibilidad de ATP total en los tumores.

9. El tratamiento con nebivolol, combinado con tratamientos clásicos de 5FU y tamoxifeno, aumentan significativamente la tasa de supervivencia de ratones portadores de carcinomas de colon y mama, respectivamente.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Acebo, P., Giner, D., Calvo, P., Blanco-Rivero, A., Ortega, A. D., Fernandez, P. L., Roncador, G., Fernandez-Malave, E., Chamorro, M. & Cuezva, J. M. 2009. Cancer abolishes the tissue type-specific differences in the phenotype of energetic metabolism. *Transl Oncol*, 2, 138-45.
- Acin-Perez, R., Bayona-Bafaluy, M. P., Fernandez-Silva, P., Moreno-Loshuertos, R., Perez-Martos, A., Bruno, C., Moraes, C. T. & Enriquez, J. A. 2004. Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria. *Mol Cell*, 13, 805-15.
- Acin-Perez, R., Carrascoso, I., Baixauli, F., Roche-Molina, M., Latorre-Pellicer, A., Fernandez-Silva, P., Mittelbrunn, M., Sanchez-Madrid, F., Perez-Martos, A., Lowell, C. A., Manfredi, G. & Enriquez, J. A. 2014. ROS-triggered phosphorylation of complex II by Fgr kinase regulates cellular adaptation to fuel use. *Cell Metab*, 19, 1020-33.
- Acin-Perez, R., Fernandez-Silva, P., Peleato, M. L., Perez-Martos, A. & Enriquez, J. A. 2008. Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell*, 32, 529-39.
- Acin-Perez, R., Gatti, D. L., Bai, Y. & Manfredi, G. 2011. Protein phosphorylation and prevention of cytochrome oxidase inhibition by ATP: coupled mechanisms of energy metabolism regulation. *Cell Metab*, 13, 712-9.
- Acin-Perez, R., Salazar, E., Kamenetsky, M., Buck, J., Levin, L. R. & Manfredi, G. 2009. Cyclic AMP produced inside mitochondria regulates oxidative phosphorylation. *Cell Metab*, 9, 265-76.
- Ahn, C. S. & Metallo, C. M. 2015. Mitochondria as biosynthetic factories for cancer proliferation. *Cancer Metab*, 3, 1.
- Akatsuka, A., Kojima, N., Okamura, M., Dan, S. & Yamori, T. 2016. A novel thiophene-3-carboxamide analog of annonaceous acetogenin exhibits antitumor activity via inhibition of mitochondrial complex I. *Pharmacol Res Perspect*, 4, e00246.
- Akouchekian, M., Houshmand, M., Akbari, M. H., Kamalidehghan, B. & Dehghan, M. 2011. Analysis of mitochondrial ND1 gene in human colorectal cancer. *J Res Med Sci*, 16, 50-5.
- Alavian, K. N., Beutner, G., Lazrove, E., Sacchetti, S., Park, H. A., Licznanski, P., Li, H., Nabili, P., Hockensmith, K., Graham, M., Porter, G. A., Jr. & Jonas, E. A. 2014. An uncoupling channel within the c-subunit ring of the F1FO ATP synthase is the mitochondrial permeability transition pore. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 10580-5.
- Alavian, K. N., Li, H., Collis, L., Bonanni, L., Zeng, L., Sacchetti, S., Lazrove, E., Nabili, P., Flaherty, B., Graham, M., Chen, Y., Messerli, S. M., Mariggio, M. A., Rahner, C., Mcnay, E., Shore, G. C., Smith, P. J., Hardwick, J. M. & Jonas, E. A. 2011. Bcl-x(L) regulates metabolic efficiency of neurons through interaction with the mitochondrial F(1)F(O) ATP synthase. *Nat Cell Biol*, 13, 1224-33.
- Alcazar-Fabra, M., Navas, P. & Brea-Calvo, G. 2016. Coenzyme Q biosynthesis and its role in the respiratory chain structure. *Biochim Biophys Acta*, 1857, 1073-1078.
- Alonso, R., Pisa, D., Marina, A. I., Morato, E., Rabano, A., Rodal, I. & Carrasco, L. 2015. Evidence for fungal infection in cerebrospinal fluid and brain tissue from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Int J Biol Sci*, 11, 546-58.
- Arachiche, A., Augereau, O., Decossas, M., Pertuiset, C., Gontier, E., Letellier, T. & Dachary-Prigent, J. 2008. Localization of PTP-1B, SHP-2, and Src exclusively in rat brain mitochondria and functional consequences. *J Biol Chem*, 283, 24406-11.
- Arteaga, M. F. & Canessa, C. M. 2005. Functional specificity of Sgk1 and Akt1 on ENaC activity. *Am J Physiol Renal Physiol*, 289, F90-6.
- Attardi, G. & Schatz, G. 1988. Biogenesis of mitochondria. *Annu. Rev. Cell. Biol.*, 4, 289-333.

- Bah, A., Vernon, R. M., Siddiqui, Z., Krzeminski, M., Muhandiram, R., Zhao, C., Sonenberg, N., Kay, L. E. & Forman-Kay, J. D. 2014. Folding of an intrinsically disordered protein by phosphorylation as a regulatory switch. *Nature*, 519, 106-109.
- Baines, C. P., Zhang, J., Wang, G. W., Zheng, Y. T., Xiu, J. X., Cardwell, E. M., Bolli, R. & Ping, P. 2002. Mitochondrial PKCepsilon and MAPK form signaling modules in the murine heart: enhanced mitochondrial PKCepsilon-MAPK interactions and differential MAPK activation in PKCepsilon-induced cardioprotection. *Circ Res*, 90, 390-7.
- Balaban, R. S., Nemoto, S. & Finkel, T. 2005. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, 120, 483-95.
- Ballard-Croft, C., Kristo, G., Yoshimura, Y., Reid, E., Keith, B. J., Mentzer, R. M., Jr. & Lasley, R. D. 2005. Acute adenosine preconditioning is mediated by p38 MAPK activation in discrete subcellular compartments. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288, H1359-66.
- Banoth, B. & Cassel, S. L. 2018. Mitochondria in innate immune signaling. *Transl Res*, 202, 52-68.
- Baracca, A., Chiaradonna, F., Sgarbi, G., Solaini, G., Alberghina, L. & Lenaz, G. 2010. Mitochondrial Complex I decrease is responsible for bioenergetic dysfunction in K-ras transformed cells. *Biochim Biophys Acta*, 1797, 314-23.
- Barbot, M., Jans, D. C., Schulz, C., Denkert, N., Kroppen, B., Hoppert, M., Jakobs, S. & Meinecke, M. 2015. Mic10 oligomerizes to bend mitochondrial inner membranes at cristae junctions. *Cell Metab*, 21, 756-63.
- Barja, G. 1999. Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J Bioenerg Biomembr*, 31, 347-66.
- Barksdale, K. A. & Bijur, G. N. 2009. The basal flux of Akt in the mitochondria is mediated by heat shock protein 90. *J Neurochem*, 108, 1289-99.
- Barrientos, A., Fontanesi, F. & Diaz, F. 2009. Evaluation of the mitochondrial respiratory chain and oxidative phosphorylation system using polarography and spectrophotometric enzyme assays. *Curr Protoc Hum Genet*, Chapter 19, Unit19 3.
- Bason, J. V., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. & Walker, J. E. 2014. Pathway of binding of the intrinsically disordered mitochondrial inhibitor protein to F1-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 11305-10.
- Bastian, A., Matsuzaki, S., Humphries, K. M., Pharaoh, G. A., Doshi, A., Zaware, N., Gangjee, A. & Ihnat, M. A. 2017. AG311, a small molecule inhibitor of complex I and hypoxia-induced HIF-1alpha stabilization. *Cancer Lett*, 388, 149-157.
- Bastian, A., Thorpe, J. E., Disch, B. C., Bailey-Downs, L. C., Gangjee, A., Devambatla, R. K., Henthorn, J., Humphries, K. M., Vadvalkar, S. S. & Ihnat, M. A. 2015. A small molecule with anticancer and antimetastatic activities induces rapid mitochondrial-associated necrosis in breast cancer. *J Pharmacol Exp Ther*, 353, 392-404.
- Becker, T., Gebert, M., Pfanner, N. & Van Der Laan, M. 2009. Biogenesis of mitochondrial membrane proteins. *Curr Opin Cell Biol*, 21, 484-93.
- Belogradov, G. I. 2009. Recent advances in structure-functional studies of mitochondrial factor B. *J Bioenerg Biomembr*, 41, 137-43.
- Bender, E. & Kadenbach, B. 2000. The allosteric ATP-inhibition of cytochrome c oxidase activity is reversibly switched on by cAMP-dependent phosphorylation. *FEBS Lett*, 466, 130-4.
- Bernardi, P. 2018. Why F-ATP Synthase Remains a Strong Candidate as the Mitochondrial Permeability Transition Pore. *Front Physiol*, 9, 1543.
- Bernardi, P., Rasola, A., Forte, M. & Lippe, G. 2015. The Mitochondrial Permeability Transition Pore: Channel Formation by F-ATP Synthase, Integration in Signal Transduction, and Role in Pathophysiology. *Physiol Rev*, 95, 1111-55.
- Bernardi, P., Scorrano, L., Colonna, R., Petronilli, V. & Di Lisa, F. 1999. Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur J Biochem*, 264, 687-701.
- Bijur, G. N. & Jope, R. S. 2003a. Glycogen synthase kinase-3 beta is highly activated in nuclei and mitochondria. *Neuroreport*, 14, 2415-9.

Bibliografia

- Bijur, G. N. & Jope, R. S. 2003b. Rapid accumulation of Akt in mitochondria following phosphatidylinositol 3-kinase activation. *J Neurochem*, 87, 1427-35.
- Birsoy, K., Possemato, R., Lorbeer, F. K., Bayraktar, E. C., Thiru, P., Yucel, B., Wang, T., Chen, W. W., Clish, C. B. & Sabatini, D. M. 2014. Metabolic determinants of cancer cell sensitivity to glucose limitation and biguanides. *Nature*, 508, 108-12.
- Birsoy, K., Wang, T., Chen, W. W., Freinkman, E., Abu-Remaileh, M. & Sabatini, D. M. 2015. An Essential Role of the Mitochondrial Electron Transport Chain in Cell Proliferation Is to Enable Aspartate Synthesis. *Cell*, 162, 540-51.
- Bleier, L., Wittig, I., Heide, H., Steger, M., Brandt, U. & Drose, S. 2015. Generator-specific targets of mitochondrial reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*, 78, 1-10.
- Boerries, M., Most, P., Gledhill, J. R., Walker, J. E., Katus, H. A., Koch, W. J., Aebi, U. & Schoenenberger, C. A. 2007. Ca²⁺-dependent interaction of S100A1 with F1-ATPase leads to an increased ATP content in cardiomyocytes. *Mol Cell Biol*, 27, 4365-73.
- Bonora, M., Wieckowski, M. R., Chinopoulos, C., Kepp, O., Kroemer, G., Galluzzi, L. & Pinton, P. 2014. Molecular mechanisms of cell death: central implication of ATP synthase in mitochondrial permeability transition. *Oncogene*, 0.
- Bottani, E., Cerutti, R., Harbour, M. E., Ravaglia, S., Dogan, S. A., Giordano, C., Fearnley, I. M., D'Amati, G., Viscomi, C., Fernandez-Vizarra, E. & Zeviani, M. 2017. TTC19 Plays a Husbandry Role on UQCRC1 Turnover in the Biogenesis of Mitochondrial Respiratory Complex III. *Mol Cell*, 67, 96-105 e4.
- Boyer, P. D. 1997. The ATP synthase. A splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.*, 66, 717-749.
- Braathen, G. J., Sand, J. C., Lobato, A., Hoyer, H. & Russell, M. B. 2011. Genetic epidemiology of Charcot-Marie-Tooth in the general population. *Eur J Neurol*, 18, 39-48.
- Brand, M. D. 2016. Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. *Free Radic Biol Med*, 100, 14-31.
- Brickley, D. R., Agyeman, A. S., Kopp, R. F., Hall, B. A., Harbeck, M. C., Belova, L., Volden, P. A., Wu, W., Roe, M. W. & Conzen, S. D. 2013. Serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1) is regulated by store-operated Ca²⁺ entry and mediates cytoprotection against necrotic cell death. *J Biol Chem*, 288, 32708-19.
- Brickley, D. R., Mikosz, C. A., Hagan, C. R. & Conzen, S. D. 2002. Ubiquitin modification of serum and glucocorticoid-induced protein kinase-1 (SGK-1). *J Biol Chem*, 277, 43064-70.
- Bridges, H. R., Jones, A. J., Pollak, M. N. & Hirst, J. 2014. Effects of metformin and other biguanides on oxidative phosphorylation in mitochondria. *Biochem J*, 462, 475-87.
- Britten, C. D., Rowinsky, E. K., Baker, S. D., Weiss, G. R., Smith, L., Stephenson, J., Rothenberg, M., Smetzer, L., Cramer, J., Collins, W., Von Hoff, D. D. & Eckhardt, S. G. 2000. A phase I and pharmacokinetic study of the mitochondrial-specific rhodacyanine dye analog MKT 077. *Clin Cancer Res*, 6, 42-9.
- Buzhynskyy, N., Sens, P., Prima, V., Sturgis, J. N. & Scheuring, S. 2007. Rows of ATP synthase dimers in native mitochondrial inner membranes. *Biophys J*, 93, 2870-6.
- Cabezón, E., Butler, P. J., Runswick, M. J. & Walker, J. E. 2000. Modulation of the oligomerization state of the bovine F1-ATPase inhibitor protein, IF1, by pH. *J Biol Chem*, 275, 25460-4.
- Cabezón, E., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. & Walker, J. E. 2003. The structure of bovine F1-ATPase in complex with its regulatory protein IF1. *Nat Struct Biol*, 10, 744-50.
- Cabezón, E., Runswick, M. J., Leslie, A. G. & Walker, J. E. 2001. The structure of bovine IF(1), the regulatory subunit of mitochondrial F-ATPase. *Embo J*, 20, 6990-6.
- Cairns, R. A., Harris, I. S. & Mak, T. W. 2011. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer*, 11, 85-95.
- Calabrese, C., Iommarini, L., Kurelac, I., Calvaruso, M. A., Capristo, M., Lollini, P. L., Nanni, P., Bergamini, C., Nicoletti, G., Giovanni, C. D., Ghelli, A., Giorgio, V., Caratozzolo, M. F., Marzano, F., Manzari, C., Betts, C. M., Carelli, V., Ceccarelli, C., Attimonelli, M., Romeo, G., Fato, R., Rugolo, M., Tullo, A., Gasparre, G. & Porcelli, A. M. 2013. Respiratory

