

Esther Lapuente Brun

Organización modular de la cadena respiratoria de mamíferos y optogenética

Departamento
Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Director/es

José Antonio Enríquez
Erika M^a Fernández-Vizarra Bailey

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

ORGANIZACIÓN MODULAR DE LA CADENA RESPITATORIA DE MAMÍFEROS Y OPTOGENÉTICA MITOCONDRIAL

Autor

Esther Lapuente Brun

Director/es

José Antonio Enríquez
Erika M^a Fernández-Vizarra Bailey

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Bioquímica y Biología Molecular y Celular

2012

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

**ORGANIZACIÓN MODULAR DE LA CADENA
RESPIRATORIA DE MAMÍFEROS Y
OPTOGENÉTICA MITOCONDRIAL**

Memoria presentada por Esther Lapuente Brun
Licenciada en Biología y Licenciada en Bioquímica
para optar al Grado de Doctor

Dirigida por los Doctores
José Antonio Enríquez y Erika M^a Fernández-Vizarra Bailey

Zaragoza, Febrero 2012

D. JOSÉ ANTONIO ENRIQUEZ DOMINGUEZ, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza

Y

D^a. ERIKA M^a FERNÁNDEZ-VIZARRA BAILEY, Investigadora “Miguel Servet” del Sistema Nacional de Salud en el Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral “**Organización modular de la cadena respiratoria de mamíferos y Optogenética mitocondrial**” ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza, bajo su dirección y tutela y que reúne, a su juicio, las condiciones para optar al grado de Doctor.

Zaragoza, Febrero 2012

Fdo: José Antonio Enríquez

Erika M^a Fernández-Vizarra

Este trabajo ha sido realizado con una beca de Formación del Profesorado Universitario del Ministerio de Educación (AP2007-03834) y con las subvenciones de Ministerio de Ciencia y Tecnología (CONSOLIDER CSD2007-00020), el Instituto de Salud Carlos III (PI09/00946), el Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (PIPAMER0905) y la Diputación General de Aragón (PI090/08; Grupo de Excelencia B55).

Parte del contenido de la presente Tesis Doctoral ha sido presentado en los siguientes congresos:

- ***XXXI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular.***
Bilbao, Septiembre 2008
- ***II Workshop on Reactive Oxygen Species And Systems.*** Zaragoza, Junio 2009
- ***XXXI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular.***
Oviedo, Septiembre 2009
- ***III Workshop on Reactive Oxygen Species And Systems.*** Salamanca, Mayo 2010
- ***VI Workshop on Reactive Oxygen Species And Systems.*** Gerona, Mayo 2011
- ***European meeting on Mitochondrial Pathology.*** Zaragoza. Junio 2011

*A mi familia,
especialmente a ti, Armando*

Agradecimientos

Ha pasado ya algún tiempo desde el comienzo de este proyecto. Un proyecto con el que pretendía asomarme a este mundo de generación de conocimiento, de búsqueda de los procesos que se esconden en nuestro interior y que hacen posible la vida. Ha sido un camino lleno de retos que me han motivado en lo profesional y también en lo humano, pero no desligados de algunas dificultades que me han permitido crecer, pero que no hubiera podido salvar si en cada paso de este camino no hubierais estado alguno de vosotros dándome el apoyo necesario para afrontarlas. Por fin ha llegado el momento de compartir con vosotros los logros alcanzados, de los que sin duda sois partícipes. A todos vosotros, ¡Gracias!

Gracias a Toño, por acogerme en este equipo de investigación, y en este grupo humano, por los medios que has dedicado para sacar adelante este trabajo. Y gracias, en especial, por tu ayuda y tu compromiso conmigo para permitirme realizar este trabajo en Zaragoza.

Gracias muy especialmente a Erika. Por tomar las riendas de este trabajo a mitad de camino, por prestarte a ser mi codirectora. Gracias a eso estamos hoy aquí. Gracias por confiar en mí, haberme apoyado tanto, y ser tan buena maestra. Por haberme enseñado tantas cosas: desde el trabajo en la poyata, hasta la actitud crítica y rigurosa de interpretación de los resultados, por ser imparcial y estar abierta a la verdad. Por creer en lo que parecía imposible y llegar hasta el final. ¡La Ciencia necesita gente como tú! Aparte de todo eso, gracias por tu amistad, por mantenerte a mi lado en la dificultad y tener siempre palabras de aliento.

Gracias a Patricio, por tu ayuda, tu orientación, y la atenta lectura y corrección de esta tesis, ¡y de todos los manuscritos previos! Gracias a Acisclo, por tu compañía siempre tan alegre, por transmitirme desde la experiencia que, con esfuerzo, al final las cosas acaban saliendo, por mal que pinten.

Gracias a Nieves, por tramitarnos tantas cosas y facilitarnos tanto el trabajo. Gracias por ser siempre tan cercana, por todo tu cariño, por tus ánimos, tus consejos, y por hacerme sentir tan querida. ¡Espero no perderte de vista, y que la nueva etapa que se abre te depare mucha felicidad!

Mil gracias a Raquel. Eres para mí una tercera directora. Gracias por la acogida tan calurosa que me diste y por haberte hecho responsable de mí durante ese primer año de manera tan desinteresada, por confiar en mí para ayudarte en tus experimentos y cuidar tus células desde el primer día. Gracias por haberme enseñado todo lo que sabes. Por ser tan buena compañera y ser la primera en echar una mano a todos. Por esa entrega a tu trabajo, que has sabido transmitirme. Gracias por tu amistad, por ser tan alegre y contagiarme esa risa maravillosa.

Gracias a Ester Perales, por todos los momentos que hemos compartido a lo largo de estos años en Zaragoza o en Madrid, a través del Skype, a veces tan cerca, ¡y otras tan lejos! Desde el primer día me recibiste con una enorme sonrisa y he visto en ti una amiga. Gracias por enseñarme tus trucos: en cada uno de mis geles de Blue Native siempre has estado presente. Gracias, por animarme siempre tanto y por guardarme los secretos como nadie. Has sido para mí una referencia. Seguro que seguirás sumando muchos éxitos, y que llegarás muy lejos.

Gracias a Ricardo, por aquellas tardes en las que los dos nos quedábamos a cerrar el chiringuito. Poco importaba la hora si aún quedaba trabajo y tan buena compañía.

Gracias por ser tan buena gente, por ofrecerte siempre a ayudar en cualquier técnica o problema, por tu interés por entender mis resultados y por tu gran empatía. Has trabajado mucho y te mereces un final feliz. ¡Ánimo, ya te queda muy poco!

Gracias a Ana y Elena, porque empezamos juntas este camino. A Ana, por tu compañía, en especial durante mi estancia en Madrid, por hacerme sentir que no estaba tan lejos de casa. A Elena por los cuatro años que hemos compartido, muchas veces enfrentándonos a las mismas dificultades. Os deseo mucha suerte ahora que acabamos esta etapa.

Muchas gracias a Pilar, que desde el primer día mostraste interés por mi trabajo. Siempre has estado abierta a discutir los resultados y a pensar alternativas. Gracias por tus buenas ideas y por esos artículos de los que me advertías. Ha sido una suerte tenerte cerca y poder compartir contigo, además, muchas otras cosas personales.

Gracias a Nuria, siempre tan positiva y tan alegre, dándole vidilla al laboratorio, y dispuesta a escuchar. Por el interés que has mostrado y todos tus ánimos, en especial en los últimos momentos de esta tesis, gracias.

Gracias a Patricia, por ser tan práctica, porque en los momentos especialmente difíciles me regalaste tus consejos, animándome a dejar a un lado las dificultades y apostar por aquello que es mejor a largo plazo.

Gracias a la gente que ha ido pasando alguna época por el laboratorio, a Guillermo, Cristina y María, por vuestra simpatía y hacerme más ameno el trabajo. Gracias a los miembros del grupo en Madrid, especialmente a Carmen y a Conchi, con las que he tenido más contacto.

Gracias a Pili, Reyes, Mariví e Ismael, por su gran implicación siempre que los he necesitado. Gracias a Marta, que ha sido siempre tan cercana y solvente respondiendo a mis dudas. También quiero agradecer su amabilidad a los compañeros y profesores del Departamento, que he tenido el gusto de conocer en Veterinaria y en Ciencias. En especial a la gente del grupo de Julio y Eduardo (David, Marora, Malena, Iñigo, Ester...) cuya cercanía hace que parezcan parte del propio grupo. A mis amigas (Erena, Andrea, Patricia, Cristina...), aunque apenas podemos vernos, os tengo presentes mucho más de lo que pensáis. Gracias por vuestros ánimos y por arrancarme tantas sonrisas.

En último lugar, quiero agradecer todo su apoyo a aquellos a quienes dedico este trabajo, a mi familia. A mis padres, que siempre han luchado tanto por nosotras, mil GRACIAS por estar siempre a mi lado, por enseñarme a asumir el reto de irme mejorando día a día, por escuchar con tanta atención las cosas que os contaba del trabajo, a pesar de no entenderlas siempre, por creer que es una labor importante y por creer en mí. Muchas gracias, Nuria y Cristina, por vuestro cariño, por vuestro interés en este trabajo, y las veces que me habéis acompañado a “ver las células”, y porque con vosotras consigo olvidarme de las preocupaciones. Siempre me tendréis cerca.

Gracias al resto de mi familia, a mis tíos (Marcos, Fina y Ángel) y a mi prima Beatriz, por vuestro cariño y por tener esa fe ciega en mí; y a los Sánchez, que siempre habéis mostrado interés por mi trabajo, gracias por vuestra compañía y vuestros ánimos.

Y por supuesto, GRACIAS a ti, Armando, por tu infinita comprensión, paciencia y apoyo durante tantos años. Por dar prioridad a mis sueños, y por darme el empujón necesario cuando parece que me rindo. Ahora quién sabe lo que nos espera, pero sea lo que sea, estaremos juntos. Gracias por estar a mi lado. Te quiero mucho.

A todos de corazón, ¡gracias! Esther

Abreviaturas

A	Absorbancia
Aa	Aminoácidos
AAV	Virus adenoasociados
acetil-CoA	Acetil-coenzima A
ADP	Adenosín difosfato
AICAR	Aminoimidazole carboxamide ribonucleotide,
AMP	Adenosín monofosfato
AMPK	Kinasa de AMP
ANT	Translocasa de nucleótidos de adenina
AOX	Oxidasa alternativa
APS	Persulfato de amonio
ATP	Adenosín trifosfato
ATPasa	ATP sintasa
BN	<i>Blue Native</i>
BPR	Proteorrodopsina azul
BR	Bacteriorrodopsina
BrEt	Bromuro de etidio
BSA	Seroalbúmina bovina
C8	Subunidad 8 de la citocromo c oxidasa
Cer	Ceramida
CIAP	Fosfatasa alcalina de intestino de ternera
CI-CV	Complejo I, al V
CMV	Citomegalovirus
CoQ	Coenzima Q o ubiquinona
COX	Citocromo c oxidasa
CS	Citrato sintasa
Cyt c	Citocromo c
Chol	Colesterol
DCPIP	Diclorofenol-indofenol
DDM	Dodecilmaltósido
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> , medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> , Ácido Desoxirribonucleico (ADN)
cDNA	ADN codificante
mtDNA	ADN mitocondrial
nDNA	ADN nuclear
DNP	Dinitrofenol
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
DT	Tiempo de duplicación
DTNB	Ácido 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoico
ε	Coefficiente de extinción molar

e⁻	Electrón
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
EF	Factor de elongación
EGTA	Ácido etilen-glicol-tetra-acético
ETC,CTE	Cadena transportadora de electrones
ETF	Flavoproteína Transferente de electrones
FAD	Flavín adenín dinucleótido, oxidado
FADH₂	Flavín adenín dinucleótido, reducido
Fe-S	Grupo sulfoférico
FILA	Acidosis láctica severa neonatal
Filtros SFCA	Filtros de acetato de celulosa libres de surfactante
FMN	Flavín mononucleótido
Ft	<i>Feet</i> , pies
GA3PDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GPR	Proteorrodopsina verde
Grp75	Proteína regulada por glucosa 75
HEPES	4 (2-hydroxyethyl) - ácido 1-piperazineethanesulfónico
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HSP	Promotor de cadena pesada
Hsp	Proteína de choque térmico
IMP	Peptidasa de membrana interna
IP3	Inositol trifosfato
IP3R	Receptor de Inositol trifosfato
IRF	Factor de regulación de interferón
Kb	kilobase
kDa	kiloDalton
KP	Tampón fosfato
LHON	Neuropatía óptica hereditaria de Leber
LSP	Promotor de cadena ligera
M9	Subunidad 9 de la ATP sintasa
MAM	Membrana de retículo Asociado a Mitocondria
MAVS	Proteína mitocondrial de señalización antiviral
MELAS	Encefalopatía mitocondrial con acidosis láctica
MERRF	Síndrome de epilepsia mioclónica asociada a fibras rojas rasgada
MILS	Síndrome de Leigh heredado maternalmente
MIM	Membrana interna mitocondrial
MISS	Señal de espacio intermembrana mitocondrial
MnSOD	Superóxido dismutasa de manganeso
MOPS	3-(N-morpholino)-propanosulfónico
MPP	Peptidasa de procesamiento mitocondrial
MRP	Proteína del ribosoma mitocondrial
mt	Mitocondria

MTIF2	Factor de iniciación mitocondrial 2
mtSSB	Proteína de unión a cadena sencilla mitocondrial
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido, oxidado
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido, reducido
NARP	Neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa
NDI1	NADH deshidrogenasa alternativa de levadura
NF-κB	Factor nuclear κB
nm	nanómetros
NRF1,2	Factor respiratorio nuclear 1 y 2
nt	Nucleótidos
OAA	Oxalacetato
Oligo Fw	Cebador directo
Oligo Rv	Cebador reverso
OXPPOS	Sistema de fosforilación oxidativa
PAM	Motor asociado a la traslocasa de presecuencia
PBS	Tampón fosfato salino
PBS-T	PBS-Tween
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PGC-1α,-1β	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators</i> , coactivador del receptor gamma activado por proliferadores peroxisomales
Pi	Fosfato inorgánico
PLA2	Fosfolipasa A2
PMSF	Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo
PNA	<i>Peptide nucleic acid</i> , péptido ácido nucleico,
POLRMT	ARN polimerasa mitocondrial
PRC	Coactivador relacionado a PGC
PtdEtn	Fosfatidiletanolamina
PtdSer	Fosfatidilserina
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
R-6-G	Rodamina-6-G
RE	Retículo endoplásmico
RFLP	Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> , Ácido Ribonucleico (ARN)
mRNA	ARN mensajero
rRNA	ARN ribosómico
tRNA	ARN de transferencia
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
SAM	Maquinaria de ensamblaje y distribución
SC	Supercomplejos
SCAFI	Factor de ensamblaje de supercomplejos I

SDH	Succinato deshidrogenasa
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida y SDS
(d)SFB	Suero fetal bovino (dializado)
Sig-1R	Receptor de Sigma-1
T	Temperatura
TAE	Tampón Tris, Acético y EDTA
TBE	Tampón Tris, Borato y EDTA
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletildiamina
TFAM	Factor de transcripción mitocondrial A
TFB1M	Factor de transcripción B1 mitocondrial
TFB2M	Factor de transcripción B2 mitocondrial
TIM	Traslucasa de membrana interna
Tm	Temperatura de hibridación
TMP	<i>Trimethyl-psoralen</i>
TMPD	N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina
TOM	Traslucasa de membrana externa
UQ₂	Ubiquinona
UQ₂H₂	Ubiquinol
UV	Ultravioleta
VDAC	Canal aniónico dependiente de voltaje, porina mitocondrial
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido
λ	Longitud de onda
ρ⁰	Célula carente de ADN mitocondrial

Índice

Índice

Introducción y Objetivos	3
Revisión Bibliográfica	7
1. LA MITOCONDRIA	9
1.1 Origen de la mitocondria.....	9
1.2 Estructura de la mitocondria	10
1.3 Genoma mitocondrial	12
1.4 Biogénesis mitocondrial	15
1.5 Control de calidad	22
2. METABOLISMO MITOCONDRIAL	25
2.1 Bioenergética mitocondrial	26
2.2 Sistema de Fosforilación Oxidativa.....	27
2.3 Organización del sistema OXPHOS	34
2.4 Supercomplejos respiratorios.....	36
2.5 Ensamblaje de supercomplejos	38
2.6 Supercomplejos vs el papel de transportadores móviles.	39
3. PATOLOGÍA MITOCONDRIAL	41
3.1 Patología asociada a Complejo I	42
3.2 Patología asociada a Complejo II	43
3.3 Patología asociada a Complejo III	43
3.4 Patología asociada a Complejo IV.....	44
3.5 Patología asociada a Complejo V	44
3.6 Consecuencias metabólicas de los defectos en OXPHOS.....	45
4. TERAPIA MITOCONDRIAL	47
5. BOMBAS DE PROTONES	51
5.1 Bacteriorrodopsina	51
5.2 Proteorrodopsinas	52
5.3 Optogenética	53
Resultados	57
Parte I: Organización modular de la cadena respiratoria. Manuscrito 1: <i>"Preferential Super-assembly Between Mitochondrial Respiratory Complexes I and III defines a dedicated CoQ pool"</i>	59
Parte I: Organización modular de la cadena respiratoria. Manuscrito 2: <i>"Integration of mitochondrial complex IV into respiratory supercomplexes requires Cox7a2l"</i>	89

Parte II: Optogenética mitocondrial. Manuscrito 3:

<i>"Strategies for optogenetical control of membrane potential generation"</i>	117
Discusión	147
Conclusiones	159
Material y Métodos	165
1. MATERIAL.....	167
1.1 Aparatos y útiles.....	167
1.2 Reactivos.....	172
1.3 Kits comerciales.....	172
1.4 Oligonucleótidos.....	172
1.5 Plásmidos.....	173
1.6 Cepas bacterianas.....	173
1.7 Anticuerpos.....	173
<u>1.7.1 Western Blot</u>	173
<u>1.7.2. Inmunofluorescencia</u>	174
1.8 Animales y órganos.....	175
1.9 Líneas celulares eucariotas.....	175
2. MÉTODOS.....	176
2.1 Cultivos bacterianos.....	176
<u>2.1.1 Medios de cultivo</u>	176
<u>2.1.2 Generación de bacterias químicamente competentes</u>	177
<u>2.1.3 Transformación de bacterias competentes</u>	177
<u>2.1.4 Siembra de bacterias en placas de LB-agar y en medio líquido LB</u>	177
<u>2.1.5 Identificación de colonias positivas</u>	178
<u>2.1.6 Conservación de las colonias de interés</u>	178
2.2 Cultivos celulares eucariota.....	179
<u>2.2.1 Medios de cultivo</u>	179
2.2.1.1 Diálisis del suero fetal bovino.....	179
<u>2.2.2 Establecimiento de cultivos primarios</u>	180
<u>2.2.3 Inmortalización de cultivo primario</u>	181
<u>2.2.4 Generación y aislamiento de líneas celulares mutantes en su mtDNA</u>	181
<u>2.2.5 Generación de híbridos transmitocondriales</u>	182
2.2.5.1 Eliminación de mitocondrias mediante tratamiento con Rodamina-6G.....	182
2.2.5.2 Enucleación de las células donadoras de mitocondrias	182
2.2.5.3 Fusión.....	183
<u>2.2.6 Siembra y mantenimiento celular</u>	184
<u>2.2.7 Recuento celular</u>	184

<u>2.2.8 Curvas de crecimiento</u>	185
<u>2.2.9 Transfección celular</u>	185
2.2.9.1 <i>Transfección química</i>	185
2.2.9.2 <i>Transfección mediada por lentivirus</i>	186
<u>2.2.10 Análisis de contaminación por micoplasma y tratamiento</u>	187
<u>2.2.11 Congelación y descongelación celular</u>	188
2.3 Purificación y permeabilización de mitocondrias	188
<u>2.3.1 Purificación de mitocondrias para medidas espectrofotométricas de los complejos respiratorios</u>	188
<u>2.3.2 Extracción y purificación de mitocondrias de células en cultivo para el análisis por Blue Native</u>	189
<u>2.3.3 Purificación de mitocondrias de hígado o corazón de ratón</u>	190
<u>2.3.4 Permeabilización de mitocondrias para Blue Native</u>	191
2.4 Medida de funcionalidad de la cadena de transporte electrónico	191
<u>2.4.1 Medida de consumo de oxígeno</u>	191
2.4.1.1 <i>Medida de respiración endógena y desacoplada en células intactas</i>	192
2.4.1.2 <i>Medida de la actividad de los complejos por polarografía en células permeabilizadas con digitonina</i>	193
<u>2.4.2 Medida de la actividad enzimática por espectrofotometría</u>	195
2.4.2.1 <i>Actividad NADH-Deshidrogenasa sensible a rotenona (CI)</i>	195
2.4.2.2 <i>Actividad Succinato-Deshidrogenasa (CII)</i>	196
2.4.2.3 <i>Actividad Glicerol-3-P-Deshidrogenasa (G3P-DH)</i>	197
2.4.2.4 <i>Actividad Citocromo c Reductasa (CIII)</i>	197
2.4.2.5 <i>Actividad Citocromo c Oxidasa (COX, CIV)</i>	198
2.4.2.6. <i>Actividad CI+III</i>	198
2.4.2.7. <i>Actividad CII+III</i>	199
2.4.2.8 <i>Citrato sintasa (CS)</i>	200
2.5 Extracción, manipulación y análisis de ácidos nucleicos	201
<u>2.5.1 Diseño de los genes de interés</u>	201
<u>2.5.2 Extracción y purificación de DNA</u>	201
2.5.2.1 <i>Extracción y purificación de DNA total de células en cultivo</i>	201
2.5.2.2. <i>Extracción de DNA plasmídico</i>	201
2.5.2.3. <i>Purificación de DNA a partir de geles de agarosa</i>	202
2.5.2.4. <i>Purificación de productos de PCR</i>	202
<u>2.5.3 Extracción de RNA total a partir de células en cultivo</u>	202
<u>2.5.4 Cuantificación de ácidos nucleicos</u>	202
2.5.4.1. <i>Cuantificación de ácidos nucleicos por espectrofotometría</i>	202
2.5.4.2. <i>Cuantificación de DNA en geles de agarosa</i>	203
<u>2.5.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)</u>	203
2.5.5.1. <i>Obtención de cDNA monocatenario para su uso como molde de PCR</i>	203

2.5.5.2 Reacción de PCR utilizando DNA genómico como molde.....	204
2.5.5.3. Reacción de PCR usando cDNA como molde.....	205
2.5.5.4 Reacción de PCR utilizando DNA plasmídico como molde.....	205
<u>2.5.6 Clonación de fragmentos de DNA en vectores plasmídicos.....</u>	205
2.5.6.1 Clonación de productos de PCR en el vector pCR2.1.....	205
2.5.6.2 Clonación de los productos de digestión en un vector plasmídico.....	206
2.5.6.2.A Digestión de vectores plasmídicos.....	207
2.5.6.2.B Purificación producto de digestión.....	207
2.5.6.2.C Ligación de un determinado inserto en el vector de elección.....	207
<u>2.5.7 Electroforesis de ácidos nucleicos.....</u>	207
2.5.7.1. Electroforesis de DNA en geles horizontales de agarosa.....	207
2.5.7.2 Electroforesis vertical de DNA en geles de poliacrilamida.....	207
<u>2.5.8 Análisis de mutaciones y polimorfismos en el mtDNA por RFLP.....</u>	208
2.5.8.1. Análisis de la mutación G15263A en mt-Cytb.....	208
<u>2.5.9 Secuenciación automática del DNA.....</u>	208
2.6 Extracción, manipulación y análisis de proteínas.....	209
<u>2.6.1 Extracción de proteínas totales de células en cultivo.....</u>	209
<u>2.6.2 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....</u>	210
<u>2.6.3 Síntesis “in vitro” de proteínas</u>	210
<u>2.6.4 Electroforesis de proteínas.....</u>	211
2.6.4.1. Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE.....	211
2.6.4.2. Electroforesis en geles nativos Blue Native: Primera dimensión.....	212
2.6.4.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturizante: Segunda dimensión.....	214
<u>2.6.5. Inmunodetección de proteínas por Western Blot.....</u>	215
2.6.5.1 Transferencia y fijación de proteínas a membranas de PVDF.....	215
2.6.5.2. Incubación de los anticuerpos primarios y secundarios.....	216
2.6.5.3 Detección de proteínas.....	216
2.6.5.4 Reutilización de las membranas.....	217
<u>2.6.6. Inmunofluorescencia.....</u>	217
Apéndice	219
Bibliografía	231

Introducción y Objetivos

El sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) representa la principal fuente de energía del organismo, en forma de la molécula de ATP. Gracias a la actividad de una ATP sintasa ubicada en la membrana interna mitocondrial, el gradiente protónico generado por la cadena transportadora de electrones a través de dicha membrana permite la síntesis de esta molécula.

Una de las características más relevantes de este sistema, es el doble origen genético de sus componentes. El sistema OXPHOS está constituido por dos transportadores electrónicos y cinco complejos enzimáticos, cuatro de los cuales están formados por subunidades codificadas tanto en el DNA mitocondrial (mtDNA) como en el nuclear.

El DNA mitocondrial de mamíferos presenta una gran variabilidad como consecuencia de mutaciones puntuales debidas, entre otros, a factores ambientales. El catálogo de mutaciones puntuales y deleciones del DNA mitocondrial que causan enfermedades humanas es muy amplio y continúa creciendo a un ritmo acelerado (MITOMAP, <http://www.mitomap.org>). Estas mutaciones están asociadas a un variado espectro de manifestaciones clínicas, mayoritariamente síndromes neurológicos degenerativos, que hasta la fecha no tienen tratamiento efectivo. Por otra parte, los defectos en el mtDNA también afectan a otros órganos provocando debilidad muscular, fallo cardiaco, diabetes, disfunciones renales, enfermedad hepática, etc. Desde el punto de vista bioquímico, las mutaciones del mtDNA pueden afectar a la función de uno o más complejos respiratorios, aunque a menudo su determinación precisa resulta difícil. Además de las mutaciones en el mtDNA, existen bastantes casos de enfermedades del sistema OXPHOS causadas por fallos en algunos genes nucleares que codifican proteínas esenciales para la correcta biogénesis del sistema.

La participación de dos genomas en la biogénesis del sistema OXPHOS, implica la necesidad de un exhaustivo control de los procesos de importe y ensamblaje de las subunidades para formar los complejos respiratorios, así como repercute en la complejidad de la etiología y manifestaciones de las enfermedades mitocondriales.

Además, la producción de energía es sólo una de las muchas funciones desempeñadas por las mitocondrias. La homeostasis del calcio, la biosíntesis de pirimidinas o de los grupos hemo y centros Fe-S, la regulación del proceso apoptótico o la producción de especies reactivas son algunos de los otros procesos metabólicos en los que este orgánulo interviene de manera crucial, algunos de los cuales están íntimamente ligados al sistema OXPHOS a través de alguno de sus componentes.

Por todo ello, el estudio de la mitocondria y en especial del sistema OXPHOS resulta de suma importancia para el entendimiento de la bioquímica y biología celular, así como para la comprensión de las patologías relacionadas. Desde su descubrimiento, este sistema se ha convertido en uno de los procesos bioquímicos mejor conocidos. Sin embargo, todavía quedan muchos aspectos por esclarecer, tanto estructurales, (cristalización de CI, sitios de unión de transportadores, etc.), como funcionales (papel de algunas subunidades, mecanismos de bombeo protónico, etc.). Por otro lado, algunas de las cuestiones del sistema OXPHOS que parecían estar bien definidas se están revisando en la actualidad. Es el caso por ejemplo de la organización del sistema. Recientemente se ha propuesto una distribución diferencial de sus componentes en compartimentos mitocondriales distintos, y también se han descrito interacciones entre los diferentes elementos de la cadena que llevarían a la formación de supercomplejos respiratorios.

Esta nueva organización del sistema plantea interrogantes en cuanto a la participación de nuevas proteínas, factores o elementos regulatorios, y también en cuanto a las

consecuencias funcionales derivadas de la nueva estructuración del mismo, así como el papel que pasarían a jugar sus componentes en esta nueva situación.

En este marco general, la presente tesis pretende abordar dos problemas relacionados con el estudio estructural y funcional de este sistema:

Parte I: Organización modular de la cadena respiratoria.

Se centra en el estudio de la organización del sistema OXPHOS, en concreto en aspectos relacionados con la formación de los supercomplejos respiratorios y en su relación con los transportadores móviles, concretamente con el Coenzima Q (CoQ). Los objetivos correspondientes a este apartado se enumeran a continuación:

1.- Determinar el papel del CoQ en el paso de electrones al Complejo III, y su vinculación a la formación de los supercomplejos CI+CIII en la cadena respiratoria.

2.- Regulación de la formación de los supercomplejos: identificación y caracterización de proteínas implicadas en estos procesos.

Parte II: Optogenética mitocondrial.

Cuando existen defectos en la cadena respiratoria mitocondrial, se produce un déficit de síntesis de ATP con las consiguientes consecuencias para la funcionalidad celular. El objetivo de esta parte del trabajo es:

1.- Restaurar la función de bombeo protónico propia de la cadena transportadora de electrones, cuando existen defectos en ella. Se plantea la xenoexpresión, en células de mamífero, de bombas de protones fotoinducibles bacterianas, de manera análoga a las utilizadas en la “optogenética”. De esta manera se pretende:

A- Aumentar el conocimiento básico de la interacción de los distintos elementos del sistema OXPHOS (cadena respiratoria y ATPsintasa) con otras vías metabólicas,

B- Plantear una posibilidad de terapia para restaurar una cierta tasa de síntesis de ATP en casos de una cadena respiratoria defectuosa.

Revisión Bibliográfica

1. LA MITOCONDRIA

Las mitocondrias son orgánulos presentes en el citoplasma de la mayoría de las células eucariotas, a excepción de en torno a 1.000 especies de protistas (Cavalier-Smith 1987; Mai, Ghosh et al. 1999; Lithgow y Schneider 2010; Lane 2011). El número de mitocondrias presentes en cada célula, así como su morfología y localización, depende tanto del tipo celular como del estado metabólico del mismo. Las mitocondrias son orgánulos plásticos, capaces de modificar su forma y de sufrir procesos de fusión y fisión (Chen y Chan 2009; Palmer, Osellame et al. 2011). Dichos procesos parecen ser importantes para el mantenimiento de la función mitocondrial, especialmente en las células nerviosas, puesto que sus defectos están relacionados con algunas neuropatías y enfermedades neurodegenerativas (Bueler 2009; Cartoni y Martinou 2009; Reddy y Shirendeb 2011; Reddy, Tripathi et al. 2011).

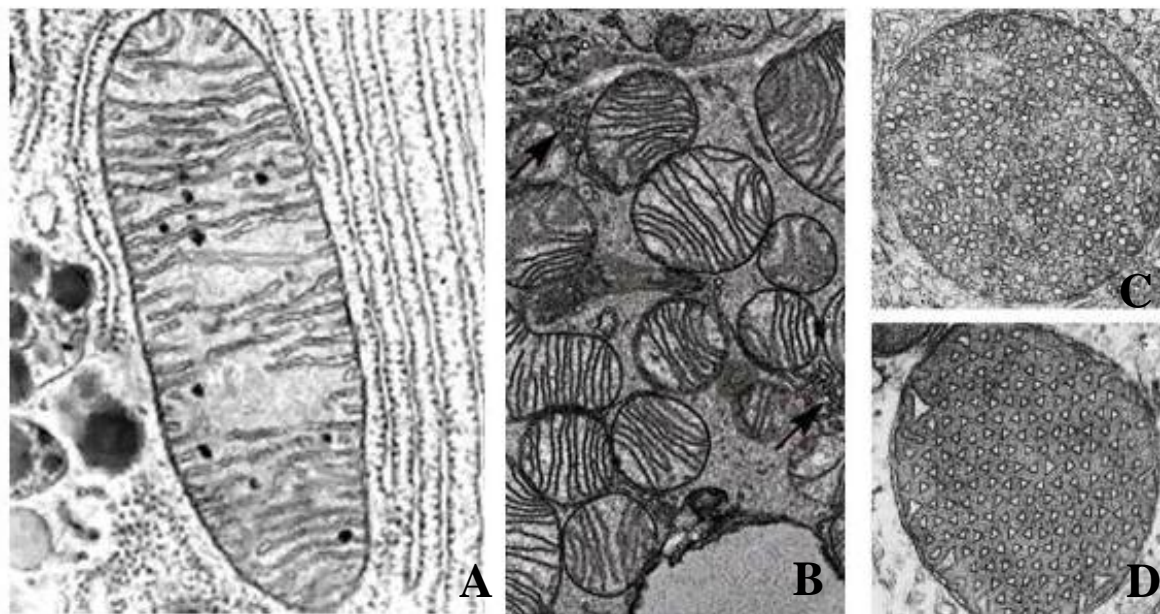


Figura 1. Diversidad en la ultraestructura mitocondrial. A) Imagen longitudinal de una mitocondria obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión. *Imagen tomada de biologia.edu.ar.* B) Sección transversal de mitocondrias con crestas laminares. *Tomada de ies.rayuela.mostoles.educa.madrid.org.* C) Sección transversal de una mitocondria de la corteza adrenal. D) Sección transversal de una mitocondria de astrocyte. C) y D) *Imágenes tomadas de (Zick, Rabl et al. 2009).*

El conjunto de mitocondrias que alberga una célula forma un retículo al que se denomina condrioma. Este establece una estrecha relación con elementos del citoesqueleto celular, en particular con microtúbulos, permitiendo la movilidad mitocondrial (Anesti y Scorrano 2006; Boldogh y Pon 2007).

La presencia de doble membrana y de un genoma propio, son características que permitieron el desarrollo de la teoría endosimbionte acerca del origen de la mitocondria (Sagan 1967).

1.1 Origen de la mitocondria

El origen de la mitocondria se remonta 1,5 mil millones de años atrás, cuando tuvo lugar un proceso de endosimbiosis probablemente entre dos organismos procariotas (van

der Giezen y Tovar 2005; van der Giezen, Tovar et al. 2005). Todas las células eucariotas derivan de este organismo primigenio, de manera que incluso aquellas que hoy en día carecen de mitocondrias, en algún momento de la evolución dispusieron de ellas. Pocos datos se tienen acerca del hospedador primitivo, si bien el organismo endosimbionte antecesor de la mitocondria parece ser una α -proteobacteria (Gray, Burger et al. 1999; Karlberg, Canback et al. 2000). Se desconoce el tipo de metabolismo que pudieran tener estos organismos, no obstante se han desarrollado diversas propuestas acerca de las posibles combinaciones y el medio ambiente terrestre que pudieron conferir ventaja evolutiva al establecimiento de la simbiosis (Andersson, Karlberg et al. 2003; Cavalier-Smith 2006).

Destaca la variedad de tamaños en los genomas mitocondriales, desde 16,5 kb en humanos hasta 500 kb en algunas especies de plantas. Sin embargo la mayoría de ellos contienen información para la síntesis de tan sólo 12 a 20 proteínas, involucradas en la respiración aeróbica o bien en la traducción proteica (Andersson, Karlberg et al. 2003). A pesar de la enorme diversidad existente, todos estos genomas tienen un origen monofilético.

El genoma de la proteobacteria ancestral era mucho mayor al actual genoma mitocondrial. A lo largo del proceso evolutivo, a medida que el endosimbionte fue instalándose en la célula hospedadora como un orgánulo, tres procesos tuvieron lugar: la pérdida de contenido genético, la transferencia de genes al núcleo celular y la duplicación de genes nucleares y su posterior divergencia funcional para finalmente importar estas proteínas al orgánulo, donde desempeñaron nuevas funciones (Kuan y Saier 1993; Walker y Runswick 1993). El mantenimiento de un genoma mitocondrial propio tiene un alto coste (Feagin 2000), sin embargo no se ha producido una transferencia de genes total. Dos hipótesis tratan de explicar este fenómeno, la teoría de la hidrofobicidad (von Heijne 1986), y la teoría acerca del control redox de la expresión génica de los componentes de las cadenas respiratorias (Allen y Raven 1996).

El origen endosimbionte de la mitocondria explica alguna de las características de estos orgánulos, tales como la existencia de doble membrana y de un genoma propio circular, que se describen a continuación, o su división mediante fisión binaria.

1.2 Estructura de la mitocondria

El uso de la microscopía electrónica permitió a principios de los años 50 determinar que la mitocondria presenta dos membranas (Palade 1953): una externa (60% proteínas, 40% lípidos) que la separa del citoplasma y que es permeable a todas aquellas moléculas inferiores a 10 kDa; y la membrana interna, que tiene un alto contenido en proteínas (80% proteínas, 20% lípidos) y que constituye una barrera muy selectiva para el paso de moléculas. Ello permite el mantenimiento de un gradiente electroquímico de protones, originado por la cadena de transporte electrónico, necesario para la síntesis del ATP. La membrana interna define dos compartimentos adicionales, el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial. Esta última alberga las moléculas de DNA mitocondrial (mtDNA) y proteínas necesarias para su replicación y transcripción, los ribosomas encargados de la traducción de las proteínas codificadas en dicho genoma, así como otras 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 (Attardi y Schatz 1988).

La membrana externa mitocondrial, puede asociarse físicamente al retículo endoplásmico (RE) a través de estrechos contactos llamados MAM (*Membrana de RE*

Asociada a Mitochondria). La distancia mínima descrita entre ambos es de 10-25 nm. Se estima que sólo un 12% de la superficie de la membrana externa mitocondrial participa en estas asociaciones, que tienen por objeto la regulación de los niveles de calcio en la mitocondria y el transporte lipídico (Giorgi, De Stefani et al. 2009; Hayashi, Rizzuto et al. 2009).

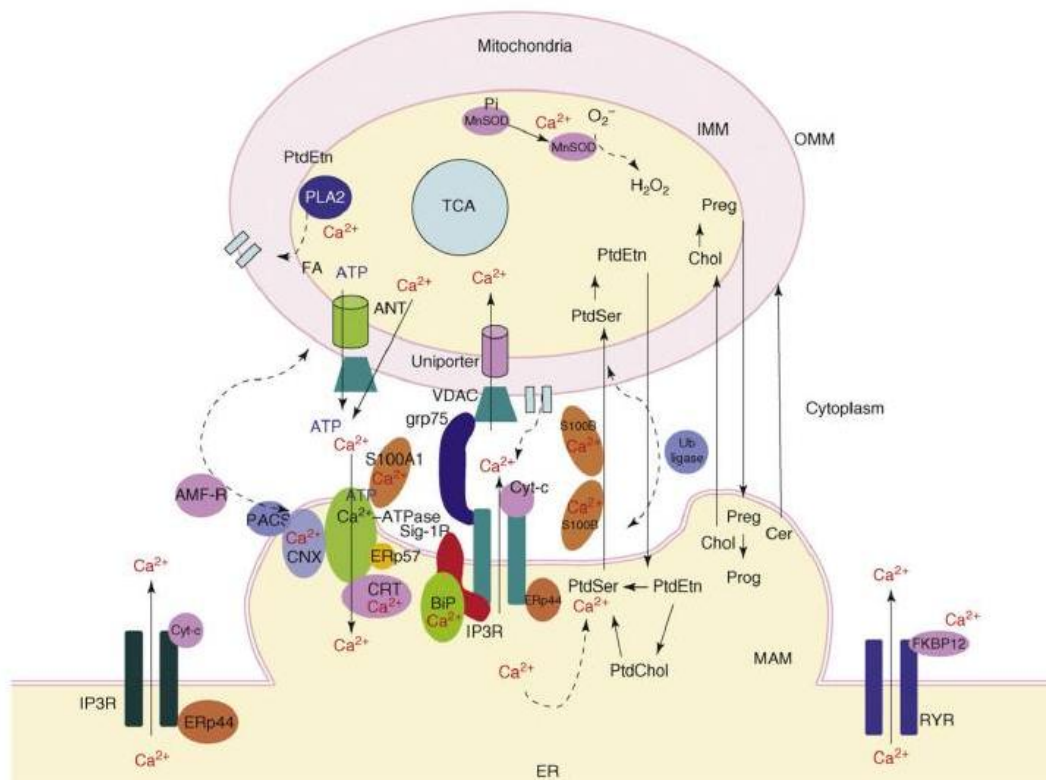


Figura 2. MAM, relación entre la mitocondria y el RE. Las regiones MAM están enriquecidas en receptores IP3 (IP3R). Estos se estabilizan gracias a Sig-1R en la luz del RE, y a través de grp75 citosólico los IP3R se conectan con VDAC en la membrana externa mitocondrial. El Cyt c liberado de la mitocondria también se asocia a IP3Rs, provocando la liberación masiva de Ca^{2+} . El aumento de la concentración de Ca^{2+} a nivel de las MAM activa el transportador de calcio mitocondrial, y permite su acumulación en la matriz. Este aumento de Ca^{2+} en la mitocondria activa el ciclo de Krebs y estimula la producción de ATP, y su posterior liberación hacia el citosol vía ANT y VDAC. Esto provoca la activación de Ca^{2+} -ATPasa en el RE. El aumento de Ca^{2+} mitocondrial también activa la manganeso superóxido dismutasa (MnSOD) y la fosfolipasa A2 (PLA2), aumentando la producción de ácidos grasos requeridos en la formación de poros en la membrana externa mitocondrial. El transporte de fosfolípidos (fosfatidíserina, PtdSer, y fosfatidiletanolamina, PtdEtn), colesterol (Chol) y ceramidas (Cer) también ocurre a nivel de MAM. *Imagen tomada de (Hayashi, Rizzuto et al. 2009).*

La membrana interna mitocondrial posee una mayor superficie que la externa y presenta dos regiones diferenciadas: las crestas mitocondriales, invaginaciones que protruyen hacia la matriz mitocondrial, y la membrana interna que rodea la matriz, la cual transcurre adyacente a la membrana externa, con la que establece contactos puntuales en los llamados sitios de contacto. Ambas regiones se conectan a través de estrechas aperturas tubulares con diámetros de entre 12 y 40 nm llamadas uniones de las crestas (Zick, Rabl et al. 2009). Este hecho determina un nuevo compartimento mitocondrial, el espacio intercrestal. La formación de las crestas es un proceso dinámico, reversible,

vinculado al estado respiratorio (Hackenbrock 1966; Hackenbrock 1968; Vogel, Bornhovd et al. 2006). Las crestas son el compartimento donde tiene lugar la fosforilación oxidativa, y también son esenciales durante el proceso de apoptosis y liberación del citocromo *c* (Cyt *c*) (Gilkerson, Selker et al. 2003; Wurm y Jakobs 2006; Frey y Sun 2008).

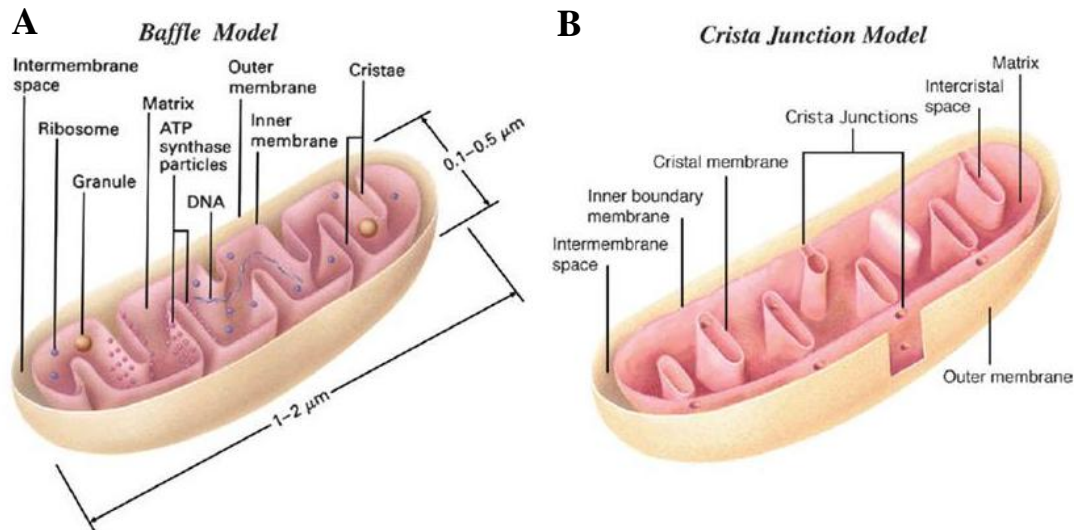


Figura 3. Estructura mitocondrial. A) Modelo tradicional basado en las observaciones de Palade con cuatro compartimentos mitocondriales: membrana externa, membrana interna, espacio intermembrana y matriz. B) Modelo de uniones de las crestas. La membrana interna presenta dos regiones diferenciadas, las crestas y la membrana interna que rodea a la matriz, conectadas a través de las uniones de las crestas. El espacio delimitado por las membranas de las crestas se denomina espacio intercrestal. *Imagen tomada de (Logan 2006).*

1.3 Genoma mitocondrial

El mtDNA de mamíferos es una molécula circular de doble cadena de aproximadamente 16,5 kb que se replica y transcribe en la matriz mitocondrial (Clayton 1982; Clayton 1991). Cada mitocondria contiene entre 2 y 10 copias de mtDNA y cada célula alrededor de 10^3 y 10^4 copias, dependiendo del tejido y de las necesidades energéticas de la célula (Satoh y Kuroiwa 1991). La replicación de estos genomas es independiente del ciclo celular.

El mtDNA de mamíferos contiene información para 37 genes: 13 proteínas, que forman parte de la cadena de transporte electrónico, y 24 RNAs necesarios para su síntesis (2 RNAs ribosómicos y 22 tRNAs). De estos polipéptidos, siete forman parte del complejo I (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 y ND6), uno corresponde al apocitocromo b del complejo III (CYTB), tres subunidades del complejo IV (COI, COII y COIII), y dos son las subunidades 6 y 8 de la ATPasa o complejo V (ATP6 y ATP8) (Anderson, Bankier et al. 1981; Bibb, Van Etten et al. 1981; Bayona-Bafaluy, Acin-Perez et al. 2003). Estos genes se distribuyen heterogéneamente entre las dos cadenas del mtDNA, que por su diferente contenido en bases G+T pueden separarse utilizando gradientes alcalinos de CsCl (Kasamatsu y Vinograd 1974), dando lugar a la denominación de cadena pesada (H, heavy) y ligera (L, light). La cadena H contiene

información para los dos rRNAs, 14 tRNAs y 12 polipéptidos, mientras que la cadena L sólo contiene 9 genes: 8 tRNAs y la subunidad ND6 del complejo I.

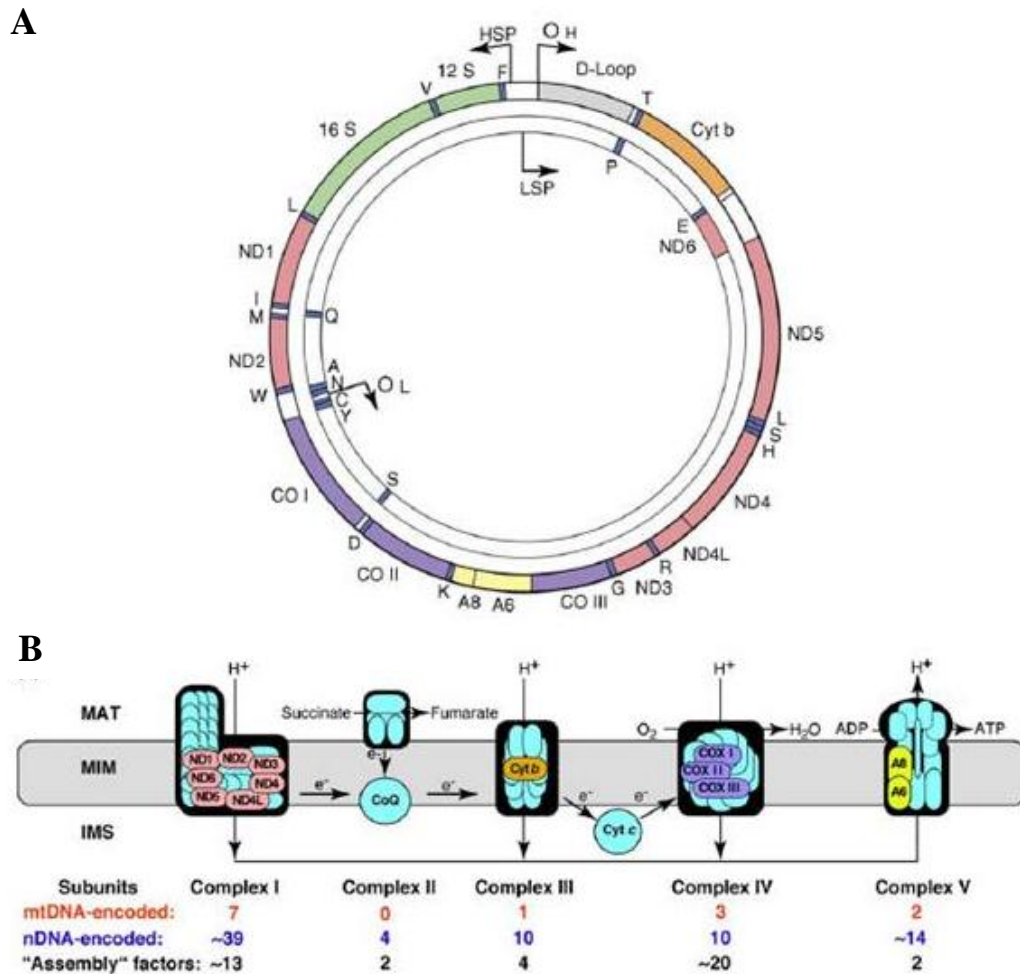


Figura 4. Mapa genético del mtDNA humano y sistema OXPHOS. A) Mapa genético del mtDNA humano. Representación de las dos cadenas que lo componen y los genes que codifican: siete subunidades de complejo I (NDs), una subunidad de complejo III (CYTB), tres subunidades de complejo IV (COX), y dos subunidades de complejo V (A6 y A8), se muestran en distintos colores. Los RNAs ribosómicos 12S y 16S se muestran en verde y los 22 tRNAs en azul oscuro. B) Representación esquemática del sistema OXPHOS embebido en la membrana interna mitocondrial (IMM). Muestra las subunidades codificadas por el nDNA en azul y las codificadas por el mtDNA en distintos colores. Los electrones (e^-) fluyen a través de los complejos de la cadena de transporte electrónico (mtCTE) y los protones son bombeados desde la matriz (MAT) al espacio intermembrana (IMS), a través de los complejos I, III y IV, volviendo a la matriz mediante el complejo V para producir ATP. Los transportadores móviles son el coenzima Q10 (CoQ) y el citocromo *c* (Cyt *c*). *Figura adaptada de (Schon, DiMauro et al. 2010).*

El genoma mitocondrial de mamíferos reúne una serie de características particulares: I) su código genético difiere ligeramente del código genético universal (Barrell, Bankier et al. 1979); II) presenta una alta tasa de mutación, 10 veces superior a la del DNA nuclear (Brown, George et al. 1979), debido a la exposición del mtDNA a las especies reactivas de oxígeno generadas en el interior de la mitocondria, a su menor protección por asociación de proteínas que el nuclear, y a la ausencia de sistemas eficientes para su reparación (Fernandez-Silva, Enriquez et al. 2003); III) se transmite por herencia materna, no mendeliana (Giles, Blanc et al. 1980); IV) es muy compacto ya que carece de intrones,

de regiones no traducidas en los extremos del gen y de espaciadores entre genes. Otra característica de los genes codificados en el mtDNA es que la mayor parte de ellos carecen de codón de parada. En estos casos, se ha visto que presentan una T o TA justo después del último triplete y que estas bases van seguidas por el extremo 5' del gen adyacente por lo que el codón de terminación se genera mediante la poliadenilación del extremo 3' del mRNA correspondiente (Ojala, Montoya et al. 1981).

Otro aspecto interesante del mtDNA es la posibilidad de que existan varias formas alélicas en un mismo individuo, pudiendo diferir su proporción relativa dependiendo del tejido (Holt, Harding et al. 1988). La presencia de más de un tipo de mtDNA en una célula o tejido se denomina heteroplasmia, frente al término homoplasmia que se utiliza cuando todas las moléculas de mtDNA de una célula u organismo son idénticas. Dentro de un mismo individuo pueden encontrarse distintos grados de heteroplasmia en los diferentes tejidos y suele darse la necesidad de alcanzar un umbral de porcentaje de DNA mutante para que empiecen a manifestarse los efectos patológicos de la mutación (Mazat, Rossignol et al. 2001). Otro fenómeno destacable es que mientras algunas moléculas de mtDNA pueden sufrir varias rondas de replicación a lo largo del ciclo celular, otras pueden no replicarse. Este hecho, junto a la distribución al azar de mitocondrias entre las células hijas en el proceso de división celular, permite la segregación de variantes alélicas.

El mtDNA es además altamente polimórfico: esto significa que hay numerosas diferencias en su secuencia, no patológicas, entre individuos del mismo grupo étnico y que se ven incrementadas entre individuos de grupos distintos. Estas variantes se denominan haplogrupos del mtDNA y se basan en patrones específicos de polimorfismos. Algunos haplogrupos parecen estar relacionados con diversos procesos como la motilidad espermática (Ruiz-Pesini, Lapena et al. 2000), el envejecimiento (Castrì, Melendez-Obando et al. 2009), la susceptibilidad a diversas enfermedades (Hendrickson, Hutcheson et al. 2008; Khusnutdinova, Gilyazova et al. 2008) o la sensibilidad a fármacos (Pacheu-Grau, Gomez-Duran et al. 2010; Pacheu-Grau, Gomez-Duran et al. 2010). Además, se han utilizado para seguir el rastro de los movimientos poblacionales mundiales, la antigüedad de la especie humana y proporcionan un medio para evaluar la descendencia étnica (Horai 1995; Disotell 1999; Rhouda, Martínez-Redondo et al. 2009; Catelli, Alvarez-Iglesias et al. 2011).

Durante mucho tiempo se pensó que las moléculas de mtDNA están desnudas y sin protección, es decir, que no se encuentran asociadas a proteínas, como las histonas al DNA nuclear. Sin embargo, ahora se sabe que el mtDNA está asociado a varias proteínas dentro de una estructura denominada nucleoide. Los nucleoides tienen forma oval y están formados por un número variable de copias de mtDNA, entre 1-10. Recientemente se ha descrito que tienen un tamaño de ~70 nm y la mayor parte de ellos contienen una sola copia de mtDNA (Kukat, Wurm et al. 2011). Este tamaño implica un alto grado de compactación del DNA, ya que dicho diámetro corresponde a 300 pb lineales (Boghenhagen 2011).

La principal proteína estructural en el nucleoide es el factor de transcripción mitocondrial A (TFAM ó mtTFA), de la que se calcula que existen $1,4 \times 10^3$ moléculas por nucleoide. Además de compactar el mtDNA, TFAM funciona como factor de transcripción (ver más abajo) y recientemente se ha determinado el cambio estructural que provoca su unión en la molécula de mtDNA (Ngo, Kaiser et al. 2011; Rubio-Cosials, Sidow et al. 2011).

Se ha descrito que la organización del mtDNA en los nucleoides es importante durante la segregación y afecta al grado de heteroplasmia (Jacobs, Lehtinen et al. 2000; Poe, Duffy et al. 2010).

También se ha propuesto un modelo de la estructura del nucleoide en capa. En este modelo, la replicación y la transcripción tienen lugar en el interior del nucleoide, mientras que la traducción tiene lugar en la zona periférica, estando el nucleoide unido a la membrana interna mitocondrial (Bogenhagen, Rousseau et al. 2008).

1.4 Biogénesis mitocondrial

1.4.1 Replicación, transcripción y traducción mitocondrial

Como se ha mencionado anteriormente, la replicación del mtDNA tiene lugar en la matriz mitocondrial independientemente de la fase del ciclo celular (Bogenhagen y Clayton 1977). La única DNA polimerasa presente en la mitocondria y responsable de la síntesis, reparación y recombinación del mtDNA es la DNA polimerasa γ (Bolden, Fry et al. 1972; Fridlender, Fry et al. 1972; Bolden, Noy et al. 1977; Kaguni 2004) compuesta por dos subunidades: la subunidad catalítica α (Gray y Wong 1992), y la subunidad accesoria β , que le confiere capacidad de procesamiento y reconocimiento de los cebadores (Olson, Wang et al. 1995; Carrodegua, Kobayashi et al. 1999; Lim, Longley et al. 1999). Otras proteínas implicadas en la síntesis de DNA son la proteína de unión a cadena sencilla (*mtSSB: Single-Stranded Binding Protein*) (Tiranti, Rocchi et al. 1993), la DNA helicasa Twinkle (Spelbrink, Li et al. 2001) y, probablemente la mtDNA topoisomerasa I (Zhang, Barcelo et al. 2001; Wang 2002).

Existen varios modelos sobre la replicación del mtDNA. El modelo propuesto por Vinograd-Clayton (Kasamatsu y Vinograd 1974; Clayton 1982), sugiere un mecanismo de replicación asimétrico y unidireccional de las dos cadenas a partir de orígenes de replicación diferentes y específicos de cada una de ellas, en un proceso íntimamente unido a la transcripción del mtDNA. Por otro lado, el modelo llamado de Holt-Jacobs propone la replicación simultánea de ambas cadenas a partir de una horquilla de replicación única, bien de manera unidireccional (Holt, Lorimer et al. 2000), o bidireccional (Bowmaker, Yang et al. 2003).

En cuanto a la transcripción del mtDNA, la iniciación tiene lugar a partir de tres promotores, un promotor de cadena ligera (LSP) y dos promotores en la cadena pesada (HSP1 y HSP2). En el proceso de transcripción desde LSP y HSP2 se originan largos transcritos policistrónicos, mientras que el iniciado en HSP1 produce un transcrito corto que contiene tan sólo tRNA^{Phe} y los dos rRNAs (Shadel 2008). Las principales proteínas implicadas en la transcripción mitocondrial son la RNA polimerasa POLRMT, y los factores de transcripción TFAM y TFB2M (Shutt y Shadel 2010). TFB1M ha sido considerado durante algún tiempo otro factor de transcripción mitocondrial debido a experimentos *in vitro*, donde se demostraba su unión a TFAM y su actividad, aunque considerablemente inferior a la de TFB2M (Falkenberg, Gaspari et al. 2002; McCulloch, Seidel-Rogol et al. 2002). Sin embargo, recientemente se ha visto que no ejerce esta función, sino la de metilación del rRNA 12S (Cotney, McKay et al. 2009; Litonin, Sologub et al. 2010). Otras proteínas posiblemente implicadas en el proceso de transcripción mitocondrial son MRPL12, capaz de asociarse a POLRMT (Wang, Cotney et al. 2007), o proteínas de la familia de mTERF (Shutt y Shadel 2010).

Debido a la generación de transcritos policistrónicos, un proceso de edición del RNA mediado por las RNasa P y RNasa Z posibilita la liberación de los tRNAs, que se sigue de la adición del CCA al extremo 3' (Nagaike, Suzuki et al. 2001), y de los rRNAs y mRNAs que serán poliadenilados (Ojala, Montoya et al. 1981; Tomecki, Dmochowska et al. 2004).

El reconocimiento de los mRNAs mitocondriales por los ribosomas es un proceso poco conocido en mamíferos al carecer de regiones no traducidas en el extremo 5' (Montoya, Ojala et al. 1981). La falta de estructura secundaria en esa región del mRNA o la existencia de señales internas podrían participar en la iniciación de la traducción (Jones, Wilkinson et al. 2008). Los mitorribosomas o ribosomas mitocondriales son, junto al sistema OXPHOS, los únicos componentes de la mitocondria con doble origen genético. Alrededor de 80 proteínas del mitorribosoma están codificadas en el núcleo, y se ensamblan, una vez importadas a la matriz, a los dos rRNAs codificados en el mtDNA (rRNAs 12S y 16S) para originar el ribosoma (Attardi, Chomyn et al. 1990). El ensamblaje del ribosoma y el inicio de la traducción precisa solamente de dos factores de iniciación, MTIF2 (*mitochondrial initiation factor 2*), que realiza las funciones de IF1 y IF2 de bacterias (Gaur, Grasso et al. 2008), y MTIF3 que se une directamente al tRNA iniciador (Christian y Spremulli 2009). Se han identificado tres factores de elongación de las proteínas mitocondriales (mtEF-Tu, mtEF-Ts y mtEF-G) en hígado bovino (Schwartzbach y Spremulli 1989; Chung y Spremulli 1990). En humanos se conocen los factores de elongación EF-Ts, EF-Tu, EF-G1 y EF-G2 (Xin, Worix et al. 1995; Hammarsund, Wilson et al. 2001; Bhargava, Templeton et al. 2004; Tsuboi, Morita et al. 2009). Para la terminación de la traducción se han descrito también factores implicados: mtRRF (*ribosome release factor*), mtRF1 (*translation release factor*) y su homólogo mtRF1a (Zhang y Spremulli 1998; Soleimanpour-Lichaei, Kuhl et al. 2007; Nozaki, Matsunaga et al. 2008).

1.4.2 Expresión coordinada de dos genomas

El mtDNA contiene tan sólo una pequeña proporción de los genes que necesita el orgánulo para desempeñar sus funciones biológicas. La mayor parte de las proteínas mitocondriales se encuentran codificadas en el núcleo celular. Por ello, se dice que la mitocondria es un orgánulo semiautónomo.

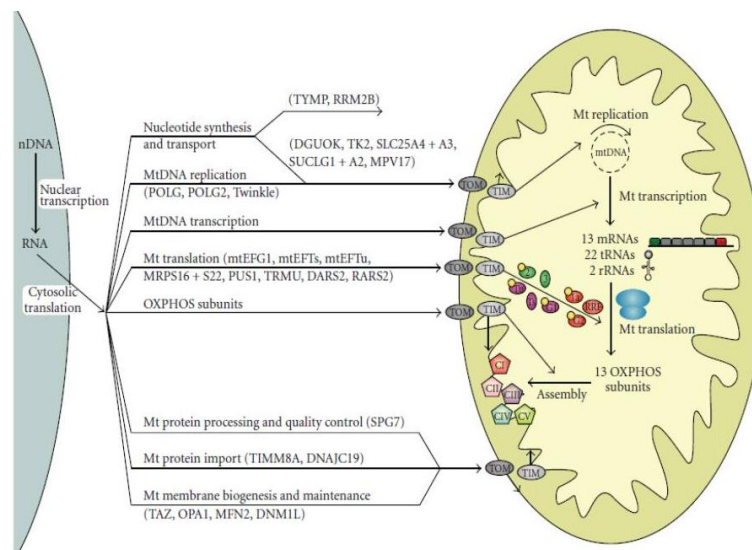


Figura 5. Doble origen genético de las proteínas mitocondriales. Imagen tomada de (Smits, Smeitink et al. 2010).

La coordinación de la transcripción de los genes del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) en los dos compartimentos celulares está mediada, en parte, a través de ciertas hormonas, especialmente hormonas esteroideas (Scheller y Sekeris 2003) y tiroideas (Enriquez, Fernandez-Silva et al. 1999). La unión de la hormona a su receptor nuclear induce la transcripción de genes del sistema OXPHOS y la de factores de transcripción de estos genes (Nelson, Luciakova et al. 1995; Wrutniak-Cabello, Casas et al. 2001; Scarpulla 2002; Weitzel, Iwen et al. 2003). También se induce la expresión de los factores de transcripción mitocondrial (Weitzel, Iwen et al. 2003; Gleyzer, Vercauteren et al. 2005; Scarpulla 2006), que son traslocados a la mitocondria, coordinando la transcripción de los genes OXPHOS en ambos compartimentos. Por otro lado, la presencia de receptores de hormonas tiroideas y esteroideas en la mitocondria, así como de secuencias de unión a éstas en el genoma mitocondrial han sugerido el efecto directo de la hormona en la transcripción mitocondrial, sin mediación de factores nucleares (Sekeris 1990; Chen, Delannoy et al. 2004). Esta acción directa de las hormonas tiroideas sobre la transcripción mitocondrial ha sido demostrada experimentalmente (Casas, Rochard et al. 1999; Enriquez, Fernandez-Silva et al. 1999). Sin embargo, se han observado diferencias en la acción de estas hormonas en función del tipo celular, en cuanto al mecanismo a través del cual ejercen su acción, y destacando que la acción directa de la hormona sobre la mitocondria, sin implicación de proteínas nucleares, es específica de tejido (Fernandez-Vizarra, Enriquez et al. 2008).

Entre los factores de transcripción que controlan la expresión de los genes respiratorios codificados en el núcleo se encuentran NRF-1 (Cyt *c*, ATPase- γ) y NRF-2 (subunidades del CIV). NRF-1 también induce la expresión de dos enzimas de la ruta de biosíntesis del grupo hemo (Braidotti, Borthwick et al. 1993; Aizencang, Bishop et al. 2000), de la proteína Tom20 perteneciente al sistema de importe de proteínas en la mitocondria (Blesa, Prieto-Ruiz et al. 2007), y también actúa sobre los factores de transcripción mitocondrial TFAM y TFB2M, y sobre TFB1M, de manera que coordina la expresión simultánea de los dos genomas (Virbasius y Scarpulla 1994; Gleyzer, Vercauteren et al. 2005). En esta misma dirección, NRF-2 también se ha descrito que activa la expresión tanto de subunidades del complejo respiratorio IV (Virbasius, Virbasius et al. 1993; Ongwijitwat y Wong-Riley 2005), como de TFAM, TFB1M y TFB2M (Larsson, Wang et al. 1998; Falkenberg, Gaspari et al. 2002; McCulloch, Seidel-Rogol et al. 2002).

Por otro lado, independientemente de los mecanismos anteriores, para lograr la expresión coordinada de los componentes de la cadena respiratoria sintetizados en el citoplasma y en la matriz mitocondrial, los factores de transcripción mitocondrial, y los factores de transcripción de genes nucleares codificantes de proteínas mitocondriales están sujetos al control de coactivadores de la transcripción (PGC-1 α , PGC-1 β y PRC), cuya expresión se induce bajo determinadas condiciones ambientales y también en respuesta a señales intracelulares (Scarpulla 2006; Scarpulla 2008).

1.4.2 Importe de proteínas

Además de la expresión coordinada de sus genes en dos compartimentos celulares diferentes, la mitocondria debe solventar el problema del importe de aquellos productos génicos sintetizados en el exterior del orgánulo. En mamíferos, de aproximadamente 1.500 proteínas mitocondriales diferentes (Pagliarini, Calvo et al. 2008), tan sólo el 1% se sintetizan en la matriz, y las demás han de ser importadas a través de diferentes mecanismos. Para ello, existe gran diversidad de señales contenidas en la proteína mitocondrial necesarias para importarse en el orgánulo y alcanzar allí su posición final, con la topología y disposición adecuadas.

Targeting and sorting signals of mitochondrial precursor proteins			
A	Presequences and variations	Imported via	Destination of proteins
	Presequence Amphipathic α helix Typically cleaved after import	MPP +++ N ————— C	TOM TIM23 PAM Matrix
	Presequence + uncleaved hydrophobic anchor (sorting signal)	MPP +++ N ————— C	TOM TIM23 (PAM) Inner membrane
	Presequence + cleaved hydrophobic sorting signal (bipartite presequence)	MPP +++ N ————— C IMP	TOM TIM23 (PAM) Intermembrane space
B	Noncleavable signals of hydrophobic proteins		
	β signal	TOM signal β signal N ————— C	TOM SAM Outer membrane (β -barrel)
	Signal-anchor sequence	N ————— C	Mim1 Outer membrane (α -helical)
	C tail anchor	N ————— C	? Outer membrane (α -helical)
	Internal signal	N ————— C	(TOM) (SAM)
	Multiple internal signals	N ————— C	TOM Tim9-Tim10 TIM22 Inner membrane (metabolite carrier)
	Presequence-like internal signal (after hydrophobic region)	+++ N ————— C	TOM TIM23 Inner membrane
C	Internal signal for intermembrane space		
	Cysteine-containing signal	Cys Cys Cys Cys N ————— C	TOM MIA Intermembrane space

Figura 6. Señales descritas en precursores de proteínas mitocondriales para el direccionamiento y la distribución en el orgánulo. Imagen obtenida de (Chacinska, Koehler et al. 2009).

Una gran parte de las proteínas mitocondriales se sintetizan como precursores que poseen en su extremo amino una presecuencia. Esta consiste en una secuencia de 15- 50 aminoácidos, que se elimina proteolíticamente una vez que la proteína se encuentra en la matriz gracias a la peptidasa mitocondrial MPP (*mitochondrial processing peptidase*). Esta secuencia de aminoácidos adopta una estructura secundaria en hélice α , anfipática y positivamente cargada. Su conformación se modifica al atravesar los complejos de importe proporcionando diferente información. En algunos casos, esta presecuencia no se escinde y forma parte de la proteína madura. Un grupo de proteínas precursoras poseen además de la presecuencia, una secuencia hidrofóbica que permite su anclaje en la membrana interna mitocondrial. Cuando esta es la ubicación final de la proteína, la presecuencia no se escinde sino que forma parte de la proteína madura y permanece anclada a la membrana; sin embargo en el caso de las proteínas del espacio intermembrana, se produce la ruptura de la misma por una peptidasa de membrana interna (IMP, *inner membrane peptidase*) u otra proteasa (AAA-proteasas), de manera que la proteína madura queda soluble (Chacinska, Koehler et al. 2009).

Otro tipo de señal de importe a mitocondria consiste en varias secuencias no contiguas a lo largo de la proteína. Este es el caso de los transportadores de metabolitos, localizados en la membrana interna mitocondrial. Entre las proteínas de membrana externa, las de tipo barril β poseen una señal interna que permite el reconocimiento de la mitocondria, y a través de la última lámina beta se une a la maquinaria de ensamblaje SAM (*sorting and assembly machinery*), mientras que las proteínas de tipo hélice α presentan una hélice transmembrana flanqueada por residuos cargados positivamente.

Algunos precursores de proteínas mitocondriales poseen una señal mitocondrial de espacio intermembrana (MISS) que incluye un residuo hidrofóbico y un residuo cisteína que permite la formación de un puente disulfuro con el receptor del espacio intermembrana Mia40 (Chacinska, Koehler et al. 2009).

Todas estas señales permiten la inserción de proteínas en la mitocondria a través de diferentes rutas de importe:

Ruta de la presecuencia

Los precursores proteicos que disponen de presecuencia se importan parcialmente plegados. El punto de entrada a la mitocondria es el complejo TOM (traslocasa de membrana externa), un complejo proteico construido entorno a Tom40, una proteína integral de membrana con estructura de barril beta que actúa de canal (Ahting, Thieffry et al. 2001). La preproteína se une al receptor Tom20 (Saitoh, Igura et al. 2007), que la transfiere a Tom22, y atraviesa Tom40 con la ayuda de Tom5. A continuación la proteína se libera del complejo TOM tras la interacción con Tim21 y se une a Tim50, el receptor de la traslocasa de membrana interna TIM23, con la que el complejo TOM establece una interacción transitoria (Chacinska, Lind et al. 2005; Tamura, Harada et al. 2009). A través de Tim50, la preproteína atraviesa Tim23 en un proceso que requiere del correcto potencial de membrana mitocondrial (Shariff, Ghosal et al. 2004; Krayl, Lim et al. 2007). Desde el Tim23, la proteína puede salir hacia la bicapa lipídica y anclarse en la membrana interna mitocondrial gracias a Tim17 (Martinez-Caballero, Grigoriev et al. 2007), o bien se une a la chaperona mtHsp70 perteneciente al motor de importe expuesto a matriz, PAM, y se trasloca a la matriz, en un proceso en el que participan Tim44, Pam16, Pam17 y Pam18 (Kozany, Mokranjac et al. 2004; Li, Dudek et al. 2004; Hutu, Guiard et al. 2008). Este proceso requiere gasto energético, esto es hidrólisis de ATP.

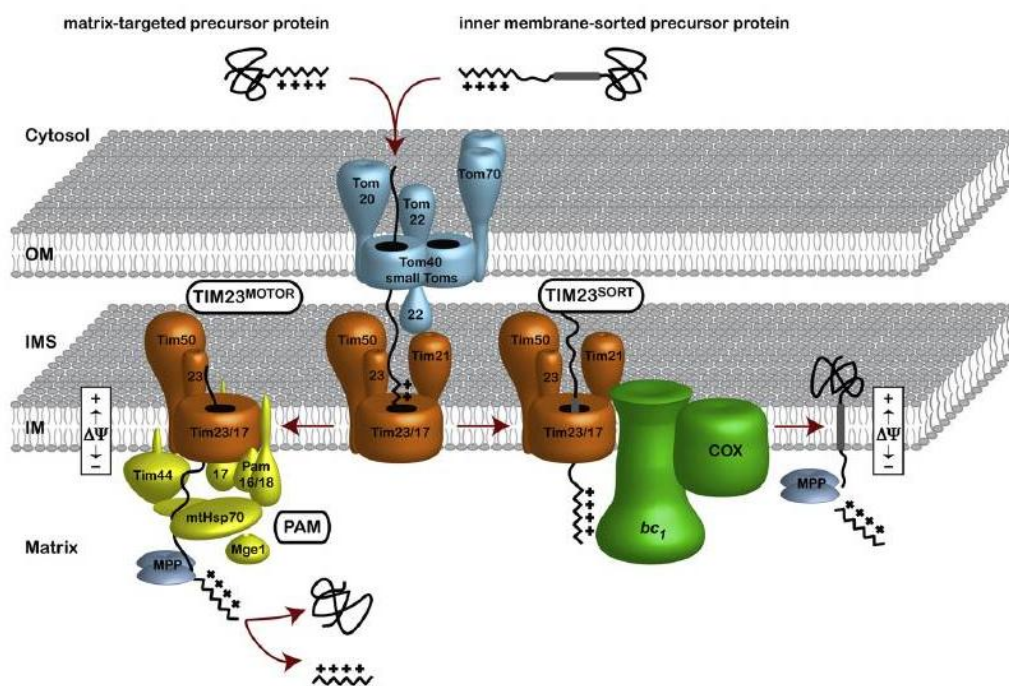


Figura 7. Ruta de la presecuencia. Los precursores proteicos con señales amino-terminales atraviesan los complejos de importe parcialmente plegados. Atraviesan la membrana externa a través de la traslocasa de membrana externa, el complejo TOM. Distintas formas de complejo TIM23 median la traslocación completa del precursor hacia la matriz mitocondrial o bien su salida e inserción en la bicapa de la membrana interna, ambos procesos dependientes de potencial de membrana. Finalmente en ambos casos, la peptidasa procesadora de matriz (MPP) elimina la presecuencia. *Imagen tomada de (van der Laan, Hutu et al. 2010).*

Ruta de los transportadores de metabolitos

Estos precursores son altamente hidrofóbicos. Con el fin de evitar su agregación, se unen en el lado citoplásmico a chaperonas Hsp70 y Hsp90 formando complejos reconocibles por el receptor Tom70 (Wiedemann, Pfanner et al. 2001), el cual oligomeriza y permite la traslocación de los precursores a la subunidad Tom22 y de allí al interior del canal Tom40. Posteriormente, se unirán al complejo Tim9-Tim10 del espacio intermembrana (Curran, Leuenberger et al. 2002). Este complejo asocia la subunidad Tim12 en la superficie externa del complejo TIM22, que le permite interactuar con Tim54, el receptor de la traslocasa TIM22 (Wagner, Gebert et al. 2008). Finalmente, TIM22 permite la inserción en la membrana de los precursores proteicos gracias al potencial de membrana.

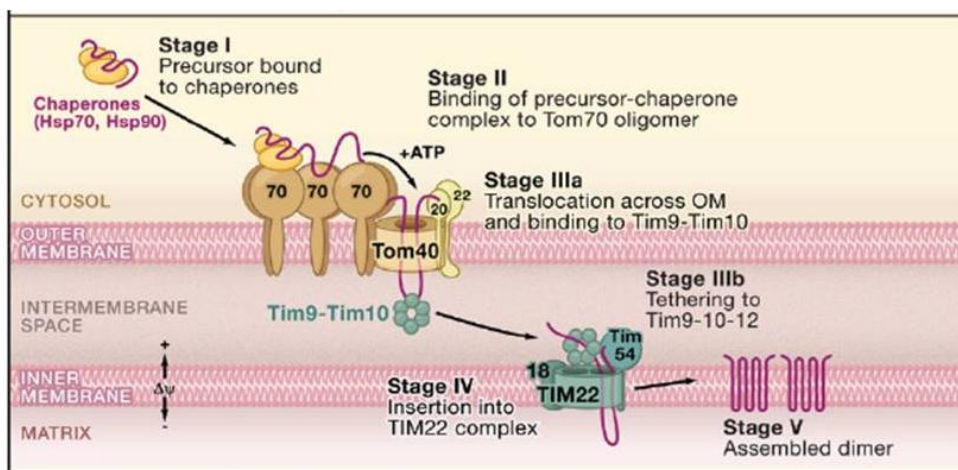


Figura 8. Ruta de los transportadores de metabolitos. (Chacinska, Koehler et al. 2009)

Ruta de proteínas de espacio intermembrana

Muchas de las proteínas del espacio intermembrana poseen motivos cisteína. Estos precursores utilizan el complejo TOM para su internalización en la mitocondria, vía Tom5, en estado reducido (Kurz, Martin et al. 1999). Una vez en el espacio intermembrana, se unen a Mia40 (*mitochondrial intermembrane space assembly machinery*) a través de un residuo hidrofóbico de su superficie y estableciendo un puente disulfuro con el motivo CPC de esta. La sulfidril oxidasa Erv1 se encarga del reciclaje por reoxidación de la proteína Mia40 reducida, transfiriendo los electrones al Cyt *c* (Muller, Milenkovic et al. 2008).

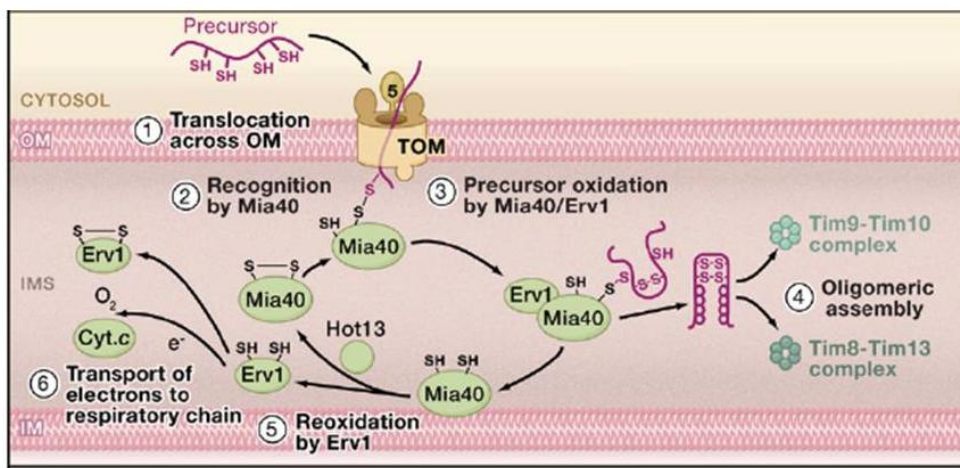


Figura 9. Ruta de las proteínas del espacio intermembrana. (Chacinska, Koehler et al. 2009)

Ruta de proteínas de membrana externa con estructura de barril β

Inicialmente, los precursores de proteínas de tipo barril β , se dirigen al complejo TOM y a través de Tom40 pasan al espacio intermembrana. Allí se unen a los complejos Tim9-Tim10 y Tim8-Tim13 (Hoppins y Nargang 2004) que los guían hasta el complejo SAM (*Sorting and assembly machinery*). SAM permite la liberación de los precursores en la membrana externa (Wiedemann, Kozjak et al. 2003). Se han descrito varias subunidades del complejo SAM y proteínas adicionales que modulan su actividad (Kozjak, Wiedemann et al. 2003; Gentle, Gabriel et al. 2004; Chan y Lithgow 2008).

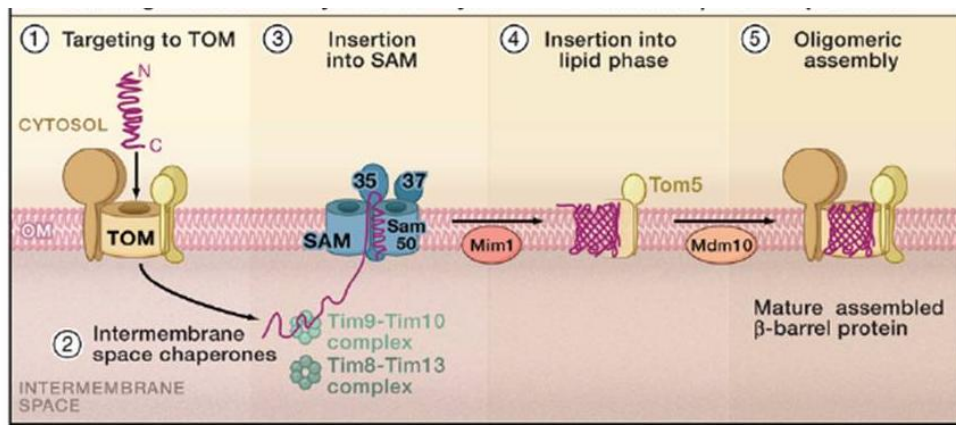


Figura 10. Importe y ensamblaje de las proteínas de membrana externa con estructura de barril β . Imagen tomada de (Chacinska, Koehler et al. 2009).

Ruta de proteínas de membrana externa con estructura de hélice α

Presentan diversos mecanismos de importe. Algunas no requieren de complejo TOM y su internalización esta mediada por Mim1, ya que contienen un segmento transmembrana que actúa de señal y al mismo tiempo permite su anclaje en la bicapa lipídica (Becker, Pfannschmidt et al. 2008; Hulett, Lueder et al. 2008). Otro grupo de precursores esta formado por aquellos que poseen en su extremo carboxilo una estructura en hélice. Esta cola hidrofoba permite su anclaje en membrana, aunque no se han descrito las insertasas involucradas (Setoguchi, Otera et al. 2006; Kemper, Habib et al. 2008). Otras, en cambio, requieren de la acción combinada de complejo TOM y del complejo SAM para su inserción (Stojanovski, Guiard et al. 2007). Un último grupo se inserta en la membrana gracias a Tom70, aunque no precisan de la acción de ningún otro componente del sistema de importe descrito hasta la fecha (Otera, Taira et al. 2007).