- complex I is essential to induce a Warburg profile in mitochondria-defective tumor cells. *Cancer Metab*, 1, 11.
- Calvaruso, M. A., Willems, P., Van Den Brand, M., Valsecchi, F., Kruse, S., Palmiter, R., Smeitink, J. & Nijtmans, L. 2012. Mitochondrial complex III stabilizes complex I in the absence of NDUFS4 to provide partial activity. *Hum Mol Genet*, 21, 115-20.
- Campanella, M., Casswell, E., Chong, S., Farah, Z., Wieckowski, M. R., Abramov, A. Y., Tinker, A. & Duchon, M. R. 2008. Regulation of mitochondrial structure and function by the F1Fo-ATPase inhibitor protein, IF1. *Cell Metab*, 8, 13-25.
- Cano, A., Santamaria, P. G. & Moreno-Bueno, G. 2012. LOXL2 in epithelial cell plasticity and tumor progression. *Future Oncol*, 8, 1095-108.
- Cao, X., Zhu, H., Ali-Osman, F. & Lo, H. W. 2011. EGFR and EGFRvIII undergo stress- and EGFR kinase inhibitor-induced mitochondrial translocation: a potential mechanism of EGFR-driven antagonism of apoptosis. *Mol Cancer*, 10, 26.
- Chance, B. & Williams, G. R. 1955. A method for the localization of sites for oxidative phosphorylation. *Nature*, 176, 250-4.
- Chauhan, D., Li, G., Podar, K., Hideshima, T., Shringarpure, R., Catley, L., Mitsiades, C., Munshi, N., Tai, Y. T., Suh, N., Gribble, G. W., Honda, T., Schlossman, R., Richardson, P., Sporn, M. B. & Anderson, K. C. 2004. The bortezomib/proteasome inhibitor PS-341 and triterpenoid CDDO-Im induce synergistic anti-multiple myeloma (MM) activity and overcome bortezomib resistance. *Blood*, 103, 3158-66.
- Chen, G., Zhang, X., Zhao, M., Wang, Y., Cheng, X., Wang, D., Xu, Y., Du, Z. & Yu, X. 2011. Celastrol targets mitochondrial respiratory chain complex I to induce reactive oxygen species-dependent cytotoxicity in tumor cells. *BMC Cancer*, 11, 170.
- Chen, R., Runswick, M. J., Carroll, J., Fearnley, I. M. & Walker, J. E. 2007. Association of two proteolipids of unknown function with ATP synthase from bovine heart mitochondria. *FEBS Lett*, 581, 3145-8.
- Chen, W. W., Birsoy, K., Mihaylova, M. M., Snitkin, H., Stasinski, I., Yucel, B., Bayraktar, E. C., Carette, J. E., Clish, C. B., Brummelkamp, T. R., Sabatini, D. D. & Sabatini, D. M. 2014a. Inhibition of ATPIF1 ameliorates severe mitochondrial respiratory chain dysfunction in mammalian cells. *Cell Rep*, 7, 27-34.
- Chen, Y., Sparks, M., Bhandari, P., Matkovich, S. J. & Dorn, G. W., 2nd 2014b. Mitochondrial genome linearization is a causative factor for cardiomyopathy in mice and *Drosophila*. *Antioxid Redox Signal*, 21, 1949-59.
- Chin, C. C., Li, J. M., Lee, K. F., Huang, Y. C., Wang, K. C., Lai, H. C., Cheng, C. C., Kuo, Y. H. & Shi, C. S. 2016. Selective beta2-AR Blockage Suppresses Colorectal Cancer Growth Through Regulation of EGFR-Akt/ERK1/2 Signaling, G1-Phase Arrest, and Apoptosis. *J Cell Physiol*, 231, 459-72.
- Chin, R. M., Fu, X., Pai, M. Y., Vergnes, L., Hwang, H., Deng, G., Diep, S., Lomenick, B., Meli, V. S., Monsalve, G. C., Hu, E., Whelan, S. A., Wang, J. X., Jung, G., Solis, G. M., Fazlollahi, F., Kaweeteerawat, C., Quach, A., Nili, M., Krall, A. S., Godwin, H. A., Chang, H. R., Faull, K. F., Guo, F., Jiang, M., Trauger, S. A., Saghatelian, A., Braas, D., Christofk, H. R., Clarke, C. F., Teitell, M. A., Petrascheck, M., Reue, K., Jung, M. E., Frand, A. R. & Huang, J. 2014. The metabolite alpha-ketoglutarate extends lifespan by inhibiting ATP synthase and TOR. *Nature*, 510, 397-401.
- Chou, R. H., Wen, H. C., Liang, W. G., Lin, S. C., Yuan, H. W., Wu, C. W. & Chang, W. S. 2012. Suppression of the invasion and migration of cancer cells by SERPINB family genes and their derived peptides. *Oncol Rep*, 27, 238-45.
- Christensen, G. L., Kelstrup, C. D., Lyngso, C., Sarwar, U., Bogebo, R., Sheikh, S. P., Gammeltoft, S., Olsen, J. V. & Hansen, J. L. 2010. Quantitative phosphoproteomics dissection of seven-transmembrane receptor signaling using full and biased agonists. *Mol Cell Proteomics*, 9, 1540-53.

Bibliografía

- Chu, S., Rushdi, S., Zumpe, E. T., Mamers, P., Healy, D. L., Jobling, T., Burger, H. G. & Fuller, P. J. 2002. FSH-regulated gene expression profiles in ovarian tumours and normal ovaries. *Mol Hum Reprod*, 8, 426-33.
- Cintron, N. M. & Pedersen, P. L. 1979. A protein inhibitor of the mitochondrial adenosine triphosphatase complex of rat liver. Purification and characterization. *J Biol Chem*, 254, 3439-43.
- Cleator, S., Heller, W. & Coombes, R. C. 2007. Triple-negative breast cancer: therapeutic options. *Lancet Oncol*, 8, 235-44.
- Cogliati, S., Frezza, C., Soriano, M. E., Varanita, T., Quintana-Cabrera, R., Corrado, M., Cipolat, S., Costa, V., Casarin, A., Gomes, L. C., Perales-Clemente, E., Salviati, L., Fernandez-Silva, P., Enriquez, J. A. & Scorrano, L. 2013. Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell*, 155, 160-71.
- Cogliati, S., Lorenzi, I., Rigoni, G., Caicci, F. & Soriano, M. E. 2018. Regulation of Mitochondrial Electron Transport Chain Assembly. *J Mol Biol*, 430, 4849-4873.
- Colombini, M., Blachly-Dyson, E. & Forte, M. 1996. VDAC, a channel in the outer mitochondrial membrane. *Ion Channels*, 4, 169-202.
- Contessi, S., Comelli, M., Cmet, S., Lippe, G. & Mavelli, I. 2007. IF(1) distribution in HepG2 cells in relation to ecto-F(0)F (1)ATP synthase and calmodulin. *J Bioenerg Biomembr*, 39, 291-300.
- Contessi, S., Haraux, F., Mavelli, I. & Lippe, G. 2005. Identification of a conserved calmodulin-binding motif in the sequence of FOF1 ATP synthase inhibitor protein. *J Bioenerg Biomembr*, 37, 317-26.
- Contreras, L., Drago, I., Zampese, E. & Pozzan, T. 2010. Mitochondria: the calcium connection. *Biochim Biophys Acta*, 1797, 607-18.
- Cordas, E., Naray-Fejes-Toth, A. & Fejes-Toth, G. 2007. Subcellular location of serum- and glucocorticoid-induced kinase-1 in renal and mammary epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292, C1971-81.
- Covian, R. & Balaban, R. S. 2012. Cardiac mitochondrial matrix and respiratory complex protein phosphorylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 303, H940-66.
- Cribbs, J. T. & Strack, S. 2007. Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Rep*, 8, 939-44.
- Cseplo, P., Vamos, Z., Ivic, I., Torok, O., Toth, A. & Koller, A. 2016. The Beta-1-Receptor Blocker Nebivolol Elicits Dilation of Cerebral Arteries by Reducing Smooth Muscle [Ca²⁺]_i. *PLoS One*, 11, e0164010.
- Cuezva, J. M., Chen, G., Alonso, A. M., Isidoro, A., Misek, D. E., Hanash, S. M. & Beer, D. G. 2004. The bioenergetic signature of lung adenocarcinomas is a molecular marker of cancer diagnosis and prognosis. *Carcinogenesis*, 25, 1157-63.
- Cuezva, J. M., Chitra, C. I. & Patel, M. S. 1982. The newborn of diabetic rat. II. Impaired gluconeogenesis in the postnatal period. *Pediatr Res*, 16, 638-43.
- Cuezva, J. M., Krajewska, M., De Heredia, M. L., Krajewski, S., Santamaria, G., Kim, H., Zapata, J. M., Marusawa, H., Chamorro, M. & Reed, J. C. 2002. The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer Res*, 62, 6674-81.
- Cuezva, J. M., Ortega, A. D., Willers, I., Sanchez-Cenizo, L., Aldea, M. & Sanchez-Arago, M. 2009. The tumor suppressor function of mitochondria: translation into the clinics. *Biochim Biophys Acta*, 1792, 1145-58.
- Cuezva, J. M., Ostronoff, L. K., Ricart, J., Lopez De Heredia, M., Di Liegro, C. M. & Izquierdo, J. M. 1997. Mitochondrial biogenesis in the liver during development and oncogenesis. *J Bioenerg Biomembr*, 29, 365-77.
- Cuillierier, A., Honarmand, S., Cadete, V. J. J., Ruiz, M., Forest, A., Deschenes, S., Beauchamp, C., Consortium, L., Charron, G., Rioux, J. D., Des Rosiers, C., Shoubbridge, E. A. & Burelle, Y. 2017. Loss of hepatic LRPPRC alters mitochondrial bioenergetics, regulation of

- permeability transition and trans-membrane ROS diffusion. *Hum Mol Genet*, 26, 3186-3201.
- Cunningham, D., Atkin, W., Lenz, H. J., Lynch, H. T., Minsky, B., Nordlinger, B. & Starling, N. 2010. Colorectal cancer. *Lancet*, 375, 1030-47.
- D'autreaux, B. & Toledano, M. B. 2007. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 813-24.
- Dagda, R. K., Gusdon, A. M., Pien, I., Strack, S., Green, S., Li, C., Van Houten, B., Cherra, S. J., 3rd & Chu, C. T. 2011. Mitochondrially localized PKA reverses mitochondrial pathology and dysfunction in a cellular model of Parkinson's disease. *Cell Death Differ*, 18, 1914-23.
- Dagda, R. K., Zhu, J., Kulich, S. M. & Chu, C. T. 2008. Mitochondrially localized ERK2 regulates mitophagy and autophagic cell stress: implications for Parkinson's disease. *Autophagy*, 4, 770-82.
- Danial, N. N., Gramm, C. F., Scorrano, L., Zhang, C. Y., Krauss, S., Ranger, A. M., Datta, S. R., Greenberg, M. E., Licklider, L. J., Lowell, B. B., Gygi, S. P. & Korsmeyer, S. J. 2003. BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature*, 424, 952-6.
- Das, A. M. 2003. Regulation of the mitochondrial ATP-synthase in health and disease. *Mol Genet Metab*, 79, 71-82.
- Davies, K. M., Anselmi, C., Wittig, I., Faraldo-Gomez, J. D. & Kuhlbrandt, W. 2012. Structure of the yeast F1Fo-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 13602-7.
- Davies, K. M., Strauss, M., Daum, B., Kief, J. H., Osiewacz, H. D., Rycovska, A., Zickermann, V. & Kuhlbrandt, W. 2011. Macromolecular organization of ATP synthase and complex I in whole mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 14121-6.
- De Rasmio, D., Micelli, L., Santeramo, A., Signorile, A., Lattanzio, P. & Papa, S. 2016. cAMP regulates the functional activity, coupling efficiency and structural organization of mammalian FOF1 ATP synthase. *Biochim Biophys Acta*, 1857, 350-8.
- De Rasmio, D., Panelli, D., Sardanelli, A. M. & Papa, S. 2008. cAMP-dependent protein kinase regulates the mitochondrial import of the nuclear encoded NDUFS4 subunit of complex I. *Cell Signal*, 20, 989-97.
- De Rasmio, D., Signorile, A., Santeramo, A., Larizza, M., Lattanzio, P., Capitanio, G. & Papa, S. 2015. Intramitochondrial adenylyl cyclase controls the turnover of nuclear-encoded subunits and activity of mammalian complex I of the respiratory chain. *Biochim Biophys Acta*, 1853, 183-91.
- Deberardinis, R. J. & Chandel, N. S. 2016. Fundamentals of cancer metabolism. *Sci Adv*, 2, e1600200.
- Demory, M. L., Boerner, J. L., Davidson, R., Faust, W., Miyake, T., Lee, I., Huttemann, M., Douglas, R., Haddad, G. & Parsons, S. J. 2009. Epidermal growth factor receptor translocation to the mitochondria: regulation and effect. *J Biol Chem*, 284, 36592-604.
- Deng, X., Xiao, L., Lang, W., Gao, F., Ruvolo, P. & May, W. S., Jr. 2001. Novel role for JNK as a stress-activated Bcl2 kinase. *J Biol Chem*, 276, 23681-8.
- Denicola, G. M., Karreth, F. A., Humpton, T. J., Gopinathan, A., Wei, C., Frese, K., Mangal, D., Yu, K. H., Yeo, C. J., Calhoun, E. S., Scrimieri, F., Winter, J. M., Hruban, R. H., Iacobuzio-Donahue, C., Kern, S. E., Blair, I. A. & Tuveson, D. A. 2011. Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature*, 475, 106-9.
- Di Benedetto, G., Scalzotto, E., Mongillo, M. & Pozzan, T. 2013. Mitochondrial Ca(2)(+) uptake induces cyclic AMP generation in the matrix and modulates organelle ATP levels. *Cell Metab*, 17, 965-75.
- Diaz, F., Fukui, H., Garcia, S. & Moraes, C. T. 2006. Cytochrome c oxidase is required for the assembly/stability of respiratory complex I in mouse fibroblasts. *Mol Cell Biol*, 26, 4872-81.

Bibliografía

- Dickey, A. S. & Strack, S. 2011. PKA/AKAP1 and PP2A/Bbeta2 regulate neuronal morphogenesis via Drp1 phosphorylation and mitochondrial bioenergetics. *J Neurosci*, 31, 15716-26.
- Dienhart, M., Pfeiffer, K., Schagger, H. & Stuart, R. A. 2002. Formation of the yeast F1F0-ATP synthase dimeric complex does not require the ATPase inhibitor protein, Inh1. *J Biol Chem*, 277, 39289-95.
- Ding, Y., Liu, Z., Desai, S., Zhao, Y., Liu, H., Pannell, L. K., Yi, H., Wright, E. R., Owen, L. B., Dean-Colomb, W., Fodstad, O., Lu, J., Ledoux, S. P., Wilson, G. L. & Tan, M. 2012. Receptor tyrosine kinase ErbB2 translocates into mitochondria and regulates cellular metabolism. *Nat Commun*, 3, 1271.
- Doherty, J. R. & Cleveland, J. L. 2013. Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics. *J Clin Invest*, 123, 3685-92.
- Dohi, T., Xia, F. & Altieri, D. C. 2007. Compartmentalized phosphorylation of IAP by protein kinase A regulates cytoprotection. *Mol Cell*, 27, 17-28.
- Dowsett, M., Cuzick, J., Ingle, J., Coates, A., Forbes, J., Bliss, J., Buyse, M., Baum, M., Buzdar, A., Colleoni, M., Coombes, C., Snowdon, C., Gnant, M., Jakesz, R., Kaufmann, M., Boccardo, F., Godwin, J., Davies, C. & Peto, R. 2010. Meta-analysis of breast cancer outcomes in adjuvant trials of aromatase inhibitors versus tamoxifen. *J Clin Oncol*, 28, 509-18.
- Drago, I., Pizzo, P. & Pozzan, T. 2011. After half a century mitochondrial calcium in- and efflux machineries reveal themselves. *EMBO J*, 30, 4119-25.
- Dreier, A., Barth, S., Goswami, A. & Weis, J. 2012. Cetuximab induces mitochondrial translocation of EGFRvIII, but not EGFR: involvement of mitochondria in tumor drug resistance? *Tumour Biol*, 33, 85-94.
- Du, W. W., Fang, L., Yang, W., Sheng, W., Zhang, Y., Seth, A., Yang, B. B. & Yee, A. J. 2012. The role of versican G3 domain in regulating breast cancer cell motility including effects on osteoblast cell growth and differentiation in vitro - evaluation towards understanding breast cancer cell bone metastasis. *BMC Cancer*, 12, 341.
- Duarte, A., Castillo, A. F., Podesta, E. J. & Poderoso, C. 2014. Mitochondrial fusion and ERK activity regulate steroidogenic acute regulatory protein localization in mitochondria. *PLoS One*, 9, e100387.
- Dyson, M. T., Kowalewski, M. P., Manna, P. R. & Stocco, D. M. 2009. The differential regulation of steroidogenic acute regulatory protein-mediated steroidogenesis by type I and type II PKA in MA-10 cells. *Mol Cell Endocrinol*, 300, 94-103.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, G. 2005. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*, 365, 1687-717.
- Elango, S., Venugopal, S., Thangaraj, K. & Viswanadha, V. P. 2014. Novel mutations in ATPase 8, ND1 and ND5 genes associated with peripheral neuropathy of diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*, 103, e49-52.
- Engelsberg, A., Kobelt, F. & Kuhl, D. 2006. The N-terminus of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase Sgk1 specifies mitochondrial localization and rapid turnover. *Biochem J*, 399, 69-76.
- Enriquez, J. A. 2016. Supramolecular Organization of Respiratory Complexes. *Annu Rev Physiol*, 78, 533-61.
- Esparza-Moltó, P. B. & Cuezva, J. M. 2018. The Role of Mitochondrial H⁺-ATP Synthase in Cancer. *Frontiers in Oncology*, 8.
- Esparza-Molto, P. B., Nuevo-Tapióles, C., Chamorro, M., Najera, L., Torresano, L., Santacatterina, F. & Cuezva, J. M. 2019. Tissue-specific expression and post-transcriptional regulation of the ATPase inhibitory factor 1 (IF1) in human and mouse tissues. *FASEB J*, 33, 1836-1851.
- Esparza-Molto, P. B., Nuevo-Tapióles, C., Chamorro, M., Nájera, L., Torresano, L., Santacatterina, F. & Cuezva, J. M. 2018. Tissue-specific expression and posttranscriptional regulation of the ATPase Inhibitory Factor 1 (IF1) in human and mouse tissues. *FASEB Journal*, In press.