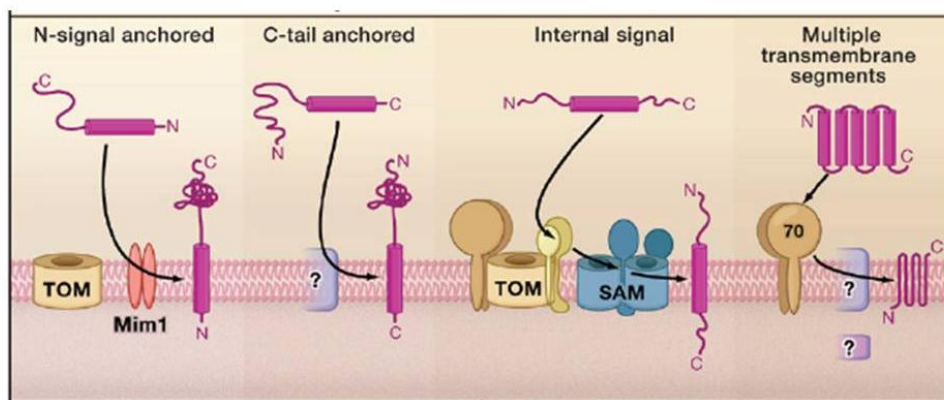


Figura 11. Importe y ensamblaje de las proteínas de membrana externa con estructura de hélice α . Imagen tomada de (Chacinska, Koehler et al. 2009).

1.4.3 Importe de RNAs

Los RNAs sintetizados en el citoplasma translocados a la mitocondria son muy pocos comparados con el elevado número de proteínas que se importan y que son necesarias para la viabilidad celular. El importe mitocondrial de tRNAs ocurre en distintos microorganismos eucarióticos (protozoos, hongos y algas), en algunas plantas y en unos pocos animales pertenecientes a los filos *Cnidaria* y *Mollusca* (Schneider y Marechal-Drouard 2000). En la mayor parte de los casos, el importe mitocondrial de los tRNAs se basa en la falta de dichos genes en los correspondientes genomas mitocondriales.

En mamíferos, tradicionalmente se había considerado que no se produce importe de tRNAs codificados en el núcleo, sin embargo, intentos de compensar algunos defectos mitocondriales causados por la mutación en genes del tRNA, han demostrado la posibilidad de importar tRNA citoplasmáticos en mitocondrias humanas (Kolesnikova, Entelis et al. 2004; Mahata, Mukherjee et al. 2006; Karicheva, Kolesnikova et al. 2011). Este importe de tRNAs a la mitocondria parece que ocurre de manera fisiológica, pues se ha detectado la presencia del tRNA^{Gln} codificado en el núcleo en mitocondrias murinas y humanas (Rubio, Rinehart et al. 2008).

Clásicamente se ha postulado que la síntesis del ribosoma mitocondrial precisaba tan sólo de los rRNAs codificados en la mitocondria (Attardi y Ojala 1971). Sin embargo se ha demostrado que existe de manera natural importe del rRNA 5S codificado en el núcleo a la mitocondria, pero a pesar de la existencia de evidencias en relación a su implicación en la síntesis proteica (Entelis, Kolesnikova et al. 2001), inicialmente no se detectó en los mitorribosomas (Yoshionari, Koike et al. 1994; Magalhaes, Andreu et al. 1998; Smirnov, Tarassov et al. 2008). Recientemente, gracias a modificaciones en el protocolo de purificación, se ha conseguido detectar su presencia en mitorribosomas murinos y humanos, y se ha dilucidado el mecanismo de traslocación a la mitocondria mediado por el precursor de la proteína ribosomal MRP-L18 (preMRPL-18) y la rodanasa (Smirnov, Entelis et al. 2011).

Otros dos RNAs codificados en el núcleo, el componente RNA de la nucleasa MRP (*mitochondrial RNA processing*) y el componente de RNA de la Rnasa P, se importan a la mitocondria en humanos, pero su presencia dentro de la mitocondria es un tema controvertido (Puranam y Attardi 2001; Kamenski, Kolesnikova et al. 2007).

1.5 Control de calidad

El doble origen genético del sistema de fosforilación oxidativa, exige la existencia de un sistema que ejerza un fuerte control y permita eliminar aquellos productos proteicos que se hallen en exceso. Este sistema de control de calidad, es también capaz de reconocer aquellas proteínas defectuosas incapaces de alcanzar su estado nativo, y de eliminarlas del orgánulo (Tatsuta y Langer 2008; Baker 2011). Se trata de un sistema proteolítico presente en la membrana interna mitocondrial, que se encuentra distribuido ubicuamente en eucariotas.

Hay dos complejos proteolíticos dependientes de ATP embebidos en la membrana: las i-AAA proteasas son activas en el lado del espacio intermembrana, mientras que las m-AAA proteasas exponen su centro catalítico hacia la matriz mitocondrial (Koppen y Langer 2007). Las m-AAA proteasas son diferentes isoenzimas formadas en humanos por subunidades de AFG3L2 que forman homo-oligómeros o hetero-oligómeros con paraplegina (SPG7). En ratones existe una subunidad adicional, llamada Afg311, que

puede bien homo-oligomerizar o bien unirse en complejos con Afg312 o paraplegina (Kremmidiotis, Gardner et al. 2001). Las i-AAA proteasas están formadas por oligomerización de subunidades Yme11-1. Además de promover la degradación de las proteínas defectuosas para su posterior exporte de la mitocondria o su degradación por otras peptidasas, las AAA-proteasas participan en la maduración proteolítica de proteínas específicas, como la proteína ribosomal MrpL32, regulando así la biogénesis de la cadena respiratoria (Nolden, Ehses et al. 2005); o regulando la dinámica mitocondrial a través de la maduración de la proteína de fusión mitocondrial OPA1 (Duvezin-Caubet, Koppen et al. 2007; Song, Chen et al. 2007).

La metalopeptidasa Oma1, que se localiza en membrana interna con el sitio activo dirigido hacia la matriz mitocondrial, también se considera parte del sistema de control de calidad, tras encontrar que posee funciones solapantes con las m-AAA proteasas (Kaser, Kambacheld et al. 2003), por ejemplo eliminando la Oxa1 defectuosa, una proteína encargada de la inserción de los polipéptidos mitocondriales en la membrana interna (Stiburek, Fornuskova et al. 2007), y participando en el procesamiento de OPA1 (Ehses, Raschke et al. 2009).

2. METABOLISMO MITOCONDRIAL

Las mitocondrias desempeñan funciones muy importantes en el metabolismo celular. Además de participar en la obtención de energía y en el metabolismo de lípidos y aminoácidos, son esenciales para la síntesis de los grupos hemo, de los centros hierro-azufre, en la síntesis de pirimidinas, en el metabolismo del calcio, en señalización intracelular, apoptosis e incluso en el desarrollo de la respuesta inmune.

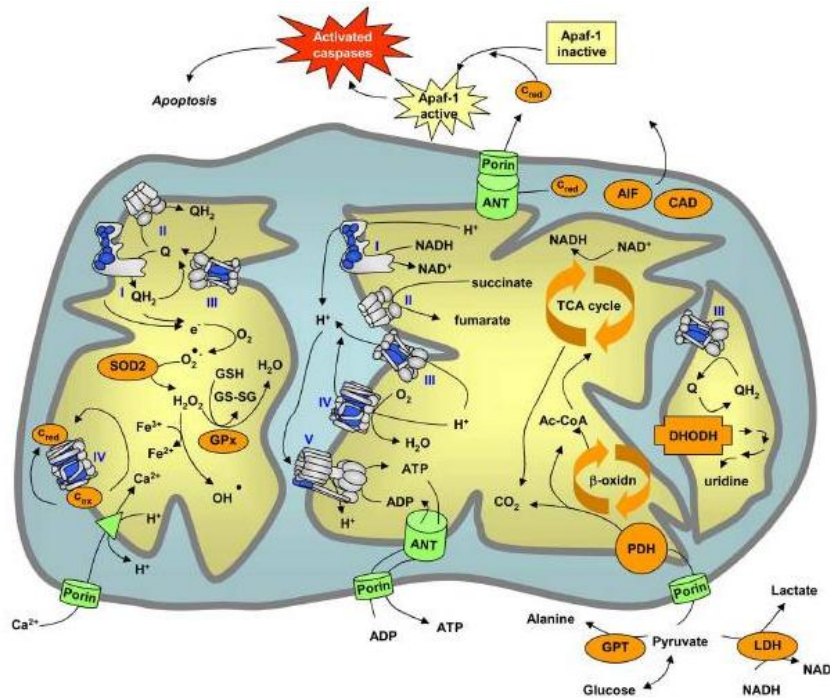


Figura 12. Metabolismo mitocondrial. Esquema representativo del metabolismo energético mitocondrial y las rutas relacionadas. Complejos respiratorios I-V, superóxido dismutasa 2 (SOD2), glutatión peroxidasa (GPx), translocasa de nucleótidos de adenina (ANT), porina (Porin), ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), β-oxidación de los ácidos grasos (β-oxidn), complejo piruvato deshidrogenasa (PDH), acetil-CoA (Ac-CoA), dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH), transaminasa glutámico-pirúvica (GPT), lactato deshidrogenasa (LDH), factor de inducción de apoptosis (AIF), DNasa activada por caspasa (CAD), coenzima Q o ubiquinona (Q), coenzima Q reducida o ubiquinol (QH₂), citocromo c reducido y oxidado (C_{red} y C_{ox}). *Figura tomada de (Smeitink, Zeviani et al. 2006).*

El hierro es esencial para toda célula eucariota y muchos procariontes, ya que se utiliza en la síntesis de los grupos hemo, destacando el de la hemoglobina, mioglobina y citocromos; así como en la síntesis de centros hierro-azufre y otros cofactores. Las proteínas con estos centros participan en reacciones catabólicas, reacciones redox, respiración, replicación de DNA y transcripción. El compartimento mitocondrial participa en estos dos procesos (Richardson, Lane et al. 2010).

La producción de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria, más allá del daño celular que produce (oxidación de proteínas, peroxidación lipídica y daño en el mtDNA), constituye un mecanismo de señalización intracelular. La producción mitocondrial de especies reactivas de oxígeno puede activarse en condiciones de hipoxia, en respuesta a la unión de ligandos a receptores celulares que activan la vía PI3K-Akt (Hamanaka y Chandel 2010).

Por otro lado, el papel de la mitocondria en el proceso de apoptosis es innegable, ya que allí se localizan muchas de las proteínas involucradas en las etapas iniciales del

proceso. Proteínas de la familia Bcl-2 (las proapoptóticas Bax y Bak, y las antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL) actúan a nivel de la membrana externa mitocondrial en respuesta a estímulos de estrés. Cuando las señales proapoptóticas son suficientes, Bax y Bak ayudan a la liberación del Cyt c, el cual induce la cascada de caspasas que llevan a la destrucción celular (Wang y Youle 2009).

Se han descrito también proteínas mitocondriales que tienen papel en la respuesta inmunológica innata frente a virus. Estas proteínas, llamadas MAVS (*mitochondrial antiviral signalling protein*), se anclan en la membrana externa mitocondrial y son capaces de activar los factores de transcripción pro-inmunes IRF3, IRF7 y NF-κB (Scott 2010).

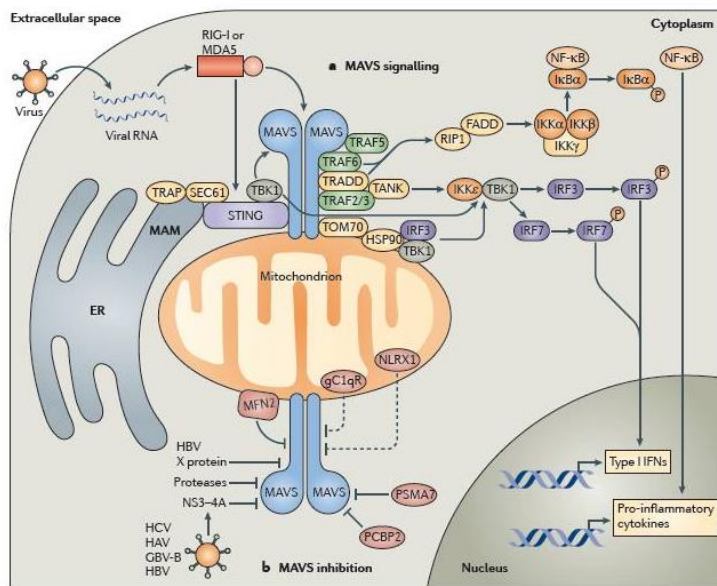


Figura 13. Vías de señalización antiviral en la mitocondria. El RNA viral en el citosol es reconocido por receptores del tipo RIG-I-like (*retinoic acid-inducible gene*) y MDA5 (*melanoma differentiation-associated gene 5*), que activan a las MAVS, quienes transducen la señal e inician una cascada de señales que activa NF-κB (nuclear factor-κB) y la expresión de citocinas proinflamatorias. Las MAVS también interaccionan con moléculas que activan IRF3 e IRF7. Figura tomada de (West, Shadel et al. 2011).

El interés de esta tesis, sin embargo, se centra en el estudio del sistema de fosforilación oxidativa por lo que prestaremos especial atención al metabolismo energético.

2.1 Bioenergética mitocondrial

La oxidación de la glucosa por las células como fuente de energía para la producción de ATP, empieza con la glucólisis. Este es un conjunto de reacciones que tienen lugar en el citoplasma celular, con independencia de la mitocondria, y puede proporcionar una cantidad suficiente de energía para garantizar la supervivencia celular, incluso en ausencia de mitocondrias funcionales. Sin embargo, este proceso conlleva la obtención de tan sólo 2 moléculas de ATP frente a las ~30-32 que se logran mediante la oxidación completa de glucosa hasta CO₂ y H₂O en la fosforilación oxidativa, llevada a cabo en la mitocondria.

El piruvato obtenido en la etapa final de la glucólisis y en el metabolismo de seis aminoácidos, es importado a la matriz mitocondrial donde se oxida a acetil-CoA. Así mismo los ácidos grasos, tras una serie de reacciones de oxidación, también se transforman en acetil-CoA. La oxidación de este grupo mediante las reacciones que constituyen el ciclo de Krebs (Krebs 1970), genera NADH+H⁺ y FADH₂. La oxidación de este poder reductor a través del sistema de fosforilación oxidativa conlleva la producción

de agua y la síntesis de ATP. Finalmente, el ATP generado es liberado al citosol celular, intercambiado por ADP a través de la translocasa de nucleótidos de adenina (ANT).

2.2 Sistema de Fosforilación Oxidativa

El sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) consta de una cadena de transporte electrónico (mtETC), formada por los complejos I-IV y dos transportadores de electrones móviles (CoQ y Cyt *c*), y una ATP sintasa o complejo V. El proceso de fosforilación oxidativa permite acoplar el flujo electrónico producido en la oxidación del $\text{NADH} + \text{H}^+$ y FADH_2 a la fosforilación del ADP.

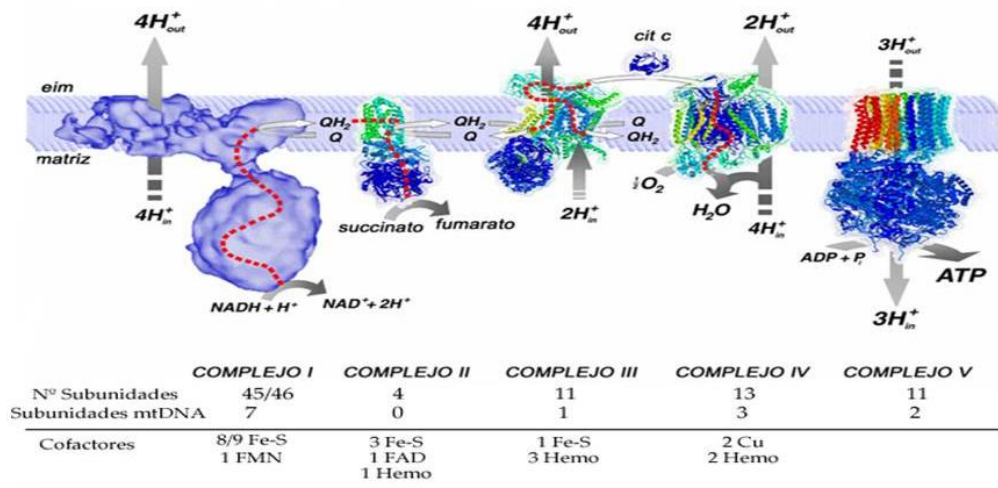


Figura 14. Representación esquemática del Sistema OXPHOS. En la figura se muestran los complejos de la cadena respiratoria y se indica en qué puntos se produce el bombeo de protones, así como el número de subunidades que los componen y los cofactores que contienen. El complejo V o ATP sintasa completa el sistema de fosforilación oxidativa.

Los electrones procedentes del $\text{NADH} + \text{H}^+$ pasan secuencialmente a través del complejo I, la ubiquinona o CoQ, el complejo III y el citocromo *c*, para llegar finalmente al complejo IV, quien los cederá al oxígeno molecular generando H_2O . De forma alternativa, los electrones del FADH_2 , producto final de la succinato deshidrogenasa o complejo II, así como de otras enzimas como la glicerol-3-P deshidrogenasa, la ETF-ubiquinona oxidoreductasa (enzima que toma dos electrones procedentes de la primera reacción de la β -oxidación de los ácidos grasos) o la dihidroorotato deshidrogenasa (enzima implicada en la biosíntesis de pirimidinas), son cedidos a la ubiquinona y son canalizados mediante el complejo III, citocromo *c* y complejo IV para finalmente reducir el oxígeno molecular.

En los complejos I, III y IV de la cadena de transporte electrónico, el flujo electrónico está acoplado a un bombeo de protones desde la matriz mitocondrial hasta el espacio intermembrana. De esta manera se genera un gradiente electroquímico o potencial de membrana que es aprovechado por la ATP sintasa o complejo V para llevar a cabo la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i , completándose de este modo el proceso de fosforilación oxidativa (Mitchell 1961; Mitchell y Moyle 1967).

Mediante este proceso se produce entre el 80 y 90% del ATP celular, que es utilizado en los distintos tejidos para mantener las necesidades energéticas. Así, aquellos tejidos que tengan mayor requerimiento de ATP serán los más afectados en el caso de producirse fallos en su generación.

2.2.1 Complejo I

También llamado NADH:ubiquinona oxidorreductasa o NADH deshidrogenasa (EC 1.6.5.3). Es el principal punto de entrada de los electrones en la cadena respiratoria y cataliza la transferencia de dos electrones desde el $\text{NADH} + \text{H}^+$ a la ubiquinona o coenzima Q, acoplada a la traslocación de 4 protones hacia el espacio intermembrana. El mecanismo por el cual estos dos procesos se acoplan es todavía motivo de discusión (Janssen, Nijtmans et al. 2006). Los electrones pasan desde el $\text{NADH} + \text{H}^+$ al aceptor de electrones del CI, un FMN, y de ahí sucesivamente a través de 8 centros Fe-S, hasta reducir la ubiquinona a ubiquinol.

El complejo I es el mayor de los complejos del sistema OXPHOS, con un peso molecular en torno a 980 kDa. Está formado por 45 subunidades, 7 de las cuales están codificadas en el mtDNA (ND1-6 y ND4L) y las restantes se sintetizan en el citosol. Conviene puntualizar que en un trabajo realizado en colaboración con nuestro grupo se ha comprobado que la subunidad NDUFA4 no pertenece al mismo, de manera que hasta la fecha el complejo I estaría formado por 44 proteínas (pendiente de publicación). Conocemos el papel de 14 de estas proteínas, que forman el núcleo del complejo, mientras que las otras 30 subunidades accesorias o supernumerarias no tienen un papel bien definido. Se postula que éstas podrían participar en la unión del complejo a la membrana, en la protección frente a ROS o en la estabilidad (Schulte, Haupt et al. 1999; Hirst, Carroll et al. 2003).

Aunque sólo recientemente se ha logrado la cristalización del CI (Hunte, Zickermann et al. 2010) se sabe desde hace tiempo que el complejo I tiene forma de “L”, ya que está formado por dos brazos dispuestos perpendicularmente uno respecto del otro (Grigorieff 1998; Sazanov, Peak-Chew et al. 2000; Friedrich y Bottcher 2004). El brazo hidrofóbico, está embebido en la membrana interna mitocondrial y contiene las 7 subunidades codificadas en el genoma mitocondrial. El brazo hidrofílico protuye hacia la matriz.

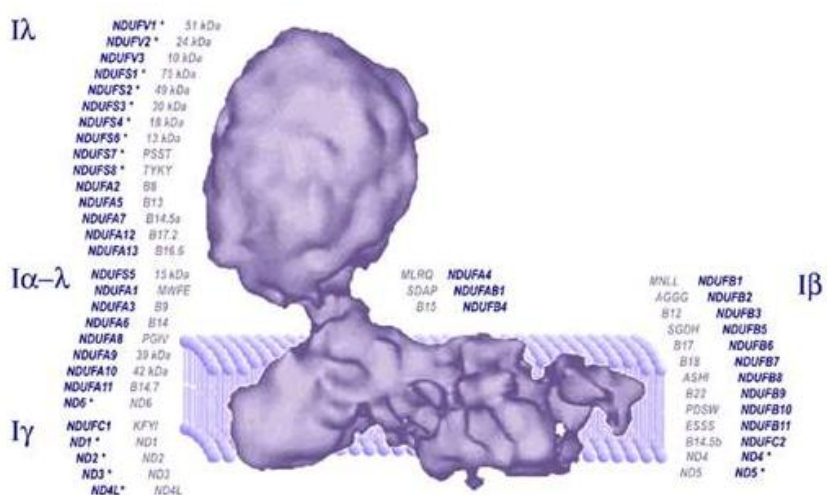


Figura 15. Representación esquemática de la topología de complejo I. El complejo I se puede subfraccionar en cuatro fragmentos, cuya composición se indica en la figura (Carroll, Fearnley et al. 2003). La nomenclatura de las subunidades humanas se muestra en azul oscuro y la nomenclatura de bovino en gris. Las subunidades en las cuales se habían descrito mutaciones patológicas hasta la fecha se encuentran marcadas con * (Janssen, Nijtmans et al. 2006). *Figura tomada de (Vogel, Smeitink et al. 2007).*

Desde el punto de vista funcional, podemos distinguir tres módulos: el módulo deshidrogenasa (responsable de la oxidación del NADH, que incluye las subunidades

nucleares NDUFV2, NDUFV1 y NDUFS1, al menos), el módulo de la hidrogenasa (transfiere electrones a la ubiquinona e incluye las subunidades NDUFS2, NDUFS3, NDUFS7 y NDUFS8, al menos), y el módulo de transporte de protones, dispuesto en el brazo de membrana, compuesto al menos por todas las subunidades mitocondriales (Pagniez-Mammeri, Loublier et al. 2012).

El proceso de ensamblaje de las diferentes subunidades que tiene lugar mediante módulos (Vogel, Smeitink et al. 2007; Perales-Clemente, Fernandez-Vizarrá et al. 2010) precisa de diversos factores de ensamblaje que se han ido describiendo en los últimos años. En humanos, algunas de estas proteínas son NDUFAF1/CIA30, Ecsit, NDUFA12L/B17.2L/NDUFAF2, C20orf7, NDUFAF3, NDUFAF4 (McKenzie y Ryan 2010).

2.2.2 Complejo II

El complejo II o succinato deshidrogenasa (EC 1.3.5.1) se localiza en la membrana interna mitocondrial expuesto hacia la matriz, y conecta la cadena transportadora de electrones con el ciclo de Krebs (Cecchini 2003). Oxida el succinato a fumarato con la consiguiente reducción del cofactor FAD. A continuación transfiere los electrones del FADH₂ a la ubiquinona.

Está formado por cuatro subunidades (SDHA-D) codificadas todas ellas en el núcleo (Hagerhall 1997). Las subunidades SDHA y SDHB forman el centro catalítico. SDHA contiene el cofactor FAD unido covalentemente y el sitio de unión del succinato. SDHB posee tres centros Fe-S que permiten la transferencia de electrones a la ubiquinona (Sun, Huo et al. 2005). SDHC y SDHD permiten el anclaje a la membrana interna. Sin embargo, la superficie de contacto de SDHB con SDHA y SDHC es similar, y el núcleo catalítico no existe como una entidad libre funcional en ausencia de las subunidades de anclaje a membrana, lo que sugiere que las subunidades de membrana participan de algún modo en la reacción enzimática (Rutter, Winge et al. 2010).

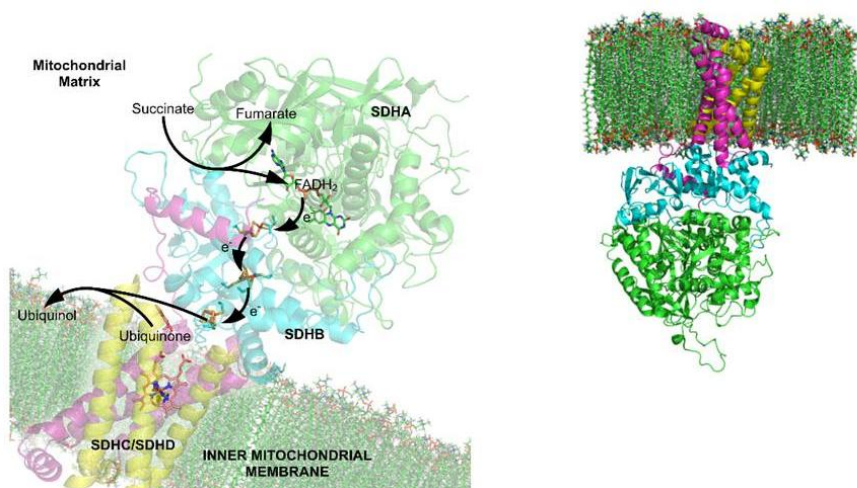


Figura 16. Estructura cristalina del CII y representación del flujo de electrones. Las subunidades SDHA y SDHB se orientan hacia la matriz mitocondrial y llevan a cabo la reacción catalítica. SDHC y SDHD están embebidas en la membrana interna.

Además de ser el único complejo de la cadena respiratoria con todas sus subunidades codificadas en el núcleo, es el único que no ejerce bombeo de protones.

Se han descrito dos proteínas principales en el ensamblaje de CII, SDHAF1 y SDHAF2 (Ghezzi, Goffrini et al. 2009; Hao, Khalimonchuk et al. 2009).

2.2.3 Complejo III

El complejo III, también llamado complejo citocromo bc1 o ubiquinol:citocromo c oxidorreductasa (EC 1.10.2.2), transfiere electrones desde el CoQ reducido al Cyt *c* en un proceso acoplado a la traslocación de cuatro protones hacia el espacio intermembrana. Tiene una estructura de homodímero simétrico y se localiza en la membrana interna.

En mamíferos, cada “monómero” consta de 11 subunidades. De todas ellas sólo MTCYB se codifica en el mtDNA. Tres subunidades forman el centro catalítico de la enzima y contienen centros metálicos que permiten la transferencia electrónica: citocromo *b* (MTCYB), citocromo *c1* (CYC1), y la proteína de Rieske Fe-S (UQCRFS1 ó RISP). Citocromo *b* posee 8 hélices transmembrana, mientras que Cyc1 y la proteína de Rieske se anclan a la membrana a través de un solo dominio transmembrana y exponen sus dominios globulares, conteniendo el hemo *c* y 2 grupos Fe-S respectivamente, hacia el espacio intermembrana.

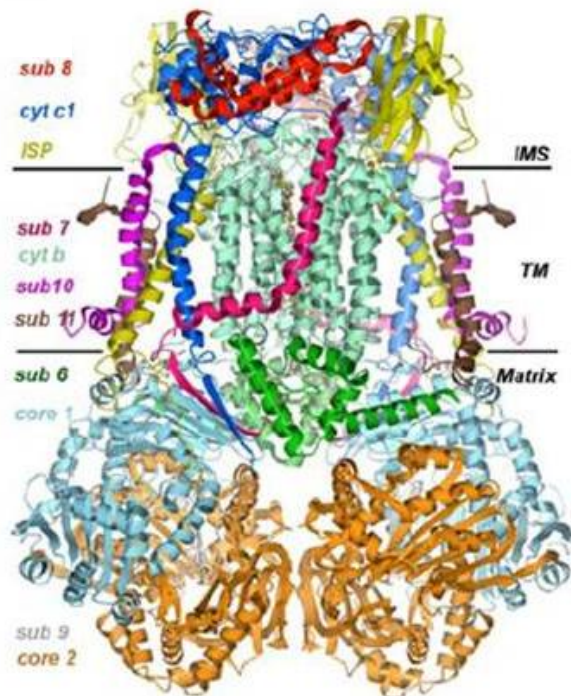


Figura 17. Estructura de CIII dimérico de mitocondrias bovinas. El código de color de cada subunidad se detalla a la izquierda, y los grupos prostéticos aparecen según el modelo de bolas y palos. Las dos líneas horizontales representan los límites de la membrana interna mitocondrial. *Figura tomada de (Xia, Esser et al. 2007).*

Se desconoce el papel de las subunidades UQCRC1 (core1), UQCRC2 (core2) y UQCRH (subunidad 6) en el complejo enzimático. UQCRB (subunidad 7) y UQCRQ (subunidad 8) intervienen en la unión de la ubiquinona. UQCR10 (subunidad 9) interacciona con el citocromo *c1* y la subunidad 10 podría unir la proteína de Rieske (Diaz, Kotarsky et al. 2011).

Respecto al proceso de ensamblaje de CIII, el factor de ensamblaje BCS1L, tal y como su homólogo en *S. cerevisiae*, Bcs1p, interviene en los estadios finales al promover la inserción de RISP en el precomplejo citocromo *bc1* (Cruciat, Hell et al. 1999; Fernandez-Vizarra, Bugiani et al. 2007). TTC19 es la otra proteína que actúa como factor de ensamblaje del CIII en mamíferos descrita hasta la fecha (Ghezzi, Arzuffi et al. 2011).

2.2.4 Complejo IV

El complejo IV o Citocromo c oxidasa (COX, EC 1.9.3.1) es el complejo final de la cadena transportadora de electrones. Cataliza la transferencia electrónica desde el Cyt *c* reducido al oxígeno molecular.

El complejo IV está formado por 13 subunidades. El centro catalítico del complejo está formado por las subunidades mitocondriales MTCO1 y MTCO2 que contienen los motivos *hemo a* y *hemo a₃* y los centros Cu_A y Cu_B 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.

Las 10 subunidades codificadas en el núcleo podrían tener un papel de regulación o estabilización (Arnold y Kadenbach 1997). También se han descrito isoformas específicas de tejido para varias de las subunidades nucleares de COX (Ewart, Lightowlers et al. 1990; Kennaway, Carrero-Valenzuela et al. 1990), entre ellas, COX6A y COX7A presentan isoformas específicas de corazón e hígado (Grossman y Lomax 1997), COX6B2 es una isoforma específica de testículo y también existe una isoforma específica de pulmón en el caso de COX4 (Fernandez-Vizarra, Tiranti et al. 2009).

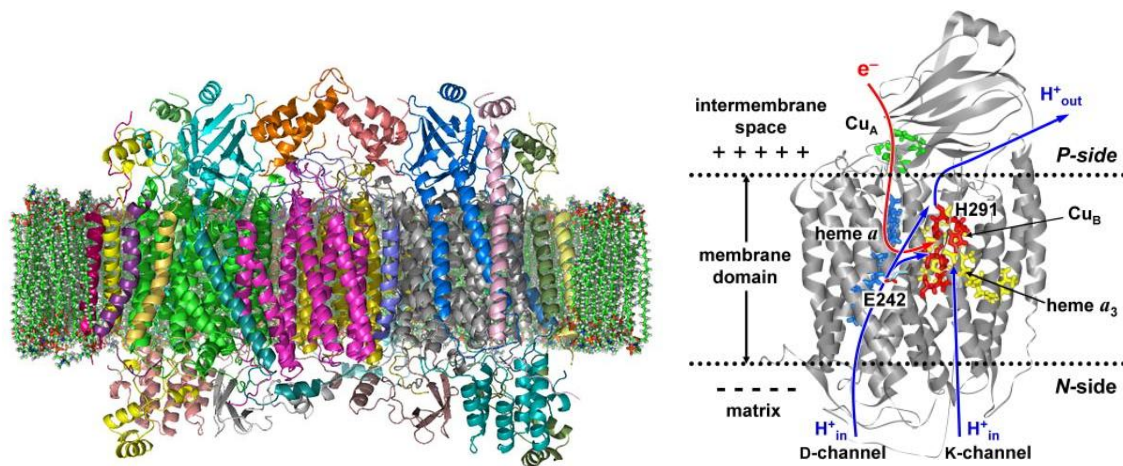


Figura 18. Estructura de complejo IV de mitocondria bovina y mecanismo de bombeo protónico acoplado al flujo electrónico. Figura tomada de (Popovic y Stuchebrukhov 2011).

En *S. cerevisiae*, se han descrito en torno a 20 proteínas necesarias para el ensamblaje del CIV, de las cuales más de la mitad tienen descritas proteínas ortólogas en humanos. SURF1, COX10, COX15, SCO1 y SCO2 son algunos de los factores de ensamblaje de CIV (Diaz, Kotarsky et al. 2011).

2.2.5 Complejo V

La ATP sintasa mitocondrial o complejo V (EC 3.6.3.14) aprovecha la energía generada por la cadena transportadora de electrones en la creación de un gradiente de protones en el espacio intermembrana para llevar a cabo la fosforilación del ADP.

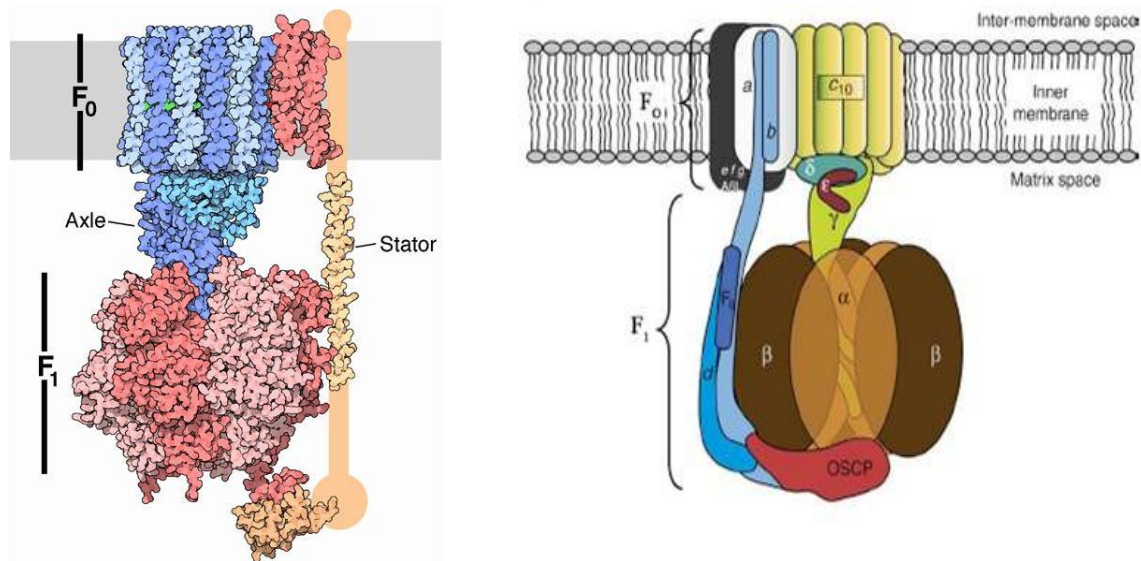


Figura 19. Estructura de complejo V o ATP sintasa. A) Estructura de PDB. B) Representación esquemática de las subunidades de CV, tomada de (Kucharczyk, Zick et al. 2009).

Se pueden distinguir dos módulos funcionales conectados por un tallo (Futai, Noumi et al. 1989; Boyer 1993; Lutter, Saraste et al. 1993). La región F₁ se localiza en la matriz mitocondrial constituyendo la fracción soluble de la enzima y se compone de cinco subunidades distintas ensambladas en una estequiometría de 3 α :3 β :1 δ :1 γ :1 ϵ (Abrahams, Leslie et al. 1994). Esta región forma el dominio catalítico de la ATP sintasa. La región F₀ se encuentra anclada en la membrana interna mitocondrial, está compuesta por ocho tipos de proteínas (a, b, c, d, e, f, g y A6L). El tallo central contiene alguna de las proteínas de la región F₁ (δ , γ , ϵ) y el periférico se compone de las subunidades OSCP, F₆, b y d (Collinson, Runswick et al. 1994; Stock, Leslie et al. 1999). Las subunidades a y A6L se encuentran codificadas en el mtDNA, en los genes *mt-Atp6* y *mt-Atp8* respectivamente (Anderson, Bankier et al. 1981) y el resto, en el genoma nuclear. La región F₀ funciona como un poro de protones y dirige la energía liberada en la disipación del gradiente electroquímico a la parte F₁ que es donde se forma el ATP. La energía se transfiere de una parte a otra mediante un mecanismo de motor rotatorio (Stock, Leslie et al. 1999).

Cuando disminuye el gradiente de protones, la ATP sintasa puede funcionar de modo inverso, es decir, es capaz de hidrolizar ATP para bombear protones al espacio intermembrana y así contribuir a mantener el potencial de membrana. La actividad hidrolítica del complejo V se regula mediante la unión de la proteína inhibitoria natural IF1 (Cabezon, Montgomery et al. 2003).

En mamíferos, se han descrito otras dos subunidades asociadas tanto al complejo V monomérico como dimérico, llamadas DAPIT (*diabetes-associated protein in insulin-sensitive tissue*) y el proteolípido mitocondrial de 6,8 kDa (Meyer, Wittig et al. 2007). Estas subunidades no parecen vincularse a la actividad hidrolítica del complejo. Recientemente se ha demostrado que la ausencia de DAPIT conlleva la disminución en la actividad de CV (Ohsakaya, Fujikawa et al. 2011).

2.2.6 Transportadores móviles

La transferencia electrónica entre los complejos respiratorios tiene lugar gracias a la acción de dos transportadores móviles de electrones, moléculas capaces de adoptar diferentes formas redox y de trasladarse de un lugar a otro en la bicapa lipídica conectando así los complejos entre sí. Estos transportadores móviles son la ubiquinona o coenzima Q (CoQ), que permite conectar los complejos I o II con el CIII, y el Cyt *c* que conecta CIII y CIV.

El CoQ presenta tres estados redox: totalmente oxidado (ubiquinona), radical semiquinona (ubisemiquinona) y totalmente reducido (ubiquinol). Es una molécula muy hidrofóbica que puede presentarse unida a proteínas o disuelta en bicapas lipídicas. Los sitios de unión a CoQ en proteínas no siguen unos patrones comunes, aunque sí se observan características análogas: la interacción del CoQ con la proteína tiene lugar en un sitio hidrófobo a través de puentes de H entre motivos carbonilo/hidroxilo y el anillo quinona/quinol queda flanqueado por residuos alifáticos o aromáticos. Se requieren también interacciones con la cadena lateral del CoQ para evitar competición. Se observa la conservación de un residuo histidina para el enlace de puentes de H, inserto en una secuencia de aminoácidos con la estructura alifático-[X]3-H-[X]2/3-[L/T/S] (Lenaz y Genova 2009). En cuanto a la difusión lateral en bicapas lipídicas artificiales y naturales, los coeficientes de difusión varían en función de la técnica empleada, pero los resultados más fidedignos apuntan a un coeficiente $>10^{-6}$ cm²/s (Fato, Battino et al. 1986).

Además de actuar en la transferencia electrónica entre complejos respiratorios, se le ha descrito una función antioxidante en su forma reducida, interrumpiendo la iniciación del proceso de peroxidación lipídica (Ernster y Dallner 1995), y también un papel protector frente a la apoptosis, inhibiendo la apertura del poro de transición PTP (Yamamura, Otani et al. 2001; Papucci, Schiavone et al. 2003; Naderi, Somayajulu-Nitu et al. 2006).

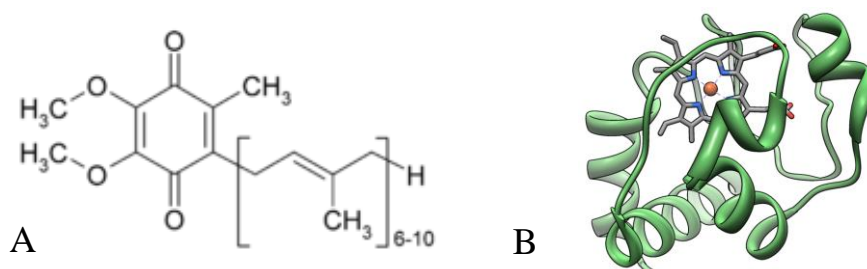


Figura 20. Estructuras del Coenzima Q y Citocromo *c*. A) Estructura química del coenzima Q, en su forma oxidada o ubiquinona. B) Estructura tridimensional del citocromo *c*. Imagen adaptada de Protein Data Bank.

El citocromo *c* (Cyt *c*) es una proteína de 104 aminoácidos, que actúa como transportador de electrones hidrosoluble y se encuentra en el espacio intermembrana de la mitocondria. Cumple al menos cinco funciones conocidas: la transferencia de electrones desde CIII al CIV, la iniciación de la apoptosis formando un complejo con Apaf-1 para activar la caspasa-9 (Liu, Kim et al. 1996), actúa como cardiolipina oxigenasa en las etapas iniciales de la apoptosis (Kagan, Tyurin et al. 2005; Belikova, Jiang et al. 2007), actúa como dador de electrones para p66^{Shc}, como *scavenger* de superóxido (Skulachev 1998; Trinei, Berniakovich et al. 2009), y comoceptor de electrones en la traslocación de proteínas del espacio intermembrana con puentes disulfuro (Chacinska, Koehler et al. 2009).

2.3 Organización del sistema OXPHOS

La organización del sistema de fosforilación oxidativa dentro de la membrana interna mitocondrial ha resultado ser mucho más complicada de lo que se suponía inicialmente.

Tradicionalmente, se han propuesto dos modelos contrapuestos. El “modelo fluido” postula que los complejos de la cadena difunden libremente por la membrana y la transferencia de electrones tiene lugar en función de las colisiones arbitrarias entre los complejos y los transportadores móviles (Hackenbrock, Chazotte et al. 1986). Frente a este, el “modelo sólido” propone la asociación entre los complejos I-IV siguiendo una secuencia ordenada (Chance y Williams 1955). El aislamiento o reconstitución de ensamblados estequiométricos de dos o más complejos y algunos estudios cinéticos apoyaron este último modelo (Garfinkel 1957; Fowler y Richardson 1963), sin embargo el que se impuso fue el modelo fluido debido al hecho experimental de que todos los complejos del sistema OXPHOS pueden ser purificados individualmente, manteniendo su actividad enzimática, y a demostraciones cinéticas (Kroger y Klingenberg 1973; Hackenbrock, Chazotte et al. 1986).

En la última década, sin embargo, se han publicado numerosos trabajos que han avivado de nuevo el debate entre los dos modelos. Diversas observaciones experimentales apoyan la existencia de interacciones estables entre los complejos del sistema OXPHOS, formando los denominados supercomplejos:

- 1) En levaduras, usando inhibidores específicos de la cadena, se ha encontrado que la cadena respiratoria se encuentra organizada en una unidad funcional (Boumans, Grivell et al. 1998). También en mamíferos hay datos cinéticos en este sentido (Bianchi, Genova et al. 2004; Genova, Bianchi et al. 2005; Lenaz y Genova 2009).
- 2) Los supercomplejos pueden ser separados mediante técnicas electroforéticas *cuasi-nativas* (Blue-Native) y gradientes de densidad (Schagger y Pfeiffer 2000; Eubel, Jansch et al. 2003).
- 3) El consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas de patata se encuentra relacionado con la abundancia de supercomplejos (Eubel, Heinemeyer et al. 2004). También se ha visto asociación entre la tasa respiratoria y la cantidad de supercomplejos ensamblados (D'Aurelio, Gajewski et al. 2006), así como cambios en la abundancia de supercomplejos y en la tasa respiratoria asociados a envejecimiento y fallo cardíaco en mamíferos (Rosca, Vazquez et al. 2008; Gomez, Monette et al. 2009).
- 4) Las estructuras obtenidas por diversas técnicas basadas en la microscopía electrónica, correlacionan con la superposición de las estructuras cristalinas de los diferentes complejos OXPHOS y permiten vislumbrar las interacciones entre ellos dentro de los supercomplejos (Dudkina, Eubel et al. 2005; Minauro-Sanmiguel, Wilkens et al. 2005; Schafer, Seelert et al. 2006; Heinemeyer, Braun et al. 2007; Dudkina, Kudryashev et al. 2011).
- 5) Los supercomplejos aislados presentan capacidad para transferir electrones desde el NADH hasta el oxígeno (Acin-Perez, Fernandez-Silva et al. 2008).

Desde un punto de vista funcional, se ha propuesto que la existencia de supercomplejos teóricamente conferiría varias ventajas, entre ellas la canalización más eficiente de los electrones a través de las moléculas transportadoras (Genova, Bianchi et al. 2005; D'Aurelio, Gajewski et al. 2006), la disminución en la producción de ROS, o la estabilización de los complejos para su correcto ensamblaje. En este sentido, estudios con

pacientes y modelos celulares de ratón portadores de mutaciones en distintos complejos han revelado que los complejos III y IV son esenciales para la estabilización del complejo I (Acin-Perez, Bayona-Bafaluy et al. 2004; Schagger, de Coo et al. 2004; Diaz, Fukui et al. 2006). Por otra parte, la ausencia de citocromo *c* repercute en el ensamblaje del complejo IV, afectando secundariamente al ensamblaje de CI y de supercomplejos (Vempati, Han et al. 2009).

Tanto el modelo fluido como el de ensamblaje en supercomplejos se asientan solamente sobre algunas de las observaciones experimentales realizadas en relación a la naturaleza del sistema OXPHOS, permitiendo una explicación parcial del mismo. Por ello, se ha sugerido que la integración de las observaciones realizadas debe ocurrir a través de la coexistencia de ambas formas de organización del sistema OXPHOS, en una manera dinámica (Boekema y Braun 2007). Conforme a estos principios y en base a las observaciones realizadas en nuestro laboratorio, nuestro grupo ha propuesto un tercer modelo para la organización del sistema de fosforilación oxidativa. Este modelo se ha denominado “modelo de plasticidad” y propone que los complejos pueden aparecer individualmente o bien establecer diversas asociaciones entre ellos formando diferentes tipos de supercomplejos. Este modelo ofrece una visión más dinámica que permitiría adaptar la disposición de los elementos del sistema OXPHOS a las necesidades energéticas y fisiológicas de la célula (Acin-Perez, Fernandez-Silva et al. 2008).

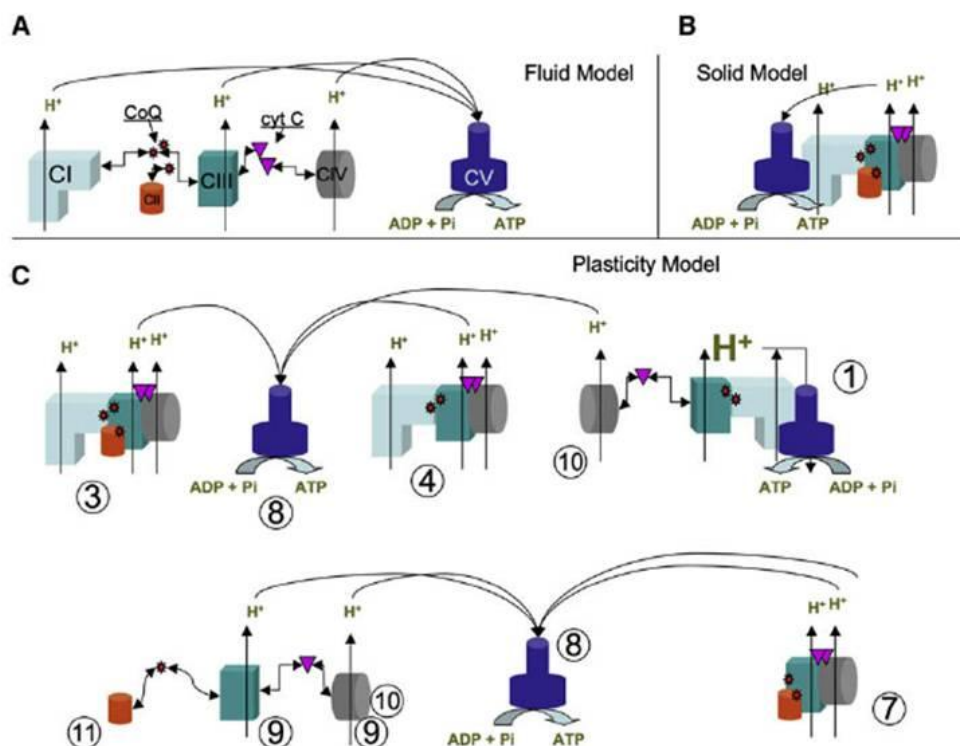


Figura 20. Modelos organizativos del sistema OXPHOS. A) Modelo fluido. B) Modelo sólido. C) Modelo de plasticidad. El código con el que se representan los complejos individuales se describe en A), las estrellas rojas representan el CoQ y los triángulos morados el Cyt *c*. Sólo se representa una unidad de cada complejo aunque la estequiometría puede variar. *Figura tomada de (Acin-Perez, Fernandez-Silva et al. 2008).*

Todavía se ha propuesto un nivel superior de organización del sistema OXPHOS, en estructuras macromoleculares superiores a los SC. Estas consistirían en el ensamblaje de SC sucesivos formando una estructura lineal, a la que se ha denominado cordones respiratorios (Wittig, Braun et al. 2006). La composición de los mismos podría variar en función del organismo. En plantas se han sugerido diversos modelos constructivos de cordón. El más reciente, en mitocondria de patata, define el cordón como estructuras compuestas por unidades de $I_2+III_2+IV_2$ repetitivas que se conectarían entre sí a través de CIV contiguos (Bultema, Braun et al. 2009). Nuevas técnicas electroforéticas están desarrollándose para permitir el análisis de estos cordones respiratorios (Strecker, Wumaier et al. 2010).

2.4 Supercomplejos respiratorios

La asociación de los complejos respiratorios en supercomplejos (SC) es un fenómeno universalmente descrito en todos los eucariotas. Sin embargo, la composición de los mismos difiere en función de la especie y el tipo de tejido, variando la cantidad relativa de los mismos.

El complejo I se ha visto asociado a CIII en muchos organismos, a través de una asociación estable formando SC $I+III_2$ (Dudkina, Eubel et al. 2005; Peters, Dudkina et al. 2008). Esta asociación es la forma más abundante en plantas (Eubel, Heinemeyer et al. 2004).

La asociación de complejos $III+IV$ formando SC se ha descrito ampliamente en mitocondrias vegetales (Eubel, Jansch et al. 2003; Eubel, Heinemeyer et al. 2004; Krause, Reifschneider et al. 2004; Dudkina, Heinemeyer et al. 2006). El complejo III dímero se puede asociar hasta con cuatro copias de CIV. La más estudiada es la forma en que se asocia a una o dos copias de CIV. La estructura de este tipo de SC se estudió en primer lugar en *S. cerevisiae* (Heinemeyer, Braun et al. 2007), ya que este organismo carece de complejo I multimérico, y se observó que hasta dos CIV monoméricos se unen a ambos lados de CIII dímero a través de su cara convexa. Esta misma disposición se ha descrito para el SC III_2+IV_1 en mitocondria de patata (Bultema, Braun et al. 2009).

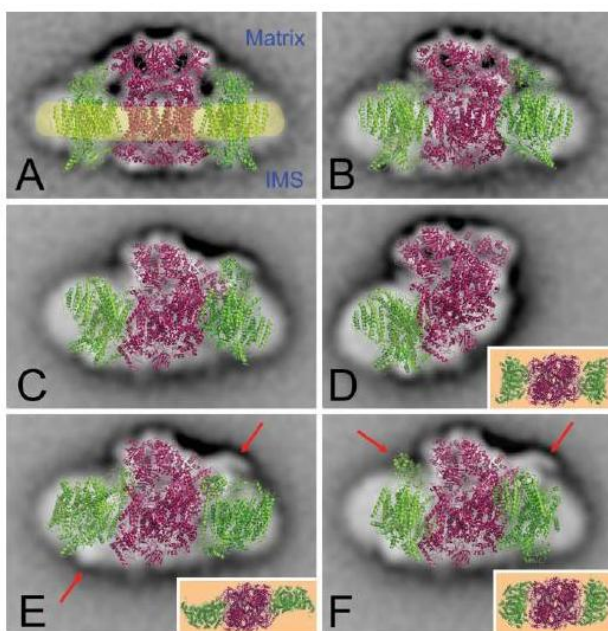


Figura 21. Supercomplejos III_2+IV_2 (A-C) y III_2+IV_1 (D) en mitocondrias de levadura. Se representa la proyección de la estructura pseudo-atómica de complejo bc1 de levadura (en rojo) y de complejo IV de mitocondria bovina (en verde), sobre la imagen obtenida mediante microscopía electrónica de los supercomplejos III_2+IV_2 y III_2+IV_1 . En amarillo se representa la posición que ocuparía la membrana interna. Las figuras E y F representan mapas alternativos de la estructura de supercomplejos, que como indican las flechas rojas, se ajustan peor a la imagen de ME. (Heinemeyer, Braun et al. 2007).

En mitocondrias de corazón bovino, la cantidad de CI que forma SC I+III₂ es del 17% respecto del CI total, mientras que un 67% aparece en asociaciones I+III₂+IV_n. Estos datos sugieren que la cantidad de CI libre *in vivo*, en ausencia de detergentes, es casi nula (Schagger y Pfeiffer 2001). De acuerdo con la estequiometría de los complejos del sistema OXPHOS en que I:III es 1.1:3, es plausible que un tercio del CIII total permanezca libre en mitocondria bovina. La fracción de CIV libre, en cambio, representa un 85% del CIV total.

A los SC formados por unidades de complejos I, III y IV se les denominó también respirasomas (Schagger y Pfeiffer 2000), ya que se consideraron capaces de reducir el oxígeno, como se ha demostrado posteriormente (Acin-Perez, Fernandez-Silva et al. 2008).

El primer mapa 3D del respirasoma bovino, propone que los sitios de unión de la ubiquinona y el Cyt *c* se hallan próximos (Schafer, Dencher et al. 2007), aunque la estructura presentaba diferencias con respecto al modelo que Dudkina y colaboradores habían propuesto anteriormente para la unión entre CIII y CI en mitocondrias vegetales (Dudkina, Eubel et al. 2005). En *Arabidopsis*, el CIII₂ se une al final del brazo de membrana del CI. En mamíferos en cambio interaccionaría con el brazo de membrana del CI en su parte media y es el CIV el que se uniría al final del brazo de membrana de CI. Más recientemente Dudkina *et al* corrigen resultados anteriores y concluyen que no existen diferencias en la unión de CIII al CI entre mamíferos y plantas. Así, el CIII se uniría al CI en la parte interna de su curvatura. En cambio, en esta aproximación no llegan a precisar la posición de CIV en el respirasoma bovino (Dudkina, Kouril et al. 2010). Para la determinación de esta posición, han presentado un nuevo mapa, coherente con los resultados del primer mapa 3D bovino, según el cual ambos complejos parecen conectar uno con otro en la parte de la membrana próxima a la matriz y la distancia propuesta para la difusión del citocromo *c* entre CIII y CIV sería de 10 nm, mientras que la distancia propuesta para el SC III+IV es inferior a 4 nm (Dudkina, Kudryashev et al. 2011).

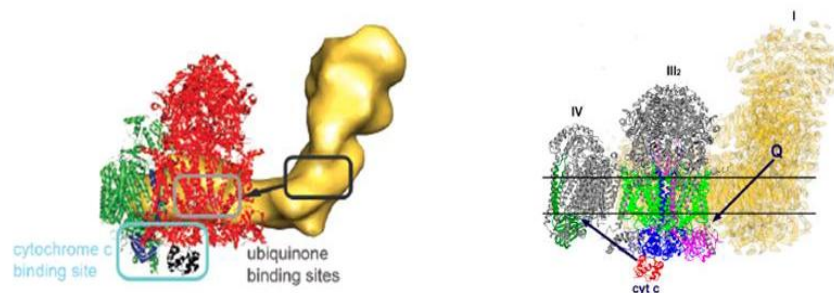


Figura 22. Estructura del respirasoma bovino. A) Mapa generado por (Schafer, Dencher et al. 2007). B) Mapa propuesto por (Dudkina, Kudryashev et al. 2011).

También se ha descrito la formación de dímeros para el CV en levadura, *Arabidopsis* y también en mitocondrias bovinas (Arnold, Pfeiffer et al. 1998; Schagger y Pfeiffer 2000; Eubel, Jansch et al. 2003; Minauro-Sanmiguel, Wilkens et al. 2005; Couoh-Cardel, Uribe-Carvajal et al. 2010). En todos los organismos estudiados dos monómeros de CV se asocian a través de las partes de membrana de las F_O, formando un ángulo fijo o variable de entre 35° y 90°. Sin embargo asociaciones mayores de complejos ATP sintasa se han descrito más recientemente. Así, largas cadenas constituidas por dímeros de CV se localizan en el límite donde se produce la curvatura en la membrana de las crestas laminares (Davies, Strauss et al. 2011).

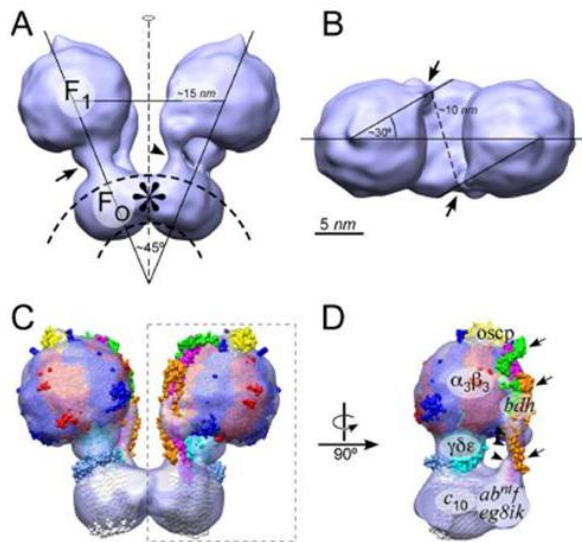


Figura 23. Reconstrucción 3D del dímero de ATPsintasa.

A) y B) Representación en superficie de la reconstrucción para el dímero de ATPasa de levadura con mediciones de las distancias características, vista frontal y superior respectivamente.

C) y D) Proyección del modelo atómico de referencia sobre la reconstrucción 3D, e identificación de las subunidades estructurales. *Imagen tomada de (Cough-Cardel, Uribe-Carvajal et al. 2010).*

2.5 Ensamblaje de supercomplejos

Así como para el ensamblaje de los complejos individuales se dispone de diversos modelos y se conoce la participación de proteínas accesorias o factores de ensamblaje, poco se sabe en relación al proceso constructivo de los supercomplejos.

Experimentos de pulso-caza revelaron que la formación de los SC tiene lugar una vez que se ensamblan los complejos individuales, debido al lapso de tiempo entre la detección de los complejos individuales completamente ensamblados y la aparición de supercomplejos (Acin-Perez, Fernandez-Silva et al. 2008). Sin embargo, en células humanas, la interferencia de Cox17 sugiere que la formación de supercomplejos no tiene lugar con posterioridad a la de los complejos individuales, sino que el ensamblaje y asociación entre complejos individuales es un proceso coordinado (Oswald, Krause-Buchholz et al. 2009). En esta misma dirección, otros estudios concluyen que la asociación de CI a otros complejos para formar SC tiene lugar antes del completo ensamblaje del CI individual (Lazarou, Smith et al. 2009; Moreno-Lastres 2012).

Por otro lado es necesario esclarecer la participación de factores de ensamblaje en este proceso de construcción de los SC. Hasta la fecha no hay descrito ningún factor proteico implicado. Sí existen evidencias acerca del papel de moléculas de lípidos en la interacción entre complejos. En este sentido, se ha descrito que la cardiolipina tiene un papel estabilizador de la interacción de los supercomplejos III₂+IV en levadura y humanos (Zhang, Mileykovskaya et al. 2005; McKenzie, Lazarou et al. 2006). Se ha propuesto que promueve una neutralización de carga de la hélice transmembrana del Cyt *c1* que aparece en la interfaz entre ambos complejos. La deficiencia en cardiolipina descrita en el síndrome de Barth se asocia a la desestabilización de los SC, particularmente la asociación de CIV (McKenzie, Lazarou et al. 2006).

2.6 Supercomplejos vs el papel de transportadores móviles.

El análisis de los coeficientes de respiración de los complejos respiratorios mediante control de flujo en mitocondrias aisladas han permitido probar la existencia de una asociación funcional relevante entre CI y CIII (Bianchi, Genova et al. 2004), de manera que ambos complejos se comportan como uno solo. Sin embargo, no se ha observado este fenómeno para el CIV, aunque debido a la gran proporción de CIV libre respecto al total, es posible que las interacciones con otros complejos no puedan detectarse mediante esta técnica. El CII en cambio es absolutamente limitante para la oxidación de succinato, de modo que no parece existir canalización de sustratos entre CII y CIII, sino que el CoQ actúa como intermediario.

Se ha propuesto que el CoQ puede encontrarse en dos formas en la membrana interna mitocondrial. Bien unido a proteínas, o bien disuelto en la bicapa lipídica. La cantidad de CoQ unido a proteína mitocondrial oscila entre el 10 y el 32% del total (Lass y Sohal 1999). La estimación de CoQ unido a proteína, considerandolo en estequiometría 1:1 con los complejos respiratorios I, II y III, respecto del total sugiere que la mayor parte estaría en forma libre (>85%). Así, en la membrana interna mitocondrial coexistiría un *pool* móvil de CoQ en equilibrio con el CoQ unido a proteínas. Este equilibrio explicaría las cinéticas de saturación del CoQ total descrita en la actividad integrada I+III (Estornell, Fato et al. 1992), y la disminución en la respiración de mitocondrias fusionadas a fosfolípidos, debido a la dilución del *pool* de CoQ (Schneider, Lemasters et al. 1982). El CoQ unido a proteínas podría ser el utilizado para la respiración mientras que el libre desempeñaría otras muchas funciones: como aceptor de electrones del CII, de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, la ETF deshidrogenasa o la dihidroorotato deshidrogenasa, así como la unión a proteínas desacoplantes (Echtay, Winkler et al. 2000) o la permeabilización del poro de transición (Armstrong, Whiteman et al. 2003). La interacción de los complejos mitocondriales I y II, en el proceso de transferencia electrónica reversa, también requiere de la existencia de un *pool* móvil de CoQ, ya que no se han descrito asociaciones de CI y CII (Lenaz y Genova 2009). Desde el punto de vista funcional parece también que la mayor parte del CoQ sería reducible por succinato mientras el NADH solo podría reducir un 10% del CoQ (Lass y Sohal 1999).

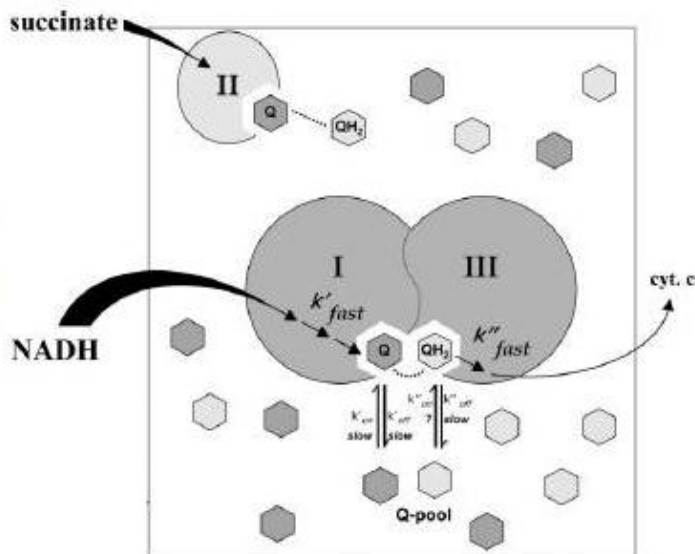


Figura 24. Comportamiento del CoQ en la membrana mitocondrial. Relación entre el *pool* de CoQ y el CoQ unido al supercomplejo I-III, e interacción del *pool* con CII. Figura tomada de (Lenaz, Fato et al. 2007).

En el caso del Cyt *c*, mediante análisis de control de flujo no se ha podido detectar la existencia de un ensamblaje CIII-CIV funcional, ya que CIV nunca es limitante en la oxidación de NADH y la transferencia electrónica se produce a través de un *pool* de moléculas de Cyt *c* distribuidas aleatoriamente. Esta observación, no obstante, puede deberse a la mayor proporción de CIV libre o al rápido intercambio entre Cyt *c* unido y el *pool* de Cyt *c*. En cualquier caso, estos datos indican que aunque pueda existir la canalización de electrones entre III y IV vía supercomplejos, no es una condición necesaria para la transferencia en esta región (Genova, Baracca et al. 2008).

En concordancia con estos resultados, en células intactas de *Saccharomyces cerevisiae*, a través de un método basado en la inhibición competitiva y reversible del CIV por monóxido de carbono, se ha comprobado que hay al menos dos tipos de Cyt *c*, uno unido a CIV que constituye en torno al 16%, y uno libre. Esta unión de Cyt *c* al CIV viene determinada por las interacciones bimoleculares entre estas dos proteínas y su estequiometría, y no por un atrapamiento del transportador móvil en una estructura de supercomplejos. El comportamiento del Cyt *c* se adecúa al comportamiento de *pool* descrito según el modelo fluido. Por otro lado, la desestabilización de los supercomplejos no produjo cambios observables en las cinéticas de las reacciones (Trouillard, Meunier et al. 2011).

3. PATOLOGÍA MITOCONDRIAL

Las enfermedades mitocondriales, y más específicamente las enfermedades debidas a defectos del sistema OXPHOS, constituyen los desórdenes metabólicos innatos más frecuentes, con una incidencia de 1/5.000 nacidos (Smeitink, Zeviani et al. 2006).

Debido al doble control genético los defectos en el sistema OXPHOS pueden ser debidos a mutaciones en el mtDNA o en genes nucleares y manifiestan una gran variedad de fenotipos clínicos, que aparecen en la infancia o en la edad adulta. Estos defectos pueden afectar a diferentes tejidos y órganos, de una manera específica de tejido o multisistémica. Sin embargo, los tejidos con alta demanda energética como cerebro, corazón y músculo esquelético son más vulnerables de verse afectados.

Estas enfermedades pueden seguir una herencia de transmisión materna, ser autosómicas dominantes o recesivas, ligado al X o esporádicas. Especialmente, para aquellas mutaciones en el mtDNA no existe una relación genotipo-fenotipo clara: mutaciones diferentes, en el mismo o diferentes genes, pueden causar un mismo fenotipo, mientras que la misma mutación o mutaciones diferentes de un mismo gen pueden tener manifestaciones clínicas muy distintas. También es una característica destacable, el diferente curso que una determinada enfermedad puede seguir entre individuos de una misma familia. Esta heterogeneidad de los desórdenes mitocondriales tienen su causa en aspectos comentados anteriormente acerca del genoma mitocondrial: la herencia materna, la heteroplasmia, la segregación mitótica y el efecto umbral.

CLASIFICACIÓN GENÉTICA DE LAS MUTACIONES CAUSANTES DE ENFERMEDADES DEL SISTEMA OXPHOS

Defectos en el mtDNA:
Mutaciones en genes codificantes de subunidades estructurales de los complejos (CI, CIII, CIV, CV)
Mutaciones en los genes de la maquinaria de traducción mitocondrial (rRNAs, tRNAs)
Grandes deleciones
Depleciones (disminución del nº de copias de mtDNA)
Mutaciones en genes codificados en el DNA nuclear:
Subunidades estructurales de los complejos del sistema OXPHOS
Factores de ensamblaje de los complejos del sistema OXPHOS
Factores de mantenimiento del mtDNA
Factores para la traducción mitocondrial
Enzimas biosintéticos de lípidos o cofactores

Tabla1: Clasificación genética de las mutaciones causantes de enfermedades del sistema OXPHOS.

Pese a que las mutaciones más abundantes son aquellas que afectan a los mt-tRNAs, debido a que el objetivo de la tesis es el estudio de la organización de los componentes del sistema OXPHOS, a continuación prestaremos especial atención a las patologías asociadas a los diferentes complejos respiratorios, puesto que muchos de estos defectos han proporcionado información muy valiosa para el entendimiento de la organización del sistema y para el desarrollo de posibles estrategias terapéuticas. También conviene señalar cuáles son las consecuencias metabólicas a nivel celular y sistémico asociadas a los defectos mitocondriales en su conjunto, con el fin de tener una idea general de la repercusión de estos defectos más allá de los mecanismos moleculares subyacentes.

3.1 Patología asociada a Complejo I

Las deficiencias en los complejos respiratorios se asocian mayoritariamente al CI, tanto en niños como en adultos (Loeffen, Smeitink et al. 2000; Scaglia, Towbin et al. 2004). Las manifestaciones clínicas son extremadamente heterogéneas, sin embargo aquellos defectos de CI debido a mutaciones en genes nucleares generalmente debutan en la infancia, mientras que la mayoría de defectos asociados a mutaciones en mtDNA se presentan en la infancia tardía, en la adolescencia o incluso en edad adulta.

Mutaciones en genes mitocondriales

Se han descrito mutaciones patogénicas en cada uno de los siete genes mitocondriales que codifican subunidades del complejo I (*MTND*) en humanos. Las presentaciones clínicas incluyen la neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON), el síndrome de Leigh, y desórdenes multisistémicos como el MELAS (encefalopatía mitocondrial con acidosis láctica).

LHON es una causa común de pérdida de visión temprana en adultos. Se caracteriza por ser una neuropatía óptica, bilateral y a menudo secuencial. En algunos pacientes aparecen también otras alteraciones como enfermedad neuromuscular o esclerosis múltiple. Tres mutaciones puntuales son las principales causantes del LHON: G3460A en ND1, G11778A en ND4, y T14484C en ND6. Otras mutaciones asociadas a LHON se han descrito en ND2, ND5 Y ND4L, aunque ND1 y ND6 se consideran “*hot spots*” para LHON.

El síndrome de MELAS es probablemente la encefalomiopatía mitocondrial más común y en el 80% de los casos se encuentra asociada a la mutación m.3243A>G en el mt-tRNA^{Leu(UUR)}. Se caracteriza por retraso mental, deterioro psicomotor, convulsiones, acidosis láctica en suero o líquido cefalorraquídeo. Se presenta en la infancia o adolescencia y puede desarrollar sordera y diabetes en etapas posteriores. Se han encontrado mutaciones en ND1, ND5 y ND6 asociadas a este síndrome. Se han descrito casos de solapamiento entre MELAS y otros síndromes mitocondriales: LHON/MELAS (Pulkes, Eunson et al. 1999), MELAS/MERRF (Naini, Lu et al. 2005) y Leigh/MELAS (Crimi, Galbiati et al. 2003), todos ellos con afectación de ND5.

El síndrome de Leigh (1951) es un desorden neurológico progresivo que se caracteriza por un retraso en el desarrollo intelectual y motor, y niveles elevados de lactato en sangre y líquido cefalorraquídeo (Rahman, Blok et al. 1996). Otros signos clínicos son la atrofia óptica, hipotonía, ataxia y distonía. Esta enfermedad se asocia principalmente a defectos en genes nucleares, pero se han descrito casos con mutaciones en los genes mitocondriales ND3, ND4, ND5 y ND6.

Mutaciones en genes nucleares

Suelen debutar en la infancia. Hay cinco manifestaciones principales: acidosis láctica severa neonatal (FILA), síndrome de Leigh, cardiomiopatía neonatal con acidosis láctica, leucodistrofia con macrocefalia y hepatopatía con tubulopatía renal.

Se han encontrado mutaciones en 14 genes nucleares pertenecientes a subunidades estructurales de CI. Mutaciones en NDUFS1, NDUFS3, NDUFS4, NDUFS7, NDUFS8, NDUFV1, NDUFA12 y NDUFA2 causan defectos cerebrales y del tronco cerebral, mientras que mutaciones en NDUFS2 Y NDUFV2 están relacionados con cardiomiopatía y encefalomiopatía. Mutaciones en NDUFS6, NDUFA11 causan enfermedad mitocondrial infantil letal o acidosis láctica severa en neonatos (Pagniez-Mammeri, Rak et al. 2012).

También se han descrito mutaciones en factores de ensamblaje de CI como CIA30 humana (NDUFAF1), B17.2L (NDUFAF2, mimitina), C6ORF66 (NDUFAF4), C20ORF7, C3ORF60 (NDUFAF3) (McKenzie & Ryan, 2010), ACAD9 (Haack, Danhauser et al. 2010; Nouws, Nijtmans et al. 2010), C8ORF38 (McKenzie, Tucker et al. 2011) o HuInd1 (Pagniez-Mammeri, Rak et al. 2012).

3.2 Patología asociada a Complejo II

Existen mutaciones patológicas en todas las subunidades que forman el complejo II: SDHA (Bourgeron, Rustin et al. 1995; Parfait, Chretien et al. 2000), SDHB (Astuti, Latif et al. 2001), SDHC (Niemann y Muller 2000; Lemarie y Grimm 2009) y SDHD (Baysal, Ferrell et al. 2000; Astuti, Douglas et al. 2001). Además, se ha encontrado asociación molecular entre deficiencias en el complejo II y la formación de tumores mediante regulación a través de la subunidad de factor inducible por hipoxia 1 (HIF1- α) (Selak, Armour et al. 2005). Recientemente se han publicado dos mutaciones patológicas en un factor de ensamblaje del complejo SDHAF1 (Ghezzi, Goffrini et al. 2009) y una mutación en el gen *SDH5* (Hao, Khalimonchuk et al. 2009).

3.3 Patología asociada a Complejo III

Las patologías asociadas con deficiencia en complejo III son heterogéneas en su presentación clínica y relativamente raras. Hasta 27 mutaciones diferentes se han encontrado en el gen mitocondrial *MTCYB*.

Las mutaciones en *MTCYB* se encuentran asociadas a distintas enfermedades, como la encefalopatía mitocondrial (De Coo, Renier et al. 1999; Keightley, Anitori et al. 2000), cardiomiopatía (Valnot, Kassis et al. 1999; Andreu, Checcarelli et al. 2000), displasia septo-óptica (Schuelke, Krude et al. 2002), y fallo multisistémico (Wibrand, Ravn et al. 2001). Sin embargo, la mayoría de los pacientes con estas mutaciones, presentan una miopatía aislada con fibras rojo rasgadas (RRF), caracterizada por intolerancia al ejercicio, debilidad y mioglobinuria (Andreu, Hanna et al. 1999).

Es importante destacar que existen mutaciones en *MTCYB*, que se pueden asociar con una deficiencia combinada de CI y CIII, debido a la dificultad en la formación de los supercomplejos (Bruno, Santorelli et al. 2003; Acin-Perez, Bayona-Bafaluy et al. 2004).

Sin embargo, tan sólo se han descrito mutaciones nucleares para las subunidades estructurales UQCRB (Haut, Brivet et al. 2003) y UQCRQ (Barel, Shorer et al. 2008). También hay defectos producidos por mutaciones en dos factores de ensamblaje. Se conocen casos de más de 20 mutaciones patológicas en BCS1L que se asocian con una gran variedad de manifestaciones fenotípicas: desde el síndrome GRACILE (retraso del crecimiento, aminoaciduria, colestasis, sobrecarga de hierro, acidosis láctica y muerte prematura) (Visapaa, Fellman et al. 2002), hasta acidosis metabólica congénita, tubulopatía proximal neonatal, fallo hepático y encefalopatía, encefalopatía mitocondrial aislada o el síndrome de Björnstad (de Lonlay, Valnot et al. 2001; De Meirleir, Seneca et al. 2003; Fernandez-Vizarra, Bugiani et al. 2007; Hinson, Fantin et al. 2007). Mutaciones en un nuevo factor de ensamblaje, TTC19, son causa de encefalopatía asociada con un déficit de CIII (Ghezzi, Arzuffi et al. 2011).

3.4 Patología asociada a Complejo IV

La deficiencia en COX es uno de los defectos de la cadena respiratoria más común en humanos y se asocia con distintos fenotipos debido a causas genéticas heterogéneas.

Entre las mutaciones en subunidades estructurales se encuentran las codificadas en el mtDNA que afectan al ensamblaje o estabilidad del complejo (Bruno, Martinuzzi et al. 1999; Tiranti, Corona et al. 2000; Campos, Garcia-Redondo et al. 2001). Dichas mutaciones se asocian a un amplio rango de fenotipos incluyendo miopatía, MELAS, encefalomiopatía y fallo neuronal (Barrientos, Barros et al. 2002).

La primera mutación en una subunidad estructural codificada en el genoma nuclear fue descrita por el grupo de Zeviani en 2008 en dos casos de encefalopatía mitocondrial y deficiencia aislada en COX. Se trata de la mutación G221A en el exón 2 del gen *COX6B1*, presente en homocigosis (Massa, Fernandez-Vizarra et al. 2008). Hasta entonces, se pensaba que las mutaciones en proteínas estructurales nucleares del complejo IV eran incompatibles con la vida extrauterina (Adams, Lightowlers et al. 1997; Jaksch, Hofmann et al. 1998).

En cuanto a las mutaciones en factores de ensamblaje de complejo IV se han descrito mutaciones en muchos de ellos, y también se dispone de modelos animales para el estudio de alguno de estos defectos. Por ejemplo, se han descrito más de 40 mutaciones patogénicas en el gen *SURF1*, todas ellas causan síndrome de Leigh con deficiencia en COX (LScox). Mutaciones en *COX10* pueden determinar leucodistrofia y tubulopatía renal (Valnot, von Kleist-Retzow et al. 2000), síndrome de Leigh o cardiomiopatía hipertrófica infantil fatal (Antonicka, Leary et al. 2003; Coenen, van den Heuvel et al. 2004). Mutaciones en *COX15* también pueden causar cardiomiopatía hipertrófica infantil fatal (Antonicka, Mattman et al. 2003) o síndrome de Leigh (Oquendo, Antonicka et al. 2004; Bugiani, Tiranti et al. 2005). *SCO1* y *SCO2* son dos genes parálogos que codifican dos metalochaperonas responsables, junto con otros factores como la subunidad COX17, de la inserción del cobre en el centro catalítico del complejo. Mutaciones en *SCO1* o en *SCO2* se han asociado con hepatopatía neonatal y coma cetoacidótico (*SCO1*) o cardiomiopatía infantil (*SCO2*), ambas caracterizadas por una deficiencia grave de actividad COX (Papadopoulou, Sue et al. 1999; Valnot, von Kleist-Retzow et al. 2000). Mutaciones en el gen que codifica la proteína LRPPRC, implicada en la estabilización de los mensajeros de COI y COIII, causan el síndrome de Leigh francocanadiense (LSFC) (Mootha, Lepage et al. 2003; Xu, Morin et al. 2004).

3.5 Patología asociada a Complejo V

La deficiencia en CV es rara, y las mutaciones se concentran principalmente en el gen mitocondrial *MTATP6*. Las dos mutaciones más frecuentes son T8993G y T8993C, causantes de diferentes síndromes como neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa (NARP) o el síndrome de Leigh heredado maternalmente (MILS), en función de la carga mutacional del paciente (Houstek, Pickova et al. 2006). Otra mutación en el gen *MTATP6* es una microdelección de 2 pb en la posición 9205-9206 ($\Delta T9205$) descrita en un recién nacido con acidosis láctica y en un niño con encefalopatía severa y acidosis láctica. Dichas mutaciones producen la desaparición del codon stop y el sitio de corte entre los genes *MTATP6* y *MTCO3*, produciendo un defecto combinado de complejo V y complejo IV (Seneca, Abramowicz et al. 1996; Jesina, Tesarova et al. 2004). Existen observaciones contradictorias sobre las consecuencias moleculares de las mutaciones en el gen

MTATP6. En un estudio (Nijtmans, Henderson et al. 2001) muestran una reducción en el complejo ensamblado y una acumulación de varios subcomplejos de bajo peso molecular, mediante técnicas de BNGE. En otro encuentran que el complejo V en líneas celulares con las mutaciones T8993C o T8893G, mantiene su integridad estructural, aunque la actividad se ve seriamente afectada (Cortes-Hernandez, Vazquez-Memije et al. 2007). También se ha descrito una mutación en *MTATP8* en un paciente con cardiomiopatía hipertrófica y neuropatía. Esta mutación se asocia con disminución de la actividad, del ensamblaje del complejo entero y con la acumulación de subcomplejos (Jonckheere, Hogeveen et al. 2008).

En cuanto a los factores de ensamblaje, una mutación sin sentido en la proteína ATP12 se ha descrito en un paciente con defecto de CV que presentaba acidosis láctica severa, cardiomiopatía hipertrófica y aciduria metilglutagónica (De Meirleir, Seneca et al. 2004). Se han descrito mutaciones en TMEM70 asociadas a déficit de CV (Cizkova, Stranecky et al. 2008).

3.6 Consecuencias metabólicas de los defectos en OXPHOS

Consecuencias sistémicas

Generalmente, los pacientes con defectos en el sistema OXPHOS presentan niveles altos de ácido láctico e intermediarios del ciclo de Krebs en sangre, orina y líquido cefalorraquídeo, además de a nivel tisular. El aumento en la producción de ácido láctico se debe a la fermentación mediante la NADH lactato deshidrogenasa del piruvato acumulado debido a la inhibición del sistema OXPHOS y el ciclo de Krebs. El exceso de ácido láctico puede provocar acidosis láctica. Además el desequilibrio NADH/NAD⁺ puede conducir a un aumento en la proporción de cuerpos cetónicos (Munnich, Rustin et al. 1992)

La concentración sanguínea de alanina está elevada en la mayor parte de los pacientes, ya que su síntesis a partir de piruvato por la enzima alanina aminotransferasa es dependiente de los niveles de este sustrato. En algunos casos, los pacientes pueden presentar aumento de prolina o disminución de citrulina (Rabier, Diry et al. 1998). También se ha asociado diabetes a pacientes con defectos OXPHOS, debido a una secreción inapropiada de insulina por las células beta pancreáticas producida por la defectuosa señalización mediada por glucosa (Walker, Taylor et al. 2005).

Consecuencias a nivel celular y tisular

La insuficiente producción de ATP para hacer frente a las demandas energéticas de la célula, es una de las consecuencias inmediatas del defecto en OXPHOS, pero no tiene por qué ser la consecuencia más relevante. Este defecto repercutirá mayoritariamente en aquellos tejidos como cerebro, corazón o músculo, que requieren un aporte elevado.

En cambio, procesos vitales para todas las células como el transporte de metabolitos y de iones (fosfato, sodio, calcio o potasio), dependen de un gradiente protónico y potencial de membrana generado por un sistema OXPHOS funcional. Un ejemplo es la internalización de calcio en la mitocondria tras el aumento de sus niveles citoplásmicos en algunas cascadas de señalización intracelular. Pacientes con sistema OXPHOS defectuosos han mostrado defectos en la homeostasis de calcio (Kawamata y Manfredi 2010).

Por otro lado la inhibición del sistema OXPHOS provoca desequilibrios redox, acumulándose aquellos intermediarios o transportadores previos al defecto de complejo

en estado reducido y en estado oxidado los transportadores posteriores. Esto puede tener efectos en aquellas rutas metabólicas dependientes de estas moléculas con capacidad de ceder o donar electrones. Un ejemplo es la inhibición de la síntesis de las pirimidinas, debido a la inhibición de la enzima dihidroorotato deshidrogenasa como consecuencia de la acumulación de CoQ reducido debido al defecto en CIII o CIV (Hirano, Nishigaki et al. 2004).

El defecto en el sistema OXPHOS también repercute en la generación de especies reactivas de oxígeno. Los complejos respiratorios I y III son la principal fuente de ROS (superóxido y H₂O₂, que pueden dar lugar al radical hidroxilo). En condiciones normales se producen bajas cantidades de ROS que pueden actuar como señalizadores intracelulares y se pueden detoxificar por varias enzimas, entre ellas la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa. Con la cadena bloqueada, la producción de ROS se incrementa y se puede producir daño oxidativo (Balaban, Nemoto et al. 2005; Koopman, Verkaart et al. 2005).

Debido al papel de la mitocondria en el inicio del proceso apoptótico, el defecto en el sistema OXPHOS puede desencadenar la desregulación de este proceso (Smeitink, Zeviani et al. 2006).

4. TERAPIA MITOCONDRIAL

Actualmente no existe una terapia efectiva para las enfermedades mitocondriales, aunque se han desarrollado numerosas estrategias que, por el momento, son sólo terapias paliativas. Entre ellas, la suplementación de la dieta con carnitina, CoQ, tiamina, succinato o ácido fólico; la eliminación de metabolitos nocivos como el lactato; la administración de antioxidantes; el tratamiento de los síntomas mediante ejercicio, cirugía (implantes cocleares, trasplante hepático o cardiaco, corrección de ptosis) y también el consejo genético. Algunas de las estrategias actuales que se están investigando se revisan a continuación.

Una de las perspectivas terapéuticas actuales es el aumento de la biogénesis mitocondrial, y por consiguiente el número de mitocondrias, mediante la estimulación de coactivadores de la transcripción mitocondrial (PGC-1 α , PGC-1 β y PRC) (Schon, DiMauro et al. 2010). Estudios en ratón deficiente en Cox10 han mostrado una recuperación completa del fenotipo normal tras la sobreexpresión de PGC-1 α mediante terapia génica, y de un 85 % tras la administración de bezafibrato, un agonista de PGC-1 α (Wenz, Diaz et al. 2008). Aunque en otro estudio con el bezafibrato no se logró la recuperación de la actividad en otros tres modelos animales de déficit de COX, sí que se consiguió parcialmente activando el eje AMPK/PGC-1 α mediante la administración de AICAR (Viscomi, Bottani et al. 2011).

Otra estrategia prometedora es la manipulación de la dinámica mitocondrial, mediante agentes farmacológicos. Las mitocondrias son orgánulos con gran capacidad para fusionarse y dividirse, y redistribuir los nucleoides, logrando incluso la complementación entre diferentes moléculas de mtDNA. Se ha propuesto que aumentando los procesos de fusión, podría alcanzarse una complementación funcional entre diferentes moléculas de DNA mitocondrial y al mismo tiempo, debido a la estrecha relación de este proceso de fusión con la autofagia, eliminar las mitocondrias que contienen elevados niveles de mtDNA mutante (Schon, DiMauro et al. 2010).

Otro grupo de aproximaciones terapéuticas proponen el uso de distintas estrategias de terapia génica como posible alternativa para el tratamiento de las enfermedades mitocondriales. Éstas aproximaciones son:

1) **Eliminar el gen mutante.** Para las enfermedades que tienen su origen en fallos en el mtDNA, las aproximaciones más prometedoras se basan en reducir la proporción de genomas mutados respecto al genoma sano, es decir, en reducir la heteroplasmia. Se han propuesto distintas estrategias:

1.a) Inhibir la replicación de las moléculas de mtDNA mutantes. Para ello se necesita una molécula que se una selectivamente al mtDNA mutado e inhiba su replicación, permitiendo así la propagación del mtDNA sano, eliminando de este modo el defecto OXPHOS. Dicha estrategia se basa en el uso de ácidos peptidonucleicos o PNAs (peptide nucleic acids) moléculas sintéticas análogas a ácidos nucleicos (Egholm, Buchardt et al. 1993; Muratovska, Lightowers et al. 2001; Muratovska, Lightowers et al. 2001).

1.b) Eliminación de las moléculas de mtDNA mutante mediante corte con enzimas de restricción dirigidas a la mitocondria. Estrategia utilizada con éxito tanto en células en cultivo (Srivastava y Moraes 2001) como en ratones heteroplásmicos (Bayona-Bafaluy, Blits et al. 2005; Bacman, Williams et al. 2007). Dicha estrategia ve limitada su aplicación a secuencias generadas por una mutación patológica que

reconoce una determinada enzima de restricción, por ello se ha propuesto el uso de nucleasas con dominios de dedos de Zn, que se pueden unir a secuencias de DNA predeterminadas y cortar la doble hebra (Minczuk, Papworth et al. 2008).

1.c) Una estrategia recientemente llevada a cabo en modelos animales y en humanos es la manipulación de los oocitos maduros o de los cigotos para eliminar las moléculas de mtDNA maternas, en aquellos casos en que la madre presenta una mutación en genes mitocondriales.

En el estudio realizado en *Macaca mulata* con oocitos maduros parados en segunda metafase, se realizó una transferencia de los complejos cromosoma-huso acromático de la madre a oocitos enucleados de una hembra sin parentesco. Una vez realizada la transferencia y fusión utilizando un extracto de virus Sendai, los complejos cromosoma-huso acromático se mantuvieron intactos. Posteriormente se realizó la fecundación del oocito y se prosiguió el desarrollo embrionario con normalidad. Los monos nacidos fueron todos sanos. Esta técnica ha requerido la optimización de las técnicas de visualización de DNA para evitar su daño (Tachibana, Sparman et al. 2009).

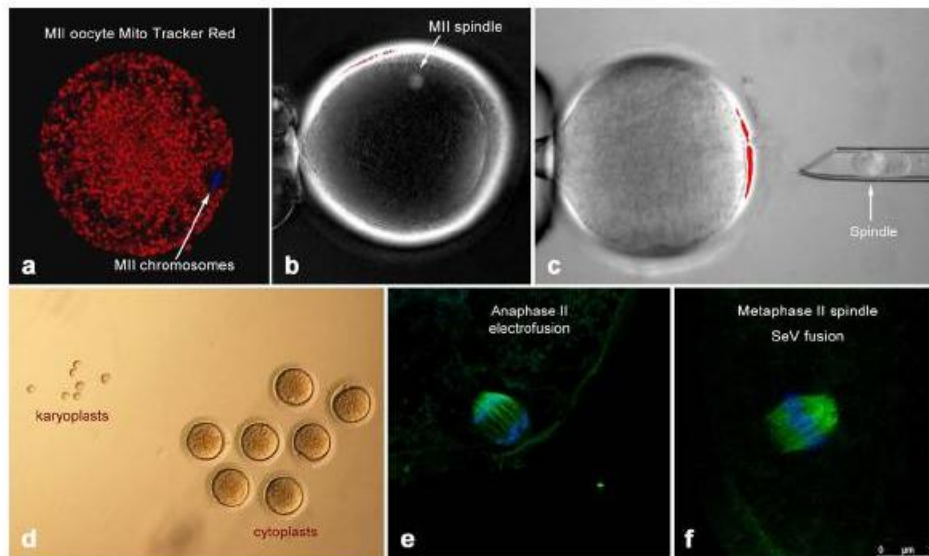


Figura 25. Transferencia de complejo cromosómico-huso acromático. A) Distribución de DNA nuclear (azul, tinción con DAPI) y de las mitocondrias (rojo, Mitotracker red) en el oocito arrestado en fase MII. B) Observación de oocito MII bajo microscopio de luz polarizada. C) Extracción de complejo cromosómico-huso acromático. D) Comparativa de los tamaños de carioplasto y citoplasto. E y F) Oocitos regenerados. Tinción DNA nuclear con DAPI (azul), y anticuerpo α - tubulina (verde). (Tachibana, Sparman et al. 2009)

En el estudio en humanos, a partir de oocitos fecundados artificialmente con el objetivo de producir cigotos portando uno o tres pronúcleos, se produjo una transferencia de los pronúcleos a un cigoto receptor previamente enucleado (Craven, Tuppen et al. 2010). El desarrollo embrionario se permitió hasta la etapa de blastocisto. Los análisis revelaron que en esta técnica se produce un arrastre de mtDNA junto al pronúcleo variable entre blastómeros de un mismo individuo. Los aspectos éticos de esta transferencia de citoplasmas todavía deben ser discutidos. En cualquier caso, este mismo grupo señala haber realizado la técnica de transferencia

cromosómica desarrollada en monos y no encontraron diferencias significativas en cuanto al resultado y arrastre de mtDNA entre las dos técnicas.

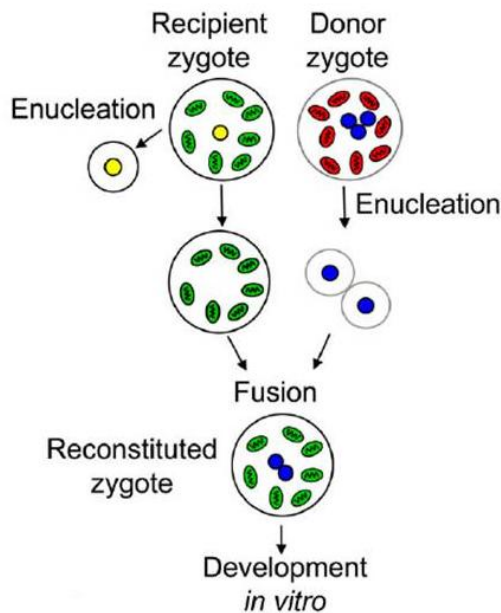


Figura 25. Esquema de la técnica de transferencia de pronúcleos. A partir de cigotos producidos artificialmente portadores de una mutación en el mtDNA, se produce una transferencia de pronúcleos a un cigoto receptor previamente enucleado, que es donante de un mtDNA sano. (Craven, Tuppen et al. 2010)

2) **Introducir el gen sano.** Actualmente no existe ninguna técnica que permita introducir un gen exógeno dentro de la mitocondria, con la excepción de las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae* y *Chlamydomonas reinhardtii* mediante biolística (Bonnefoy y Fox 2007; Bonnefoy, Remacle et al. 2007). Por tanto, se ha propuesto la expresión funcional del mismo gen mitocondrial que el que presentaba la mutación, mediante su inserción en el núcleo (Expresión Alotópica). Esta estrategia se basa en la síntesis de la proteína por los ribosomas citoplasmáticos y su importe a la mitocondria, donde reemplazaría a la proteína mutada. Durante muchos años se ha considerado una técnica de terapia génica mitocondrial prometedora, aunque existen numerosos trabajos con resultados contradictorios en mitocondrias de mamíferos (Guy, Qi et al. 2002; Manfredi, Fu et al. 2002; Oca-Cossio, Kenyon et al. 2003; Bokori-Brown y Holt 2006; Bonnet, Augustin et al. 2008) En un trabajo reciente de nuestro grupo se cuestiona la viabilidad de esta aproximación y explica los motivos de las discrepancias existentes entre los diferentes trabajos publicados (Perales-Clemente, Fernandez-Silva et al. 2011).

3) **Xenoexpresión de enzimas alternativas.** Esta estrategia se basa en el uso de vías alternativas al transporte electrónico en la cadena respiratoria.

Se ha demostrado que la expresión de la NADH deshidrogenasa de levadura NDI1 en células de ratón deficientes en complejo I restablece la capacidad de crecer en medios no fermentables (Seo, Kitajima-Ihara et al. 1998; Bai, Hajek et al. 2001). Además, la generación de virus asociados a adenovirus expresando NDI1, (rAAV-NDI1), ha permitido obtener altas tasas de transfección en células de roedores (incluidas las neuronales), y demostrar que éstas pueden sobrevivir en presencia de inhibidores de complejo I, que *in vivo* producen parkinsonismo en roedores, (rotenona y 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPTP) (Seo, Nakamaru-Ogiso et al. 2006).

Posteriormente, se ha demostrado el efecto neuroprotector de la enzima NDI1 en un modelo de la enfermedad de Parkinson en ratas, mediante tratamiento con rotenona (Marella, Seo et al. 2008). El efecto protector propuesto se basa en la restauración de la parte de la cadena dañada y en la reducción de la producción de radicales libres.

La expresión de la oxidasa alternativa AOX podría proporcionar una opción en el caso de deficiencias en la vía del citocromo. Esta enzima ha sido expresada en células humanas sanas en cultivo, comprobando que su expresión no resulta tóxica y las hace parcialmente resistentes al cianuro y a la antimicina A, inhibidores de los complejos IV y III respectivamente (Hakkaart, Dassa et al. 2006). Dicha oxidasa alternativa es capaz de permitir la supervivencia de moscas que tienen disminuida parcialmente la expresión del factor de ensamblaje del complejo IV Surf1, así como compensar el fenotipo de una cepa de *Drosophila* que contiene una mutación en el gen homólogo al humano Park7 relacionado con la enfermedad del Parkinson (Fernandez-Ayala, Sanz et al. 2009).

La xenoexpresión simultánea de ambas proteínas en una línea celular carente de mtDNA (línea rho cero) permitió restablecer el transporte electrónico desde NADH hasta oxígeno molecular en un trabajo llevado a cabo en nuestro grupo (Perales-Clemente, Bayona-Bafaluy et al. 2008). Esta recuperación funcional permitió asimismo restablecer vías metabólicas adyacentes, como la biosíntesis de pirimidinas. Sin embargo no se recupera el bombeo protónico, ya que ninguna de estas proteínas cumple esta función. En este sentido, la recuperación de las funciones de la cadena respiratoria fue incompleta.

Para restaurar esta función, necesaria para el establecimiento del potencial de membrana requerido en la síntesis de ATP, entre otros procesos, se podría desarrollar una estrategia de xenoexpresión que emplease proteínas con función de bombeo de protones.

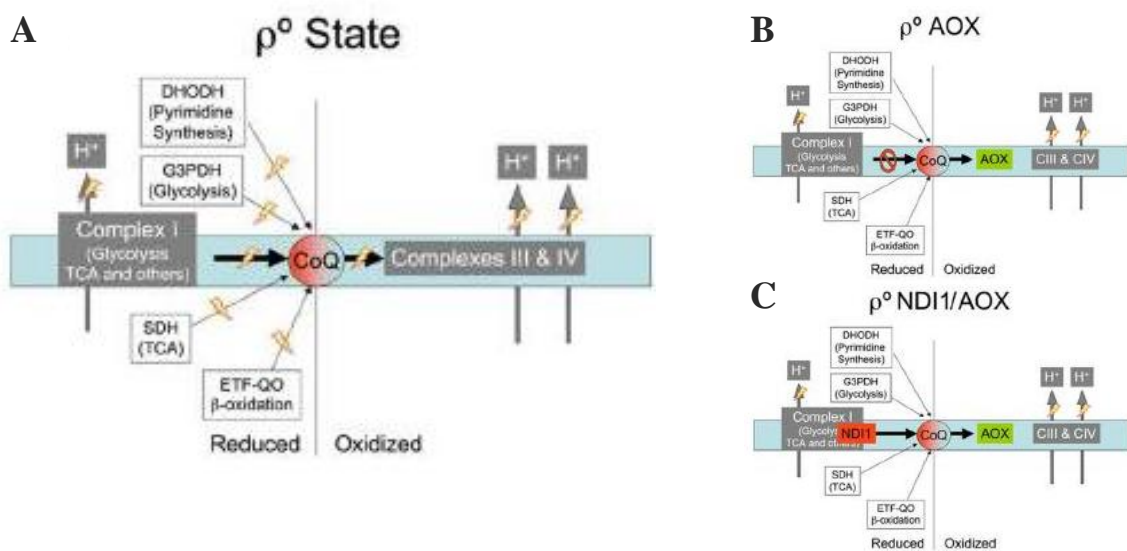


Figura 26. Reconstrucción de la cadena transportadora de electrones (CTE) mediante una estrategia de xenoexpresión. A) Funcionamiento de CTE en líneas carentes de mtDNA. B) Xenoexpresión de AOX y recuperación de la oxidación del CoQ y vías metabólicas dependientes. C) Xenoexpresión conjunta de AOX y NDI1 y recuperación de flujo electrónico desde NADH hasta O_2 . (Perales-Clemente, Bayona-Bafaluy et al. 2008).

5. BOMBAS DE PROTONES

5.1 Bacteriorrodopsina

La bacteriorrodopsina es una proteína integral de membrana con función de bomba protónica fotoinducible presente en arqueobacterias con halofilismo extremo, siendo el género *Halobium* el más representativo. Estos organismos pueden obtener el ATP mediante dos vías alternativas: mediante respiración a través de una cadena respiratoria funcional en condiciones aeróbicas, o a través de un proceso de fotofosforilación inducible en condiciones de hipoxia (Danon y Stoeckenius 1974; Lanyi 1978). En estas condiciones, se estimula la transcripción de una serie de genes que conllevan cambios fenotípicos en el organismo, como la formación de vesículas gaseosas en el citoplasma que le confieren flotabilidad, y la aparición de parches a nivel de la membrana plasmática, llamados membrana púrpura, en los que se expresa la proteína bacteriorrodopsina. En condiciones de luminosidad, esta proteína es capaz de traslocar protones desde el lado citoplásmico hacia el extracelular, lo cual genera un gradiente protónico que será ulteriormente utilizado por una ATP sintasa presente en la membrana plasmática para la fosforilación del ADP (revisiones de (Haupt, Tittor et al. 1999; Lanyi y Luecke 2001).

Este proceso de conversión de la energía lumínica recibida en la traslocación de protones se ha llamado fotociclo (1 fotón-1 protón), y se inicia gracias al cambio conformacional mediado por el cofactor todo-*trans*-retinal, tras la recepción de un fotón ($\lambda_{\text{máx}}$ 568nm) (Goldschmidt, Ottolenghi et al. 1976; Luecke 2000; Pebay-Peyroula, Neutze et al. 2000).

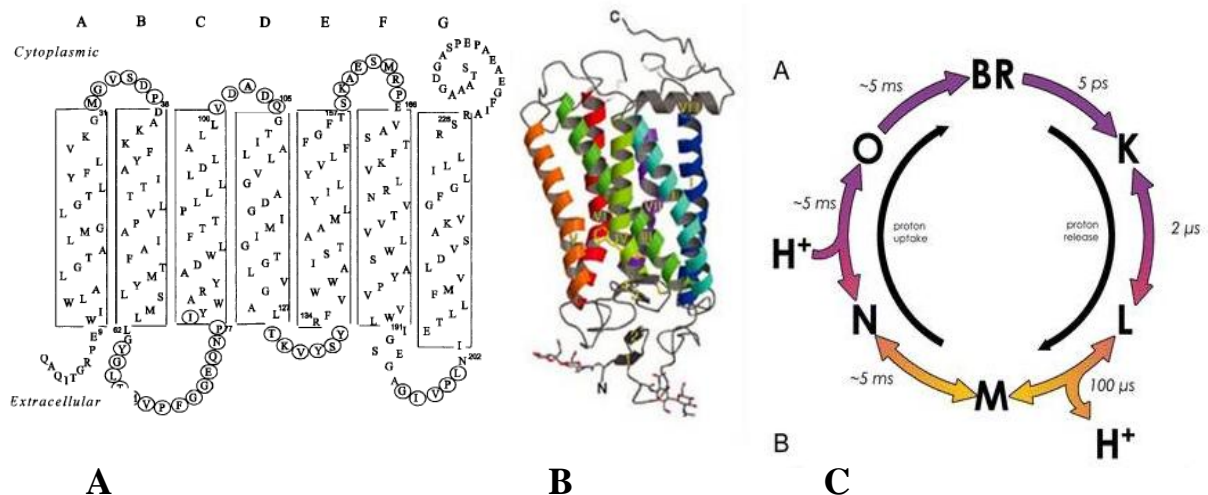


Figura 27. Bacteriorrodopsina. A) Esquema de la estructura secundaria y disposición en la membrana púrpura de *Halobacterium*. Imagen tomada de (Allen, Kim et al. 2001). B) Estructura terciaria de la bacteriorrodopsina. Tomada de Protein Data Bank. C) Fotociclo. Se inicia tras la recepción de un fotón, y a lo largo del mismo se producen cambios conformacionales y en los estados de protonación de diferentes residuos. En la figura se muestran los sucesivos intermediarios K, L, M, N y O, y las flechas hacen referencia a los cambios en el espectro de absorción (color de la flecha), la duración de cada una de las etapas, y la liberación y reposición del protón. Imagen tomada de (Cartailler y Luecke 2003).

La bacteriorrodopsina es una proteína de 26 kDa constituida por una sola cadena polipeptídica de 248 aminoácidos unida a través del grupo ε-amino de K216 a un cofactor, todo-*trans*-retinal, formando una base de Schiff. La estructura terciaria de la

proteína consiste en siete hélices α , denominadas A-G, unidas entre sí por lazos cortos extramembranosos. Las hélices E, F y G son casi perpendiculares al plano de la membrana, mientras que las hélices A, B, C y D atraviesan la membrana formando pequeños ángulos respecto a la perpendicular. Las siete hélices encierran una cavidad interna donde se ubica el cromóforo y por donde transcurre el protón. La base de Schiff divide la cavidad en dos secciones: el semicanal citoplásmico y el semicanal extracelular. La región extracelular contiene residuos polares cargados, entre los que destaca Asp-85 que actúa como aceptor del protón cuando la base de Schiff se desprotona. Otros residuos destacables son Asp-212, Arg-82, Glu-204, y Glu-194, que permiten la traslocación y liberación de un protón hacia el lado extracelular. La región citoplásmica contiene residuos hidrófobos a excepción de Asp-96, encargado de reponer el protón perdido a la base de Schiff (Lanyi y Luecke 2001).

Esta es una de las proteínas de membrana mejor conocidas a nivel estructural y funcional, gracias a su simplicidad y la disponibilidad de cientos de mutantes puntuales.

5.2 Proteorrodopsinas

Las proteorrodopsinas son bombas protónicas fotoinducibles, al igual que la bacteriorrodopsina, descubiertas muy recientemente a partir de muestras marinas (Beja, Aravind et al. 2000; Beja, Spudich et al. 2001; Friedrich, Geibel et al. 2002; de la Torre, Christianson et al. 2003; Giovannoni, Bibbs et al. 2005). Se encuentran en α , β y γ -proteobacterias, organismos altamente representados en el bioplankton. De manera que, considerando el porcentaje de biomasa que representan, el fototrofismo mediado por las proteorrodopsinas contribuiría de manera fundamental en el flujo de carbono y energía en los océanos.

Se distinguen dos subgrupos de proteorrodopsinas principales atendiendo a su diferente espectro de absorción: $\lambda_{\text{máx}}$ 525 nm (verde) y $\lambda_{\text{máx}}$ 490 nm (azul). Su diferente distribución en capas en función de la profundidad a la que se encuentra el organismo, proteorrodopsinas verde (GPR) para los organismos más superficiales, y azul (BPR) en los de aguas más profundas, demuestra el proceso adaptativo en función de la disponibilidad lumínica a esas profundidades. Esta divergencia en cuanto al espectro de absorción no se manifiesta en cuanto a la secuencia aminoacídica, ya que ambos tipos comparten más del 78% de sus residuos (Kelemen, Du et al. 2003; Man, Wang et al. 2003). De hecho el cambio en el espectro de absorción puede conseguirse mediante mutación puntual en un único residuo: Leu-105 determina espectro de absorción con máxima en el verde, mientras que Gln-105 determina la absorción de luz azul (Man, Wang et al. 2003). A parte de diferencias en el espectro de absorción, las GPR muestran un fotociclo más rápido y un bombeo protónico superior (Wang, Sineshchekov et al. 2003).

Debido a su similitud con la bacteriorrodopsina, se ha propuesto su reemplazo en aquellas aplicaciones tecnológicas en las que se emplea la bacteriorrodopsina (Pandey 2006; Anton, Walczak et al. 2010; Chu, Yen et al. 2010), debido a que resulta más ventajosa la producción *in vitro* de proteorrodopsinas de manera funcional que la de la bacteriorrodopsina (Gourdon, Alfredsson et al. 2008; Ranaghan, Shima et al. 2010).

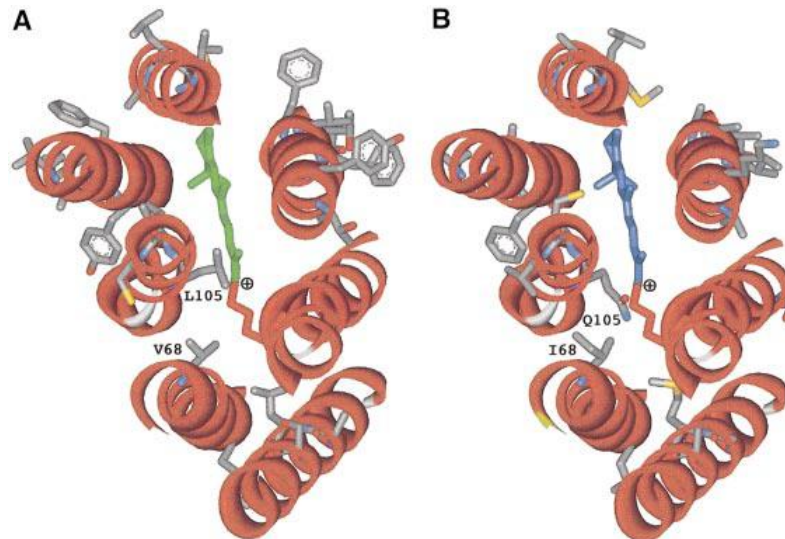


Figura 28. Modelo de estructura de proteorrodopsinas. A) Variante eBAC31A08, proteorrodopsina de absorción de luz verde (G-PR). B) Variante PalE6, proteorrodopsina de absorción de luz azul (B-PR). *Imagen obtenida de (Man, Wang et al. 2003).*

5.3 Optogenética

La optogenética es una combinación de métodos genéticos y ópticos para llevar a cabo una ganancia o pérdida de función específica en células, tejidos o animales. En realidad, pretende controlar la activación o desactivación de un proceso o mecanismo celular mediante una señal luminosa.

En 1979 Francis Crick, estudiando en el ámbito de la neurociencia, sugirió que la luz podría actuar como método de control y reemplazar el uso de electrodos y drogas en la estimulación neurológica, actuando sobre un tipo celular específico y a gran velocidad. Pero convertir esta idea en realidad llevó cerca de 30 años.

Fue en el año 2005, cuando se describe la sensibilización de neuronas a la luz tras la expresión en su membrana plasmática de una proteína fotoinducible natural de algas llamada canalrodopsina-2 (Boyden, Zhang et al. 2005). No es necesario la adición del cofactor *todo-trans* retinal, el cofactor de todas las opsinas microbianas, debido a que existe de manera natural en vertebrados. Esto ha permitido ampliar estos estudios realizados en modelos celulares a otros modelos más complejos, modelos tisulares y modelos animales (Adamantidis, Zhang et al. 2007; Aravanis, Wang et al. 2007; Zhao, Ting et al. 2011).

El uso de diferentes tipos de canales fotoinducibles también ha contribuido a la extensión de esta técnica. Así por ejemplo se han utilizado diferentes proteínas que permiten el paso de protones: mientras que la bacteriorrodopsina realiza una función de transporte de protones en una sola dirección, determinada por la conformación de la proteína, las canalrodopsina-1 y canalrodopsina-2, son canales que permiten su paso a favor de gradiente (Nagel, Ollig et al. 2002; Nagel, Szellas et al. 2003). Otro tipo de moléculas empleadas en optogenética para modular la polarización neuronal ha sido la halorrodopsina, una bomba de iones cloruro (Lanyi 1986; Zhao, Cunha et al. 2008; Kaneda, Kasahara et al. 2011). No obstante, para el empleo de algunas de estas proteínas procedentes de microorganismos ha sido necesario resolver algunas dificultades en cuanto a la toxicidad y niveles de expresión o localización intracelular (Gradinaru, Thompson et

al. 2008; Zhao, Cunha et al. 2008; Gradinaru, Zhang et al. 2010; Kaneda, Kasahara et al. 2011).

Resultados

Parte I:
Organización modular de la cadena respiratoria

Manuscrito1

*Preferential Super-assembly Between Mitochondrial
Respiratory Complexes I and III defines a dedicated CoQ pool.*

***Preferential Super-assembly Between Mitochondrial Respiratory
Complexes I and III defines a dedicated CoQ pool***

Raquel Moreno-Loshuertos², Esther Lapuente-Brun², Carmen Colás¹, M. A. Rodríguez-Hernández³, Plácido Navas³, Acisclo Pérez-Martos², Patricio Fernández-Silva² and José Antonio Enríquez^{1,2*}

¹ Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III. Melchor Fernández Almagro, 3. 28029 Madrid. SPAIN

² Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Facultad de Ciencias. Universidad de Zaragoza. Pedro Cerbuna, 12. Zaragoza 50009. SPAIN.

³ Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, Universidad Pablo de Olavide-CSIC and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras, ISCIII, Sevilla, SPAIN.

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: jaenriquez@cnic.es

Tel. +34 914531200. Fax: +34 914531240.

Experimental Procedures word count: 1,443

Introduction, Results & Discussion word count: 2,549

Running title: Specific Quinone pool for complexes I and III

Keywords: Mitochondrial Complex I/Quinone pool/Mitochondrial Electron transport chain

Subject Category: Cellular Metabolism; Molecular Biology of Disease

SUMMARY

Four multi-protein complexes (I to IV) compose the mitochondrial electron transport chain. The electrons are transferred between the respiratory complexes by two small electron carriers. Coenzyme Q (CoQ) transfers electrons from complexes I, II and other FAD dependent enzymes to complex III; and cytochrome *c* (cyt *c*) transfers electrons from complex III to IV. It was believed that a unique pool of CoQ exists, and, therefore, the origin of electrons that reduce CoQ cannot be traced back. We report here that the physical interaction between complexes I and III defines a specific CoQ pool and a subset of complex III molecules that are dedicated to transfer electrons between NADH and cyt *c*.

INTRODUCTION

Coenzyme Q (CoQ, Ubiquinone) is required to transfer electrons from NADH or FAD dependent enzymes to respiratory complex III within the inner mitochondrial membrane. The reduction/oxidation of CoQ is critical for energy production, redox balance, pyrimidine synthesis, amino acid and lipid metabolism and indirectly for apoptosis control and calcium handling. For more than 40 years it was generally accepted that CoQ exerted its role by freely diffusing through the membrane and behaving as a homogenous pool available to enzymes that required it, according to the random collision model proposed to explain the organization of the mitochondrial electron transport chain (Lenaz, Fato et al. 2007). In the last 10 years this view has been modified substantially with strong experimental support for a model in which the electron transport chain is organized, at least partially, into dynamic structures called respiratory supercomplexes. We recently demonstrated that such structures contain CoQ. Here, we show in mammalian cells that the physical interaction between complexes I and III defines a specific CoQ pool and a subset of complex III molecules that are dedicated to transferring electrons between NADH and cytochrome *c*. We also show that a different subset of complex III molecules oxidizes CoQ molecules that receive electrons from complex II or from enzymes other than complex I. By modulating the relative levels of complexes I and III we demonstrate competition between these two electron flux pathways.

RESULTS

We previously characterized a mouse mitochondrial DNA (mtDNA) mutant cell line (A22) harbouring a mutation in the *mt-Cytb* gene that prevents the assembly of mitochondrial complex III (Acin-Perez, Bayona-Bafaluy et al. 2004). In the absence of complex III, complex I becomes very unstable and is degraded. Here, we randomly induced suppressor mutations in A22 cells (Bayona-Bafaluy, Movilla et al. 2008) by

chemical mutagenesis followed by selection for uridine autotrophy. After mutagenesis, cells were replicated and grown in selective medium (lacking uridine), in which the original *cyt b*^{KO} cells (A22; referred to hereafter as mutant or M cells) are unable to grow. In this way, we isolated mA22, a cell line able to survive without uridine supplementation (hereafter suppressor or S cells). Interestingly, S cells were also able to grow in a medium in which glucose was replaced by galactose (Fig 1A).

RFLP analysis revealed that the suppressor phenotype was not due to a reversion in the original mutation in *mt-Cytb* (Fig. 1B). Furthermore, full sequencing of the S cell mtDNA discarded the possible role of a secondary mutation in either *mt-Cytb* or any other mtDNA-encoded gene. To directly demonstrate the nuclear origin of the suppressor mutation, we performed two cybridization assays (Moraes, Dey et al. 2001; Acin-Perez, Bayona-Bafaluy et al. 2003). First, the nucleus of the suppressor cells (puromycin resistant) was transferred to enucleated mutant cells (geneticin resistant): proper nucleus replacement was confirmed by geneticin sensitivity and puromycin resistance. In the second assay, mtDNA of mutant cells was replaced with that of suppressor cells by mitochondrial substitution. The cybrids were tested for geneticin resistance and puromycin sensitivity to ensure that only mitochondria were transferred (Fig 1C). Finally, in both cases the trans-mitochondrial cell lines were cultured in galactose-containing medium. While none of 45 independent clones with the M nucleus were able to survive in galactose, all clones harbouring mutant mtDNA and the S nucleus survived, indicating that the suppressor genetic alteration was transferred with the nucleus and not with the mtDNA. Furthermore, sequencing of the entire set of cDNAs for the structural complex III subunits (*Uqcrc1*, *Uqcrc2*, *Cyc1*, *Risp*, *Uqcrb*, *Uqcrcq*, *Uqcrh*, *Uqcr10*, *Uqcr*), as well as the chaperones *BCS1L* and *OXA1*, did not detect any mutation that would explain the suppressor phenotype (See Table S1 for primer sequences).

The fact that S cells become both uridine independent and able to grow in galactose indicates that, despite being mutant for *mt-Cytb*, they have recovered OXPHOS competence. Indeed, suppressor cells have recovered respiration ability (Fig 1D), implying that complexes III and I are once again assembled. To understand the effect of the suppressor mutation on the steady state assembly of mtDNA-dependent respiratory complexes, we performed Blue-Native Gel Electrophoresis (BNGE) of dodecyl-maltoside (DDM) solubilized mitochondria followed by western blot. We found that $\approx 11\%$ of assembled complex III dimers is enough to stabilize $\approx 50\%$ of fully-assembled complex I. We also found that the amount of complex IV in the suppressor cell line is only $\approx 15\%$ lower than that found in controls (Fig 1E).

S cells have thus recovered the ability to reduce oxygen and, despite the modest recovery in the amount of complexes I and III, their respiration capacity was even higher than that of control cells grown under the same conditions (Fig 1D). Polarographic measurement performed in digitonized cells showed that in suppressor cells, oxygen consumption dependent on complexes I+III+IV is similar to that in isogenic control cells. But to our surprise, complex II+III+IV-dependent oxygen consumption in S cells, though restored, remained significantly lower than in controls ($p=0.0024$). Finally, complex IV-dependent oxygen consumption in S cells was similar to that of M cells and significantly higher than in controls ($p=0.0063$) (Fig. 1F). We previously described an influence of the level of assembled complex III on complex I stability and function, but complex II activity was believed to be independent of complex III levels (Acin-Perez, Bayona-Bafaluy et al. 2004). To better understand this phenomenon, we measured, by spectrophotometry, the activity of the individual OXPHOS complexes in isolated mitochondria from S cells. We found a significant reduction, compared with controls, in the activities of complexes I, III and IV (CI/CS=46.9% of control, $p<0.0001$;

CIII/CS=37.9% of control, $p=0.020$; CIV/CS=83.0%, $p=0.0271$, see figure S1 for IU activity values), while complex II activity was normal or slightly increased (Fig. 2A). Note that the relative amount of assembled complexes I, II, III and IV (Fig. 1F) correlated with the enzymatic activity of individual complexes (Fig. 2A). This observation appears to contradict the respiration rates measured above: on one hand, maximal complex I amount and activity were less than half of the control, while complex-I-dependent respiration was normal; on the other hand, maximal complex II activity and amount were normal, while complex-II-dependent respiration was significantly lower than in control cells (Fig. 1F and 2A).

To investigate electron flow through complex III we used linked spectrophotometric assays to measure the activities of complexes I+III, II+III or glycerol-3-phosphate dehydrogenase+III (G3PDH+III). Interestingly, we observed a significant increase in the activity linking complexes I and III in S cells ($p=0.0252$) and a reduction in the activities of both succinate- and glycerol-3-P-cytochrome c reductase ($p=0.0003$ and $p=0.0006$, respectively) (Fig. 2A, left pannel). This observation reconciles the discrepancy between the spectrophotometric and polarographic measurements, and strongly suggests that electron transfer to complex III through the CoQ pool is much more efficient from NADH dehydrogenase than from succinate dehydrogenase. In other words, the small amount of complex III was more available to electrons coming from complex I than from other sources. Next we measured the amount of CoQ available for electron transfer in control, mutant and suppressor cells. As expected, since they are rodent cells, the major form of CoQ detected was CoQ₉, being CoQ₁₀ (the human major form) levels much lower. In addition, we found that while mutant cells showed a small but significant reduction CoQ₉, suppressor cells do not show any depletion in CoQ levels that could influence the availability of the carrier (Fig. 2B)

Evidence accumulated in recent years indicates that respiratory complexes associate in superstructures called supercomplexes (Schagger and Pfeiffer 2000). We recently demonstrated that some supercomplexes containing associations of complexes I, III and IV also contain CoQ and cyt *c*, and are able to respire (Acin-Perez, Fernandez-Silva et al. 2008). The formation of supercomplexes is suggested to provide greater efficiency for electron transfer (Schagger and Pfeiffer 2000). We wondered if our present observations might reveal the nature of the formation of these supercomplexes. Our findings indicate that complexes I and III in S cells are assembled into the same supramolecular structure, and whereas a small amount of independent complex I can be detected in S mitochondria, no free complex III dimer is detected in this cell line within the detection limit of this assay (Fig. 2C). This observation suggests a potential explanation for the apparently contradictory results described above: the existence of at least two discrete CoQ pools in the inner mitochondrial membrane. One of these pools would be sequestered with complexes I and III in supercomplexes to facilitate the transfer of electrons from complex I to complex III, with the other free in the inner membrane, allowing the transfer of electrons from complex II and other FAD dependent enzymes to complex III.

If this hypothesis is correct, and the complex II vs. complex I competition phenomenon is also happening with normal levels of complex III, specific depletion of complex I in cells, maintaining normal complex III levels would result in an increase of complex II plus III activity. To evaluate this prediction we took advantage of another cell line isolated in our laboratory that harboured an insertion of a C in a stretch of 6Cs at positions 13887 to 13892 within the *mt-Nd6* coding sequence, in heteroplasmic form (Acin-Perez, Bayona-Bafaluy et al. 2003). This is a frameshift mutation (13887iC) that creates a stop codon 51-53 base pairs downstream of the C stretch, resulting in a 79 amino acid truncated polypeptide, instead of the 172 amino acids of the full ND6 protein.

In particular we used a clone with an stable 60% of mutation that leads to a partial depletion of complex I (Acin-Perez, Bayona-Bafaluy et al. 2003). Complex I activity was reduced while complex III and complex II showed normal or slightly increased activity (Fig. 2D). On the contrary, complex I+III combined activity was still normal while, as predicted, complex II+III was significantly increased (Fig. 2D). In view of these results we hypothesized that specific depletion of complex I in the suppressor cell line should release complex III to reactivate the transfer of electrons from complex II. To test this possibility, we had to grow the cells in permissive (glucose-containing) medium, in which oxidative phosphorylation is down regulated in favour of glycolysis. We therefore observed lower overall respiratory activity in the S cells (Fig. 3B). We reduced the relative amount of complex I by siRNA targeting of NDUFS3 protein (Fig. 3A). The reduction in complex I had three linked consequences: 1) reduced activity of complex I+III (Fig. 3B); 2) a parallel increase in complex II+III activity (Fig. 3B); and 3) release of complex III from its physical association with complex I (Fig. 3C). We thus demonstrate that competition also takes place between complexes I and II for the transfer electrons to complex III in cells with abnormally low levels of complex III. This occurs because complex III associates preferentially with complex I in CoQ-containing supercomplexes (I+III or I+III+IV), establishing a preferential flux of electrons from complex I to III. These results demonstrate the existence of a specific CoQ pool for the transfer of electrons from complex I to complex III in mammalian mitochondria (Fig. 3D), and have major implications for our understanding of the function and regulation of the mitochondrial electron transport chain. In particular, they indicate that the regulation of the relative abundance of complexes I and III defines the metabolic potential of mitochondria by determining the use of CoQ.

The suppression mechanism is still elusive. However, we do not believe that this would handicap seriously the interpretation of this study. Nevertheless, to discard any potential doubt, we have performed an additional experiment to clarify it. We have down regulated complex III levels in control cells by interfering core 1 protein expression (Fig 4A) and we have found that this reduction in complex III induces, in agreement with the suppressor phenotype, a specific loss of the III+IV complex (Fig 4B). Also as predicted, a decrease in complex I levels and activity takes place. But more interestingly, a decrease in complex II+III activity, significantly higher than that of complex I+III activity, was observed with a controlled CIII reduction (Fig. 4C). This observation confirms our interpretation of the results obtained in S cells regardless the mechanism of suppression.

DISCUSSION

In this report we have provide compelling evidence showing that the physical assembly between complexes I and III determine an exclusive pathway for electrons mediated by a dedicated CoQ subset of molecules that we name CoQ_{NADH}. In this way NADH oxidation and FAD oxidation do not inter-talk at least until the electrons reach cytochrome *c*. In addition, we have shown that complex I affinity for complex III is very high, to the point that this association is preferred despite the possibility that dragging too much complex III could compromise the oxidation of CoQH₂ reduced by FAD dependent enzymes (using CoQ_{FAD}). These observations provide the experimental support to resolve a long lasting controversy on the existence of a single or multiple CoQ pools within inner membrane mitochondria (for review see (Genova and Lenaz 2011)). Some reports studying the reduction of CoQ in isolated mitochondria determined that succinate and NADH can reduce a limited and specific fraction of the total CoQ pool (Jorgensen, Rasmussen et al. 1985; Lass and Sohal 1998). In addition, it was also estimated that a portion of CoQ (15% to 30% of the total) seemed to be bound to proteins (although the

nature of the proteins was not determined) while the rest seemed to be free in the membrane (Lass and Sohal 1999). More recently, Rossignol and co-workers, clearly demonstrated that CoQ content in mitochondrial inner membrane is not homogenous. Thus, when they measured the reduction levels of CoQ and cytochrome *c* in state 3 isolated mitochondria, they found that one fraction of CoQ was utilized during steady-state respiration, another mobilizable, i.e. a reserve that is used in case of a perturbation to maintain the energy fluxes at normal values (e.g. as a consequence of inhibition of the respiratory complexes or in case of mitochondrial diseases), and a third one which is not utilizable and is unable to participate in succinate-dependent respiration. They estimated that the non-utilizable pool by succinate was 79% of the total CoQ in muscle mitochondria and 21% in liver mitochondria. Unfortunately they did not perform similar assays analysing NADH dependent respiration. In any case, these results are incompatible with a single CoQ pool (Benard, Faustin et al. 2008). In a review published recently by Genova and Lenaz they collect, in an impressive tour the force, chemical, biochemical, metabolic, structural and biophysical data from 1955 up to date, to address the function and role of CoQ in mitochondria. With respect to the existence of a single CoQ pool in mitochondria they state that the concept of CoQ pool has been universally accepted to the point that “*has gained place in all biochemistry textbooks*”(sic) despite the existence of experimentally demonstrated deviations from this concept (Genova and Lenaz 2011). More impressive, they, in fact, predicted our results: “*The non-homogeneity of the ubiquinone pool with respect to succinate and NADH oxidation may be interpreted today in terms of compartmentalization of CoQ in the I–III supercomplex in contrast with the free pool used for connecting complexes II and III.*” (Genova and Lenaz 2011). In particular, they indicate that the regulation of the relative abundance of complexes I and

III defines the metabolic potential of mitochondria. In this report we have given fully experimental support to this hypothesis.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell lines and media. Control cell lines were grown in DMEM (GibcoBRL) supplemented with 5% FBS (fetal bovine serum, Gibco BRL), whereas mutant cells (A22) were cultured in the same medium supplemented with uridine (50µg/ml). mA22 cells were obtained by random mutagenesis of A22 cells, using TMP and UV light as previously described (Acin-Perez, Bayona-Bafaluy et al. 2004; Bayona-Bafaluy, Movilla et al. 2008), and selected positively by survival in the absence of uridine. When indicated, control and mA22 cells were grown in DMEM lacking glucose but containing 0.9 mg galactose/ml and 0.11 mg of pyruvate/ml and supplemented with 5% FBS. Cybridization experiments were performed as described (Acin-Perez, Bayona-Bafaluy et al. 2004).

DNA analysis. Total DNA from cell lines was extracted by standard procedures. The complete mtDNA of mA22 cells was sequenced as previously described (Gallardo, Moreno-Loshuertos et al. 2006). Primers were designed using the reference sequence (Bayona-Bafaluy, Acin-Perez et al. 2003). Assembly and identification of variations in the mitochondrial DNA was performed automatically with the Staden package (Staden, Beal et al. 2000).

The presence of the mt-Cytb mutation was confirmed by RFLP analysis as previously described (Acin-Perez, Bayona-Bafaluy et al. 2004).

Nuclear subunit sequencing. All nuclear-encoded subunits of mitochondrial complex III and some mitochondrial chaperones were sequenced using total cellular cDNA as template and specific oligodeoxynucleotides for each gene (Table S1). Total cellular RNA was isolated from 5-6 million mA22 cells using the TRIzol® Reagent (Invitrogen) and 1 µg of this RNA was used as a template to generate cDNA using the 1st Strand

cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) from Roche. All nuclear-encoded complex III subunits and chaperones were amplified by PCR, cloned in the TA Cloning[®] vector (Invitrogen) and automatically sequenced with M13 Fw and M13-Rev primers.

Growth measurements. Growth capacity was determined by plating 5×10^4 cells on 12-well test plates in 2 ml of the appropriate medium as described (Moreno-Loshuertos, Acin-Perez et al. 2006).

Oxygen consumption measurements. O₂ consumption determinations in intact or digitonin-permeabilized cells were carried out in an oxytherm Clark-type electrode (Hansatech) as previously described (Hofhaus, Shakeley et al. 1996) with small modifications (Acin-Perez, Bayona-Bafaluy et al. 2003).

Enzyme activity measurements. Mitochondria were isolated as described previously (Fernandez-Vizarra, Lopez-Perez et al. 2002) and the different enzymatic activities were assessed by spectrophotometry. Activities of citrate synthase and complexes I, II, III, I+III, II+III and IV were measured in isolated mitochondria as described before (Acin-Perez, Bayona-Bafaluy et al. 2004).

CoQ determination. Cell samples were lysed with 1% SDS and vortexed for 1 min. A mixture of ethanol:isopropanol (95:5) was added and the samples were vortexed for 1 min. To recover CoQ, 5ml of hexane was added and the samples were centrifuged at 1000xg for 5 min at 4°C. The upper phases from two extractions were recovered and dried using a rotary evaporator. Lipid extracts were suspended in 1ml of ethanol, dried in a speed-vac and stored at -20°C. Samples were suspended in the suitable volume of ethanol prior to HPLC injection. Lipid components were separated by a Beckmann 166–126 HPLC system equipped with a 15-cm Kromasil C-18 column in a column oven set to 40°C, with a flow rate of 1ml/min and a mobile phase containing 65:35 methanol/n-propanol and 1.42 mM lithium perchlorate. CoQ₆ was used as internal standard for the

quantitative determination of CoQ₉ and CoQ₁₀. CoQ levels were analyzed with ultraviolet (System Gold 168) and electrochemical (Coulchem III ESA) detectors. CoQ content was determined as pmol/mg protein (Santos-Ocana, Do et al. 2002; Brea-Calvo, Rodriguez-Hernandez et al. 2006).

Protein quantification by western blot. Western blot of total cell protein lysates was used to estimate the steady-state levels of mitochondrial complexes subunits. Samples were run through a 12.5% acrylamide/bisacrylamide SDS-PAGE and electroblotted onto PVDF filters. The blots were probed with specific antibodies for NDUFB9 (Complex I), Core2 (Complex III), COI (Complex IV) and SDHA (Complex II), all from Molecular probes. Actin was detected with a monoclonal antibody from SIGMA.

Mitochondrial complexes assembly analysis. The detection of the assembled respiratory complexes and supercomplexes in control and mutant cell lines was performed by BNGE according to Schagger et al. (Schagger 1996; Schagger and Pfeiffer 2000). After mitochondria isolation, membranes were solubilized using DDM or digitonin as detergents in order to isolate individual complexes or supercomplexes. For western analysis, the gels were electroblotted onto PVDF membranes and sequentially probed with specific antibodies as described above.

NDUFS3 mRNA interference. Expression of *NDUFS3* in mA22 cells was knocked down using the “Expression Arrest™ GIPZ lentiviral shRNAmir library” developed by Thermo Scientific Open Biosystems. Optimal multiplicity of Infection (MOI) was calculated according to the manufacturer’s protocol. 50,000 mA22 cells per well were plated in a 24-well plate the day before transduction. The next day, medium was replaced (250 µl DMEM without FBS or antibiotics plus 8 µg/ml polybrene) and virus added at the desired MOI. After 4-6 h, an additional 1 ml of full medium was added and cells were incubated for 48 h. Cells were then examined under a fluorescence microscope every 24 h

for reporter expression, and once expression reached an acceptable level, the reduction in NDUFS3 protein content was tested by western blot.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Santiago Morales for technical assistance and Simon Bartlett for English editing. This study was supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2009-08007 & CSD2007-00020), the Instituto de Salud Carlos III-FIS (PS09/00946), and the Diputación General de Aragón (Grupo de Excelencia B55, PIPAMER O905). EL-B is the recipient of an FPU fellowship from the MICINN and CC of a “Sara-Borrell” fellowship from the ISCIII. The CNIC is supported by the Instituto de Salud Carlos III-MICINN and the Pro-CNIC Foundation. All authors declare that they have no competing interest. RM-L, EL-B, CC, MAR-H, PN & PF-S performed experimental work. RM-L, AP-M, PF-S and JAE designed the research. JAE directed the work. RM-L, PF-S and JAE wrote the manuscript.

REFERENCES

- Acin-Perez, R., Bayona-Bafaluy, M.P., Bueno, M., Machicado, C., Fernandez-Silva, P., Perez-Martos, A., Montoya, J., Lopez-Perez, M.J., Sancho, J., and Enriquez, J.A. (2003). An intragenic suppressor in the cytochrome c oxidase I gene of mouse mitochondrial DNA. *Hum Mol Genet* *12*, 329-339.
- Acin-Perez, R., Bayona-Bafaluy, M.P., Fernandez-Silva, P., Moreno-Loshuertos, R., Perez-Martos, A., Bruno, C., Moraes, C.T., and Enriquez, J.A. (2004). Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria. *Mol Cell* *13*, 805-815.
- Acin-Perez, R., Fernandez-Silva, P., Peleato, M.L., Perez-Martos, A., and Enriquez, J.A. (2008). Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell* *32*, 529-539.

- Bayona-Bafaluy, M.P., Acin-Perez, R., Mullikin, J.C., Park, J.S., Moreno-Loshuertos, R., Hu, P., Perez-Martos, A., Fernandez-Silva, P., Bai, Y., and Enriquez, J.A. (2003). Revisiting the mouse mitochondrial DNA sequence. *Nucleic Acids Res* 31, 5349-5355.
- Bayona-Bafaluy, M.P., Movilla, N., Perez-Martos, A., Fernandez-Silva, P., and Enriquez, J.A. (2008). Functional genetic analysis of the mammalian mitochondrial DNA encoded peptides: a mutagenesis approach. *Methods Mol Biol* 457, 379-390.
- Benard, G., Faustin, B., Galinier, A., Rocher, C., Bellance, N., Smolkova, K., Casteilla, L., Rossignol, R., and Letellier, T. (2008). Functional dynamic compartmentalization of respiratory chain intermediate substrates: implications for the control of energy production and mitochondrial diseases. *The international journal of biochemistry & cell biology* 40, 1543-1554.
- Djafarzadeh, R., Kerscher, S., Zwicker, K., Radermacher, M., Lindahl, M., Schagger, H., and Brandt, U. (2000). Biophysical and structural characterization of proton-translocating NADH-dehydrogenase (complex I) from the strictly aerobic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochim Biophys Acta* 1459, 230-238.
- Fernandez-Vizarra, E., Lopez-Perez, M.J., and Enriquez, J.A. (2002). Isolation of biogenetically competent mitochondria from mammalian tissues and cultured cells. *Methods* 26, 292-297.
- Gallardo, M.E., Moreno-Loshuertos, R., Lopez, C., Casqueiro, M., Silva, J., Bonilla, F., Rodriguez de Cordoba, S., and Enriquez, J.A. (2006). m.6267G>A: a recurrent mutation in the human mitochondrial DNA that reduces cytochrome c oxidase activity and is associated with tumors. *Hum Mutat* 27, 575-582.
- Genova, M.L., and Lenaz, G. (2011). New developments on the functions of coenzyme Q in mitochondria. *Biofactors* 37, 330-354.

- Hofhaus, G., Shakeley, R.M., and Attardi, G. (1996). Use of polarography to detect respiration defects in cell cultures. *Methods Enzymol* 264, 476-483.
- Jorgensen, B.M., Rasmussen, H.N., and Rasmussen, U.F. (1985). Ubiquinone reduction pattern in pigeon heart mitochondria. Identification of three distinct ubiquinone pools. *The Biochemical journal* 229, 621-629.
- Lass, A., and Sohal, R.S. (1998). Electron transport-linked ubiquinone-dependent recycling of alpha-tocopherol inhibits autooxidation of mitochondrial membranes. *Archives of biochemistry and biophysics* 352, 229-236.
- Lass, A., and Sohal, R.S. (1999). Comparisons of coenzyme Q bound to mitochondrial membrane proteins among different mammalian species. *Free radical biology & medicine* 27, 220-226.
- Lenaz, G., Fato, R., Formiggini, G., and Genova, M.L. (2007). The role of Coenzyme Q in mitochondrial electron transport. *Mitochondrion* 7 *Suppl*, S8-33.
- Moraes, C.T., Dey, R., and Barrientos, A. (2001). Transmitochondrial technology in animal cells. *Methods Cell Biol* 65, 397-412.
- Moreno-Loshuertos, R., Acin-Perez, R., Fernandez-Silva, P., Movilla, N., Perez-Martos, A., de Cordoba, S.R., Gallardo, M.E., and Enriquez, J.A. (2006). Differences in reactive oxygen species production explain the phenotypes associated with common mouse mitochondrial DNA variants. *Nat Genet* 38, 1261-1268.
- Schagger, H. (1996). Electrophoretic techniques for isolation and quantification of oxidative phosphorylation complexes from human tissues. *Methods Enzymol* 264, 555-566.
- Schagger, H., and Pfeiffer, K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *Embo J* 19, 1777-1783.

Staden, R., Beal, K.F., and Bonfield, J.K. (2000). The Staden package, 1998. *Methods Mol Biol* 132, 115-130.

FIGURE LEGENDS

Figure 1.- Genetic and biochemical characterization of suppressor cells. A) Growth ratios for each cell line in medium containing galactose as the energy source versus medium containing glucose. Mutant cells (M) are unable to grow in galactose-containing medium while isogenic control cells (C) or suppressor cells (S) do grow. B) Chromatogram showing the G15263A transition in the *mt-Cytb* gene of suppressor cells (left) and RFLP analysis of the mutation in homoplasmy (right). C) Scheme of cybridization experiments showing the nuclear origin of the suppressor mutation. D) Endogenous (left) and maximal (right) rates of oxygen consumption in intact cells. Mutant cells do not respire. E) Western blot of the different assembled complexes after Blue Native Gel Electrophoresis (BNGE), probed with monoclonal antibodies specific for complexes I (anti NDUFA9), III (anti Core2), IV (anti COI) and II (anti SDHA, Fp70). F) Oxygen consumption by permeabilized cells in the presence of electron donors for complex I (glutamate + malate), complex III (succinate + G3P) and complex IV (TMPD). Note that mutant cells only consume oxygen when complex IV substrates are added.

Figure 2.- A) Spectroscopic measurement of the activities of isolated mitochondrial complexes (left) and mitochondrial complexes combined with complex III (right) in control and suppressor cell lines. Activities are normalized to citrate synthase activity. B) CoQ content evaluation in C, M and S cells. C) Western blot of the different assembled supercomplexes in digitonin-permeabilized mitochondria after BNGE, probed with monoclonal antibodies specific for complexes I (anti NDUF6), III (anti Core2), IV (anti COI) and II (anti SDHB (I30)). In the mitochondria of S cells, supercomplexes can be

observed containing complex III and lacking dimeric complex III, while other supercomplexes contain either complex IV or complex II. D) Spectroscopic measurement of the specific activities of isolated mitochondrial complexes (left) and mitochondrial complexes combined with complex III (right) in control, suppressor and heteroplasmic ND6 mutant cells lines. Data are means \pm SD. Asterisks indicate significant differences with respect to control cells, tested by ANOVA and post-hoc Fisher PLSD ($p < 0.05$). See supplementary material for detailed statistic analysis.

Figure 3.- Characterization of cells knocked down for complex I (NDUFS3-interfered cells). A) Western blot of NDUFS3 protein after SDS-PAGE. Actin was detected as a loading control. B) Spectroscopic measurement of the activities of isolated complex I and of complex I or II combined with complex III in non-interfered and NDUFS3-interfered suppressor cells. Note that the respiration capacity of suppressor cells in these experiments was lower than in the previous figure because here they were grown in glucose medium. Data are means \pm SD. Asterisks indicate significant differences with respect to control cells, tested by ANOVA and post-hoc Fisher PLSD ($p < 0.05$). See supplementary material for statistics details. C) Characterization of complex III-containing supercomplexes in non-interfered and NDUFS3-interfered suppressor cells. The presence of complex III+IV and dimeric complex III can be observed in interfered clones. The small amounts of these two forms present in suppressor cells disappear when the cells are grown in galactose medium. D) Scheme representing the existence of two ubiquinone pools.

Figure 4.- Characterization of complex III knocked down cells (Core1-interfered cells). A) Western blot of Core 1 protein after SDS-PAGE. Actin was used to normalize. For control purposes, control cells were transduced with an empty vector (mock). Quantification of interference levels was made using Odyssey CLx. B) Characterization

of complex III-containing supercomplexes in non-interfered and Core1-interfered cells. The decrease of complex III+IV and dimeric complex III can be observed when Core1 is knocked down. C) Spectroscopic measurement of the activities of isolated complex I and of complex I or II combined with complex III in non-interfered and Core1-interfered suppressor cells (71.6% of interference). Complex IV activity was measured for control purposes. Data were normalized by CS activity and are represented as means \pm SD. Asterisks indicate significant differences with respect to control cells, tested by ANOVA and post-hoc Fisher PLSD ($p < 0.05$). See supplementary material for statistics details.

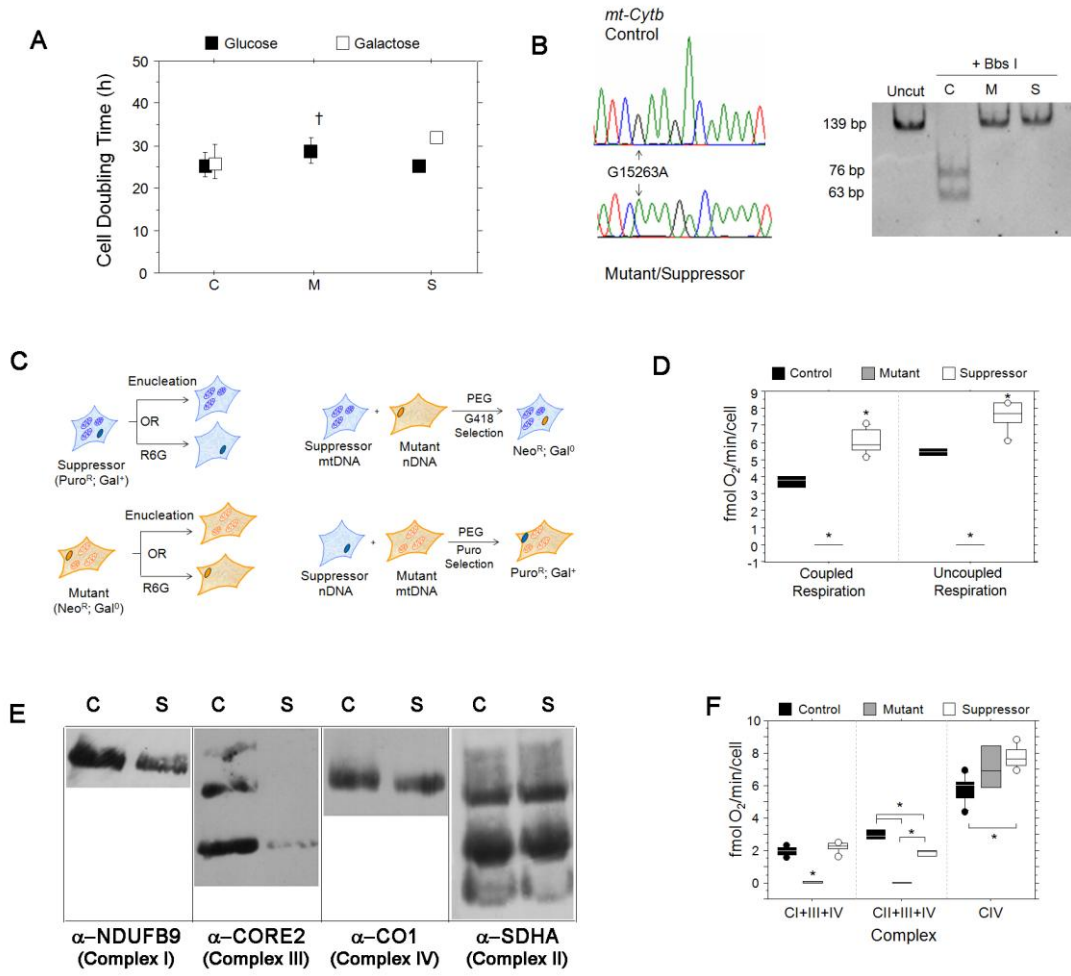


Figure 1

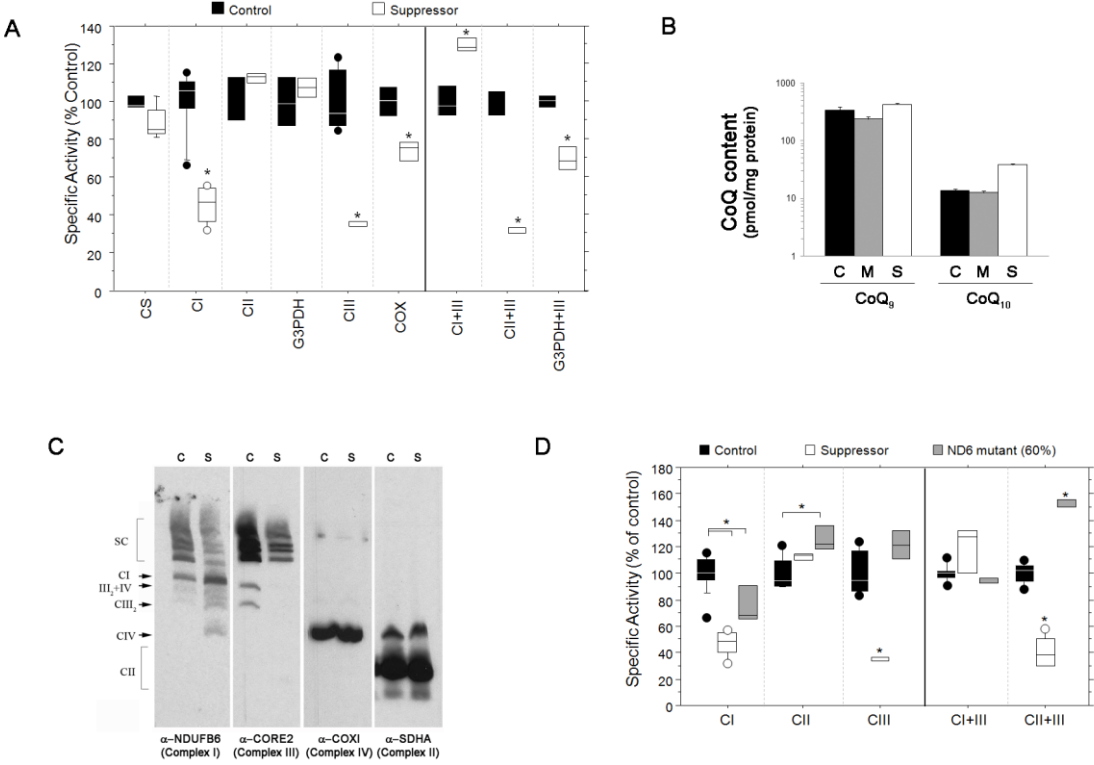


Figure 2

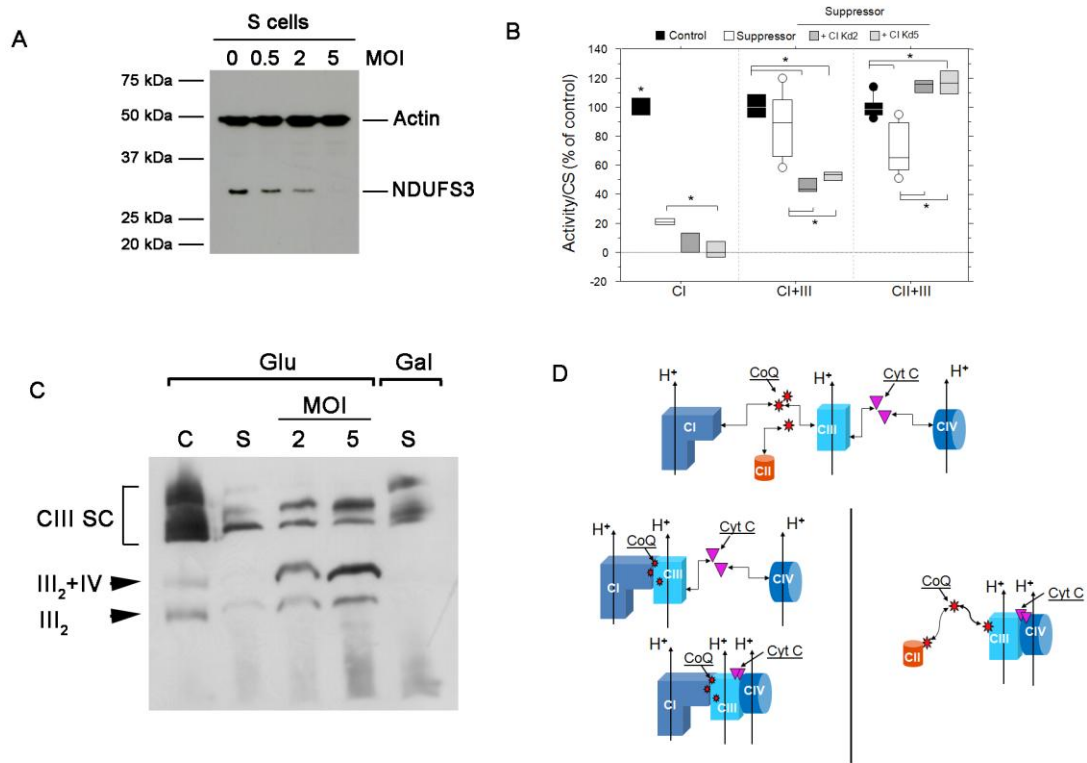


Figure 3

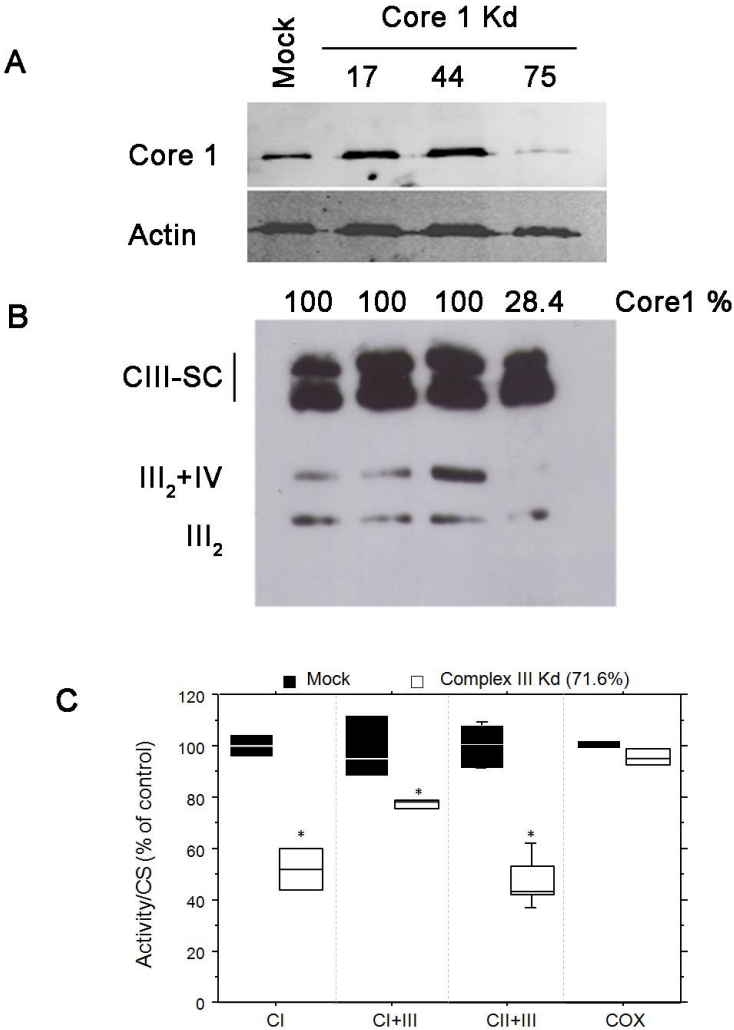


Figure 4

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Statistical analysis. Differences between cell lines were assessed by analysis of variance (ANOVA). Paired differences were assessed by the post hoc Fisher's protected least significant difference test (PLSD). All tests and calculations were done with the statistical package StatView 5.0 for Macintosh (SAS Institute, Inc.).

For figure 1: (A) n=4, 2 and 4 for control, mutant and suppressor respectively; differences between control and suppressor doubling times ratio (DT_{Gal}/DT_{Glu}) are significant according to Fisher's PLSD post-hoc test: p=0.0006. (D) n=4, 3 and 6 for control, mutant and suppressor cells respectively; paired differences between all the cell lines are significant for both endogenous and maximal respiratory rates according to Fisher's PLSD post-hoc test: Endogenous respiration: p=0.0001 between control and suppressor cells and p<0.0001 between mutant and any other cell line. Maximal respiration: p=0.0003 between control and suppressor cells and p<0.0001 between mutant and any other cell line. (F) n=6, 3 and 6 for control, mutant and suppressor cells respectively. Fisher's PLSD post-hoc test of paired differences among cell lines is significant for different substrates: Glutamate+Malate: p<0.0001 between mutant and any other cell line but it is not significant between control and suppressor cells. Succinate+G3P: There are significant differences among all cell lines: p<0.0001 between control and mutant cells, p=0.0024 between control and suppressor cells and p=0.0002 between mutant and suppressor cells. TMPD: p=0.0063 between control and suppressor cells.

For figure 2: (A) Left panel: n \geq 3 in all the measurements; Fisher's PLSD post-hoc test of paired differences between control -C- and suppressor -S- cells is significant for some complexes: Complex I: n=6 and 7 for C and S respectively; p<0.0001. Complex III: n=4 and 3 for C and S respectively; p=0.0020. Complex IV: n=4 for both cell lines; p=0.0271.

Right panel: $n=3$ for both cell lines in all cases but G3PDH+Complex III where $n=4$. Fisher's PLSD post-hoc test of paired differences between control and suppressor cells is significant for all complex III-linked measurements: $p=0.0252$ for complex I+III, $p=0.0004$ for complex II+III and $p=0.0048$ for G3PDH+complex III.

(D) Fisher's PLSD post-hoc test of paired differences between control -C- suppressor -S- and ND6 mutants cells is significant for some complexes: Complex I: $n=14, 9$ and 3 for C, S and ND6-M cells respectively; $p<0.0001$ between C and S, $p=0.0082$ between C and ND6-M and $p=0.0014$ between S and ND6-M. Complex II: $n=6; 3$ and 3 for C, S and ND6-M cells; $p=0.0090$ between mutant and control cells. Complex III: $n=7, 3$ and 2 for C, S and ND6-M cells; $p=0.0001$ between S and the others. Complex I+III: $n=8, 4$ and 3 for C, S and ND6-M; $p>0.05$. Complex II+III: $n=11, 6$ and 3 for M, S and ND6-M and $p<0.0001$ in all the paired tests.

For figure 3: (B) Fisher's PLSD post-hoc test of paired differences among cell lines is significant for all measured activities: Complex I: $n=3$ for all cell lines; $p<0.0001$ between control (C) and any other cell line and $p=0.0218$ between suppressor (S) and Complex I-Kd5 (CI-Kd5) cells. Complex I+III: $n=10, 6, 3$ and 3 for C, S and CI-Kd2 and CI-Kd5 respectively; $p<0.0001$ between C and Complex I Kd cells; $p=0.0006$ between suppressor and CI-Kd2 and $p=0.0022$ between S and CI-Kd5. Complex II+III: $n=9, 6, 3$ and 3 for C, S and Complex I-Kd2 and 5 respectively; $p=0.0447$ between C and CI-Kd5, $p=0.0002$ between C and S and $p<0.0001$ between S and CI-Kd cells.

For figure 4: (C) $n\geq 3$ in all the measurements. Fisher's PLSD post-hoc test of paired differences among cell lines is significant for all but complex IV analysis. Complex I: $p=0.0333$; Complex I+III: $p=0.0298$; and Complex II+III: $p<0.0001$.

Organización modular de la cadena respiratoria y Optogenética mitocondrial

Table 1. Primers Collection used for cDNAs sequencing

Function	Gene	Accession number	Primer name	Primer sequence
Mitochondrial Complex III Subunits	<i>Uqcrc1</i>	NM_025407.2	Uqcrc1-F	GACGGAAGTTAGAAGATGGC
			Uqcrc1-R	CTGTGCAGACTTCCTGCCTA
	<i>Uqcrc2</i>	NM_025899.2	Uqcrc2-F	AGGGCAACTGCTAGAGCCAT
			Uqcrc2-R	GAGCTTTAAATACACGCATGTG
	<i>Cyc1</i>	NM_025567.2	Cyc1-F	GCACTAAAGGGGGCCGACAT
			Cyc1-R	CAAGCAGATACTGAACAGGG
	<i>Uqcrf1</i>	NM_025710.1	RISP-F	TGGTTTGAGCAGCTGTCCG
			RISP-R	TAGGCCCTGAGTCCACGTGT
	<i>Uqcrb</i>	NM_026219.1	VI-F	CGCTTCACTCTCAGGTCAAA
			VI-R	CCCACAGATCTTAACTAAAAG
	<i>Uqcrq</i>	NM_025352.2	Ucrq-F	GGTGTTAGGCCGTGGGAGG
			Ucrq-R	CAAGACTACAGTGTGGATTCC
	<i>Uqcrh</i>	NM_025641.3	VIII-F	ATCCCAAACCGGCTCCCGAC
			VIII-R	TGAGGAGGACGAATCTGCACAT
	<i>Uqcr10</i>	NM_197979.1	X-F	ATGTCGTCGCCGACGATCC
			X-R	TTACTCCTTGTTCTCATACTTG
<i>Uqcr11</i>	NM_025650.2	XI-F	AGTATTGAGACCCTGCAGCG	
		XI-R	TGAGGCCTCGGCACATGGTA	
Mitochondrial Complexes Chaperones	<i>Bcs1l</i>	NM_025784	BCS1-F	CATCTGTGCTGCTTCTTTTCAAG
			BCS1-R	GCAGATCATGGCCTGGTGGGTCA
	<i>Oxa1l</i>	NM_026936	Oxa1-F	TTCCCGGCAAGATGGCGAG
			Oxa1-R	CAGAGTGAGCACAGAACACGTCA

Parte I:
Organización modular de la cadena respiratoria

Manuscrito2
***Integration of mitochondrial complex IV into respiratory
supercomplexes requires Cox7a2l***

Integration of mitochondrial complex IV into respiratory supercomplexes requires Cox7a2l

Esther Lapuente-Brun¹, Erika Fernández-Vizarra², Ester Perales-Clemente³, Pedro M. Quirós⁴, Enrique Calvo³, Raquel Cruz⁵, Angel Carracedo⁵, Carlos López-Otín⁴, Acisclo Pérez-Martos¹, Patricio Fernández-Silva¹ and José Antonio Enríquez^{1,3*}

¹ Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Facultad de Ciencias. Universidad de Zaragoza. Pedro Cerbuna, 12. Zaragoza 50009. Spain

² IIS Aragón. Unidad de Investigación Traslacional I+CS. Hospital Universitario Miguel Servet. Paseo Isabel La Católica, 1-3. Zaragoza 50009. Spain

³ Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III. Melchor Fernández Almagro, 3. 28029 Madrid. Spain

⁴ Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Instituto Universitario de Oncología (IUOPA), Universidad de Oviedo, 33006-Oviedo, Spain

⁵ Grupo de Medicina Xenómica, Facultad de Medicina, CIBERER, Universidad de Santiago de Compostela C/ San Francisco s/n 15782 Santiago de Compostela, A Coruña. Spain

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: jaenriquez@cnic.es

Tel. +34 914531200. Fax: +34 914531240.

Experimental Procedures word count: 1,183

Introduction, Results & Discussion word count: 1,968

Running title: Superassembly of complexes III and IV requires Cox7a2l

Keywords: mouse/ mitochondria/ Respiratory Supercomplexes/Mitochondrial Electron transport chain

Subject Category: Cellular Metabolism; Molecular Biology of Disease

SUMMARY

The organization of respiratory complexes within the inner mitochondrial membrane is an unsolved issue. The random collision model is challenged by a new model in which individual complexes combine to form distinct superstructures called supercomplexes. However, nothing is known about the factors required to assemble supercomplexes. Here we identify Cox7a2l as a protein required for stable interaction between respiratory complexes III and IV, an interaction identified in all eukaryotic cells. Mouse cells harbouring a mutated form of Cox7a2l are unable to build supercomplex III+IV or the respirasome, and expression of wild-type Cox7a2l cDNA in Cox7a2l -deficient cells rescues supercomplex assembly. We also report that mice on the C57Bl/6 genetic background, used to generate most KO and KI mouse models, are unable to build respiratory supercomplexes containing complex IV.

INTRODUCTION

Formation of supercomplexes through the interaction of complexes III and IV has been postulated in all types of eukaryotic cells, from yeast and fungi to plants and animals (Schagger and Pfeiffer 2000; Acin-Perez, Bayona-Bafaluy et al. 2004; Eubel, Heinemeyer et al. 2004; Lenaz and Genova 2010). In all studies to date, the putative occurrence of these supercomplexes has been determined by electrophoretic co-migration and stable purification through density gradients (Schagger and Pfeiffer 2000; Acin-Perez, Bayona-Bafaluy et al. 2004; Eubel, Heinemeyer et al. 2004; Dudkina, Eubel et al. 2005). In addition, 3D maps of respiratory supercomplexes have been generated by single-particle electron microscopy analysis (Dudkina, Eubel et al. 2005; Schafer, Seelert et al. 2006; Schafer, Dencher et al. 2007) or single particle cryoelectron tomography (Dudkina, Kudryashev et al. 2011). Two potential roles have been attributed to the supercomplex organization of the respiratory chain. First, this supraorganization has been proposed to stabilize the respiratory complexes, and there is evidence indicating that complex I is stabilized by interaction with complex III or IV (Acin-Perez, Bayona-Bafaluy et al. 2004; Diaz, Fukui et al. 2006; Vempati, Han et al. 2009). Second, supercomplexes have been suggested to allow substrate channelling in order to increase electron flux, but the evidence for this role is controversial since it conflicts with the predicted pool behaviour of CoQ and cytochrome *c* (Genova, Bianchi et al. 2005; Lenaz and Genova 2007). The lack of functional and genetic evidence has fed continued controversy regarding the *in vivo* significance of supercomplexes, and two models, the classic random collision or fluid model (Hackenbrock, Chazotte et al. 1986) and the solid model (Schagger and Pfeiffer 2000), have been in dispute. We previously demonstrated that the respirasome is functional, being able to transfer electrons from NADH to oxygen (Acin-Perez, Fernandez-Silva et al. 2008). We have also proposed the plasticity model, which can

resolve the apparent contradiction between the fluid and solid models by incorporating them as extreme forms of a variety of structural associations that can be adopted by the respiratory complexes and in which electron flux and proton pumping can be operative (Acin-Perez, Fernandez-Silva et al. 2008). Here we have identified Cox7a2l, for which we propose the new name “supercomplex assembly factor 1” (SCAFI), as a protein required for super-assembly of complexes III and IV, providing the first genetic evidence for the regulation of respiratory supercomplexes assembly. Our data also show that SCAFI is not required for cell survival in culture or *in vivo*, since C57Bl/6 mice lacking functional SCAFI are healthy and fertile.

RESULTS

Cox7a2l is only detected in supercomplexes.- We previously characterized several mouse cell lines harbouring mitochondrial DNA (mtDNA) mutations that render them deficient for a given respiratory complex (Acin-Perez, Bayona-Bafaluy et al. 2004; Moreno-Loshuertos, Acin-Perez et al. 2006; Bayona-Bafaluy, Movilla et al. 2008; Perales-Clemente, Fernandez-Vizarra et al. 2011). In our laboratory, we are conducting a high-throughput proteomic analysis of these cell lines to identify candidates for participation in the formation of respiratory (oxidative phosphorylation: OXPHOS) supercomplexes. Digitonin-treated mitochondrial samples from respiratory-deficient cell lines and mtDNA isogenic controls were separated by blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE). Bands corresponding to supercomplexes were identified in lanes from control cells, and the corresponding positions excised from the lanes from the respiratory-deficient cells, in which supercomplexes do not assemble due to the lack of a particular complex. We also excised the gel areas corresponding to the migration positions of free complexes. The protein components in each band were then analyzed by

liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. We first compared isogenic controls with a cell line with a mutation in *mt-Nd4*, which prevents the assembly of complex I (Fig. 1a and 1b). Comparison of supercomplexes and free complexes identified the presence of Cox7a21 exclusively in supercomplexes of isogenic control cells. Cox7a21 is a protein of unknown function that is very similar in sequence to the structural complex IV subunit Cox7a2 (Fig. 1c and 1d). Cox7a21 was present in the associations between complexes I+III₂+IV_n (respirasome) and III₂+IV, but was not detected at the migration positions of free complex III₂ or complex IV (Fig. 1a). This was the case despite the fact that most complex IV migrates in the free form on BN-PAGE, confirmed by the fact that other structural complex IV proteins such as Cox7a2 and Cox6a1 were detectable only in the free complex IV band (Fig. 1a).