- Esparza-Molto, P. B., Nuevo-Tapióles, C. & Cuezva, J. M. 2017. Regulation of the H⁺-ATP synthase by IF1: a role in mitohormesis. *Cell Mol Life Sci*, 74, 2151-2166.
- Esposito, L. A., Kokoszka, J. E., Waymire, K. G., Cottrell, B., Macgregor, G. R. & Wallace, D. C. 2000. Mitochondrial oxidative stress in mice lacking the glutathione peroxidase-1 gene. *Free Radic Biol Med*, 28, 754-66.
- Evangelisti, C., De Biase, D., Kurelac, I., Ceccarelli, C., Prokisch, H., Meitinger, T., Caria, P., Vanni, R., Romeo, G., Tallini, G., Gasparre, G. & Bonora, E. 2015. A mutation screening of oncogenes, tumor suppressor gene TP53 and nuclear encoded mitochondrial complex I genes in oncocytic thyroid tumors. *BMC Cancer*, 15, 157.
- Evans, J. M., Donnelly, L. A., Emslie-Smith, A. M., Alessi, D. R. & Morris, A. D. 2005. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ*, 330, 1304-5.
- Faccenda, D., Nakamura, J., Gorini, G., Dhoot, G. K., Piacentini, M., Yoshida, M. & Campanella, M. 2017. Control of Mitochondrial Remodeling by the ATPase Inhibitory Factor 1 Unveils a Pro-survival Relay via OPA1. *Cell Rep*, 18, 1869-1883.
- Faccenda, D., Tan, C. H., Seraphim, A., Duchen, M. R. & Campanella, M. 2013. IF1 limits the apoptotic-signalling cascade by preventing mitochondrial remodelling. *Cell Death Differ*, 20, 686-97.
- 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. *Hum Mol Genet*, 16, 1241-52.
- Fernandez-Vizarra, E., Tiranti, V. & Zeviani, M. 2009. Assembly of the oxidative phosphorylation system in humans: what we have learned by studying its defects. *Biochim Biophys Acta*, 1793, 200-11.
- Fernandez-Vizarra, E. & Zeviani, M. 2015. Nuclear gene mutations as the cause of mitochondrial complex III deficiency. *Front Genet*, 6, 134.
- Fesik, S. W. 2005. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat Rev Cancer*, 5, 876-85.
- Fogal, V., Richardson, A. D., Karmali, P. P., Scheffler, I. E., Smith, J. W. & Ruoslahti, E. 2010. Mitochondrial p32 protein is a critical regulator of tumor metabolism via maintenance of oxidative phosphorylation. *Mol Cell Biol*, 30, 1303-18.
- Formentini, L., Pereira, M. P., Sanchez-Cenizo, L., Santacatterina, F., Lucas, J. J., Navarro, C., Martinez-Serrano, A. & Cuezva, J. M. 2014. In vivo inhibition of the mitochondrial H⁺-ATP synthase in neurons promotes metabolic preconditioning. *The EMBO Journal*, 33, 762-78.
- Formentini, L., Ryan, A. J., Galvez-Santisteban, M., Carter, L., Taub, P., Lapek, J. D., Jr., Gonzalez, D. J., Villarreal, F., Ciaraldi, T. P., Cuezva, J. M. & Henry, R. R. 2017a. Mitochondrial H⁺-ATP synthase in human skeletal muscle: contribution to dyslipidaemia and insulin resistance. *Diabetologia*, 60, 2052-2065.
- Formentini, L., Sánchez-Aragó, M., Sánchez-Cenizo, L. & Cuezva, J. M. 2012. The mitochondrial ATPase Inhibitory Factor 1 (IF1) triggers a ROS-mediated retrograde pro-survival and proliferative response. *Mol. Cell*, 45, 731-742.
- Formentini, L., Santacatterina, F., Nunez De Arenas, C., Stamatakis, K., Lopez-Martinez, D., Logan, A., Fresno, M., Smits, R., Murphy, M. P. & Cuezva, J. M. 2017b. Mitochondrial ROS Production Protects the Intestine from Inflammation through Functional M2 Macrophage Polarization. *Cell Rep*, 19, 1202-1213.
- Forner, A., Reig, M. & Bruix, J. 2018. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*, 391, 1301-1314.
- Forner, F., Foster, L. J., Campanaro, S., Valle, G. & Mann, M. 2006. Quantitative proteomic comparison of rat mitochondria from muscle, heart, and liver. *Mol Cell Proteomics*, 5, 608-19.
- Foulkes, W. D., Smith, I. E. & Reis-Filho, J. S. 2010. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*, 363, 1938-48.

Bibliografia

- Frey, T. G. & Mannella, C. A. 2000. The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci*, 25, 319-24.
- Fujikawa, M., Imamura, H., Nakamura, J. & Yoshida, M. 2012. Assessing the actual contribution of IF1, an inhibitor of mitochondrial FoF1, to ATP homeostasis, cell growth, mitochondrial morphology and cell viability. *J Biol Chem*, 287, 18781-18787.
- Fujikawa, M., Ohsakaya, S., Sugawara, K. & Yoshida, M. 2014. Population of ATP synthase molecules in mitochondria is limited by available 6.8-kDa proteolipid protein (MLQ). *Genes Cells*, 19, 153-60.
- Fujikawa, M., Sugawara, K., Tanabe, T. & Yoshida, M. 2015. Assembly of human mitochondrial ATP synthase through two separate intermediates, F1-c-ring and b-e-g complex. *FEBS Lett*, 589, 2707-12.
- Galli, S., Antico Arciuch, V. G., Poderoso, C., Converso, D. P., Zhou, Q., Bal De Kier Joffe, E., Cadenas, E., Boczkowski, J., Carreras, M. C. & Poderoso, J. J. 2008. Tumor cell phenotype is sustained by selective MAPK oxidation in mitochondria. *PLoS One*, 3, e2379.
- Galluzzi, L., Kepp, O., Tajeddine, N. & Kroemer, G. 2008. Disruption of the hexokinase-VDAC complex for tumor therapy. *Oncogene*, 27, 4633-5.
- Gao, Y. X., Chen, L., Hu, X. G., Wu, H. B., Cui, Y. H., Zhang, X., Wang, Y., Liu, X. D. & Bian, X. W. 2016. ATPase inhibitory factor 1 expression is an independent prognostic factor in non-small cell lung cancer. *Am J Cancer Res*, 6, 1141-8.
- Garcia-Bermudez, J. & Cuezva, J. M. 2016. The ATPase Inhibitory Factor 1 (IF1): A master regulator of energy metabolism and of cell survival. *Biochim Biophys Acta*, 1857, 1167-1182.
- Garcia-Bermudez, J., Sanchez-Arago, M., Soldevilla, B., Del Arco, A., Nuevo-Tapioles, C. & Cuezva, J. M. 2015. PKA Phosphorylates the ATPase Inhibitory Factor 1 and Inactivates Its Capacity to Bind and Inhibit the Mitochondrial H-ATP Synthase. *Cell Rep*, 12, 2143-2155.
- García-Bermúdez, J. N.-T., C. And Cuezva, J.M. 2016. Determination of the H⁺-ATP Synthase and Hydrolytic Activities. *Bio-protocol*, 6, e1905.
- Garcia-Ledo, L., Nuevo-Tapioles, C., Cuevas-Martin, C., Martinez-Reyes, I., Soldevilla, B., Gonzalez-Llorente, L. & Cuezva, J. M. 2017. Overexpression of the ATPase Inhibitory Factor 1 Favors a Non-metastatic Phenotype in Breast Cancer. *Front Oncol*, 7, 69.
- Gasser, T. 2004. Genetics of Parkinson's disease. *Dialogues Clin Neurosci*, 6, 295-301.
- Gaude, E. & Frezza, C. 2014. Defects in mitochondrial metabolism and cancer. *Cancer Metab*, 2, 10.
- Gautier, C. A., Kitada, T. & Shen, J. 2008. Loss of PINK1 causes mitochondrial functional defects and increased sensitivity to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 11364-9.
- Gehrke, S., Wu, Z., Klinkenberg, M., Sun, Y., Auburger, G., Guo, S. & Lu, B. 2015. PINK1 and Parkin control localized translation of respiratory chain component mRNAs on mitochondria outer membrane. *Cell Metab*, 21, 95-108.
- Gellad, Z. F. & Provenzale, D. 2010. Colorectal cancer: national and international perspective on the burden of disease and public health impact. *Gastroenterology*, 138, 2177-90.
- Genoux, A., Lichtenstein, L., Ferrieres, J., Duparc, T., Bongard, V., Vervueren, P. L., Combes, G., Taraszkiwicz, D., Elbaz, M., Galinier, M., Nassar, B., Ruidavets, J. B., Perret, B. & Martinez, L. O. 2016. Serum levels of mitochondrial inhibitory factor 1 are independently associated with long-term prognosis in coronary artery disease: the GENES Study. *BMC Med*, 14, 125.
- Gerbeth, C., Schmidt, O., Rao, S., Harbauer, A. B., Mikropoulou, D., Opalinska, M., Guiard, B., Pfanner, N. & Meisinger, C. 2013. Glucose-induced regulation of protein import receptor Tom22 by cytosolic and mitochondria-bound kinases. *Cell Metab*, 18, 578-87.
- Gillan, L., Matei, D., Fishman, D. A., Gerbin, C. S., Karlan, B. Y. & Chang, D. D. 2002. Periostin secreted by epithelial ovarian carcinoma is a ligand for alpha(V)beta(3) and alpha(V)beta(5) integrins and promotes cell motility. *Cancer Res*, 62, 5358-64.

- Giorgio, V., Fogolari, F., Lippe, G. & Bernardi, P. 2018a. OSCP subunit of mitochondrial ATP synthase: role in regulation of enzyme function and of its transition to a pore. *Br J Pharmacol*.
- Giorgio, V., Guo, L., Bassot, C., Petronilli, V. & Bernardi, P. 2018b. Calcium and regulation of the mitochondrial permeability transition. *Cell Calcium*, 70, 56-63.
- Giorgio, V., Von Stockum, S., Antoniel, M., Fabbro, A., Fogolari, F., Forte, M., Glick, G. D., Petronilli, V., Zoratti, M., Szabo, I., Lippe, G. & Bernardi, P. 2013. Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 5887-92.
- Glancy, B. & Balaban, R. S. 2012. Role of mitochondrial Ca²⁺ in the regulation of cellular energetics. *Biochemistry*, 51, 2959-73.
- Glater, E. E., Megeath, L. J., Stowers, R. S. & Schwarz, T. L. 2006. Axonal transport of mitochondria requires Milton to recruit kinesin heavy chain and is light chain independent. *J Cell Biol*, 173, 545-57.
- Gledhill, J. R., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. & Walker, J. E. 2007. How the regulatory protein, IF(1), inhibits F(1)-ATPase from bovine mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 15671-6.
- Godbole, M., Togar, T., Patel, K., Dharavath, B., Yadav, N., Janjuha, S., Gardi, N., Tiwary, K., Terwadkar, P., Desai, S., Prasad, R., Dhamne, H., Karve, K., Salunkhe, S., Kawle, D., Chandrani, P., Dutt, S., Gupta, S., Badwe, R. A. & Dutt, A. 2018. Up-regulation of the kinase gene SGK1 by progesterone activates the AP-1-NDRG1 axis in both PR-positive and -negative breast cancer cells. *J Biol Chem*, 293, 19263-19276.
- Goekjian, P. G. & Jirousek, M. R. 2001. Protein kinase C inhibitors as novel anticancer drugs. *Expert Opin Investig Drugs*, 10, 2117-40.
- Gohil, V. M., Nilsson, R., Belcher-Timme, C. A., Luo, B., Root, D. E. & Mootha, V. K. 2010. Mitochondrial and nuclear genomic responses to loss of LRPPRC expression. *J Biol Chem*, 285, 13742-7.
- Golstein, P. & Kroemer, G. 2007. A multiplicity of cell death pathways. Symposium on apoptotic and non-apoptotic cell death pathways. *EMBO Rep*, 8, 829-33.
- Gomes, L. C., Di Benedetto, G. & Scorrano, L. 2011a. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol*, 13, 589-98.
- Gomes, L. C., Di Benedetto, G. & Scorrano, L. 2011b. Essential amino acids and glutamine regulate induction of mitochondrial elongation during autophagy. *Cell Cycle*, 10, 2635-9.
- Gomez-Chang, E., Espinosa-Garcia, M. T., Olvera-Sanchez, S., Flores-Herrera, O. & Martinez, F. 2014. PKA tightly bound to human placental mitochondria participates in steroidogenesis and is not modified by cAMP. *Placenta*, 35, 748-62.
- Gordon-Smith, D. J., Carbajo, R. J., Yang, J. C., Videler, H., Runswick, M. J., Walker, J. E. & Neuhaus, D. 2001. Solution structure of a C-terminal coiled-coil domain from bovine IF(1): the inhibitor protein of F(1) ATPase. *J Mol Biol*, 308, 325-39.
- Govindarajan, B., Sligh, J. E., Vincent, B. J., Li, M., Canter, J. A., Nickoloff, B. J., Rodenburg, R. J., Smeitink, J. A., Oberley, L., Zhang, Y., Slingerland, J., Arnold, R. S., Lambeth, J. D., Cohen, C., Hilenski, L., Griendling, K., Martinez-Diez, M., Cuezva, J. M. & Arbiser, J. L. 2007. Overexpression of Akt converts radial growth melanoma to vertical growth melanoma. *J Clin Invest*, 117, 719-29.
- Green, D. R., Galluzzi, L. & Kroemer, G. 2014. Cell biology. Metabolic control of cell death. *Science*, 345, 1250256.
- Green, D. R. & Kroemer, G. 2004. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, 305, 626-9.
- Greer, Y. E., Porat-Shliom, N., Nagashima, K., Stuelten, C., Crooks, D., Koparde, V. N., Gilbert, S. F., Islam, C., Ubaldini, A., Ji, Y., Gattinoni, L., Soheilian, F., Wang, X., Hafner, M., Shetty, J., Tran, B., Jailwala, P., Cam, M., Lang, M., Voeller, D., Reinhold, W. C., Rajapakse, V.,

Bibliografía

- Pommier, Y., Weigert, R., Linehan, W. M. & Lipkowitz, S. 2018. ONC201 kills breast cancer cells in vitro by targeting mitochondria. *Oncotarget*, 9, 18454-18479.
- Griss, T., Vincent, E. E., Egnatchik, R., Chen, J., Ma, E. H., Faubert, B., Viollet, B., Deberardinis, R. J. & Jones, R. G. 2015. Metformin Antagonizes Cancer Cell Proliferation by Suppressing Mitochondrial-Dependent Biosynthesis. *PLoS Biol*, 13, e1002309.
- Guaras, A., Perales-Clemente, E., Calvo, E., Acin-Perez, R., Loureiro-Lopez, M., Pujol, C., Martinez-Carrascoso, I., Nunez, E., Garcia-Marques, F., Rodriguez-Hernandez, M. A., Cortes, A., Diaz, F., Perez-Martos, A., Moraes, C. T., Fernandez-Silva, P., Trifunovic, A., Navas, P., Vazquez, J. & Enriquez, J. A. 2016. The CoQH2/CoQ Ratio Serves as a Sensor of Respiratory Chain Efficiency. *Cell Rep*, 15, 197-209.
- Guaras, A. M. & Enriquez, J. A. 2017. Building a Beautiful Beast: Mammalian Respiratory Complex I. *Cell Metab*, 25, 4-5.
- Guo, J. Y., Chen, H. Y., Mathew, R., Fan, J., Strohecker, A. M., Karsli-Uzunbas, G., Kamphorst, J. J., Chen, G., Lemons, J. M., Karantza, V., Collier, H. A., Dipaola, R. S., Gelinas, C., Rabinowitz, J. D. & White, E. 2011. Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Dev*, 25, 460-70.
- Guo, R., Zong, S., Wu, M., Gu, J. & Yang, M. 2017. Architecture of Human Mitochondrial Respiratory Megacomplex I2III2IV2. *Cell*, 170, 1247-1257 e12.
- Hackenbrock, C. R., Chazotte, B. & Gupte, S. S. 1986. The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J Bioenerg Biomembr*, 18, 331-68.
- Hahn, A., Parey, K., Bublitz, M., Mills, D. J., Zickermann, V., Vonck, J., Kuhlbrandt, W. & Meier, T. 2016. Structure of a Complete ATP Synthase Dimer Reveals the Molecular Basis of Inner Mitochondrial Membrane Morphology. *Mol Cell*, 63, 445-56.
- Hamanaka, R. B. & Chandel, N. S. 2012. Targeting glucose metabolism for cancer therapy. *J Exp Med*, 209, 211-5.
- Han, X., He, L., Xin, L., Shan, B. & Ma, B. 2011. PeaksPTM: Mass spectrometry-based identification of peptides with unspecified modifications. *J Proteome Res*, 10, 2930-6.
- Han, Y., Ma, B. & Zhang, K. 2004. SPIDER: software for protein identification from sequence tags with de novo sequencing error. *Proc IEEE Comput Syst Bioinform Conf*, 206-15.
- Handy, D. E. & Loscalzo, J. 2012. Redox regulation of mitochondrial function. *Antioxid Redox Signal*, 16, 1323-67.
- Harada, H., Becknell, B., Wilm, M., Mann, M., Huang, L. J., Taylor, S. S., Scott, J. D. & Korsmeyer, S. J. 1999. Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A. *Mol Cell*, 3, 413-22.
- Harbeck, N. & Gnant, M. 2017. Breast cancer. *Lancet*, 389, 1134-1150.
- Harmel, J., Ruzzenente, B., Terzioglu, M., Spahr, H., Falkenberg, M. & Larsson, N. G. 2013. The leucine-rich pentatricopeptide repeat-containing protein (LRPPRC) does not activate transcription in mammalian mitochondria. *J Biol Chem*, 288, 15510-9.
- Harner, M., Korner, C., Walther, D., Mokranjac, D., Kaesmacher, J., Welsch, U., Griffith, J., Mann, M., Reggiori, F. & Neupert, W. 2011. The mitochondrial contact site complex, a determinant of mitochondrial architecture. *EMBO J*, 30, 4356-70.
- Hashimoto, T., Negawa, Y. & Tagawa, K. 1981. Binding of intrinsic ATPase inhibitor to mitochondrial ATPase--stoichiometry of binding of nucleotides, inhibitor, and enzyme. *J Biochem*, 90, 1151-7.
- Hatefi, Y. 1985. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu Rev Biochem*, 54, 1015-69.
- Hay, N. 2016. Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? *Nat Rev Cancer*, 16, 635-49.
- Hayashi, T., Rizzuto, R., Hajnoczky, G. & Su, T. P. 2009. MAM: more than just a housekeeper. *Trends Cell Biol*, 19, 81-8.