Lack of Cox7a21 abolishes the formation of supercomplexes containing complex IV.- While studying the assembly of respiratory complexes in immortalized mouse fibroblast lines derived from different littermate animals (mixed C57BL/6 and 129Sv nuclear background), we observed two patterns for the incorporation of complex III into supercomplexes (SC), despite the fact that all the cell lines express all individual respiratory complexes (Fig. 2a). The expected pattern (hereafter SC+ cells) included, from lower to higher molecular weight, free complex III dimer, complex III co-migrating with complex IV (III₂+IV), complex III co-migrating with complex I (I+III₂), the respirasome (I+III₂+IV_n) and complex III again co-migrating with complex I (likely I₂+III₂). However, three cell lines (hereafter SC- cells) showed an unexpected pattern, lacking all putative co-migrations involving interaction between complexes III and IV (III₂+IV and the respirasome) (Fig. 2a). This was confirmed by 2D BN-PAGE plus SDS-PAGE electrophoresis followed by immunodetection of respiratory complexes (Fig. 2b). To identify the genomic region responsible for the heterogeneous SC phenotype, we

performed genome-wide analyses with the Affymetrix® Mouse Diversity Genotyping Array, which can interrogate more than 623,000 single nucleotide polymorphisms (SNPs). DNA samples from three SC⁺ cell lines and the three SC⁻ cell lines were compared. Most SNPs differentiating SC⁺ and SC⁻ cells were located in chromosome 17 (274 discriminant SNPs), and very few discriminant SNPs were detected in other chromosomes (mean: 4.7, range 0-17). Mapping of chromosome 17 discriminant SNPs revealed a well-defined grouping (Fig. 2c). Most discriminant SNPs concentrated in two neighbouring groups located between positions 81296164 and 86203330. Detailed examination of this zone revealed a near complete absence of non-discriminant SNPs (coded as -1 in the figure). For all discriminant SNPs, SC⁻ cell lines were homozygous and SC⁺ cells were opposed allele carriers (most of them heterozygous). Among the small number of genes located in this region, we identified Cox7a2l (Fig. 2c, lower panel). Sequencing of the coding region of the Cox7a2l gene revealed that the three SC⁻ cell lines were homozygous for a Cox7a2l version 6 bp shorter than the one found in heterozygosis in the three SC⁺ cell lines (Fig. 3a). The short and long forms of the gene respectively encode proteins of 111 and 113 amino acids.

Western blot analysis of the fibroblast lines with a polyclonal antibody against Cox7a2l detected two protein bands. The larger band was detected in all preparations and showed a molecular mass much higher than that expected for Cox7a2l, indicating that it was non-specific. The second immunoreactive band, corresponding to the expected size of Cox7a2l, was detected only in SC⁺ cell lines (Fig. 3b). Immunoprecipitation of *in vitro*-synthesized haemagglutinin epitope (HA)-tagged Cox7a2l proteins followed by western blot confirmed that the anti-Cox7a2l antibody detects both isoforms (Fig. 3b). We therefore conclude that the 111 amino-acid isoform is unstable and degraded in cells.

We next investigated the evolutionary conservation of Cox7a2l (Fig. 3c). Surprisingly, we found that the reference sequence for the mouse Cox7a2l gene (corresponding to the C57Bl/6 genetic background) is that encoding the unstable, 111 amino-acid isoform (Fig. 2c), which does not support interaction between complexes III and IV. The Cox7a2l proteins of all vertebrates studied contain a conserved triplet in the region that differs between the 111 and 113 amino acid-long mouse proteins (Fig. 3c). The N- and C-terminal amino acids of this triplet vary (VPI, VPV, LPV or IPV), but the central residue is always proline. Since proline residues often confer a specific secondary structure, it is likely that the absence of this motif in the 111 amino-acid isoform results in a misfolded, non-functional protein that is then degraded. Notice that in our proteomic study we could detect unambiguously the 113 isoform (Fig. 1d).

Since the analysed cell lines were derived from animals on a mixed genetic background (129sv:C57BL/6), we examined the SC phenotype in tissues derived from these strain-mixed mice. The heterogeneity in SC phenotype shown in the cell lines was also apparent in littermate source animals, with mitochondria isolated from liver and heart showing either normal formation of supercomplexes or no association between complexes III and IV (Fig. 3e). Moreover, mitochondria isolated from the inbred strain C57BL/6 exclusively showed the SC- phenotype, whereas mitochondria from the inbred NZB/BINJ strain are SC+ (Fig. 3e). Consistent with the findings in the cell lines, the SC+ animals exclusively expressed the long form of the Cox7a2l protein, while SC- animals, including the purebred C57Bl/6 mice, expressed the short form (Fig. 3D).

Re-expression of wild type Cox7a2l restores the incorporation of complex IV in supercomplexes.- There is thus an exact correlation in cells and animals between the absence of the 113 amino acid Cox7a2l protein and the lack of interaction between complexes III and IV. To test whether this correlation signifies a causal relationship, we

cloned and overexpressed the long and short Cox7a2l proteins in SC- cells (Fig. 4). Overexpression of the short form (111 amino acids) had no effect on the phenotype of SC- cells, whereas the long isoform (113 amino acids) restored the assembly of supercomplexes containing III₂+IV and I+III₂+IV₁₋₄ (Fig. 4a and 4b).

Collectively, these results demonstrate that the functional form of Cox7a2l is required for the assembly of complexes III and IV into supercomplexes in the mammalian respiratory chain. To our knowledge, these observations provide the first genetic evidence for the existence of respiratory supercomplexes in mammalian mitochondria and indicate that mitochondrial supercomplexes are physiologically regulated entities.

DISCUSSION

The debate on the organization of the mitochondrial electron transport chain (mtETC) between the fluid model, with individual ETC complexes connected by single pools of “mobile carriers” CoQ and cythochrome *c* (Fig. 5a), and the solid model, where the respiratory complexes are assembled in superstructures called respirasomes, was maintained because the absence of genetic evidences of the existence of supercomplexes *in vivo*. We recently propose that the two opposed views may be reconciled in an unified model, that we called *Plasticity model* (Acin-Perez, Bayona-Bafaluy et al. 2004). Thus, we proposed that a variety of superstructures could co-exist (Fig. 5b): complex I associations (the respirasome (CI+III+IV) and CI+III) containing a dedicated CoQ pool (author’s manuscript submitted) coexisting with complex III+IV associations and free complexes II, III and IV. Then complex I would be virtually always in association with other complexes while complex IV super-assembly would be under tide regulation. Intrinsic to this model would be that any arrangement of complex IV, from 100% free to 100% interacting with other complexes would be functional (Fig 5c).

The discovery of SCAFI as a modulator of the proportion of CIV-containing and the observation of the *in vivo* viability of the extreme situation where SCAFI is absent and no complex IV-containing supercomplexes can be formed, strongly validate the *Plasticity model*. Moreover, the demonstration of a dedicated CoQ pool for the transfer of electrons between complexes I and III complete the picture of the functional consequences of the Plasticity model (Fig 5c)

The mechanism that we describe here reformulates the picture of the function, regulation and homeostasis of bioenergetics metabolism in eukaryotic cells. The finding that the mitochondrial electron transport chain has a variable and complex structural organization adds a new level of regulation to the system that, when fully characterized and understood, will allow a better understanding of its implication in human disease.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture. All cell lines were grown in DMEM (GIBCO-Invitrogen) supplemented with 5% FBS (fetal bovine serum, GIBCO-Invitrogen). Cell culture studies were conducted with immortalized fibroblast cell lines derived from six animals (77-82) on a mixed C57BL/6 and 129Sv nuclear background (129sv/B6). Animal studies were conducted with 129sv/B6 mice and purebred C57BL/6J mice and NZB/B1NJ.

DNA isolation and mutation analysis. For total DNA isolation from cells, cells were digested with proteinase K in TE buffer (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.5) containing 0.5% SDS and ribonuclease A, and DNA was extracted with phenol-chloroform-isoamyl alcohol and precipitated with ethanol. DNA was isolated from liver or heart homogenates with using TRIzol[®] Reagent (Invitrogen). For microdeletion analysis the Cox7a2l genomic region was amplified with the following primers: Fw 5'-3': CTTTCTTGCTTTGCAGAAGGC and Rev: 5'-3': GAAGGCCTCGTTTCAGGTGG.

Amplification products (56 bp and 50 bp-long) were analysed by electrophoresis on a 10% polyacrylamide gel.

Genotyping. Cell lines were genotyped using the Affymetrix Mouse Diversity Genotyping array. Total genomic DNA (500 ng) was processed according to the Affymetrix Genome-Wide Human SNP Nsp/Sty assay protocol. Image files were automatically processed for allele calling and quality control with a modified version of the BRLMM-P algorithm, available through the Affymetrix Power Tools (APT); for details, see <http://www.affymetrix.com>. The Affymetrix Mouse Diversity Genotyping array contains more than 623,000 SNPs, with a mean separation of 4.3 kb. Of these SNPs, 80% (498929) were monomorphic in the sample (all six cell lines showed the same genotype) and another 38457 SNPs were missing. Thus 85738 SNPs showed genetic variability in our sample and were analysed. To try to identify genomic regions which best discriminate between supercomplex competent and non-competent cell lines, each SNP was classified as discriminant or not-discriminant. An SNP was classified as discriminant when it showed a coherent genotype within one group opposite to that shown in the other group (frequent homozygous allele versus rare allele carrier; rare homozygous allele versus frequent allele carrier). This difference was only evaluated for those SNPs genotyped in a minimum of two lines per group, to check the coherence within each phenotypic group. Data were managed and figures generated with IBM SPSS Statistics v18.

Cox7a2l constructs. Total RNA was isolated from SC+ cell line 78 with TRIzol[®] Reagent (Invitrogen). Total cDNA was synthesized using the Transcriptor First Stand cDNA Synthesis Kit (Roche). Cox7a2l cDNA was amplified and cloned into the pCR2.1 plasmid using the TA Cloning kit (Invitrogen) and sequenced. A second construct

was performed with the haemagglutinin epitope added for immunoprecipitation to the C-terminus.

The short and long Cox7a2l variants (Cox7a2l-111 and Cox7a2l-113) were subcloned into the pWPXLd lentiviral vector (Tronolab) for cell transfection, using BamHI and SpeI restriction sites (NEB), and into the pTNTTM vector (Promega) for *in vitro* protein synthesis, using NotI and XhoI restriction sites (NEB).

Lentiviral vector production and cell infection. Human 293T cells (2.5×10^6) were plated 24 h before cotransfection with 10 μ g of transfer vector (pWPXLd COX7A2L-111p or pWPXLd COX7A2L-113p), 7.5 μ g of second-generation packaging plasmid (psPAX2) and 3 μ g of envelope plasmid (pMD2.G). FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche) was used. Infectious particles were collected 24 h after transfection (Naldini, Blomer et al. 1996). Lentiviral particles were used to transduce SC- cell lines.

Protein extraction. Cells were collected from 100 mm-diameter culture plates, washed twice with PBS, pelleted and resuspended in 200 μ l RIPA buffer with protease inhibitors.

In vitro reticulocyte protein expression. Cox7a2l-111 and Cox7a2l-113 cloned into pTNTTM vector (Promega) were *in-vitro* synthesized using the TNT T7/SP6 Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega).

Blue native polyacrylamide electrophoresis. Mitochondria were isolated from mouse liver and heart samples as described (Fernandez-Vizarra, Lopez-Perez et al. 2002). Mitochondria were isolated from cultured cell lines according to Schagger (Schagger 1995), with some modifications (Acin-Perez, Fernandez-Silva et al. 2008). Digitonin-solubilized mitochondrial proteins (100 μ g) were separated on blue native gradient gels (3-13% acrylamide). After electrophoresis, the gels were further processed for Western blotting or a second dimension of SDS-PAGE (Wittig, Braun et al. 2006). For proteomic analysis, the gel was submerged for 2 h in staining solution (0.25% Coomassie Blue R-

250, 40% methanol, 10% acetic acid) at room temperature. After several washes in 40% methanol, 10% acetic acid, the gel was soaked in water overnight and the protein bands of interest were excised.

Immunological techniques. Synthetic proteins were immunoprecipitated using the HA epitope (Anti HA Immunoprecipitation Kit, SIGMA) and run on a 16% SDS-polyacrylamide gel.

Total cell protein extracts (15 µg) were separated by 16% acrylamide/bisacrylamide SDS-PAGE.

After electrophoresis, SDS-PAGE, BN-PAGE or BN-SDS-PAGE gels were electroblotted onto Hybond-P PVDF membranes (GE Lifesciences). Antibodies used were anti-cox7a2l (polyclonal, Protein Tech Group), or specific antibodies against complex I (anti-NDUFA9, MitoSciences), complex II (anti-70 kDa subunit, SDHA, Invitrogen), complex III (anti-Core2, MitoSciences) and complex IV (anti-COXIV, MitoSciences). Secondary antibodies used were peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit (Invitrogen). Signal was generated using the EZ-ECL Chemiluminiscence Detection Kit for HRP (Biological Industries).

Protein identification by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Gel pieces from blue native gels containing the protein bands of interest were excised. After reduction with DTT (10mM) and alkylation of Cys groups with iodoacetamide (50mM), modified porcine trypsin (Promega) was added at a final mass ratio of 1:50 (trypsin-protein). Digestion proceeded overnight at 37°C, after which samples were vacuum-dried and dissolved in 1% acetic acid.

To identify proteins, the resulting tryptic peptide mixtures were analysed by nano-liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Peptides were injected onto a C-18 reversed phase (RP) nano-column (100 µm I.D. and 15 cm, Mediterranea sea,

Teknokroma) and analysed on a continuous acetonitrile gradient consisting of 0-43% B for 90 min and 50-90% B for 1 min (B=95% acetonitrile, 0.5% acetic acid). Peptides were eluted from the RP nano-column at a flow rate of ~300 nL/min to an emitter nanospray needle for real-time ionization and peptide fragmentation on an LTQ-Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher, San José, CA, USA). An enhanced FT-resolution spectrum (resolution=6000) and the MS/MS spectra of the five most-intense parent ions were analyzed during the chromatographic run (130 min). Dynamic exclusion was set at 0.5 min.

For protein identification, tandem mass spectra were extracted and charge-state deconvoluted with Proteome Discoverer 1.2.0.207 (Thermo Fisher Scientific). All MS/MS samples were analysed by SEQUESTTM (Thermo Fisher Scientific, version 1.0.43.2), MASCOTTM (Matrixscience, version 2.1) and X! Tandem (The GPM, thegpm.org; version 2007.01.01.1). Search engines were set up to search MSIP1_mouse_3.67.fasta (1.0, 56687 entries). All searches were performed assuming complete trypsin digestion. Two mixed cleavages were allowed, and errors of 15 ppm or 0.8 Da were set for full MS and MS/MS spectra searches, respectively. Oxidation in M, phosphorylation in S or T, and deamidation in Q or N were selected as dynamic modifications. All identifications were performed by Decoy database search for FDR analysis. Scaffold (version Scaffold_3_00_03, Proteome Software Inc., Portland, OR) was used to validate MS/MS peptide and protein identifications. Protein probabilities were assigned by the Protein Prophet algorithm. Proteins that contained similar peptides and could not be differentiated based on MS/MS analysis alone were grouped to satisfy the principles of parsimony.

Comparative phylogenetic analysis. Protein sequences from different organisms were collected from NCBI Protein database. Sequences were aligned with the Clustawl 2.1 multiple sequence alignment package.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Simon Bartlett (CNIC) for English editing. This study was supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2 & CSD), the Instituto de Salud Carlos III-FIS, the European Union (FP7-Microenvimet) and the Diputación General de Aragón. EL-B is the recipient of an FPU fellowship from the Spanish Ministerio de Educación. EF-V is recipient of a Miguel Servet grant from the Instituto de Salud Carlos III. Genotyping was conducted at the Spanish National Genotyping Centre (CEGEN-ISCI). C.L-O is an Investigator of the Botin Foundation. The CNIC is supported by the Instituto de Salud Carlos III-MICINN and the Pro-CNIC Foundation. All authors declare that they have no competing interests. EL-B, PF-S and EF-V performed the cell and mouse analysis, E P-C and EC performed the proteomic analysis, RC and AC performed genome wide analysis and statistics, PMQ and CL-O generated the mouse cell lines, AP-M and PF-S, EF-V and JAE designed the experiments. EL-B, CL-O and JAE wrote the manuscript.

REFERENCES

- Acin-Perez, R., Bayona-Bafaluy, M.P., Fernandez-Silva, P., Moreno-Loshuertos, R., Perez-Martos, A., Bruno, C., Moraes, C.T., and Enriquez, J.A. (2004). Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria. *Mol Cell* 13, 805-815.
- Acin-Perez, R., Fernandez-Silva, P., Peleato, M.L., Perez-Martos, A., and Enriquez, J.A. (2008). Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell* 32, 529-539.

- Bayona-Bafaluy, M.P., Movilla, N., Perez-Martos, A., Fernandez-Silva, P., and Enriquez, J.A. (2008). Functional genetic analysis of the mammalian mitochondrial DNA encoded peptides: a mutagenesis approach. *Methods Mol Biol* 457, 379-390.
- Diaz, F., Fukui, H., Garcia, S., and Moraes, C.T. (2006). Cytochrome c oxidase is required for the assembly/stability of respiratory complex I in mouse fibroblasts. *Mol Cell Biol* 26, 4872-4881.
- Dudkina, N.V., Eubel, H., Keegstra, W., Boekema, E.J., and Braun, H.P. (2005). Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 3225-3229.
- Dudkina, N.V., Kudryashev, M., Stahlberg, H., and Boekema, E.J. (2011). Interaction of complexes I, III, and IV within the bovine respirasome by single particle cryoelectron tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 15196-15200.
- Eubel, H., Heinemeyer, J., and Braun, H.P. (2004). Identification and characterization of respirasomes in potato mitochondria. *Plant Physiol* 134, 1450-1459.
- Fernandez-Vizarra, E., Lopez-Perez, M.J., and Enriquez, J.A. (2002). Isolation of biogenetically competent mitochondria from mammalian tissues and cultured cells. *Methods* 26, 292-297.
- Genova, M.L., Bianchi, C., and Lenaz, G. (2005). Supercomplex organization of the mitochondrial respiratory chain and the role of the Coenzyme Q pool: pathophysiological implications. *Biofactors* 25, 5-20.
- Hackenbrock, C.R., Chazotte, B., and Gupte, S.S. (1986). The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J Bioenerg Biomembr* 18, 331-368.

- Lenaz, G., and Genova, M.L. (2007). Kinetics of integrated electron transfer in the mitochondrial respiratory chain: random collisions vs. solid state electron channeling. *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C1221-1239.
- Lenaz, G., and Genova, M.L. (2010). Structure and organization of mitochondrial respiratory complexes: a new understanding of an old subject. *Antioxid Redox Signal* 12, 961-1008.
- Moreno-Loshuertos, R., Acin-Perez, R., Fernandez-Silva, P., Movilla, N., Perez-Martos, A., Rodriguez de Cordoba, S., Gallardo, M.E., and Enriquez, J.A. (2006). Differences in reactive oxygen species production explain the phenotypes associated with common mouse mitochondrial DNA variants. *Nat Genet* 38, 1261-1268.
- Naldini, L., Blomer, U., Gage, F.H., Trono, D., and Verma, I.M. (1996). Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11382-11388.
- Perales-Clemente, E., Fernandez-Vizarra, E., Acin-Perez, R., Movilla, N., Bayona-Bafaluy, M.P., Moreno-Loshuertos, R., Perez-Martos, A., Fernandez-Silva, P., and Enriquez, J.A. (2011). Five entry points of the mitochondrially encoded subunits in mammalian complex I assembly. *Mol Cell Biol* 30, 3038-3047.
- Schafer, E., Dencher, N.A., Vonck, J., and Parcej, D.N. (2007). Three-dimensional structure of the respiratory chain supercomplex I₁III₂IV₁ from bovine heart mitochondria. *Biochemistry* 46, 12579-12585.
- Schafer, E., Seelert, H., Reifschneider, N.H., Krause, F., Dencher, N.A., and Vonck, J. (2006). Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem* 281, 15370-15375.
- Schagger, H. (1995). Native electrophoresis for isolation of mitochondrial oxidative phosphorylation protein complexes. *Methods Enzymol* 260, 190-202.

Schagger, H., and Pfeiffer, K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J* 19, 1777-1783.

Vempati, U.D., Han, X., and Moraes, C.T. (2009). Lack of cytochrome c in mouse fibroblasts disrupts assembly/stability of respiratory complexes I and IV. *J Biol Chem* 284, 4383-4391.

Wittig, I., Braun, H.P., and Schagger, H. (2006). Blue native PAGE. *Nat Protoc* 1, 418-428.

FIGURE LEGENDS

Figure 1.- Cox7a2l is present in respiratory supercomplexes but not in complexes. a) Determination of the protein composition of bands excised from blue native polyacrylamide gels by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. The figure shows OXPHOS proteins from complexes I to IV detected in each excised band (gel bands 1-20) from control cells and a cell line mutant for complex I (Complex I^{KO}). Pink indicates components of complex IV (CIV), dark blue indicates CIII, orange CII, and light blue CI. The numbers of unique peptides detected for each protein in the band are indicated (# means more than 9 peptides). Note that Cox7a2l peptides (marked with red arrows) are found in gel areas showing interaction of complexes III and IV. b) Example blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) analysis of control cells and the ComplexI^{KO} cell line. After Coomassie staining, twenty bands were excised from the control cell lanes and the corresponding migration positions in the mutant lanes. c) Amino-acid sequence of Cox7a2 and MS/MS spectra from the three identified doubly-charged Cox7a2-derived tryptic peptides. Sequences of the three matched tryptic peptides unambiguously detected by LC-MS are shown in capitals and underlined. Dots in the sequence mark trypsin cleavage sites. Numbers indicate the residue position in the protein sequence. d) Amino-acid sequence of the Cox7a2-like protein (Cox7a2l) and MS/MS

spectra from the three doubly-charged Cox7a2l-derived tryptic peptides unambiguously detected by LC-MS. Tryptic peptides are highlighted as in d. The most intense signals on the MS/MS spectra in c and d correspond to the main fragmentation series (b-amino and y-carboxy). Neutral loss of water is labelled 'o'. Accompanying series a2 ions are labelled *. Mox indicates the oxidation of methionine in one MS/MS spectrum. Doubly-charged fragments are marked with superscript 2+.

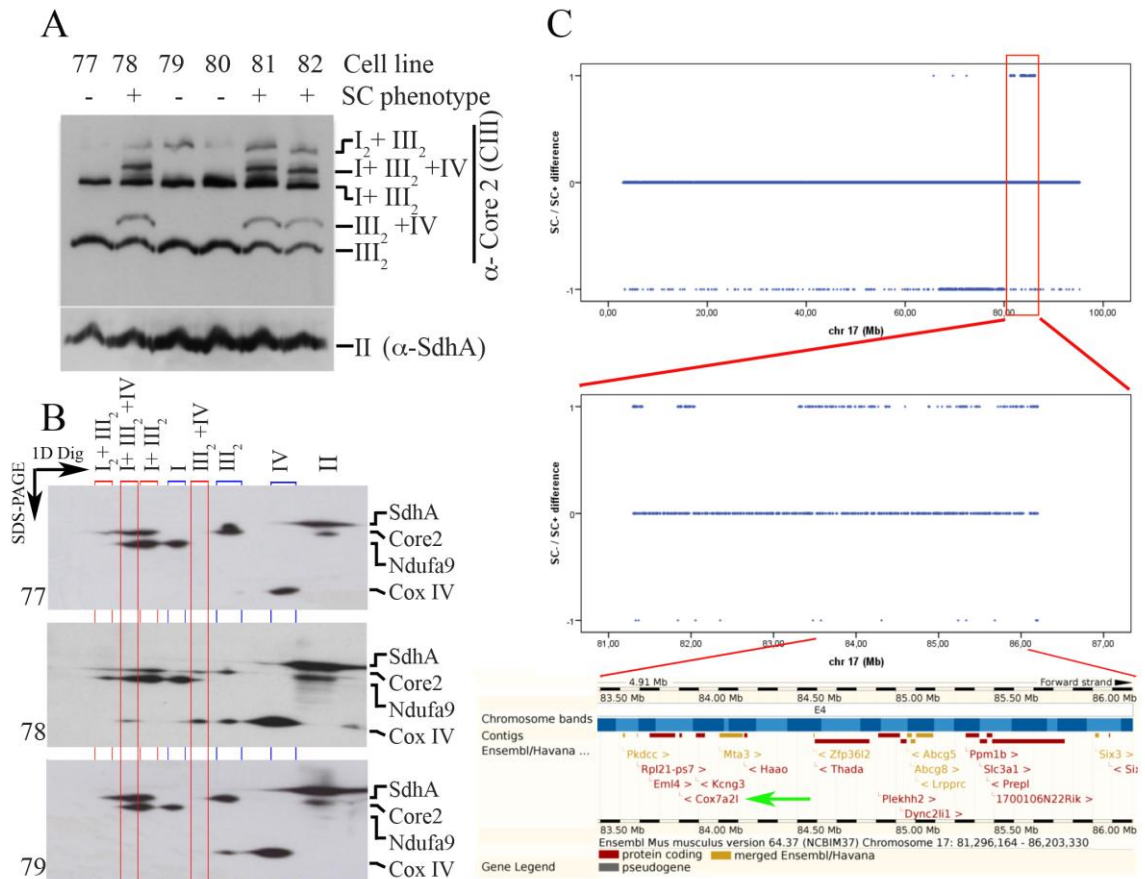
Figure 2.- Supercomplex assembly and genotyping of six mouse fibroblast lines (77-82) from a mixed 129sv:C57BL/6 genetic background. a,b) Western blot after (a) BN-PAGE of digitonin-permeabilized mitochondrial samples or (b) BN-PAGE followed by second dimension denaturing SDS-PAGE. Specific antibodies detected complexes I (Nduaf9), II (SDHA), III (core2) and IV (CoxIV). Red boxes indicate SC assembly, whereas blue squares mark individual complexes. Two phenotypes were identified (supercomplex competent, SC+, and supercomplex non-competent, SC-), with interaction between CIII and CIV lost in SC- cell lines (77, 79, 80). c) SNP differences between the SC- and SC+ genotypes along chromosome 17. Discriminant SNPs (see text) are coded as 1, non-discriminant as -1 and monomorphic SNPs as 0. Selected regions are shown in greater detail. (Image obtained from the Ensembl website, <http://www.ensembl.org/index.html>.)

Figure 3.- Characterization of Cox7a2l in SC+ and SC- cell lines and in animal models. a) Cox7a2l allele analysis reveals two alleles in the mouse fibroblast cell lines, encoding 111 amino acid (Short 111) and 113 amino-acid (Long 113) proteins. SC- cells were homozygous for the Short 111/microdeleted allele, whereas SC+ cells contained both alleles. b) Cox7a2l immunodetection in total protein extracts; the Cox7a2l signal is lost in SC- cells. The lower gel shows immunoreactivity of the anti-Cox7a2l antibody to *in vitro* synthesized HA-tagged Short (S) and Long (L) Cox7a2l proteins. c) Comparative

phylogenetic analysis of Cox7a2l proteins reveals high conservation of a proline residue absent in the C57BL/6 background (Image generated with the Clustawl 2.1 multiple sequence alignment package). d) Cox7a2l allele analysis in C57BL/6 (C57) and NZB/BINJ (NZB) backgrounds. C57 is homozygous for Short 111, whereas NZB is homozygous for the Long 113 allele. e) Western blot analysis of complex III (anti Core2) after BN-PAGE showing complex assembly status in mitochondrial samples from C57 and NZB mice.

Figure 4.- Restoration of the superassembly between complexes III and IV in SC- cell lines by overexpression of 113 amino-acid Cox7a2l. a) Western blot after BN-PAGE, probed with antibody specific for complex III (anti Core2). Supercomplex formation in SC- cells is rescued only when cells are transfected with the 113 amino acid-long version of the Cox7a2l protein (+113p). Results obtained with fibroblasts derived from purebred NZB and C57 mice are shown for reference. b) Western blot, after second dimension separation of proteins on blue native gels by denaturing SDS-PAGE, probed with antibodies specific for complexes I (Nduaf9), II (anti SDHA), III (anti Core2) and IV (CoxIV).

Figure 5.- Electron transport chain (ETC) organization alternatives and role of SCAFI. a) fluid model with individual ETC complexes connected by single pools of the “mobile carriers” CoQ and cytochrome c. b) Plasticity model showing complex I associations, the respirasome (CI+III+IV) and CI+III supercomplex, containing a dedicated CoQ pool and coexisting with complex III+IV associations and free complexes II, III and IV. The role of SCAFI as modulator of CIV-containing supercomplexes and free complex III and complex IV proportions is highlighted. c) Extreme situation reported in this article where SCAFI is absent and no complex IV-containing supercomplexes can be formed.



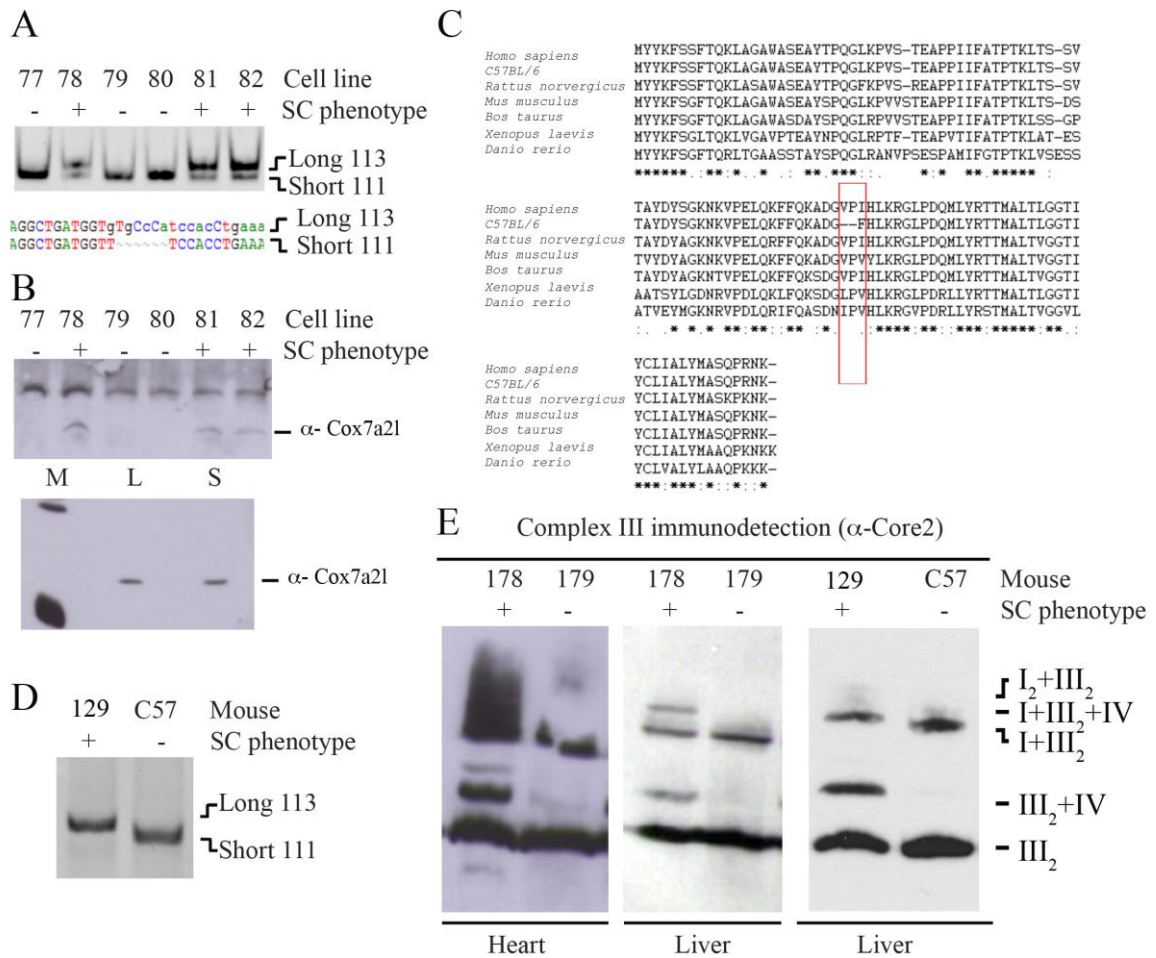


Figure 3

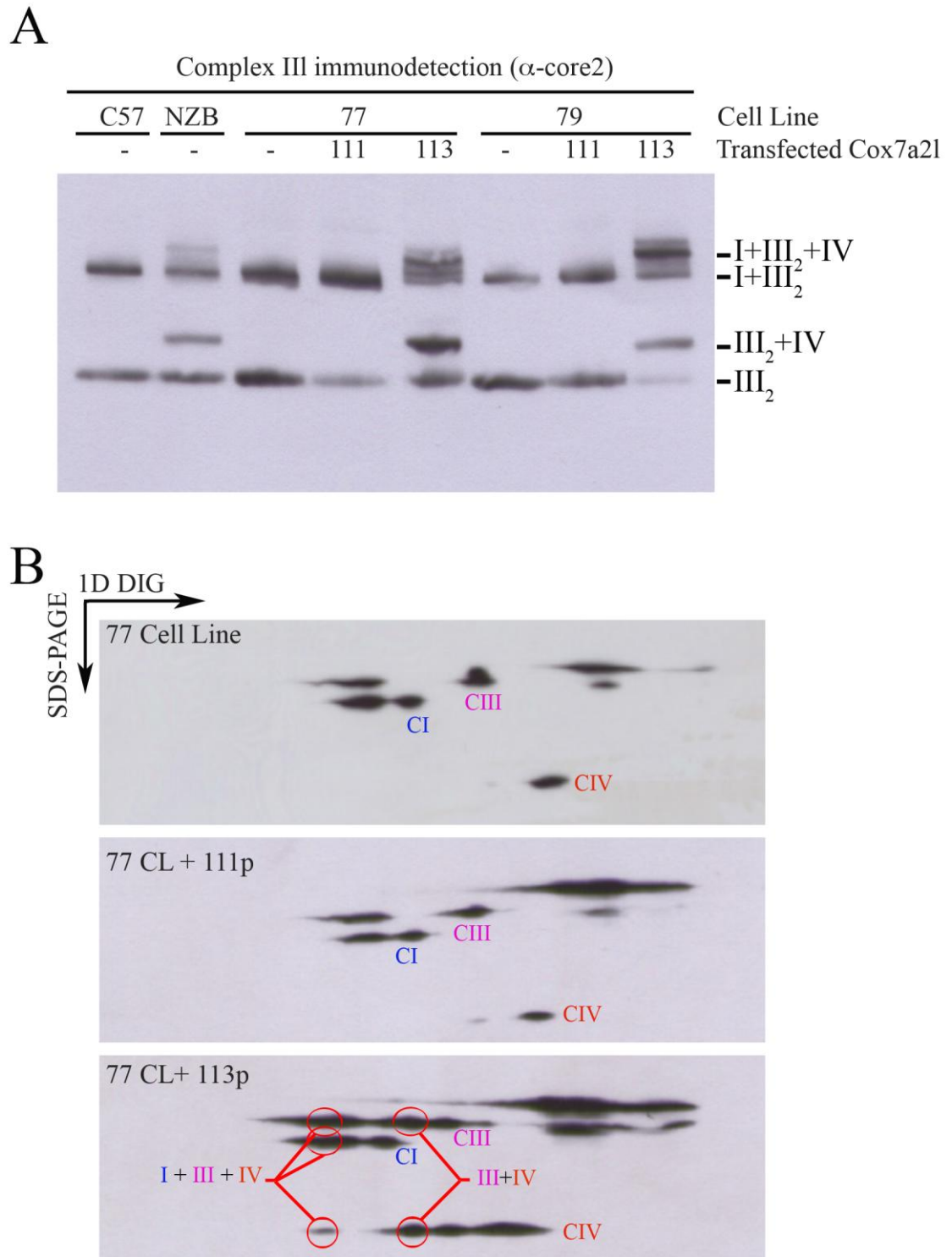


Figure 4

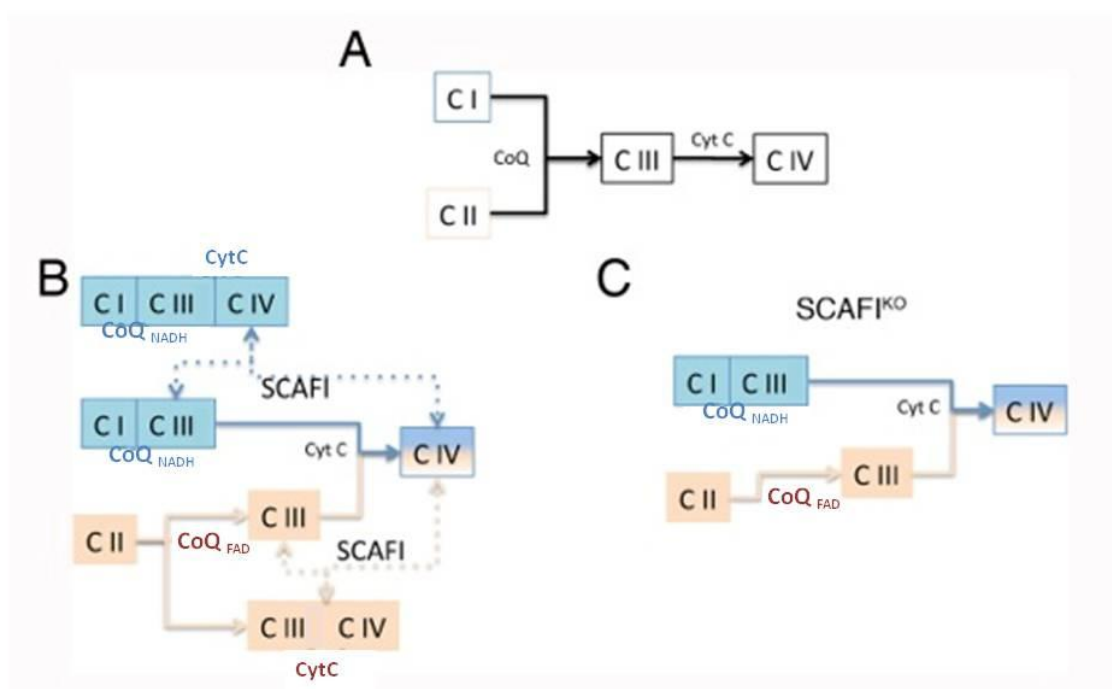


Figura 5

Parte II: Optogenética Mitocondrial

Manuscrito3

Strategies for optogenetical control of membrane potential generation.

Strategies for optogenetical control of membrane potential generation.

Esther Lapuente-Brun¹, Patricio Fernández-Silva¹, Erika Fernández-Vizarra^{2*}, José Antonio Enríquez^{1,3*}

¹ Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Facultad de Ciencias. Universidad de Zaragoza. Pedro Cerbuna, 12. Zaragoza 50009. SPAIN.

² IIS Aragón. Unidad de Investigación Traslacional I+CS. Hospital Universitario Miguel Servet. Paseo Isabel La Católica, 1-3. Zaragoza 50009. Spain

³ Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III. Melchor Fernández Almagro, 3. 28029 Madrid. SPAIN

* Corresponding authors:

E-mail: jaenriquez@cnic.es Tel. +34 914531200. Fax: +34914531240.

E-mail: emfernandezvizarra.iacs@aragon.es Tel: +34 976769565. Fax: +34 976769566

Materials & Methods word count: 785

Introduction, Results & Discussion word count: 3,367

Running title: Optogenetical control of electrochemical gradient generation

Keywords: mouse/ mitochondria/ optogenetics/ ATP synthesis

Subject Category: Cellular Metabolism; Molecular Biology of Disease

ABSTRACT

Mitochondrial diseases or more precisely, Oxidative Phosphorylation (OXPHOS) disorders include a wide group of heterogeneous pathologies that mainly affect energy production where the defects are most commonly found in skeletal and cardiac muscles and in the nervous system. OXPHOS system is the main ATP source in mammalian cells, whose synthesis depends on the correct function and coordination of the system components. Therefore, a defect in one part or process can have very deleterious effects in OXPHOS biogenesis and function.

In this work, we aimed to create a cellular model where ATP synthesis could be performed in absence of the Electron Transport Chain, substituting its proton pumping function by introducing only one protein with this function, as it is the Bacteriorhodopsin. This approach would allow knowing up to what extent the ATP synthesis deficiency is responsible of the observed pathological phenotypes and could be proposed as a gene therapy alternative.

INTRODUCTION

Every single cell needs an energy supply to perform its processes. This energy is provided by the nutrition. In respiring cells, the mitochondrion is the major ATP source through the oxidative phosphorylation system (OXPHOS), located in the organelle inner membrane. In this system, the electron flux generated by the oxidation of nutrients is coupled to the translocation of protons in the electron transport chain (ETC), and the electrochemical gradient generated triggers the phosphorylation of ADP at the level of the ATP synthase or complex V.

The correct function of this system depends on a great number of proteins encoded in two physically separated genomes: the nuclear and the mitochondrial DNA (mtDNA). A large number of mitochondrial diseases that result in metabolic syndromes in which ATP synthesis is affected, have been described. These disorders have different genetic aetiologies being due either to mutations in the mtDNA or in nuclearly encoded mitochondrial proteins. In this sense, to find a therapeutic approach to compensate the low ATP production related to OXPHOS disorders would be of great interest in mitochondrial medicine. By introducing the fungal alternative NADH dehydrogenase ND1I and the alternative oxidase (AOX), our group was able to generate a system in which the electron flow could be restored in OXPHOS deficient mammalian cells (Perales-Clemente, Bayona-Bafaluy et al. 2008). However, these proteins do not have the proton pumping capacity and they do not allow the formation of an electrochemical gradient that could be utilized by Complex V in the synthesis of ATP. Therefore, we aimed to obtain a cellular model where ATP synthesis could be carried out independently of the ETC function. Theoretically, in absence of the electron flux, this could be achieved by expression and import into the mitochondrial inner membrane of a protein able to

pump protons from the matrix into the intermembrane space, so that a functional ATPase could carry out the ATP synthesis process.

Bacteriorhodopsin is the most commonly known protein with the ability to pump protons (Stoeckenius, Lozier et al. 1979). It is a small, 26-kDa integral membrane protein found in extreme halophilic archaeobacteria, and acts as a light-driven proton pump using all-*trans*-retinal as a cofactor (Bayley, Radhakrishnan et al. 1981), which is covalently bound to the amino acid chain to the K216 residue (Lemke and Oesterhelt 1981). Absorption of light by the all-*trans*-retinal chromophore causes isomerisation to 13-*cis*, 15-*anti*, and subsequently, a change in the polypeptide conformation, which leads to the release of a proton to the extracellular side (Lanyi and Luecke 2001). This process takes place in the case of a lowered pO₂ at the organism environment, in order to export protons to the extracellular medium to create a gradient used to perform photosynthesis (Danon and Stoeckenius 1974). This kind of photosynthesis is quite conserved in evolution, and some other rhodopsin related proteins, called proteorhodopsins (Beja, Spudich et al. 2001), are widespread distributed in marine plankton (Morris, Rappe et al. 2002; Venter, Remington et al. 2004). The protein pigments belonging to the proteorhodopsin family have been shown to absorb light at different wavelengths according to the light availability (de la Torre, Christianson et al. 2003; Man, Wang et al. 2003; Sabehi, Massana et al. 2003). This spectral tuning, reflects the adaptation capability of the phototrophic process, and increases the number of protein sequences performing this function.

We propose the use of this kind of proteins to partially substitute a defective ETC function in proton translocation so ATP synthesis is readily performed. As a proof of concept, the bacteriorhodopsin protein was successfully imported into yeast mitochondria being the ATP demand by glycolysis diminished (Hoffmann, Hildebrandt et al. 1994).

Taking this precedent into account, we tried to introduce bacteriorhodopsin into mammalian cell mitochondria to test whether ATP synthesis could be restored in the absence of a functional ETC. In spite of our effort and after following different strategies to import the expressed bacterial protein inside mouse cell mitochondria, we were unable to obtain its efficient translocation inside the organelle. In the present work, we also discuss the remaining tasks and the possibility to achieve the bacteriorhodopsin import inside mitochondrion by the addition of some modification to its native sequence in order to avoid its kidnapping in vesicles.

RESULTS

Mitochondrial targeting sequences of Cox8a and ATPase9 do not allow the import of bacteriorhodopsin-like proteins inside mammalian mitochondria.

The first attempt in order to obtain the translocation of bacteriorhodopsin proteins into the mitochondrial inner membrane was to construct fusion proteins containing mitochondrial targeting signals (MTS) upstream of the bacteriorhodopsin sequence. The nuclear encoded mitochondrial proteins follow different pathways to be imported to their final location inside the organelle (Chacinska, Koehler et al. 2009). Most of them are translated as pre-proteins carrying a MTS at the amino terminus (Jensen and Dunn 2002). In these cases the protein will cross the membrane in an unfolded state, using the TOM and TIM23 pathway (Endo, Yamamoto et al. 2003). MTS is often excised by the mitochondrial processing peptidase (MPP) once the protein reaches the organelle matrix. Finally, depending on its final destination the protein can remain soluble in the matrix or move into the MIM by different possible mechanisms (Glick, Brandt et al. 1992; Chacinska, Lind et al. 2005).

For our proton gradient formation purpose, it is important that the bacteriorhodopsin performs the proton translocation reaction from the matrix to the intermembrane space

(IMS), in order to create the electrochemical gradient in the same direction as the respiratory complexes do. To do that, it is necessary that the bacteriorhodopsin amino terminus faces the IMS, leaving the carboxyl-terminus facing the matrix (Fig 1A). The insertion of bacteriorhodopsin in the opposite direction would make it act as an uncoupling protein, translocating protons from the IMS to the matrix (Fig 1B).

Two different MTS, found in mitochondrial proteins naturally located in the mammalian MIM, were added to the bacteriorhodopsin N-terminus in order to attempt its import into the desired compartment. The added MTS were expected to be excised by the MPP once the fusion protein had reached the organelle matrix. The two chosen MTS corresponded to subunit 9 of ATPase, and subunit VIIIa of complex IV. Both proteins are MIM integral proteins but they are embedded in the MIM in opposite directions: the COX8a amino terminus faces the matrix, whereas ATPase9 amino terminus faces the IMS. As the final topology of the hybrid protein is unknown, both presequences were added to bacteriorhodopsin sequence, in two different constructs, in order to be sure to finally obtain the correct orientation using either one of them. Additionally, the haemagglutinin epitope (HA) was added in the carboxyl extreme of the protein to allow the protein immunodetection.

Therefore, three different constructs were made and cloned into lentiviral vectors for their expression in mammalian cells: C8BOP (Cox8a presequence (1-78 bp) +BOP, bacteriorhodopsin,+HA), M9BOP (ATPase9 presequence(1-207 bp)+ BOP, bacteriorhodopsin+HA) and, as a control, the BOP+HA without MTS. Detection of the protein product was performed in cell lines that were individually transfected with these constructs. The exogenous proteins were thought to be correctly translated and expressed and even a maturation process was observed, as indicated by the different detected bands (Fig 2A). Location of the protein products was subsequently examined by

immunofluorescence. In these experiments, none of the fusion proteins co-localised with the mitochondrial signal obtained with Mitotracker Red staining (Fig 2B). The protein signal was observed as discrete vesicles distributed along the cytoplasm. There were no differences among the different constructs in the observed pattern.

To verify this observation, the transfected cells were sub-fractionated and the HA-tagged protein was immunodetected in the nuclear, mitochondrial and cytosolic fractions. The signal for the exogenous bacteriorhodopsin was detected in all of them. The signal corresponding to mitochondrial markers were detected as expected, however other organelles (as ER, lysosomes, peroxisomes, as well as trafficking vesicles) could have been co-purified with the mitochondria, not examined (Fig 2C).

The addition to the culture medium of different concentrations of the bacteriorhodopsin cofactor all-trans-retinal, did not modify the expressed proteins importability into the mouse cell mitochondria, as the immunofluorescence images were essentially the same as in the cofactor absence (not shown).

The described analyses indicated that the expressed BOP was not being imported into mitochondria following our first strategy. Alternative approaches had to be conceived in order to pursue our goal, as described in the following sections.

Bacteriorhodopsin fragmentation.

Spontaneous reconstitution of bacteriorhodopsin from different fragments has been demonstrated *in vitro* (Huang, Bayley et al. 1981; Liao, Huang et al. 1984). These fragments were shown to refold in a correct way allowing the protein proton pumping function restoration. These previous experiments suggested that the expression of the protein in two separate fragments, each of them carrying its own MTS, might work to overcome the mitochondrial import problems encountered by trying to introduce the whole protein. Thus, two non-overlapping fragments, smaller than the entire protein and

with a lower hydrophobicity index, were designed according to previous studies about the role of the interhelical loops in the folding process, to favour the best possible reconstitution of the entire protein (Gilles-Gonzalez, Engelman et al. 1991; Marti 1998; Allen, Kim et al. 2001). The amino terminal fragment consisted in helixes A to D and was labelled with the V5 epitope, whereas the carboxyl terminal fragment included the E to G helixes, labelled with the HA epitope (Fig 3A).

Thus, four different constructs were made with the addition of the C8 or M9 MTS to each one of the N-terminal and C-terminal fragments. Each construct was first studied separately to test their importability in control cell lines, before their co-transfection with the other half of the protein (Fig 3B). However, none of the expressed peptides were able to reach mitochondria, as was shown by immunofluorescence (Fig 3C).

Bacteriorhodopsin fusion proteins containing the Bcs11 mitochondrial localisation sequences are not inserted into the mitochondrial membrane.

A different strategy used for the correct import of bacteriorhodopsin into the MIM, was to change the sequences that would target the xenoprotein to mitochondria. Therefore, a protein containing the first 89 amino acids of Bcs11, which contains an internal MTS after a transmembrane domain (Stan, Brix et al. 2003; Fernandez-Vizarra, Bugiani et al. 2007), fused to the HA- tagged bacteriorhodopsin was constructed. An analogous approach enabled a mammalian protein, mCYP11A1, to follow the mitochondrial import pathway in yeast (Minenko, Novikova et al. 2008).

The fusion protein cloned into a lentiviral vector was used to transduce control cell lines and immunofluorescence analysis of the subcellular localisation was performed (Fig 4A). This time, two different antibodies were used for the detection of the hybrid protein: the anti-HA epitope whose signal did not co-localise with mitochondria (stained using Mitotraker Red or by immunodetection of the OXPHOS Complex IV protein COI), and

anti- Bcs11. In this case, part of the Bcs11 signal was not located within mitochondria, whereas there was some co-localisation with the specific mitochondrial fluorescence due to the native Bcs11 protein naturally present in the MIM.

Bacteriorhodopsin fusion proteins containing Ant2 transmembrane domains are not inserted into the mitochondrial membrane.

The bacteriorhodopsin structure, with several hydrophobic domains spanning the membrane in which they are located, could be considered similar to that of the substrate carrier proteins naturally found in the mammalian MIM, such as the ADP/ATP translocator Ant2. The metabolic substrate carriers of the inner membrane follow a different import pathway as they are transferred to the TIM22 complex, with the help of the TIM chaperone complex, and are later integrated into the inner membrane (Koehler, Jarosch et al. 1998; Sirrenberg, Endres et al. 1998; Davis, Alder et al. 2007). The signals that allow this integration pathway are not well understood, but internal signals in the polypeptidic sequences, or perhaps the intrinsic topology of the protein, have been thought to participate. To attempt the integration of the bacteriorhodopsin into the inner membrane via the so-called carrier pathway, a fusion protein of the adenine nucleotide translocator, isoform 2 (Ant2), plus bacteriorhodopsin was synthesized. The Ant2 sequence was positioned at the amino terminus region of the fusion protein, followed by the BOP sequence and labeled with HA. Once again, even following this different strategy to use a different import and membrane insertion pathway, the final destination of the protein did not seem to differ from those previously described (Fig 4B).

Import of proteorhodopsin molecules.

Despite its small size, bacteriorhodopsin is a highly hydrophobic protein, being most of its amino acids part of seven transmembrane helix domains. Hydrophobicity has repeatedly been reported as a limiting condition for the import of nuclear encoded

proteins inside the mitochondria. For instance, the high hydrophobicity of the 13 mitochondrial peptides encoded in the mammalian mitochondrial DNA is supposed to be the reason they remained encoded inside the organelle genome, instead of being transferred to the nucleus, as were most of the original endosymbiont genes (Sagan 1967). With the idea that the BOP high hydrophobicity could be the main reason for the inability to get imported inside mitochondria, we checked the hydrophobicity index of other potential proton pumping molecules found in the databases. A total of 238 results for bacteriorhodopsin-like molecules and 7,894 results for proteorhodopsin polypeptide sequences were found in the SwissProt database. Of these, 14 were complete protein sequences and 5 of them were selected as possible candidates for import, because of their lower hydrophobicity: Q4PJD2 (A), A4GIB6 (B), Q2Q0F3 (C), Q2Q0E7 (D), A4GI52 (E), being all of them bacterial proteins. The strategy for their import was, once again, the addition of the C8 and M9 MTS to the amino terminal region of the proteins and the construct lacking MTS was also used as a control. Subcellular localisation of these protein products was analysed by immunofluorescence, but the protein signal did not coincide with mitochondria and was distributed as the previous bacteriorhodopsin constructs, in discrete vesicular-like structures different from mitochondria (Fig.5).

DISCUSSION

The synthesis of the adequate amount of ATP, the energy currency of the cell, to fulfil the organism demands, depends mainly on the correct function of the OXPHOS system. The failure in this energy producing system is responsible for the clinical phenotypes observed in patients suffering from mitochondrial disease. The restoration of ATP synthesis when a defect in the mitochondrial ETC exists would provide a possible therapeutic tool but also a model that could clearly determine to what extent the ATP deficiency is responsible for the pathological phenotype shown in mitochondrial diseases.

Keeping these considerations in mind we aimed to restore the proton translocation process, required for the ATPsynthase function in the absence of the ETC, through the expression of a single protein able to pump protons from the mitochondrial matrix to the MIM. Many proteins have been described to play a role as proton transporters, some of them in a passive way, acting as channels allowing the protons to go through in order to dissipate a gradient (Nagel, Ollig et al. 2002; Nagel, Szellas et al. 2005); or in a vectorial way as the exchanging proteins that shuttle protons together with some other ions, in the same or the opposite direction. Bacteriorhodopsin is the best known protein in nature to perform the light-driven directional proton translocation which depends only on its sequence and topology, using all-*trans*-retinal as a cofactor. Its function is also related to ATP synthesis which is lastly performed by an ATPase located at the external membrane of extreme photosynthetic microorganisms. Proton translocation induced by light absorption, was thought not to be a problem considering the transparency of our model (cultured cell lines) and the wavelength required for the photocycle activation (visible spectrum). However, the molecule used as cofactor by bacteriorhodopsin, all-*trans*-retinal, which is normally synthesised by the archaeobacteria or the proteobacteria, presumably had to be added to the culture medium. Considering the fact that our major problem was the impossibility to import bacteriorhodopsins into mouse cell MIM despite the different strategies used, we did not have the chance to test de influence of the addition of different concentrations of all-*trans*-retinal for the functionality of the protein. However, it has been shown that the addition of this cofactor to mammalian neurons is not required as they become responsive to light upon introduction of the single microbial opsin (Boyden, Zhang et al. 2005), due to the all-*trans* retinal natural content in vertebrate tissues.

The expression of the exogenous protein was not toxic for the cells, and high expression levels were observed. However, the subcellular localisation of the protein was never the desired one.

Despite the addition of different MTS and mitochondrial localisation sequences, we still encountered the difficulty to import the bacteriorhodopsin, attributing it to the fact that it is a highly hydrophobic protein. This is also the case when thinking about therapy using the so-called allotopic expression, i.e. the expression of a naturally mtDNA-encoded protein in the nucleus and its subsequent import, which its feasibility and success has been controversially demonstrated. The main obstacle for this approach is most probably the fact that it is so difficult to achieve the import of these hydrophobic proteins (Perales-Clemente, Fernandez-Silva et al. 2011). We tried to overcome this problem by dividing the protein into two fragments and by searching less hydrophobic proteins with analogous functionality as alternatives to the bacteriorhodopsin. Nevertheless, the objective of their import into mitochondria was not achieved in any case.

The difficulty to attempt the bacteriorhodopsin transport into a different organism was previously demonstrated in *E. coli* (Dunn, Hackett et al. 1987; Karnik, Nassal et al. 1987), where in a first moment the protein was poorly expressed and it even inhibited the host growth, and when finally its insertion into the bacterial membrane was achieved, it was properly folded in a low amount. Indeed, the successful import of BOP in *Schizosaccharomyces pombe*, first into the plasma membrane (Hildebrandt, Ramezani-Rad et al. 1989; Hildebrandt, Fendler et al. 1993) and later into its MIM (Hoffmann, Hildebrandt et al. 1994), seems to be an exceptional case. Furthermore, the difficulty for the correct expression of some kind of photosensible microbial proteins in complex organisms has been demonstrated when trying to extend the use of those photoactivable molecules in optogenetics (Deisseroth 2011), i.e. in neuronal trafficking or functional

studies (Boyden, Zhang et al. 2005). These approaches have demonstrated that the expression of these microorganism molecules in more complex cell lines is not always well tolerated, encountering the problem of impaired subcellular localization as well as intracellular accumulation of the proteins inside the ER (Gradinaru, Thompson et al. 2008; Zhao, Cunha et al. 2008), similarly to what we have faced throughout the development of this project. However, some molecular modifications were shown to ameliorate the problem of aberrant molecular accumulation. For instance, the addition of ER export motifs proved to prevent the formation of halorhodopsin aggregates (Gradinaru, Zhang et al. 2010). If the objective of importing bacteriorhodopsin shall be further pursued, this is a strategy that could be tested to try to solve the actual problem of bacteriorhodopsin import. However, the addition of a determined signal to different opsin molecules may have various results, i.e. Kir2.1 ER export sequence allowed halorhodopsin to improve its localisation at the plasma membrane whereas it did not work for Archaeorhodopsin-3 from *Halorubrum sodomense* (Chow, Han et al. 2010).

Channelrhodopsins and halorhodopsin had been the most developed tools used for optogenetic approaches. However, in 2010 two light-driven proton pumps (Archaeorhodopsin-3 from *Halorubrum sodomense* and bacteriorhodopsin from *Leptosphaeria maculans*) were optimized to be successfully expressed and functionally active in mammalian neurons (Chow, Han et al. 2010).

In the future, in order to express a light-driven proton pump in the MIM, two new different strategies can be tested: the addition of ER export motifs to bacteriorhodopsin, or the construction of new vectors to express mitochondrially-targeted Archaeorhodopsin-3 or the proton pump from *Leptosphaeria maculans*, using any of the strategies developed in this work.

However, these molecules have successfully been expressed and inserted into the plasma membrane, but the mitochondrial import will most probably present additional difficulties due to the nature of the mitochondrial protein import machinery. In addition, the expression, insertion and functionality of the xenoprotein can also present several problems also due to the very different composition of the mitochondrial membranous environment with respect to the one that naturally surrounds bacteriorhodopsin in the microorganism. Bacteriorhodopsin appears as the sole protein within some patches in the bacterial external membrane, called the purple membrane. While the composition of the plasma membrane (50% lipid and 50% proteins) has allowed xenoproteins to become embedded, the mitochondrial inner membrane composition (20% lipid and 80% proteins) where a great number of proteins corresponding to different converging metabolic pathways are present, could limit the correct folding and function of the protein as well as the folding and chromophore regeneration necessary for its functionality (Catucci, Lattanzio et al. 2004).

Even if the proposed strategies for the proton pump import in the mitochondrion are successful, a further effort in optimization of these tools will probably be required before obtaining a functional light-driven proton pump. However, it is worth to make an effort in order to allow the creation of a model where ATP defects could be compensated independently of the ETC function, as it would provide a better understanding of the functional relationships among the different components of the OXPHOS system, and the role of ATP deficiency in the pathological phenotype and course in the mitochondrial diseases.

MATERIAL & METHODS

Cell lines and synthetic genes

All cell lines were grown in High Glucose DMEM (Gibco-Invitrogen) supplemented with 5% FBS (foetal bovine serum, Gibco-Invitrogen).

Mouse codon-usage optimized version of bacteriorhodopsin (BOP, P02945 UniProtKB/Swiss-Prot) from *Halobacterium halobium*, also called *Halobacterium salinarum*, and five proteorhodopsin sequences from uncultured bacteria collected in UniProtKB/Swiss-Prot database, Q4PJD2 (A), A4GIB6 (B), Q2Q0F3 (C), Q2Q0E7 (D), A4GI52(E), were recodified using the program Backtranslation-Tool v2.(Entelechon <http://www.entelechon.com/index.php?id=tools/backtranslation&lang=eng>)

The haemagglutinin epitope (HA tag) (YPYDVDPYA) was added to their C-terminus and 5' flanking restriction sites for PmeI/NdeI and 3' flanking SpeI restriction site were added. All the synthetic genes were ordered to GenScript Corporation, cloned into the pUC57 vector.

Bacteriorhodopsin and proteorhodopsin constructs

These genes were subcloned using PmeI/SpeI sites in the lentiviral vector pWPXLD (Tronolab), in order to obtain a non-mitochondrial targeted version of the protein. Two modified versions of pWPXLD vector, pM9 and pC8, carrying between BamHI and NdeI restriction site the mitochondrial targeting sequences from subunit 9 of ATPase (M F A C A K L A R T P A L I R A G S R V A Y R P I S A S V L S R P E T R T G E G S T V F N G A Q N G V C Q L I R R E F Q T S V I S R D I D), or subunit VIIIa of complex IV, (M S V L T P L L L R S L T G S A R R L M V P R A Q V H) were used for the introduction of the mitochondrial presequence. BOP, proteorhodopsins A, B, C, D and E, and BOP-fragments (A-D, E-G) were subcloned in pC8 and pM9 by using NdeI and SpeI restriction sites and sequenced.

Total RNA was isolated with TRIzol[®] Reagent from control cell lines. Total cDNA was synthesized using the Transcriptor First Stand cDNA Synthesis Kit (Roche). First portion from Bcs11 protein (amino acids 1-89), and Ant2 cDNA were amplified from total cDNA from control cell lines by PCR, adding the PmeI and NdeI restriction sites to the primers, and cloned in the pCR2.1 vector from the TA Cloning Kit (Invitrogen). They were subcloned in the pC8BOP using PmeI/NdeI substituting the C8 MTS, and were sequenced.

Bacteriorhodopsin fragmentation

Bacteriorhodopsin was split into two fragments by PCR amplification. First portion included A to D helixes (BOP 1-160 aa, called A-D fragment), including in the C terminus the V5 epitope (G K P I P N P L L G L D S T) for its immunodetection and the NdeI/SpeI restriction sites by PCR. Final portion of BOP included E to G helixes (BOP 160-262 aa, called E-G fragment) labeled with the HA tag and NdeI/SpeI restriction sites were added by PCR. The PCR products were cloned into de the TA Cloning pCR2.1 vector (Invitrogen). They were later subcloned into the PC8 or PM9 lentiviral vectors using NdeI and SpeI, and sequenced.

Lentiviral vectors production and cell infection

2×10^6 HEK 293T cells were plated 24 hours before co-transfection with 10 μ g of transfer vector, 7.5 μ g of second generation packaging plasmid (psPAX2) and 3 μ g of envelope plasmid (pMD2.G). FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche) was used. Infectious particles were collected 24 h after transfection(Naldini, Blomer et al. 1996). Lentiviral particles were used to transduce control cell lines L929-mtC57BL/6J (TM).

Immunological techniques

For immunofluorescence, cells were incubated with 100 nM mitochondrial dye Mitotracker red (Invitrogen) for 30 min, primary antibody anti-HA (Roche) and secondary antibody Alexa Fluor 488 IgG anti-rat (Invitrogen) were used. When the immunodetection of the V5 tag was carried out, cells were incubated with 200 nM mitochondrial dye Mitotracker green (Invitrogen) for 1 hour, primary antibody anti-V5 (Invitrogen) and secondary antibody Alexa Fluor 594 IgG anti-mouse (Invitrogen) were used. When COI signal was detected (MitoSciences), Alexa Fluor 594 IgG anti-mouse (Invitrogen) was used as secondary antibody. Bcs11 detection was performed using polyclonal antibodies (Proteintech) and Alexa Fluor 488 anti-rabbit IgG (Invitrogen).

Fluorescent images were visualized under a ZEISS HAL100 microscope, captured by the joined camera PHOTOMETRICS CoolSPANfx, and the overlapping images were performed using the *Meta Imaging Series 6.1 (MetaMorph) Software*.

For Western-blot, cell proteins were extracted in RIPA buffer (Pierce). 20 µg of total protein were separated in 12.5% acrylamide/bisacrylamide SDS-PAGE, and electroblotted onto PVDF filter and probed against Anti-HA (Roche), anti-V5 (Invitrogen) and anti-β actin (SIGMA) as primary antibodies, followed by anti-rat, anti-mouse and anti-rabbit secondary antibodies (Invitrogen), respectively.

Subcellular fractionating

Mitochondria were isolated from cultured cell lines according to Schagger (Schagger 1995), with some modifications (Acin-Perez, Fernandez-Silva et al. 2008). 20 µg of total protein were separated in 12.5% acrylamide/bisacrylamide SDS-PAGE, electroblotted onto PVDF filters and probed against Anti-HA (Roche) and anti-TOM20 (Santa Cruz), followed by anti-rat and anti-mouse antibodies (Invitrogen), respectively.

REFERENCES

1. E. Perales-Clemente *et al.*, Restoration of electron transport without proton pumping in mammalian mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 18735 (Dec 2, 2008).
2. W. Stoeckenius, R. H. Lozier, R. A. Bogomolni, Bacteriorhodopsin and the purple membrane of halobacteria. *Biochim Biophys Acta* 505, 215 (Mar 14, 1979).
3. H. Bayley, R. Radhakrishnan, K. S. Huang, H. G. Khorana, Light-driven proton translocation by bacteriorhodopsin reconstituted with the phenyl analog of retinal. *J Biol Chem* 256, 3797 (Apr 25, 1981).
4. H. D. Lemke, D. Oesterhelt, Lysine 216 is a binding site of the retinyl moiety in bacteriorhodopsin. *FEBS Lett* 128, 255 (Jun 15, 1981).
5. J. K. Lanyi, H. Luecke, Bacteriorhodopsin. *Curr Opin Struct Biol* 11, 415 (Aug, 2001).
6. A. Danon, W. Stoeckenius, Photophosphorylation in *Halobacterium halobium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 1234 (Apr, 1974).
7. O. Beja, E. N. Spudich, J. L. Spudich, M. Leclerc, E. F. DeLong, Proteorhodopsin phototrophy in the ocean. *Nature* 411, 786 (Jun 14, 2001).
8. J. C. Venter *et al.*, Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304, 66 (Apr 2, 2004).
9. R. M. Morris *et al.*, SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. *Nature* 420, 806 (Dec 19-26, 2002).
10. D. Man *et al.*, Diversification and spectral tuning in marine proteorhodopsins. *EMBO J* 22, 1725 (Apr 15, 2003).
11. G. Sabehi *et al.*, Novel Proteorhodopsin variants from the Mediterranean and Red Seas. *Environ Microbiol* 5, 842 (Oct, 2003).
12. J. R. de la Torre *et al.*, Proteorhodopsin genes are distributed among divergent marine bacterial taxa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12830 (Oct 28, 2003).
13. A. Hoffmann, V. Hildebrandt, J. Heberle, G. Buldt, Photoactive mitochondria: in vivo transfer of a light-driven proton pump into the inner mitochondrial membrane of *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9367 (Sep 27, 1994).
14. L. Naldini, U. Blomer, F. H. Gage, D. Trono, I. M. Verma, Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11382 (Oct 15, 1996).
15. H. Schagger, Native electrophoresis for isolation of mitochondrial oxidative phosphorylation protein complexes. *Methods Enzymol* 260, 190 (1995).
16. R. Acin-Perez, P. Fernandez-Silva, M. L. Peleato, A. Perez-Martos, J. A. Enriquez, Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell* 32, 529 (Nov 21, 2008).

17. A. Chacinska, C. M. Koehler, D. Milenkovic, T. Lithgow, N. Pfanner, Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* 138, 628 (Aug 21, 2009).
18. R. E. Jensen, C. D. Dunn, Protein import into and across the mitochondrial inner membrane: role of the TIM23 and TIM22 translocators. *Biochim Biophys Acta* 1592, 25 (Sep 2, 2002).
19. T. Endo, H. Yamamoto, M. Esaki, Functional cooperation and separation of translocators in protein import into mitochondria, the double-membrane bounded organelles. *J Cell Sci* 116, 3259 (Aug 15, 2003).
20. B. S. Glick *et al.*, Cytochromes c1 and b2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism. *Cell* 69, 809 (May 29, 1992).
21. A. Chacinska *et al.*, Mitochondrial presequence translocase: switching between TOM tethering and motor recruitment involves Tim21 and Tim17. *Cell* 120, 817 (Mar 25, 2005).
22. K. S. Huang, H. Bayley, M. J. Liao, E. London, H. G. Khorana, Refolding of an integral membrane protein. Denaturation, renaturation, and reconstitution of intact bacteriorhodopsin and two proteolytic fragments. *J Biol Chem* 256, 3802 (Apr 25, 1981).
23. M. J. Liao, K. S. Huang, H. G. Khorana, Regeneration of native bacteriorhodopsin structure from fragments. *J Biol Chem* 259, 4200 (Apr 10, 1984).
24. T. Marti, Refolding of bacteriorhodopsin from expressed polypeptide fragments. *J Biol Chem* 273, 9312 (Apr 10, 1998).
25. M. A. Gilles-Gonzalez, D. M. Engelman, H. G. Khorana, Structure-function studies of bacteriorhodopsin XV. Effects of deletions in loops B-C and E-F on bacteriorhodopsin chromophore and structure. *J Biol Chem* 266, 8545 (May 5, 1991).
26. S. J. Allen, J. M. Kim, H. G. Khorana, H. Lu, P. J. Booth, Structure and function in bacteriorhodopsin: the effect of the interhelical loops on the protein folding kinetics. *J Mol Biol* 308, 423 (Apr 27, 2001).
27. T. Stan *et al.*, Mitochondrial protein import: recognition of internal import signals of BCS1 by the TOM complex. *Mol Cell Biol* 23, 2239 (Apr, 2003).
28. E. Fernandez-Vizarra *et al.*, Impaired complex III assembly associated with BCS1L gene mutations in isolated mitochondrial encephalopathy. *Hum Mol Genet* 16, 1241 (May 15, 2007).
29. A. N. Minenko, L. A. Novikova, V. N. Luzikov, I. E. Kovaleva, Import of hybrid forms of CYP11A1 into yeast mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1780, 1121 (Oct, 2008).
30. A. J. Davis, N. N. Alder, R. E. Jensen, A. E. Johnson, The Tim9p/10p and Tim8p/13p complexes bind to specific sites on Tim23p during mitochondrial protein import. *Mol Biol Cell* 18, 475 (Feb, 2007).
31. C. M. Koehler *et al.*, Import of mitochondrial carriers mediated by essential proteins of the intermembrane space. *Science* 279, 369 (Jan 16, 1998).

32. C. Sirrenberg *et al.*, Carrier protein import into mitochondria mediated by the intermembrane proteins Tim10/Mrs11 and Tim12/Mrs5. *Nature* 391, 912 (Feb 26, 1998).
33. L. Sagan, On the origin of mitosing cells. *J Theor Biol* 14, 255 (Mar, 1967).
34. G. Nagel *et al.*, Channelrhodopsins: directly light-gated cation channels. *Biochem Soc Trans* 33, 863 (Aug, 2005).
35. G. Nagel *et al.*, Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science* 296, 2395 (Jun 28, 2002).
36. E. S. Boyden, F. Zhang, E. Bamberg, G. Nagel, K. Deisseroth, Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci* 8, 1263 (Sep, 2005).
37. E. Perales-Clemente, P. Fernandez-Silva, R. Acin-Perez, A. Perez-Martos, J. A. Enriquez, Allotopic expression of mitochondrial-encoded genes in mammals: achieved goal, undemonstrated mechanism or impossible task? *Nucleic Acids Res* 39, 225 (Jan, 2011).
38. R. J. Dunn *et al.*, Structure-function studies on bacteriorhodopsin. I. Expression of the bacterio-opsin gene in Escherichia coli. *J Biol Chem* 262, 9246 (Jul 5, 1987).
39. S. S. Karnik *et al.*, Structure-function studies on bacteriorhodopsin. II. Improved expression of the bacterio-opsin gene in Escherichia coli. *J Biol Chem* 262, 9255 (Jul 5, 1987).
40. V. Hildebrandt *et al.*, Genetic transfer of the pigment bacteriorhodopsin into the eukaryote Schizosaccharomyces pombe. *FEBS Lett* 243, 137 (Jan 30, 1989).
41. V. Hildebrandt *et al.*, Bacteriorhodopsin expressed in Schizosaccharomyces pombe pumps protons through the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3578 (Apr 15, 1993).
42. K. Deisseroth, Optogenetics. *Nat Methods* 8, 26 (Jan, 2011).
43. V. Gradinaru, K. R. Thompson, K. Deisseroth, eNpHR: a Natronomonas halorhodopsin enhanced for optogenetic applications. *Brain Cell Biol* 36, 129 (Aug, 2008).
44. S. Zhao *et al.*, Improved expression of halorhodopsin for light-induced silencing of neuronal activity. *Brain Cell Biol* 36, 141 (Aug, 2008).
45. V. Gradinaru *et al.*, Molecular and cellular approaches for diversifying and extending optogenetics. *Cell* 141, 154 (Apr 2, 2010).
46. B. Y. Chow *et al.*, High-performance genetically targetable optical neural silencing by light-driven proton pumps. *Nature* 463, 98 (Jan 7, 2010).
47. L. Catucci, V. M. Lattanzio, S. Lobasso, A. Agostiano, A. Corcelli, Role of endogenous lipids in the chromophore regeneration of bacteriorhodopsin. *Bioelectrochemistry* 63, 111 (Jun, 2004).

FIGURE LEGENDS

Figure 1.- Proton traslocation across inner mitochondrial membrane driven by bacteriorhodopsin (BOP). A) BOP with its amino terminus facing the intermembrane space (IMS) promotes proton transfer from the matrix to the IMS, as respiratory complexes do. B) BOP exposing its amino terminus to the matrix pumps protons to the organelle matrix, acting as an uncoupling protein.

Figure 2.- Mitochondrial targeting sequences of Cox8a and ATPase9 do not allow the import of bacteriorhodopsin in the mitochondrial membrane. A) Expression of BOP and BOP sequences targeted to mitochondria using the mitochondrial targeting sequences of Cox8a (C8BOP) and ATPase9 (M9BOP) in control cell lines. B) Subcellular localisation of bacteriorhodopsin constructs, mitochondria staining and images overlapping. C) Subcellular fractionation of M9BOP transduced cell lines and Anti-HA immunodetection. Total homogenate (H), nuclear (N), cytosolic (S2) and mitochondrial fractions (P2). TOM20 immunodetection as mitochondrial marker.

Figure 3.- Fragmentation of bacteriorhodopsin and import strategy. A) Bacteriorhodopsin reconstitution from two separate fragments: A-D helixes containing fragment labelled with V5 epitope, and E-G helixes containing fragment, targeted both of them to mitochondria using Cox8a and ATPase9 MTS. Four different coexpression-strategies (1-4) for BOP reconstitution. B) Western Blot for the immunodetection of the fragments individually expressed in control cell lines. Anti-HA and anti-V5 antibodies were used, and actin expression was checked as a control. C) Subcellular localisation of bacteriorhodopsin fragments, mitochondria staining and overlapping images.

Figure 4.- Bcs11-BOP and Ant2-BOP subcellular localisation. A) Immunodetection of Bcs11-BOP in control cell lines, using HA, and anti-bcs11 antibodies. Mitochondrial detection using mitotraker red staining or anti-CoI. B) Immunodetection of Ant2-BOP in

control cell lines, mitochondria staining and overlapping images. C) Western blot anti HA in cell lines transduced with Bcs11-BOP and Ant2-BOP.

Figure 5.- Proteorhodopsin targeting to mitochondria using Cox8a and ATPase9 mitochondrial targeting signals. Subcellular localisation of Q4PJD2 (A), A4GIB6 (B), Q2Q0F3 (C), Q2Q0E7 (D) and A4GI52(E) proteorhodopsins without and with Cox8a and ATPase9 mitochondrial targeting signals (C8 and M9).