- Haynes, C. M. & Ron, D. 2010. The mitochondrial UPR - protecting organelle protein homeostasis. *J Cell Sci*, 123, 3849-55.
- He, J., Carroll, J., Ding, S., Fearnley, I. M. & Walker, J. E. 2017. Permeability transition in human mitochondria persists in the absence of peripheral stalk subunits of ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114, 9086-9091.
- He, J., Ford, H. C., Carroll, J., Douglas, C., Gonzales, E., Ding, S., Fearnley, I. M. & Walker, J. E. 2018. Assembly of the membrane domain of ATP synthase in human mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115, 2988-2993.
- Hebert-Chatelain, E., Jose, C., Gutierrez Cortes, N., Dupuy, J. W., Rocher, C., Dachary-Prigent, J. & Letellier, T. 2012. Preservation of NADH ubiquinone-oxidoreductase activity by Src kinase-mediated phosphorylation of NDUFB10. *Biochim Biophys Acta*, 1817, 718-25.
- Hernandez-Resendiz, S. & Zazueta, C. 2014. PHO-ERK1/2 interaction with mitochondria regulates the permeability transition pore in cardioprotective signaling. *Life Sci*, 108, 13-21.
- Herrmann, J. M. & Neupert, W. 2003. Protein insertion into the inner membrane of mitochondria. *IUBMB Life*, 55, 219-25.
- Hollenbeck, P. J. & Saxton, W. M. 2005. The axonal transport of mitochondria. *J Cell Sci*, 118, 5411-9.
- Holmstrom, K. M. & Finkel, T. 2014. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15, 411-21.
- Hoppins, S., Lackner, L. & Nunnari, J. 2007. The machines that divide and fuse mitochondria. *Annu Rev Biochem*, 76, 751-80.
- Hu, C., Huang, Y. & Li, L. 2017. Drp1-Dependent Mitochondrial Fission Plays Critical Roles in Physiological and Pathological Progresses in Mammals. *Int J Mol Sci*, 18.
- Huang, L. J., Chuang, I. C., Dong, H. P. & Yang, R. C. 2011. Hypoxia-inducible factor 1 α regulates the expression of the mitochondrial ATPase inhibitor protein (IF1) in rat liver. *Shock*, 36, 90-6.
- Hunte, C., Zickermann, V. & Brandt, U. 2010. Functional modules and structural basis of conformational coupling in mitochondrial complex I. *Science*, 329, 448-51.
- Icard, P., Shulman, S., Farhat, D., Steyaert, J. M., Alifano, M. & Lincet, H. 2018. How the Warburg effect supports aggressiveness and drug resistance of cancer cells? *Drug Resist Updat*, 38, 1-11.
- Ichikawa, N., Ando, C. & Fumino, M. 2006. Caenorhabditis elegans MAI-1 protein, which is similar to mitochondrial ATPase inhibitor (IF1), can inhibit yeast FOF1-ATPase but cannot be transported to yeast mitochondria. *J Bioenerg Biomembr*, 38, 93-9.
- Iommarini, L., Calvaruso, M. A., Kurelac, I., Gasparre, G. & Porcelli, A. M. 2013. Complex I impairment in mitochondrial diseases and cancer: parallel roads leading to different outcomes. *Int J Biochem Cell Biol*, 45, 47-63.
- Iommarini, L., Kurelac, I., Capristo, M., Calvaruso, M. A., Giorgio, V., Bergamini, C., Ghelli, A., Nanni, P., De Giovanni, C., Carelli, V., Fato, R., Lollini, P. L., Rugolo, M., Gasparre, G. & Porcelli, A. M. 2014. Different mtDNA mutations modify tumor progression in dependence of the degree of respiratory complex I impairment. *Hum Mol Genet*, 23, 1453-66.
- Ito, Y., Mishra, N. C., Yoshida, K., Kharbanda, S., Saxena, S. & Kufe, D. 2001a. Mitochondrial targeting of JNK/SAPK in the phorbol ester response of myeloid leukemia cells. *Cell Death Differ*, 8, 794-800.
- Ito, Y., Pandey, P., Mishra, N., Kumar, S., Narula, N., Kharbanda, S., Saxena, S. & Kufe, D. 2001b. Targeting of the c-Abl tyrosine kinase to mitochondria in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*, 21, 6233-42.
- Itoh, S., Lemay, S., Osawa, M., Che, W., Duan, Y., Tompkins, A., Brookes, P. S., Sheu, S. S. & Abe, J. 2005. Mitochondrial Dok-4 recruits Src kinase and regulates NF-kappaB activation in endothelial cells. *J Biol Chem*, 280, 26383-96.

Bibliografia

- 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*, 281, 64-71.
- Izquierdo, J. M., Ricart, J., Ostronoff, L. K., Egea, G. & Cuezva, J. M. 1995. Changing patterns of transcriptional and post-transcriptional control of beta-F1-ATPase gene expression during mitochondrial biogenesis in liver. *J Biol Chem*, 270, 10342-50.
- Jaburek, M., Costa, A. D., Burton, J. R., Costa, C. L. & Garlid, K. D. 2006. Mitochondrial PKC epsilon and mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel copurify and coreconstitute to form a functioning signaling module in proteoliposomes. *Circ Res*, 99, 878-83.
- Jeon, M., You, D., Bae, S. Y., Kim, S. W., Nam, S. J., Kim, H. H., Kim, S. & Lee, J. E. 2016. Dimerization of EGFR and HER2 induces breast cancer cell motility through STAT1-dependent ACTA2 induction. *Oncotarget*.
- Johnston, S. R., Dowsett, M. & Smith, I. E. 1992. Towards a molecular basis for tamoxifen resistance in breast cancer. *Ann Oncol*, 3, 503-11.
- Juhaszova, M., Zorov, D. B., Kim, S. H., Pepe, S., Fu, Q., Fishbein, K. W., Ziman, B. D., Wang, S., Ytrehus, K., Antos, C. L., Olson, E. N. & Sollott, S. J. 2004. Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest*, 113, 1535-49.
- Kahancova, A., Sklenar, F., Jezek, P. & Dlaskova, A. 2018. Regulation of glucose-stimulated insulin secretion by ATPase Inhibitory Factor 1 (IF1). *FEBS Lett*, 592, 999-1009.
- Kalluri, R. & Weinberg, R. A. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, 119, 1420-8.
- Keilin, D. & Hartree, E. F. 1947. Activity of the cytochrome system in heart muscle preparations. *Biochem J*, 41, 500-2.
- Khan, M. U., Zhao, W., Zhao, T., Al Darazi, F., Ahokas, R. A., Sun, Y., Bhattacharya, S. K., Gerling, I. C. & Weber, K. T. 2013. Nebivolol: a multifaceted antioxidant and cardioprotectant in hypertensive heart disease. *J Cardiovasc Pharmacol*, 62, 445-51.
- Kim, H., Komiyama, T., Inomoto, C., Kamiguchi, H., Kajiwara, H., Kobayashi, H., Nakamura, N. & Terachi, T. 2016. Mutations in the Mitochondrial ND1 Gene Are Associated with Postoperative Prognosis of Localized Renal Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci*, 17.
- Kioka, H., Kato, H., Fujikawa, M., Tsukamoto, O., Suzuki, T., Imamura, H., Nakano, A., Higo, S., Yamazaki, S., Matsuzaki, T., Takafuji, K., Asanuma, H., Asakura, M., Minamino, T., Shintani, Y., Yoshida, M., Noji, H., Kitakaze, M., Komuro, I., Asano, Y. & Takashima, S. 2014. Evaluation of intramitochondrial ATP levels identifies G0/G1 switch gene 2 as a positive regulator of oxidative phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 273-8.
- Kondoh, H., Leonart, M. E., Nakashima, Y., Yokode, M., Tanaka, M., Bernard, D., Gil, J. & Beach, D. 2007. A high glycolytic flux supports the proliferative potential of murine embryonic stem cells. *Antioxid Redox Signal*, 9, 293-9.
- Kontro, H., Cannino, G., Rustin, P., Dufour, E. & Kainulainen, H. 2015. DAPIT Over-Expression Modulates Glucose Metabolism and Cell Behaviour in HEK293T Cells. *PLoS One*, 10, e0131990.
- Kontro, H., Hulmi, J. J., Rahkila, P. & Kainulainen, H. 2012. Cellular and tissue expression of DAPIT, a phylogenetically conserved peptide. *Eur J Histochem*, 56, e18.
- Kordes, S., Pollak, M. N., Zwinderman, A. H., Mathot, R. A., Weterman, M. J., Beeker, A., Punt, C. J., Richel, D. J. & Wilmink, J. W. 2015. Metformin in patients with advanced pancreatic cancer: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 16, 839-47.
- Kornmann, B., Currie, E., Collins, S. R., Schuldiner, M., Nunnari, J., Weissman, J. S. & Walter, P. 2009. An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science*, 325, 477-81.
- Kornmann, B. & Walter, P. 2010. ERMES-mediated ER-mitochondria contacts: molecular hubs for the regulation of mitochondrial biology. *J Cell Sci*, 123, 1389-93.

- Kroemer, G. 2007. Cancer: defeating the immortal. *Cancer Biol Ther*, 6, 1324-8.
- Kuhlbrandt, W. 2015. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biol*, 13, 89.
- Kurbasic, E., Sjostrom, M., Krogh, M., Folkesson, E., Grabau, D., Hansson, K., Ryden, L., Waldemarson, S., James, P. & Nimeus, E. 2015. Changes in glycoprotein expression between primary breast tumour and synchronous lymph node metastases or asynchronous distant metastases. *Clin Proteomics*, 12, 13.
- Kurelac, I., Mackay, A., Lambros, M. B., Di Cesare, E., Cenacchi, G., Ceccarelli, C., Morra, I., Melcarne, A., Morandi, L., Calabrese, F. M., Attimonelli, M., Tallini, G., Reis-Filho, J. S. & Gasparre, G. 2013. Somatic complex I disruptive mitochondrial DNA mutations are modifiers of tumorigenesis that correlate with low genomic instability in pituitary adenomas. *Hum Mol Genet*, 22, 226-38.
- Kusmaul, L. & Hirst, J. 2006. The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 7607-12.
- 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. *Neuromuscul Disord*, 12, 49-52.
- Lane, N. 2008. Mitochondria and the W chromosome: low variability on the W chromosome in birds is more likely to indicate selection on mitochondrial genes. *Heredity (Edinb)*, 100, 444-5.
- Lapiente-Brun, E., Moreno-Loshuertos, R., Acin-Perez, R., Latorre-Pellicer, A., Colas, C., Balsa, E., Perales-Clemente, E., Quiros, P. M., Calvo, E., Rodriguez-Hernandez, M. A., Navas, P., Cruz, R., Carracedo, A., Lopez-Otin, C., Perez-Martos, A., Fernandez-Silva, P., Fernandez-Vizarrá, E. & Enriquez, J. A. 2013. Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science*, 340, 1567-70.
- Lebert, J. M., Lester, R., Powell, E., Seal, M. & Mccarthy, J. 2018. Advances in the systemic treatment of triple-negative breast cancer. *Curr Oncol*, 25, S142-S150.
- Lebleu, V. S., O'connell, J. T., Gonzalez Herrera, K. N., Wikman, H., Pantel, K., Haigis, M. C., De Carvalho, F. M., Damascena, A., Domingos Chinen, L. T., Rocha, R. M., Asara, J. M. & Kalluri, R. 2014. PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. *Nat Cell Biol*, 16, 992-1003, 1-15.
- Lee, I., Salomon, A. R., Ficarro, S., Mathes, I., Lottspeich, F., Grossman, L. I. & Huttemann, M. 2005. cAMP-dependent tyrosine phosphorylation of subunit I inhibits cytochrome c oxidase activity. *J Biol Chem*, 280, 6094-100.
- Lee, J., Ding, S., Walpole, T. B., Holding, A. N., Montgomery, M. G., Fearnley, I. M. & Walker, J. E. 2015. Organization of Subunits in the Membrane Domain of the Bovine F-ATPase Revealed by Covalent Cross-linking. *J Biol Chem*, 290, 13308-20.
- Lefebvre, V., Du, Q., Baird, S., Ng, A. C., Nascimento, M., Campanella, M., McBride, H. M. & Screatón, R. A. 2013. Genome-wide RNAi screen identifies ATPase inhibitory factor 1 (ATPIF1) as essential for PARK2 recruitment and mitophagy. *Autophagy*, 9, 1770-1779.
- Lenaz, G. & Genova, M. L. 2010. Structure and organization of mitochondrial respiratory complexes: a new understanding of an old subject. *Antioxid Redox Signal*, 12, 961-1008.
- Letts, J. A., Fiedorczuk, K. & Sazanov, L. A. 2016. The architecture of respiratory supercomplexes. *Nature*, 537, 644-648.
- Levine, B. & Kroemer, G. 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132, 27-42.
- Li, L. D., Sun, H. F., Liu, X. X., Gao, S. P., Jiang, H. L., Hu, X. & Jin, W. 2015. Down-Regulation of NDUFB9 Promotes Breast Cancer Cell Proliferation, Metastasis by Mediating Mitochondrial Metabolism. *PLoS One*, 10, e0144441.
- Li, R. J., Zhang, G. S., Chen, Y. H., Zhu, J. F., Lu, Q. J., Gong, F. J. & Kuang, W. Y. 2010. Down-regulation of mitochondrial ATPase by hypermethylation mechanism in chronic myeloid leukemia is associated with multidrug resistance. *Ann Oncol*, 7, 1506-14.