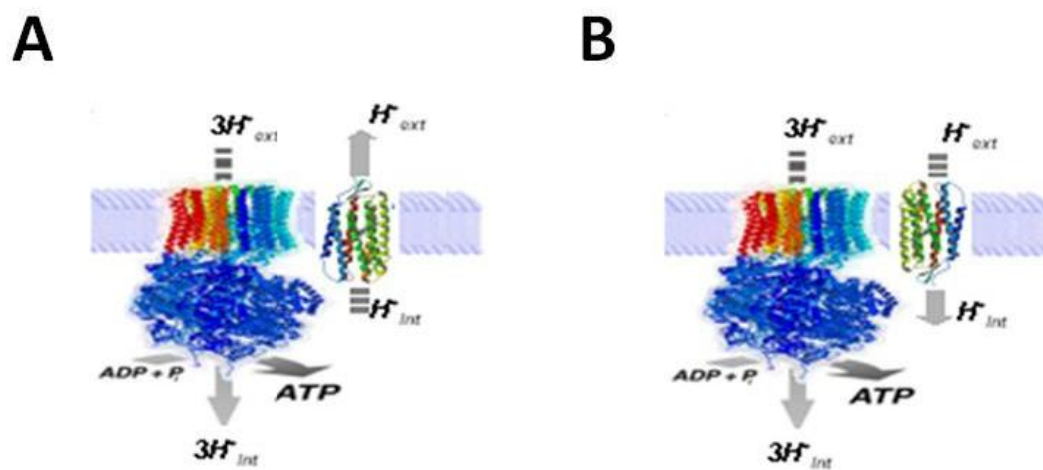
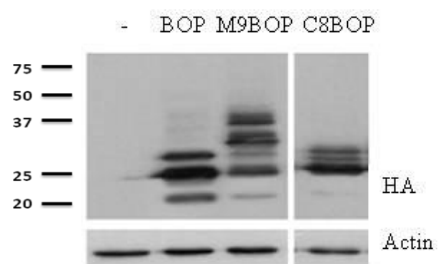
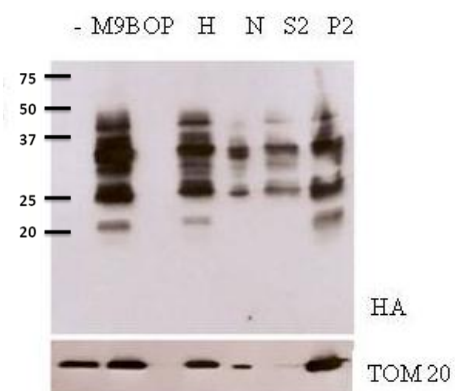


Figura 1

A



C



B

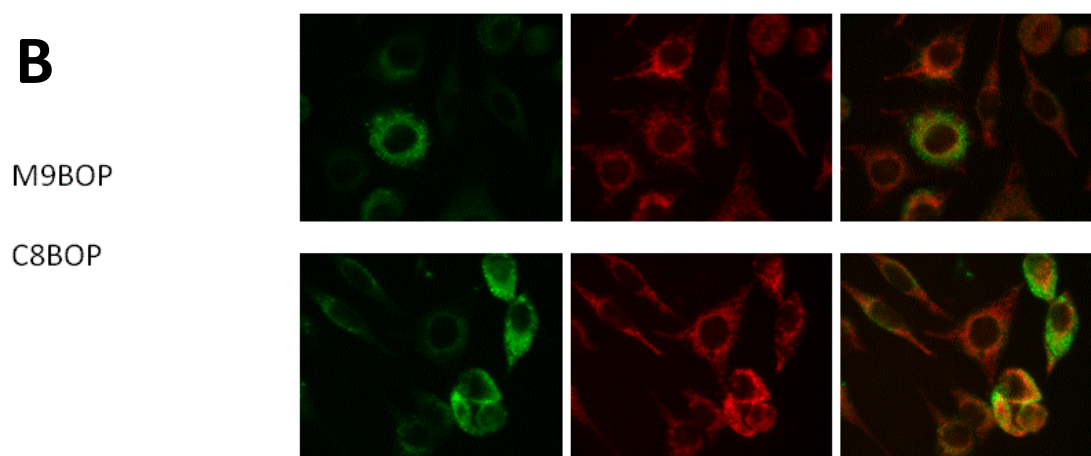


Figura 2

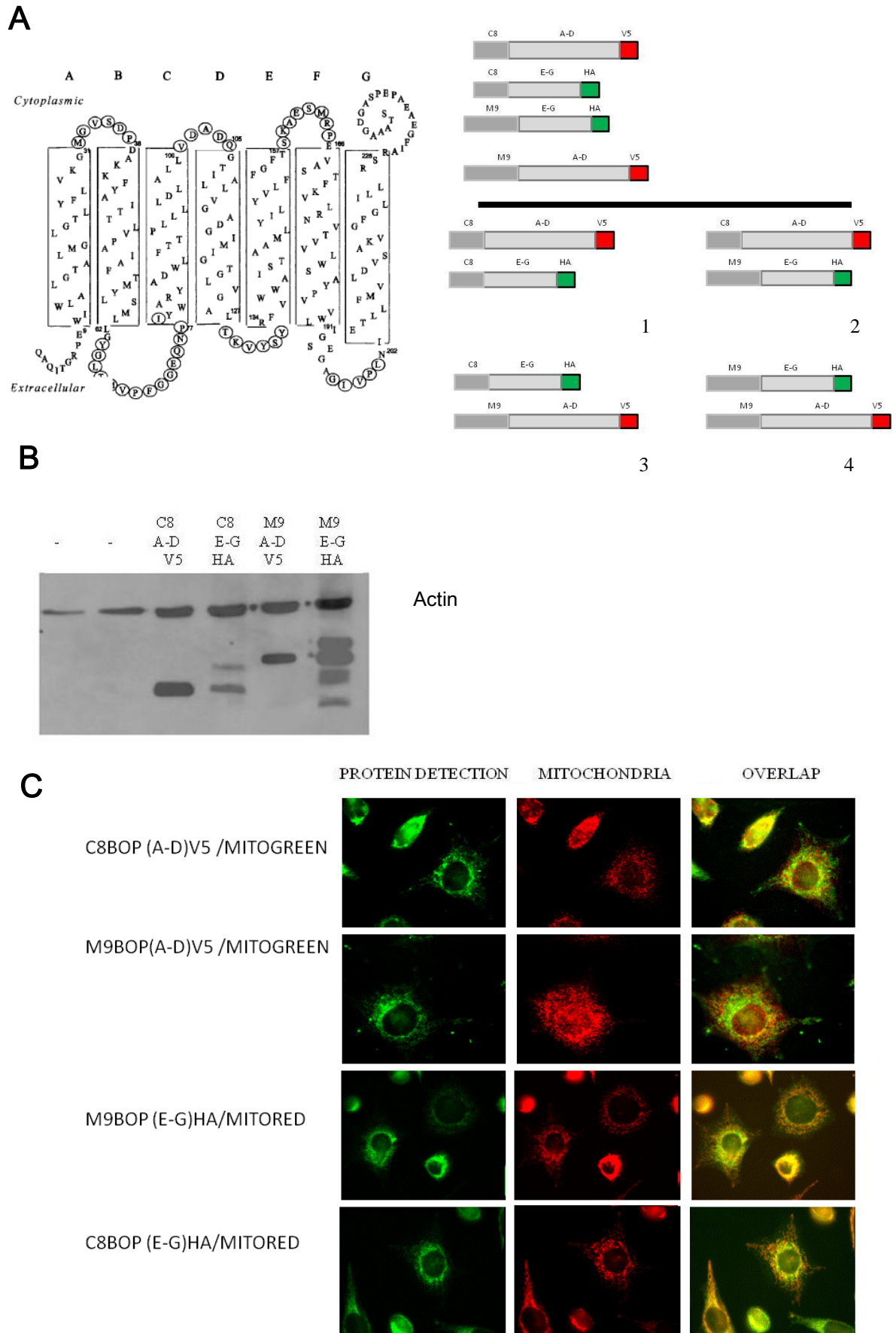
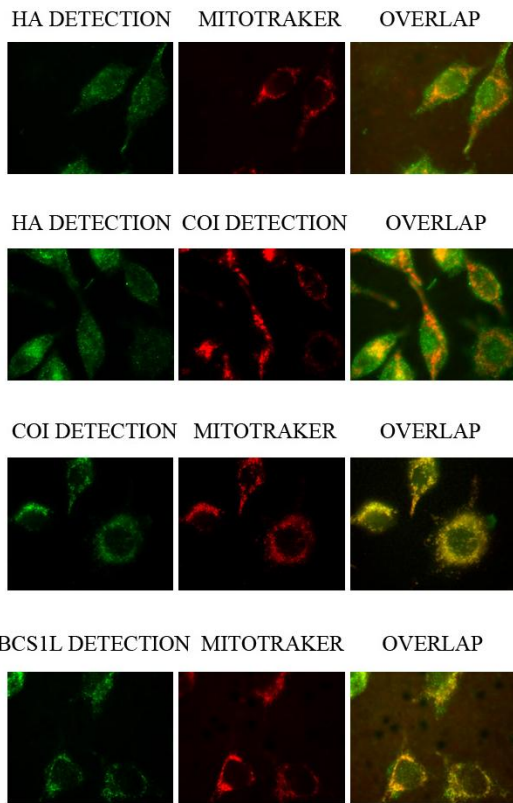
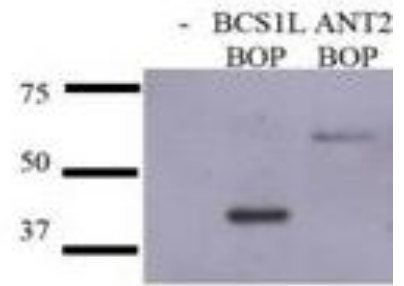


Figura 3

A



C



B

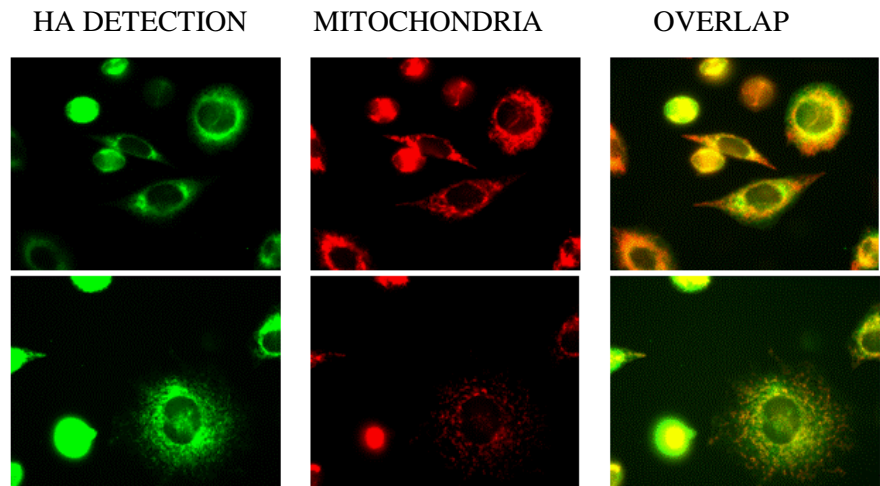


Figura 4

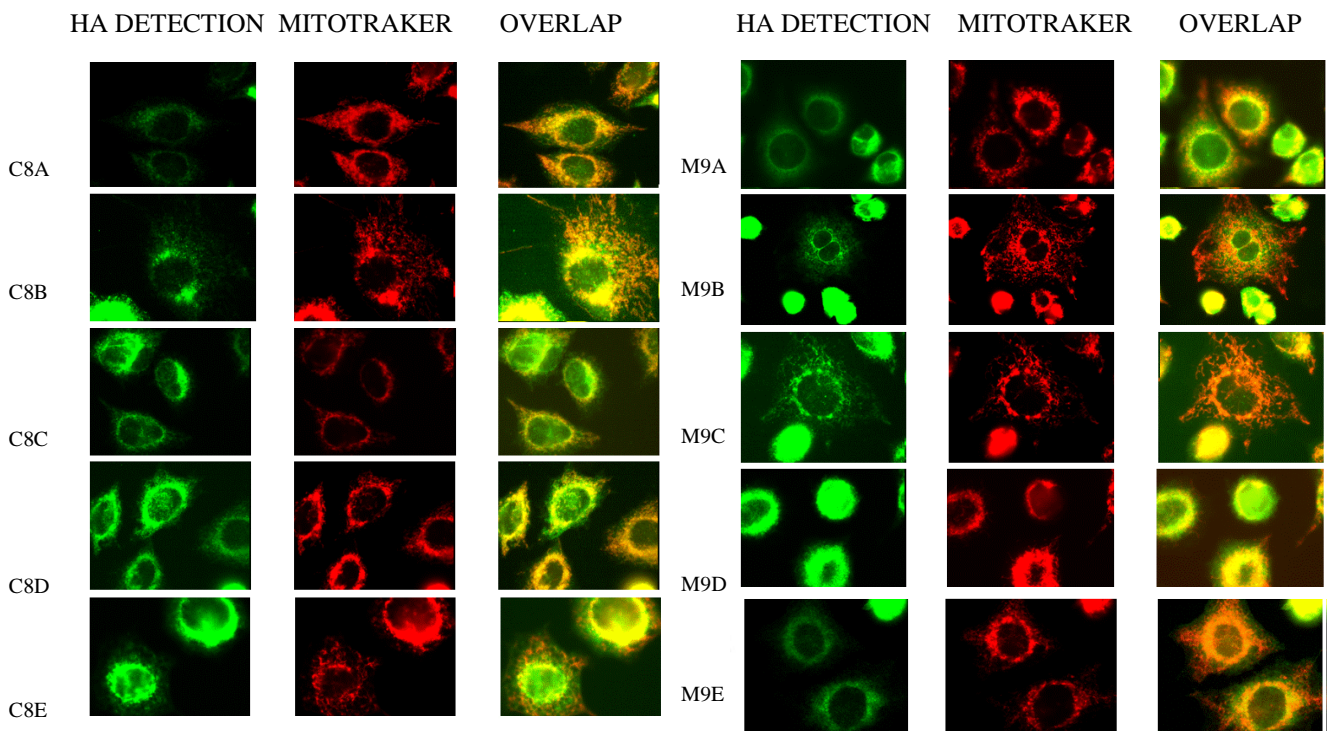
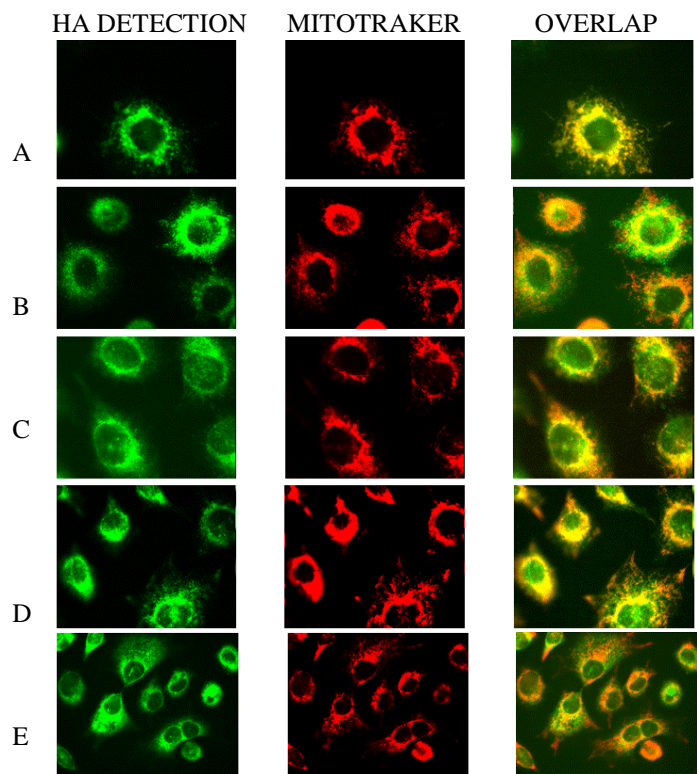


Figura 5

Discusión

El sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) es uno de los procesos metabólicos mejor descritos desde hace años. Sin embargo, quedan todavía algunos aspectos por esclarecer, y otros que parecían ya dilucidados se están revisando en la actualidad. El estudio de este sistema es muy importante para entender no sólo la bioenergética celular, sino también otros procesos del metabolismo, y para avanzar en la comprensión de las diferentes manifestaciones patológicas que tienen lugar en los casos de enfermedad mitocondrial. En esta tesis hemos pretendido abordar, por un lado, el estudio de la organización del sistema, y en segundo lugar, las relaciones que se establecen entre los diferentes componentes del mismo y su repercusión en vías metabólicas adyacentes.

En la última década, la organización del sistema OXPHOS como un conjunto de complejos embebidos en la membrana interna mitocondrial conectados funcionalmente a través de las colisiones arbitrarias del CoQ y Cyt *c*, conocido como modelo fluido, ha dado un vuelco radical. La caracterización de superensamblados moleculares formados por varios de estos complejos en estequiometrías variadas, presentes en todas las formas de vida, desde bacterias hasta las plantas y animales, y la demostración de sus capacidades funcionales, han puesto de manifiesto la necesidad de reconsiderar el tema y replantearse el modelo sólido que quedó descartado 30 años atrás. Sin embargo, cualquiera de estos dos modelos explica sólo parcialmente las observaciones experimentales. Junto a eso, ambos proponen una organización fija de la cadena electrónica, que difícilmente puede adaptarse a las condiciones y requerimientos bioenergéticos celulares, tan variables. Por ello, varios grupos han sugerido que diferentes formas de organización de la cadena pueden coexistir de manera normal en la célula, lo que explicaría las dos naturalezas observadas experimentalmente (Garfinkel 1957; Fowler y Richardson 1963; Kroger y Klingenberg 1973; Bianchi, Genova et al. 2004). Esta idea se ha consolidado en el llamado modelo de plasticidad, propuesto por nuestro grupo, que sugiere que esa capacidad de formar diferentes módulos de cadena, genera múltiples posibilidades de conexión entre ellos, esto es, diferentes vías o trayectorias de flujo electrónico, que permitirían una optimización del proceso en función de las condiciones celulares o de los requerimientos energéticos.

La coexistencia de diferentes módulos de cadena (módulos formados por superensamblados con composiciones diferentes y módulos de complejos individuales), es un aspecto bastante aceptado. Sin embargo, aún hay dificultades para demostrar las ventajas funcionales que aportaría la formación de supercomplejos (en relación al flujo electrónico, producción de ROS, secuestro de intermediarios reactivos...), y por supuesto, no existen evidencias experimentales que demuestren que esta plasticidad permita una optimización de la cadena, ni tampoco se conocen los factores que pueden regular la formación de los diferentes módulos.

El trabajo presentado en los manuscritos 1 y 2, es pionero en cuanto a la comprensión de esta organización modular de la cadena respiratoria. En el manuscrito titulado “*A dedicated CoQ pool mediates Electron Transfer Between Respiratory Complexes I and III*”, se propone la existencia de un *pool* de CoQ específico para el flujo entre el CI y CIII, y en el manuscrito titulado “*Integration of mitochondrial complex IV into respiratory supercomplexes requires Cox7a2l*” caracterizamos por primera vez una proteína que interviene en la construcción de los supercomplejos en mamíferos, en concreto, en la asociación entre CIII y CIV. La importancia de este descubrimiento recae en que es la primera evidencia genética de la existencia de un factor necesario para el

proceso de ensamblaje entre complejos respiratorios y que por tanto, puede haber un control y regulación fisiológica de este proceso a través de la expresión de este gen.

En el manuscrito 1, describimos los análisis realizados en mA22, una línea generada a partir de A22 por mutagénesis al azar y selección metabólica positiva, en la cual es detectable una cantidad significativa de CIII funcional, a pesar de contener la misma mutación homoplásmica en el gen *MtCyb* que la línea original A22, la cual es completamente defectiva en el ensamblaje del CIII (Acín-Perez, Bayona-Bafaluy et al. 2004). Con el fin de investigar el mecanismo de esta reversión se buscaron nuevas mutaciones en el mtDNA secuenciando completamente esta molécula, las cuales no se encontraron. Mediante la generación de híbridos transmitocondriales se determinó que la característica supresora de la mutación radica en el compartimento nuclear. Las secuencias de los genes estructurales de CIII y de los factores de ensamblaje *Oxa1* y *Bcs11*, se analizaron y no se hallaron mutaciones. Por tanto, la causa de la reversión fenotípica permanece por el momento desconocida. Sin embargo, esto no ha impedido realizar un trabajo de caracterización de la interacción entre complejos utilizando estas células que contienen cantidades reducidas de CIII y CI y que nos ha llevado a demostrar la existencia y la relevancia funcional de dos *pooles* de CoQ distinguibles en cuanto a que canalizan los electrones desde los sustratos ligados a NADH y aquellos de FADH₂ hacia el CIII, de forma diferente. Esto es coherente y en cierto modo corrobora la idea del modelo de plasticidad propuesto por nuestro grupo hace algunos años (Acín-Pérez et al., 2008)

La reversión del fenotipo mutante en la línea supresora se comprobó por la restauración de la capacidad de crecimiento en medio no fermentable, que contiene galactosa como fuente de carbono, del consumo de oxígeno y una recuperación parcial de las actividades de los complejos individuales I y III. Sorprendentemente, a pesar de que la actividad individual de tanto el CI como del CIII sigue siendo reducida en la línea supresora, la actividad combinada de I+III se recuperó totalmente tal y como sucedía con el consumo de oxígeno. A su vez, la actividad de CII+III se veía muy reducida, a pesar de que la actividad de CII medida individualmente era igual a la de la línea control. Los análisis del ensamblaje en supercomplejos realizados mediante *Blue Native* revelaron que la mayor parte del CIII ensamblado en la línea supresora, que cuantitativamente es bastante menor que en el control, aparece formando supercomplejos con el CI, quedando muy poco CIII libre.

Este trabajo sugiere que el CIII, al menos en el contexto de una cantidad de CIII ensamblado reducida, tiene preferencia por interaccionar con el CI en forma de SC para recibir los electrones procedentes de él, respecto a los provenientes de CII. Esta observación, demuestra la funcionalidad del SC y respalda experimentos anteriores del grupo de Lenaz que proponen el SC como la vía de flujo de electrones entre CI y CIII (Bianchi, Genova et al. 2004), y además propone la existencia de dos vías alternativas de flujo electrónico que se llevan a cabo a través de *pooles* diferentes de CoQ. Mientras que el flujo entre CI y III está mediado por un CoQ que no es accesible a los electrones procedentes del CII, (y que debe permanecer vinculado al supercomplejo), el CoQ libre en la membrana es el que recibe los electrones del CII. La existencia de estos dos *pooles* de CoQ específicos del donador de electrones, se sostiene por el comportamiento inverso que manifiestan las actividades combinadas. Cuando hay más CIII libre, hay más CoQ libre, y se favorece el flujo electrónico II+III y decae el que va a través del I+III, mientras que en situación de formación del SC, se favorece el flujo I+III y merma el II+III. Por tanto, debe haber dos *pooles* de CoQ, ya que si el CoQ reducido por CII pudiera acceder al CIII unido en el SC no veríamos esta disminución en la actividad II+III.

La existencia de varios *pooles* de CoQ, es un tema que se ha tratado con anterioridad por otros grupos. Así por ejemplo se han descrito cantidades variables de CoQ reducida en función del tipo de sustrato empleado: un 80% de la reducción de la ubiquinona se debería a la oxidación del succinato, mientras que un 10% procedería del NADH (Jorgensen, Rasmussen et al. 1985; Lass y Sohal 1998). Más recientemente se ha demostrado que el contenido en CoQ no es homogéneo, pudiendo discriminar entre un CoQ usado durante la oxidación por succinato, un segundo *pool* que actúa a modo de reservorio y que se puede movilizar para este fin, y otro porcentaje de CoQ que no puede utilizarse en la oxidación por succinato (Benard, Faustin et al. 2008). Los trabajos de Lenaz recogidos en varias revisiones también apuestan por una compartimentalización del CoQ. Según sus experimentos el flujo entre CI y CIII se establecería a través del SC, aunque todavía no ha sido posible determinar el modo en que el CoQ participante transfiere los electrones, si mediante mecanismo de canalización o a través de un proceso de microdifusión; mientras que por otro lado, una parte del CoQ sería responsable de su comportamiento como *pool* y desempeñaría diversas funciones como la de aceptor de electrones procedentes del CII, de la ETF deshidrogenasa, de GA3PDH, de la colina deshidrogenasa, o bien mediar la transferencia reversa de electrones entre CII y CI (Genova y Lenaz 2011).

Estos dos *pooles* de CoQ, sin embargo parecen estar en equilibrio: cuando disgregamos el supercomplejo (al interferir una subunidad estructural de CI), se libera el CIII y la cantidad de CoQ que estaría retenida entre los dos complejos por lo que se recupera el flujo electrónico desde CII. Este equilibrio explicaría también la cinética de saturación del CoQ total que se demuestra por las actividades CI+CIII integradas (Estornell, Fato et al. 1992), y por la disminución de las actividades respiratorias en mitocondrias fusionadas a fosfolípidos, con la consecuente dilución del CoQ (Schneider, Lemasters et al. 1982).

Una cuestión pendiente de resolver es si el flujo de electrones entre CI y CIII puede ocurrir, en ausencia del supercomplejo, a través del *pool* de CoQ libre. La bibliografía disponible arroja resultados contrapuestos: los primeros estudios de reconstitución proponen que este proceso puede ocurrir (Heron, Ragan et al. 1978), aunque medidas de respiración en condiciones patológicas concluyen que la transferencia electrónica en ausencia del supercomplejo se pierde, a pesar de mantenerse la actividad de los complejos individuales (Rosca, Vazquez et al. 2008). Hasta la fecha, no hay evidencias claras que permitan responder esta cuestión. Eso sí, pueda haber o no flujo electrónico mediado por el *pool* de CoQ libre, a la vista de los resultados sobre el ensamblaje en supercomplejos que sugiere que *in vivo* la cantidad de CI libre es casi nula (Schagger y Pfeiffer 2001) y según las evidencias anteriores en relación al flujo entre CI y CIII, esta vía no parece tener lugar en condiciones fisiológicas.

Otro asunto que queda por resolver, en relación a este trabajo, es la causa por la que la línea mA22 revierte el fenotipo. No hemos encontrado mutaciones en las secuencias de aquellos genes implicados en la formación del complejo. La proteína Cyt *b* está mutada en esta línea celular, al igual que en A22 donde conduce a la pérdida de estabilidad del CIII y consecuentemente del CI, y sin embargo en estas células hay una cierta estabilización de los complejos, suficiente para recuperar la funcionalidad y responder a las demandas fisiológicas. Una hipótesis factible es que el factor supresor sea capaz de estabilizar al Cyt *b*. Una de las posibles causas de estabilización podría ser la mutación en los elementos del sistema de control de calidad mitocondrial (QCS), un conjunto de complejos proteicos con actividad proteasa presentes en la membrana interna mitocondrial, responsables de la eliminación del exceso de subunidades (cuando ocurre

un desequilibrio entre las subunidades codificadas en el mtDNA y en el núcleo) y de la degradación de aquellos polipéptidos defectuosos incapaces de alcanzar el plegamiento nativo de la proteína (Tatsuta y Langer 2008; Baker 2011). Generalmente el defecto de este sistema conlleva la acumulación de polipéptidos defectuosos y la aparición de un efecto negativo y el desarrollo de enfermedad (Martinelli y Rugarli 2010). Pero hay también algunos trabajos en los que el defecto en este sistema desemboca en un resultado beneficioso (Fiumera, Dunham et al. 2009). Así se ha demostrado la recuperación de la función respiratoria en líneas mutantes dobles, en una proteína esencial para el sistema OXPHOS y en un gen perteneciente al QCS, como Oma1 (Bestwick, Khalimonchuk et al. 2010). Para testar esta hipótesis en nuestro sistema, hemos llevado a cabo la transferencia de mitocondrias de las líneas mA22 a líneas celulares defectuosas en el gen Oma1, disponibles en el laboratorio gracias a la colaboración del Dr. Carlos López Otín, pero no se logró recuperación fenotípica. Además, este gen se ha secuenciado y se han medido sus niveles de expresión a nivel de mRNA en la línea mA22, sin hallar alteraciones significativas. En cualquier caso, se ha descrito muy recientemente que en las levaduras parece ser que Oma1 no es parte activa en la degradación de Cyt b (Khalimonchuk, Jeong et al. 2012). Sin embargo, muchas otras proteínas forman parte de este sistema (Yme1L1, Spg7, Afg3l1 y Afg3l2, entre otras), luego todavía es plausible que esta sea la causa del fenotipo represor.

Para dilucidar el gen responsable de la supresión de la mutación, se están realizando experimentos de secuenciación de todos los mRNA de las líneas supresora y mutante. Además esta línea supresora se va a utilizar en la generación de híbridos transmitocondriales, para comprobar si este núcleo es capaz de suprimir otras mutaciones en el mtDNA de algunas líneas disponibles en nuestro laboratorio.

Como conclusión, este trabajo refuerza experimentos anteriores que demostraban, mediante experimentos de control de flujo, que la transferencia electrónica entre CI y CIII ocurre a través de la asociación entre ambos formando supercomplejos. Además, esta transferencia de electrones está mediada por un *pool* de CoQ dedicado a la misma, incapaz de tomar electrones procedentes del CII. Sólo cuando el CIII y el CoQ se disocian del SC por disrupción de este último, quedan accesibles al CII.

El manuscrito 2, "*Integration of mitochondrial complex IV into respiratory supercomplexes requires Cox7a2l*", aporta una información muy relevante en cuanto al proceso de construcción de los supercomplejos respiratorios, puesto que el hecho de haber encontrado una proteína responsable de la interacción entre el CIII y el CIV, demuestra que este proceso ocurre naturalmente en la membrana interna mitocondrial y su más que probable regulación mediante cambios en la expresión de este gen.

La formación de superensamblados moleculares por asociación de los complejos respiratorios individuales en diferentes estequiometrias fue inicialmente argumentada como un efecto artefactual debido a la solubilización de las proteínas de la membrana mitocondrial mediante el uso de detergentes, y se postuló que estas agregaciones no tenían que ver con la asociación fisiológica de los complejos, aún cuando éstos mantuvieran sus actividades enzimáticas en los geles (Schagger y Pfeiffer 2000; Eubel, Heinemeyer et al. 2004; Heinemeyer, Eubel et al. 2004). Sin embargo, la acumulación de argumentos a favor de estas asociaciones, (como la estabilización de los complejos o la demostración de su funcionalidad mediante respiración) han ido revelando la condición natural o fisiológica de estos ensamblados (Acin-Perez, Bayona-Bafaluy et al. 2004; Diaz, Fukui et al. 2006; Acin-Perez, Fernandez-Silva et al. 2008). Sin embargo, hasta este

momento, no disponíamos de pruebas genéticas que defendieran que este proceso de asociación entre complejos individuales existe como tal, ni que requiera proteínas que actúen como factores propiciando el superensamblaje sea como factor que no forma parte del supercomplejo maduro o como subunidad específica (a modo de anclaje estructural entre ellos, manteniéndolos unidos).

En este trabajo, el estudio del ensamblaje de los complejos respiratorios en líneas celulares con un fondo nuclear mixto C57BL/6N y 129S6/SvEvTac, proporcionadas por el Dr. Carlos López Otín, condujo a la observación de dos fenotipos posibles. Algunas de las líneas celulares (78, 81 y 82) ensamblaban supercomplejos con normalidad (III₂+IV, I+III₂ y I+III₂+IV_n) mientras que otras (77,79 y 80) carecían de todos aquellos que contienen CIV. Esta divergencia fenotípica resultó deberse a la existencia de dos alelos diferentes para el gen *Cox7a2l*. Uno de los alelos, en homocigosis cuando las líneas celulares o los ratones no ensamblaban SC normalmente, presentaba una microdelección de 6 nts respecto al alelo largo, que aparecía al menos en heterocigosis en las muestras capaces de ensamblar SC. La participación de esta proteína como responsable del defecto fenotípico se demostró al restaurar el ensamblaje normal de los SC mediante la expresión del alelo silvestre (largo) en aquellas células defectuosas.

Los experimentos realizados a nivel genómico y proteómico han demostrado la función de *Cox7a2l* como proteína necesaria para la interacción entre CIII y CIV. *Cox7a2l* interviene físicamente en la formación del supercomplejo como parte estructural del mismo, esto es, está presente físicamente siempre que se produce la interacción entre CIII y CIV (con o sin CI), lo cual se ha determinado mediante inmunodetección de la proteína en preparaciones de mitocondrias separadas mediante BN-PAGE (resultados no mostrados), y también por detección de su presencia en las bandas de SC por análisis de espectrometría de masas en cortes de los geles de BN-PAGE. La detección de *Cox7a2l* en ambos casos tiene lugar sólo en las bandas correspondientes a SC y no en las de los complejos individuales.

Este hecho es muy importante, ya que en las últimas semanas han aparecido algunas publicaciones en las que por primera vez se describen proteínas relacionadas con supercomplejos, concretamente con los supercomplejos III+IV₁₋₂ de levaduras (Strogolova, Furness et al. 2012; Vukotic 2012). Se trata de Aim33 y Aim38, que han sido rebautizadas como Rcf1 y Rcf2 (*Respiratory superComplex Factor 1-2*), tras observarse su intervención en la interacción entre CIII y CIV. Sin embargo, existen discrepancias entre ambos artículos respecto a si Rcf1 es capaz o no de unirse a subunidades de CIII en ausencia de CIV, y por otro lado, en ambos artículos se demuestra que la actividad enzimática de CIV, así como la biogénesis de este complejo, se ven resentidas en cepas de levadura mutantes para las mismas, por lo que parecen ser proteínas estructurales del complejo IV que intervienen en la estabilización del SC. Rcf2 es exclusiva de levaduras, mientras que Rcf1 tiene dos homólogos en humanos (Rcf1a o HIG1D1A, y Rcf1b o HIG1D2A), que también se encuentran asociados al CIV y a los SC en células humanas (Vukotic 2012), pero su función todavía debe ser esclarecida (Hayashi, Nakagami et al. 2012). No consideramos que estas proteínas sean homólogos funcionales de “Scaffi”, ya que *Cox7a2l* es detectable exclusivamente en las bandas correspondientes a los supercomplejos CIII+CIV y CI+CIII+CIV, no hemos visto asociación con el CIV libre y, además, tanto la actividad como la biogénesis del CIV es correcta en su ausencia. Si bien estas diferencias con respecto a Rcf1 podrían deberse a la diferente organización de la cadena en levaduras frente a mamíferos (carente de CI y con la práctica totalidad del CIV asociado al CIII en SC, al contrario de lo que pasa en mamíferos donde la mayor parte del CIV está libre en la membrana), nuestra

interpretación, en función de los datos de los que disponemos actualmente, es que Cox7a2l se trataría exclusivamente de una proteína estructural propia de los SC. Denominarla como factor de ensamblaje o proteína estructural del SC dependerá de la definición de factor de ensamblaje que se quiera adoptar.

Por otro lado, la presencia de Cox7a2l es necesaria para el establecimiento de la interacción III+IV, ya que en su ausencia los SC no se forman. Esta observación también difiere respecto a los mutantes de levadura en Rcf1 y Rcf2, que pueden formar supercomplejos en ausencia de las mismas (Vukotic 2012). Pero, además de necesaria, ¿es una condición suficiente? Esta cuestión es otro interrogante que queda por resolver ya que probablemente todavía queden muchos factores proteicos involucrados en este proceso por descubrir, entre otros, el papel que jugarían las homólogas de Rcf1, en relación con Cox7a2l, en mamíferos. Por otro lado, además de la acción de proteínas específicas, se sabe que la composición lipídica de la membrana interna mitocondrial favorece la asociación de los SC (Zhang, Mileykovskaya et al. 2005; McKenzie, Lazarou et al. 2006).

Un hallazgo importante de este trabajo es la observación de diferencias en la formación de supercomplejos entre cepas de ratones. Es importante resaltar que los ratones de la cepa C57BL/6, comúnmente utilizados en la generación de modelos animales, no son capaces de asociar CIII y CIV. Sin embargo, esta diferencia se debe a una mutación en un gen implicado en la construcción de los mismos, lo cual no sugiere una adaptación fisiológica de sus sistemas OXPHOS, pero puede arrojar luz acerca de la diferente funcionalidad o eficacia del sistema OXPHOS en función de los módulos de cadena respiratoria que presenten.

La existencia de una proteína propiamente específica de la construcción de los supercomplejos, en este caso de aquellos que contienen CIV, permitiría un mecanismo regulatorio de la formación de estos. Así, la organización de la cadena respiratoria en módulos individuales o en superensamblados, podría modificarse de manera controlada a través de la expresión de estas proteínas en respuesta a las necesidades bioenergéticas celulares, modulando la importancia de unas vías de flujo electrónico respecto a otras, y verificando el modelo plástico.

Como conclusión a este segundo trabajo, hay evidencias genéticas de que los supercomplejos respiratorios existen *in vivo* por la existencia de proteínas implicadas en el ensamblaje de los mismos. Cox7a2l es la primera proteína que se describe con esta función en mamíferos, y podría ser una proteína exclusiva de supercomplejos, puesto que por el momento no hay datos que la asocien a complejos respiratorios individuales. Es específica de la asociación entre los complejos III y IV, y entra a formar parte estructural de los SC. Como ella, otras proteínas pueden ser necesarias en la unión de los SC respiratorios, y su existencia posibilita la existencia de mecanismos genéticos regulatorios de la formación de supercomplejos, y en definitiva de la plasticidad en la organización del sistema OXPHOS.

Recopilando los resultados principales de estos dos manuscritos, el siguiente diagrama muestra la organización propuesta de la cadena respiratoria en diferentes módulos y las diferentes rutas para el flujo de electrones, en presencia o ausencia de Cox7a2l, aquí denominada SCAFI (SuperComplex Assembly Factor 1).

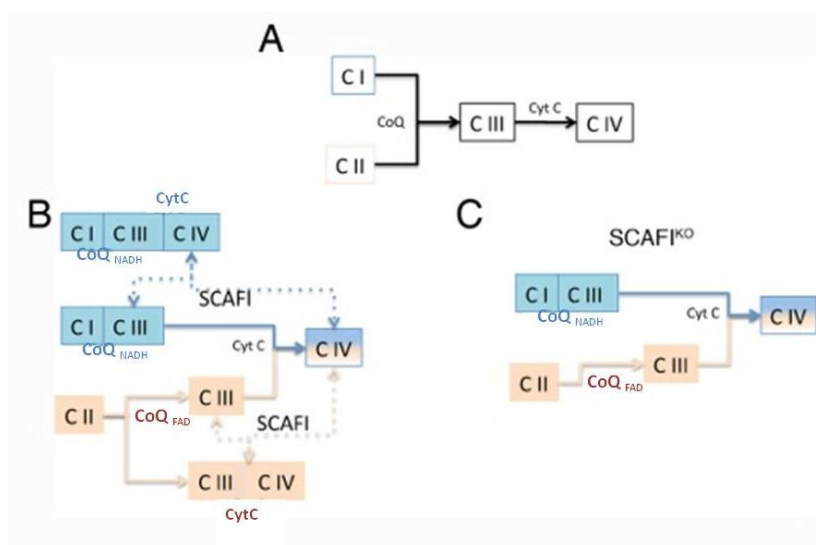


Figura 1. Organización modular de la cadena respiratoria de mamíferos. A) Modelo fluido tradicional. B) Organización de la cadena en diferentes módulos que determinan la existencia de diferentes trayectorias del flujo electrónico, en cuya regulación podría intervenir SCAFI (Cox7a2l). C) Posibilidades organizativas de la cadena respiratoria en ausencia de SCAFI.

En segundo lugar, un aspecto relevante del sistema de fosforilación oxidativa, que se suma a la complejidad estructural discutida anteriormente con posibles implicaciones en cuanto a diversidad funcional, es que en él convergen una serie de procesos estrechamente relacionados, como son la oxidación y reducción de sustratos, el transporte electrónico, el bombeo de protones y la generación de gradiente electroquímico, la síntesis de ATP o el desvío electrónico hacia la generación de radicales libres. Además, algunos de sus componentes están íntimamente ligados a otros procesos metabólicos en los que participa el orgánulo como la biosíntesis de pirimidinas, la β -oxidación de ácidos grasos, el ciclo de Krebs, la regulación del proceso apoptótico o el importe de precursores mitocondriales. Esta complejidad del sistema se pone de manifiesto en las enfermedades mitocondriales, donde podemos encontrar un amplio abanico de síndromes y alteraciones que cursan con multitud de signos.

Para poder comprender mejor las relaciones establecidas y el diferente grado de implicación de los elementos del sistema sobre otras rutas metabólicas asociadas, nuestro grupo desarrolló un modelo que permitió restaurar en líneas celulares murinas carentes de mtDNA, y por tanto de sistema OXPHOS, el flujo de electrones desde el NADH hasta el oxígeno mediante la xenoexpresión de dos proteínas: NDI1 y AOX (Perales-Clemente, Bayona-Bafaluy et al. 2008). La recuperación del flujo de electrones permitió la recuperación de otras vías metabólicas relacionadas, como la biosíntesis de pirimidinas o la G3PDH. Sin embargo, ni NDI1 ni tampoco AOX permiten el bombeo de protones a través de la membrana interna mitocondrial, necesario para la síntesis de ATP entre otros procesos. También conviene puntualizar que las rutas dependientes de Cyt *c* tampoco se van a beneficiar de la restauración del flujo electrónico, ya que AOX sólo acepta los electrones procedentes del CoQ (Hoefnagel y Wiskich 1998).

Por ello, el segundo objetivo de esta tesis era el de incorporar en estas células la herramienta adecuada para restaurar el bombeo protónico y completar así el trabajo con NDI1 y AOX. Por otro lado la generación de un gradiente electroquímico en una línea celular carente de cadena transportadora de electrones pero con una ATPsintasa funcional, permitiría determinar aquellos procesos que son directamente dependientes de

la producción de ATP. Las líneas celulares carentes de mtDNA no son aptas para probar esta situación, ya que las subunidades A6 y A8 de la ATPasa se encuentran codificadas por el genoma mitocondrial. Las células de interés podrían ser aquellas dobles mutantes en CIII y CIV, ya que si no se ensamblan estos complejos, tampoco se estabiliza el CI (Acin-Perez, Bayona-Bafaluy et al. 2004; Diaz, Fukui et al. 2006) y en esta situación no hay bombeo protónico por parte de la cadena. El ensamblaje de CV en cambio, debe completarse con normalidad en estas líneas.

El trabajo realizado en esta dirección se recopila en el manuscrito 3: “*Strategies for optogenetical control of membrane potential generation.*”

Para la generación del gradiente protónico, era necesaria la expresión e importe en la membrana interna mitocondrial de una proteína capaz de llevar a cabo un transporte de protones de manera direccional hacia el espacio intermembrana, sin intercambio de ningún otro ión. La bacteriorrodopsina es una de las proteínas mejor caracterizadas a nivel molecular, de la que se disponen cientos de mutantes funcionales y capaz de desempeñar esta función de bomba de protones en un proceso controlado por luz (Lanyi y Luecke 2001). Se idearon por tanto diferentes construcciones vectoriales que llevaran por inserto proteínas de fusión entre péptidos señales de importe mitocondrial y la bacteriorrodopsina. Estas diferentes construcciones pretenden la inserción en la membrana interna mitocondrial de la bacteriorrodopsina, y se diseñaron para seguir rutas de importe mitocondrial diversas (la ruta de la presecuencia con procesamiento de la señal, la ruta de la presecuencia sin procesamiento, la ruta de los transportadores móviles). Sin embargo, en ninguno de estos casos la proteína alcanzó el compartimento mitocondrial, sino que permaneció en vesículas dispersas por todo el citoplasma.

Experimentos de expresión alotópica, que pretenden la codificación nuclear de la versión no mutada de proteínas que tienen su gen (defectuoso) en el mtDNA, se han llevado a cabo en muchas ocasiones, con éxito a veces dudoso y resultados contrapuestos en diferentes grupos (Perales-Clemente, Fernandez-Silva et al. 2011). Las dificultades de importe de estas proteínas podrían tener que ver con el desconocimiento de las señales de importe adecuadas o por su alta hidrofobicidad. Esto sugirió probar estrategias para disminuir la hidrofobicidad de la propia bacteriorrodopsina, o el empleo de otras secuencias polipeptídicas de bombas protónicas con menor hidrofobicidad. Estas proteínas pertenecieron al recientemente descubierto grupo de proteorrodopsinas, proteínas de bacterias marinas ampliamente distribuidas en los océanos que llevan a cabo la misma acción que la bacteriorrodopsina, aunque se activan con luz a longitudes de onda (λ) diferentes (Beja, Spudich et al. 2001). En ninguno de los casos el importe de las bombas protónicas en la mitocondria fue exitoso.

La imposibilidad de conseguir importe de estas bombas protónicas a la mitocondria de mamíferos, contrasta por un lado con el éxito en el importe de NDI1 y AOX logrado anteriormente, y segundo, con el hecho con el que esta proteína se había importado previamente en la membrana interna de levadura, con mantenimiento de su funcionalidad (Hoffmann, Hildebrandt et al. 1994). Respecto al importe de NDI1 y AOX, estas dos proteínas, aunque no son naturales de mamíferos, son proteínas naturalmente localizadas en el compartimento mitocondrial de las especies de las que proceden, por tanto disponen de sus propias secuencias de direccionamiento mitocondrial. Además las rutas para su importe están conservadas en mamíferos. En cuanto al logro en el importe de la propia bacteriorrodopsina a mitocondrias de *Schizosaccharomyces pombe*, es un hecho bastante aislado, ya que la sola expresión de la bacteriorrodopsina en la membrana de *E.coli* para su producción a gran escala, y posteriormente en la membrana plasmática de mamíferos, ha

requerido su optimización (Dunn, Hackett et al. 1987; Karnik, Nassal et al. 1987; Gradinaru, Zhang et al. 2010).

En los últimos 6 años, se ha desarrollado enormemente, sobretodo en el campo de las neurociencias, una disciplina que combina genética y tecnología permitiendo el control de ciertos procesos mediante luz (Deisseroth 2011). Los eventos celulares estudiados son aquellos que se desencadenan tras cambios en los potenciales de membrana. Los mecanismos o moléculas que integran la sensibilidad a la luz y el proceso molecular que modifica el potencial de membrana, han sido hasta la fecha opsinas microbiológicas similares a la bacteriorrodopsina. Las canalrodopsinas son canales que se abren tras su activación por luz y permiten el paso de electrones disipando un gradiente (Nagel, Ollig et al. 2002; Nagel, Szellas et al. 2003), y la halorrodopsina es una bomba de Cl⁻ (Lanyi 1986). La expresión de alguna de estas proteínas en células de mamíferos ha requerido la optimización de la secuencia polipeptídica, mediante la incorporación de secuencias que permitan exportar estas proteínas del retículo endoplásmico, de lo contrario aparecen retenidas (Zhao, Cunha et al. 2008; Gradinaru, Zhang et al. 2010). Esta aproximación ha permitido también expresar a nivel de membrana plasmática la proteína bacteriorrodopsina (Gradinaru, Zhang et al. 2010).

Estos experimentos nos han sugerido adoptar esta estrategia de cara a próximos intentos de importe de la bacteriorrodopsina en la membrana interna mitocondrial. Cabe mencionar que los experimentos de optogenética tenían por objetivo la expresión y localización de las opsinas a nivel de membrana plasmática. Esta ubicación nada tiene que ver con la membrana interna mitocondrial, mucho más rica en proteínas y accesible a través de mecanismos de importe sofisticados, bastante específicos y variables según la topología final de la proteína. Esta propuesta de adición del motivo de exporte de RE por tanto, propone una salida al estancamiento actual de las estrategias empleadas en las que, independientemente de la construcción ideada, el resultado siempre fue la formación de vesículas citoplasmáticas. Sin embargo, es probable que la inserción en la membrana interna mitocondrial no sea inmediata y requiera ulteriores modificaciones de las estrategias.

El trabajo desarrollado con la bacteriorrodopsina y otras proteínas efectoras de bombeo protónico, en mi opinión, pone en evidencia las dificultades a la hora de expresar proteínas exógenas a las células, más aun cuando son proteínas de membrana e intentamos llevarlas a orgánulos complejos. Estos resultados invitan a reflexionar sobre el uso de estas estrategias con fines terapéuticos. Sin embargo, en modelos sencillos, celulares o animales, estas estrategias pueden arrojar luz acerca de mecanismos moleculares o procesos biológicos importantes, por lo que el desarrollo de estos modelos de estudio, aún cuando son técnicamente dificultosos, resulta de gran interés. Por ello, a pesar del fracaso en el desarrollo de la estrategia de importe de estas proteínas a la membrana interna mitocondrial discutido en esta tesis, nuestro grupo persevera, mientras haya una posible solución como es la adición del motivo de exporte, en el intento de construir este modelo de estudio.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten proponer las siguientes conclusiones:

Parte I: Organización modular de la cadena respiratoria de mamíferos

1.- Existe una compartimentalización del CoQ, de manera que:

- Una porción de las moléculas de CoQ aparecen ligadas al supercomplejo I+III y se encargan específicamente de esta transferencia electrónica.
- El flujo electrónico entre CII y CIII se efectúa a través de un *pool* diferente de moléculas de CoQ, que aparecen libres en la membrana.

2.- En condiciones de poca cantidad de CIII ensamblado, este tiene preferencia por asociarse al CI formando SC, de forma que el flujo electrónico entre CII y CIII se ve disminuido. Sólo tras disociarse el supercomplejo, el CIII queda libre y las moléculas de CoQ destinadas a esta transferencia electrónica pasan a formar parte del *pool* de CoQ libre, responsable de la transferencia entre CII y CIII.

3.- Cox7a2l es la primera proteína de mamíferos descrita en la asociación entre complejos respiratorios, poniendo de manifiesto que:

- Los complejos respiratorios se ensamblan entre sí formando los SC *in vivo*, puesto que hay evidencias genéticas de su formación.
- El proceso de construcción de los supercomplejos requiere proteínas específicas.
- Pueden existir mecanismos regulatorios genéticos de la formación de los supercomplejos.

4.- Cox7a2l es indispensable para la interacción entre el CIII y el CIV, y forma parte estructural de los supercomplejos III₂+IV y I+III₂+IV_n.

5.- La cepa de ratón C57BL/6 es incapaz de ensamblar los supercomplejos III₂+IV y I+III₂+IV_n, al ser portadora en homocigosis de una mutación en el gen Cox7a2l.

6.- La cadena respiratoria de mamíferos se organiza en diferentes módulos formados por asociaciones específicas de los elementos individuales (CI al CIV, y transportadores electrónicos), determinando la existencia de vías alternativas para el flujo electrónico.

Parte II: Optogenética mitocondrial

1.- La construcción de un modelo de control del gradiente protónico a través de la membrana interna mitocondrial, mediante la expresión e importe de proteínas efectoras de bombeo protónico no se ha podido llevar a cabo, a pesar de los diferentes intentos utilizando diversas estrategias para conseguirlo. Se han probado diferentes rutas de

importe mitocondrial y moléculas con diferente índice de hidrofobicidad, resultando siempre en el arresto proteico en vesículas de localización dispersa citoplasmática.

2.- Modificaciones en la secuencia proteica, como la adición del motivo de exporte del RE, deben plantearse como futura intervención con el propósito de solucionar el arresto de la proteína en dichas vesículas.

Material y Métodos

1. MATERIAL

1.1 Aparatos y útiles

Los distintos instrumentos usados durante el desarrollo de este trabajo, ordenados en función de su uso, se han recopilado en la siguiente tabla.

Nombre	Marca	Modelo	Uso
<i>Esterilización</i>			
Estufa	Selecta		Material de vidrio, a 160°C durante toda la noche
Autoclave	Selecta, 437G		Material de plástico y disoluciones (1atm, 120°C, 20 minutos)
Filtros de SFCA (Surfactant Free Cellulose Acetate) Stericup™	Nalgene o Millipore		Filtros de 0,22 µm de tamaño de poro, para sustancias termolábiles
Filtros PVDF	TPP	0,22 ó 0,45µm	Filtros para sustancias termolábiles
<i>Preparación de disoluciones</i>			
Destilador	Millipore	Milli-Ro4	Purificación de agua por ósmosis inversa.
<i>Medida de masa</i>			
Granatario	COBOS	Serie CBJ	Precisión de la medida 0,01 g
Balanza Analítica	AND	GR-120	Precisión de la medida 0,0001 g
<i>Medida de pequeños volúmenes</i>			
Micropipetas	GILSON PIPETMAN®	P10,P20,P200, P1000	Pipetas de precisión
Jeringas	Hamilton	1700 Series (25 µl)	Para añadir los reactivos en la cámara del electrodo de O ₂
<i>Incubaciones termostatizadas</i>			
Baño de agua	Grant	W14	Incubaciones
Termoblock	Eppendorf	5436	Incubaciones en seco
Termoblock	BIOER	MB-102	Incubaciones en seco

Organización modular de la cadena respiratoria y Optogenética mitocondrial

Nombre	Marca	Modelo	Uso
Sistema calefactor			
Microondas	Solac		Fundir la agarosa
Almacenamiento refrigerado			
Frigorífico/congelador	Bosch		4º/-20ºC reactivos y disoluciones
Congelador	LYNX LIEBHERR		-20ºC reactivos y muestras biológicas
Ultracongelador	Sanyo	MDF-U52V	-80ºC muestras biológicas
Contenedor de N2 líquido	AIR LIQUIDE	ESPACE 151-331-661	Almacenamiento de líneas celulares
Medida de pH			
pHmetro	Crison	pH-Meter Basic 20 ⁺	
Centrifugación			
Centrífuga refrigerada	Beckman Coulter	Avanti J-26XP (rotores JA-10 y JA 25.50)	Extracción de mitocondrias, maxipreps
Microcentrífugas	eppendorf	5415 R	Centrifugaciones termostatizadas
Microcentrífugas	eppendorf	5415	Centrifugaciones a temperatura ambiente
Microcentrífugas	eppendorf	Minispin	Centrifugaciones a temperatura ambiente
Agitación			
Agitador horizontal	ELMI	DOS-20M	Incubación anticuerpos
Agitador horizontal	Stuart Scientific	SO3	Incubación anticuerpos
Noria	Stuart	Rotator SB2	Agitación eppendorf
Agitador magnético	Tethnica	Rotamix SHP-10	Preparación disoluciones
Espectrofotometría			
Espectrofotómetro UV-Visible Software asociado	Unicam	UV 500 Vision32 1.05	Medidas de actividad enzimática y Bradford
Sistema Peltier	DBS	PCB150	Sistema de termostatización
Cubetas	VWR	1ml	
Espectrofotómetro NanoDrop® Software asociado	Thermo Scientific	ND-1000 NanoDrop 3.0.1	Concentración de DNA en disolución
NanoVue®	GE Healthcare		Concentración de DNA en disolución

Nombre	Marca	Modelo	Uso
Medida de consumo de O₂			
Electrodo de O₂ Software asociado	Hansatech CBID	Oxytherm Oxygraph PlusV1.00	Medida de la capacidad respiratoria celular
Electroforesis			
Mini Protean®	Bio-Rad	3 Cell	Verticales de proteínas y ácidos nucleicos
Mini/Wide -Sub Cell	Bio-Rad	GT* / GT**	Horizontales de ácidos nucleicos
Soportes de metacrilato	Fabricación propia		Verticales de proteínas y ácidos nucleicos
Bomba peristálticas	GILSON	MINIPULS 3	Formación de gradientes de poliacrilamida
Formador de gradientes	Amersham	Hoefer SG30	Formación de gradientes de poliacrilamida
Fuentes de alimentación	Bio-Rad	Power Pac 300 PowerPac™ Basic PowerPac™HV	Voltaje 10-300V Voltaje 10-300V Voltaje 20-5000V
Electrotransferencia			
Sistema de transferencia	Bio-Rad	Mini Trans-Blot® Cell	Transferencia de proteínas a membranas para WB (geles pequeños)
Sistema de transferencia	Bio-Rad	Trans-Blot® Cell	Transferencia de proteínas a membranas para WB (geles grandes)
Membranas para WB	Amersham	Hybond™-extra	Membranas de transferencia de proteínas desde geles de poliacrilamida
Sistema de revelado			
Placas autorradiográficas	Amersham	Hyperfilm	Detección proteica mediante quimioluminiscencia
Revelador/Fijador	SIGMA- ALDRICH	Kodak®	Detección proteica mediante quimioluminiscencia
Cassettes de exposición	SIGMA- ALDRICH	Kodak®	Detección proteica mediante quimioluminiscencia

Organización modular de la cadena respiratoria y Optogenética mitocondrial

Nombre	Marca	Modelo	Uso
<i>Sistemas de captura de imágenes</i>			
Transiluminador Software asociado	Bio-Rad	Molecular Imagen® Gel Doc™ System Quantity One® 1-D	Captura de imágenes de geles de ácidos nucleicos teñidos con bromuro de etidio
Transiluminador Software asociado	Bio-Rad	Gel Doc 2000 Multi-Analyst	Captura de imágenes de geles de ácidos nucleicos teñidos con bromuro de etidio
<i>Reacción de PCR</i>			
Termociclador	Biometra	T3000 Thermocycler	Amplificación de un fragmento de DNA
Termociclador	Bio-Rad	MyCycler™ Thermal Cycler	Amplificación de un fragmento de DNA
<i>Cultivos celulares eucariotas</i>			
Incubador	NUAIRE	DHD AUTOFLOW CO2 Air-Jacketed	Crecimiento de líneas celulares a 37°C y 5%CO ₂ en atmósfera húmeda
Incubador	SANYO	MCO-175	Crecimiento de líneas celulares a 37°C y 5%CO ₂ en atmósfera húmeda
Campana de flujo laminar, Clase II	HOLTEN	HB2448	Zona de trabajo estéril
Campana de flujo laminar, Clase II	NUAIRE	UN-425-400E	Zona de trabajo estéril
Bomba de vacío	KNF		Utilizada junto con pipetas Pasteur estériles para aspirar el medio líquido de cultivo
Baño termostatzado	SELECTA	Precistern	Atemperar medios de cultivo a 37°C
Centrífuga	KUBOTA	2420	Lavados, concentrados celulares
Microscopio invertido de contraste de fases	LEICA	DMIL	Visualización de cultivos celulares en placa
Microscopio invertido de fluorescencia Cámara de video Software asociado	ZEISS PHOTOMETRIC	HAL100 CoolSPANfx Meta Imaging Series 6.1 (MetaMorph)	Inmunofluorescencia Colocalización mitocondrial

Nombre	Marca	Modelo	Uso
Microscopio directo de campo claro	LEICA	CME	Contaje celular en cámara de Neubauer
Pipeteador eléctrico	PipetBoy Acu/PipetAid		Facilitar la adición de volúmenes de medio decultivo
Pipetas	TPP O BD FALCON™	5, 10 y 25 ml	Material de cultivo celular
Placas de cultivo	TPP O BD FALCON™	40, 60, 100, 150 mm; y de 6, 12 y 96 pocillos	Material de cultivo celular
Tubos de centrifuga	TPP O BD FALCON™	15 y 50 ml	Material de cultivo celular
Botellas enucleación	NALGENE®	250 ml	Enucleación
Contenedor Congelación	NALGENE®	Mr. Frosty™ Cryo 1°C	Congelación gradual de líneas celulares
Criotubos	NALGENE®		Congelación de líneas celulares
<i>Cultivos bacterianos</i>			
Estufa de cultivo	Memmert	Loadrill Modell 100-800	Crecimiento de bacterias en placas de LB-agar
Estufa de cultivo	Selecta		Crecimiento de bacterias en placas de LB-agar
Incubador orbital	Kühner Shaker	Lab-Term	Crecimiento de bacterias en medio LB líquido
Mechero Bunsen	Selecta		Zona de trabajo estéril
Placas petri		100 mm	Preparación de placas LB-agar con al antibiótico de elección
Tubos de centrifuga tipo Falcon	TPP O BD FALCON	15 y 50 ml	Crecimiento de bacterias en medio LB líquido
Tubo centrifuga de fondo redondo	NALGENE	50 ml	Centrifugación bacterias
Botellas centrifugación	NALGENE	250 ml	Centrifugación de grandes volúmenes de bacterias
<i>Extracción mitocondrias</i>			
Taladro	BOSCH		
Homogeneizador Potter-Elvehjem con émbolo de teflón		2 y 10 ml	Homogenados tisulares y celulares
Tubo centrifuga de fondo redondo	NALGENE	50 ml	Centrifugación homogenados

Tabla1.1. Aparatos y útiles utilizados.

1.2 Reactivos

Todos los reactivos químicos utilizados en el desarrollo de esta tesis fueron de grado analítico o de grado apto para biología molecular, y en su caso aptos para cultivo celular. La mayoría de ellos fueron adquiridos en las siguientes casas comerciales: **Bio-Rad, GE Healthcare, Invitrogen, MERCK, Panreac, Promega Biotech Ibérica, Roche, Serva y SIGMA-ALDRICH.**

Las enzimas de restricción y otras enzimas modificadoras de DNA (fosfatasa alcalina y T4 DNAligasa) se obtuvieron de las casas comerciales: **New England Biolabs, Roche, Fermentas, Invitrogen y Amersham.** Para las reacciones de PCR las enzimas Taq polimerasas que se utilizaron fundamentalmente fueron “REDTaq™ DNA polymerase” de SIGMA y “DFS-Taq DNA Polymerase” de BIORON.

Los medios, los antibióticos y el suero fetal bovino empleados en el cultivo celular fueron de la marca GIBCO®, suministrados por Invitrogen.

1.3 Kits comerciales

Todos los kits usados durante el desarrollo de esta tesis, han sido recogidos en la siguiente tabla:

Nombre	Utilidad	Casa Comercial
GenElute™ PCR Clean-up kit	Purificación de DNA en disolución	SIGMA
GenElute™ Gel Extraction kit	Purificación de DNA en gel	SIGMA
GenElute™ Plasmid Miniprep kit	Purificación de DNA plasmídico	SIGMA
GenElute™ Plasmid Maxiprep kit endotoxin free	Purificación de DNA plasmídico libre de endotoxinas	SIGMA
The Original TA Cloning® kit	Clonación de productos de PCR	Invitrogen
EZ-ECL Chemiluminescence Detection kit for HRP	Detección de proteínas mediante Western-Blot	Biological Industries
Amersham™ ECL Plus Western Blotting Detection System	Detección de proteínas mediante Western-Blot	GE Healthcare
Pierce® ECL Western Blotting Substrate	Detección de proteínas mediante Western-Blot	Thermo SCIENTIFIC
TNT® Coupled Reticulocyte LysateSystems	Traducción in vitro	Promega
Anti-HA Immunoprecipitation Kit	Inmunoprecipitación de proteínas marcadas con HA	SIGMA
1st Strand cDNA Synthesis kit for RT- PCR (AMV)	Generación de cDNA	Roche

Tabla 1.3. Kits comerciales.

1.4 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos, cuyas secuencias y posiciones se recogen en los apartados correspondientes, fueron sintetizados por SIGMA-Genosys con una escala de síntesis de 0,025 μmol y purificados por el método de desalado, con excepción de aquellos usados en los ensayos de cuantificación de cDNAs por PCR a tiempo real, los cuales se purificaron por HPLC.

1.5 Plásmidos

Los distintos plásmidos utilizados durante el desarrollo de esta tesis se recogen en la siguiente tabla, cuyos mapas de restricción se muestran en el *Apéndice*.

Nombre	Resistencia (bacterias)	Utilidad	Promotor de expresion en eucariotas	Casa Comercial
pUC57	Ampicilina	Vector de clonaje	NO	GenScript
pCR®2.1	Ampicilina/ Kanamicina	Clonación de productos de PCR	NO	Invitrogen
pTNT™	Ampicilina	Vector de expresión in vitro T7/SP6	NO	Promega
pWPI	Ampicilina	Vector lentiviral de expresión constitutiva, bicistrónico con GFP	EF1α	Tronolab
pWPXLd	Ampicilina	Vector lentiviral de expresión constitutiva, bicistrónico con GFP	EF1α	Tronolab
psPAX2	Ampicilina	Vector de empaquetamiento lentiviral de 2ª generación	CMVenh	Tronolab
pMD2.G	Ampicilina	Vector de la envuelta lentiviral	CMV	Tronolab
pLOX-Ttag-iresTK	Ampicilina	Inmortalización Cultivo Primario	CMV	Tronolab

Tabla 1.5. Listado de los vectores comerciales empleados.

1.6 Cepas bacterianas

Las bacterias utilizadas en este trabajo fueron suministradas por Invitrogen™, enumerándose a continuación:

Subcloning Efficiency™ DH5α™ *E.coli*: cepa bacteriana usada en las aplicaciones de clonaje cotidianas.

One Shot® INVαF' chemically competent *E.coli*: cepa bacteriana usada en las aplicaciones de clonaje que requerían un alto número de copias de DNA plasmídico de interés.

Bacterias competentes DH5α de *E.coli* producidas en el laboratorio por tratamiento de CaCl₂ (ver apartado 2.1.2 de esta sección).

1.7 Anticuerpos

1.7.1 Western Blot

Los anticuerpos empleados en las inmunodetecciones descritas a lo largo de este trabajo, se resumen en la siguiente tabla detallando la dilución de los mismos en PBS Tween 0,1% con leche desnatada en polvo al 0,1%.

Los stocks de los anticuerpos dirigidos frente a proteínas del sistema OXPHOS suministrados por Molecular Probes, se recibieron liofilizados y fueron resuspendidos a una concentración final de 1µg/µl (en una disolución de BSA al 1%, azida 2mM en PBS a pH=7,4) y almacenados a -20°C hasta su uso.

	Ab Primario (dilución)	Proteína	Ab Secundario (dilución)	Casa Comercial
Complejo I	Anti-17 KDa (1/10.000)	NDUFB6	Anti-ratón (1/5.000)	Molecular Probes
	Anti-20 KDa (1/5.000)	NDUFB8	Anti-ratón (1/5.000)	Molecular Probes
	Anti-30 KDa (1/10.000)	NDUFS3	Anti-ratón (1/5.000)	Molecular Probes
	Anti-39 KDa (1/10.000)	NDUFA9	Anti-ratón (1/5.000)	Molecular Probes
Complejo II	Anti-30 KDa (1/5.000)	SDHB	Anti-ratón (1/5.000)	Molecular Probes
	Anti-70 KDa (1/5.000)	SDHA	Anti-ratón (1/5.000)	Molecular Probes
Complejo III	Anti-Core1 (1/5.000)	UQCRC1	Anti-ratón (1/5.000)	Molecular Probes
	Anti-Core2 (1/2.000)	UQCRC2	Anti-ratón (1/5.000)	MitoSciences
Complejo IV	Anti-COI (1/2.000)	MT-CO1	Anti-ratón (1/5.000)	MitoSciences
	Anti. COXIV (1/4.000)	COXIV	Anti-ratón (1/5.000)	MitoSciences
Otros	Anti Cox7a2l (1/600)	COX7A2L	Anti-conejo (1/6.000)	Proteintech
	Anti TOM20 (1/2.500)	TOM20	Anti-conejo (1/6.000)	Santa Cruz
	Anti-Actina (1/5.000)	β -Actina	Anti-conejo (1/6.000)	SIGMA
	Anti-HA (1/5.000)	Epítipo HA YPYDVPDYA	Anti-rata (1/5.000)	Roche
	Anti-V5 (1/5.000)	Epítipo V5 KPIPPLLGLDST	Anti-ratón (1/5.000)	Invitrogen

Tabla 1.7. Anticuerpos utilizados en la inmunodetección de proteínas mediante Western Blot.

1.7.2. Inmunofluorescencia

Los anticuerpos y reactivos empleados en los ensayos de colocalización mitocondrial se describen a continuación:

Anticuerpo primario:

Anti-HA (Roche) dilución 1: 2.000, 2% BSA en PBS pH=7,4.

Anti-V5 (Invitrogen) dilución 1: 2.000, 2% BSA en PBS pH=7,4.

Anti- Bcs1l (Proteintech) dilución 1: 500, 2% BSA en PBS pH=7,4.

Anticuerpo secundario:

Alexa Fluor® 488 goat anti-rat IgG (H+L) 2mg/ml (Invitrogen).

Alexa Fluor® 594 goat anti-mouse IgG (H+L) 2mg/ml (Invitrogen).

Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) 2mg/ml (Invitrogen).

Todos ellos se prepararon a una dilución 1: 500, 2% BSA en PBS pH=7,4.

MitoTracker® Red CMXRos (Invitrogen) colorante mitocondrial fluorescente rojo, tiñe las mitocondrias de las células en cultivo, su acumulación depende del potencial de membrana mitocondrial (100 nM concentración final en medio de cultivo).

MitoTracker®Green colorante mitocondrial fluorescente verde, tiñe las mitocondrias de las células en cultivo (200 nM concentración final en medio de cultivo).

La solución de montaje Slow Fade® Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen) fue empleada para montar las preparaciones analizadas al microscopio de fluorescencia.

1.8 Animales y órganos

Los ratones de las estirpes C57BL/6J y NZB/B1NJ utilizados en este trabajo fueron suministrados por Harlan Ibérica y criados en el animalario de la Unidad Mixta de Investigación de la Universidad de Zaragoza donde se han mantenido bajo condiciones de temperatura y humedad adecuadas. Los órganos utilizados en el transcurso de este trabajo, procedentes de ratones de estas estirpes, fueron extraídos tras el sacrificio de estos animales.

Los órganos pertenecientes a ratones Oma1 +/+ y Oma1 -/-, con fondo nuclear mixto de las cepas C57BL/6N y 129S6/SvEvTac, fueron amablemente cedidos y enviados en hielo seco, por Carlos López Otín, de la Universidad de Oviedo.

1.9 Líneas celulares eucariotas

En este trabajo se emplearon las líneas celulares que se describen a continuación y que se generaron en nuestro laboratorio o bien fueron amablemente cedidas por las personas que figuran en la siguiente tabla:

Nombre	Mutación	Observaciones
L929	MT-COI C6063A MT-COI T6589C MT-ND6 13887iC (heteroplasmia)	Fibroblastos de ratón L929 C3H/An. Dr. Naval (Universidad de Zaragoza)
TM	-	Cíbrido transmitocondrial por fusión de plaquetas de ratón C57BL/6J con la línea p ⁰ 929 resistente a neomicina. (P. Bayona-Bafaluy)
E9	MT-COI T6589C	Generada por subclonaje de L929. (P. Bayona-Bafaluy)
A22	MT-CYB G15263A MT-COI T6589C (homoplasmia)	Generada por mutación aleatoria y posterior subclonaje de L929. (P. Bayona-Bafaluy)
mA22	MT-CYB G15263A MT-COI T6589C (homoplasmia)	Generada por mutagénesis aleatoria de A22 resistente a puromicina. (R. Moreno-Loshuertos)

Nombre	Mutación	Observaciones
77,79,80	-	Fibroblastos de ratón mixto C57BL/6N y 129S6/SvEvTac No ensamblan supercomplejos. Dr. López-Otín (Universidad de Oviedo) Inmortalizados por E. Lapuente-Brun
78,81,82	-	Fibroblastos de ratón mixto C57BL/6N y 129S6/SvEvTac Ensamblan supercomplejos. Dr. López-Otín (Universidad de Oviedo) Inmortalizados por E. Lapuente-Brun
C57	-	Fibroblastos de ratón C57BL/6N (E. Lapuente-Brun)
NZB	-	Fibroblastos de ratón NZB/B1NJ (E. Lapuente-Brun)
HEK 293T	-	Células renales embrionarias humanas. Dr. Carrodeguas (Universidad de Zaragoza)

Tabla 1.9. Líneas celulares.

2. MÉTODOS

2.1 Cultivos bacterianos

El trabajo de cultivo de bacterias se desarrolló en condiciones asépticas. Todo el material utilizado y los medios de cultivo fueron previamente esterilizados para evitar el crecimiento de organismos contaminantes y el trabajo se realizó manteniendo las condiciones de esterilidad, trabajando en la proximidad de la llama de un mechero Bunsen.

Una vez concluida cada sesión, el sitio de trabajo se limpió con etanol al 70% y los residuos se desecharon convenientemente.

2.1.1 Medios de cultivo

El medio de cultivo bacteriano empleado en este trabajo fué medio líquido LB (Luria-Bertani). Para preparar un volumen de un litro de LB, se disolvieron 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl en agua destilada. Aquellas bacterias transformadas con vectores lentivirales, se crecieron en medio LB pero con la mitad de concentración de NaCl. A este medio se le denominó LB-Low Salt. El medio se esterilizó en autoclave a 120°C y 1 atm de presión durante 20 minutos. Una vez terminado este proceso, la disolución se dejó enfriar hasta 55°C y se añadió la cantidad de antibiótico correspondiente, si era preciso, o bien se almacenó a 4°C hasta su uso.

Las placas de LB-agar, se prepararon del mismo modo que el medio LB líquido, pero añadiendo 15 g de agar/litro, antes de esterilizar. Del mismo modo, una vez enfriado a 55°C se añadió la cantidad de antibiótico necesaria para alcanzar una concentración final de 100 µg/ml de ampicilina, o 50 µg/ml de kanamicina. A continuación, se vertieron unos 25 ml en cada placa de Petri de 10 cm, dejándolas solidificar. Finalmente, se almacenaron a 4°C de forma invertida y protegidas de la luz, hasta su uso.

2.1.2 Generación de bacterias químicamente competentes

La preparación de bacterias competentes se llevó a cabo mediante un procedimiento químico, consistente en la permeabilización de la membrana de las bacterias DH5 α al DNA plasmidico, al enfriar las células en presencia de cationes divalentes.

Para ello se partió de 5 ml de bacterias DH5 α crecidas a 37°C durante toda la noche, y se inocularon en 500 ml de LB. Se incubaron a 37°C en agitación hasta alcanzar una densidad óptica a $\lambda=600$ nm (OD600) de 0,4-0,6. Para detener el crecimiento, el cultivo se incubó durante 30 min a 4°C. Pasado este tiempo se realizó una centrifugación a 4.000 rpm durante 20 min en centrífuga refrigerada a 4°C, para sedimentar las bacterias, que posteriormente se resuspendieron en tampón CM1 (NaAc 10 mM pH=5,6; MnCl₂ 50 mM; NaCl 5 mM). La mezcla se mantuvo a 4°C durante 20 min. Pasado este periodo de incubación, se volvió a centrifugar durante 10 min a 4.000 rpm, y el pellet bacteriano se resuspendió en 10 ml de tampón CM2 (NaAc 10 mM pH=5,6; MnCl₂ 5 mM; CaCl₂ 70mM, y glicerol al 15%), preparándose así para su congelación en alícuotas de 50 μ l.

2.1.3 Transformación de bacterias competentes

Una vez obtenido nuestro constructo de interés, bien por ligación de un producto de PCR en el vector pCR2.1® o por subclonación de un determinado inserto en otro vector (ver apartado 2.5.6), se realizó la transformación de esta construcción en las bacterias químicamente competentes *E.coli One Shot® de Invitrogen (INV α F', DH5 α)*, o bien en bacterias DH5 α competentes preparadas en nuestro laboratorio según se indica en el apartado 2.1.2.

En primer lugar, se descongeló en hielo una alícuota de 50 μ l de las bacterias competentes (almacenadas a -80°C), para cada transformación a realizar. Una vez descongeladas, se añadieron 2 μ l de la ligación (procedentes de un volumen total de 10 μ l) o el correspondiente volumen para añadir entre 20 y 50 ng del constructo, mezclando suavemente con la punta de la pipeta. A continuación se incubaron en hielo durante 30 minutos. Tras la incubación se realizó el choque térmico, a 42°C durante 30 segundos en el caso de la cepa INV α F' o a 42°C durante 45 segundos para las bacterias DH5 α , sin agitación. Rápidamente, se transfirieron los viales al baño de hielo y se incubaron durante 2 minutos.

Una vez realizado el choque térmico, se añadieron 250 μ l de medio SOC a temperatura ambiente en cada vial, y a continuación, se incubaron a 37°C durante 1 hora a 225 rpm, en agitación horizontal. Finalmente se sembraron entre 50 y 250 μ l de cada vial de transformación, en placas de LB-agar conteniendo el antibiótico de selección y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

Para la preparación del medio SOC, se preparó una disolución conteniendo Bacto triptona 2% (p/v), Bacto yeast extract 0,5% (p/v) y NaCl 0,05% (p/v). Tras ajustar el pH a 7,0 y esterilizar, se añadió en condiciones asépticas MgCl₂ 10 mM y Glucosa 20 mM.

2.1.4 Siembra de bacterias en placas de LB-agar y en medio líquido LB

Para seleccionar aquellas colonias que expresan el plásmido con el que se habían transformado previamente, se utilizaron placas de LB-agar conteniendo el antibiótico deseado. Dichas placas se prepararon con antelación (ver apartado 2.1.1).

Antes de sembrar las bacterias transformadas, las placas de LB-agar conteniendo el antibiótico de elección se atemperaron a 37°C durante 30 minutos.

Cuando las bacterias fueron transformadas con un producto de ligación que utilizase como vector pCR2.1® linearizado en el gen *LacZα*, el cual permite la inserción directa de un producto de PCR en el vector plasmídico, se añadieron a la placa de LB-agar 40 µl de una disolución de X-Gal (SIGMA) 40 mg/ml en dimetilformamida, con el fin de seleccionar las bacterias positivas. Esta disolución se repartió por toda su superficie, dejando que el líquido se absorbiera convenientemente antes de proceder a la siembra de las bacterias.

Se sembraron entre 50 y 250 µl de cada vial de transformación, en placas de LB-agar conteniendo el antibiótico adecuado, con la ayuda de un asa de siembra de vidrio, esterilizada previamente a la llama con etanol.

Finalmente, se introdujeron las placas de forma invertida, en el incubador o estufa a 37°C, donde se mantuvieron durante 16-18 horas. El resto de la mezcla de transformación, se conservó a 4°C para volver a sembrar un volumen mayor, en caso de obtener un número reducido de colonias.

La siembra de bacterias en medio LB líquido, se realizó partiendo de una colonia procedente de una placa de LB-agar o de un glicerol (ver apartado 2.1.6), con ayuda de un palillo o una punta amarilla estériles y se crecieron a 37°C, en agitación (225 rpm) durante toda la noche.

2.1.5 Identificación de colonias positivas

En el caso de la transformación de las bacterias competentes con el sistema TA Cloning® Kit, la identificación de colonias positivas se realizó en primer lugar, por selección de colonias de color blanco. Al incorporar el inserto, el gen *LacZα* del vector pCR2.1, queda interrumpido, impidiéndose la expresión de la β-galactosidasa, dando lugar a colonias de color blanco. En el caso contrario, cuando no se incorpora el inserto en el vector, la β-galactosidasa hidroliza un enlace de la molécula de X-Gal que cambia a color azul, color que desarrolla la colonia bacteriana. De este modo, podemos distinguir rápidamente las colonias que tienen el vector más inserto de aquellas que tienen el vector pero no han incorporado inserto. Hemos de ser conscientes de la existencia de posibles falsos positivos.

Cuando la transformación se lleva a cabo con un vector que carece del sistema de identificación comentado anteriormente, una media de 5 colonias por cada placa de LB agar fueron seleccionadas al azar.

Las bacterias seleccionadas, mediante cualquiera de los dos métodos señalados, fueron sembradas en 5 ml de medio LB líquido con el antibiótico correspondiente, según fuese la resistencia obtenida por la incorporación del plásmido. A partir del cultivo bacteriano en medio líquido, se procedió a la purificación del DNA plasmídico (ver apartado 2.5.2.2) y a la identificación de la correcta incorporación del inserto deseado, mediante PCR (ver apartado 2.5.5.4) o mediante corte por enzimas de restricción (ver apartado 2.5.6.2.A). Posteriormente, si el clon bacteriano era positivo para la incorporación del inserto, se secuenció el fragmento incorporado a la caja de clonado del vector, para verificar la ausencia de mutaciones en la construcción.

2.1.6 Conservación de las colonias de interés

Las colonias de interés, partiendo del cultivo líquido fresco, se congelaron en glicerol al 15% como agente crioprotector. Se hicieron alícuotas de 0,85 ml de bacterias en medio LB y 0,15 ml de glicerol. Los criotubos se conservaron y almacenaron a -20°C y a -80°C.

La descongelación de las cepas para su uso posterior se realizó en hielo y, antes de la completa descongelación del criovial, se raspó con ayuda de un palillo un poco su superficie, y se inocularon 5 ml de LB líquido con el antibiótico correspondiente. A continuación, se incubaron a 37°C en agitación durante 16-18 horas.

2.2 Cultivos celulares eucariotas

El cultivo de las líneas celulares se realiza en el interior de una cabina de flujo laminar de seguridad tipo II, a fin de evitar su contaminación con microorganismos del ambiente. Todo el material empleado en la manipulación, precisa de esterilización (en la casa comercial, o en el propio laboratorio). Los reactivos eran estériles o bien se filtraron a través de filtros de 0,22 µm.

La superficie de trabajo se limpió tras su uso con etanol al 70%, y finalmente se expuso a radiación ultravioleta durante al menos 15 minutos. Cuando se manipularon lentivirus se hizo una limpieza adicional con lejía al 50%.

Los conductos empleados para la aspiración de los medios de cultivo (mediante bomba de vacío), se lavaron con lejía al 20% tras cada uso y al finalizar la sesión de trabajo.

Todo el material sometido a contacto directo con el cultivo celular se recogió en contenedores apropiados y fueron retirados por empresas especializadas.

Aproximadamente una vez al mes, se procedió a la limpieza de todo el equipamiento (baño, campanas e incubadores) con etanol al 70%. Una vez limpio, el baño se rellenó de agua y se añadió cloruro de benzalconio al 1% (v/v).

2.2.1 Medios de cultivo

Para el crecimiento de las distintas líneas de fibroblastos de ratón usadas en este trabajo, se utilizó un medio de cultivo preparado a partir de medio comercial DMEM (GIBCO®) rico en glucosa (4,5 g/l), con piruvato de sodio (0,11 g/l) y glutamina (584 mg/l), suplementado con suero fetal bovino (SFB, de Invitrogen) al 5%, el cual aporta proteínas y factores de crecimiento, y un 1% de una mezcla de antibióticos (10.000 unidades/ml de penicilina G sódica y 10.000 µg/ml de sulfato de estreptomicina) de Invitrogen, para evitar una posible contaminación con bacterias.

Las líneas celulares murinas inmortalizadas TM, E9, C57, NZB y las líneas 77-82, así como la línea HEK 293T, que contienen mtDNA funcional, se cultivaron en el medio anteriormente descrito.

Los cultivos primarios de fibroblastos de ratón con mtDNA funcional (ρ^+), se cultivaron en el medio anteriormente descrito preparado con un contenido final del 20% en SFB durante los primeros días tras el establecimiento del cultivo, y se redujo al 10% en los días siguientes.

Las líneas celulares carentes de mtDNA, se cultivaron en un medio específico que lleva su nombre (medio ρ^0), con un aporte extra de uridina 50 µg/ml. Cabe destacar que el SFB aporta al medio una cantidad indeterminada de uridina pero que no es suficiente para el crecimiento óptimo de esta línea celular.

La línea celular mutante en complejo III, A22, se cultivó en medio ρ^0 . Sin embargo, la línea mA22 (que presenta las mitocondrias de A22), se cultivó en medio normal o medio de galactosa, por poseer un mecanismo supresor de la mutación en *Mt-Cyb*.

El medio de galactosa, usado cuando deseamos que las células obtengan su energía principalmente a través del sistema de fosforilación oxidativa, se preparó partiendo del medio comercial DMEM (GIBCO®) carente de glucosa y piruvato, al que se le añadió 4,5 ó 0,9 g/l de galactosa, 0,11g/l de piruvato de sodio (ambos de SIGMA), 5% de SFB y un 1% de la mezcla de antibióticos.

El medio carente de uridina, se preparó a partir del medio comercial DMEM (GIBCO®) rico en glucosa (4,5 g/l), con piruvato de sodio (0,11 g/l) y glutamina (584 mg/l), suplementado con suero fetal bovino dializado (dSFB) al 5% y un 1% de la mezcla de antibióticos.

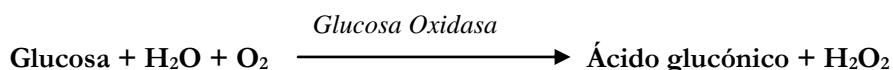
2.2.1.1 Diálisis del suero fetal bovino

La diálisis del suero permite eliminar la uridina y la glucosa presentes en el suero fetal bovino comercial.

En nuestro sistema de estudio de mutaciones implicadas en el funcionamiento OXPHOS se usan dos medios de selección que permiten distinguir la posible naturaleza de las mutaciones. Uno de estos medios es aquel en el que se sustituye la fuente de carbono de glucosa por galactosa. El segundo, centrado en averiguar si el complejo III y/o IV están implicados en el fenotipo, incluye la selección en un medio que carezca de uridina.

En el proceso de diálisis se utilizaron membranas con tamaño de exclusión igual o menor que 12.000 kDa, de 6 mm de diámetro con capacidad de 10 ml/ft, en tampón PBS (NaCl 9 g/l, K₂HPO₄ 0,5 M y KH₂PO₄ 0,5 M) a 4°C y con agitación. Se utilizó una relación de tampón a suero de 10:1 y se hicieron cambios de tampón una vez cada 4 ó 12 horas, (cuando coincidía con las noches), durante tres días. Se hicieron al menos 10 cambios de medio.

La cuantificación de la cantidad de uridina presente en un medio de reacción es algo complejo pero no así la de la glucosa. Para determinar la cantidad de glucosa remanente en el suero tras las diálisis se llevó a cabo la reacción de la glucosa oxidasa (reactivo Trinder, SIGMA) en el electrodo de oxígeno y por espectrofotometría. En el primer método se medía la desaparición de oxígeno fruto de la reacción con la glucosa. En el segundo, se medía la cantidad de glucosa mediante una segunda reacción colorimétrica acoplada a la primera.



2.2.2 Establecimiento de cultivos primarios

La mayor parte de las líneas celulares utilizadas durante este trabajo han sido líneas celulares inmortalizadas o estables, disponibles en nuestro laboratorio. Sin embargo, también se requirió el establecimiento de cultivos primarios a partir de los animales recogidos en el apartado 1.8 de esta sección.

El tipo celular escogido como modelo de estudio fueron fibroblastos de ratón adulto. Para el establecimiento del cultivo primario se hizo un explante de piel de la oreja del animal y se lavó en un Falcon de 15 ml en etanol al 70%, durante un periodo máximo de una hora. A continuación, se procedió a lavar el pedazo de oreja con PBS estéril sobre una placa de Petri en el interior de la cabina de flujo laminar. Seguidamente, con la ayuda de pinzas y de bisturí, se fragmentó el tejido en trozos de 1 mm² aproximadamente y se introdujeron en un tubo Falcon de 15 ml, conteniendo 6 ml de medio de cultivo DMEM (GIBCO®) rico en glucosa (4,5 g/l), con piruvato de sodio (0,11 g/l) y glutamina (584 mg/l), suplementado con suero fetal bovino (SFB, Invitrogen) al 20% y colagenasa 1X. Se incubó durante toda la noche a 37°C y 5% de CO₂ en el interior del incubador para cultivo celular.

Al día siguiente, se sedimentaron los trozos de tejido y las células disgregadas mediante centrifugación a 1.500 x g durante 10 min. El pellet se lavó con 4 ml de PBS estéril y se centrifugó en las mismas condiciones. El lavado se repitió dos veces. Finalmente el sedimento se resuspendió en 1 ml de medio al 20% en SFB y se sembró en placa de 60 mm de diámetro, y el cultivo se mantuvo en el incubador a 37°C y 5% de CO₂, efectuándose un cambio de medio cada 2 días.

Para la preparación de la colagenasa 6X, en condiciones estériles se inyectaron 22 ml de PBS estéril en el vial que contiene 1 g de colagenasa I y se agitó el vial hasta la completa disolución del polvo. Con la misma jeringa se recogió la solución de colagenasa y se filtró a través de un filtro de 0,22 µm. Se añadieron 198 ml de PBS estéril y tras mezclar bien se hicieron alícuotas de 8 ml.

2.2.3 Inmortalización de cultivo primario

A excepción de algunos derivados de tumores, la mayoría de los cultivos celulares primarios tienen un periodo de vida limitado. Después de un cierto número de divisiones las células entran en el proceso de senescencia por lo que dejan de dividirse. Por ello los cultivos primarios establecidos se sometieron a la transfección con el plásmido lentiviral pLOX-Ttag-iresTK (Tronolab), que permite la inserción estable en el genoma de las células del antígeno Large T (Tag) del virus SV40 de simios, lo cual conduce a la desprogramación del ciclo celular sin necesidad de la expresión de otras oncoproteínas y a la inmortalización del cultivo.