Bibliografia

- Liang, X., Lan, C., Zhou, J., Fu, W., Long, X., An, Y., Jiao, G., Wang, K., Li, Y., Xu, J., Huang, Q., Xu, B. & Xiao, J. 2017. Development of a new analog of SGK1 inhibitor and its evaluation as a therapeutic molecule of colorectal cancer. *J Cancer*, 8, 2256-2262.
- Liesa, M. & Shirihai, O. S. 2013. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab*, 17, 491-506.
- Lim, S., Smith, K. R., Lim, S. T., Tian, R., Lu, J. & Tan, M. 2016. Regulation of mitochondrial functions by protein phosphorylation and dephosphorylation. *Cell Biosci*, 6, 25.
- Liu, S., Sawada, T., Lee, S., Yu, W., Silverio, G., Alapatt, P., Millan, I., Shen, A., Saxton, W., Kanao, T., Takahashi, R., Hattori, N., Imai, Y. & Lu, B. 2012. Parkinson's disease-associated kinase PINK1 regulates Miro protein level and axonal transport of mitochondria. *PLoS Genet*, 8, e1002537.
- Liu, T., Kan, X. F., Ma, C., Chen, L. L., Cheng, T. T., Zou, Z. W., Li, Y., Cao, F. J., Zhang, W. J., Yao, J. & Li, P. D. 2017. GPX2 overexpression indicates poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol*, 39, 1010428317700410.
- Livingstone, E., Swann, S., Lilla, C., Schadendorf, D. & Roesch, A. 2015. Combining BRAF(V) (600E) inhibition with modulators of the mitochondrial bioenergy metabolism to overcome drug resistance in metastatic melanoma. *Exp Dermatol*, 24, 709-10.
- Llorente-Folch, I., Rueda, C. B., Pardo, B., Szabadkai, G., Duchen, M. R. & Satrustegui, J. 2015. The regulation of neuronal mitochondrial metabolism by calcium. *J Physiol*, 593, 3447-62.
- Lo-Coco, F., Avvisati, G., Vignetti, M., Thiede, C., Orlando, S. M., Iacobelli, S., Ferrara, F., Fazi, P., Cicconi, L., Di Bona, E., Specchia, G., Sica, S., Divona, M., Levis, A., Fiedler, W., Cerqui, E., Breccia, M., Fioritoni, G., Salih, H. R., Cazzola, M., Melillo, L., Carella, A. M., Brandts, C. H., Morra, E., Von Lilienfeld-Toal, M., Hertenstein, B., Wattad, M., Lubbert, M., Hanel, M., Schmitz, N., Link, H., Kropp, M. G., Rambaldi, A., La Nasa, G., Luppi, M., Ciceri, F., Finizio, O., Venditti, A., Fabbiano, F., Dohner, K., Sauer, M., Ganser, A., Amadori, S., Mandelli, F., Dohner, H., Ehninger, G., Schlenk, R. F., Platzbecker, U., Gruppo Italiano Malattie Ematologiche, D. A., German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study, G. & Study Alliance, L. 2013. Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med*, 369, 111-21.
- Lobo-Jarne, T. & Ugalde, C. 2018. Respiratory chain supercomplexes: Structures, function and biogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 76, 179-190.
- Logan, D. C. 2007. The mitochondrial compartment. *J Exp Bot*, 58, 1225-43.
- Longley, D. B., Harkin, D. P. & Johnston, P. G. 2003. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*, 3, 330-8.
- Lopez-Crisosto, C., Bravo-Sagua, R., Rodriguez-Pena, M., Mera, C., Castro, P. F., Quest, A. F., Rothermel, B. A., Cifuentes, M. & Lavandero, S. 2015. ER-to-mitochondria miscommunication and metabolic diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1852, 2096-105.
- Lopez-Fabuel, I., Le Douce, J., Logan, A., James, A. M., Bonvento, G., Murphy, M. P., Almeida, A. & Bolanos, J. P. 2016. Complex I assembly into supercomplexes determines differential mitochondrial ROS production in neurons and astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, 13063-13068.
- Lopez-Mediavilla, C., Vigny, H. & Godinot, C. 1993. Docking the mitochondrial inhibitor protein IF1 to a membrane receptor different from the F1-ATPase beta subunit. *Eur J Biochem*, 215, 487-96.
- Luengo, A., Gui, D. Y. & Vander Heiden, M. G. 2017. Targeting Metabolism for Cancer Therapy. *Cell Chem Biol*, 24, 1161-1180.
- Lundby, A., Lage, K., Weinert, B. T., Bekker-Jensen, D. B., Secher, A., Skovgaard, T., Kelstrup, C. D., Dmytriyev, A., Choudhary, C., Lundby, C. & Olsen, J. V. 2012. Proteomic analysis of lysine acetylation sites in rat tissues reveals organ specificity and subcellular patterns. *Cell Rep*, 2, 419-31.

- Lutz, A. K., Exner, N., Fett, M. E., Schlehe, J. S., Kloos, K., Lammermann, K., Brunner, B., Kurz-Drexler, A., Vogel, F., Reichert, A. S., Bouman, L., Vogt-Weisenhorn, D., Wurst, W., Tatzelt, J., Haass, C. & Winklhofer, K. F. 2009. Loss of parkin or PINK1 function increases Drp1-dependent mitochondrial fragmentation. *J Biol Chem*, 284, 22938-51.
- Lytovchenko, O., Naumenko, N., Oeljeklaus, S., Schmidt, B., Von Der Malsburg, K., Deckers, M., Warscheid, B., Van Der Laan, M. & Rehling, P. 2014. The INA complex facilitates assembly of the peripheral stalk of the mitochondrial F1Fo-ATP synthase. *EMBO J*, 33, 1624-38.
- Ma, M. P. & Thomson, M. 2012. Protein Kinase A Subunit alpha Catalytic and A Kinase Anchoring Protein 79 in Human Placental Mitochondria. *Open Biochem J*, 6, 23-30.
- Majewski, N., Nogueira, V., Robey, R. B. & Hay, N. 2004. Akt inhibits apoptosis downstream of BID cleavage via a glucose-dependent mechanism involving mitochondrial hexokinases. *Mol Cell Biol*, 24, 730-40.
- Mannella, C. A. 2000. Introduction: our changing views of mitochondria. *J Bioenerg Biomembr*, 32, 1-4.
- Mansley, M. K., Watt, G. B., Francis, S. L., Walker, D. J., Land, S. C., Bailey, M. A. & Wilson, S. M. 2016. Dexamethasone and insulin activate serum and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1) via different molecular mechanisms in cortical collecting duct cells. *Physiol Rep*, 4.
- 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. *Antioxid Redox Signal*, 19, 1469-80.
- Marchi, S., Patergnani, S. & Pinton, P. 2014. The endoplasmic reticulum-mitochondria connection: one touch, multiple functions. *Biochim Biophys Acta*, 1837, 461-9.
- Mashek, G., Savaraj, N., Priebe, W., Braunschweiger, P., Hamilton, K., Tidmarsh, G. F., De Young, L. R. & Lampidis, T. J. 2004. 2-deoxy-D-glucose increases the efficacy of adriamycin and paclitaxel in human osteosarcoma and non-small cell lung cancers in vivo. *Cancer Res*, 64, 31-4.
- Masur, K., Niggemann, B., Zanker, K. S. & Entschladen, F. 2001. Norepinephrine-induced migration of SW 480 colon carcinoma cells is inhibited by beta-blockers. *Cancer Res*, 61, 2866-9.
- Matsuyama, S., Xu, Q., Velours, J. & Reed, J. C. 1998. The Mitochondrial F0F1-ATPase proton pump is required for function of the proapoptotic protein Bax in yeast and mammalian cells. *Mol Cell*, 1, 327-36.
- Melhem-Bertrandt, A., Chavez-Macgregor, M., Lei, X., Brown, E. N., Lee, R. T., Meric-Bernstam, F., Sood, A. K., Conzen, S. D., Hortobagyi, G. N. & Gonzalez-Angulo, A. M. 2011. Beta-blocker use is associated with improved relapse-free survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*, 29, 2645-52.
- Merrill, R. A. & Strack, S. 2014. Mitochondria: a kinase anchoring protein 1, a signaling platform for mitochondrial form and function. *Int J Biochem Cell Biol*, 48, 92-6.
- Metelkin, E., Goryanin, I. & Demin, O. 2006. Mathematical modeling of mitochondrial adenine nucleotide translocase. *Biophys J*, 90, 423-32.
- Milenkovic, D., Blaza, J. N., Larsson, N. G. & Hirst, J. 2017. The Enigma of the Respiratory Chain Supercomplex. *Cell Metab*, 25, 765-776.
- Mills, E. L., Kelly, B., Logan, A., Costa, A. S. H., Varma, M., Bryant, C. E., Tournalousis, P., Dabritz, J. H. M., Gottlieb, E., Latorre, I., Corr, S. C., Mcmanus, G., Ryan, D., Jacobs, H. T., Szibor, M., Xavier, R. J., Braun, T., Frezza, C., Murphy, M. P. & O'Neill, L. A. 2016. Succinate Dehydrogenase Supports Metabolic Repurposing of Mitochondria to Drive Inflammatory Macrophages. *Cell*, 167, 457-470 e13.
- Mitchell, P. 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 191, 144-8.

Bibliografia

- Mitchell, P. & Moyle, J. 1965. Evidence discriminating between the chemical and the chemiosmotic mechanisms of electron transport phosphorylation. *Nature*, 208, 1205-6.
- Miyamoto, S., Murphy, A. N. & Brown, J. H. 2008. Akt mediates mitochondrial protection in cardiomyocytes through phosphorylation of mitochondrial hexokinase-II. *Cell Death Differ*, 15, 521-9.
- Miyazaki, T., Neff, L., Tanaka, S., Horne, W. C. & Baron, R. 2003. Regulation of cytochrome c oxidase activity by c-Src in osteoclasts. *J Cell Biol*, 160, 709-18.
- Miyoshi, H., Inoue, M., Okamoto, S., Ohshima, M., Sakamoto, K. & Iwamura, H. 1997. Probing the ubiquinone reduction site of mitochondrial complex I using novel cationic inhibitors. *J Biol Chem*, 272, 16176-83.
- Molina, A. J., Wikstrom, J. D., Stiles, L., Las, G., Mohamed, H., Elorza, A., Walzer, G., Twig, G., Katz, S., Corkey, B. E. & Shirihai, O. S. 2009. Mitochondrial networking protects beta-cells from nutrient-induced apoptosis. *Diabetes*, 58, 2303-15.
- Monick, M. M., Powers, L. S., Barrett, C. W., Hinde, S., Ashare, A., Groskreutz, D. J., Nyunoya, T., Coleman, M., Spitz, D. R. & Hunninghake, G. W. 2008. Constitutive ERK MAPK activity regulates macrophage ATP production and mitochondrial integrity. *J Immunol*, 180, 7485-96.
- Mootha, V. K., Bunkenborg, J., Olsen, J. V., Hjerrild, M., Wisniewski, J. R., Stahl, E., Bolouri, M. S., Ray, H. N., Sihag, S., Kamal, M., Patterson, N., Lander, E. S. & Mann, M. 2003a. Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria. *Cell*, 115, 629-40.
- 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. 2003b. Identification of a gene causing human cytochrome c oxidase deficiency by integrative genomics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 605-10.
- Morais, V. A., Verstreken, P., Roethig, A., Smet, J., Snellinx, A., Vanbrabant, M., Haddad, D., Frezza, C., Mandemakers, W., Vogt-Weisenhorn, D., Van Coster, R., Wurst, W., Scorrano, L. & De Strooper, B. 2009. Parkinson's disease mutations in PINK1 result in decreased Complex I activity and deficient synaptic function. *EMBO Mol Med*, 1, 99-111.
- Moran, M., Marin-Buera, L., Gil-Borlado, M. C., Rivera, H., Blazquez, A., Seneca, S., Vazquez-Lopez, M., Arenas, J., Martin, M. A. & Ugalde, C. 2010. Cellular pathophysiological consequences of BCS1L mutations in mitochondrial complex III enzyme deficiency. *Hum Mutat*, 31, 930-41.
- Morgan, J. B., Liu, Y., Coothankandaswamy, V., Mahdi, F., Jekabsons, M. B., Gerwick, W. H., Valeriote, F. A., Zhou, Y. D. & Nagle, D. G. 2015. Kalkitoxin inhibits angiogenesis, disrupts cellular hypoxic signaling, and blocks mitochondrial electron transport in tumor cells. *Mar Drugs*, 13, 1552-68.
- Mourier, A., Ruzzenente, B., Brandt, T., Kuhlbrandt, W. & Larsson, N. G. 2014. Loss of LRPPRC causes ATP synthase deficiency. *Hum Mol Genet*, 23, 2580-92.
- Munzel, T. & Gori, T. 2009. Nebivolol: the somewhat-different beta-adrenergic receptor blocker. *J Am Coll Cardiol*, 54, 1491-9.
- Murphy, M. P. 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*, 417, 1-13.
- Musgrove, E. A. & Sutherland, R. L. 2009. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Cancer*, 9, 631-43.
- Nasir, O., Wang, K., Foller, M., Gu, S., Bhandaru, M., Ackermann, T. F., Boini, K. M., Mack, A., Klingel, K., Amato, R., Perrotti, N., Kuhl, D., Behrens, J., Stournaras, C. & Lang, F. 2009. Relative resistance of SGK1 knockout mice against chemical carcinogenesis. *IUBMB Life*, 61, 768-76.
- Nijboer, C. H., Bonestroo, H. J., Zijlstra, J., Kavelaars, A. & Heijnen, C. J. 2013. Mitochondrial JNK phosphorylation as a novel therapeutic target to inhibit neuroinflammation and apoptosis after neonatal ischemic brain damage. *Neurobiol Dis*, 54, 432-44.

- Nishihara, M., Miura, T., Miki, T., Tanno, M., Yano, T., Naitoh, K., Ohori, K., Hotta, H., Terashima, Y. & Shimamoto, K. 2007. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore complex in GSK-3beta-mediated myocardial protection. *J Mol Cell Cardiol*, 43, 564-70.
- Noguchi, M., Tajiri, K., Taniya, T., Kumaki, T. & Miyazaki, I. 1989. [Influence of endocrine therapy on the proliferation of estrogen (ER) positive cells and ER negative cells of human breast cancer (MCF-7)]. *Nihon Geka Gakkai Zasshi*, 90, 780-5.
- Norling, B., Tourikas, C., Hamasur, B. & Glaser, E. 1990. Evidence for an endogenous ATPase inhibitor protein in plant mitochondria. Purification and characterization. *Eur J Biochem*, 188, 247-52.
- Nowak, G., Clifton, G. L., Godwin, M. L. & Bakajsova, D. 2006. Activation of ERK1/2 pathway mediates oxidant-induced decreases in mitochondrial function in renal cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 291, F840-55.
- O'keeffe, B. A., Cilia, S., Maiyar, A. C., Vaysberg, M. & Firestone, G. L. 2013. The serum- and glucocorticoid-induced protein kinase-1 (Sgk-1) mitochondria connection: identification of the IF-1 inhibitor of the F(1)F(0)-ATPase as a mitochondria-specific binding target and the stress-induced mitochondrial localization of endogenous Sgk-1. *Biochimie*, 95, 1258-65.
- Ogbi, M. & Johnson, J. A. 2006. Protein kinase Cepsilon interacts with cytochrome c oxidase subunit IV and enhances cytochrome c oxidase activity in neonatal cardiac myocyte preconditioning. *Biochem J*, 393, 191-9.
- Ogura, M., Yamaki, J., Homma, M. K. & Homma, Y. 2012. Mitochondrial c-Src regulates cell survival through phosphorylation of respiratory chain components. *Biochem J*, 447, 281-9.
- Ohnuma, Y., Miura, T., Miki, T., Tanno, M., Kuno, A., Tsuchida, A. & Shimamoto, K. 2002. Opening of mitochondrial K(ATP) channel occurs downstream of PKC-epsilon activation in the mechanism of preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 283, H440-7.
- Ohsakaya, S., Fujikawa, M., Hisabori, T. & Yoshida, M. 2011. Knockdown of DAPIT (diabetes-associated protein in insulin-sensitive tissue) results in loss of ATP synthase in mitochondria. *J Biol Chem*, 286, 20292-6.
- Okamoto, K. & Shaw, J. M. 2005. Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu Rev Genet*, 39, 503-36.
- Orrenius, S., Gogvadze, V. & Zhivotovsky, B. 2007. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 47, 143-83.
- Ortega, A. D., Willers, I. M., Sala, S. & Cuezva, J. M. 2010. Human G3BP1 interacts with beta-F1-ATPase mRNA and inhibits its translation. *J Cell Sci*, 123, 2685-96.
- Ostronoff, L. K., Izquierdo, J. M. & Cuezva, J. M. 1995. mt-mRNA stability regulates the expression of the mitochondrial genome during liver development. *Biochem Biophys Res Commun*, 217, 1094-8.
- Owen, M. R., Doran, E. & Halestrap, A. P. 2000. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J*, 348 Pt 3, 607-14.
- Paech, F., Mingard, C., Grunig, D., Abegg, V. F., Bouitbir, J. & Krahenbuhl, S. 2018. Mechanisms of mitochondrial toxicity of the kinase inhibitors ponatinib, regorafenib and sorafenib in human hepatic HepG2 cells. *Toxicology*, 395, 34-44.
- Pagliarini, D. J., Calvo, S. E., Chang, B., Sheth, S. A., Vafai, S. B., Ong, S. E., Walford, G. A., Sugiana, C., Boneh, A., Chen, W. K., Hill, D. E., Vidal, M., Evans, J. G., Thorburn, D. R., Carr, S. A. & Mootha, V. K. 2008. A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell*, 134, 112-23.
- Pagliarini, D. J. & Dixon, J. E. 2006. Mitochondrial modulation: reversible phosphorylation takes center stage? *Trends Biochem Sci*, 31, 26-34.