La transfección de las células de interés se realizó mediante infección viral siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.2.9.2.

Las células transfectadas eficientemente con el vector pLOX-Ttag-iresTK, fueron naturalmente seleccionadas tras los siguientes subcultivos, al entrar en senescencia aquellas que no fueron infectadas y que, consecuentemente, no expresaron el antígeno Large T. El contenido en SFB del medio de cultivo fue disminuyéndose progresivamente a un 10% y finalmente al 5%.

2.2.4 Generación y aislamiento de líneas celulares mutantes en su mtDNA

Con el objetivo de crear mutaciones al azar en el mtDNA de células de ratón utilizamos un protocolo puesto a punto en nuestro laboratorio (Bayona-Bafaluy 2001; Acin-Perez, Bayona-Bafaluy et al. 2004).

Para inducir las mutaciones, la línea celular se cultivó durante dos días en presencia de 30 µg/ml del agente mutágeno TMP (*Trimethyl-psoralen*) cambiando el medio cada 24 h. Una vez transcurrido ese tiempo, las células se tripsinizaron, se resuspendieron en medio

de cultivo ρ^0 y se añadieron a una placa de 100 mm de diámetro. La placa que contenía las células se colocó abierta sobre un recipiente con hielo y las células se irradiaron con luz ultravioleta en el crosslinker ($4.400 \times 100 \mu\text{J}/\text{cm}^2$). Tras la irradiación las células se dejaron recuperar durante 3 ó 4 días cambiándoles el medio frecuentemente.

Seguidamente, las células fueron tratadas con bromuro de etidio ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$) durante 10-12 días para reducir el número de copias de mtDNA a una sola copia por célula.

Tras un tiempo de recuperación de 15 días, las células se sembraron en placas de microcultivo de 96 pocillos a una densidad de 0,8-1 células/ml. Cada uno de los clones obtenidos se recogió y se sembró en dos pocillos de placa de 96. Uno de los pocillos contenía medio de glucosa y el otro de galactosa. Los clones que morían o crecían con dificultad en el medio de galactosa se recogieron del pocillo de glucosa para expandirlos y caracterizarlos.

En el caso de la línea mA22, esta se generó mediante una segunda mutagénesis sobre la línea A22 con resistencia a puromicina (línea mutante en el *Mt-Cyb*, y por tanto incapaz de crecer en medio carente de uridina) mediante el procedimiento anteriormente descrito. La selección de las células mA22 represoras de la mutación, se llevó a cabo mediante el cultivo en medio carente de uridina, tras la replicación de los clones obtenidos. En este caso, la línea de interés era aquella capaz de sobrevivir en este medio.

2.2.5 Generación de híbridos transmitocondriales

En algunos casos, nos interesó ver el comportamiento de un determinado tipo de mtDNA en un contexto nuclear diferente al propio de la célula original. La generación de los híbridos requiere el establecimiento de una línea celular carente de mtDNA que actúa como receptora de mitocondrias, la cual puede ser una línea rho cero (que posee mitocondrias pero no mtDNA) o bien puede generarse por inactivación de las mitocondrias mediante un tratamiento con rodamina-6-G, y una línea donadora de mitocondrias que se ha de someter a un proceso de enucleación. Ambos tipos celulares han de fusionarse para dar lugar al híbrido transmitocondrial.

2.2.5.1 Eliminación de mitocondrias mediante tratamiento con Rodamina-6-G

El tratamiento con rodamina-6-G (R6G), permite eliminar las mitocondrias de una línea celular, ya que este compuesto tiene afección por las mismas, uniéndose de forma irreversible a la membrana mitocondrial e inactivándolas. Las células tratadas con R6G son incapaces de sobrevivir a menos que sean repobladas con mitocondrias intactas.

Así pues, las células receptoras de mitocondrias se cultivaron durante 3 días con medio ρ^0 suplementado con $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ de R6G, cambiando el medio cada 24 h. La droga se eliminó del medio 2 h antes de la fusión, y se continuó como se describe en el apartado 2.2.5.3.

Para aumentar la eficiencia de la fusión se utilizaron 4 placas de células donadoras de mitocondrias y se tripsinizaron una vez enucleadas para añadirlas sobre las receptoras, evitando así la manipulación de las células tratadas con R6G (Acín-Pérez 2004; Acín-Pérez, Bayona-Bafaluy et al. 2004).

2.2.5.2 Enucleación de las células donadoras de mitocondrias

Antes de fusionar las líneas carentes en mtDNA con aquellas que les van a proveer de las mitocondrias de interés, estas últimas han de someterse a un proceso por el que sus núcleos son eliminados. Esta enucleación consiste en la desestabilización del

citoesqueleto celular mediado por citocalasina B, seguido de un proceso físico (centrifugación) tras el cual los núcleos se desprenden de las células que los contienen.

Para ello se sembraron las líneas celulares donadoras de mitocondrias, o citoplastos, en placas de 40 mm de diámetro y se dejaron crecer hasta 2/3 de confluencia. La enucleación se llevó a cabo en botellas de centrífuga de 250 ml previamente esterilizados en autoclave a los que se añadieron:

- 30 ml de DMEM con SFB al 5%.
- 0,32 ml de Citocalasina B (SIGMA, 1 mg/ml en etanol).

Se tomó 1 ml de este medio y se añadió sobre la placa de cultivo en la que estaban sembradas las células donadoras, y se incubó durante una hora a 37°C y 5% CO₂ en el incubador.

Pasado este periodo, las placas se lavaron con etanol al 70% y se introdujeron en los tubos de centrífuga abiertas y boca abajo, de modo que las células quedasen enfocadas hacia el medio de enucleación, y se centrifugaron 20 minutos a 6.500-7.000 rpm. a 30°C en un rotor JA-10. Las tapas de las placas de cultivo se guardaron en la campana para su uso posterior.

Tras la centrifugación, y dentro de la cabina de flujo laminar, las placas fueron extraídas con ayuda de unas pinzas estériles, se limpió su superficie exterior con etanol 70%, y se cubrieron con sus correspondientes tapas.

Con el fin de evitar la proliferación en el cultivo de aquellas células que no se hubieran enucleado eficazmente, se trataron durante una hora en presencia de 1 ml de medio suplementado con uridina 50 µg/ml y conteniendo Mitomicina C (Cf=10 µg/µl), en el interior del incubador.

A continuación se procedió a la fusión de los citoplastos o células donadoras de mitocondrias a las células receptoras.

2.2.5.3 Fusión

De modo paralelo, se tripsinizaron las células receptoras y donadoras de mitocondrias y se sedimentaron. Los citoplastos se resuspendieron en 2 ml de medio DMEM suplementado con 5% SFB. A continuación, se añadieron suavemente sobre el pellet de células receptoras tratadas con R6G o células ρ^0 , y sin remover el precipitado, la mezcla se centrifugó inmediatamente a 1.200 rpm durante 10 minutos, para facilitar el contacto entre ambas. Se aspiró cuidadosamente todo el sobrenadante y se añadieron 100 µl de PEG al 42% para favorecer la fusión de membranas celulares, mezclando el precipitado. Cuando el precipitado estaba casi resuspendido se empezó a contar 1 minuto continuando la resuspensión durante 30 segundos más. Una vez transcurrido el tiempo se añadieron 6 ml de medio ρ^0 sobre las células y se procedió a centrifugar a 1.000 rpm durante 3 minutos, para eliminar restos de PEG. Tras la centrifugación, las células se resuspendieron en 6 ml de medio suplementado con 5% SFB y uridina (Cf=50 µg/ml), y seguidamente se sembraron en una placa de 60 mm de diámetro.

La selección de los clones de interés comenzó transcurridos 2 días desde la siembra, mediante selección antibiótica y metabólica.

2.2.6 Siembra y mantenimiento celular

Las células se sembraron en placas aptas para cultivo celular, de 40, 60, 100 y 150 mm de diámetro, en función de las necesidades, a una densidad entre 10.000-100.000 células/ml de medio de cultivo, a las que se les añadieron 0,2 ml de medio de cultivo/cm² de superficie de la placa.

Los cultivos se mantuvieron durante su crecimiento en un incubador a 37°C, en una atmósfera húmeda conteniendo un 5% de CO₂, cambiándoles el medio periódicamente cada 2 ó 3 días. Cuando los cultivos celulares se sometieron a la acción de ciertos compuestos químicos, como inhibidores de la cadena de transporte electrónico, el medio se renovó cada 24 h.

Ya que todas las líneas celulares utilizadas en este trabajo son adherentes, la resiembra se llevó a cabo por tripsinización. Para ello, tras eliminar el medio de cultivo por succión, las células se lavaron con PBS (GIBCO®), con el fin de eliminar las proteínas del suero que inhiben la acción de la tripsina. A continuación, una vez eliminado el PBS de la placa, se añadieron 0,033 ml/cm² de 0,05% tripsina (SIGMA) y 0,02% EDTA en PBS (esterilizado mediante filtros de 0,22 µm de tamaño de poro StericupTM de Millipore), y se incubó durante 2–3 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo, se comprobó que las células se habían despegado de la placa y se añadió el volumen suficiente de PBS suplementado con 10% de SFB (inhibe la tripsina), para recoger las células en suspensión y pasarlas a un tubo Falcon de 15 ml. Tras centrifugar durante 5 minutos a 1.500-2.000 rpm, el pellet celular resultante fue resuspendido en el volumen suficiente de medio de cultivo para su división, recuento (ver apartado 2.2.7) o congelación (ver apartado 2.2.11).

Todos los medios usados para lavar, tripsinizar, centrifugar y cultivar las células se precalentaron antes de su uso, en un baño de agua a 37°C.

2.2.7 Recuento celular

Para el recuento celular se utilizó una cámara de Neubauer de líneas claras. Se trata de un portaobjetos con una depresión en el centro, en el fondo de la cual se ha marcado con la ayuda de un diamante una cuadrícula que consta de 9 cuadrantes. El lado de cada uno de ellos mide 1 mm. La depresión central del cubreobjetos está hundida 0,1 mm respecto a la superficie, de forma que cuando se cubre con un cubreobjetos el volumen que por capilaridad ocupa cada cuadrante es 0,1 milímetro cúbico, es decir 0,1 microlitro. Así el número de células en cada cuadrante es el número de células que tenemos por 0,1 microlitro.

El procedimiento consiste en resuspender las células una vez sedimentadas en el volumen deseado de medio de cultivo o PBS y tomar una alícuota de 50 µl en un tubo Eppendorf. Antes de proceder al recuento celular, la alícuota se diluyó a la mitad con el colorante Azul Trypan (FLUKA) al 0,4% en NaCl 0,15 M. El azul trypan es un coloide que se introduce en el interior de las células que presentan roturas en la membrana. Así podemos establecer el número de células viables en nuestra solución, que serán aquellas que permanezcan translúcidas, si simplificamos la viabilidad celular al único criterio de integridad de membrana.

Habitualmente se cuenta el número de células dispuestas en los cuatro cuadrantes de las esquinas, que debe estar comprendido entre 100 y 300 para que la estimación sea fiable. Teniendo en cuenta el volumen de cada cuadrante, el número de cuadrantes

contados y la dilución de la alícuota el número de células en la muestra original por ml viene dado por la siguiente fórmula:

$$\text{Nº células/ml} = (\text{nº células contadas}) \times \frac{10.000 \text{ (factor de conversión: de } 0,1\mu\text{l/ml) } \times 2 \text{ (dilución)}}{\text{nº de cuadrantes contados.}}$$

2.2.8 Curvas de crecimiento

La determinación de la velocidad de crecimiento celular en distintas condiciones (diferentes medios de cultivo, presencia de inhibidores...), se llevó a cabo mediante curvas de crecimiento, donde se calculó el tiempo de duplicación (DT).

Para realizar este ensayo, se utilizaron placas de microcultivo de 12 pocillos (o de 6 pocillos para el último día). El experimento se realizó durante 5 días, sembrando un pocillo para cada día y para cada condición, con 50.000 células de la línea celular sujeta a estudio.

Todas las células se sembraron en el mismo medio conteniendo glucosa y uridina. Una vez se hubieron adherido las células a la placa (entre las 16 y 24 horas posteriores), se realizó el recuento correspondiente de las células de los pocillos a tiempo=0 horas, estimándose de este modo la eficiencia de siembra. El resto de pocillos se lavaron con PBS y se puso el medio de cultivo correspondiente: medio con galactosa 5 ó 25 mM, glucosa 5 ó 25 mM, medio carente de uridina etc... Cada 24 horas se procedió a la tripsinización y cuenta de las células presentes en los pocillos correspondientes, así como al cambio de medio de los pocillos restantes.

Para calcular el tiempo de duplicación, se representó en una gráfica el nº de células frente al tiempo transcurrido (horas) y se ajustó a una curva exponencial del tipo:

$$N = a e^{bt}, \text{ donde } a \text{ es el nº de células a tiempo } (t) = 0$$

A partir de esta ecuación, y teniendo en cuenta que el crecimiento celular es exponencial ($a=1$ y $N=2$), obtenemos el tiempo de duplicación: $DT = \ln(2)/b$

2.2.9 Transfección celular

La generación de distintas líneas celulares que expresan una determinada proteína de manera estable o transitoria, se llevó a cabo mediante transfección mediada por agentes químicos y lentivirus.

2.2.9.1 Transfección química

Esta técnica permite introducir en la línea celular eucariota un DNA exógeno, mediante la formación de un complejo con determinados compuestos químicos. Los reactivos comerciales empleados fueron FuGENE[®]6 (Roche) ó FuGENE[®]HD Transfection Reagent (Roche), formados por una mezcla de lípidos y otros componentes disueltos en etanol al 80%. Estos reactivos forman un complejo con el DNA y lo transportan al interior de las células animales.

El día anterior a la transfección, se sembraron las células a una densidad adecuada para alcanzar entre el 50 y el 80% de confluencia, y se procedió tal y como se indica en las instrucciones del fabricante.

Previamente a la transfección química, las células eucariotas se trataron con cloroquina a una concentración final de 25 μ M en medio completo durante 1 hora en el incubador a 37°C y 5% de CO₂. La cloroquina es una sustancia química que multiplica por cuatro la

eficiencia de transfección. El mecanismo de acción no está completamente esclarecido, pero al parecer se une al DNA e inhibe la degradación intracelular por las hidrolasas lisosomales. Pasada la hora de incubación, se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco, y se añadió el complejo DNA-FuGENE, según las indicaciones del fabricante.

2.2.9.2 Transfección mediada por lentivirus

Este método se utilizó por su elevada eficiencia de transfección, además de permitir la inserción estable del DNA de interés en el genoma de la célula diana.

El proceso de transfección celular con lentivirus consta de dos etapas, una primera para la transfección de las células empaquetadoras con los plásmidos virales; y una segunda en la que las partículas virales producidas en el interior de las células empaquetadoras y liberadas al medio, se ponen en contacto con las células dianas y estas son infectadas. En su interior, el genoma viral modificado va a integrarse en el genoma celular de forma estable, de modo que el DNA de interés pasa a replicarse, transcribirse, y en definitiva expresarse conjuntamente al propio de la célula.

Transfección química de las células empaquetadoras

En la primera etapa, 2×10^6 células productoras HEK 293T se incuban con cloroquina a una concentración final de 25 μM en medio completo durante 1 hora en el incubador a 37°C y 5% de CO₂.

Durante ese tiempo se prepara un complejo entre el DNA plasmídico del vector + inserto, el plásmido para la envoltura, el plásmido de la cápside y el reactivo FuGENE® 6 Transfection Reagent (Roche) en medio sin suplementar (Ver tabla 2.2.9.2). Como ya se ha indicado previamente, este reactivo es una mezcla de compuestos químicos que forman un complejo con el DNA y lo transportan al interior de las células animales.

La mezcla se incubaba a temperatura ambiente entre 15 y 45 minutos.

Reactivo	Masa	Volumen
Vector +Gen de interés	10 μg	0,5-50 μL totales de DNA
PMD2.G (env)	3,5 μg	
psPAX2 (gag)	6,5 μg	
FuGene	3 μL : 1 μg DNA	(60 μL Fugene para los 20 μg de DNA)
DMEM sin nada añadido:	1 ml- vol _{DNA} - vol _{FuGene}	Hasta 1 ml

Tabla 2.2.9.2. Reactivos para la transfección.

Pasada la hora de incubación con cloroquina se retira el medio a las 293T y se les añade nuevo medio suplementado con SFB y antibiótico. Sobre la placa se añade el complejo DNA-FuGene gota a gota y se deposita la placa nuevamente en el incubador. Este medio debe sustituirse por uno limpio 8 horas tras la transfección.

En las 48 horas siguientes a la transfección estos plásmidos se replican y expresan el arsenal de proteínas necesarias para la encapsidación del vector y las proteínas de la cápside que se ensamblan, y proteínas de la envoltura que van a ubicarse a nivel de membrana plasmática. La célula 293T comienza la producción de partículas virales. Solamente el vector de expresión de nuestro gen de interés posee en *cis* la señal necesaria para la encapsidación y va a transmitirse a través del virión, que escapa de la célula empaquetadora, liberándose así al medio de cultivo, por un fenómeno de extrusión.

Infeción de las células diana

La segunda etapa consiste en la infección de la célula de interés o diana con las partículas virales producidas en las 293T, que van a liberar el plásmido en el núcleo celular, donde se inserta.

Para ello, transcurridas 48 y 72 horas desde la transfección química de las células empaquetadoras, se recogió el medio que contenía las partículas virales y se centrifugó a 1.500-2.000 rpm, y se filtró el sobrenadante a través de un filtro de 0,45 µm de diámetro para evitar la contaminación con las células productoras de virus. Este medio se añade a una placa donde están sembradas las células diana de interés (habitualmente 150.000), tras la adición de polibreno Cf= 8 µg/ml, que ayuda a la infección viral.

En el proceso de infección se extremó el cuidado en la manipulación, así como la limpieza del material, utilizando lejía en todo aquello que haya entrado en contacto con las partículas infecciosas.

2.2.10 Análisis de contaminación por micoplasma y tratamiento

Los micoplasmas son bacterias carentes de pared celular que frecuentemente parasitan los cultivos celulares, especialmente cuando se cultivan células de origen humano. Por ese motivo, el control de contaminaciones por micoplasma se llevó a cabo de forma periódica y rutinaria mediante la técnica de PCR.

Para ello, se recogió medio del cultivo sujeto a análisis que había estado en contacto con las células durante al menos 48 horas y se incubó durante otras 48 horas a 37°C.

Transcurrido el período de incubación se tomaron 2 µl de dicho medio y se utilizaron como molde para una reacción de PCR de 50 µl de volumen final.

Los oligos empleados, Myc A (5' GGCGAATGGGTGAGTAACACG 3') y Myc B (5' CGGATAACGCTTGCGACCTATG 3'), son capaces de reconocer las ocho especies más comunes de micoplasma (*M. hyorhinitis*, *M. arginini*, *M. pneumoniae*, *M. fermentans*, *M. orale*, *M. pirum*, *Acholeplasma laidlawii* y *Spiroplasma mirum*).

Las condiciones y el protocolo para preparar una PCR se describen más adelante (2.5.5). El programa de PCR utilizado sigue el esquema señalado en el apartado 2.5.5.2, con una temperatura de alineamiento de cebadores de 60°C y un tiempo de elongación de 1 min. En caso de contaminación, se obtiene un producto de PCR de 500 pb.

Para el tratamiento de los cultivos contaminados por micoplasma, se utilizó un kit de Roche, BM-Cyclin, que consta de dos compuestos, BM Cyclin 1 (25 mg) y BM Cyclin 2 (12,5 mg), que se reconstituyen en 10 ml de PBS estéril (250X).

El medio de los cultivos contaminados se eliminó y se cambió por uno nuevo que contenía 10 µg/ml del compuesto BM Cyclin 1. Las células se cultivaron normalmente durante 3 días. Transcurrido ese tiempo, se cambió el medio por uno que contenía 5 mg/ml de BM Cyclin 2 y se mantuvo durante 4 días. Este ciclo se repitió dos veces más y una vez terminado el tratamiento, se comprobó la ausencia de contaminación por micoplasmas.

2.2.11 Congelación y descongelación celular

Es importante disponer de alícuotas congeladas de las líneas celulares con el fin de minimizar la acumulación de cambios genéticos en las mismas, y evitar la pérdida accidental de una línea por muerte o contaminación.

Las células a congelar se crecieron hasta un 70-80% de confluencia en placa de 100 mm, se tripsinizaron y se recogieron por centrifugación tal como se detalla en el apartado (2.2.6). El pellet celular obtenido, se resuspendió en 500 µl de medio de congelación (DMEM con 10% de SFB y 10% de Dimetilsulfoxido (DMSO, de SIGMA), como agente crioprotector) pasándolo a un tubo criogénico resistente a N₂ líquido, convenientemente etiquetado. La suspensión celular se congeló lentamente (descenso de aproximadamente 1°C/min). Para ello los criotubos se llevaron rápidamente a un congelador a -80°C, donde se almacenaron durante al menos durante 4 horas en el contenedor de congelación con isopropanol (NALGENE® Mr. Frosty™ Cryo 1°C Freezing Container). Al día siguiente, se pasaron a un contenedor de N₂ líquido donde pueden mantenerse durante largos períodos de tiempo (años) sin deterioro celular apreciable. El almacenamiento a temperaturas tan bajas como -80°C es posible aunque se detecta deterioro de las células a las pocas semanas y/o meses.

La descongelación de los stocks almacenados, se realizó rápidamente, diluyendo la suspensión y el agente preservante (DMSO) con la mayor rapidez. Para ello, se tomó el vial indicado del tanque de N₂ líquido y se descongeló en un baño a 37°C, tras lo cual se añadió la suspensión celular resultante a una placa de 100 mm² conteniendo 10 ml de medio óptimo para el crecimiento de la línea celular en cuestión. Al día siguiente, una vez que las células se adherieron a la placa, se reemplazó el medio de cultivo para eliminar la presencia de DMSO, que afecta negativamente a las células.

2.3 Purificación y permeabilización de mitocondrias

2.3.1 Purificación de mitocondrias para medidas espectrofotométricas de los complejos respiratorios

Para medir la actividad enzimática de los complejos respiratorios por espectrofotometría, se crecieron entre 5 y 12 placas de células de 150 mm de diámetro hasta su confluencia con el fin de extraer mitocondrias, siguiendo el protocolo descrito por Birch-Machin y Turnbull (Birch-Machin y Turnbull 2001).

Cuando se alcanzó la masa celular adecuada, las células se recogieron mediante tripsinización y centrifugación (10 minutos a 1.500–2.000 rpm), se lavaron dos veces, primero con PBS frío y después con medio B frío (Sacarosa 250 mM, HEPES 2 mM, EGTA 0,1 mM), y se transfirieron a un tubo Falcon de 15 ml. A partir de este momento, tanto las células como los medios se mantuvieron en hielo durante todo el proceso.

El sedimento celular resultante fue resuspendido en 2 ml de medio B y transferido a un homogeneizador Potter-Elvehjem de 2 ml con émbolo de teflón. A continuación, la mezcla se homogeneizó mediante 10 pases (arriba y abajo, 600 rpm) y se centrifugó a 3.000 rpm durante 6 minutos, a 4°C en el rotor JA 25.50 de una centrífuga Beckman Coulter.

El sobrenadante se pasó a tubos Eppendorf estériles, y el pellet se volvió a homogeneizar del mismo modo para aumentar la eficiencia de la extracción. Tras centrifugar la mezcla en las mismas condiciones, el sobrenadante resultante se transfirió a nuevos tubos Eppendorf y se centrifugaron en una microfuga a 13.000 rpm durante 6

minutos, a 4°C. Los sobrenadantes obtenidos se eliminaron y los sedimentos se resuspendieron en 1 ml de medio B juntando todos en un único tubo, que se centrifugó durante 10 minutos a 13.000 rpm, 4°C.

El pellet final se resuspendió en el volumen adecuado de medio B, según el volumen del sedimento de mitocondrias obtenido. De forma aproximada, el pellet de mitocondrias obtenido a partir de 10 placas de células de 150 mm (confluentes) se resuspendió en 200–250 µl de medio B, y se hicieron distintas alícuotas de 20 µl (5 tubos Eppendorf, al menos) y de 40 µl (2 tubos, al menos, para medir los complejos I y II). Los tubos se congelaron en N₂ líquido y se conservaron a -80°C hasta su uso.

2.3.2 Extracción y purificación de mitocondrias de células en cultivo para el análisis por Blue Native

La extracción y purificación de mitocondrias para el análisis de los complejos del sistema OXPHOS por *Blue-Native Gel Electroforesis*, se realizó partiendo de 10 placas de 150 mm al 80% de confluencia. Las células se recogieron por tripsinización (ver apartado 2.2.6) y se mantuvieron siempre en hielo a partir de este momento.

Tras la centrifugación celular a 1.750 rpm durante 10 minutos, el pellet resultante se lavó 2 veces con PBS frío o NKM 1X (NaCl 130 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 7,5mM, Tris 1 mM, pH=7,4) frío mediante resuspensión y posterior centrifugación.

A continuación, el pellet celular se congeló a -80°C durante 10 minutos, como mínimo, para facilitar la ruptura celular. Cabe destacar que, el proceso puede pararse en este momento dejando las células a -80°C hasta su utilización en días posteriores.

La ruptura celular para la extracción de mitocondrias se realizó mediante choque hipotónico. Para ello, el pellet celular una vez descongelado, 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 buscando 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 teflón tipo Potter Elvehjem rotando a 600 rpm.

La purificación de mitocondrias se realizó mediante centrifugación diferencial. Para ello, el homogenado se diluyó rápidamente a la mitad con tampón hipertónico (sacarosa 250 mM, MOPS 30 mM, pH=7,2) y, tras mezclar bien se centrifugó a 1.000 g (3.000 rpm, en el rotor JA 25.50) durante 5 minutos a 4°C, para eliminar los núcleos y las células que no se hubieran roto. Opcionalmente, una vez recogido el sobrenadante, se rehomogeneizó el sedimento en las mismas condiciones anteriormente descritas para obtener un mayor rendimiento en la extracción mitocondrial. Seguidamente, los sobrenadantes anteriores se centrifugaron a 9.000 rpm durante 10 minutos a 4° C en el rotor anteriormente citado. El pellet de mitocondrias obtenido 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 12.000 rpm durante 2 minutos, a 4°C en una microcentrífuga. Los pellets mitocondriales resultantes se resuspendieron en medio A, juntando las mitocondrias de 2 tubos Eppendorf en uno y volviendo a centrifugar en las mismas condiciones. Este paso de lavado y centrifugación se repitió hasta tener todas las mitocondrias en un único tubo lo cual permite aumentar el grado de pureza de la fracción mitocondrial (Fernandez-Vizarra 2006).

La determinación de la concentración de proteínas de la muestra se realizó mediante el método Bradford (ver apartado 2.6.2). Para ello, el pellet de mitocondrias obtenido se resuspendió en 500 µl de medio A, de los que se tomaron 4 µl para medir la concentración de proteínas, por triplicado. A continuación, se volvió a sedimentar la muestra a 12.000 rpm durante 2 minutos a 4° C, y se resuspendió 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. Llegados a este punto las mitocondrias pueden lisarse para el análisis de los complejos respiratorios por BN (apartado 2.3.4), o bien guardarse congeladas a -80°C hasta su posterior uso.

2.3.3 Purificación de mitocondrias de hígado o corazón de ratón

La extracción de mitocondrias de órganos de ratón (hígado o corazón), se realizó para llevar a cabo la caracterización de las asociaciones de los complejos respiratorios en las cepas de ratón C57BL/6J, NZB/B1NJ y los ratones Oma1^{+/+} y Oma1^{-/-} con fondo mixto C57BL/6N y 129S6/SvEvTac.

Tras el sacrificio del animal, se extrajo el hígado y/o el corazón y se lavaron con abundante medio A frío estéril (sacarosa 0,32 M, Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH=7,4) con el fin de eliminar los restos que se pudieran arrastrar de la extracción, se pasaron a tubos Falcon de 50 ml conteniendo medio A frío en su interior y se pesaron convenientemente.

Seguidamente, se cortaron en trozos de pequeño tamaño utilizando unas tijeras, y se realizaron sucesivos lavados, eliminando el medio de lavado a su paso por un colador. Una vez limpios, los fragmentos de los órganos fueron transferidos a un homogenizador y se añadieron 4 ml de medio de homogenización (Medio A) por 1 g de hígado trasvasado, o 10 ml de medio por 1 g de corazón. La homogenización se realizó en *potter* tipo Elvehjem con émbolo de teflón rotando a 600 rpm. El homogenado se transfirió a tubos de fondo redondo de plástico, de NALGENE y se centrifugaron a 1.000 g durante 5 min a 4°C.

Parte del sobrenadante resultante de la centrifugación fue transferido a 8 tubos Eppendorf, tomándolo de la parte central, procurando coger la menor cantidad de grasa posible. Los tubos Eppendorf se centrifugaron en microfuga a 12.000 rpm durante 2 min a 4°C, eliminando posteriormente los sobrenadantes. Los pellets mitocondriales obtenidos se lavaron en medio A juntándolos de dos en dos, a medida que se realizaban los lavados hasta tener todas las mitocondrias en un mismo tubo.

Una vez obtenido el pellet mitocondrial final, se realizó un lavado en medio MAITE (Sacarosa 25 mM; Sorbitol 75 mM; KCl 100 mM; EDTA-Na 0,05 mM; MgCl₂ 1 mM; Tris-HCl 10mM pH=7,4; y fosfato potásico 10 mM, pH=7.4) centrifugándose de nuevo a 12.000 rpm, durante 2 min a 4°C en microfuga. El pellet se resuspendió en 1 ml de medio MAITE y se mantuvo en hielo mientras se realizó la cuantificación proteica (ver apartado 2.6.2).

Tras la misma, se centrifugó nuevamente el pellet mitocondrial, que se resuspendió adecuadamente en tampón de resuspensión a una concentración de 10 mg/ml y se procedió a hacer alícuotas, a su congelación, o bien a la lisis de las mitocondrias con detergentes específicos.

2.3.4 Permeabilización de mitocondrias para Blue Native

Tras la extracción de las mitocondrias por los procedimientos anteriores, las membranas mitocondriales se solubilizaron utilizando detergentes suaves, que mantienen las interacciones entre las proteínas que componen los complejos del sistema OXPHOS. Cuando lo que interesa obtener son los complejos individuales se usó dodecilmaltósido, a una concentración de 1,6 g/g proteína mitocondrial. Por otro lado, para determinar la presencia de asociaciones entre complejos (supercomplejos), se usó digitonina a una concentración de 4 g/g proteína mitocondrial. 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 13.000 rpm, en microfuga. Finalmente, se recogió el sobrenadante y se le añadió un volumen de tampón de carga BN (5% Blue-G Coomassie en 1 M aminocaproico) igual a un tercio del volumen final de la muestra y se congeló a -80°C.

2.4 Medida de funcionalidad de la cadena de transporte electrónico

2.4.1 Medida de consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno se midió en un electrodo tipo Clark (sistema desarrollado por Clark en 1956, para medir la concentración de oxígeno en muestras de sangre) termostatzado (Oxytherm, Hansatech Instruments) compuesto por un cátodo de platino (Pt) y un ánodo de plata (Ag). Los electrodos se encuentran montados en un disco de resina epoxi, los cuales entran en contacto mediante un papel espaciador empapado en una solución de cloruro potásico saturado al 50% (electrolito), separados de la mezcla de reacción por una membrana de teflón permeable al oxígeno. Sobre la pieza que contiene los electrodos se coloca otra pieza que incluye la cámara de reacción termostatzada que mantiene la reacción a la temperatura deseada, en nuestro caso 37°C.

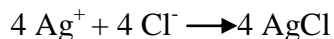
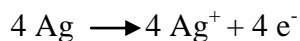
La cámara se cierra con un émbolo provisto de una abertura capilar en su centro para permitir la salida de aire y la adición de los reactivos durante el experimento. El contenido de la cámara de reacción se mantiene en constante agitación mediante un agitador magnético. Los datos obtenidos en cada experimento se registraron en un PC con el programa Oxygraph Plus V1.00 de Hansatech Instruments.



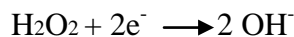
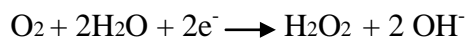
Figura 1. Oxytherm. A) Electrodo de oxígeno tipo Clark termostatzado (Oxytherm, Hansatech Instruments). B) Partes del electrodo (A) Disco de resina epoxy, (B) cátodo de platino en el centro de un saliente, (C) ánodo de plata en forma circular, (D) anillo de goma que sostiene el papel espaciador empapado en el electrolito y la membrana de teflón que separa los electrodos de la mezcla de reacción.

La aplicación de un voltaje polarizante de 700 mV ioniza al electrolito que inicia un flujo de corriente a través de distintas reacciones electroquímicas:

Ecuación 1



Ecuación 2



La corriente que se genera está estequiométricamente relacionada con el oxígeno consumido en el cátodo.

Antes de empezar cada sesión de trabajo, se fijó la temperatura del Oxytherm, a 37°C y se calibró el aparato estableciendo la línea base mediante la adición de un agente reductor como el ditionito de sodio.

La adición de sustratos e inhibidores de la cadena de transporte electrónico se realizó usando jeringas Hamilton de 10 ó 25 µl.

Después de cada medida, la cámara de reacción se lavó con agua y con albúmina sérica bovina, (BSA) al 10%, para eliminar restos de inhibidores que pueden interferir en las medidas sucesivas, especialmente de antimicina A, tras cuyo uso se hace imprescindible esta limpieza.

2.4.1.1 Medida de respiración endógena y desacoplada en células intactas

Preparación de reactivos

Dinitrofenol (DNP): agente desacoplante, se preparó a una concentración de 6,5 mM. Para ello, se pesaron 12 mg de DNP (184,1 g/mol) y se disolvieron en 4 ml de NaOH 1 M. La mezcla se calentó durante 20 minutos a 50°C y se ajustó su pH a 7,0, añadiendo aproximadamente unos 3 ml de HCl 1 M. El volumen final se ajustó a 10 ml con H₂O, se alícuotó y se congeló a -20°C.

Cianuro de potasio (KCN): inhibidor del complejo IV, se preparó a una concentración de 400 mM en agua.

Procedimiento experimental

Para las medidas de respiración endógena, se recogieron 5 millones de células, sembradas en placas de cultivo de 150 mm de diámetro, mediante tripsinización y posterior centrifugación (ver apartado 2.2.6). Las células se resuspendieron en 1 ml de medio de cultivo (5×10^6 cél/ml) y se introdujeron en la cámara del electrodo para registrar su tasa de respiración endógena, es decir, el consumo de oxígeno de la cadena de transporte electrónico cuando está acoplada a la síntesis de ATP. Transcurridos 2-3 minutos, se añadieron 10 µl de la solución de DNP 6,5 mM, para desacoplar la cadena respiratoria y detectar la máxima tasa de consumo de oxígeno de la misma. Transcurridos otros 2-3 minutos, se añadieron 10 µl de KCN 400 mM para inhibir el consumo de oxígeno asociado a la cadena de transporte electrónico.

2.4.1.2 Medida de la actividad de los complejos por polarografía en células permeabilizadas con digitonina

Preparación de reactivos

- Medio A: 20 mM HEPES pH=7,1 ajustado con NaOH o KOH, 250 mM sacarosa, 10 mM MgCl₂. El medio se preparó, alicuotó y se conservó a -20°C.

- Medio de respiración: se preparó diariamente a partir de medio A al que se le añadió ADP y fosfato potásico a una concentración final de 1 mM y 2 mM respectivamente.

- Digitonina: detergente utilizado para permeabilizar las células. Se preparó al 1% en DMSO a partir de una disolución madre de digitonina al 10%. La disolución stock de digitonina se preparó al 10% en etanol (teniendo en cuenta que la pureza del producto era del 80%) y luego se recristalizó a 4°C. Finalmente, se centrifugó (5 min, 13.000 rpm en la microfuga) y se eliminó el etanol, resuspendiendo el sedimento en DMSO. Cada vez que se preparó una nueva disolución stock de digitonina se testó su capacidad de permeabilización y se calculó la cantidad necesaria que había que añadir a las células para obtener la máxima pendiente de consumo de oxígeno al utilizar succinato como sustrato (Hofhaus, Johns et al. 1996).

- Sustratos para la actividad de los complejos: Todos los sustratos para la actividad de los complejos, excepto el TMPD, se prepararon en H₂O a una concentración 1 M y pH=7,0. Se hicieron alícuotas y se guardaron a -20°C. El TMPD se preparó diariamente a una concentración de 120 mM en medio A y se protegió de la luz para evitar la autooxidación del producto.

- o Glutamato: sustrato de la L-glutamato deshidrogenasa, enzima mitocondrial que cataliza reversiblemente la desaminación oxidativa del glutamato a α -cetoglutarato, produciendo NAD(P)H+H⁺. El complejo de la α -cetoglutarato deshidrogenasa del ciclo de Krebs produce la oxidación del α -cetoglutarato a succinil-CoA y CO₂, generando poder reductor en forma de NADH+H⁺, que dona electrones al complejo I.

- o Malato: sustrato de la L-malato deshidrogenasa de ciclo de Krebs, como producto de la reacción se produce oxalacetato y poder reductor en forma de NADH+H⁺, que constituye la entrada de electrones a la cadena de transporte electrónico por el complejo I.

- o Succinato: sustrato de la succinato deshidrogenasa (complejo II), que cataliza la reacción de formación de fumarato y el transportador electrónico reducido FADH₂.

- o Glicerol-3-fosfato: formado tanto a partir del glicerol liberado en la hidrólisis del triacilglicerol, como en la reducción de la dihidroxiacetona fosfato en la glucólisis, es oxidado por la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa, localizada en la cara externa de la membrana interna mitocondrial, canaliza los electrones hacia la cadena respiratoria por reducción de la ubiquinona.

- o TMPD: N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina, sustrato donador de electrones directamente al complejo IV.

- Inhibidores de la actividad de los complejos: Las disoluciones concentradas de inhibidores también se almacenaron a -20°C y fueron: rotenona 500 μ M (complejo I) y antimicina A 100 μ M (complejo III), ambas en etanol y KCN 400 mM (complejo IV) en H₂O, preparado fresco. Las diluciones de trabajo de rotenona y antimicina A fueron 100 μ M y 10 μ M, respectivamente y se prepararon en medio A.

Procedimiento experimental

La medida de actividad de complejos por polarografía se llevó a cabo siguiendo una adaptación del protocolo de Hofhaus (Hofhaus, Shakeley et al. 1996). Para medir la actividad de cada uno de los complejos se añadieron sustratos e inhibidores específicos para cada uno de ellos y el consumo de oxígeno provocado por esta adición se registró durante 1-2 minutos.

- **Permeabilización de las células:** El primer paso del experimento consistió en la permeabilización de la membrana exterior de las células por acción de la digitonina. Para ello se partió de placas de 150 mm de diámetro al 70-80% de confluencia. Las células se recogieron por tripsinización, se lavaron en medio A y se contaron. Una alícuota de 5×10^6 células se resuspendió en 1 ml de medio de respiración y se introdujo en la cámara del electrodo, donde se añadieron 5 μ l de digitonina al 1% (50 μ g de digitonina; 10 μ g de digitonina por cada 10^6 células) y se dejó equilibrar durante 10 minutos, con la cámara abierta para favorecer el consumo de sustratos endógenos de las células. La correcta permeabilización de las células se determinó por visualización al microscopio utilizando el tinte vital azul trypan (apartado 2.2.7).

- **Medida del consumo de oxígeno:** Tras el proceso de permeabilización, se cerró la cámara termostatizada y se añadieron los sustratos e inhibidores que actúan en los distintos puntos de la cadena con ayuda de jeringas Hamilton.

o Medida de Complejo I+III+IV:

- Sustratos: 10 μ l de una disolución 0,5 M de glutamato y 0,5 M de malato.
- Inhibidor: 10 μ l de la disolución 100 μ M de rotenona.

o Medida de Complejos II+III+IV:

- Sustratos: 10 μ l de una disolución 0,5 M de succinato solo o con 0,5 M de glicerol-3 fosfato.
- Inhibidor: 10 μ l de 10 μ M de antimicina A.

o Medida de Complejo IV:

- Sustrato: 10 μ l de una disolución 120 mM de TMPD.
- Inhibidor: de 20 μ l de una disolución 400 mM KCN.

o Medida de la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa:

- Sustrato: 10 μ l de una disolución 0,5 M de glicerol 3-fosfato.
- Inhibidor: debido a que no existe un inhibidor específico de la actividad de dicha enzima, utilizamos 10 μ l de una disolución 10 μ M de antimicina A.

Cálculo de actividades

La actividad de cada uno de los complejos se obtuvo calculando la diferencia entre las pendientes de consumo de oxígeno obtenido al añadir el sustrato específico de cada uno de ellos y la obtenida cuando se adiciona el inhibidor de cada uno de ellos.

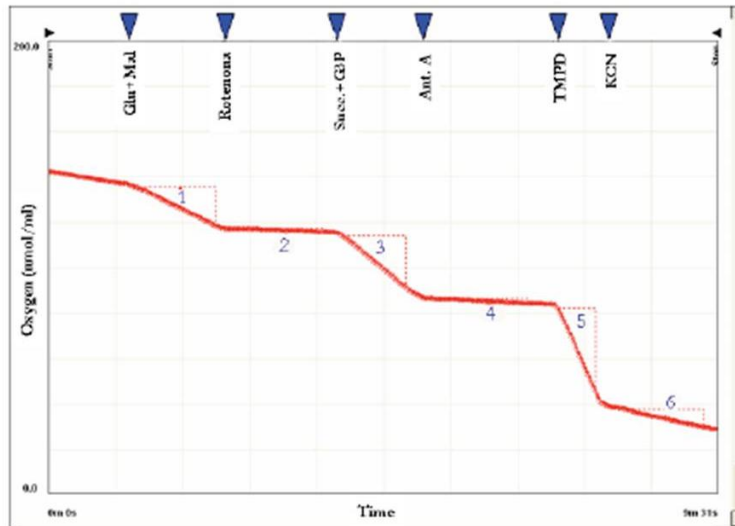


Figura 2. Medida de la actividad de complejos por polarografía. En la figura se muestra un ejemplo de gráfica de polarografía obtenida en un experimento con 5×10^6 células de ratón control.

En la figura observamos los cambios de pendiente que se producen tras la adición de cada uno de los sustratos e inhibidores. Así, calculamos las actividades de los complejos según las fórmulas:

$$\begin{aligned} \text{CI+III+IV} &= \text{pte 1-pte 2} \\ \text{CII+III+IV} &= \text{pte 3-pte 4} \\ \text{CIV} &= \text{pte 5-pte 6} \end{aligned}$$

2.4.2 Medida de la actividad enzimática por espectrofotometría

Todas las determinaciones se llevaron a cabo en un espectrofotómetro UV-Visible UV 500 de Unicam termostatzado mediante un sistema Peltier PCB150 de DBS y los datos se registraron utilizando el software Vision 32, versión 1.05. Las muestras (mitocondrias aisladas según el procedimiento descrito en el apartado 2.3.1) se depositaron en cubetas de plástico de 1 ml y se incubaron a la temperatura de medida durante un tiempo antes de añadir el iniciador de la reacción y registrar la actividad.

2.4.2.1 Actividad NADH-Deshidrogenasa sensible a rotenona (CI)

La actividad de complejo I se midió como la disminución de la absorbancia a 340 nm que se produce debido a la oxidación del NADH ($\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) por parte de la preparación mitocondrial. Para descartar la acción de otras NADH deshidrogenasas, la muestra se inhibe con rotenona y se registra la disminución de su absorbancia. En este caso, la $\Delta A/\text{min}$ es igual a la diferencia entre las actividades en ausencia y presencia de rotenona ($(\Delta A/\text{minuto})_{\text{CI}} = (\Delta A/\text{minuto})_1 - (\Delta A/\text{minuto})_{\text{rot}}$). La medida se lleva a cabo a 30°C durante 4 minutos.

Preparación de reactivos

- Tampón C1/C2: 25 mM fosfato potásico (K_2HPO_4), 5 mM MgCl_2 , 3 mM KCN, 2,5 mg/ml BSA. Ajustar el pH a 7,2.
- NADH 13 mM: 46 mg en 5 ml de H₂O (FRESCO).
- UQ₁ 10 mM en etanol.
- Antimicina A 1 mg/ml en etanol.
- Rotenona 500 μM en etanol.

Preparación de la muestra

Se tomó una alícuota de 40 μl de suspensión de mitocondrias, se añadieron 160 μl de tampón C1/C2 y se incubó durante 5 min a T ambiente. Después se centrifugó la muestra

durante 10 min a 13.000 rpm en una microfuga. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 80 µl de tampón C1/C2. Tras incubar 5 min a T ambiente, se procedió a medir la actividad del complejo I.

Reacción

	Concentración Stock	Volumen (µl)	Concentración final
Tampón C1/C2	1X	955	1X
UQ₁	10 mM	13	0,13 mM
NADH	13 mM	10	0,13 mM
Antimicina A	1 mg/ml	2	0,2 µg/ml
Muestra	-	20	-

Tras registrar la disminución de absorbancia durante 4 minutos, se añadieron 6 ml de rotenona 500 mM, se incubó la mezcla un par de minutos y se volvió a medir la actividad de igual manera que antes.

2.4.2.2 Actividad Succinato-Deshidrogenasa (CII)

La actividad de complejo II se midió como el incremento de la absorbancia a 600 nm que se produce debido a la reducción del diclorofenol-indofenol ($\epsilon = 19,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) por la preparación mitocondrial. La actividad succinato deshidrogenasa se registró durante 4 minutos a una temperatura de 30°C.

Preparación de reactivos

- Tampón C1/C2 (apartado 2.4.2.1)
- DCPIP 5 mM
- Succinato 1M
- UQ₁ 10 mM en etanol
- Antimicina A 1 mg/ml en etanol
- Rotenona 500 mM en etanol

Preparación de la muestra

La muestra se preparó de la misma forma que en el apartado anterior (2.4.2.1)

Reacción

	Concentración Stock	Volumen (µl)	Concentración final
Tampón C1/C2	1X	939	1X
Succinato	1 M	10	10 mM
Muestra	-	20	-

Incubar 10 minutos, 30°C

	Concentración Stock	Volumen (μl)	Concentración final
DCPIP	5 mM	6	0,03 mM
Antimicina A	1 mg/ml	2	2 μg/ml
Rotenona	500 μM	10	5 μM

Incubar 2 minutos, 30°C.

	Concentración Stock	Volumen (μl)	Concentración final
UQ₁	10 mM	13	0,13 mM

2.4.2.3 Actividad Glicerol-3-P-Deshidrogenasa (G3P-DH)

La medida de la actividad G3P-DH se llevó a cabo de la misma manera que la del complejo II usando como sustrato que el G3P (10 mM) en lugar de succinato.

2.4.2.4 Actividad Citocromo c Reductasa (CIII)

La actividad Citocromo *c* reductasa se midió por el incremento de la absorbancia a 550 nm debido a la reducción del citocromo *c* ($\epsilon = 21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) en presencia de ubiquinol y dodecilmaltósido, durante 2 minutos a 30°C.

Preparación de reactivos

- Tampón C1/C2
- N-dodecil-β-D-Maltósido (DDM) 15 mg/ml en agua.
- Rotenona 500 mM en etanol
- Ubiquinol-2 (UQ₂H₂), 35 mM en etanol. El ubiquinol se preparó por reducción de ubiquinona (UQ₂). A 200 ml de coenzima Q₂, (50 mM en etanol) se les añadieron 300 ml de etanol y el volumen se completó hasta 1 ml con H₂O pH=2. La ubiquinona se redujo con una punta de espátula de NaBH₄ y se mantuvo 5 minutos a T ambiente. La mezcla se sometió a dos extracciones con 1 ml de dietileter:isooctano (2:1). Las fases orgánicas se lavaron con 2 ml de NaCl (2M) y se evaporaron completamente bajo vapor de N₂. El residuo se disolvió en 1 ml de etanol y se acidificó por adición de 10 ml de HCl 0,1M. Cuando la disolución se preparó correctamente, su color amarillo desapareció.

- Ácido L-ascórbico en polvo.

Preparación de la muestra

Las muestras no necesitaron preparación ni dilución alguna.

Reacción

	Concentración Stock	Volumen (μl)	Concentración final
Buffer C1/C2	1X	967,8	1X
DDM	15 mg/ml	20	0,3 mg/ml
Rotenona	500 μM	6	3 μM

Incubar 15-20 segundos.

	Concentración Stock	Volumen (μ l)	Concentración final
UQ ₂ H ₂	50 mM	1,2	0,06 mM

Incubar 1 minuto.

Muestra	-	5	-
---------	---	---	---

Incubar 2 minutos y medir

Una vez realizada la medida se añadió ácido L-ascórbico, para reducir completamente el citocromo *c*. Se esperaron ~3 min y se volvió a medir.

2.4.2.5 Actividad Citocromo *c* Oxidasa (COX, CIV)

La actividad COX se mide como disminución de la absorbancia a 550 nm debido a la oxidación del citocromo *c* reducido ($\epsilon = 21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La reacción se siguió durante 2 minutos a 38°C. Este protocolo se utilizó usando tanto mitocondrias aisladas como homogenados celulares totales.

Preparación de reactivos

- Tampón KP 100 mM pH=7: Para preparar 100 ml de tampón se añadieron 38,5 ml de K₂HPO₄ 100 mM y se completó el volumen con KH₂PO₄ 100 mM, ajustando el pH.

- Citocromo *c* reducido 1% (10 mg/ml, FRESCO). Para preparar 1-1,5 ml, se pesaron entre 10 y 15 mg de citocromo *c* que se resuspendieron en 0,75-1 ml de tampón KP 10 mM pH=7, según lo pesado. Para reducir el citocromo se añadió una punta de espátula de NaBH₄. La mezcla se agitó y se mantuvo en hielo 30 minutos. El pH se ajustó a 7-7,3 con HCl 1N. El volumen requerido se completó con agua destilada hasta 1-1,5 ml. La disolución se mantuvo en hielo todo el rato.

Preparación de la muestra

Las muestras no necesitaron preparación ni dilución alguna.

Reacción

	Concentración Stock	Volumen (μ l)	Concentración final
H ₂ O destilada	-	795	-
KP (pH=7)	100 mM	100	10 mM
Muestra	-	5	-
Cyt <i>c</i> reducido	10 mg/ml	100	1 mg/ml

2.4.2.6. Actividad CI+III

En el ensayo para medir la actividad de los complejos I+III se siguió la reducción del citocromo *c* por parte de la preparación de mitocondrias, al añadir NADH como sustrato de la reacción, como aumento de la absorbancia a 550 nm ($\epsilon = 21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

La reacción se llevó a cabo durante 2 minutos a 30°C.

Preparación de reactivos

- Tampón C1/C2
- KCN 10 mM
- Citocromo *c* oxidado, 1 mM en agua (12,4 mg/ml de agua; FRESCO)
- NADH, 1 mM en agua (0,71 mg/ml; FRESCO)

Preparación de la muestra

Las muestras se diluyeron dos veces en el tampón de medida.

Reacción

	Concentración Stock	Volumen (μl)	Concentración final
Tampón C1/C2	1X	745	1X
KCN	10 mM	50	0,2 mM
Cyt <i>c</i> oxidado	1 mM	100	0,1 mM
Muestra	-	5	-
NADH	1 mM	100	0,1 mM

Opcionalmente se inhibió la reacción con Antimicina A. Para ello, añadimos 10 ml de antimicina A (1 mg/ml en etanol) e incubamos durante 3 minutos aproximadamente antes de realizar la medida de absorbancia.

2.4.2.7. Actividad CII+III

De forma similar al ensayo para medir la actividad de los complejos I+III se siguió la reducción del citocromo *c* como aumento de la absorbancia a 550 nm ($\epsilon = 21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), cuando se añadió succinato como sustrato de reacción. Para que la señal registrada represente exclusivamente a la actividad II+III se inhibió la actividad del complejo I con rotenona. La reacción se llevó a cabo durante 2 minutos a 30°C.

Preparación de reactivos

Los reactivos fueron los mismos que en el caso de la medida de CI+III a excepción del sustrato:

- Succinato, 30 mM en agua (8,1 mg/ml)
- Rotenona 500 mM en etanol

Preparación de la muestra

Las muestras se diluyeron dos veces en el tampón de medida.

Reacción

	Concentración Stock	Volumen (μl)	Concentración final
Tampón C1/C2	1X	735	1X
KCN	10 mM	50	0,2 mM
Cyt <i>c</i> oxidado	1 mM	100	0,1 mM

	Concentración Stock	Volumen (μ l)	Concentración final
Rotenona	500 μ M	10	5 μ M
Muestra	-	5	-
Succinato	30 mM	100	3 mM

La inhibición con antimicina A se llevó a cabo de igual forma que en el apartado anterior.

De igual forma, cambiando el succinato 30 mM por G3P 1M se midió la actividad citocromo *c* reductasa acoplada a la G3P-DH.

2.4.2.8 Citrato sintasa (CS)

La actividad citrato sintasa se mide por el incremento de la absorbancia a 412 nm producido por la formación de la forma aniónica del DTNB ($\epsilon = 13,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) tras añadir 250 μ moles de oxalacetato como iniciador de la reacción. La medida se lleva a cabo a 30°C durante 2 minutos.

Preparación de reactivos

- Tampón de medida: Tris-HCl 10 mM pH=8
- Acetil CoA: 7 mg/ml
- DTNB: (Ácido 5,5-Ditio-bis-2-nitrobenzóico) 1 mM, 2 mg en 5ml de tampón de medida (FRESCO).
- Oxalacetato 50mM (OAA) 33 mg en 5 ml de agua (FRESCO)
- Tritón X-100 10%, 1 ml en 10 ml de agua

Preparación de la muestra

Cuando se trabaja con mitocondrias aisladas, la muestra se diluye 5 veces en el tampón de medida.

Reacción

	Concentración Stock	Volumen (μ l)	Concentración final
Tampón de	10mM	861,7	10mM
Acetil-CoA	7mg/ml	3,3	0,023mg/ml
DTNB	1mM	100	0,1mM
Muestra	-	20	-
Tritón X 100	10%	10	0,1%
OAA	50mM	5	0,25mM

2.5 Extracción, manipulación y análisis de ácidos nucleicos

2.5.1 Diseño de los genes de interés

Las secuencias codificantes de los genes sintéticos usados en este trabajo (correspondientes a la bacteriorrodopsina y a cinco proteorrodopsinas) se diseñaron partiendo de la secuencia de aminoácidos de la proteína correspondiente, usando el programa “Bacttranslation tool” de Entelechon:

<http://www.entelechon.com/bioinformatics/backtranslation.php?lang=eng>, eligiendo el código genético estándar y adaptando el codon bias al de ratón, usando los codones más frecuentes.

Las secuencias optimizadas fueron sintetizadas por la empresa GenScript http://www.genscript.com/gene_synthesis.html quien proporciona los genes sintéticos clonados en el vector pUC57 (ver Tabla 2 y Apéndice). La confirmación de la secuencia solicitada fue realizada mediante secuenciación (ver apartado 2.5.9) usando los oligos: pUC57-F:gcacagat gcgtaaggag y pUC57-R:tacgcaaacgcctctcc.

2.5.2 Extracción y purificación de DNA

2.5.2.1 Extracción y purificación de DNA total de células en cultivo

Para extraer DNA de células en cultivo, las células procedentes de una placa de 60 ó 100 mm de diámetro, se recogieron por tripsinización y posterior centrifugación (ver apartado 2.2.6). El pellet celular se resuspendió en 250 µl de TE 10:1 (Tris-HCl 10 mM, pH=7,5; EDTA 1 mM), se añadieron 1,25 µl de proteinasa K (20 mg/ml), para digerir las proteínas, 5 µl de SDS al 25%, para solubilizar las membranas celulares, y 5 µl de ribonucleasa A (10 mg/ml) para eliminar el RNA de la preparación y ésta se incubó a 37°C durante toda la noche.

A continuación se realizó una doble extracción del DNA con 1,5 volúmenes de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1, saturado con una disolución de Tris-HCl 10 mM pH=8, EDTA 1 mM, SIGMA) en la que, tras agitar vigorosamente en vórtex durante 1 minuto, se centrifugó durante 5 minutos a 13.000 rpm en microfuga. Seguidamente, se recogió la fase acuosa superior, con cuidado de no tomar la interfase y se realizó una nueva extracción de la mezcla con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) de forma anteriormente descrita, con el fin de obtener una preparación de DNA más pura y sin fenol.

Finalmente, se procedió a precipitar el DNA de la fase acuosa final, mediante la adición de 50 µl de acetato amónico 7,5 M y dos volúmenes de etanol frío. La disolución se mezcló por inversión y se dejó precipitar durante al menos 3 horas a -20°C. Después del paso de precipitación, se centrifugó a 13.000 rpm durante 30 minutos a 4°C en microfuga. Una vez eliminado el etanol, el pellet de DNA se dejó secar a temperatura ambiente o en el Speed-Vac, el cual se resuspendió en un volumen (100-300 µl en función del tamaño del pellet) de Tris-HCl 10 mM; pH=8 o agua estéril de Gibco® y se dejó mezclando toda la noche en agitación a 37°C.

2.5.2.2 Extracción de DNA plasmídico

La extracción de DNA plasmídico se realizó a partir de cultivos bacterianos crecidos durante 12-16 horas a 37°C y en agitación orbital. El volumen de cultivo de partida varió en función de la cantidad de DNA necesitada. Para realizar un clonaje o la comprobación de la colonia escogida, bastaron 5 ml de cultivo bacteriano, mientras que para obtener una

gran cantidad de DNA para realizar varios experimentos de transfección celular se partió de un volumen de 250 ml. Según el volumen de cultivo también varió el kit comercial empleado para la extracción plasmídica (GenElute™ Plasmid Miniprep kit o GenElute™ Plasmid Maxiprep kit endotoxin free, ambos de SIGMA).

2.5.2.3 Purificación de DNA a partir de geles de agarosa

Para purificar productos de digestión de DNA a partir de geles de agarosa, éstos se cargaron en geles del 0,5 al 2% de agarosa en función del tamaño del fragmento a purificar. Tras desarrollarse la electroforesis, el fragmento de DNA se visualizó bajo luz UV y se recortó la banda de agarosa que lo contenía con ayuda de un bisturí estéril. El DNA se purificó utilizando el kit comercial “GenElute™ Gel Extraction Kit” (SIGMA) o “SpinClean™ Gel Extraction Kit” (MBiotech) (ver Tabla 1.3 de esta misma sección), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para comprobar la eficiencia del proceso y estimar la concentración del fragmento, se cargó una alícuota del producto eluido en un gel de agarosa del 1%, y la intensidad de la banda del fragmento purificado se comparó con la del marcador “Low DNA Mass™ Ladder” de Invitrogen™.

2.5.2.4 Purificación de productos de PCR

Los productos de PCR de tamaño comprendido entre 100 pb-10 Kb, fueron purificados mediante el kit “GenElute™ PCR Clean-up kit” (SIGMA) o “SpinClean™ PCR Extraction Kit” (MBiotech) (ver Tabla 1.3 de esta misma sección) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este mismo kit fue utilizado para purificar productos de digestión que debían ser sometidos a una segunda digestión con una enzima de restricción cuyo tampón era incompatible con la primera.

2.5.3 Extracción de RNA total a partir de células en cultivo

Todos los ensayos en los que se trabajó con RNA se llevaron a cabo en frío, utilizando guantes y con todo el material estéril y libre de RNAsas.

El RNA total se extrajo a partir de células en cultivo utilizando el kit “RNAagents® Total RNA Isolation System” de Promega o el reactivo TRIzol® de Invitrogen.

2.5.4 Cuantificación de ácidos nucleicos

2.5.4.1 Cuantificación de ácidos nucleicos por espectrofotometría

Para determinar la concentración y pureza del DNA en nuestras preparaciones, se realizó la lectura de la absorbancia a las longitudes de onda de 260 y 280 nm. Para ello, se utilizaron cubetas de cuarzo de 500 µl en las que se añadió la muestra diluida en agua (generalmente 1/100). La relación de las absorbancias obtenida a 260 nm y a 280 nm (A_{260}/A_{280}) da idea del grado de pureza de la preparación, considerándose una buena pureza cuando se obtienen relaciones de $A_{260}/A_{280} = 1.8$ para DNA. La lectura de absorbancia a $\lambda = 260$ nm permitió calcular la concentración de DNA presente en la muestra, sabiendo que $A_{260}=1$ corresponde, aproximadamente, a 50 µg/ml de DNA de doble hebra. En el cálculo de la concentración de la muestra se tuvo en cuenta la dilución realizada para efectuar la medida.

En otras ocasiones, la concentración de ácidos nucleicos se midió en un espectrofotómetro NanoDrop® o NanoVue. En este caso, se depositaron 2 µl de la disolución de DNA en el lugar apropiado del aparato y tras la medida se obtuvo directamente tanto la concentración como la relación de absorbancias.

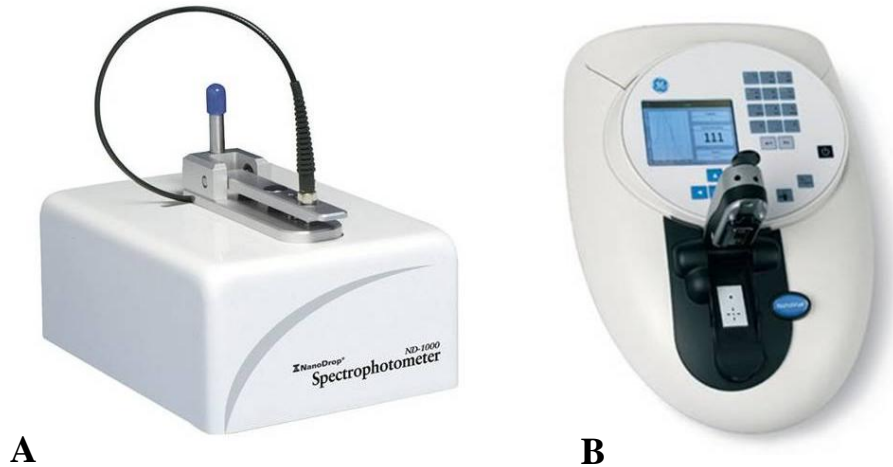


Figura 3. Espectrofotómetros empleados en la cuantificación de ácidos nucleicos. A) NanoDrop® ND-1000. B) NanoVue.

2.7.4.2 Cuantificación de DNA en geles de agarosa

La cuantificación de los fragmentos de DNA procedentes de digestión con enzimas de restricción, habituales en los procesos de clonaje, se llevó a cabo por densitometría utilizando el programa informático *Quantity One®1-D* (Bio-Rad). Para ello, se comparó la señal obtenida al cargar la muestra a cuantificar en un gel de agarosa con bromuro de etidio, con la señal obtenida de los marcadores “Low DNA Mass™ Ladder” y “High DNA Mass™ Ladder” de Invitrogen™ de concentración conocida.

2.5.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa se utilizó con el fin de obtener un elevado número de copias de un fragmento de DNA determinado, utilizando como molde muestras de DNA genómico, complementario (cDNA) o plasmídico.

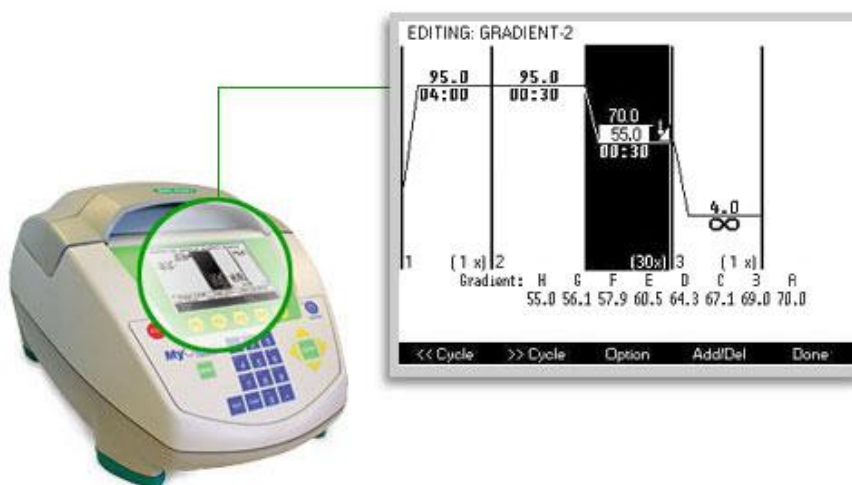


Figura 4. Termociclador MyCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad).

2.5.5.1 Obtención de cDNA monocatenario para su uso como molde de PCR

El cDNA se obtuvo utilizando como molde RNA total procedente de células en cultivo y el kit “1st Strand cDNA Síntesis Kit for RT-PCR (AMV)” de Roche.

Las muestras de RNA fueron desnaturalizadas a 65° C durante 15 minutos, y se dejaron en hielo durante 5 minutos antes de mezclar en el tubo de reacción los siguientes reactivos:

	Concentración inicial	Volumen (µl)	Concentración final
Tampón de reacción	10X	2	1X
MgCl₂	25 mM	4	5 mM
dNTPs	10 mM cada uno	2	1 mM cada uno
Oligo-p(dT)₁₅	0,8 g/µl	2	80 ng/µl
Inhibidor de RNAsas	50 U/µl	1	50 U (2,5 U/µl)
Transcriptasa reversa AMV	1 U/µl	0,8	0,8 U (0,04 U/µl)
RNA total	± 1 µg/µl	1	1µg (0,05 µg/µl)
Agua (hasta 20µl)	-	7,2	-

Tabla 2.5.5.1. Mezcla de reacción para la síntesis de cDNA.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador donde se incubó a 25°C durante 10 minutos y después a 42°C durante 60 minutos. Terminado el proceso, la transcriptasa reversa se desnaturalizó incubando la mezcla de reacción a 99°C durante 5 minutos y enfriando a 4°C durante 5 minutos. El cDNA obtenido así se almacenó a -20°C hasta su uso.

2.5.5.2 Reacción de PCR utilizando DNA genómico como molde

En las reacciones de PCR en las que se utilizó DNA genómico como molde, se añadieron 500 ng de DNA total, extraído según se detalla en el apartado 2.5.2.1, a una mezcla de reacción de 50 µl de volumen final. La mezcla de PCR contenía los componentes que se recogen en la siguiente tabla.

	Concentración inicial	Volumen (µl)	Concentración final
Tampón de reacción	10X	5	1x
dNTPs	10 M cada uno	1	0, 2 mM cada uno
Cebador 1	10 µM	2	0,4 µM
Cebador 2	10 µM	2	0,4 µM
Taq polimerasa	1 U/µl	1	1 U
DNA	-	-	500 ng
Agua	-	Hasta 50 µl	-

Tabla 2.5.5.2a. Mezcla de PCR.

El programa utilizado para amplificar fragmentos de DNA es el siguiente:

Paso	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización previa	2 min	95°C
Desnaturalización	45 s	95°C
Hibridación	45 s	T _m propia de cebadores (55-60°C)
Extensión	1-2 min	72°C
Final de reacción	5 min	72°C




Tabla 2.5.5.2b. Programa clásico de PCR.

La temperatura de hibridación (T_m) se determinó en función del par de cebadores utilizados. Para ello, se utilizó la siguiente fórmula matemática:

$$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$$

El tiempo de extensión depende del tamaño del fragmento de DNA a amplificar, en general se estima 1 minuto por cada mil pares de bases.

2.5.5.3 Reacción de PCR usando cDNA como molde

En las reacciones de PCR en las que se utilizó cDNA como molde, se siguieron los mismos pasos que con el DNA genómico pero añadiendo entre 3 y 5 µl del producto de la reacción de generación de cDNA.

2.5.5.4 Reacción de PCR utilizando DNA plasmídico como molde

Para comprobar la presencia de un determinado inserto en un vector tras su ligación en el mismo, o para la modificación de un inserto mediante la adición nuevos sitios de restricción en sus extremos, se realizaron reacciones de PCR utilizando DNA plasmídico como molde. Tras cuantificar el DNA plasmídico extraído a partir de un cultivo bacteriano (ver apartado 2.5.2.2), se preparó una mezcla de reacción siguiendo las indicaciones de la tabla 2.5.5.2a con una excepción: la cantidad de DNA plasmídico utilizado por reacción es entre 50 y 100 ng de plásmido. El programa de PCR utilizado es el mismo que está recogido en la tabla 2.5.5.2b, usando la temperatura de fusión propia para la pareja de cebadores utilizada.

2.5.6 Clonación de fragmentos de DNA en vectores plasmídicos

2.5.6.1 Clonación de productos de PCR en el vector pCR2.1

Los productos de PCR (ver apartado anterior), que se desean clonar en algún vector de expresión mediante digestión con enzimas de restricción y posterior ligación, han de ser previamente clonados en otro vector del cual escindirlo con dichas endonucleasas. El vector plasmídico de clonaje utilizado para tal fin fue, en todos los casos, el denominado pCR®2.1 (ver mapa de restricción en el Apéndice), suministrado en el kit de Invitrogen™ ‘TA Cloning® Kit’ (Tabla 1.3). Este sistema se utilizó también para clonar y secuenciar cDNAs de genes codificados en el genoma nuclear de las distintas líneas celulares.

El programa de PCR utilizado en estos casos se encuentra recogido en la tabla 2.5.5.2b. La Taq polimerasa añade una desoxiadenosina (A) al extremo 3’ de los amplificados, imprescindible para la clonación del fragmento en el vector linearizado, el cual contiene una desoxitimidina (T) en el extremo 5’. La ligación se realizó utilizando el

producto de PCR fresco para evitar que se hubieran degradado las desoxiadensinas añadidas en 3'.

Una vez cuantificado el producto de PCR (ver apartado 2.5.4), se utilizó la siguiente fórmula para calcular la cantidad de DNA (producto de PCR) necesaria para ligar con 50 ng del vector pCR®2.1 a una relación 1:1 (inserto: vector). En el caso de que no se obtuvieran transformantes se probaron relaciones de inserto: vector de 3:1 o 6:1.

$$X \text{ ng PCR product} = \frac{Y \text{ bp PCR product}(50 \text{ ng pCR}^{\circledR}2.1)}{\text{Tamaño en bp del vector pCR}^{\circledR}2.1: \sim 3.900}$$

Una vez calculada la cantidad de fragmento de PCR necesario para la ligación, se procedió a incubarlo con los reactivos que se describen a continuación, a 14° C durante toda la noche.

Componente	Volumen
Producto de PCR	X µl
Tampón de ligación 10X	1 µl
vector pCR®2.1 (25 ng/µl)	2 µl
T4 DNA ligasa (4 unidades Weiss)	1 µl
Agua estéril	hasta un volumen de 10 µl

Tabla 2.5.6.1. Mezcla para la reacción de ligación.

Al día siguiente se procedió a la transformación de las bacterias competentes (ver apartado 2.1.3) o se almacenó a -20° C hasta su uso.

2.5.6.2 Clonación de los productos de digestión en un vector plasmídico

2.5.6.2.A Digestión de vectores plasmídicos

La digestión de vectores plasmídicos con enzimas de restricción, se llevó cabo para conseguir:

- La liberación de un inserto determinado: el cual va a ser clonado en un vector diferente al primero.
- La creación de sitios de restricción adecuados en el vector para la clonación de un nuevo inserto en el mismo. En estos casos, con el fin de disminuir los eventos de autoligación del vector, es decir, la recircularización del vector sin incorporación del inserto de interés, una vez finalizada la incubación con la/s enzima/s de restricción se procedió a la defosforilación de los extremos 5' del vector, añadiendo 1U de fosfatasa alcalina (CIAP, Invitrogen™) a la mezcla de digestión del plásmido, e incubando a 37°C durante 30 min.
- Confirmación de la correcta incorporación del inserto deseado en la construcción final.

La digestión de los vectores plasmídicos se realizó mediante la incubación con las enzimas de restricción de interés, en un bloque térmico a la temperatura óptima para la actividad de éstas y durante el tiempo necesario en función tanto de la cantidad de DNA a digerir como de las unidades de enzima añadidas a la mezcla de digestión, preparada en el tampón conveniente para la correcta actividad enzimática, y tras la adición de BSA a una concentración final de 1X en aquellos casos en que fuese requerida.

Habitualmente, partimos de 1 a 3 µg de plásmido que se digirieron con 10 unidades de enzima (1 µl de enzima 10 U/µl) en un volumen final de entre 20 y 50 µl en el que se encontraba el tampón adecuado a una concentración 1X. La reacción se llevó a cabo a la temperatura óptima de cada enzima, durante 3–4 horas.

Cuando se necesitó digerir el vector con dos enzimas de restricción diferentes, se consultaron las condiciones de la doble digestión recomendada por la casa comercial. En algunos casos fue posible realizar la doble digestión simultánea, mientras que en otros se procedió a la digestión secuencial del vector, primero con una de las enzimas en el tampón y condiciones óptimas para la misma, y tras purificar el producto de esta digestión en aquellos casos de incompatibilidad de los tampones (ver apartado 2.5.2.4), se incubó con la segunda enzima en su tampón y condiciones específicos.

2.5.6.2.B Purificación producto de digestión

Una vez digeridos los plásmidos, se comprobó el resultado de la digestión en un gel de agarosa (apartado 2.5.7.1), y aquellos fragmentos de tamaño compatible con los productos de interés se extrajeron del gel y purificaron (apartado 2.5.2.3). Tras la cuantificación (apartado 2.5.4) se procedió a la ligación de vector e inserto.

2.5.6.2.C Ligación de un determinado inserto en el vector de elección

La ligación de vector e inserto se realizó conforme a la fórmula recogida en el apartado 2.5.6.1. Habitualmente se escogió una relación inserto:vector de 3:1. La reacción de ligación se llevó a cabo usando la enzima T4 DNA ligasa de NEB, incubando la mezcla de reacción a 16°C toda la noche.

2.5.7 Electroforesis de ácidos nucleicos

2.5.7.1 Electroforesis de DNA en geles horizontales de agarosa

Los geles se prepararon disolviendo agarosa en tampón de electroforesis TBE (Tris 50 mM, ácido bórico 50 mM, y EDTA 1 mM) o TAE (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1mM), a unos 60–70° C. Las concentraciones de trabajo variaron entre el 0,5 y el 2% (p/v) según el tamaño de los fragmentos que se quisieran separar. Posteriormente, y con el gel aún caliente, se añadió bromuro de etidio (10 mg/ml) hasta una concentración final de 0,5 µg/ml, se mezcló cuidadosamente y se vertió sobre el molde del gel, con el peine ya puesto y se dejó gelificar por enfriamiento.

Para cargar las muestras en el gel, estas se mezclaron con 1/3 del volumen de colorante (Ficoll 400 al 30% y azul de bromofenol al 0,1% (p/v) en TBE o TAE 1X). Como marcador de pesos moleculares se utilizó “1 Kb DNA Ladder” o “Low DNA Mass™ Ladder”, de Invitrogen. La electroforesis se desarrolló en tampón TBE o TAE (según el gel), aplicando un voltaje de 80–100 V, durante aproximadamente media hora.

2.5.7.2 Electroforesis vertical de DNA en geles de poliacrilamida

Cuando el tamaño de los fragmentos de DNA era menor de 100 pb, el análisis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida, puesto que permiten una mayor resolución de los fragmentos de bajo peso molecular.

Para preparar estos geles se utilizó el sistema MiniProtean III (BioRad), una vez montado el sándwich con los cristales, se vertió la mezcla que contenía los siguientes componentes y se introdujo el peine correspondiente.

Reactivo	Concentración inicial	Volumen	Concentración final
TBE	10X	1 ml	1X
Acrilamida:bisacrilimida 29:1	30%	3,3 ml	10%
Agua	-	Hasta 10 ml	-
APS	20%	20 µl	0,4%
TEMED		10 µL	

Tabla 2.5.7.2. Disoluciones para preparar un gel de poliacrilamida para resolver DNA.

Una vez polimerizado el gel se quitó el peine, se añadió el tampón de electroforesis (TBE 1X) y se cargaron las muestras utilizando como tampón de carga (Ficoll 400 30% y azul de bromofenol al 0,1% (p/v) en TBE 1X). La electroforesis se desarrolló a 80-100V.

Los fragmentos de DNA se visualizaron bajo la luz ultravioleta tras teñir el gel con bromuro de etidio. Para ello se sumergió el gel en una disolución de agua con bromuro de etidio a una concentración final de 0,75 µg/ml durante 10 minutos a temperatura ambiente, y finalmente se lavó con agua destilada para eliminar el exceso de bromuro de etidio.

2.5.8 Análisis de mutaciones y polimorfismos en el mtDNA por RFLP

El análisis de mutaciones y polimorfismos en el mtDNA de células de ratón se llevó a cabo mediante digestión de productos de PCR (RFLP). Para comprobar la presencia de una mutación o para cuantificar el grado de dicha mutación en caso de heteroplasmia, se procedió a la amplificación por PCR del fragmento que la contenía y a la posterior digestión con enzimas de restricción.

2.5.8.1 Análisis de la mutación G15263A en mt-Cytb

Para analizar la presencia de la mutación G15263A en el gen *mt-Cytb* del complejo III mitocondrial se amplificó un fragmento de PCR de 138 pb con los oligos:

CITB L3: 5' TTGGCCAACACTAGCCTCCATCTC 3' (15195-15216)

CITBH: 5'TTTCAGGTTTACAAGACCAGAG 3' (15312-15333)

La secuencia original o silvestre del gen (G15263) alberga un sitio de corte para la enzima BbsI (GAAGAC) dando lugar a dos fragmentos de 76 y 63 pb. Este sitio de restricción desaparece en la variante mutante (A15263).

El producto de PCR resultante se digirió con la enzima Bbs I a 37°C durante 6 horas y los resultados se analizaron en geles de poliacrilamida al 10% (2.5.7.2).

2.5.9 Secuenciación automática de DNA

La secuenciación de los fragmentos de DNA clonados en los distintos vectores de clonaje y expresión, así como los productos de PCR, se realizó en la Unidad de Genómica del Servicio Interdepartamental de Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid, así como en la empresa SECUGEN S.L.

La cantidad total de DNA necesaria por cada reacción de secuenciación dependía del tipo de DNA que se enviase a secuenciar. Las muestras de PCR se purificaron antes de ser enviadas como se indica en el apartado 2.5.2.

En la siguiente tabla se recogen las cantidades necesarias de DNA y oligonucleótido, así como la concentración óptima de los mismos, para una única reacción de secuenciación, en función del tipo de DNA a secuenciar.

	PRODUCTOS DE PCR		PLÁSMIDOS
	100 – 2000 pb	> 2000 pb	
CANTIDAD TOTAL DNA	30 – 50 ng	50 – 100 ng	300 – 500 ng
CANTIDAD TOTAL OLIGO	3 – 5 pmol	3 – 5 pmol	3 – 5 ng
CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DNA	10 – 50 ng/ µl	10 – 50 ng/ µl	100 – 500 ng/µl

Tabla 2.5.9. Concentraciones óptimas de productos de PCR y plásmidos sugeridas por el servicio de secuenciación.

Las muestras se purificaron antes de enviarse utilizando los kits “GenElute PCR Clean-up” en el caso de productos de PCR o el “GenElute™ Plasmid Miniprep” en el caso de plásmidos.

Como oligonucleótidos cebadores de las reacciones de secuenciación se utilizaron los específicos del vector (M13 F y M13 R, en el caso del vector pCR®2.1), disponibles en el mismo servicio de secuenciación, o los cebadores diseñados en el laboratorio para fragmentos de PCR u otros vectores. Los resultados de la secuenciación se recibieron por correo electrónico y se analizaron en un PC usando el programa BioEdit 5.0.9.

2.6 Extracción, manipulación y análisis de proteínas

2.6.1 Extracción de proteínas totales de células en cultivo

Para extraer proteínas totales a partir de células en cultivo, partimos de placa de 100 mm de diámetro, al 80% de confluencia.

Tras eliminar el medio de cultivo, las células se tripsinizaron y se recogieron en PBS con 10% de SFB. A continuación se centrifugaron 5 min a 1.750 rpm y el pellet celular se resuspendió en PBS frío, y se repitió la centrifugación. El lavado con PBS se efectuó una vez más. El sobrenadante se eliminó cuidadosamente y el pellet celular se guardó a -80°C o bien se utilizó de inmediato manteniéndose siempre en hielo.

A continuación se procedió a la lisis celular, añadiendo 200 µl de tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM pH=7,4, NaCl 50 mM, Triton X100 1%, Na-deoxycholate 0,5%, EDTA 5 mM), que contenía una mezcla de inhibidores de proteasas (pepstatina 1 µg/ml, leupeptina 1 µg/ml, aprotinina 1 µg/ml, PMSF 1 mM). La adición de los inhibidores de proteasa al tampón de extracción se efectuó en el momento de su utilización. Los inhibidores de proteasas, a excepción del PMSF, se prepararon en etanol 1.000 veces concentrados y se guardaron a -20°C. El PMSF se preparó a una concentración de 200 mM y se conservó a 4°C.

A continuación, se incubaron 15 minutos a 4°C en una rueda giratoria, y se centrifugaron a 13.000 rpm durante otros 15 minutos a 4°C. Finalmente, se recuperó el sobrenadante y se guardó a -80°C.

2.6.2 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

La cuantificación de proteínas en extractos celulares totales (apartado 2.6.1) o en muestras de mitocondrias aisladas (apartados 2.3.2 y 2.3.3) se llevó a cabo por espectrofotometría, utilizando el método de Bradford (Bradford 1976).

Para ello, se construyó una curva de calibrado con 6 standards que tenían de 1 a 20 µg de seroalbúmina bovina (BSA). Las muestras, diluidas o no, se midieron por triplicado utilizando 3 volúmenes distintos. Tanto las muestras, como los standards y blancos, se llevaron hasta un volumen final de 800 µl y se les añadieron 200 µl del reactivo de Bradford (Bio-Rad Protein Assay) concentrado. Se les dejó desarrollar el color (de cinco minutos a una hora) y, finalmente, se procedió a la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. Con los standards, se construyó una recta de calibrado en la que se interpolaron los valores de absorbancia obtenidos con cada una de las muestras para calcular la concentración de proteína presente en las mismas.

2.6.3 Síntesis “in vitro” de proteínas

La síntesis de proteínas *in vitro* se llevó a cabo mediante el sistema TNT® Coupled Reticulocyte Lysate Systems (Promega). Dicho sistema requiere tener clonado el cDNA del gen cuyo producto queremos sintetizar, bajo el control de un promotor para la RNA polimerasa SP6. Para tal fin, utilizamos el plásmido pTNT (Promega, ver mapa de restricción en el Apéndice).

Este kit se emplea cuando nos interesa marcar radiactivamente una proteína en los aminoácidos Metionina (normalmente L-[³⁵S]-Metionina) o Leucina (normalmente L-[³H]-Leucina). En nuestro caso nos interesó utilizar proteína sintética, no necesariamente marcada, y se utilizó este mismo sistema reemplazando el mix de aminoácidos carente de aquellos que se incorporan marcados radiactivamente, por las mezclas de aminoácidos carentes de metionina y leucina provistas en el kit, mezcladas en iguales cantidades. De este modo la ausencia de uno de esos aminoácidos en uno de los reactivos, se suplementa con el otro. La mezcla de reacción se incubó durante 2 horas a 30°C. Para la comprobación de la síntesis se procedió a cargar 10 microlitros de proteína en gel de SDS-PAGE, seguido de inmunodetección de la misma con anticuerpos específicos.

Reactivos	Masa (µg)	Volumen (µl)
TNT® Lisado de reticulocito de conejo	-	25
TNT® Buffer 25X	-	2
TNT® RNA polimerasa SP6	-	1
Mezcla de aminoácidos excepto metionina, 1mM	-	0,5
Mezcla de aminoácidos excepto Leucina, 1 mM	-	0,5
Inhibidor de Ribonucleasas (40 U/µl)	-	1
Vector pTNT conteniendo el cDNA de interés	1	X
Agua libre RNAsas	-	Hasta 30 µl

Tabla 2.6.3. Mezcla de reacción para síntesis *in vitro* de proteínas.

2.6.4 Electroforesis de proteínas

2.6.4.1 Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE

La separación electroforética de las proteínas que componen los extractos celulares obtenidos (apartado 2.6.1) se llevó a cabo mediante geles desnaturalizantes de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).

El sistema utilizado para este fin fue el Mini Protean III de BioRad y las disoluciones necesarias para preparar el gel fueron las siguientes:

Disolución stock de acrilamida-bisacrilamida: acrilamida 30%: bisacrilamida 0,8% (p/v), se filtró y almacenó protegida de la luz a 4° C.

Tampón de electroforesis 10X: Tris-HCl 250 mM; glicina 1,92 M; SDS 1% (p/v).

Tampón del gel separador 4X: Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; SDS 0,4%; EDTA 8 mM.

Tampón del gel concentrador 4X: Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; SDS 0,4%, EDTA 8 mM.

Tampón de carga 4X: Glicerol 10%, Tris- HCl 50 mM pH 6,8; SDS 2% (p/v), azul de bromofenol 0,02% (p/v); β-mercaptoetanol 1% (v/v).

El porcentaje del gel separador fue el adecuado a cada caso, siendo el porcentaje del gel concentrador siempre del 5%. Para preparar 5 ml de gel separador del 12,5 ó 15% de acrilamida: bisacrilamida y 2 ml de gel concentrador, se mezclaron los compuestos que se recogen en la siguiente tabla.

Componente	Acrilamida 12,5%	Acrilamida 15%	Concentrador
Acrilamida: Bisacrilamida (30:0,8)	2,08 ml	2,5 ml	0,33 ml
Tampón 4X	1,25 ml	1,25 ml	0,5ml
H2O destilada	Hasta 5 ml	Hasta 5 ml	Hasta 2 ml
APS 20%	15 µl	15 µl	10 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl

Tabla 2.6.4.1. Composición de las disoluciones para preparar un gel de SDS-PAGE.

El gel separador se vertió entre los cristales que forman el soporte, dejando unos 2 cm para el gel concentrador. A continuación se añadió cuidadosamente una capa de isopropanol para favorecer una polimerización recta y evitar la posible entrada de oxígeno que dificultaría la polimerización. Una vez polimerizado el gel, se eliminó el isopropanol y se lavó su superficie con agua destilada. Tras retirar el exceso de agua con un papel secante, se vertió el gel concentrador, rellenando el espacio que anteriormente ocupaba el isopropanol.

Finalmente, se insertó el peine con cuidado y se esperó a la polimerización del gel antes de retirarlo. Cuando polimerizó, se quitó el peine y se lavaron los pocillos con ayuda de una jeringa con el propio tampón de electroforesis, para retirar los restos de acrilamida y SDS antes de cargar las muestras. La cubeta se llenó de tampón de electroforesis 1X y se procedió a cargar las muestras, mezcladas con tampón de carga. La

electroforesis se desarrolló a una intensidad constante de 8-10 mA hasta que las muestras llegaron al gel separador, momento en el que se subió la intensidad de corriente a 15-20 mA hasta que el frente de azul de bromofenol llegó al final del gel.

2.6.4.2 Electroforesis en geles nativos *Blue Native: Primera dimensión*

Los geles nativos en gradiente de poliacrilamida fueron descritos por primera vez por Schägger en 1991 (Schagger y von Jagow 1991) y permiten la resolución electroforética de complejos proteicos formados por más de una proteína. Esta metodología se puso a punto en 1996 para separar los complejos que integran la cadena de transporte electrónico (Schagger, Bentlage et al. 1996).

Existen dos tipos de gradientes para la formación de los geles de Blue-Native-PAGE, en función del tipo de solubilización a la que se ha sometido a la muestra (apartado 2.3.4):

Gradiente del 5 al 13%: permite la resolución de los complejos individuales que integran el sistema OXPHOS

Gradiente del 3 al 13%: permite la resolución de los supercomplejos, asociaciones entre los complejos del sistema OXPHOS.

Para la preparación de dichos geles se utilizó el sistema **Mini Protean III de BioRad** con dos cristales (uno de 10,1 x 8,3 cm y otro de 10,1 x 7,3 cm) y espaciadores unidos al cristal más alto de 1.5 mm.

Disoluciones necesarias para la preparación de los geles de Blue-Native:

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.

Tampón del cátodo A: Tricina 50 mM; Bis-Tris 15 mM pH=7,0; Serva blue G 0,02%.

Tampón del cátodo B: Tricina 50 mM; Bis-Tris 15 mM pH=7,0; Serva blue G 0,002%.

Tampón del ánodo: Bis-Tris 50 mM pH=7,0.

Tampón de carga BN: Coomassie Blue-G al 5% en ácido aminocaproico 1 M.

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 de una sola vía, que bombea la disolución hasta la abertura superior entre los cristales. Una vez preparadas las mezclas de gel del 3% ó del 5 % y del 13% de acrilamida (ver tabla), se vertieron en sendas cámaras del formador de gradientes, de forma que mientras la mezcla del 13% tenía salida directa hacia los cristales, la mezcla del 3 ó 5% se conectaba (mediante una llave) con la cámara que contenía la mezcla del 13%. Además, en la cámara que contenía la mezcla del 13% se introdujo un pequeño imán, para que la disolución se mezclase continuamente, para tal fin, el formador de gradientes se colocó sobre una placa agitadora que hacía girar dicho imán (ver figura 5).

Componente	Supercomplejos		Complejos individuales	
	Acrilamida 3%	Acrilamida 13%	Acrilamida 5%	Acrilamida 13%
Acrilamida: Bisacrilamida (48:1.5)	0,305 ml	0,866 ml	0,61 ml	1,04 ml
Tampón de gel 3X	1,667 ml	1,111 ml	2 ml	1,33 ml
H2O destilada	Hasta 5 ml	Hasta 3,333 ml	Hasta 6 ml	Hasta 4 ml
Glicerol	-	0,56 ml	-	0,72 ml
APS 20%	20 µl	7 µl	20 µl	7 µl
TEMED	4 µl	3 µl	4 µl	3 µl

Tabla 2.6.4.2. Composición de las disoluciones para preparar geles en gradiente para Blue Native.

Una vez vertidas ambas mezclas en sus respectivas cámaras, se puso en marcha la bomba peristáltica. Cuando la mezcla de 13% hubo avanzado unos 3 cm del recorrido hasta los cristales (1 ml, aproximadamente) se abrió la llave que comunicaba ambas cámaras para que empezara a formarse el gradiente. El imán de la cámara de salida mezclaba las soluciones de acrilamida conforme estas entraban en contacto.

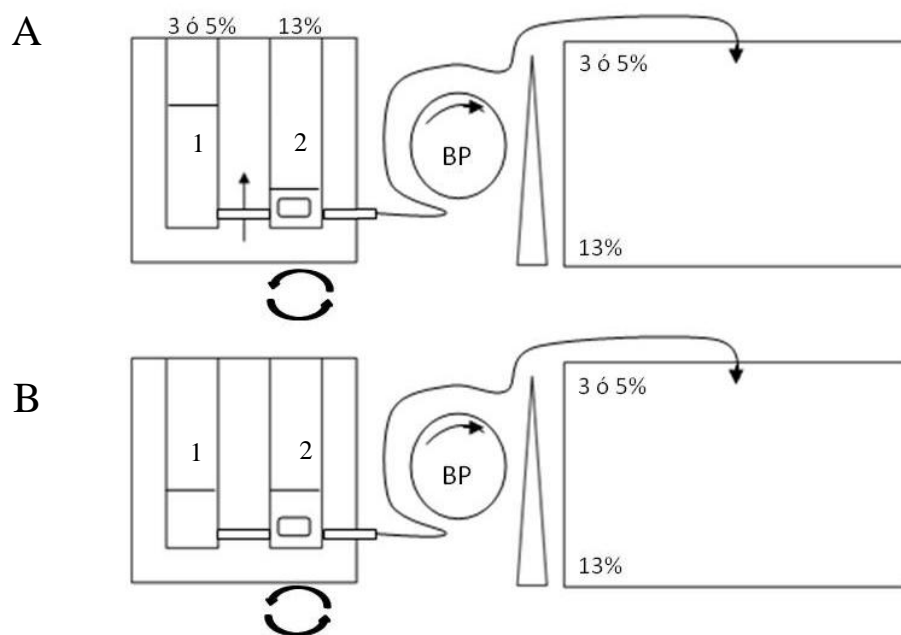


Figura 5. Esquema del montaje para la formación de un gel en gradiente. A) Comienzo del gel, la llave situada entre las dos cámaras está cerrada (flecha vertical) y solamente pasa solución del 13% de acrilamida. B) Las dos cámaras se comunican, los volúmenes se igualan en ambas, y el porcentaje de acrilamida en la cámara 2, en cuyo interior hay un imán en agitación, va disminuyendo linealmente. BP es la bomba peristáltica a la que se conecta el formador de gradientes, las flechas indican la dirección de la solución.

Cuando el gel quedó a una distancia de unos 2 cm del borde superior de los cristales, se detuvo su bombeo se añadió una fina capa de isopropanol para evitar la formación de

menisco en el gel. En este momento se dejó polimerizar el gel a temperatura ambiente. Cuando hubo polimerizado, se eliminó el isopropanol, se lavó con agua y se cubrió con tampón de gel 1X, se tapó con film de plástico y se mantuvo a 4° C hasta el día siguiente o se procedió a la formación del gel concentrador del 4% de acrilamida, preparado del mismo modo que en el apartado anterior. Rápidamente, se introdujo el peine y se dejó polimerizar a temperatura ambiente.

Tras montar el gel en el soporte del Mini Protean III, en la cámara fría, se añadieron los tampones del cátodo A y del ánodo y se limpiaron los pocillos. Las muestras, preparadas como se indica en el apartado 2.3.4 se mezclaron con 1/3 de su volumen de tampón de carga BN y se cargaron en el gel.

La electroforesis se desarrolló a voltaje constante de 90 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 (300V), y se mantuvo así hasta que el colorante azul llegó hasta el final del gel (aproximadamente 1,5 h). Transcurridos 30 minutos después de limitar la corriente a 15 mA (300V), se cambió el tampón del cátodo A por el B para poder apreciar mejor las bandas de los complejos proteicos a lo largo del recorrido electroforético.

Una vez terminada la electroforesis, en función de la finalidad del experimento se realizó:

- Directamente transferencia de las proteínas del gel a una membrana de PVDF (Western-Blot) para la realización de una inmunodetección (ver apartado 2.6.5.1).
- Recorte de las calles del gel nativo, tratamiento desnaturante y electroforesis a través de un gel de SDS-PAGE de 2ª dimensión, seguida de Western-Blot e inmunodetección.

2.6.4.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturante: Segunda dimensión

Una vez separados los distintos complejos o supercomplejos del sistema OXPHOS en el gel de Blue-Native, es posible disgregar cada complejo en las subunidades que lo componen y separarlas electroforéticamente utilizando un segundo gel desnaturante SDS-PAGE.

El sistema utilizado para hacer el gel fue el Mini Protean III de BioRad con dos cristales (uno de 10,1 x 8,3 cm y otro de 10,1 x 7,3 cm) y espaciadores unidos al cristal más alto de 1 mm.

Las disoluciones necesarias para la preparación de los geles de poliacrilamida desnaturantes fueron las siguientes:

Tampón de gel 3X (2D): Tris 3 M; SDS 0,3%; pH =8,45.

Disolución de acrilamida: bisacrilamida (48:1,5) (p/v), que se filtró y se almacenó protegida de la luz a 4°C.

Tampón del cátodo: Tricina 0,1 M; Tris 0,1 M; SDS 0,1%; pH=8,25.

Tampón del ánodo: Tris 0,2 M pH=8,9.

Tras correr la muestra en un gel de Blue Native, se recortó la calle correspondiente del gel y se colocó sobre un cristal de 10,1 x 8,3 cm, cubriendo el ancho de dicho cristal (donde normalmente iría el peine).

A continuación, la banda de gel se cubrió completamente con una solución del 1% de 2-Mercaptoetanol y 1% SDS, durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se eliminó esta solución desnaturalizante de la tira de gel de Blue Native utilizando un papel secante. Seguidamente, se colocó encima del cristal que contenía la tira el cristal de 10,1 x 7,3 cm, casando las bases de ambos para montar el sándwich donde verter el gel desnaturalizante.

El gel desnaturalizante compuesto por un gel separador (del 16,5% de acrilamida:bisacrilamida) y dos concentradores (10%, desnaturalizante y nativo) se preparó como se indica en la siguiente tabla.

Componente	Gel separador 16.5%	Gel concentrador 10%	
		Desnaturalizante	Nativo
Acrilamida: Bisacrilamida (48:1,5)	2,5 ml	0,606 ml	0,606 ml
Tampón de gel 3X (2D)	2,5 ml	1 ml	-
Tampón de gel 3X (BN)	-	-	1 ml
Agua destilada	1,6 ml	1 ml	1 ml
Glicerol	0,9 ml	0,4 ml	0,4 ml
APS 20%	12,5 µl	7 µl	7 µl
TEMED	2,5 µl	2 µl	2 µl

Tabla 2.6.4.3 Composición de las disoluciones para preparar un gel de BN-PAGE.

El gel separador se vertió dentro de los cristales evitando tocar la tira de gel de Blue-Native, que se encontraba en el borde superior, hasta una distancia de unos 3 cm de la tira de gel. Una vez polimerizado el primer gel, se vertió el gel concentrador desnaturalizante hasta quedar tan cerca de la tira de gel de Blue-Native como fue posible sin llegar a tocarla.

De nuevo, tras polimerizar, se vertió un segundo gel concentrador, no desnaturalizante en este caso, hasta cubrir completamente la tira de gel. La composición de este último gel era la misma que la del concentrador desnaturalizante, con la excepción de que el tampón utilizado para su preparación era el mismo que el utilizado para la preparación del gel de Blue-Native (ver apartado 2.6.4.2).

Una vez polimerizado, el gel se corrió a temperatura ambiente, durante el tiempo necesario (20 horas aproximadamente), a amperaje constante de 15-20 mA (exceptuando los primeros 30 minutos, en los que se corrió a 10 mA).

2.6.5. Western Blot e Inmunodetección de proteínas

2.6.5.1 Transferencia y fijación de proteínas a membranas de PVDF

La transferencia de las proteínas separadas electroforéticamente a membranas de PVDF se realizó mediante electrotransferencia utilizando el sistema Mini Trans-Blot Cell o Trans-Blot Cell de Bio-Rad, en función del tamaño del gel.

Para ello, se cortó un pedazo de membrana de PVDF (Hybond-P de Amersham) adecuado al tamaño del gel a transferir, se incubó en metanol durante 10 segundos y se lavó en agua destilada durante 5 minutos. Seguidamente, la membrana se equilibró en el tampón de transferencia (BSN: Tris 48 mM; glicina 39 mM; metanol 20% (v/v)) durante unos 10 minutos. Simultáneamente, el gel se sumergió en el mismo tampón durante el mismo tiempo.

El “sándwich” del aparato de transferencia se montó sumergido en tampón de transferencia según las indicaciones del fabricante. La transferencia se realizó a 4°C a 100 V durante 1 h o a 30 V durante toda la noche.

Una vez terminada la transferencia, se dejó secar la membrana a temperatura ambiente y seguidamente las proteínas se fijaron a la misma sumergiéndola en metanol durante 10 segundos. La membrana se lavó brevemente en PBS, y se conservó envuelta en film de plástico papel y Whatman 3MM a 4° C hasta su uso.

La eficiencia de la transferencia se comprobó tiñendo las proteínas de la membrana de forma reversible con Rojo Ponceau (SIGMA) durante unos segundos. Rápidamente se observa la presencia de las bandas de las proteínas y la formación de posibles burbujas. Para eliminar la solución de teñido, basta con lavar la membrana en PBS varias veces.

Otra forma de comprobar la eficiencia de la transferencia es teñir el gel transferido con azul de Coomassie y comprobar que no quedan proteínas en él.

2.6.5.2. Incubación de los anticuerpos primarios y secundarios

Cabe destacar que todas las incubaciones y lavados realizados para la inmunodetección de proteínas se realizaron en agitación.

Antes de empezar la primera incubación, se humedeció la membrana en metanol durante unos segundos para su rehidratación y activación, y a continuación se lavó con PBS-T (Tween 20 al 0,1% en PBS) durante unos minutos.

Antes de proceder a las incubaciones con los anticuerpos de elección, la membrana se bloqueó, es decir, se eliminaron los posibles sitios de unión inespecíficos de la misma. Para ello, se incubó la membrana en una disolución de leche desnatada en polvo al 5% en PBS-T durante al menos 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Seguidamente, se eliminó el exceso de agente bloqueante mediante un lavado de 5 min con PBS-T.

El anticuerpo primario comercial se diluyó en la proporción adecuada (ver Tabla 1.7) en una disolución de PBS-T con 0,1% de leche desnatada en polvo. La incubación con el anticuerpo primario se dejó un tiempo variable entre 1 y 2 horas a temperatura ambiente, o a 4°C durante toda la noche. Pasado este tiempo, la membrana se lavó con PBS-T tres veces durante 10 minutos. El anticuerpo secundario (anti IgG de ratón, rata o de conejo conjugado con peroxidasa de rábano) se diluyó a una proporción de 1:5.000 en 0,1% de leche desnatada en polvo disuelta en PBS-T y se incubó la membrana con él durante 45-60 minutos. Finalmente, se eliminó esta última disolución y se procedió a los tres últimos lavados de 10 minutos con PBS-T.

2.6.5.3 Detección de proteínas

La detección de la proteína de interés se realizó mediante la reacción de la enzima peroxidasa de rábano, conjugada al anticuerpo secundario, al entrar en contacto con el luminol como sustrato quimioluminiscente (ECL de Amersham, EZ-ECL de Biological Industries o Pierce® ECL Western Blotting Substrate).

La membrana, incubada con los anticuerpos primario y secundario, se incubó durante un minuto con el sustrato quimioluminiscente y la luz emitida en dicha reacción se detectó, tras envolver la membrana en un film transparente de plástico, mediante una placa de autorradiografía. El revelado se realizó sumergiendo la placa de autorradiografía, durante el tiempo necesario, en el revelador Kodak® (suministrado por SIGMA). Finalmente la señal obtenida se fijó durante 1 minuto sumergiendo dicha placa en el fijador Kodak® (suministrado por SIGMA).

2.6.5.4 Reutilización de las membranas

Con el fin de eliminar los anticuerpos unidos a las proteínas fijadas en la membrana y hacer posible la reutilización de la misma en otra inmunodetección, la membrana se sumergió en una solución de *stripping* (2-mercaptoetanol 100 mM, SDS 2%, Tris-HCl 1 M pH=6,7) y se incubó a 58°C durante 30 minutos, con agitación ocasional. Transcurrido este tiempo, se realizaron tres lavados de 10 minutos a temperatura ambiente con PBS-T. A partir de ese momento, la membrana estaba lista para ser reutilizada.

2.6.6. Inmuncitofluorescencia

La localización microscópica de determinadas proteínas dentro de una célula y su colocalización o no con la mitocondria, se realizó tal y como se detalla a continuación:

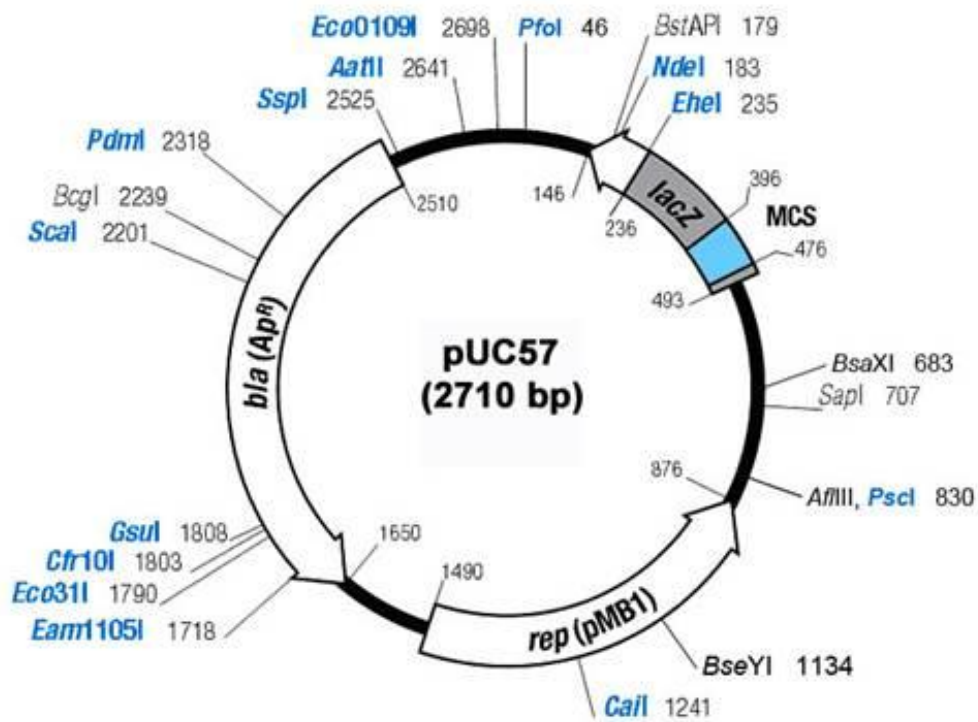
Las células sometidas a estudio se sembraron sobre un cubreobjetos estéril, en placas de 6 pocillos. Sin dejar que llegaran a confluencia, las células se incubaron en presencia de un colorante fluorescente específico para las mitocondrias (rojo: MitoTracker® Red CMXRos (Invitrogen) a Cf=100 nM en medio de cultivo, o verde, MitoTracker®Green Cf=200 nM) durante 30 minutos en el incubador a 37°C y 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo, se cambió el medio por medio de cultivo sin colorante y se dejó durante otros 30 min en el incubador celular.

A continuación, las células se lavaron con PBS y se fijaron con formaldehído al 3,7% en PBS durante 20 min a temperatura ambiente, en agitación. Seguidamente, se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS y se procedió a la apertura de poros en las membranas celulares tratando con metanol (preenfriado a -20°C) durante 5 min. El metanol se eliminó mediante 3 lavados de 5 min con PBS.

La inmunodetección se realizó añadiendo un volumen adecuado del anticuerpo primario (ver apartado 1.7.2) y se dejó incubando durante 2 h a temperatura ambiente, o toda la noche a 4°C. A continuación, se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS y se añadió el anticuerpo secundario fluorescente (ver apartado 1.7.2) y se incubó durante 1 h, protegido de la luz.

Finalmente, tras la realización de 3 lavados de 5 min con PBS, siempre protegido de la luz, se tomó el cubreobjetos que contenía las células “marcadas” y se montó sobre un portaobjetos con ayuda de una solución de montaje Slow Fade® Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen) (solución que tiñe los núcleos celulares). A partir de este momento, las células pueden ser visualizadas en el microscopio de fluorescencia o conservadas a 4°C en oscuridad, hasta su uso.

Apéndice



M13/pUC sequencing primer (-20), 17-mer

396 *EcoRI* *XbaI* *Eco136II* *SacI* *Acc65I* *XbaI* *Bsp68I* *MvaI269I* *Mpm1103I* *XbaI* *EcoRV* *BamHI* *CfrI* *Eco88I* *SmaI* *ApaI* *Bsp120I* *HincII* *SatI* *XmiI* *PstI* *Eco147I* *PaeI* *HindIII* 476

5' GTAA AAC GAC GGC CAG TGA ATT CGA GCT CGG TAC CTC GCG AAT GCA TCT AGA TAT CGG ATC CCG GGC CCG TCG ACT GCA GAG GCC TGC ATG CAA GCT TGG

3' CATT TTG CTG CCG GTC ACT TAA GCT CGA GCC ATG GAG CGC TTA CGT AGA TCT ATA GCC TAG GGC CCG GGC AGC TGA CGT CTC CGG ACG TAC GTT CGA Acc

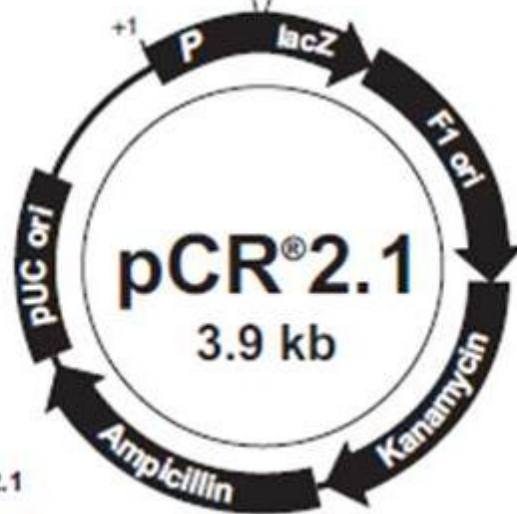
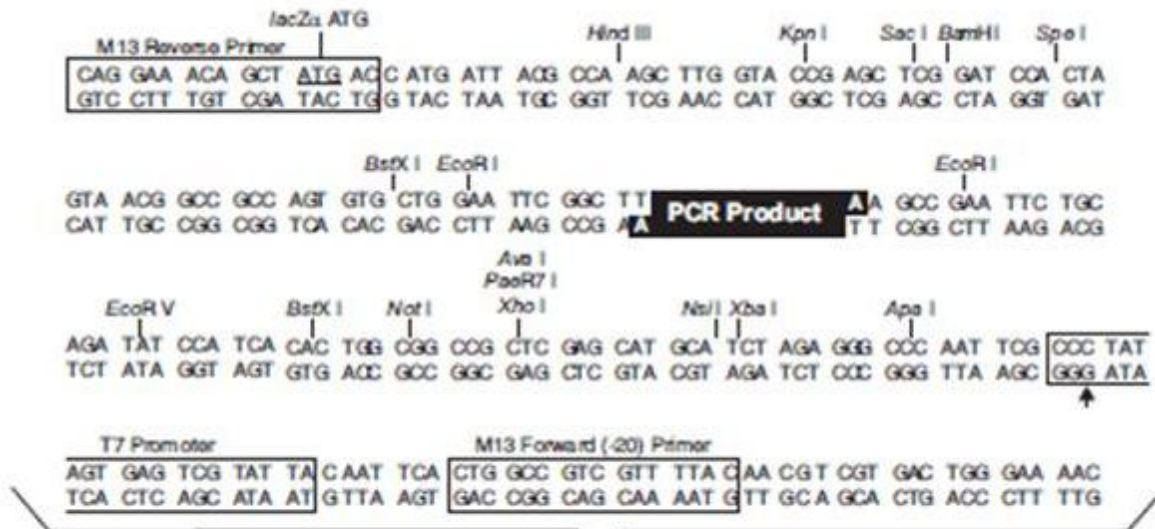
LacZ ← Val Val Ala Leu Ser Asn Ser Ser Pro Val Glu Arg Ile Cys Arg Ser Ile Pro Asp Arg Ala Arg Arg Ser Cys Leu Gly Ala His Leu Ser Pro

CGT AAT CAT GGT CAT AGC TGT TTC CTG 3'

GCATTA GTA CCA GTA TCG ACA AAG GAC 5'

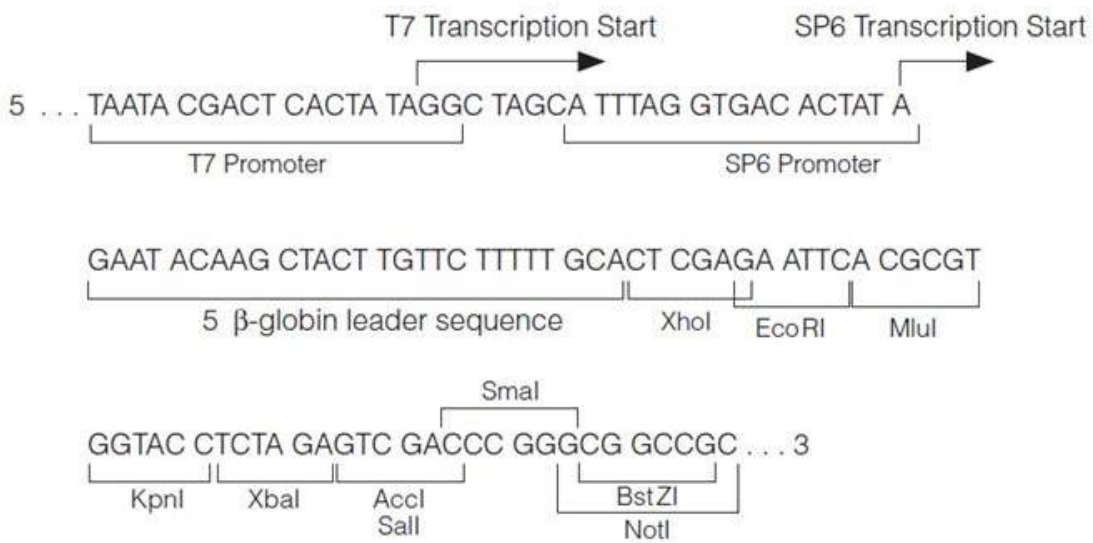
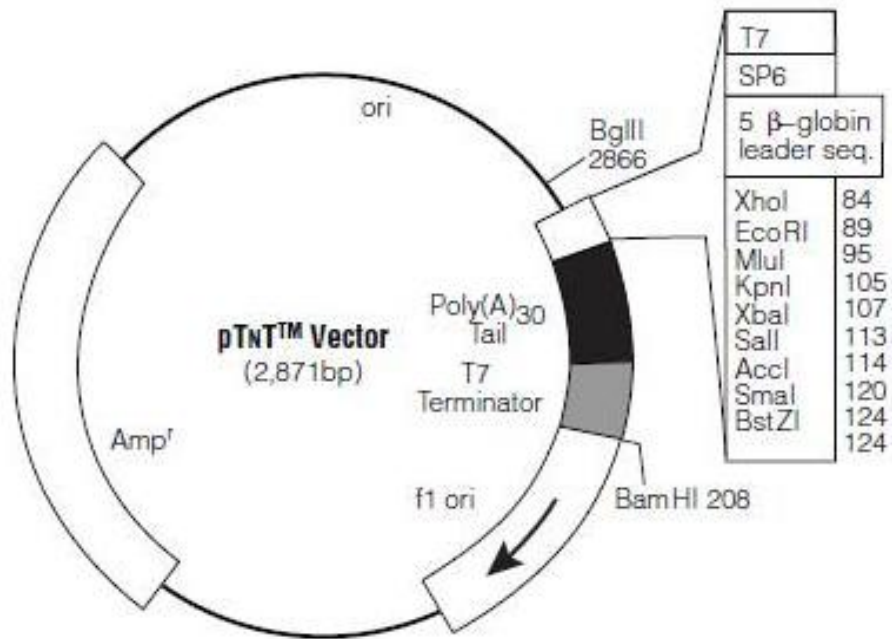
Thr Ile Met Thr Met

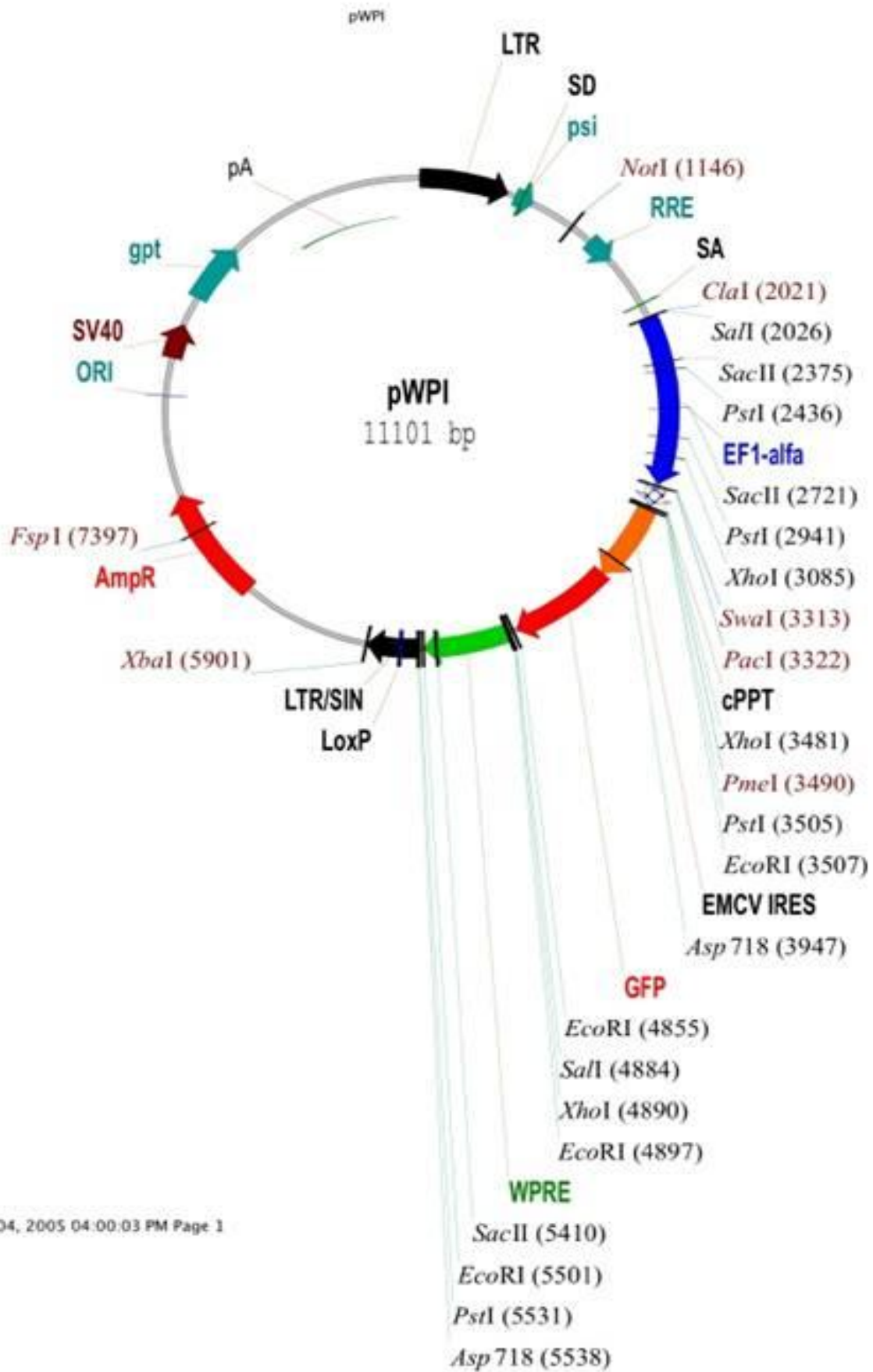
M13/pUC reverse sequencing primer (-26), 17-mer

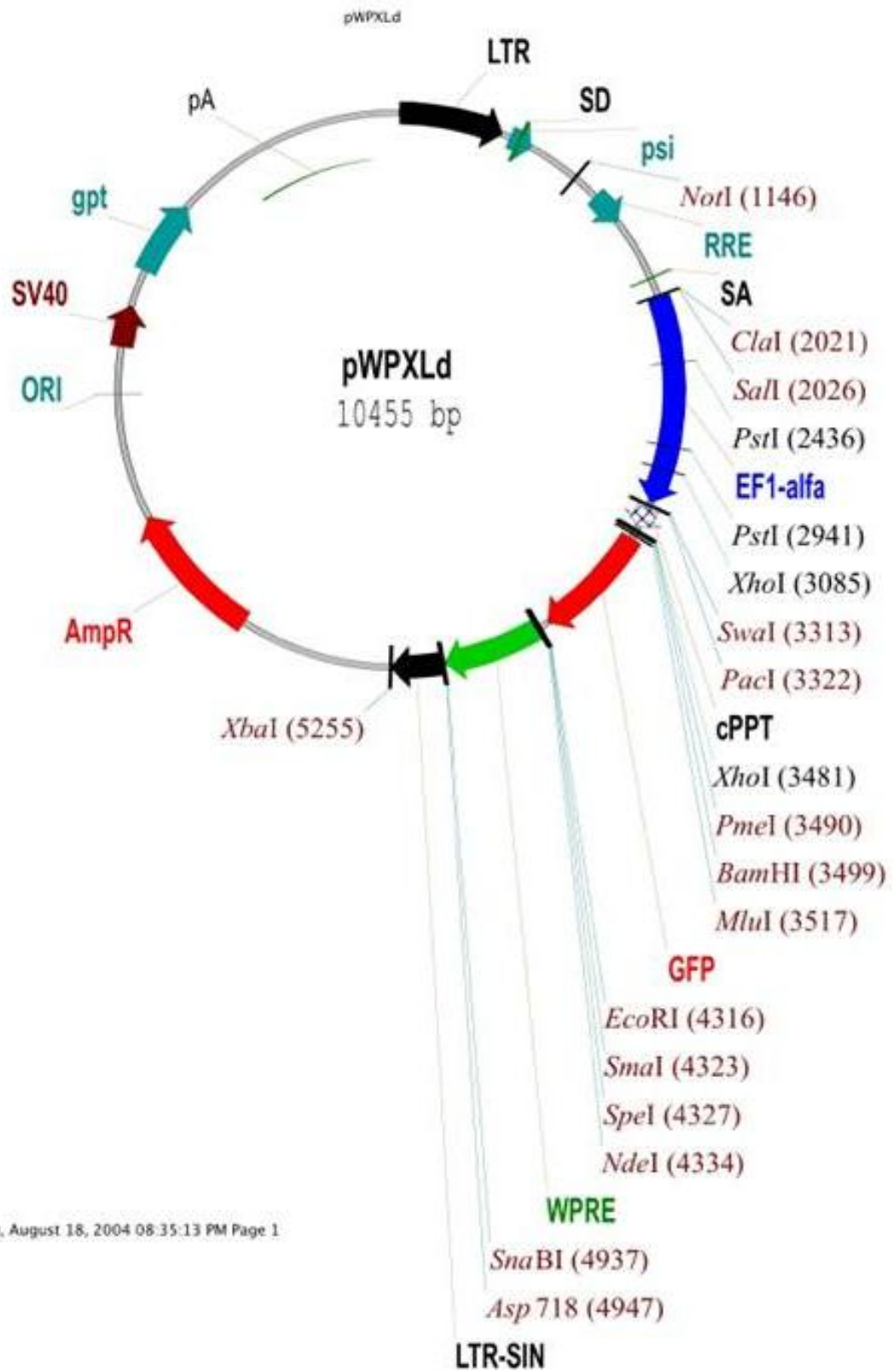


Comments for pCR®2.1
3929 nucleotides

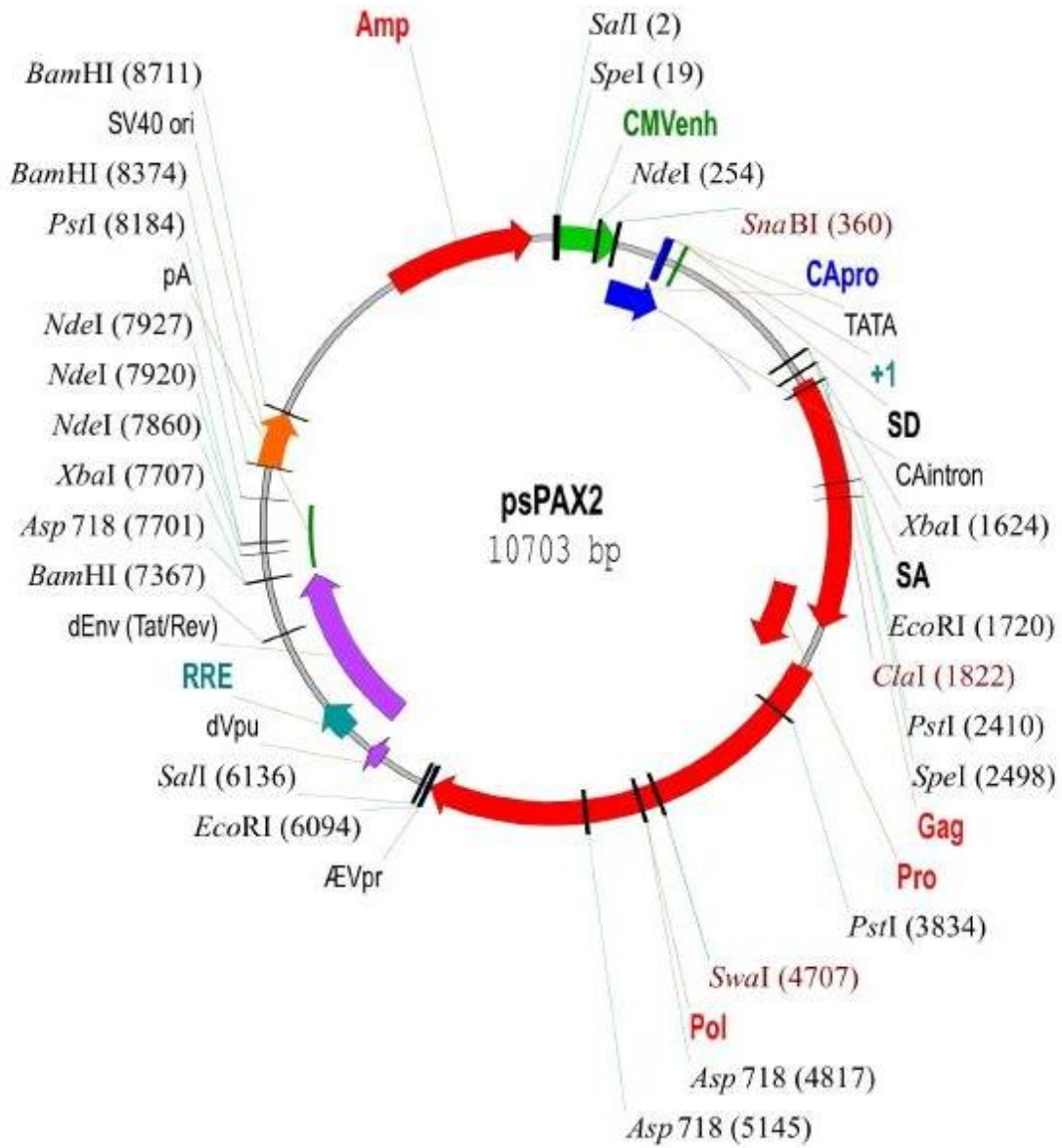
- LacZα gene: bases 1-545
- M13 Reverse priming site: bases 205-221
- T7 promoter: bases 362-381
- M13 (-20) Forward priming site: bases 389-404
- f1 origin: bases 546-983
- Kanamycin resistance ORF: bases 1317-2111
- Ampicillin resistance ORF: bases 2129-2989
- pUC origin: bases 3134-3807

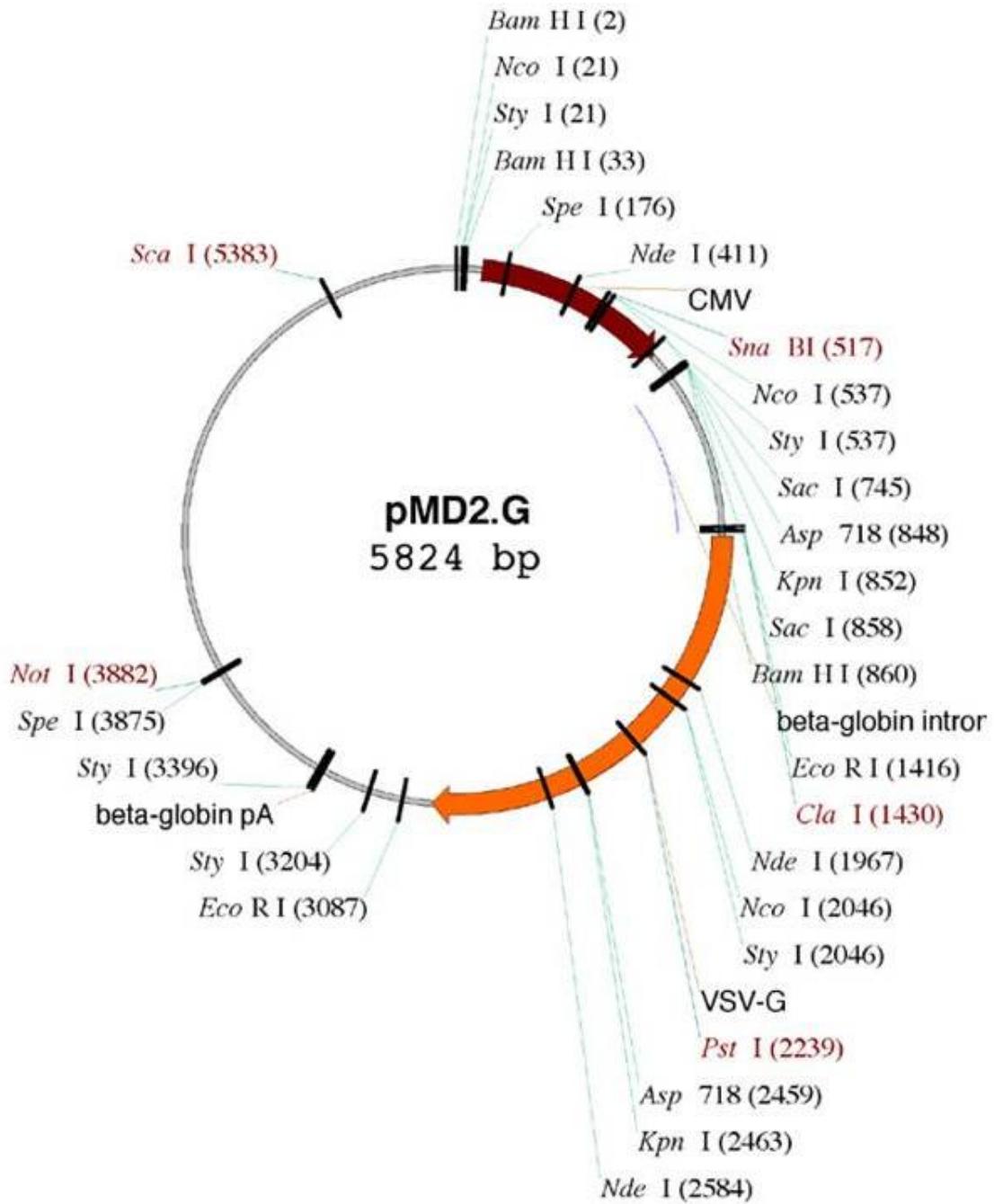


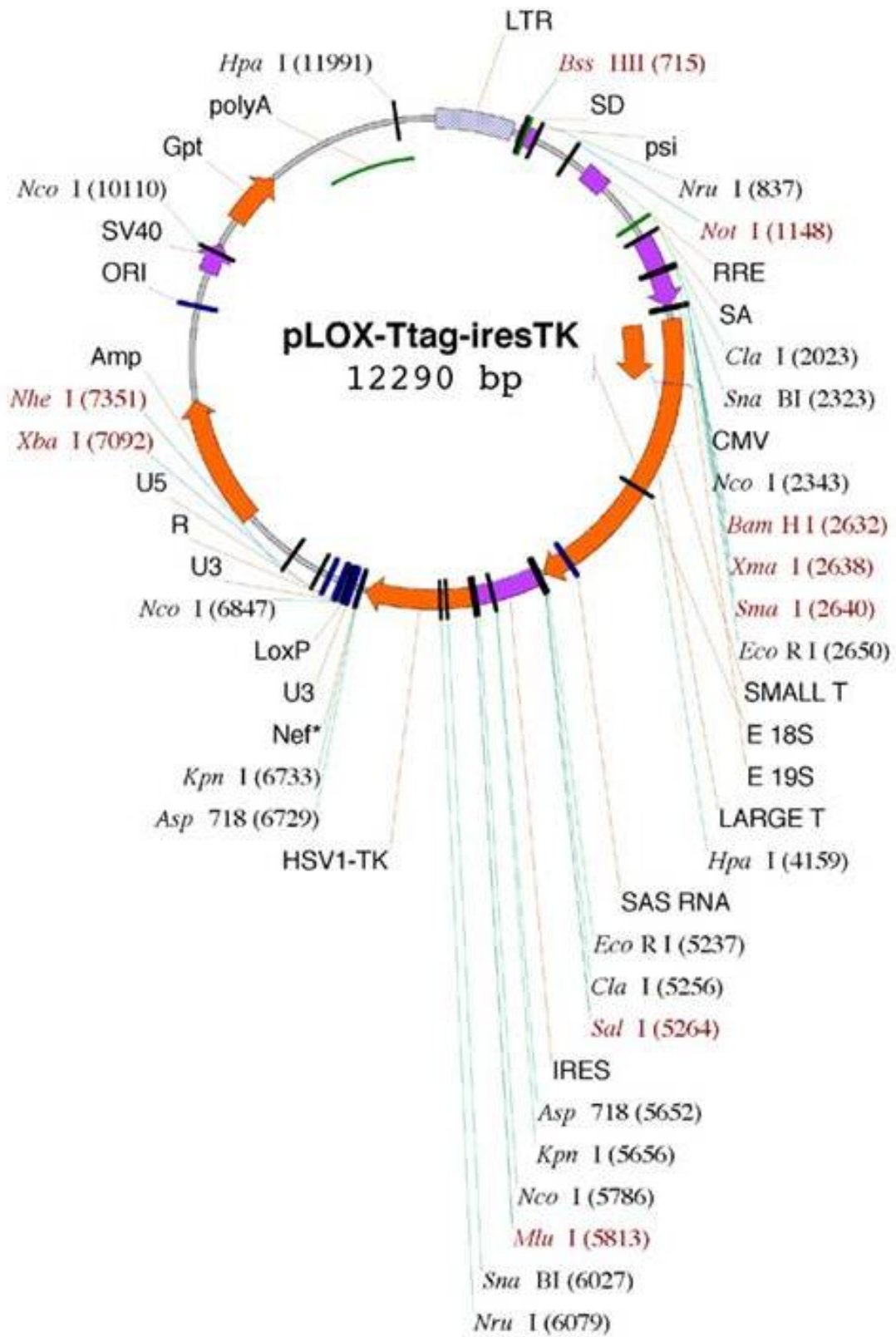


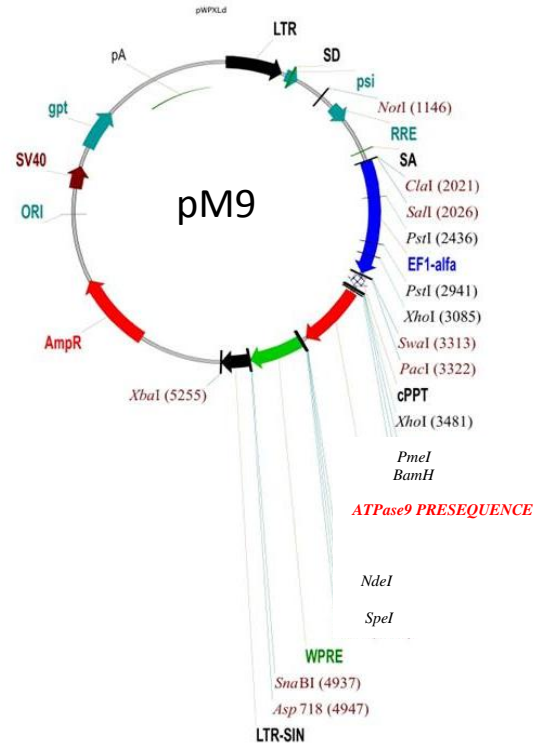
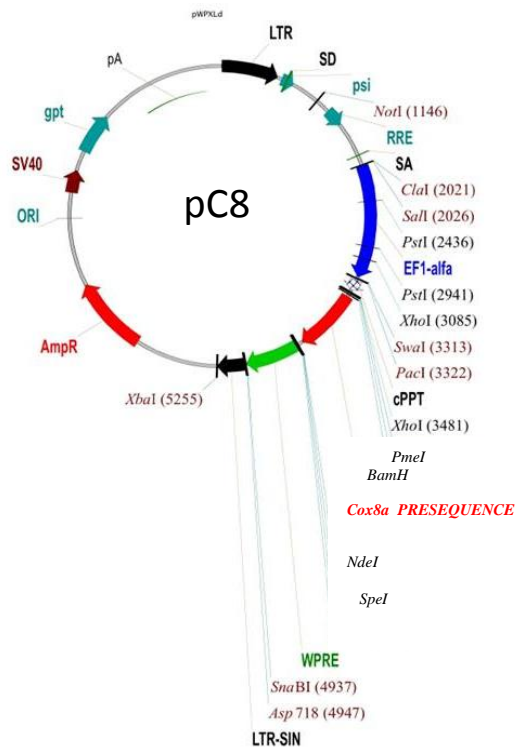


Jay, August 18, 2004 08:35:13 PM Page 1









Bibliografía

- Abrahams, J. P., A. G. Leslie, R. Lutter and J. E. Walker (1994). "Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria." *Nature* **370**(6491): 621-628.
- Acín-Pérez, R. (2004). *Genética funcional del mtDNA: Modelos celulares y animales. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Zaragoza, Universidad de Zaragoza. Tesis Doctoral: 367.*
- Acin-Perez, R., M. P. Bayona-Bafaluy, M. Bueno, C. Machicado, P. Fernandez-Silva, A. Perez-Martos, J. Montoya, M. J. Lopez-Perez, J. Sancho and J. A. Enriquez (2003). "An intragenic suppressor in the cytochrome c oxidase I gene of mouse mitochondrial DNA." *Hum Mol Genet* **12**(3): 329-339.
- Acin-Perez, R., M. P. Bayona-Bafaluy, P. Fernandez-Silva, R. Moreno-Loshuertos, A. Perez-Martos, C. Bruno, C. T. Moraes and J. A. Enriquez (2004). "Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria." *Mol Cell* **13**(6): 805-815.
- Acin-Perez, R., P. Fernandez-Silva, M. L. Peleato, A. Perez-Martos and J. A. Enriquez (2008). "Respiratory active mitochondrial supercomplexes." *Mol Cell* **32**(4): 529-539.
- Adamantidis, A. R., F. Zhang, A. M. Aravanis, K. Deisseroth and L. de Lecea (2007). "Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons." *Nature* **450**(7168): 420-424.
- Adams, P. L., R. N. Lightowers and D. M. Turnbull (1997). "Molecular analysis of cytochrome c oxidase deficiency in Leigh's syndrome." *Ann Neurol* **41**(2): 268-270.
- Ahting, U., M. Thieffry, H. Engelhardt, R. Hegerl, W. Neupert and S. Nussberger (2001). "Tom40, the pore-forming component of the protein-conducting TOM channel in the outer membrane of mitochondria." *J Cell Biol* **153**(6): 1151-1160.
- Aizencang, G. I., D. F. Bishop, D. Forrest, K. H. Astrin and R. J. Desnick (2000). "Uroporphyrinogen III synthase. An alternative promoter controls erythroid-specific expression in the murine gene." *J Biol Chem* **275**(4): 2295-2304.
- Allen, J. F. and J. A. Raven (1996). "Free-radical-induced mutation vs redox regulation: costs and benefits of genes in organelles." *J Mol Evol* **42**(5): 482-492.
- Allen, S. J., J. M. Kim, H. G. Khorana, H. Lu and P. J. Booth (2001). "Structure and function in bacteriorhodopsin: the effect of the interhelical loops on the protein folding kinetics." *J Mol Biol* **308**(2): 423-435.
- Anderson, S., A. T. Bankier, B. G. Barrell, M. H. de Bruijn, A. R. Coulson, J. Drouin, I. C. Eperon, D. P. Nierlich, B. A. Roe, F. Sanger, P. H. Schreier, A. J. Smith, R. Staden and I. G. Young (1981). "Sequence and organization of the human mitochondrial genome." *Nature* **290**(5806): 457-465.
- Andersson, S. G., O. Karlberg, B. Canback and C. G. Kurland (2003). "On the origin of mitochondria: a genomics perspective." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**(1429): 165-177; discussion 177-169.

- Andreu, A. L., N. Checcarelli, S. Iwata, S. Shanske and S. DiMauro (2000). "A missense mutation in the mitochondrial cytochrome b gene in a revisited case with histiocytoid cardiomyopathy." *Pediatr Res* **48**(3): 311-314.
- Andreu, A. L., M. G. Hanna, H. Reichmann, C. Bruno, A. S. Penn, K. Tanji, F. Pallotti, S. Iwata, E. Bonilla, B. Lach, J. Morgan-Hughes and S. DiMauro (1999). "Exercise intolerance due to mutations in the cytochrome b gene of mitochondrial DNA." *N Engl J Med* **341**(14): 1037-1044.
- Anesti, V. and L. Scorrano (2006). "The relationship between mitochondrial shape and function and the cytoskeleton." *Biochim Biophys Acta* **1757**(5-6): 692-699.
- Anton, C., K. Walczak, D. Lueking and C. Friedrich (2010). "Integration of optical protein with electronics for bio-nanosensors." *J Nanosci Nanotechnol* **10**(9): 6104-6109.
- Antonicka, H., S. C. Leary, G. H. Guercin, J. N. Agar, R. Horvath, N. G. Kennaway, C. O. Harding, M. Jaksch and E. A. Shoubridge (2003). "Mutations in COX10 result in a defect in mitochondrial heme A biosynthesis and account for multiple, early-onset clinical phenotypes associated with isolated COX deficiency." *Hum Mol Genet* **12**(20): 2693-2702.
- Antonicka, H., A. Mattman, C. G. Carlson, D. M. Glerum, K. C. Hoffbuhr, S. C. Leary, N. G. Kennaway and E. A. Shoubridge (2003). "Mutations in COX15 produce a defect in the mitochondrial heme biosynthetic pathway, causing early-onset fatal hypertrophic cardiomyopathy." *Am J Hum Genet* **72**(1): 101-114.
- Aravanis, A. M., L. P. Wang, F. Zhang, L. A. Meltzer, M. Z. Mogri, M. B. Schneider and K. Deisseroth (2007). "An optical neural interface: in vivo control of rodent motor cortex with integrated fiberoptic and optogenetic technology." *J Neural Eng* **4**(3): S143-156.
- Armstrong, J. S., M. Whiteman, P. Rose and D. P. Jones (2003). "The Coenzyme Q10 analog decylubiquinone inhibits the redox-activated mitochondrial permeability transition: role of mitochondrial [correction mitochondrial] complex III." *J Biol Chem* **278**(49): 49079-49084.
- Arnold, I., K. Pfeiffer, W. Neupert, R. A. Stuart and H. Schagger (1998). "Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits." *EMBO J* **17**(24): 7170-7178.
- Arnold, S. and B. Kadenbach (1997). "Cell respiration is controlled by ATP, an allosteric inhibitor of cytochrome-c oxidase." *Eur J Biochem* **249**(1): 350-354.
- Astuti, D., F. Douglas, T. W. Lennard, I. A. Aligianis, E. R. Woodward, D. G. Evans, C. Eng, F. Latif and E. R. Maher (2001). "Germline SDHD mutation in familial pheochromocytoma." *Lancet* **357**(9263): 1181-1182.
- Astuti, D., F. Latif, A. Dallol, P. L. Dahia, F. Douglas, E. George, F. Skoldberg, E. S. Husebye, C. Eng and E. R. Maher (2001). "Gene mutations in the succinate dehydrogenase subunit SDHB cause susceptibility to familial pheochromocytoma and to familial paraganglioma." *Am J Hum Genet* **69**(1): 49-54.
- Attardi, G., A. Chomyn, M. P. King, B. Kruse, P. L. Polosa and N. N. Murdter (1990). "Regulation of mitochondrial gene expression in mammalian cells." *Biochem Soc Trans* **18**(4): 509-513.

- Attardi, G. and D. Ojala (1971). "Mitochondrial ribosome in HeLa cells." Nat New Biol **229**(5): 133-136.
- Attardi, G. and G. Schatz (1988). "Biogenesis of mitochondria." Annu Rev Cell Biol **4**: 289-333.
- Bacman, S. R., S. L. Williams, D. Hernandez and C. T. Moraes (2007). "Modulating mtDNA heteroplasmy by mitochondria-targeted restriction endonucleases in a 'differential multiple cleavage-site' model." Gene Ther **14**(18): 1309-1318.
- Bai, Y., P. Hajek, A. Chomyn, E. Chan, B. B. Seo, A. Matsuno-Yagi, T. Yagi and G. Attardi (2001). "Lack of complex I activity in human cells carrying a mutation in MtDNA-encoded ND4 subunit is corrected by the *Saccharomyces cerevisiae* NADH-quinone oxidoreductase (NDI1) gene." J Biol Chem **276**(42): 38808-38813.
- Baker, M. J., T. Tatsuta, Langer T. (2011). "Quality control of mitochondrial proteostasis." Cold Spring Harb Perspect Biol **3**.
- Balaban, R. S., S. Nemoto and T. Finkel (2005). "Mitochondria, oxidants, and aging." Cell **120**(4): 483-495.
- Barel, O., Z. Shorer, H. Flusser, R. Ofir, G. Narkis, G. Finer, H. Shalev, A. Nasasra, A. Saada and O. S. Birk (2008). "Mitochondrial complex III deficiency associated with a homozygous mutation in UQCRCQ." Am J Hum Genet **82**(5): 1211-1216.
- Barrell, B. G., A. T. Bankier and J. Drouin (1979). "A different genetic code in human mitochondria." Nature **282**(5735): 189-194.
- Barrientos, A., M. H. Barros, I. Valnot, A. Rotig, P. Rustin and A. Tzagoloff (2002). "Cytochrome oxidase in health and disease." Gene **286**(1): 53-63.
- Bayley, H., R. Radhakrishnan, K. S. Huang and H. G. Khorana (1981). "Light-driven proton translocation by bacteriorhodopsin reconstituted with the phenyl analog of retinal." J Biol Chem **256**(8): 3797-3801.
- Bayona-Bafaluy, M. P. (2001). Estrategia de generación, aislamiento y caracterización de mutaciones, en el mtDNA de células de ratón. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Zaragoza, Universidad de Zaragoza. **Tesis doctoral**: 203.
- Bayona-Bafaluy, M. P., R. Acin-Perez, J. C. Mullikin, J. S. Park, R. Moreno-Loshuertos, P. Hu, A. Perez-Martos, P. Fernandez-Silva, Y. Bai and J. A. Enriquez (2003). "Revisiting the mouse mitochondrial DNA sequence." Nucleic Acids Res **31**(18): 5349-5355.
- Bayona-Bafaluy, M. P., B. Blits, B. J. Battersby, E. A. Shoubridge and C. T. Moraes (2005). "Rapid directional shift of mitochondrial DNA heteroplasmy in animal tissues by a mitochondrially targeted restriction endonuclease." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(40): 14392-14397.
- Bayona-Bafaluy, M. P., N. Movilla, A. Perez-Martos, P. Fernandez-Silva and J. A. Enriquez (2008). "Functional genetic analysis of the mammalian mitochondrial DNA encoded peptides: a mutagenesis approach." Methods Mol Biol **457**: 379-390.
- Baysal, B. E., R. E. Ferrell, J. E. Willett-Brozick, E. C. Lawrence, D. Myssiorek, A. Bosch, A. van der Mey, P. E. Taschner, W. S. Rubinstein, E. N. Myers, C. W.

- Richard, 3rd, C. J. Cornelisse, P. Devilee and B. Devlin (2000). "Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma." Science **287**(5454): 848-851.
- Becker, T., S. Pfannschmidt, B. Guiard, D. Stojanovski, D. Milenkovic, S. Kutik, N. Pfanner, C. Meisinger and N. Wiedemann (2008). "Biogenesis of the mitochondrial TOM complex: Mim1 promotes insertion and assembly of signal-anchored receptors." J Biol Chem **283**(1): 120-127.
- Beja, O., L. Aravind, E. V. Koonin, M. T. Suzuki, A. Hadd, L. P. Nguyen, S. B. Jovanovich, C. M. Gates, R. A. Feldman, J. L. Spudich, E. N. Spudich and E. F. DeLong (2000). "Bacterial rhodopsin: evidence for a new type of phototrophy in the sea." Science **289**(5486): 1902-1906.
- Beja, O., E. N. Spudich, J. L. Spudich, M. Leclerc and E. F. DeLong (2001). "Proteorhodopsin phototrophy in the ocean." Nature **411**(6839): 786-789.
- Belikova, N. A., J. Jiang, Y. Y. Tyurina, Q. Zhao, M. W. Epperly, J. Greenberger and V. E. Kagan (2007). "Cardiolipin-specific peroxidase reactions of cytochrome C in mitochondria during irradiation-induced apoptosis." Int J Radiat Oncol Biol Phys **69**(1): 176-186.
- Benard, G., B. Faustin, A. Galinier, C. Rocher, N. Bellance, K. Smolkova, L. Casteilla, R. Rossignol and T. Letellier (2008). "Functional dynamic compartmentalization of respiratory chain intermediate substrates: implications for the control of energy production and mitochondrial diseases." Int J Biochem Cell Biol **40**(8): 1543-1554.
- Bestwick, M., O. Khalimonchuk, F. Pierrel and D. R. Winge (2010). "The role of Coa2 in hemylation of yeast Cox1 revealed by its genetic interaction with Cox10." Mol Cell Biol **30**(1): 172-185.
- Bhargava, K., P. Templeton and L. L. Spremulli (2004). "Expression and characterization of isoform 1 of human mitochondrial elongation factor G." Protein Expr Purif **37**(2): 368-376.
- Bianchi, C., M. L. Genova, G. Parenti Castelli and G. Lenaz (2004). "The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly: kinetic evidence using flux control analysis." J Biol Chem **279**(35): 36562-36569.
- Bibb, M. J., R. A. Van Etten, C. T. Wright, M. W. Walberg and D. A. Clayton (1981). "Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA." Cell **26**(2 Pt 2): 167-180.
- Birch-Machin, M. A. and D. M. Turnbull (2001). "Assaying mitochondrial respiratory complex activity in mitochondria isolated from human cells and tissues." Methods Cell Biol **65**: 97-117.
- Blesa, J. R., J. A. Prieto-Ruiz, J. M. Hernandez and J. Hernandez-Yago (2007). "NRF-2 transcription factor is required for human TOMM20 gene expression." Gene **391**(1-2): 198-208.
- Boekema, E. J. and H. P. Braun (2007). "Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system." J Biol Chem **282**(1): 1-4.

- Bogehagen, D. and D. A. Clayton (1977). "Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle." Cell **11**(4): 719-727.
- Bogehagen, D. F. (2011). "Mitochondrial DNA nucleoid structure." Biochim Biophys Acta.
- Bogehagen, D. F., D. Rousseau and S. Burke (2008). "The layered structure of human mitochondrial DNA nucleoids." J Biol Chem **283**(6): 3665-3675.
- Bokori-Brown, M. and I. J. Holt (2006). "Expression of algal nuclear ATP synthase subunit 6 in human cells results in protein targeting to mitochondria but no assembly into ATP synthase." Rejuvenation Res **9**(4): 455-469.
- Bolden, A., M. Fry, R. Muller, R. Citarella and A. Weissbach (1972). "The presence of a polyribadenylic acid-dependent DNA polymerase in eukaryotic cells." Arch Biochem Biophys **153**(1): 26-33.
- Bolden, A., G. P. Noy and A. Weissbach (1977). "DNA polymerase of mitochondria is a gamma-polymerase." J Biol Chem **252**(10): 3351-3356.
- Boldogh, I. R. and L. A. Pon (2007). "Mitochondria on the move." Trends Cell Biol **17**(10): 502-510.
- Bonnefoy, N. and T. D. Fox (2007). "Directed alteration of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial DNA by biolistic transformation and homologous recombination." Methods Mol Biol **372**: 153-166.
- Bonnefoy, N., C. Remacle and T. D. Fox (2007). "Genetic transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Chlamydomonas reinhardtii* mitochondria." Methods Cell Biol **80**: 525-548.
- Bonnet, C., S. Augustin, S. Ellouze, P. Benit, A. Bouaita, P. Rustin, J. A. Sahel and M. Corral-Debrinski (2008). "The optimized allotopic expression of ND1 or ND4 genes restores respiratory chain complex I activity in fibroblasts harboring mutations in these genes." Biochim Biophys Acta **1783**(10): 1707-1717.
- Boumans, H., L. A. Grivell and J. A. Berden (1998). "The respiratory chain in yeast behaves as a single functional unit." J Biol Chem **273**(9): 4872-4877.
- Bourgeron, T., P. Rustin, D. Chretien, M. Birch-Machin, M. Bourgeois, E. Viegas-Pequignot, A. Munnich and A. Rotig (1995). "Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency." Nat Genet **11**(2): 144-149.
- Bowmaker, M., M. Y. Yang, T. Yasukawa, A. Reyes, H. T. Jacobs, J. A. Huberman and I. J. Holt (2003). "Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone." J Biol Chem **278**(51): 50961-50969.
- Boyden, E. S., F. Zhang, E. Bamberg, G. Nagel and K. Deisseroth (2005). "Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity." Nat Neurosci **8**(9): 1263-1268.
- Boyer, P. D. (1993). "The binding change mechanism for ATP synthase--some probabilities and possibilities." Biochim Biophys Acta **1140**(3): 215-250.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.

- Braidotti, G., I. A. Borthwick and B. K. May (1993). "Identification of regulatory sequences in the gene for 5-aminolevulinate synthase from rat." J Biol Chem **268**(2): 1109-1117.
- Brea-Calvo, G., A. Rodriguez-Hernandez, D. J. Fernandez-Ayala, P. Navas and J. A. Sanchez-Alcazar (2006). "Chemotherapy induces an increase in coenzyme Q10 levels in cancer cell lines." Free Radic Biol Med **40**(8): 1293-1302.
- Brown, W. M., M. George, Jr. and A. C. Wilson (1979). "Rapid evolution of animal mitochondrial DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(4): 1967-1971.
- Bruno, C., A. Martinuzzi, Y. Tang, A. L. Andreu, F. Pallotti, E. Bonilla, S. Shanske, J. Fu, C. M. Sue, C. Angelini, S. DiMauro and G. Manfredi (1999). "A stop-codon mutation in the human mtDNA cytochrome c oxidase I gene disrupts the functional structure of complex IV." Am J Hum Genet **65**(3): 611-620.
- Bruno, C., F. M. Santorelli, S. Assereto, E. Tonoli, A. Tessa, M. Traverso, S. Scapolan, M. Bado, S. Tedeschi and C. Minetti (2003). "Progressive exercise intolerance associated with a new muscle-restricted nonsense mutation (G142X) in the mitochondrial cytochrome b gene." Muscle Nerve **28**(4): 508-511.
- Bueler, H. (2009). "Impaired mitochondrial dynamics and function in the pathogenesis of Parkinson's disease." Exp Neurol **218**(2): 235-246.
- Bugiani, M., V. Tiranti, L. Farina, G. Uziel and M. Zeviani (2005). "Novel mutations in COX15 in a long surviving Leigh syndrome patient with cytochrome c oxidase deficiency." J Med Genet **42**(5): e28.
- Bultema, J. B., H. P. Braun, E. J. Boekema and R. Kouril (2009). "Megacomplex organization of the oxidative phosphorylation system by structural analysis of respiratory supercomplexes from potato." Biochim Biophys Acta **1787**(1): 60-67.
- Cabezón, E., M. G. Montgomery, A. G. Leslie and J. E. Walker (2003). "The structure of bovine F1-ATPase in complex with its regulatory protein IF1." Nat Struct Biol **10**(9): 744-750.
- Campos, Y., A. Garcia-Redondo, M. A. Fernandez-Moreno, M. Martinez-Pardo, G. Goda, J. C. Rubio, M. A. Martin, P. del Hoyo, A. Cabello, B. Bornstein, R. Garesse and J. Arenas (2001). "Early-onset multisystem mitochondrial disorder caused by a nonsense mutation in the mitochondrial DNA cytochrome C oxidase II gene." Ann Neurol **50**(3): 409-413.
- Carrodegua, J. A., R. Kobayashi, S. E. Lim, W. C. Copeland and D. F. Bogenhagen (1999). "The accessory subunit of *Xenopus laevis* mitochondrial DNA polymerase gamma increases processivity of the catalytic subunit of human DNA polymerase gamma and is related to class II aminoacyl-tRNA synthetases." Mol Cell Biol **19**(6): 4039-4046.
- Carroll, J., I. M. Fearnley, R. J. Shannon, J. Hirst and J. E. Walker (2003). "Analysis of the subunit composition of complex I from bovine heart mitochondria." Mol Cell Proteomics **2**(2): 117-126.
- Cartailler, J. P. and H. Luecke (2003). "X-ray crystallographic analysis of lipid-protein interactions in the bacteriorhodopsin purple membrane." Annu Rev Biophys Biomol Struct **32**: 285-310.

- Cartoni, R. and J. C. Martinou (2009). "Role of mitofusin 2 mutations in the physiopathology of Charcot-Marie-Tooth disease type 2A." *Exp Neurol* **218**(2): 268-273.
- Casas, F., P. Rochard, A. Rodier, I. Cassar-Malek, S. Marchal-Victorion, R. J. Wiesner, G. Cabello and C. Wrutniak (1999). "A variant form of the nuclear triiodothyronine receptor c-ErbA α 1 plays a direct role in regulation of mitochondrial RNA synthesis." *Mol Cell Biol* **19**(12): 7913-7924.
- Castri, L., M. Melendez-Obando, R. Villegas-Palma, R. Barrantes, H. Raventos, R. Pereira, D. Luiselli, D. Pettener and L. Madrigal (2009). "Mitochondrial polymorphisms are associated both with increased and decreased longevity." *Hum Hered* **67**(3): 147-153.
- Catelli, M. L., V. Alvarez-Iglesias, A. Gomez-Carballea, A. Mosquera-Miguel, C. Romanini, A. Borosky, J. Amigo, A. Carracedo, C. Vullo and A. Salas (2011). "The impact of modern migrations on present-day multi-ethnic Argentina as recorded on the mitochondrial DNA genome." *BMC Genet* **12**: 77.
- Catucci, L., V. M. Lattanzio, S. Lobasso, A. Agostiano and A. Corcelli (2004). "Role of endogenous lipids in the chromophore regeneration of bacteriorhodopsin." *Bioelectrochemistry* **63**(1-2): 111-115.
- Cavalier-Smith, T. (1987). "Eukaryotes with no mitochondria." *Nature* **326**(6111): 332-333.
- Cavalier-Smith, T. (2006). "Origin of mitochondria by intracellular enslavement of a photosynthetic purple bacterium." *Proc Biol Sci* **273**(1596): 1943-1952.
- Cecchini, G. (2003). "Function and structure of complex II of the respiratory chain." *Annu Rev Biochem* **72**: 77-109.
- Cizkova, A., V. Stranecky, J. A. Mayr, M. Tesarova, V. Havlickova, J. Paul, R. Ivanek, A. W. Kuss, H. Hansikova, V. Kaplanova, M. Vrbacky, H. Hartmannova, L. Noskova, T. Honzik, Z. Drahota, M. Magner, K. Hejzlarova, W. Sperl, J. Zeman, J. Houstek and S. Kmoch (2008). "TMEM70 mutations cause isolated ATP synthase deficiency and neonatal mitochondrial encephalocardiomyopathy." *Nat Genet* **40**(11): 1288-1290.
- Clayton, D. A. (1982). "Replication of animal mitochondrial DNA." *Cell* **28**(4): 693-705.
- Clayton, D. A. (1991). "Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA." *Annu Rev Cell Biol* **7**: 453-478.
- Coenen, M. J., L. P. van den Heuvel, C. Ugalde, M. Ten Brinke, L. G. Nijtmans, F. J. Trijbels, S. Beblo, E. M. Maier, A. C. Muntau and J. A. Smeitink (2004). "Cytochrome c oxidase biogenesis in a patient with a mutation in COX10 gene." *Ann Neurol* **56**(4): 560-564.
- Collinson, I. R., M. J. Runswick, S. K. Buchanan, I. M. Fearnley, J. M. Skehel, M. J. van Raaij, D. E. Griffiths and J. E. Walker (1994). "Fo membrane domain of ATP synthase from bovine heart mitochondria: purification, subunit composition, and reconstitution with F1-ATPase." *Biochemistry* **33**(25): 7971-7978.
- Cortes-Hernandez, P., M. E. Vazquez-Memije and J. J. Garcia (2007). "ATP6 homoplasmic mutations inhibit and destabilize the human F1F0-ATP synthase

- without preventing enzyme assembly and oligomerization." *J Biol Chem* **282**(2): 1051-1058.
- Cotney, J., S. E. McKay and G. S. Shadel (2009). "Elucidation of separate, but collaborative functions of the rRNA methyltransferase-related human mitochondrial transcription factors B1 and B2 in mitochondrial biogenesis reveals new insight into maternally inherited deafness." *Hum Mol Genet* **18**(14): 2670-2682.
- Couoh-Cardel, S. J., S. Uribe-Carvajal, S. Wilkens and J. J. Garcia-Trejo (2010). "Structure of dimeric F1F0-ATP synthase." *J Biol Chem* **285**(47): 36447-36455.
- Craven, L., H. A. Tuppen, G. D. Greggains, S. J. Harbottle, J. L. Murphy, L. M. Cree, A. P. Murdoch, P. F. Chinnery, R. W. Taylor, R. N. Lightowlers, M. Herbert and D. M. Turnbull (2010). "Pronuclear transfer in human embryos to prevent transmission of mitochondrial DNA disease." *Nature* **465**(7294): 82-85.
- Crimi, M., S. Galbiati, I. Moroni, A. Bordoni, M. P. Perini, E. Lamantea, M. Sciacco, M. Zeviani, I. Biunno, M. Moggio, G. Scarlato and G. P. Comi (2003). "A missense mutation in the mitochondrial ND5 gene associated with a Leigh-MELAS overlap syndrome." *Neurology* **60**(11): 1857-1861.
- Cruciat, C. M., K. Hell, H. Folsch, W. Neupert and R. A. Stuart (1999). "Bcs1p, an AAA-family member, is a chaperone for the assembly of the cytochrome bc(1) complex." *EMBO J* **18**(19): 5226-5233.
- Curran, S. P., D. Leuenberger, W. Oppliger and C. M. Koehler (2002). "The Tim9p-Tim10p complex binds to the transmembrane domains of the ADP/ATP carrier." *EMBO J* **21**(5): 942-953.
- Chacinska, A., C. M. Koehler, D. Milenkovic, T. Lithgow and N. Pfanner (2009). "Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms." *Cell* **138**(4): 628-644.
- Chacinska, A., M. Lind, A. E. Frazier, J. Dudek, C. Meisinger, A. Geissler, A. Sickmann, H. E. Meyer, K. N. Truscott, B. Guiard, N. Pfanner and P. Rehling (2005). "Mitochondrial presequence translocase: switching between TOM tethering and motor recruitment involves Tim21 and Tim17." *Cell* **120**(6): 817-829.
- Chan, N. C. and T. Lithgow (2008). "The peripheral membrane subunits of the SAM complex function codependently in mitochondrial outer membrane biogenesis." *Mol Biol Cell* **19**(1): 126-136.
- Chance, B. and G. R. Williams (1955). "A method for the localization of sites for oxidative phosphorylation." *Nature* **176**(4475): 250-254.
- Chen, H. and D. C. Chan (2009). "Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases." *Hum Mol Genet* **18**(R2): R169-176.
- Chen, J. Q., M. Delannoy, C. Cooke and J. D. Yager (2004). "Mitochondrial localization of ERalpha and ERbeta in human MCF7 cells." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **286**(6): E1011-1022.
- Chow, B. Y., X. Han, A. S. Dobry, X. Qian, A. S. Chuong, M. Li, M. A. Henninger, G. M. Belfort, Y. Lin, P. E. Monahan and E. S. Boyden (2010). "High-performance

- genetically targetable optical neural silencing by light-driven proton pumps." *Nature* **463**(7277): 98-102.
- Christian, B. E. and L. L. Spremulli (2009). "Evidence for an active role of IF3mt in the initiation of translation in mammalian mitochondria." *Biochemistry* **48**(15): 3269-3278.
- Chu, L. K., C. W. Yen and M. A. El-Sayed (2010). "Bacteriorhodopsin-based photo-electrochemical cell." *Biosens Bioelectron* **26**(2): 620-626.
- Chung, H. K. and L. L. Spremulli (1990). "Purification and characterization of elongation factor G from bovine liver mitochondria." *J Biol Chem* **265**(34): 21000-21004.
- D'Aurelio, M., C. D. Gajewski, G. Lenaz and G. Manfredi (2006). "Respiratory chain supercomplexes set the threshold for respiration defects in human mtDNA mutant cybrids." *Hum Mol Genet* **15**(13): 2157-2169.
- Danon, A. and W. Stoeckenius (1974). "Photophosphorylation in *Halobacterium halobium*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**(4): 1234-1238.
- Davies, K. M., M. Strauss, B. Daum, J. H. Kief, H. D. Osiewacz, A. Rycovska, V. Zickermann and W. Kuhlbrandt (2011). "Macromolecular organization of ATP synthase and complex I in whole mitochondria." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(34): 14121-14126.
- Davis, A. J., N. N. Alder, R. E. Jensen and A. E. Johnson (2007). "The Tim9p/10p and Tim8p/13p complexes bind to specific sites on Tim23p during mitochondrial protein import." *Mol Biol Cell* **18**(2): 475-486.
- De Coo, I. F., W. O. Renier, W. Ruitenbeek, H. J. Ter Laak, M. Bakker, H. Schagger, B. A. Van Oost and H. J. Smeets (1999). "A 4-base pair deletion in the mitochondrial cytochrome b gene associated with parkinsonism/MELAS overlap syndrome." *Ann Neurol* **45**(1): 130-133.
- de la Torre, J. R., L. M. Christianson, O. Beja, M. T. Suzuki, D. M. Karl, J. Heidelberg and E. F. DeLong (2003). "Proteorhodopsin genes are distributed among divergent marine bacterial taxa." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(22): 12830-12835.
- de Lonlay, P., I. Valnot, A. Barrientos, M. Gorbatyuk, A. Tzagoloff, J. W. Taanman, E. Benayoun, D. Chretien, N. Kadhom, A. Lombes, H. O. de Baulny, P. Niaudet, A. Munnich, P. Rustin and A. Rotig (2001). "A mutant mitochondrial respiratory chain assembly protein causes complex III deficiency in patients with tubulopathy, encephalopathy and liver failure." *Nat Genet* **29**(1): 57-60.
- De Meirleir, L., S. Seneca, E. Damis, B. Sepulchre, A. Hoorens, E. Gerlo, M. T. Garcia Silva, E. M. Hernandez, W. Lissens and R. Van Coster (2003). "Clinical and diagnostic characteristics of complex III deficiency due to mutations in the BCS1L gene." *Am J Med Genet A* **121A**(2): 126-131.
- De Meirleir, L., S. Seneca, W. Lissens, I. De Clercq, F. Eyskens, E. Gerlo, J. Smet and R. Van Coster (2004). "Respiratory chain complex V deficiency due to a mutation in the assembly gene ATP12." *J Med Genet* **41**(2): 120-124.
- Deisseroth, K. (2011). "Optogenetics." *Nat Methods* **8**(1): 26-29.
- Diaz, F., H. Fukui, S. Garcia and C. T. Moraes (2006). "Cytochrome c oxidase is required for the assembly/stability of respiratory complex I in mouse fibroblasts." *Mol Cell Biol* **26**(13): 4872-4881.