Bibliografia

- Pagliarini, D. J., Wiley, S. E., Kimple, M. E., Dixon, J. R., Kelly, P., Worby, C. A., Casey, P. J. & Dixon, J. E. 2005. Involvement of a mitochondrial phosphatase in the regulation of ATP production and insulin secretion in pancreatic beta cells. *Mol Cell*, 19, 197-207.
- Pagnozzi, D., Birolo, L., Leo, G., Contessi, S., Lippe, G., Pucci, P. & Mavelli, I. 2010. Stoichiometry and topology of the complex of the endogenous ATP synthase inhibitor protein IF(1) with calmodulin. *Biochemistry*, 49, 7542-52.
- Paivarinne, H. & Kainulainen, H. 2001. DAPIT, a novel protein down-regulated in insulin-sensitive tissues in streptozotocin-induced diabetes. *Acta Diabetol*, 38, 83-6.
- Palade, G. E. 1952. The fine structure of mitochondria. *Anat Rec*, 114, 427-51.
- Palade, G. E. 1953. An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J Histochem Cytochem*, 1, 188-211.
- Panchenko, M. V. & Vinogradov, A. D. 1985. Interaction between the mitochondrial ATP synthetase and ATPase inhibitor protein. Active/inactive slow pH-dependent transitions of the inhibitor protein. *FEBS Lett*, 184, 226-30.
- Panov, A., Dikalov, S., Shalbuyeva, N., Hemendinger, R., Greenamyre, J. T. & Rosenfeld, J. 2007. Species- and tissue-specific relationships between mitochondrial permeability transition and generation of ROS in brain and liver mitochondria of rats and mice. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292, C708-18.
- Papa, S., De Rasmio, D., Scacco, S., Signorile, A., Technikova-Dobrova, Z., Palmisano, G., Sardanelli, A. M., Papa, F., Panelli, D., Scaringi, R. & Santeramo, A. 2008. Mammalian complex I: a regulable and vulnerable pacemaker in mitochondrial respiratory function. *Biochim Biophys Acta*, 1777, 719-28.
- Papa, S., Rasmio, D. D., Technikova-Dobrova, Z., Panelli, D., Signorile, A., Scacco, S., Petruzzella, V., Papa, F., Palmisano, G., Gnoni, A., Micelli, L. & Sardanelli, A. M. 2012. Respiratory chain complex I, a main regulatory target of the cAMP/PKA pathway is defective in different human diseases. *FEBS Lett*, 586, 568-77.
- Papa, S., Sardanelli, A. M., Scacco, S. & Technikova-Dobrova, Z. 1999. cAMP-dependent protein kinase and phosphoproteins in mammalian mitochondria. An extension of the cAMP-mediated intracellular signal transduction. *FEBS Lett*, 444, 245-9.
- Papa, S., Zanotti, F., Cocco, T., Perrucci, C., Candita, C. & Minuto, M. 1996. Identification of functional domains and critical residues in the adenosinetriphosphatase inhibitor protein of mitochondrial FOF1 ATP synthase. *Eur J Biochem*, 240, 461-7.
- Papagerakis, S., Pannone, G., Zheng, L., About, I., Taqi, N., Nguyen, N. P., Matossian, M., Mcalpin, B., Santoro, A., Mchugh, J., Prince, M. E. & Papagerakis, P. 2014. Oral epithelial stem cells - implications in normal development and cancer metastasis. *Exp Cell Res*, 325, 111-29.
- Park, J., Chen, Y., Tishkoff, D. X., Peng, C., Tan, M., Dai, L., Xie, Z., Zhang, Y., Zwaans, B. M., Skinner, M. E., Lombard, D. B. & Zhao, Y. 2013. SIRT5-mediated lysine desuccinylation impacts diverse metabolic pathways. *Mol Cell*, 50, 919-30.
- Partecke, L. I., Speerforck, S., Kading, A., Seubert, F., Kuhn, S., Lorenz, E., Schwandke, S., Sendler, M., Kessler, W., Trung, D. N., Oswald, S., Weiss, F. U., Mayerle, J., Henkel, C., Menges, P., Beyer, K., Lerch, M. M., Heidecke, C. D. & Von Bernstorff, W. 2016. Chronic stress increases experimental pancreatic cancer growth, reduces survival and can be antagonised by beta-adrenergic receptor blockade. *Pancreatology*, 16, 423-33.
- Pasquier, E., Street, J., Pouchy, C., Carre, M., Gifford, A. J., Murray, J., Norris, M. D., Trahair, T., Andre, N. & Kavallaris, M. 2013. beta-blockers increase response to chemotherapy via direct antitumour and anti-angiogenic mechanisms in neuroblastoma. *Br J Cancer*, 108, 2485-94.
- Paumard, P., Arselin, G., Vaillier, J., Chaignepain, S., Bathany, K., Schmitter, J. M., Brethes, D. & Velours, J. 2002. Two ATP synthases can be linked through subunits i in the inner mitochondrial membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*, 41, 10390-6.

- Pedersen, P. L. & Hüllihen, J. 1984. Inhibitor peptide of mitochondrial proton adenosine triphosphatase. Neutralization of its inhibitory action by calmodulin. *J Biol Chem*, 259, 15148-53.
- Perez-Moreno, M., Jamora, C. & Fuchs, E. 2003. Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell*, 112, 535-48.
- Perez, M., Garcia-Limones, C., Zapico, I., Marina, A., Schmitz, M. L., Munoz, E. & Calzado, M. A. 2012. Mutual regulation between SIAH2 and DYRK2 controls hypoxic and genotoxic signaling pathways. *J Mol Cell Biol*, 4, 316-30.
- Perkins, G. A. & Frey, T. G. 2000. Recent structural insight into mitochondria gained by microscopy. *Micron*, 31, 97-111.
- Pernas, L. & Scorrano, L. 2016. Mito-Morphosis: Mitochondrial Fusion, Fission, and Cristae Remodeling as Key Mediators of Cellular Function. *Annu Rev Physiol*, 78, 505-31.
- Perou, C. M., Sorlie, T., Eisen, M. B., Van De Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslén, L. A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lonning, P. E., Borresen-Dale, A. L., Brown, P. O. & Botstein, D. 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406, 747-52.
- Petrelli, F., Coinu, A., Cabiddu, M., Ghilardi, M., Lonati, V. & Barni, S. 2013. Five or more years of adjuvant endocrine therapy in breast cancer: a meta-analysis of published randomised trials. *Breast Cancer Res Treat*, 140, 233-40.
- Pfanner, N. & Meijer, M. 1997. The Tom and Tim machine. *Curr Biol*, 7, R100-3.
- Pfanner, N. & Wiedemann, N. 2002. Mitochondrial protein import: two membranes, three translocases. *Curr Opin Cell Biol*, 14, 400-11.
- Philly, J. V., Kannan, A., Qin, W., Sauter, E. R., Ikebe, M., Hertweck, K. L., Troyer, D. A., Semmes, O. J. & Dasgupta, S. 2016. Complex-I Alteration and Enhanced Mitochondrial Fusion Are Associated With Prostate Cancer Progression. *J Cell Physiol*, 231, 1364-74.
- Picard, M., Mcmanus, M. J., Csordas, G., Varnai, P., Dorn, G. W., 2nd, Williams, D., Hajnoczky, G. & Wallace, D. C. 2015. Trans-mitochondrial coordination of cristae at regulated membrane junctions. *Nat Commun*, 6, 6259.
- Ping, P., Song, C., Zhang, J., Guo, Y., Cao, X., Li, R. C., Wu, W., Vondriska, T. M., Pass, J. M., Tang, X. L., Pierce, W. M. & Bolli, R. 2002. Formation of protein kinase C(epsilon)-Lck signaling modules confers cardioprotection. *J Clin Invest*, 109, 499-507.
- Powe, D. G., Voss, M. J., Zanker, K. S., Habashy, H. O., Green, A. R., Ellis, I. O. & Entschladen, F. 2010. Beta-blocker drug therapy reduces secondary cancer formation in breast cancer and improves cancer specific survival. *Oncotarget*, 1, 628-38.
- Prabu, S. K., Anandatheerthavarada, H. K., Raza, H., Srinivasan, S., Spear, J. F. & Avadhani, N. G. 2006. Protein kinase A-mediated phosphorylation modulates cytochrome c oxidase function and augments hypoxia and myocardial ischemia-related injury. *J Biol Chem*, 281, 2061-70.
- Prieto, J., Seo, A. Y., Leon, M., Santacatterina, F., Torresano, L., Palomino-Schatzlein, M., Gimenez, K., Vallet-Sanchez, A., Ponsoda, X., Pineda-Lucena, A., Cuezva, J. M., Lippincott-Schwartz, J. & Torres, J. 2018. MYC Induces a Hybrid Energetics Program Early in Cell Reprogramming. *Stem Cell Reports*, 11, 1479-1492.
- Pullman, M. E. & Monroy, G. C. 1963. A Naturally Occurring Inhibitor of Mitochondrial Adenosine Triphosphatase. *J Biol Chem*, 238, 3762-9.
- Qi, X. & Mochly-Rosen, D. 2008. The PKCdelta -Abl complex communicates ER stress to the mitochondria - an essential step in subsequent apoptosis. *J Cell Sci*, 121, 804-13.
- Quinlan, C. L., Perevoshchikova, I. V., Hey-Mogensen, M., Orr, A. L. & Brand, M. D. 2013. Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates. *Redox Biol*, 1, 304-12.
- Rahman, M., Nirala, N. K., Singh, A., Zhu, L. J., Taguchi, K., Bamba, T., Fukusaki, E., Shaw, L. M., Lambright, D. G., Acharya, J. K. & Acharya, U. R. 2014. Drosophila Sirt2/mammalian

Bibliografia

- SIRT3 deacetylates ATP synthase beta and regulates complex V activity. *J Cell Biol*, 206, 289-305.
- Raimundo, N., Baysal, B. E. & Shadel, G. S. 2011. Revisiting the TCA cycle: signaling to tumor formation. *Trends Mol Med*, 17, 641-9.
- Rak, M., Gokova, S. & Tzagoloff, A. 2011. Modular assembly of yeast mitochondrial ATP synthase. *EMBO J*, 30, 920-30.
- Rambold, A. S., Kostelecky, B., Elia, N. & Lippincott-Schwartz, J. 2011. Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 10190-5.
- Rardin, M. J., He, W., Nishida, Y., Newman, J. C., Carrico, C., Danielson, S. R., Guo, A., Gut, P., Sahu, A. K., Li, B., Uppala, R., Fitch, M., Riiff, T., Zhu, L., Zhou, J., Mulhern, D., Stevens, R. D., Ilkayeva, O. R., Newgard, C. B., Jacobson, M. P., Hellerstein, M., Goetzman, E. S., Gibson, B. W. & Verdin, E. 2013. SIRT5 regulates the mitochondrial lysine succinylome and metabolic networks. *Cell Metab*, 18, 920-33.
- Rasola, A. & Bernardi, P. 2007. The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis*, 12, 815-33.
- Rauhala, H. E., Porkka, K. P., Tolonen, T. T., Martikainen, P. M., Tammela, T. L. & Visakorpi, T. 2005. Dual-specificity phosphatase 1 and serum/glucocorticoid-regulated kinase are downregulated in prostate cancer. *Int J Cancer*, 117, 738-45.
- Ristow, M. & Schmeisser, K. 2014. Mitohormesis: Promoting Health and Lifespan by Increased Levels of Reactive Oxygen Species (ROS). *Dose Response*, 12, 288-341.
- Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A. & Mammucari, C. 2012. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13, 566-78.
- Rizzuto, R. & Pozzan, T. 2006. Microdomains of intracellular Ca²⁺: molecular determinants and functional consequences. *Physiol Rev*, 86, 369-408.
- Rodenburg, R. J. 2016. Mitochondrial complex I-linked disease. *Biochim Biophys Acta*, 1857, 938-45.
- Ronchi, C. L., Sbiera, S., Leich, E., Tissier, F., Steinhauer, S., Deutschbein, T., Fassnacht, M. & Allolio, B. 2012. Low SGK1 expression in human adrenocortical tumors is associated with ACTH-independent glucocorticoid secretion and poor prognosis. *J Clin Endocrinol Metab*, 97, E2251-60.
- Rouslin, W. & Pullman, M. E. 1987. Protonic inhibition of the mitochondrial adenosine 5'-triphosphatase in ischemic cardiac muscle. Reversible binding of the ATPase inhibitor protein to the mitochondrial ATPase during ischemia. *J Mol Cell Cardiol*, 19, 661-8.
- Rumora, L., Lovric, J., Sairam, M. R. & Maysinger, D. 2007. Impairments of heat shock protein expression and MAPK translocation in the central nervous system of follitropin receptor knockout mice. *Exp Gerontol*, 42, 619-28.
- Ruzzenente, B., Metodiev, M. D., Wredenberg, A., Bratic, A., Park, C. B., Camara, 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. *EMBO J*, 31, 443-56.
- Ryu, H., Lee, J., Impey, S., Ratan, R. R. & Ferrante, R. J. 2005. Antioxidants modulate mitochondrial PKA and increase CREB binding to D-loop DNA of the mitochondrial genome in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 13915-20.
- Sagan, L. 1967. On the origin of mitosing cells. *J Theor Biol*, 14, 255-74.
- Sah, J. F., Kumar, C. & Mohanty, P. 1993. pH dependent conformational changes modulate functional activity of the mitochondrial ATPase inhibitor protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 194, 1521-8.
- Saita, E., Suzuki, T., Kinosita, K., Jr. & Yoshida, M. 2015. Simple mechanism whereby the F1-ATPase motor rotates with near-perfect chemomechanical energy conversion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, 9626-31.

- Salvi, M., Brunati, A. M., Bordin, L., La Rocca, N., Clari, G. & Toninello, A. 2002. Characterization and location of Src-dependent tyrosine phosphorylation in rat brain mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1589, 181-95.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. 2001. *Molecular cloning. A Laboratory manual*, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez-Arago, M. & Cuezva, J. M. 2011. The bioenergetic signature of isogenic colon cancer cells predicts the cell death response to treatment with 3-bromopyruvate, iodoacetate or 5-fluorouracil. *J Transl Med*, 9, 19.
- Sanchez-Arago, M., Formentini, L. & Cuezva, J. M. 2013a. Mitochondria-mediated energy adaptation in cancer: the H(+)-ATP synthase-gear switch of metabolism in human tumors. *Antioxid Redox Signal*, 19, 285-98.
- Sanchez-Arago, M., Formentini, L., Garcia-Bermudez, J. & Cuezva, J. M. 2012. IF1 reprograms energy metabolism and signals the oncogenic phenotype in cancer. *Cell Cycle*, 11, 2963-4.
- Sanchez-Arago, M., Formentini, L., Martinez-Reyes, I., Garcia-Bermudez, J., Santacatterina, F., Sanchez-Cenizo, L., Willers, I. M., Aldea, M., Najera, L., Juarranz, A., Lopez, E. C., Cloufent, J., Navarro, C., Espinosa, E. & Cuezva, J. M. 2013b. Expression, regulation and clinical relevance of the ATPase inhibitory factor 1 in human cancers. *Oncogenesis*, 2, e46.
- Sanchez-Arago, M., Garcia-Bermudez, J., Martinez-Reyes, I., Santacatterina, F. & Cuezva, J. M. 2013c. Degradation of IF1 controls energy metabolism during osteogenic differentiation of stem cells. *EMBO Rep*, 14, 638-44.
- Sanchez-Cenizo, L., Formentini, L., Aldea, M., Ortega, A. D., Garcia-Huerta, P., Sanchez-Arago, M. & Cuezva, J. M. 2010. Up-regulation of the ATPase inhibitory factor 1 (IF1) of the mitochondrial H⁺-ATP synthase in human tumors mediates the metabolic shift of cancer cells to a Warburg phenotype. *J Biol Chem*, 285, 25308-13.
- Santacatterina, F., Sanchez-Cenizo, L., Formentini, L., Mobasher, M. A., Casas, E., Rueda, C. B., Martinez-Reyes, I., Nunez De Arenas, C., Garcia-Bermudez, J., Zapata, J. M., Sanchez-Arago, M., Satrustegui, J., Valverde, A. M. & Cuezva, J. M. 2016. Down-regulation of oxidative phosphorylation in the liver by expression of the ATPase inhibitory factor 1 induces a tumor-promoter metabolic state. *Oncotarget*, 7, 490-508.
- Santamaria, G., Martinez-Diez, M., Fabregat, I. & Cuezva, J. M. 2006. Efficient execution of cell death in non-glycolytic cells requires the generation of ROS controlled by the activity of mitochondrial H⁺-ATP synthase. *Carcinogenesis*, 27, 925-35.
- Sardanelli, A. M., Signorile, A., Nuzzi, R., Rasmø, D. D., Technikova-Dobrova, Z., Drahota, Z., Occhiello, A., Pica, A. & Papa, S. 2006. Occurrence of A-kinase anchor protein and associated cAMP-dependent protein kinase in the inner compartment of mammalian mitochondria. *FEBS Lett*, 580, 5690-6.
- Sardanelli, A. M., Technikova-Dobrova, Z., Scacco, S. C., Speranza, F. & Papa, S. 1995. Characterization of proteins phosphorylated by the cAMP-dependent protein kinase of bovine heart mitochondria. *FEBS Lett*, 377, 470-4.
- Sardanelli, A. M., Technikova-Dobrova, Z., Speranza, F., Mazzocca, A., Scacco, S. & Papa, S. 1996. Topology of the mitochondrial cAMP-dependent protein kinase and its substrates. *FEBS Lett*, 396, 276-8.
- Sarrio, D., Palacios, J., Hergueta-Redondo, M., Gomez-Lopez, G., Cano, A. & Moreno-Bueno, G. 2009. Functional characterization of E- and P-cadherin in invasive breast cancer cells. *BMC Cancer*, 9, 74.
- Satrustegui, J., Pardo, B. & Del Arco, A. 2007. Mitochondrial transporters as novel targets for intracellular calcium signaling. *Physiol Rev*, 87, 29-67.
- Schagger, H. 2001. Respiratory chain supercomplexes. *IUBMB Life*, 52, 119-28.
- Schagger, 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. *J Biol Chem*, 279, 36349-53.

Bibliografia

- Schagger, H. & Pfeiffer, K. 2000. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J*, 19, 1777-83.
- Schagger, H. & Von Jagow, G. 1991. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem*, 199, 223-31.
- Schockel, L., Glasauer, A., Basit, F., Bitschar, K., Truong, H., Erdmann, G., Algire, C., Hagebarth, A., Willems, P. H., Kopitz, C., Koopman, W. J. & Heroult, M. 2015. Targeting mitochondrial complex I using BAY 87-2243 reduces melanoma tumor growth. *Cancer Metab*, 3, 11.
- Schon, E. A., Dimauro, S. & Hirano, M. 2012. Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nat Rev Genet*, 13, 878-90.
- Schwoch, G., Trinczek, B. & Bode, C. 1990. Localization of catalytic and regulatory subunits of cyclic AMP-dependent protein kinases in mitochondria from various rat tissues. *Biochem J*, 270, 181-8.
- Sciacovelli, M., Goncalves, E., Johnson, T. I., Zecchini, V. R., Da Costa, A. S., Gaude, E., Drubbel, A. V., Theobald, S. J., Abbo, S. R., Tran, M. G., Rajeeve, V., Cardaci, S., Foster, S., Yun, H., Cutillas, P., Warren, A., Gnanapragasam, V., Gottlieb, E., Franze, K., Huntly, B., Maher, E. R., Maxwell, P. H., Saez-Rodriguez, J. & Frezza, C. 2016. Fumarate is an epigenetic modifier that elicits epithelial-to-mesenchymal transition. *Nature*, 537, 544-547.
- Scialo, F., Fernandez-Ayala, D. J. & Sanz, A. 2017. Role of Mitochondrial Reverse Electron Transport in ROS Signaling: Potential Roles in Health and Disease. *Front Physiol*, 8, 428.
- Scialo, F., Sriram, A., Fernandez-Ayala, D., Gubina, N., Lohmus, M., Nelson, G., Logan, A., Cooper, H. M., Navas, P., Enriquez, J. A., Murphy, M. P. & Sanz, A. 2016. Mitochondrial ROS Produced via Reverse Electron Transport Extend Animal Lifespan. *Cell Metab*, 23, 725-34.
- Sebastian, D., Palacin, M. & Zorzano, A. 2017. Mitochondrial Dynamics: Coupling Mitochondrial Fitness with Healthy Aging. *Trends Mol Med*, 23, 201-215.
- Seelert, H., Dani, D. N., Dante, S., Hauss, T., Krause, F., Schafer, E., Frenzel, M., Poetsch, A., Rexroth, S., Schwassmann, H. J., Suhai, T., Vonck, J. & Dencher, N. A. 2009. From protons to OXPHOS supercomplexes and Alzheimer's disease: structure-dynamics-function relationships of energy-transducing membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1787, 657-71.
- Sena, L. A. & Chandel, N. S. 2012. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell*, 48, 158-67.
- Shah, D. I., Takahashi-Makise, N., Cooney, J. D., Li, L., Schultz, I. J., Pierce, E. L., Narla, A., Seguin, A., Hattangadi, S. M., Medlock, A. E., Langer, N. B., Dailey, T. A., Hurst, S. N., Faccenda, D., Wiwczar, J. M., Heggars, S. K., Vogin, G., Chen, W., Chen, C., Campagna, D. R., Brugnara, C., Zhou, Y., Ebert, B. L., Danial, N. N., Fleming, M. D., Ward, D. M., Campanella, M., Dailey, H. A., Kaplan, J. & Paw, B. H. 2012. Mitochondrial Atp1f1 regulates haem synthesis in developing erythroblasts. *Nature*, 491, 608-612.
- Sharma, K., D'souza, R. C., Tyanova, S., Schaab, C., Wisniewski, J. R., Cox, J. & Mann, M. 2014. Ultradeep human phosphoproteome reveals a distinct regulatory nature of Tyr and Ser/Thr-based signaling. *Cell Rep*, 8, 1583-94.
- Shen, L., Zhi, L., Hu, W. & Wu, M. X. 2009. IEX-1 targets mitochondrial F1Fo-ATPase inhibitor for degradation. *Cell Death Differ*, 16, 603-12.
- Sherk, A. B., Frigo, D. E., Schnackenberg, C. G., Bray, J. D., Laping, N. J., Trizna, W., Hammond, M., Patterson, J. R., Thompson, S. K., Kazmin, D., Norris, J. D. & McDonnell, D. P. 2008. Development of a small-molecule serum- and glucocorticoid-regulated kinase-1 antagonist and its evaluation as a prostate cancer therapeutic. *Cancer Res*, 68, 7475-83.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. & Mann, M. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem*, 68, 850-8.
- Shiiba, M., Nomura, H., Shinozuka, K., Saito, K., Kouzu, Y., Kasamatsu, A., Sakamoto, Y., Murano, A., Ono, K., Ogawara, K., Uzawa, K. & Tanzawa, H. 2010. Down-regulated expression of

- SERPIN genes located on chromosome 18q21 in oral squamous cell carcinomas. *Oncol Rep*, 24, 241-9.
- Slater, E. C. 1953. Mechanism of phosphorylation in the respiratory chain. *Nature*, 172, 975-8.
- Sleire, L., Forde, H. E., Netland, I. A., Leiss, L., Skeie, B. S. & Enger, P. O. 2017. Drug repurposing in cancer. *Pharmacol Res*, 124, 74-91.
- Sloan, E. K., Priceman, S. J., Cox, B. F., Yu, S., Pimentel, M. A., Tangkanangnukul, V., Arevalo, J. M., Morizono, K., Karanikolas, B. D., Wu, L., Sood, A. K. & Cole, S. W. 2010. The sympathetic nervous system induces a metastatic switch in primary breast cancer. *Cancer Res*, 70, 7042-52.
- Sol, E. M., Wagner, S. A., Weinert, B. T., Kumar, A., Kim, H. S., Deng, C. X. & Choudhary, C. 2012. Proteomic investigations of lysine acetylation identify diverse substrates of mitochondrial deacetylase sirt3. *PLoS One*, 7, e50545.
- Soldevilla, B., Cuevas-Martin, C., Ibanez, C., Santacatterina, F., Alberti, M. A., Simo, C., Casasnovas, C., Marquez-Infante, C., Sevilla, T., Pascual, S. I., Sanchez-Arago, M., Espinos, C., Palau, F. & Cuezva, J. M. 2017. Plasma metabolome and skin proteins in Charcot-Marie-Tooth 1A patients. *PLoS One*, 12, e0178376.
- Song, R., Song, H., Liang, Y., Yin, D., Zhang, H., Zheng, T., Wang, J., Lu, Z., Song, X., Pei, T., Qin, Y., Li, Y., Xie, C., Sun, B., Shi, H., Li, S., Meng, X., Yang, G., Pan, S., Zhu, J., Qi, S., Jiang, H., Zhang, Z. & Liu, L. 2014a. Reciprocal activation between ATPase inhibitory factor 1 and NF-kappaB drives hepatocellular carcinoma angiogenesis and metastasis. *Hepatology*, 60, 1659-73.
- Song, R., Song, H., Liang, Y., Yin, D., Zhang, H., Zheng, T., Wang, J., Lu, Z., Song, X., Pei, T., Qin, Y., Li, Y., Xie, C., Sun, B., Shi, H., Li, S., Meng, X., Yang, G., Pan, S., Zhu, J., Qi, S., Jiang, H., Zhang, Z. & Liu, L. 2014b. Reciprocal activation between ATPase inhibitory factor 1 and NF-kappaB drives hepatocellular carcinoma angiogenesis and metastasis. *Hepatology*, 60, 1659-1673.
- Soto, I. C., Fontanesi, F., Liu, J. & Barrientos, A. 2012. Biogenesis and assembly of eukaryotic cytochrome c oxidase catalytic core. *Biochim Biophys Acta*, 1817, 883-97.
- Speijer, D. 2011. Oxygen radicals shaping evolution: why fatty acid catabolism leads to peroxisomes while neurons do without it: FADH(2)/NADH flux ratios determining mitochondrial radical formation were crucial for the eukaryotic invention of peroxisomes and catabolic tissue differentiation. *Bioessays*, 33, 88-94.
- Sterky, F. H., Ruzzenente, B., Gustafsson, C. M., Samuelsson, T. & Larsson, N. G. 2010. LRPPRC is a mitochondrial matrix protein that is conserved in metazoans. *Biochem Biophys Res Commun*, 398, 759-64.
- Stram, A. R. & Payne, R. M. 2016. Post-translational modifications in mitochondria: protein signaling in the powerhouse. *Cell Mol Life Sci*, 73, 4063-73.
- Strauss, M., Hofhaus, G., Schroder, R. R. & Kuhlbrandt, W. 2008. Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *EMBO J*, 27, 1154-60.
- Su, C. Y., Chang, Y. C., Yang, C. J., Huang, M. S. & Hsiao, M. 2016. The opposite prognostic effect of NDUFS1 and NDUFS8 in lung cancer reflects the oncojanus role of mitochondrial complex I. *Sci Rep*, 6, 31357.
- Sullivan, L. B., Gui, D. Y., Hosios, A. M., Bush, L. N., Freinkman, E. & Vander Heiden, M. G. 2015. Supporting Aspartate Biosynthesis Is an Essential Function of Respiration in Proliferating Cells. *Cell*, 162, 552-63.
- 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, 1043-57.
- Sun, J. Y., Li, C., Shen, Z. X., Zhang, W. C., Ai, T. J., Du, L. J., Zhang, Y. Y., Yao, G. F., Liu, Y., Sun, S., Naray-Fejes-Toth, A., Fejes-Toth, G., Peng, Y., Chen, M., Liu, X., Tao, J., Zhou, B., Yu, Y., Guo, F., Du, J. & Duan, S. Z. 2016. Mineralocorticoid Receptor Deficiency in Macrophages Inhibits Neointimal Hyperplasia and Suppresses Macrophage Inflammation Through SGK1-AP1/NF-kappaB Pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 36, 874-85.

Bibliografia

- Suzuki, T., Tanaka, K., Wakabayashi, C., Saita, E. & Yoshida, M. 2014. Chemomechanical coupling of human mitochondrial F1-ATPase motor. *Nat Chem Biol*, 10, 930-6.
- Tan, A. S., Baty, J. W., Dong, L. F., Bezawork-Geleta, A., Endaya, B., Goodwin, J., Bajzikova, M., Kovarova, J., Peterka, M., Yan, B., Pesdar, E. A., Sobol, M., Filimonenko, A., Stuart, S., Vondrusova, M., Kluckova, K., Sachaphibulkij, K., Rohlena, J., Hozak, P., Truksa, J., Eccles, D., Haupt, L. M., Griffiths, L. R., Neuzil, J. & Berridge, M. V. 2015. Mitochondrial genome acquisition restores respiratory function and tumorigenic potential of cancer cells without mitochondrial DNA. *Cell Metab*, 21, 81-94.
- Tang, Z., Li, J., Shen, Q., Feng, J., Liu, H., Wang, W., Xu, L., Shi, G., Ye, X., Ge, M., Zhou, X. & Ni, S. 2017. Contribution of upregulated dipeptidyl peptidase 9 (DPP9) in promoting tumorigenicity, metastasis and the prediction of poor prognosis in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Int J Cancer*, 140, 1620-1632.
- Tasken, K. & Aandahl, E. M. 2004. Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev*, 84, 137-67.
- Tebbenkamp, A. T. N., Varela, L., Choi, J., Paredes, M. I., Giani, A. M., Song, J. E., Sestan-Pesa, M., Franjic, D., Sousa, A. M. M., Liu, Z. W., Li, M., Bichsel, C., Koch, M., Szigeti-Buck, K., Liu, F., Li, Z., Kawasawa, Y. I., Paspalas, C. D., Mineur, Y. S., Prontera, P., Merla, G., Picciotto, M. R., Arnsten, A. F. T., Horvath, T. L. & Sestan, N. 2018. The 7q11.23 Protein DNAJC30 Interacts with ATP Synthase and Links Mitochondria to Brain Development. *Cell*, 175, 1088-1104 e23.
- Technikova-Dobrova, Z., Sardanelli, A. M. & Papa, S. 1993. Phosphorylation of mitochondrial proteins in bovine heart. Characterization of kinases and substrates. *FEBS Lett*, 322, 51-5.
- Technikova-Dobrova, Z., Sardanelli, A. M., Stanca, M. R. & Papa, S. 1994. cAMP-dependent protein phosphorylation in mitochondria of bovine heart. *FEBS Lett*, 350, 187-91.
- Terzi, E., Boyot, P., Van Dorsselaer, A., Luu, B. & Trifilieff, E. 1990. Isolation and amino acid sequence of a novel 6.8-kDa mitochondrial proteolipid from beef heart. Use of FAB-MS for molecular mass determination. *FEBS Lett*, 260, 122-6.
- Thaker, P. H., Han, L. Y., Kamat, A. A., Arevalo, J. M., Takahashi, R., Lu, C., Jennings, N. B., Armaiz-Pena, G., Bankson, J. A., Ravoori, M., Merritt, W. M., Lin, Y. G., Mangala, L. S., Kim, T. J., Coleman, R. L., Landen, C. N., Li, Y., Felix, E., Sanguino, A. M., Newman, R. A., Lloyd, M., Gershenson, D. M., Kundra, V., Lopez-Berestein, G., Lutgendorf, S. K., Cole, S. W. & Sood, A. K. 2006. Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. *Nat Med*, 12, 939-44.
- Thiery, J. P. 2002. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 2, 442-54.
- Thomas, S., Sharma, N., Gonzalez, R., Pao, P. W., Hofman, F. M., Chen, T. C., Louie, S. G., Pirrung, M. C. & Schonthal, A. H. 2013. Repositioning of Verrucosidin, a purported inhibitor of chaperone protein GRP78, as an inhibitor of mitochondrial electron transport chain complex I. *PLoS One*, 8, e65695.
- Tomasetig, L., Di Pancrazio, F., Harris, D. A., Mavelli, I. & Lippe, G. 2002. Dimerization of F0F1ATP synthase from bovine heart is independent from the binding of the inhibitor protein IF1. *Biochim Biophys Acta*, 1556, 133-41.
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J. & Jemal, A. 2015. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 65, 87-108.
- Tucker, H., Umeweni, N., Robertson, J. & Adam, J. 2014. NICE guidance on dabrafenib for treating unresectable or metastatic BRAF V600 mutation-positive melanoma. *Lancet Oncol*, 15, 1425-6.
- Turanli, B., Grotli, M., Boren, J., Nielsen, J., Uhlen, M., Arga, K. Y. & Mardinoglu, A. 2018a. Drug Repositioning for Effective Prostate Cancer Treatment. *Front Physiol*, 9, 500.

- Turanli, B., Karagoz, K., Gulfidan, G., Sinha, R., Mardinoglu, A. & Arga, K. Y. 2018b. A Network-Based Cancer Drug Discovery: From Integrated Multi-Omics Approaches to Precision Medicine. *Curr Pharm Des*.
- Twig, G., Hyde, B. & Shirihai, O. 2008. Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: the bioenergetic view. *Biochim Biophys Acta*, 1777, 1092-7.
- Urra, F. A., Cordova-Delgado, M., Lapier, M., Orellana-Manzano, A., Acevedo-Arevalo, L., Pessoa-Mahana, H., Gonzalez-Vivanco, J. M., Martinez-Cifuentes, M., Ramirez-Rodriguez, O., Millas-Vargas, J. P., Weiss-Lopez, B., Pavani, M., Ferreira, J. & Araya-Maturana, R. 2016. Small structural changes on a hydroquinone scaffold determine the complex I inhibition or uncoupling of tumoral oxidative phosphorylation. *Toxicol Appl Pharmacol*, 291, 46-57.
- Urra, F. A., Munoz, F., Lovy, A. & Cardenas, C. 2017. The Mitochondrial Complex(I)ty of Cancer. *Front Oncol*, 7, 118.
- Vakifahmetoglu-Norberg, H., Ouchida, A. T. & Norberg, E. 2017. The role of mitochondria in metabolism and cell death. *Biochem Biophys Res Commun*, 482, 426-431.
- Valcarce, C., Navarrete, R. M., Encabo, P., Loeches, E., Satrustegui, J. & Cuezva, J. M. 1988. Postnatal development of rat liver mitochondrial functions. The roles of protein synthesis and of adenine nucleotides. *J Biol Chem*, 263, 7767-75.
- Valsecchi, F., Ramos-Espiritu, L. S., Buck, J., Levin, L. R. & Manfredi, G. 2013. cAMP and mitochondria. *Physiology (Bethesda)*, 28, 199-209.
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324, 1029-33.
- Vander Heiden, M. G., Lunt, S. Y., Dayton, T. L., Fiske, B. P., Israelsen, W. J., Mattaini, K. R., Vokes, N. I., Stephanopoulos, G., Cantley, L. C., Metallo, C. M. & Locasale, J. W. 2013. Metabolic pathway alterations that support cell proliferation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 76, 325-34.
- Vassilopoulos, A., Pennington, J. D., Andresson, T., Rees, D. M., Bosley, A. D., Fearnley, I. M., Ham, A., Flynn, C. R., Hill, S., Rose, K. L., Kim, H. S., Deng, C. X., Walker, J. E. & Gius, D. 2014. SIRT3 deacetylates ATP synthase F1 complex proteins in response to nutrient- and exercise-induced stress. *Antioxid Redox Signal*, 21, 551-64.
- Vatrinet, R., Iommarini, L., Kurelac, I., De Luise, M., Gasparre, G. & Porcelli, A. M. 2015. Targeting respiratory complex I to prevent the Warburg effect. *Int J Biochem Cell Biol*, 63, 41-5.
- Vazquez-Martin, A., Corominas-Faja, B., Cufi, S., Vellon, L., Oliveras-Ferraros, C., Menendez, O. J., Joven, J., Lupu, R. & Menendez, J. A. 2013. The mitochondrial H(+)-ATP synthase and the lipogenic switch: new core components of metabolic reprogramming in induced pluripotent stem (iPS) cells. *Cell Cycle*, 12, 207-18.
- Vempati, U. D., Han, X. & Moraes, C. T. 2009. Lack of cytochrome c in mouse fibroblasts disrupts assembly/stability of respiratory complexes I and IV. *J Biol Chem*, 284, 4383-91.
- Viale, A., Pettazoni, P., Lyssiotis, C. A., Ying, H., Sanchez, N., Marchesini, M., Carugo, A., Green, T., Seth, S., Giuliani, V., Kost-Alimova, M., Muller, F., Colla, S., Nezi, L., Genovese, G., Deem, A. K., Kapoor, A., Yao, W., Brunetto, E., Kang, Y., Yuan, M., Asara, J. M., Wang, Y. A., Heffernan, T. P., Kimmelman, A. C., Wang, H., Fleming, J. B., Cantley, L. C., Depinho, R. A. & Draetta, G. F. 2014. Oncogene ablation-resistant pancreatic cancer cells depend on mitochondrial function. *Nature*, 514, 628-32.
- Villani, L. A., Smith, B. K., Marcinko, K., Ford, R. J., Broadfield, L. A., Green, A. E., Houde, V. P., Muti, P., Tsakiridis, T. & Steinberg, G. R. 2016. The diabetes medication Canagliflozin reduces cancer cell proliferation by inhibiting mitochondrial complex-I supported respiration. *Mol Metab*, 5, 1048-1056.
- Vincow, E. S., Merrihew, G., Thomas, R. E., Shulman, N. J., Beyer, R. P., Maccoss, M. J. & Pallanck, L. J. 2013. The PINK1-Parkin pathway promotes both mitophagy and selective respiratory chain turnover in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 6400-5.

Bibliografia

- Wagner, A. D., Grothe, W., Haerting, J., Kleber, G., Grothey, A. & Fleig, W. E. 2006. Chemotherapy in advanced gastric cancer: a systematic review and meta-analysis based on aggregate data. *J Clin Oncol*, 24, 2903-9.
- Waldegger, S., Barth, P., Raber, G. & Lang, F. 1997. Cloning and characterization of a putative human serine/threonine protein kinase transcriptionally modified during anisotonic and isotonic alterations of cell volume. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 4440-5.
- Walker, J. E. 2013. The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown. *Biochem Soc Trans*, 41, 1-16.
- Wallace, D. C. 1992. Diseases of the mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem*, 61, 1175-212.
- Wang, J. & Byers, L. A. 2013. Teaching an old dog new tricks: drug repositioning in small cell lung cancer. *Cancer Discov*, 3, 1333-5.
- Wang, X. 2001. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, 15, 2922-33.
- Warburg, O. 1930. Metabolism of tumors. *Arnold Constable*. London
- Warburg, O. 1956. On respiratory impairment in cancer cells. *Science*, 124, 269-70.
- Waza, A. A., Andrabi, K. & Hussain, M. U. 2014. Protein kinase C (PKC) mediated interaction between connexin43 (Cx43) and K(+)(ATP) channel subunit (Kir6.1) in cardiomyocyte mitochondria: Implications in cytoprotection against hypoxia induced cell apoptosis. *Cell Signal*, 26, 1909-17.
- Webster, M. K., Goya, L., Ge, Y., Maiyar, A. C. & Firestone, G. L. 1993. Characterization of sgk, a novel member of the serine/threonine protein kinase gene family which is transcriptionally induced by glucocorticoids and serum. *Mol Cell Biol*, 13, 2031-40.
- Wei, S., Fukuhara, H., Kawada, C., Kurabayashi, A., Furihata, M., Ogura, S., Inoue, K. & Shuin, T. 2015. Silencing of ATPase Inhibitory Factor 1 Inhibits Cell Growth via Cell Cycle Arrest in Bladder Cancer. *Pathobiology*, 82, 224-32.
- Weinberg, F., Hamanaka, R., Wheaton, W. W., Weinberg, S., Joseph, J., Lopez, M., Kalyanaraman, B., Mutlu, G. M., Budinger, G. R. & Chandel, N. S. 2010. Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 8788-93.
- Weinberg, S. E. & Chandel, N. S. 2015. Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy. *Nat Chem Biol*, 11, 9-15.
- Weinberg, S. E., Sena, L. A. & Chandel, N. S. 2015. Mitochondria in the regulation of innate and adaptive immunity. *Immunity*, 42, 406-17.
- Weng, Z., Luo, Y., Yang, X., Greenhaw, J. J., Li, H., Xie, L., Mattes, W. B. & Shi, Q. 2015. Regorafenib impairs mitochondrial functions, activates AMP-activated protein kinase, induces autophagy, and causes rat hepatocyte necrosis. *Toxicology*, 327, 10-21.
- Westermann, B. 2002. Merging mitochondria matters: cellular role and molecular machinery of mitochondrial fusion. *EMBO Rep*, 3, 527-31.
- Wheaton, W. W., Weinberg, S. E., Hamanaka, R. B., Soberanes, S., Sullivan, L. B., Anso, E., Glasauer, A., Dufour, E., Mutlu, G. M., Budinger, G. S. & Chandel, N. S. 2014. Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. *Elife*, 3, e02242.
- Wick, A. N., Drury, D. R., Nakada, H. I. & Wolfe, J. B. 1957. Localization of the primary metabolic block produced by 2-deoxyglucose. *J Biol Chem*, 224, 963-9.
- Wilk, A., Wyczechowska, D., Zapata, A., Dean, M., Mullinax, J., Marrero, L., Parsons, C., Peruzzi, F., Culicchia, F., Ochoa, A., Grabacka, M. & Reiss, K. 2015. Molecular mechanisms of fenofibrate-induced metabolic catastrophe and glioblastoma cell death. *Mol Cell Biol*, 35, 182-98.
- Willers, I. M. & Cuezva, J. M. 2011. Post-transcriptional regulation of the mitochondrial H(+)-ATP synthase: A key regulator of the metabolic phenotype in cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1807, 543-51.

- Willers, I. M., Martínez-Reyes, I., Martínez-Diez, M. & Cuezva, J. 2012. miR-127-5p targets the 3'UTR of human β -F1-ATPase mRNA and inhibits its translation. *Biochim Biophys Acta-Bioenergetics*, 1817, 838-848.
- Wittig, I., Braun, H. P. & Schagger, H. 2006. Blue native PAGE. *Nat Protoc*, 1, 418-28.
- Wittig, I. & Schagger, H. 2008. Structural organization of mitochondrial ATP synthase. *Biochim Biophys Acta*, 1777, 592-8.
- Wojtczak, L., Zolkiewska, A. & Duszynski, J. 1986. Energy-storage capacity of the mitochondrial proton-motive force. *Biochim Biophys Acta*, 851, 313-21.
- Wong, W. & Scott, J. D. 2004. AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 959-70.
- Woo, D. K., Green, P. D., Santos, J. H., D'souza, A. D., Walther, Z., Martin, W. D., Christian, B. E., Chandel, N. S. & Shadel, G. S. 2012. Mitochondrial genome instability and ROS enhance intestinal tumorigenesis in APC(Min/+) mice. *Am J Pathol*, 180, 24-31.
- Wright, P. E. & Dyson, H. J. 2015. Intrinsically disordered proteins in cellular signalling and regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16, 18-29.
- Wu, J., Shan, Q., Li, P., Wu, Y., Xie, J. & Wang, X. 2015. ATPase inhibitory factor 1 is a potential prognostic marker for the migration and invasion of glioma. *Oncol Lett*, 10, 2075-2080.
- Xi, J., Wang, H., Mueller, R. A., Norfleet, E. A. & Xu, Z. 2009. Mechanism for resveratrol-induced cardioprotection against reperfusion injury involves glycogen synthase kinase 3 β and mitochondrial permeability transition pore. *Eur J Pharmacol*, 604, 111-6.
- Xu, F., Addis, J. B., Cameron, J. M. & Robinson, B. H. 2012. LRPPRC mutation suppresses cytochrome oxidase activity by altering mitochondrial RNA transcript stability in a mouse model. *Biochem J*, 441, 275-83.
- Xu, G., Shin, S. B. & Jaffrey, S. R. 2009. Global profiling of protease cleavage sites by chemoselective labeling of protein N-termini. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 19310-5.
- Xu, Q., Biener-Ramanujan, E., Yang, W. & Ramanujan, V. K. 2015. Targeting metabolic plasticity in breast cancer cells via mitochondrial complex I modulation. *Breast Cancer Res Treat*, 150, 43-56.
- Yamada, E. W. & Huzel, N. J. 1988. The calcium-binding ATPase inhibitor protein from bovine heart mitochondria. Purification and properties. *J Biol Chem*, 263, 11498-503.
- Yang, E. V., Sood, A. K., Chen, M., Li, Y., Eubank, T. D., Marsh, C. B., Jewell, S., Flavahan, N. A., Morrison, C., Yeh, P. E., Lemeshow, S. & Glaser, R. 2006. Norepinephrine up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase (MMP)-2, and MMP-9 in nasopharyngeal carcinoma tumor cells. *Cancer Res*, 66, 10357-64.
- Yang, J. Y., Deng, W., Chen, Y., Fan, W., Baldwin, K. M., Jope, R. S., Wallace, D. C. & Wang, P. H. 2013. Impaired translocation and activation of mitochondrial Akt1 mitigated mitochondrial oxidative phosphorylation Complex V activity in diabetic myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 59, 167-75.
- Yang, K., Long, Q., Saja, K., Huang, F., Pogwizd, S. M., Zhou, L., Yoshida, M. & Yang, Q. 2017. Knockout of the ATPase inhibitory factor 1 protects the heart from pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Sci Rep*, 7, 10501.
- Yin, T., Lu, L., Xiong, Z., Wei, S. & Cui, D. 2015. ATPase inhibitory factor 1 is a prognostic marker and contributes to proliferation and invasion of human gastric cancer cells. *Biomed Pharmacother*, 70, 90-6.
- Yoshikawa, S., Shinzawa-Itoh, K. & Tsukihara, T. 1998. Crystal structure of bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å resolution. *J Bioenerg Biomembr*, 30, 7-14.
- Youle, R. J. & Narendra, D. P. 2011. Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12, 9-14.
- Yu, W. M., Liu, X., Shen, J., Jovanovic, O., Pohl, E. E., Gerson, S. L., Finkel, T., Broxmeyer, H. E. & Qu, C. K. 2013. Metabolic regulation by the mitochondrial phosphatase PTPMT1 is required for hematopoietic stem cell differentiation. *Cell Stem Cell*, 12, 62-74.

Bibliografia

- Yu, Y., Lv, F., Lin, H., Qian, G., Jiang, Y. S., Pang, L. X., Wang, Y. P., Wang, X. F., Kang, Y. M., Li, C. B., Liu, Q., Xu, J. Z. & You, W. 2015. Mitochondrial ND3 G10398A mutation: a biomarker for breast cancer. *Genet Mol Res*, 14, 17426-31.
- Yue, X., Song, W., Zhang, W., Chen, L., Xi, Z., Xin, Z. & Jiang, X. 2008. Mitochondrially localized EGFR is subjected to autophagic regulation and implicated in cell survival. *Autophagy*, 4, 641-9.
- Yun, J. & Finkel, T. 2014. Mitohormesis. *Cell Metab*, 19, 757-66.
- Zanotti, F., Gnani, A., Mangiullo, R. & Papa, S. 2009. Effect of the ATPase inhibitor protein IF1 on H⁺ translocation in the mitochondrial ATP synthase complex. *Biochem Biophys Res Commun*, 384, 43-8.
- Zanotti, F., Raho, G., Gaballo, A. & Papa, S. 2004. Inhibitory and anchoring domains in the ATPase inhibitor protein IF1 of bovine heart mitochondrial ATP synthase. *J Bioenerg Biomembr*, 36, 447-57.
- Zeng, X., Neupert, W. & Tzagoloff, A. 2007. The metalloprotease encoded by ATP23 has a dual function in processing and assembly of subunit 6 of mitochondrial ATPase. *Mol Biol Cell*, 18, 617-26.
- Zhang, B., Chu, W., Wei, P., Liu, Y. & Wei, T. 2015. Xanthohumol induces generation of reactive oxygen species and triggers apoptosis through inhibition of mitochondrial electron transfer chain complex I. *Free Radic Biol Med*, 89, 486-97.
- Zhang, F., Li, M., Wang, J., Liang, X., Su, Y. & Wang, W. 2016. Finding New Tricks for Old Drugs: Tumoricidal Activity of Non-Traditional Antitumor Drugs. *AAPS PharmSciTech*, 17, 539-52.
- Zhang, J., Xin, L., Shan, B., Chen, W., Xie, M., Yuen, D., Zhang, W., Zhang, Z., Lajoie, G. A. & Ma, B. 2012. PEAKS DB: de novo sequencing assisted database search for sensitive and accurate peptide identification. *Mol Cell Proteomics*, 11, M111 010587.
- Zhao, X., Leon, I. R., Bak, S., Mogensen, M., Wrzesinski, K., Hojlund, K. & Jensen, O. N. 2011. Phosphoproteome analysis of functional mitochondria isolated from resting human muscle reveals extensive phosphorylation of inner membrane protein complexes and enzymes. *Mol Cell Proteomics*, 10, M110.000299.
- Zheng, S. Q., Li, Y. X., Zhang, Y., Li, X. & Tang, H. 2011. MiR-101 regulates HSV-1 replication by targeting ATP5B. *Antiviral Res*, 89, 219-26.
- Zhou, H., Di Palma, S., Preisinger, C., Peng, M., Polat, A. N., Heck, A. J. & Mohammed, S. 2013. Toward a comprehensive characterization of a human cancer cell phosphoproteome. *J Proteome Res*, 12, 260-71.
- Zhu, J., Vinothkumar, K. R. & Hirst, J. 2016. Structure of mammalian respiratory complex I. *Nature*, 536, 354-358.
- Zick, M., Rabl, R. & Reichert, A. S. 2009. Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1793, 5-19.
- Zong, W. X., Rabinowitz, J. D. & White, E. 2016. Mitochondria and Cancer. *Mol Cell*, 61, 667-676.

8. ANEXO I: PUBLICACIONES