- Diaz, F., H. Kotarsky, V. Fellman and C. T. Moraes (2011). "Mitochondrial disorders caused by mutations in respiratory chain assembly factors." Semin Fetal Neonatal Med **16**(4): 197-204.
- Disotell, T. R. (1999). "Human evolution: the southern route to Asia." Curr Biol **9**(24): R925-928.
- Dudkina, N. V., H. Eubel, W. Keegstra, E. J. Boekema and H. P. Braun (2005). "Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(9): 3225-3229.
- Dudkina, N. V., J. Heinemeyer, S. Sunderhaus, E. J. Boekema and H. P. Braun (2006). "Respiratory chain supercomplexes in the plant mitochondrial membrane." Trends Plant Sci **11**(5): 232-240.
- Dudkina, N. V., R. Kouril, K. Peters, H. P. Braun and E. J. Boekema (2010). "Structure and function of mitochondrial supercomplexes." Biochim Biophys Acta **1797**(6-7): 664-670.
- Dudkina, N. V., M. Kudryashev, H. Stahlberg and E. J. Boekema (2011). "Interaction of complexes I, III, and IV within the bovine respirasome by single particle cryoelectron tomography." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(37): 15196-15200.
- Dunn, R. J., N. R. Hackett, J. M. McCoy, B. H. Chao, K. Kimura and H. G. Khorana (1987). "Structure-function studies on bacteriorhodopsin. I. Expression of the bacterio-opsin gene in Escherichia coli." J Biol Chem **262**(19): 9246-9254.
- Duvezin-Caubet, S., M. Koppen, J. Wagener, M. Zick, L. Israel, A. Bernacchia, R. Jagasia, E. I. Rugarli, A. Imhof, W. Neupert, T. Langer and A. S. Reichert (2007). "OPA1 processing reconstituted in yeast depends on the subunit composition of the m-AAA protease in mitochondria." Mol Biol Cell **18**(9): 3582-3590.
- Echtay, K. S., E. Winkler and M. Klingenberg (2000). "Coenzyme Q is an obligatory cofactor for uncoupling protein function." Nature **408**(6812): 609-613.
- Egholm, M., O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden and P. E. Nielsen (1993). "PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules." Nature **365**(6446): 566-568.
- Ehse, S., I. Raschke, G. Mancuso, A. Bernacchia, S. Geimer, D. Tondera, J. C. Martinou, B. Westermann, E. I. Rugarli and T. Langer (2009). "Regulation of OPA1 processing and mitochondrial fusion by m-AAA protease isoenzymes and OMA1." J Cell Biol **187**(7): 1023-1036.
- Endo, T., H. Yamamoto and M. Esaki (2003). "Functional cooperation and separation of translocators in protein import into mitochondria, the double-membrane bounded organelles." J Cell Sci **116**(Pt 16): 3259-3267.
- Enriquez, J. A., P. Fernandez-Silva, N. Garrido-Perez, M. J. Lopez-Perez, A. Perez-Martos and J. Montoya (1999). "Direct regulation of mitochondrial RNA synthesis by thyroid hormone." Mol Cell Biol **19**(1): 657-670.
- Enriquez, J. A., P. Fernandez-Silva and J. Montoya (1999). "Autonomous regulation in mammalian mitochondrial DNA transcription." Biol Chem **380**(7-8): 737-747.

- Entelis, N. S., O. A. Kolesnikova, S. Dogan, R. P. Martin and I. A. Tarassov (2001). "5 S rRNA and tRNA import into human mitochondria. Comparison of in vitro requirements." *J Biol Chem* **276**(49): 45642-45653.
- Ernster, L. and G. Dallner (1995). "Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function." *Biochim Biophys Acta* **1271**(1): 195-204.
- Estornell, E., R. Fato, C. Castelluccio, M. Cavazzoni, G. Parenti Castelli and G. Lenaz (1992). "Saturation kinetics of coenzyme Q in NADH and succinate oxidation in beef heart mitochondria." *FEBS Lett* **311**(2): 107-109.
- Eubel, H., J. Heinemeyer and H. P. Braun (2004). "Identification and characterization of respirasomes in potato mitochondria." *Plant Physiol* **134**(4): 1450-1459.
- Eubel, H., J. Heinemeyer, S. Sunderhaus and H. P. Braun (2004). "Respiratory chain supercomplexes in plant mitochondria." *Plant Physiol Biochem* **42**(12): 937-942.
- Eubel, H., L. Jansch and H. P. Braun (2003). "New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II." *Plant Physiol* **133**(1): 274-286.
- Ewart, G., R. Lightowers, Y. Z. Zhang, V. J. Balan, N. Kennaway and R. A. Capaldi (1990). "Tissue specificity and defects in human cytochrome c oxidase." *Biochim Biophys Acta* **1018**(2-3): 223-224.
- Falkenberg, M., M. Gaspari, A. Rantanen, A. Trifunovic, N. G. Larsson and C. M. Gustafsson (2002). "Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA." *Nat Genet* **31**(3): 289-294.
- Fato, R., M. Battino, M. Degli Esposti, G. Parenti Castelli and G. Lenaz (1986). "Determination of partition and lateral diffusion coefficients of ubiquinones by fluorescence quenching of n-(9-anthroyloxy)stearic acids in phospholipid vesicles and mitochondrial membranes." *Biochemistry* **25**(11): 3378-3390.
- Feagin, J. E. (2000). "Mitochondrial genome diversity in parasites." *Int J Parasitol* **30**(4): 371-390.
- Fernandez-Ayala, D. J., A. Sanz, S. Vartiainen, K. K. Kemppainen, M. Babusiak, E. Mustalahti, R. Costa, T. Tuomela, M. Zeviani, J. Chung, K. M. O'Dell, P. Rustin and H. T. Jacobs (2009). "Expression of the *Ciona intestinalis* alternative oxidase (AOX) in *Drosophila* complements defects in mitochondrial oxidative phosphorylation." *Cell Metab* **9**(5): 449-460.
- Fernandez-Silva, P., J. A. Enriquez and J. Montoya (2003). "Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA." *Exp Physiol* **88**(1): 41-56.
- Fernandez-Vizarra, E., M. Bugiani, P. Goffrini, F. Carrara, L. Farina, E. Procopio, A. Donati, G. Uziel, I. Ferrero and M. Zeviani (2007). "Impaired complex III assembly associated with BCS1L gene mutations in isolated mitochondrial encephalopathy." *Hum Mol Genet* **16**(10): 1241-1252.
- Fernandez-Vizarra, E., J. A. Enriquez, A. Perez-Martos, J. Montoya and P. Fernandez-Silva (2008). "Mitochondrial gene expression is regulated at multiple levels and differentially in the heart and liver by thyroid hormones." *Curr Genet* **54**(1): 13-22.

- Fernandez-Vizarra, E., Fernandez-Silva, P. (2006). "Isolation of Mitochondria from Mammalian Tissues and Cultured Cells." Cell Biology: A Laboratory Handbook. J. E. Celis, Elsevier-Academic Press **3rd**: : 69-77.
- Fernandez-Vizarra, E., M. J. Lopez-Perez and J. A. Enriquez (2002). "Isolation of biogenetically competent mitochondria from mammalian tissues and cultured cells." Methods **26**(4): 292-297.
- Fernandez-Vizarra, E., V. Tiranti and M. Zeviani (2009). "Assembly of the oxidative phosphorylation system in humans: what we have learned by studying its defects." Biochim Biophys Acta **1793**(1): 200-211.
- Fiumera, H. L., M. J. Dunham, S. A. Saracco, C. A. Butler, J. A. Kelly and T. D. Fox (2009). "Translocation and assembly of mitochondrially coded *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome c oxidase subunit Cox2 by Oxal and Yme1 in the absence of Cox18." Genetics **182**(2): 519-528.
- Fowler, L. R. and S. H. Richardson (1963). "Studies on the electron transfer system. L. On the mechanism of reconstitution of the mitochondrial electron transfer system." J Biol Chem **238**: 456-463.
- Frey, T. G. and M. G. Sun (2008). "Correlated light and electron microscopy illuminates the role of mitochondrial inner membrane remodeling during apoptosis." Biochim Biophys Acta **1777**(7-8): 847-852.
- Fridlender, B., M. Fry, A. Bolden and A. Weissbach (1972). "A new synthetic RNA-dependent DNA polymerase from human tissue culture cells (HeLa-fibroblast-synthetic oligonucleotides-template-purified enzymes)." Proc Natl Acad Sci U S A **69**(2): 452-455.
- Friedrich, T. and B. Bottcher (2004). "The gross structure of the respiratory complex I: a Lego System." Biochim Biophys Acta **1608**(1): 1-9.
- Friedrich, T., S. Geibel, R. Kalmbach, I. Chizhov, K. Ataka, J. Heberle, M. Engelhard and E. Bamberg (2002). "Proteorhodopsin is a light-driven proton pump with variable vectoriality." J Mol Biol **321**(5): 821-838.
- Futai, M., T. Noumi and M. Maeda (1989). "ATP synthase (H⁺-ATPase): results by combined biochemical and molecular biological approaches." Annu Rev Biochem **58**: 111-136.
- Gallardo, M. E., R. Moreno-Loshuertos, C. Lopez, M. Casqueiro, J. Silva, F. Bonilla, S. Rodriguez de Cordoba and J. A. Enriquez (2006). "m.6267G>A: a recurrent mutation in the human mitochondrial DNA that reduces cytochrome c oxidase activity and is associated with tumors." Hum Mutat **27**(6): 575-582.
- Garfinkel, D. (1957). "Preparation and properties of a microsomal DPNH-cytochrome c reductase." Arch Biochem Biophys **71**(1): 100-110.
- Gaur, R., D. Grasso, P. P. Datta, P. D. Krishna, G. Das, A. Spencer, R. K. Agrawal, L. Spremulli and U. Varshney (2008). "A single mammalian mitochondrial translation initiation factor functionally replaces two bacterial factors." Mol Cell **29**(2): 180-190.
- Genova, M. L., A. Baracca, A. Biondi, G. Casalena, M. Faccioli, A. I. Falasca, G. Formiggini, G. Sgarbi, G. Solaini and G. Lenaz (2008). "Is supercomplex

- organization of the respiratory chain required for optimal electron transfer activity?" *Biochim Biophys Acta* **1777**(7-8): 740-746.
- Genova, M. L., C. Bianchi and G. Lenaz (2005). "Supercomplex organization of the mitochondrial respiratory chain and the role of the Coenzyme Q pool: pathophysiological implications." *Biofactors* **25**(1-4): 5-20.
- Genova, M. L. and G. Lenaz (2011). "New developments on the functions of coenzyme Q in mitochondria." *Biofactors* **37**(5): 330-354.
- Gentle, I., K. Gabriel, P. Beech, R. Waller and T. Lithgow (2004). "The Omp85 family of proteins is essential for outer membrane biogenesis in mitochondria and bacteria." *J Cell Biol* **164**(1): 19-24.
- Ghezzi, D., P. Arzuffi, M. Zordan, C. Da Re, C. Lamperti, C. Benna, P. D'Adamo, D. Diodato, R. Costa, C. Mariotti, G. Uziel, C. Smiderle and M. Zeviani (2011). "Mutations in TTC19 cause mitochondrial complex III deficiency and neurological impairment in humans and flies." *Nat Genet* **43**(3): 259-263.
- Ghezzi, D., P. Goffrini, G. Uziel, R. Horvath, T. Klopstock, H. Lochmuller, P. D'Adamo, P. Gasparini, T. M. Strom, H. Prokisch, F. Invernizzi, I. Ferrero and M. Zeviani (2009). "SDHAF1, encoding a LYR complex-II specific assembly factor, is mutated in SDH-defective infantile leukoencephalopathy." *Nat Genet* **41**(6): 654-656.
- Giles, R. E., H. Blanc, H. M. Cann and D. C. Wallace (1980). "Maternal inheritance of human mitochondrial DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(11): 6715-6719.
- Gilkerson, R. W., J. M. Selker and R. A. Capaldi (2003). "The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation." *FEBS Lett* **546**(2-3): 355-358.
- Gilles-Gonzalez, M. A., D. M. Engelman and H. G. Khorana (1991). "Structure-function studies of bacteriorhodopsin XV. Effects of deletions in loops B-C and E-F on bacteriorhodopsin chromophore and structure." *J Biol Chem* **266**(13): 8545-8550.
- Giorgi, C., D. De Stefani, A. Bononi, R. Rizzuto and P. Pinton (2009). "Structural and functional link between the mitochondrial network and the endoplasmic reticulum." *Int J Biochem Cell Biol* **41**(10): 1817-1827.
- Giovannoni, S. J., L. Bibbs, J. C. Cho, M. D. Stapels, R. Desiderio, K. L. Vergin, M. S. Rappe, S. Laney, L. J. Wilhelm, H. J. Tripp, E. J. Mathur and D. F. Barofsky (2005). "Proteorhodopsin in the ubiquitous marine bacterium SAR11." *Nature* **438**(7064): 82-85.
- Gleyzer, N., K. Vercauteren and R. C. Scarpulla (2005). "Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators." *Mol Cell Biol* **25**(4): 1354-1366.
- Glick, B. S., A. Brandt, K. Cunningham, S. Muller, R. L. Hallberg and G. Schatz (1992). "Cytochromes c1 and b2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism." *Cell* **69**(5): 809-822.
- Goldschmidt, C. R., M. Ottolenghi and R. Korenstein (1976). "On the primary quantum yields in the bacteriorhodopsin photocycle." *Biophys J* **16**(7): 839-843.

- Gomez, L. A., J. S. Monette, J. D. Chavez, C. S. Maier and T. M. Hagen (2009). "Supercomplexes of the mitochondrial electron transport chain decline in the aging rat heart." *Arch Biochem Biophys* **490**(1): 30-35.
- Gourdon, P., A. Alfredsson, A. Pedersen, E. Malmerberg, M. Nyblom, M. Widell, R. Berntsson, J. Pinhassi, M. Braiman, O. Hansson, N. Bonander, G. Karlsson and R. Neutze (2008). "Optimized in vitro and in vivo expression of proteorhodopsin: a seven-transmembrane proton pump." *Protein Expr Purif* **58**(1): 103-113.
- Gradinaru, V., K. R. Thompson and K. Deisseroth (2008). "eNpHR: a *Natronomonas* halorhodopsin enhanced for optogenetic applications." *Brain Cell Biol* **36**(1-4): 129-139.
- Gradinaru, V., F. Zhang, C. Ramakrishnan, J. Mattis, R. Prakash, I. Diester, I. Goshen, K. R. Thompson and K. Deisseroth (2010). "Molecular and cellular approaches for diversifying and extending optogenetics." *Cell* **141**(1): 154-165.
- Gray, H. and T. W. Wong (1992). "Purification and identification of subunit structure of the human mitochondrial DNA polymerase." *J Biol Chem* **267**(9): 5835-5841.
- Gray, M. W., G. Burger and B. F. Lang (1999). "Mitochondrial evolution." *Science* **283**(5407): 1476-1481.
- Grigorieff, N. (1998). "Three-dimensional structure of bovine NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) at 2.2 Å in ice." *J Mol Biol* **277**(5): 1033-1046.
- Grossman, L. I. and M. I. Lomax (1997). "Nuclear genes for cytochrome c oxidase." *Biochim Biophys Acta* **1352**(2): 174-192.
- Guy, J., X. Qi, F. Pallotti, E. A. Schon, G. Manfredi, V. Carelli, A. Martinuzzi, W. W. Hauswirth and A. S. Lewin (2002). "Rescue of a mitochondrial deficiency causing Leber Hereditary Optic Neuropathy." *Ann Neurol* **52**(5): 534-542.
- Haack, T. B., K. Danhauser, B. Haberberger, J. Hoser, V. Strecker, D. Boehm, G. Uziel, E. Lamantea, F. Invernizzi, J. Poulton, B. Rolinski, A. Iuso, S. Biskup, T. Schmidt, H. W. Mewes, I. Wittig, T. Meitinger, M. Zeviani and H. Prokisch (2010). "Exome sequencing identifies ACAD9 mutations as a cause of complex I deficiency." *Nat Genet* **42**(12): 1131-1134.
- Hackenbrock, C. R. (1966). "Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria." *J Cell Biol* **30**(2): 269-297.
- Hackenbrock, C. R. (1968). "Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. II. Electron transport-linked ultrastructural transformations in mitochondria." *J Cell Biol* **37**(2): 345-369.
- Hackenbrock, C. R., B. Chazotte and S. S. Gupte (1986). "The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport." *J Bioenerg Biomembr* **18**(5): 331-368.
- Hagerhall, C. (1997). "Succinate: quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme." *Biochim Biophys Acta* **1320**(2): 107-141.
- Hakkaart, G. A., E. P. Dassa, H. T. Jacobs and P. Rustin (2006). "Allotopic expression of a mitochondrial alternative oxidase confers cyanide resistance to human cell respiration." *EMBO Rep* **7**(3): 341-345.

- Hamanaka, R. B. and N. S. Chandel (2010). "Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes." Trends Biochem Sci **35**(9): 505-513.
- Hammarsund, M., W. Wilson, M. Corcoran, M. Merup, S. Einhorn, D. Grander and O. Sangfelt (2001). "Identification and characterization of two novel human mitochondrial elongation factor genes, hEFG2 and hEFG1, phylogenetically conserved through evolution." Hum Genet **109**(5): 542-550.
- Hao, H. X., O. Khalimonchuk, M. Schraders, N. Dephoure, J. P. Bayley, H. Kunst, P. Devilee, C. W. Cremers, J. D. Schiffman, B. G. Bentz, S. P. Gygi, D. R. Winge, H. Kremer and J. Rutter (2009). "SDH5, a gene required for flavination of succinate dehydrogenase, is mutated in paraganglioma." Science **325**(5944): 1139-1142.
- Haupts, U., J. Tittor and D. Oesterhelt (1999). "Closing in on bacteriorhodopsin: progress in understanding the molecule." Annu Rev Biophys Biomol Struct **28**: 367-399.
- Haut, S., M. Brivet, G. Touati, P. Rustin, S. Lebon, A. Garcia-Cazorla, J. M. Saudubray, A. Boutron, A. Legrand and A. Slama (2003). "A deletion in the human QP-C gene causes a complex III deficiency resulting in hypoglycaemia and lactic acidosis." Hum Genet **113**(2): 118-122.
- Hayashi, T., R. Rizzuto, G. Hajnoczky and T. P. Su (2009). "MAM: more than just a housekeeper." Trends Cell Biol **19**(2): 81-88.
- Hayashi, H., H. Nakagami, M. Takeichi, M. Shimamura, N. Koibuchi, E. Oiki, N. Sato, H. Koriyama, M. Mori, R. Gerardo Araujo, A. Maeda, R. Morishita, K. Tamai and Y. Kaneda (2012). "HIG1, a novel regulator of mitochondrial gamma-secretase, maintains normal mitochondrial function." FASEB J.
- Heinemeyer, J., H. P. Braun, E. J. Boekema and R. Kouril (2007). "A structural model of the cytochrome C reductase/oxidase supercomplex from yeast mitochondria." J Biol Chem **282**(16): 12240-12248.
- Heinemeyer, J., H. Eubel, D. Wehmhoner, L. Jansch and H. P. Braun (2004). "Proteomic approach to characterize the supramolecular organization of photosystems in higher plants." Phytochemistry **65**(12): 1683-1692.
- Hendrickson, S. L., H. B. Hutcheson, E. Ruiz-Pesini, J. C. Poole, J. Lautenberger, E. Sezgin, L. Kingsley, J. J. Goedert, D. Vlahov, S. Donfield, D. C. Wallace and S. J. O'Brien (2008). "Mitochondrial DNA haplogroups influence AIDS progression." AIDS **22**(18): 2429-2439.
- Heron, C., C. I. Ragan and B. L. Trumpower (1978). "The interaction between mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase and ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase. Restoration of ubiquinone-pool behaviour." Biochem J **174**(3): 791-800.
- Hildebrandt, V., K. Fendler, J. Heberle, A. Hoffmann, E. Bamberg and G. Buldt (1993). "Bacteriorhodopsin expressed in *Schizosaccharomyces pombe* pumps protons through the plasma membrane." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(8): 3578-3582.
- Hildebrandt, V., M. Ramezani-Rad, U. Swida, P. Wrede, S. Grzesiek, M. Primke and G. Buldt (1989). "Genetic transfer of the pigment bacteriorhodopsin into the eukaryote *Schizosaccharomyces pombe*." FEBS Lett **243**(2): 137-140.

- Hinson, J. T., V. R. Fantin, J. Schonberger, N. Breivik, G. Siem, B. McDonough, P. Sharma, I. Keogh, R. Godinho, F. Santos, A. Esparza, Y. Nicolau, E. Selvaag, B. H. Cohen, C. L. Hoppel, L. Tranebjaerg, R. D. Eavey, J. G. Seidman and C. E. Seidman (2007). "Missense mutations in the BCS1L gene as a cause of the Bjornstad syndrome." N Engl J Med **356**(8): 809-819.
- Hirano, M., Y. Nishigaki and R. Marti (2004). "Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): a disease of two genomes." Neurologist **10**(1): 8-17.
- Hirst, J., J. Carroll, I. M. Fearnley, R. J. Shannon and J. E. Walker (2003). "The nuclear encoded subunits of complex I from bovine heart mitochondria." Biochim Biophys Acta **1604**(3): 135-150.
- Hoefnagel, M. H. and J. T. Wiskich (1998). "Activation of the plant alternative oxidase by high reduction levels of the Q-pool and pyruvate." Arch Biochem Biophys **355**(2): 262-270.
- Hoffmann, A., V. Hildebrandt, J. Heberle and G. Buldt (1994). "Photoactive mitochondria: in vivo transfer of a light-driven proton pump into the inner mitochondrial membrane of *Schizosaccharomyces pombe*." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(20): 9367-9371.
- Hofhaus, G., D. R. Johns, O. Hurko, G. Attardi and A. Chomyn (1996). "Respiration and growth defects in transmitochondrial cell lines carrying the 11778 mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy." J Biol Chem **271**(22): 13155-13161.
- Hofhaus, G., R. M. Shakeley and G. Attardi (1996). "Use of polarography to detect respiration defects in cell cultures." Methods Enzymol **264**: 476-483.
- Holt, I. J., A. E. Harding and J. A. Morgan-Hughes (1988). "Mitochondrial DNA polymorphism in mitochondrial myopathy." Hum Genet **79**(1): 53-57.
- Holt, I. J., H. E. Lorimer and H. T. Jacobs (2000). "Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA." Cell **100**(5): 515-524.
- Hoppins, S. C. and F. E. Nargang (2004). "The Tim8-Tim13 complex of *Neurospora crassa* functions in the assembly of proteins into both mitochondrial membranes." J Biol Chem **279**(13): 12396-12405.
- Horai, S. (1995). "Evolution and the origins of man: clues from complete sequences of hominoid mitochondrial DNA." Southeast Asian J Trop Med Public Health **26 Suppl 1**: 146-154.
- Houstek, J., A. Pickova, A. Vojtiskova, T. Mracek, P. Pecina and P. Jesina (2006). "Mitochondrial diseases and genetic defects of ATP synthase." Biochim Biophys Acta **1757**(9-10): 1400-1405.
- Huang, K. S., H. Bayley, M. J. Liao, E. London and H. G. Khorana (1981). "Refolding of an integral membrane protein. Denaturation, renaturation, and reconstitution of intact bacteriorhodopsin and two proteolytic fragments." J Biol Chem **256**(8): 3802-3809.
- Hulett, J. M., F. Lueder, N. C. Chan, A. J. Perry, P. Wolyne, V. A. Likic, P. R. Gooley and T. Lithgow (2008). "The transmembrane segment of Tom20 is recognized by

- Mim1 for docking to the mitochondrial TOM complex." *J Mol Biol* **376**(3): 694-704.
- Hunte, C., V. Zickermann and U. Brandt (2010). "Functional modules and structural basis of conformational coupling in mitochondrial complex I." *Science* **329**(5990): 448-451.
- Hutu, D. P., B. Guiard, A. Chacinska, D. Becker, N. Pfanner, P. Rehling and M. van der Laan (2008). "Mitochondrial protein import motor: differential role of Tim44 in the recruitment of Pam17 and J-complex to the presequence translocase." *Mol Biol Cell* **19**(6): 2642-2649.
- Jacobs, H. T., S. K. Lehtinen and J. N. Spelbrink (2000). "No sex please, we're mitochondria: a hypothesis on the somatic unit of inheritance of mammalian mtDNA." *Bioessays* **22**(6): 564-572.
- Jaksch, M., S. Hofmann, S. Kleinle, S. Liechti-Gallati, D. E. Pongratz, J. Muller-Hocker, K. B. Jedele, T. Meitinger and K. D. Gerbitz (1998). "A systematic mutation screen of 10 nuclear and 25 mitochondrial candidate genes in 21 patients with cytochrome c oxidase (COX) deficiency shows tRNA(Ser)(UCN) mutations in a subgroup with syndromal encephalopathy." *J Med Genet* **35**(11): 895-900.
- Janssen, R. J., L. G. Nijtmans, L. P. van den Heuvel and J. A. Smeitink (2006). "Mitochondrial complex I: structure, function and pathology." *J Inherit Metab Dis* **29**(4): 499-515.
- Jensen, R. E. and C. D. Dunn (2002). "Protein import into and across the mitochondrial inner membrane: role of the TIM23 and TIM22 translocons." *Biochim Biophys Acta* **1592**(1): 25-34.
- Jesina, P., M. Tesarova, D. Fornuskova, A. Vojtiskova, P. Pecina, V. Kaplanova, H. Hansikova, J. Zeman and J. Houstek (2004). "Diminished synthesis of subunit a (ATP6) and altered function of ATP synthase and cytochrome c oxidase due to the mtDNA 2 bp microdeletion of TA at positions 9205 and 9206." *Biochem J* **383**(Pt. 3): 561-571.
- Jonckheere, A. I., M. Hogeveen, L. G. Nijtmans, M. A. van den Brand, A. J. Janssen, J. H. Diepstra, F. C. van den Brandt, L. P. van den Heuvel, F. A. Hol, T. G. Hofste, L. Kapusta, U. Dillmann, M. G. Shamdeen, J. A. Smeitink and R. J. Rodenburg (2008). "A novel mitochondrial ATP8 gene mutation in a patient with apical hypertrophic cardiomyopathy and neuropathy." *J Med Genet* **45**(3): 129-133.
- Jones, C. N., K. A. Wilkinson, K. T. Hung, K. M. Weeks and L. L. Spremulli (2008). "Lack of secondary structure characterizes the 5' ends of mammalian mitochondrial mRNAs." *RNA* **14**(5): 862-871.
- Jorgensen, B. M., H. N. Rasmussen and U. F. Rasmussen (1985). "Ubiquinone reduction pattern in pigeon heart mitochondria. Identification of three distinct ubiquinone pools." *Biochem J* **229**(3): 621-629.
- Kagan, V. E., V. A. Tyurin, J. Jiang, Y. Y. Tyurina, V. B. Ritov, A. A. Amoscato, A. N. Osipov, N. A. Belikova, A. A. Kapralov, V. Kini, Vlasova, II, Q. Zhao, M. Zou, P. Di, D. A. Svistunenko, I. V. Kurnikov and G. G. Borisenko (2005). "Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors." *Nat Chem Biol* **1**(4): 223-232.

- Kaguni, L. S. (2004). "DNA polymerase gamma, the mitochondrial replicase." *Annu Rev Biochem* **73**: 293-320.
- Kamenski, P., O. Kolesnikova, V. Jubenot, N. Entelis, I. A. Krasheninnikov, R. P. Martin and I. Tarassov (2007). "Evidence for an adaptation mechanism of mitochondrial translation via tRNA import from the cytosol." *Mol Cell* **26**(5): 625-637.
- Kaneda, K., H. Kasahara, R. Matsui, T. Katoh, H. Mizukami, K. Ozawa, D. Watanabe and T. Isa (2011). "Selective optical control of synaptic transmission in the subcortical visual pathway by activation of viral vector-expressed halorhodopsin." *PLoS One* **6**(4): e18452.
- Karicheva, O. Z., O. A. Kolesnikova, T. Schirtz, M. Y. Vysokikh, A. M. Mager-Heckel, A. Lombes, A. Boucheham, I. A. Krasheninnikov, R. P. Martin, N. Entelis and I. Tarassov (2011). "Correction of the consequences of mitochondrial 3243A>G mutation in the MT-TL1 gene causing the MELAS syndrome by tRNA import into mitochondria." *Nucleic Acids Res* **39**(18): 8173-8186.
- Karlberg, O., B. Canback, C. G. Kurland and S. G. Andersson (2000). "The dual origin of the yeast mitochondrial proteome." *Yeast* **17**(3): 170-187.
- Karnik, S. S., M. Nassal, T. Doi, E. Jay, V. Sgaramella and H. G. Khorana (1987). "Structure-function studies on bacteriorhodopsin. II. Improved expression of the bacterio-opsin gene in Escherichia coli." *J Biol Chem* **262**(19): 9255-9263.
- Kasamatsu, H. and J. Vinograd (1974). "Replication of circular DNA in eukaryotic cells." *Annu Rev Biochem* **43**(0): 695-719.
- Kaser, M., M. Kambacheld, B. Kisters-Woike and T. Langer (2003). "Oma1, a novel membrane-bound metallopeptidase in mitochondria with activities overlapping with the m-AAA protease." *J Biol Chem* **278**(47): 46414-46423.
- Kawamata, H. and G. Manfredi (2010). "Mitochondrial dysfunction and intracellular calcium dysregulation in ALS." *Mech Ageing Dev* **131**(7-8): 517-526.
- Keightley, J. A., R. Anitori, M. D. Burton, F. Quan, N. R. Buist and N. G. Kennaway (2000). "Mitochondrial encephalomyopathy and complex III deficiency associated with a stop-codon mutation in the cytochrome b gene." *Am J Hum Genet* **67**(6): 1400-1410.
- Kelemen, B. R., M. Du and R. B. Jensen (2003). "Proteorhodopsin in living color: diversity of spectral properties within living bacterial cells." *Biochim Biophys Acta* **1618**(1): 25-32.
- Kemper, C., S. J. Habib, G. Engl, P. Heckmeyer, K. S. Dimmer and D. Rapaport (2008). "Integration of tail-anchored proteins into the mitochondrial outer membrane does not require any known import components." *J Cell Sci* **121**(Pt 12): 1990-1998.
- Kennaway, N. G., R. D. Carrero-Valenzuela, G. Ewart, V. K. Balan, R. Lightowlers, Y. Z. Zhang, B. R. Powell, R. A. Capaldi and N. R. Buist (1990). "Isoforms of mammalian cytochrome c oxidase: correlation with human cytochrome c oxidase deficiency." *Pediatr Res* **28**(5): 529-535.
- Khalimonchuk, O., M. Y. Jeong, T. Watts, E. Ferris and D. R. Winge (2012). "Selective Oma1-mediated proteolysis of the Cox1 subunit of cytochrome oxidase in assembly mutants." *J Biol Chem*.

- Khusnutdinova, E., I. Gilyazova, E. Ruiz-Pesini, O. Derbeneva, R. Khusainova, I. Khidiyatova, R. Magzhanov and D. C. Wallace (2008). "A mitochondrial etiology of neurodegenerative diseases: evidence from Parkinson's disease." Ann N Y Acad Sci **1147**: 1-20.
- Koehler, C. M., E. Jarosch, K. Tokatlidis, K. Schmid, R. J. Schweyen and G. Schatz (1998). "Import of mitochondrial carriers mediated by essential proteins of the intermembrane space." Science **279**(5349): 369-373.
- Kolesnikova, O. A., N. S. Entelis, C. Jacquin-Becker, F. Goltzene, Z. M. Chrzanowska-Lightowlers, R. N. Lightowlers, R. P. Martin and I. Tarasov (2004). "Nuclear DNA-encoded tRNAs targeted into mitochondria can rescue a mitochondrial DNA mutation associated with the MERRF syndrome in cultured human cells." Hum Mol Genet **13**(20): 2519-2534.
- Koopman, W. J., S. Verkaart, H. J. Visch, F. H. van der Westhuizen, M. P. Murphy, L. W. van den Heuvel, J. A. Smeitink and P. H. Willems (2005). "Inhibition of complex I of the electron transport chain causes O₂- mediated mitochondrial outgrowth." Am J Physiol Cell Physiol **288**(6): C1440-1450.
- Koppen, M. and T. Langer (2007). "Protein degradation within mitochondria: versatile activities of AAA proteases and other peptidases." Crit Rev Biochem Mol Biol **42**(3): 221-242.
- Kozany, C., D. Mokranjac, M. Sichting, W. Neupert and K. Hell (2004). "The J domain-related cochaperone Tim16 is a constituent of the mitochondrial TIM23 preprotein translocase." Nat Struct Mol Biol **11**(3): 234-241.
- Kozjak, V., N. Wiedemann, D. Milenkovic, C. Lohaus, H. E. Meyer, B. Guiard, C. Meisinger and N. Pfanner (2003). "An essential role of Sam50 in the protein sorting and assembly machinery of the mitochondrial outer membrane." J Biol Chem **278**(49): 48520-48523.
- Krause, F., N. H. Reifschneider, D. Vocke, H. Seelert, S. Rexroth and N. A. Dencher (2004). "'Respirasome'-like supercomplexes in green leaf mitochondria of spinach." J Biol Chem **279**(46): 48369-48375.
- Krayl, M., J. H. Lim, F. Martin, B. Guiard and W. Voos (2007). "A cooperative action of the ATP-dependent import motor complex and the inner membrane potential drives mitochondrial preprotein import." Mol Cell Biol **27**(2): 411-425.
- Krebs, H. A. (1970). "Rate control of the tricarboxylic acid cycle." Adv Enzyme Regul **8**: 335-353.
- Kremmidiotis, G., A. E. Gardner, C. Settasatian, A. Savoia, G. R. Sutherland and D. F. Callen (2001). "Molecular and functional analyses of the human and mouse genes encoding AFG3L1, a mitochondrial metalloprotease homologous to the human spastic paraplegia protein." Genomics **76**(1-3): 58-65.
- Kroger, A. and M. Klingenberg (1973). "The kinetics of the redox reactions of ubiquinone related to the electron-transport activity in the respiratory chain." Eur J Biochem **34**(2): 358-368.
- Kuan, J. and M. H. Saier, Jr. (1993). "The mitochondrial carrier family of transport proteins: structural, functional, and evolutionary relationships." Crit Rev Biochem Mol Biol **28**(3): 209-233.

- Kucharczyk, R., M. Zick, M. Bietenhader, M. Rak, E. Couplan, M. Blondel, S. D. Caubet and J. P. di Rago (2009). "Mitochondrial ATP synthase disorders: molecular mechanisms and the quest for curative therapeutic approaches." Biochim Biophys Acta **1793**(1): 186-199.
- Kukat, C., C. A. Wurm, H. Spahr, M. Falkenberg, N. G. Larsson and S. Jakobs (2011). "Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(33): 13534-13539.
- Kurz, M., H. Martin, J. Rassow, N. Pfanner and M. T. Ryan (1999). "Biogenesis of Tim proteins of the mitochondrial carrier import pathway: differential targeting mechanisms and crossing over with the main import pathway." Mol Biol Cell **10**(7): 2461-2474.
- Lane, N. (2011). "Energetics and genetics across the prokaryote-eukaryote divide." Biol Direct **6**: 35.
- Lanyi, J. K. (1978). "Light energy conversion in *Halobacterium halobium*." Microbiol Rev **42**(4): 682-706.
- Lanyi, J. K. (1986). "Halorhodopsin: a light-driven chloride ion pump." Annu Rev Biophys Biophys Chem **15**: 11-28.
- Lanyi, J. K. and H. Luecke (2001). "Bacteriorhodopsin." Curr Opin Struct Biol **11**(4): 415-419.
- Larsson, N. G., J. Wang, H. Wilhelmsson, A. Oldfors, P. Rustin, M. Lewandoski, G. S. Barsh and D. A. Clayton (1998). "Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice." Nat Genet **18**(3): 231-236.
- Lass, A. and R. S. Sohal (1998). "Electron transport-linked ubiquinone-dependent recycling of alpha-tocopherol inhibits autooxidation of mitochondrial membranes." Arch Biochem Biophys **352**(2): 229-236.
- Lass, A. and R. S. Sohal (1999). "Comparisons of coenzyme Q bound to mitochondrial membrane proteins among different mammalian species." Free Radic Biol Med **27**(1-2): 220-226.
- Lazarou, M., S. M. Smith, D. R. Thorburn, M. T. Ryan and M. McKenzie (2009). "Assembly of nuclear DNA-encoded subunits into mitochondrial complex IV, and their preferential integration into supercomplex forms in patient mitochondria." FEBS J **276**(22): 6701-6713.
- Lemarie, A. and S. Grimm (2009). "Mutations in the heme b-binding residue of SDHC inhibit assembly of respiratory chain complex II in mammalian cells." Mitochondrion **9**(4): 254-260.
- Lemke, H. D. and D. Oesterhelt (1981). "Lysine 216 is a binding site of the retinyl moiety in bacteriorhodopsin." FEBS Lett **128**(2): 255-260.
- Lenaz, G., R. Fato, G. Formiggini and M. L. Genova (2007). "The role of Coenzyme Q in mitochondrial electron transport." Mitochondrion **7 Suppl**: S8-33.
- Lenaz, G. and M. L. Genova (2007). "Kinetics of integrated electron transfer in the mitochondrial respiratory chain: random collisions vs. solid state electron channeling." Am J Physiol Cell Physiol **292**(4): C1221-1239.

- Lenaz, G. and M. L. Genova (2009). "Mobility and function of coenzyme Q (ubiquinone) in the mitochondrial respiratory chain." *Biochim Biophys Acta* **1787**(6): 563-573.
- Lenaz, G. and M. L. Genova (2010). "Structure and organization of mitochondrial respiratory complexes: a new understanding of an old subject." *Antioxid Redox Signal* **12**(8): 961-1008.
- Li, Y., J. Dudek, B. Guiard, N. Pfanner, P. Rehling and W. Voos (2004). "The presequence translocase-associated protein import motor of mitochondria. Pam16 functions in an antagonistic manner to Pam18." *J Biol Chem* **279**(36): 38047-38054.
- Liao, M. J., K. S. Huang and H. G. Khorana (1984). "Regeneration of native bacteriorhodopsin structure from fragments." *J Biol Chem* **259**(7): 4200-4204.
- Lim, S. E., M. J. Longley and W. C. Copeland (1999). "The mitochondrial p55 accessory subunit of human DNA polymerase gamma enhances DNA binding, promotes processive DNA synthesis, and confers N-ethylmaleimide resistance." *J Biol Chem* **274**(53): 38197-38203.
- Lithgow, T. and A. Schneider (2010). "Evolution of macromolecular import pathways in mitochondria, hydrogenosomes and mitosomes." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **365**(1541): 799-817.
- Litonin, D., M. Sologub, Y. Shi, M. Savkina, M. Anikin, M. Falkenberg, C. M. Gustafsson and D. Temiakov (2010). "Human mitochondrial transcription revisited: only TFAM and TFB2M are required for transcription of the mitochondrial genes in vitro." *J Biol Chem* **285**(24): 18129-18133.
- Liu, X., C. N. Kim, J. Yang, R. Jemmerson and X. Wang (1996). "Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c." *Cell* **86**(1): 147-157.
- Loeffen, J. L., J. A. Smeitink, J. M. Trijbels, A. J. Janssen, R. H. Triepels, R. C. Sengers and L. P. van den Heuvel (2000). "Isolated complex I deficiency in children: clinical, biochemical and genetic aspects." *Hum Mutat* **15**(2): 123-134.
- Logan, D. C. (2006). "The mitochondrial compartment." *J Exp Bot* **57**(6): 1225-1243.
- Luecke, H. (2000). "Atomic resolution structures of bacteriorhodopsin photocycle intermediates: the role of discrete water molecules in the function of this light-driven ion pump." *Biochim Biophys Acta* **1460**(1): 133-156.
- Lutter, R., M. Saraste, H. S. van Walraven, M. J. Runswick, M. Finel, J. F. Deatherage and J. E. Walker (1993). "F1F0-ATP synthase from bovine heart mitochondria: development of the purification of a monodisperse oligomycin-sensitive ATPase." *Biochem J* **295** (Pt 3): 799-806.
- Magalhaes, P. J., A. L. Andreu and E. A. Schon (1998). "Evidence for the presence of 5S rRNA in mammalian mitochondria." *Mol Biol Cell* **9**(9): 2375-2382.
- Mahata, B., S. Mukherjee, S. Mishra, A. Bandyopadhyay and S. Adhya (2006). "Functional delivery of a cytosolic tRNA into mutant mitochondria of human cells." *Science* **314**(5798): 471-474.
- Mai, Z., S. Ghosh, M. Frisardi, B. Rosenthal, R. Rogers and J. Samuelson (1999). "Hsp60 is targeted to a cryptic mitochondrion-derived organelle ("crypton") in the

- microaerophilic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*." Mol Cell Biol **19**(3): 2198-2205.
- Man, D., W. Wang, G. Sabehi, L. Aravind, A. F. Post, R. Massana, E. N. Spudich, J. L. Spudich and O. Beja (2003). "Diversification and spectral tuning in marine proteorhodopsins." EMBO J **22**(8): 1725-1731.
- Manfredi, G., J. Fu, J. Ojaimi, J. E. Sadlock, J. Q. Kwong, J. Guy and E. A. Schon (2002). "Rescue of a deficiency in ATP synthesis by transfer of MTATP6, a mitochondrial DNA-encoded gene, to the nucleus." Nat Genet **30**(4): 394-399.
- Marella, M., B. B. Seo, E. Nakamaru-Ogiso, J. T. Greenamyre, A. Matsuno-Yagi and T. Yagi (2008). "Protection by the NDI1 gene against neurodegeneration in a rotenone rat model of Parkinson's disease." PLoS One **3**(1): e1433.
- Marti, T. (1998). "Refolding of bacteriorhodopsin from expressed polypeptide fragments." J Biol Chem **273**(15): 9312-9322.
- Martinelli, P. and E. I. Rugarli (2010). "Emerging roles of mitochondrial proteases in neurodegeneration." Biochim Biophys Acta **1797**(1): 1-10.
- Martinez-Caballero, S., S. M. Grigoriev, J. M. Herrmann, M. L. Campo and K. W. Kinnally (2007). "Tim17p regulates the twin pore structure and voltage gating of the mitochondrial protein import complex TIM23." J Biol Chem **282**(6): 3584-3593.
- Massa, V., E. Fernandez-Vizarra, S. Alshahwan, E. Bakhsh, P. Goffrini, I. Ferrero, P. Mereghetti, P. D'Adamo, P. Gasparini and M. Zeviani (2008). "Severe infantile encephalomyopathy caused by a mutation in COX6B1, a nucleus-encoded subunit of cytochrome c oxidase." Am J Hum Genet **82**(6): 1281-1289.
- Mazat, J. P., R. Rossignol, M. Malgat, C. Rocher, B. Faustin and T. Letellier (2001). "What do mitochondrial diseases teach us about normal mitochondrial functions...that we already knew: threshold expression of mitochondrial defects." Biochim Biophys Acta **1504**(1): 20-30.
- McCulloch, V., B. L. Seidel-Rogol and G. S. Shadel (2002). "A human mitochondrial transcription factor is related to RNA adenine methyltransferases and binds S-adenosylmethionine." Mol Cell Biol **22**(4): 1116-1125.
- McKenzie, M., M. Lazarou, D. R. Thorburn and M. T. Ryan (2006). "Mitochondrial respiratory chain supercomplexes are destabilized in Barth Syndrome patients." J Mol Biol **361**(3): 462-469.
- McKenzie, M. and M. T. Ryan (2010). "Assembly factors of human mitochondrial complex I and their defects in disease." IUBMB Life **62**(7): 497-502.
- McKenzie, M., E. J. Tucker, A. G. Compton, M. Lazarou, C. George, D. R. Thorburn and M. T. Ryan (2011). "Mutations in the gene encoding C8orf38 block complex I assembly by inhibiting production of the mitochondria-encoded subunit ND1." J Mol Biol **414**(3): 413-426.
- Meyer, B., I. Wittig, E. Trifilieff, M. Karas and H. Schagger (2007). "Identification of two proteins associated with mammalian ATP synthase." Mol Cell Proteomics **6**(10): 1690-1699.
- Minauro-Sanmiguel, F., S. Wilkens and J. J. Garcia (2005). "Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: novel F0 bridging features and the structural basis of

- mitochondrial cristae biogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(35): 12356-12358.
- Minczuk, M., M. A. Papworth, J. C. Miller, M. P. Murphy and A. Klug (2008). "Development of a single-chain, quasi-dimeric zinc-finger nuclease for the selective degradation of mutated human mitochondrial DNA." Nucleic Acids Res **36**(12): 3926-3938.
- Minenko, A. N., L. A. Novikova, V. N. Luzikov and I. E. Kovaleva (2008). "Import of hybrid forms of CYP11A1 into yeast mitochondria." Biochim Biophys Acta **1780**(10): 1121-1130.
- Mitchell, P. (1961). "Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism." Nature **191**: 144-148.
- Mitchell, P. and J. Moyle (1967). "Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation." Nature **213**(5072): 137-139.
- Montoya, J., D. Ojala and G. Attardi (1981). "Distinctive features of the 5'-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs." Nature **290**(5806): 465-470.
- Mootha, V. K., P. Lepage, K. Miller, J. Bunkenborg, M. Reich, M. Hjerrild, T. Delmonte, A. Villeneuve, R. Sladek, F. Xu, G. A. Mitchell, C. Morin, M. Mann, T. J. Hudson, B. Robinson, J. D. Rioux and E. S. Lander (2003). "Identification of a gene causing human cytochrome c oxidase deficiency by integrative genomics." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(2): 605-610.
- Moraes, C. T., R. Dey and A. Barrientos (2001). "Transmitochondrial technology in animal cells." Methods Cell Biol **65**: 397-412.
- Moreno-Lastres (2012). "Mitochondrial Complex I plays an essential role in human respirasome assembly." Cell Metabolism.
- Moreno-Loshuertos, R., R. Acin-Perez, P. Fernandez-Silva, N. Movilla, A. Perez-Martos, S. R. de Cordoba, M. E. Gallardo and J. A. Enriquez (2006). "Differences in reactive oxygen species production explain the phenotypes associated with common mouse mitochondrial DNA variants." Nat Genet **38**(11): 1261-1268.
- Moreno-Loshuertos, R., R. Acin-Perez, P. Fernandez-Silva, N. Movilla, A. Perez-Martos, S. Rodriguez de Cordoba, M. E. Gallardo and J. A. Enriquez (2006). "Differences in reactive oxygen species production explain the phenotypes associated with common mouse mitochondrial DNA variants." Nat Genet **38**(11): 1261-1268.
- Morris, R. M., M. S. Rappe, S. A. Connon, K. L. Vergin, W. A. Siebold, C. A. Carlson and S. J. Giovannoni (2002). "SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities." Nature **420**(6917): 806-810.
- Muller, J. M., D. Milenkovic, B. Guiard, N. Pfanner and A. Chacinska (2008). "Precursor oxidation by Mia40 and Erv1 promotes vectorial transport of proteins into the mitochondrial intermembrane space." Mol Biol Cell **19**(1): 226-236.
- Munnich, A., P. Rustin, A. Rotig, D. Chretien, J. P. Bonnefont, C. Nuttin, V. Cormier, A. Vassault, P. Parvy, J. Bardet and et al. (1992). "Clinical aspects of mitochondrial disorders." J Inherit Metab Dis **15**(4): 448-455.
- Muratovska, A., R. N. Lightowers, R. W. Taylor, D. M. Turnbull, R. A. Smith, J. A. Wilce, S. W. Martin and M. P. Murphy (2001). "Targeting peptide nucleic acid (PNA) oligomers to mitochondria within cells by conjugation to lipophilic cations:

- implications for mitochondrial DNA replication, expression and disease." Nucleic Acids Res **29**(9): 1852-1863.
- Muratovska, A., R. N. Lightowers, R. W. Taylor, J. A. Wilce and M. P. Murphy (2001). "Targeting large molecules to mitochondria." Adv Drug Deliv Rev **49**(1-2): 189-198.
- Naderi, J., M. Somayajulu-Nitu, A. Mukerji, P. Sharda, M. Sikorska, H. Borowy-Borowski, B. Antonsson and S. Pandey (2006). "Water-soluble formulation of Coenzyme Q10 inhibits Bax-induced destabilization of mitochondria in mammalian cells." Apoptosis **11**(8): 1359-1369.
- Nagaike, T., T. Suzuki, Y. Tomari, C. Takemoto-Hori, F. Negayama, K. Watanabe and T. Ueda (2001). "Identification and characterization of mammalian mitochondrial tRNA nucleotidyltransferases." J Biol Chem **276**(43): 40041-40049.
- Nagel, G., D. Ollig, M. Fuhrmann, S. Kateriya, A. M. Musti, E. Bamberg and P. Hegemann (2002). "Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae." Science **296**(5577): 2395-2398.
- Nagel, G., T. Szellas, W. Huhn, S. Kateriya, N. Adeishvili, P. Berthold, D. Ollig, P. Hegemann and E. Bamberg (2003). "Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(24): 13940-13945.
- Nagel, G., T. Szellas, S. Kateriya, N. Adeishvili, P. Hegemann and E. Bamberg (2005). "Channelrhodopsins: directly light-gated cation channels." Biochem Soc Trans **33**(Pt 4): 863-866.
- Naini, A. B., J. Lu, P. Kaufmann, R. A. Bernstein, M. Mancuso, E. Bonilla, M. Hirano and S. DiMauro (2005). "Novel mitochondrial DNA ND5 mutation in a patient with clinical features of MELAS and MERRF." Arch Neurol **62**(3): 473-476.
- Naldini, L., U. Blomer, F. H. Gage, D. Trono and I. M. Verma (1996). "Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(21): 11382-11388.
- Nelson, B. D., K. Luciakova, R. Li and S. Betina (1995). "The role of thyroid hormone and promoter diversity in the regulation of nuclear encoded mitochondrial proteins." Biochim Biophys Acta **1271**(1): 85-91.
- Ngo, H. B., J. T. Kaiser and D. C. Chan (2011). "The mitochondrial transcription and packaging factor Tfam imposes a U-turn on mitochondrial DNA." Nat Struct Mol Biol **18**(11): 1290-1296.
- Niemann, S. and U. Muller (2000). "Mutations in SDHC cause autosomal dominant paraganglioma, type 3." Nat Genet **26**(3): 268-270.
- Nijtmans, L. G., N. S. Henderson, G. Attardi and I. J. Holt (2001). "Impaired ATP synthase assembly associated with a mutation in the human ATP synthase subunit 6 gene." J Biol Chem **276**(9): 6755-6762.
- Nolden, M., S. Ehses, M. Koppen, A. Bernacchia, E. I. Rugarli and T. Langer (2005). "The m-AAA protease defective in hereditary spastic paraplegia controls ribosome assembly in mitochondria." Cell **123**(2): 277-289.
- Nouws, J., L. Nijtmans, S. M. Houten, M. van den Brand, M. Huynen, H. Venselaar, S. Hoefs, J. Gloerich, J. Kronick, T. Hutchin, P. Willems, R. Rodenburg, R.

- Wanders, L. van den Heuvel, J. Smeitink and R. O. Vogel (2010). "Acyl-CoA dehydrogenase 9 is required for the biogenesis of oxidative phosphorylation complex I." *Cell Metab* **12**(3): 283-294.
- Nozaki, Y., N. Matsunaga, T. Ishizawa, T. Ueda and N. Takeuchi (2008). "HMRF1L is a human mitochondrial translation release factor involved in the decoding of the termination codons UAA and UAG." *Genes Cells* **13**(5): 429-438.
- Oca-Cossio, J., L. Kenyon, H. Hao and C. T. Moraes (2003). "Limitations of allotopic expression of mitochondrial genes in mammalian cells." *Genetics* **165**(2): 707-720.
- Ohsakaya, S., M. Fujikawa, T. Hisabori and M. Yoshida (2011). "Knockdown of DAPIT (diabetes-associated protein in insulin-sensitive tissue) results in loss of ATP synthase in mitochondria." *J Biol Chem* **286**(23): 20292-20296.
- Ojala, D., J. Montoya and G. Attardi (1981). "tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria." *Nature* **290**(5806): 470-474.
- Olson, M. W., Y. Wang, R. H. Elder and L. S. Kaguni (1995). "Subunit structure of mitochondrial DNA polymerase from *Drosophila* embryos. Physical and immunological studies." *J Biol Chem* **270**(48): 28932-28937.
- Ongwijitwat, S. and M. T. Wong-Riley (2005). "Is nuclear respiratory factor 2 a master transcriptional coordinator for all ten nuclear-encoded cytochrome c oxidase subunits in neurons?" *Gene* **360**(1): 65-77.
- Oquendo, C. E., H. Antonicka, E. A. Shoubridge, W. Reardon and G. K. Brown (2004). "Functional and genetic studies demonstrate that mutation in the COX15 gene can cause Leigh syndrome." *J Med Genet* **41**(7): 540-544.
- Oswald, C., U. Krause-Buchholz and G. Rodel (2009). "Knockdown of human COX17 affects assembly and supramolecular organization of cytochrome c oxidase." *J Mol Biol* **389**(3): 470-479.
- Otera, H., Y. Taira, C. Horie, Y. Suzuki, H. Suzuki, K. Setoguchi, H. Kato, T. Oka and K. Mihara (2007). "A novel insertion pathway of mitochondrial outer membrane proteins with multiple transmembrane segments." *J Cell Biol* **179**(7): 1355-1363.
- Pacheu-Grau, D., A. Gomez-Duran, M. J. Lopez-Perez, J. Montoya and E. Ruiz-Pesini (2010). "Mitochondrial pharmacogenomics: barcode for antibiotic therapy." *Drug Discov Today* **15**(1-2): 33-39.
- Pacheu-Grau, D., A. Gomez-Duran, J. Montoya and E. Ruiz-Pesini (2010). "Influence of mtDNA genetic variation on antibiotic therapy." *Pharmacogenomics* **11**(9): 1185-1187.
- Pagliarini, D. J., S. E. Calvo, B. Chang, S. A. Sheth, S. B. Vafai, S. E. Ong, G. A. Walford, C. Sugiana, A. Boneh, W. K. Chen, D. E. Hill, M. Vidal, J. G. Evans, D. R. Thorburn, S. A. Carr and V. K. Mootha (2008). "A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology." *Cell* **134**(1): 112-123.
- Pagniez-Mammeri, H., S. Loublier, A. Legrand, P. Benit, P. Rustin and A. Slama (2012). "Mitochondrial complex I deficiency of nuclear origin I. Structural genes." *Mol Genet Metab* **105**(2): 163-172.

- Pagniez-Mammeri, H., M. Rak, A. Legrand, P. Benit, P. Rustin and A. Slama (2012). "Mitochondrial complex I deficiency of nuclear origin II. Non-structural genes." Mol Genet Metab **105**(2): 173-179.
- Palade, G. E. (1953). "An electron microscope study of the mitochondrial structure." J Histochem Cytochem **1**(4): 188-211.
- Palmer, C. S., L. D. Osellame, D. Stojanovski and M. T. Ryan (2011). "The regulation of mitochondrial morphology: intricate mechanisms and dynamic machinery." Cell Signal **23**(10): 1534-1545.
- Pandey, P. C. (2006). "Bacteriorhodopsin--novel biomolecule for nano devices." Anal Chim Acta **568**(1-2): 47-56.
- Papadopoulou, L. C., C. M. Sue, M. M. Davidson, K. Tanji, I. Nishino, J. E. Sadlock, S. Krishna, W. Walker, J. Selby, D. M. Glerum, R. V. Coster, G. Lyon, E. Scalais, R. Lebel, P. Kaplan, S. Shanske, D. C. De Vivo, E. Bonilla, M. Hirano, S. DiMauro and E. A. Schon (1999). "Fatal infantile cardioencephalomyopathy with COX deficiency and mutations in SCO2, a COX assembly gene." Nat Genet **23**(3): 333-337.
- Papucci, L., N. Schiavone, E. Witort, M. Donnini, A. Lapucci, A. Tempestini, L. Formigli, S. Zecchi-Orlandini, G. Orlandini, G. Carella, R. Brancato and S. Capaccioli (2003). "Coenzyme q10 prevents apoptosis by inhibiting mitochondrial depolarization independently of its free radical scavenging property." J Biol Chem **278**(30): 28220-28228.
- Parfait, B., D. Chretien, A. Rotig, C. Marsac, A. Munnich and P. Rustin (2000). "Compound heterozygous mutations in the flavoprotein gene of the respiratory chain complex II in a patient with Leigh syndrome." Hum Genet **106**(2): 236-243.
- Pebay-Peyroula, E., R. Neutze and E. M. Landau (2000). "Lipidic cubic phase crystallization of bacteriorhodopsin and cryotrapping of intermediates: towards resolving a revolving photocycle." Biochim Biophys Acta **1460**(1): 119-132.
- Perales-Clemente, E., M. P. Bayona-Bafaluy, A. Perez-Martos, A. Barrientos, P. Fernandez-Silva and J. A. Enriquez (2008). "Restoration of electron transport without proton pumping in mammalian mitochondria." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(48): 18735-18739.
- Perales-Clemente, E., P. Fernandez-Silva, R. Acin-Perez, A. Perez-Martos and J. A. Enriquez (2011). "Allotopic expression of mitochondrial-encoded genes in mammals: achieved goal, undemonstrated mechanism or impossible task?" Nucleic Acids Res **39**(1): 225-234.
- Perales-Clemente, E., E. Fernandez-Vizarra, R. Acin-Perez, N. Movilla, M. P. Bayona-Bafaluy, R. Moreno-Loshuertos, A. Perez-Martos, P. Fernandez-Silva and J. A. Enriquez (2010). "Five entry points of the mitochondrially encoded subunits in mammalian complex I assembly." Mol Cell Biol **30**(12): 3038-3047.
- Perales-Clemente, E., E. Fernandez-Vizarra, R. Acin-Perez, N. Movilla, M. P. Bayona-Bafaluy, R. Moreno-Loshuertos, A. Perez-Martos, P. Fernandez-Silva and J. A. Enriquez (2011). "Five entry points of the mitochondrially encoded subunits in mammalian complex I assembly." Mol Cell Biol **30**(12): 3038-3047.
- Peters, K., N. V. Dudkina, L. Jansch, H. P. Braun and E. J. Boekema (2008). "A structural investigation of complex I and I+III2 supercomplex from *Zea mays* at 11-13 Å

- resolution: assignment of the carbonic anhydrase domain and evidence for structural heterogeneity within complex I." *Biochim Biophys Acta* **1777**(1): 84-93.
- Poe, B. G., 3rd, C. F. Duffy, M. A. Greminger, B. J. Nelson and E. A. Arriaga (2010). "Detection of heteroplasmy in individual mitochondrial particles." *Anal Bioanal Chem* **397**(8): 3397-3407.
- Popovic, D. M. and A. A. Stuchebrukhov (2011). "Coupled electron and proton transfer reactions during the O²->E transition in bovine cytochrome c oxidase." *Biochim Biophys Acta*.
- Pulkes, T., L. Eunson, V. Patterson, A. Siddiqui, N. W. Wood, I. P. Nelson, J. A. Morgan-Hughes and M. G. Hanna (1999). "The mitochondrial DNA G13513A transition in ND5 is associated with a LHON/MELAS overlap syndrome and may be a frequent cause of MELAS." *Ann Neurol* **46**(6): 916-919.
- Puranam, R. S. and G. Attardi (2001). "The RNase P associated with HeLa cell mitochondria contains an essential RNA component identical in sequence to that of the nuclear RNase P." *Mol Cell Biol* **21**(2): 548-561.
- Rabier, D., C. Diry, A. Rotig, P. Rustin, B. Heron, J. Bardet, P. Parvy, G. Ponsot, C. Marsac, J. M. Saudubray, A. Munnich and P. Kamoun (1998). "Persistent hypocitrullinaemia as a marker for mtDNA NARP T 8993 G mutation?" *J Inherit Metab Dis* **21**(3): 216-219.
- Rahman, S., R. B. Blok, H. H. Dahl, D. M. Danks, D. M. Kirby, C. W. Chow, J. Christodoulou and D. R. Thorburn (1996). "Leigh syndrome: clinical features and biochemical and DNA abnormalities." *Ann Neurol* **39**(3): 343-351.
- Ranaghan, M. J., S. Shima, L. Ramos, D. S. Poulin, G. Whited, S. Rajasekaran, J. A. Stuart, A. D. Albert and R. R. Birge (2010). "Photochemical and thermal stability of green and blue proteorhodopsins: implications for protein-based bioelectronic devices." *J Phys Chem B* **114**(44): 14064-14070.
- Reddy, P. H. and U. P. Shirendeb (2011). "Mutant huntingtin, abnormal mitochondrial dynamics, defective axonal transport of mitochondria, and selective synaptic degeneration in Huntington's disease." *Biochim Biophys Acta*.
- Reddy, P. H., R. Tripathi, Q. Troung, K. Tirumala, T. P. Reddy, V. Anekonda, U. P. Shirendeb, M. J. Calkins, A. P. Reddy, P. Mao and M. Manczak (2011). "Abnormal mitochondrial dynamics and synaptic degeneration as early events in Alzheimer's disease: Implications to mitochondria-targeted antioxidant therapeutics." *Biochim Biophys Acta*.
- Rhouda, T., D. Martinez-Redondo, A. Gomez-Duran, N. Elmtili, M. Idaomar, C. Diez-Sanchez, J. Montoya, M. J. Lopez-Perez and E. Ruiz-Pesini (2009). "Moroccan mitochondrial genetic background suggests prehistoric human migrations across the Gibraltar Strait." *Mitochondrion* **9**(6): 402-407.
- Richardson, D. R., D. J. Lane, E. M. Becker, M. L. Huang, M. Whitnall, Y. Suryo Rahmanto, A. D. Sheftel and P. Ponka (2010). "Mitochondrial iron trafficking and the integration of iron metabolism between the mitochondrion and cytosol." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(24): 10775-10782.

- Rosca, M. G., E. J. Vazquez, J. Kerner, W. Parland, M. P. Chandler, W. Stanley, H. N. Sabbah and C. L. Hoppel (2008). "Cardiac mitochondria in heart failure: decrease in respirasomes and oxidative phosphorylation." Cardiovasc Res **80**(1): 30-39.
- Rubio-Cosials, A., J. F. Sidow, N. Jimenez-Menendez, P. Fernandez-Millan, J. Montoya, H. T. Jacobs, M. Coll, P. Bernado and M. Sola (2011). "Human mitochondrial transcription factor A induces a U-turn structure in the light strand promoter." Nat Struct Mol Biol **18**(11): 1281-1289.
- Rubio, M. A., J. J. Rinehart, B. Krett, S. Duvezin-Caubet, A. S. Reichert, D. Soll and J. D. Alfonzo (2008). "Mammalian mitochondria have the innate ability to import tRNAs by a mechanism distinct from protein import." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(27): 9186-9191.
- Ruiz-Pesini, E., A. C. Lapena, C. Diez-Sanchez, A. Perez-Martos, J. Montoya, E. Alvarez, M. Diaz, A. Urries, L. Montoro, M. J. Lopez-Perez and J. A. Enriquez (2000). "Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility." Am J Hum Genet **67**(3): 682-696.
- Rutter, J., D. R. Winge and J. D. Schiffman (2010). "Succinate dehydrogenase - Assembly, regulation and role in human disease." Mitochondrion **10**(4): 393-401.
- Sabehi, G., R. Massana, J. P. Bielawski, M. Rosenberg, E. F. Delong and O. Beja (2003). "Novel Proteorhodopsin variants from the Mediterranean and Red Seas." Environ Microbiol **5**(10): 842-849.
- Sagan, L. (1967). "On the origin of mitosing cells." J Theor Biol **14**(3): 255-274.
- Saitoh, T., M. Igura, T. Obita, T. Ose, R. Kojima, K. Maenaka, T. Endo and D. Kohda (2007). "Tom20 recognizes mitochondrial presequences through dynamic equilibrium among multiple bound states." EMBO J **26**(22): 4777-4787.
- Santos-Ocana, C., T. Q. Do, S. Padilla, P. Navas and C. F. Clarke (2002). "Uptake of exogenous coenzyme Q and transport to mitochondria is required for bc1 complex stability in yeast coq mutants." J Biol Chem **277**(13): 10973-10981.
- Satoh, M. and T. Kuroiwa (1991). "Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell." Exp Cell Res **196**(1): 137-140.
- Sazanov, L. A., S. Y. Peak-Chew, I. M. Fearnley and J. E. Walker (2000). "Resolution of the membrane domain of bovine complex I into subcomplexes: implications for the structural organization of the enzyme." Biochemistry **39**(24): 7229-7235.
- Scaglia, F., J. A. Towbin, W. J. Craigen, J. W. Belmont, E. O. Smith, S. R. Neish, S. M. Ware, J. V. Hunter, S. D. Fernbach, G. D. Vladutiu, L. J. Wong and H. Vogel (2004). "Clinical spectrum, morbidity, and mortality in 113 pediatric patients with mitochondrial disease." Pediatrics **114**(4): 925-931.
- Scarpulla, R. C. (2002). "Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis." Biochim Biophys Acta **1576**(1-2): 1-14.
- Scarpulla, R. C. (2006). "Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells." J Cell Biochem **97**(4): 673-683.
- Scarpulla, R. C. (2008). "Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function." Physiol Rev **88**(2): 611-638.
- Scott, I. (2010). "The role of mitochondria in the mammalian antiviral defense system." Mitochondrion **10**(4): 316-320.

- Schafer, E., N. A. Dencher, J. Vonck and D. N. Parcej (2007). "Three-dimensional structure of the respiratory chain supercomplex I₁III₂IV₁ from bovine heart mitochondria." *Biochemistry* **46**(44): 12579-12585.
- Schafer, E., H. Seelert, N. H. Reifschneider, F. Krause, N. A. Dencher and J. Vonck (2006). "Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes." *J Biol Chem* **281**(22): 15370-15375.
- Schagger, H. (1995). "Native electrophoresis for isolation of mitochondrial oxidative phosphorylation protein complexes." *Methods Enzymol* **260**: 190-202.
- Schagger, H. (1996). "Electrophoretic techniques for isolation and quantification of oxidative phosphorylation complexes from human tissues." *Methods Enzymol* **264**: 555-566.
- Schagger, H., R. de Coo, M. F. Bauer, S. Hofmann, C. Godinot and U. Brandt (2004). "Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I." *J Biol Chem* **279**(35): 36349-36353.
- Schagger, H. and K. Pfeiffer (2000). "Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria." *Embo J* **19**(8): 1777-1783.
- Schagger, H. and K. Pfeiffer (2001). "The ratio of oxidative phosphorylation complexes I-V in bovine heart mitochondria and the composition of respiratory chain supercomplexes." *J Biol Chem* **276**(41): 37861-37867.
- Scheller, K. and C. E. Sekeris (2003). "The effects of steroid hormones on the transcription of genes encoding enzymes of oxidative phosphorylation." *Exp Physiol* **88**(1): 129-140.
- Schneider, A. and L. Marechal-Drouard (2000). "Mitochondrial tRNA import: are there distinct mechanisms?" *Trends Cell Biol* **10**(12): 509-513.
- Schneider, H., J. J. Lemasters and C. R. Hackenbrock (1982). "Lateral diffusion of ubiquinone during electron transfer in phospholipid- and ubiquinone-enriched mitochondrial membranes." *J Biol Chem* **257**(18): 10789-10793.
- Schon, E. A., S. DiMauro, M. Hirano and R. W. Gilkerson (2010). "Therapeutic prospects for mitochondrial disease." *Trends Mol Med* **16**(6): 268-276.
- Schuelke, M., H. Krude, B. Finckh, E. Mayatepek, A. Janssen, M. Schmelz, F. Trefz, F. Trijbels and J. Smeitink (2002). "Septo-optic dysplasia associated with a new mitochondrial cytochrome b mutation." *Ann Neurol* **51**(3): 388-392.
- Schulte, U., V. Haupt, A. Abelmann, W. Fecke, B. Brors, T. Rasmussen, T. Friedrich and H. Weiss (1999). "A reductase/isomerase subunit of mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) carries an NADPH and is involved in the biogenesis of the complex." *J Mol Biol* **292**(3): 569-580.
- Schwartzbach, C. J. and L. L. Spremulli (1989). "Bovine mitochondrial protein synthesis elongation factors. Identification and initial characterization of an elongation factor Tu-elongation factor Ts complex." *J Biol Chem* **264**(32): 19125-19131.
- Sekeris, C. E. (1990). "The mitochondrial genome: a possible primary site of action of steroid hormones." *In Vivo* **4**(5): 317-320.
- Selak, M. A., S. M. Armour, E. D. MacKenzie, H. Boulahbel, D. G. Watson, K. D. Mansfield, Y. Pan, M. C. Simon, C. B. Thompson and E. Gottlieb (2005).

- "Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-alpha prolyl hydroxylase." *Cancer Cell* **7**(1): 77-85.
- Seneca, S., M. Abramowicz, W. Lissens, M. F. Muller, E. Vamos and L. de Meirleir (1996). "A mitochondrial DNA microdeletion in a newborn girl with transient lactic acidosis." *J Inher Metab Dis* **19**(2): 115-118.
- Seo, B. B., T. Kitajima-Ihara, E. K. Chan, I. E. Scheffler, A. Matsuno-Yagi and T. Yagi (1998). "Molecular remedy of complex I defects: rotenone-insensitive internal NADH-quinone oxidoreductase of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria restores the NADH oxidase activity of complex I-deficient mammalian cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(16): 9167-9171.
- Seo, B. B., E. Nakamaru-Ogiso, T. R. Flotte, A. Matsuno-Yagi and T. Yagi (2006). "In vivo complementation of complex I by the yeast Ndi1 enzyme. Possible application for treatment of Parkinson disease." *J Biol Chem* **281**(20): 14250-14255.
- Setoguchi, K., H. Otera and K. Mihara (2006). "Cytosolic factor- and TOM-independent import of C-tail-anchored mitochondrial outer membrane proteins." *EMBO J* **25**(24): 5635-5647.
- Shadel, G. S. (2008). "Expression and maintenance of mitochondrial DNA: new insights into human disease pathology." *Am J Pathol* **172**(6): 1445-1456.
- Shariff, K., S. Ghosal and A. Matouschek (2004). "The force exerted by the membrane potential during protein import into the mitochondrial matrix." *Biophys J* **86**(6): 3647-3652.
- Shutt, T. E. and G. S. Shadel (2010). "A compendium of human mitochondrial gene expression machinery with links to disease." *Environ Mol Mutagen* **51**(5): 360-379.
- Sirrenberg, C., M. Endres, H. Folsch, R. A. Stuart, W. Neupert and M. Brunner (1998). "Carrier protein import into mitochondria mediated by the intermembrane proteins Tim10/Mrs11 and Tim12/Mrs5." *Nature* **391**(6670): 912-915.
- Skulachev, V. P. (1998). "Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades." *FEBS Lett* **423**(3): 275-280.
- Smeitink, J. A., M. Zeviani, D. M. Turnbull and H. T. Jacobs (2006). "Mitochondrial medicine: a metabolic perspective on the pathology of oxidative phosphorylation disorders." *Cell Metab* **3**(1): 9-13.
- Smirnov, A., N. Entelis, R. P. Martin and I. Tarassov (2011). "Biological significance of 5S rRNA import into human mitochondria: role of ribosomal protein MRP-L18." *Genes Dev* **25**(12): 1289-1305.
- Smirnov, A., I. Tarassov, A. M. Mager-Heckel, M. Letzelter, R. P. Martin, I. A. Krasheninnikov and N. Entelis (2008). "Two distinct structural elements of 5S rRNA are needed for its import into human mitochondria." *RNA* **14**(4): 749-759.
- Smits, P., J. Smeitink and L. van den Heuvel (2010). "Mitochondrial translation and beyond: processes implicated in combined oxidative phosphorylation deficiencies." *J Biomed Biotechnol* **2010**: 737385.
- Soleimanpour-Lichaei, H. R., I. Kuhl, M. Gaisne, J. F. Passos, M. Wydro, J. Rorbach, R. Temperley, N. Bonnefoy, W. Tate, R. Lightowlers and Z. Chrzanowska-

- Lightowers (2007). "mtRF1a is a human mitochondrial translation release factor decoding the major termination codons UAA and UAG." *Mol Cell* **27**(5): 745-757.
- Song, Z., H. Chen, M. Fiket, C. Alexander and D. C. Chan (2007). "OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L." *J Cell Biol* **178**(5): 749-755.
- Srivastava, S. and C. T. Moraes (2001). "Manipulating mitochondrial DNA heteroplasmy by a mitochondrially targeted restriction endonuclease." *Hum Mol Genet* **10**(26): 3093-3099.
- Staden, R., K. F. Beal and J. K. Bonfield (2000). "The Staden package, 1998." *Methods Mol Biol* **132**: 115-130.
- Stan, T., J. Brix, J. Schneider-Mergener, N. Pfanner, W. Neupert and D. Rapaport (2003). "Mitochondrial protein import: recognition of internal import signals of BCS1 by the TOM complex." *Mol Cell Biol* **23**(7): 2239-2250.
- Stiburek, L., D. Fornuskova, L. Wenchich, M. Pejznochova, H. Hansikova and J. Zeman (2007). "Knockdown of human Oxa11 impairs the biogenesis of F1Fo-ATP synthase and NADH:ubiquinone oxidoreductase." *J Mol Biol* **374**(2): 506-516.
- Stock, D., A. G. Leslie and J. E. Walker (1999). "Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase." *Science* **286**(5445): 1700-1705.
- Stoeckenius, W., R. H. Lozier and R. A. Bogomolni (1979). "Bacteriorhodopsin and the purple membrane of halobacteria." *Biochim Biophys Acta* **505**(3-4): 215-278.
- Stojanovski, D., B. Guiard, V. Kozjak-Pavlovic, N. Pfanner and C. Meisinger (2007). "Alternative function for the mitochondrial SAM complex in biogenesis of alpha-helical TOM proteins." *J Cell Biol* **179**(5): 881-893.
- Strecker, V., Z. Wumaier, I. Wittig and H. Schagger (2010). "Large pore gels to separate mega protein complexes larger than 10 MDa by blue native electrophoresis: isolation of putative respiratory strings or patches." *Proteomics* **10**(18): 3379-3387.
- Strogolova, V., A. Furness, M. Robb-McGrath, J. Garlich and R. A. Stuart (2012). "Rcf1 and Rcf2, members of the hypoxia induced gene 1 protein family, are critical components of the mitochondrial cytochrome bc1-cytochrome c oxidase supercomplex." *Mol Cell Biol*.
- Sun, F., X. Huo, Y. Zhai, A. Wang, J. Xu, D. Su, M. Bartlam and Z. Rao (2005). "Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II." *Cell* **121**(7): 1043-1057.
- Tachibana, M., M. Sparman, H. Sritanaudomchai, H. Ma, L. Clepper, J. Woodward, Y. Li, C. Ramsey, O. Kolotushkina and S. Mitalipov (2009). "Mitochondrial gene replacement in primate offspring and embryonic stem cells." *Nature* **461**(7262): 367-372.
- Tamura, Y., Y. Harada, T. Shiota, K. Yamano, K. Watanabe, M. Yokota, H. Yamamoto, H. Sesaki and T. Endo (2009). "Tim23-Tim50 pair coordinates functions of translocators and motor proteins in mitochondrial protein import." *J Cell Biol* **184**(1): 129-141.

- Tatsuta, T. and T. Langer (2008). "Quality control of mitochondria: protection against neurodegeneration and ageing." *EMBO J* **27**(2): 306-314.
- Tiranti, V., P. Corona, M. Greco, J. W. Taanman, F. Carrara, E. Lamantea, L. Nijtmans, G. Uziel and M. Zeviani (2000). "A novel frameshift mutation of the mtDNA COIII gene leads to impaired assembly of cytochrome c oxidase in a patient affected by Leigh-like syndrome." *Hum Mol Genet* **9**(18): 2733-2742.
- Tomecki, R., A. Dmochowska, K. Gewartowski, A. Dziembowski and P. P. Stepień (2004). "Identification of a novel human nuclear-encoded mitochondrial poly(A) polymerase." *Nucleic Acids Res* **32**(20): 6001-6014.
- Trinei, M., I. Berniakovich, E. Beltrami, E. Migliaccio, A. Fassina, P. Pelicci and M. Giorgio (2009). "P66Shc signals to age." *Aging (Albany NY)* **1**(6): 503-510.
- Trouillard, M., B. Meunier and F. Rappaport (2011). "Questioning the functional relevance of mitochondrial supercomplexes by time-resolved analysis of the respiratory chain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(45): E1027-1034.
- Tsuboi, M., H. Morita, Y. Nozaki, K. Akama, T. Ueda, K. Ito, K. H. Nierhaus and N. Takeuchi (2009). "EF-G2mt is an exclusive recycling factor in mammalian mitochondrial protein synthesis." *Mol Cell* **35**(4): 502-510.
- Valnot, I., J. Kassis, D. Chretien, P. de Lonlay, B. Parfait, A. Munnich, J. Kachaner, P. Rustin and A. Rotig (1999). "A mitochondrial cytochrome b mutation but no mutations of nuclearly encoded subunits in ubiquinol cytochrome c reductase (complex III) deficiency." *Hum Genet* **104**(6): 460-466.
- Valnot, I., J. C. von Kleist-Retzow, A. Barrientos, M. Gorbatyuk, J. W. Taanman, B. Mehaye, P. Rustin, A. Tzagoloff, A. Munnich and A. Rotig (2000). "A mutation in the human heme A:farnesyltransferase gene (COX10) causes cytochrome c oxidase deficiency." *Hum Mol Genet* **9**(8): 1245-1249.
- van der Giezen, M. and J. Tovar (2005). "Degenerate mitochondria." *EMBO Rep* **6**(6): 525-530.
- van der Giezen, M., J. Tovar and C. G. Clark (2005). "Mitochondrion-derived organelles in protists and fungi." *Int Rev Cytol* **244**: 175-225.
- van der Laan, M., D. P. Hutu and P. Rehling (2010). "On the mechanism of preprotein import by the mitochondrial presequence translocase." *Biochim Biophys Acta* **1803**(6): 732-739.
- Vempati, U. D., X. Han and C. T. Moraes (2009). "Lack of cytochrome c in mouse fibroblasts disrupts assembly/stability of respiratory complexes I and IV." *J Biol Chem* **284**(7): 4383-4391.
- Venter, J. C., K. Remington, J. F. Heidelberg, A. L. Halpern, D. Rusch, J. A. Eisen, D. Wu, I. Paulsen, K. E. Nelson, W. Nelson, D. E. Fouts, S. Levy, A. H. Knap, M. W. Lomas, K. Nealson, O. White, J. Peterson, J. Hoffman, R. Parsons, H. Baden-Tillson, C. Pfannkoch, Y. H. Rogers and H. O. Smith (2004). "Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea." *Science* **304**(5667): 66-74.
- Virbasius, J. V. and R. C. Scarpulla (1994). "Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(4): 1309-1313.

- Virbasius, J. V., C. A. Virbasius and R. C. Scarpulla (1993). "Identity of GABP with NRF-2, a multisubunit activator of cytochrome oxidase expression, reveals a cellular role for an ETS domain activator of viral promoters." Genes Dev **7**(3): 380-392.
- Visapaa, I., V. Fellman, J. Vesa, A. Dasvarma, J. L. Hutton, V. Kumar, G. S. Payne, M. Makarow, R. Van Coster, R. W. Taylor, D. M. Turnbull, A. Suomalainen and L. Peltonen (2002). "GRACILE syndrome, a lethal metabolic disorder with iron overload, is caused by a point mutation in BCS1L." Am J Hum Genet **71**(4): 863-876.
- Viscomi, C., E. Bottani, G. Civiletto, R. Cerutti, M. Moggio, G. Fagiolari, E. A. Schon, C. Lamperti and M. Zeviani (2011). "In vivo correction of COX deficiency by activation of the AMPK/PGC-1alpha axis." Cell Metab **14**(1): 80-90.
- Vogel, F., C. Bornhovd, W. Neupert and A. S. Reichert (2006). "Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane." J Cell Biol **175**(2): 237-247.
- Vogel, R. O., J. A. Smeitink and L. G. Nijtmans (2007). "Human mitochondrial complex I assembly: a dynamic and versatile process." Biochim Biophys Acta **1767**(10): 1215-1227.
- von Heijne, G. (1986). "Why mitochondria need a genome." FEBS Lett **198**(1): 1-4.
- Vukotic, O., Wiese, Vögtle, Meisinger, Meyer, zieseniss, Katschinski, Jans, Jakobs, Warscheid, Rehling, Deckers (2012). "Rcf1 Mediates Cytochrome Oxidase Assembly and Respirasome Formation, revealing heterogeneity of the enzyme Complex." Cell Metabolism.
- Wagner, K., N. Gebert, B. Guiard, K. Brandner, K. N. Truscott, N. Wiedemann, N. Pfanner and P. Rehling (2008). "The assembly pathway of the mitochondrial carrier translocase involves four preprotein translocases." Mol Cell Biol **28**(13): 4251-4260.
- Walker, J. E. and M. J. Runswick (1993). "The mitochondrial transport protein superfamily." J Bioenerg Biomembr **25**(5): 435-446.
- Walker, M., R. W. Taylor and D. M. Turnbull (2005). "Mitochondrial diabetes." Diabet Med **22 Suppl 4**: 18-20.
- Wang, C. and R. J. Youle (2009). "The role of mitochondria in apoptosis*." Annu Rev Genet **43**: 95-118.
- Wang, W. W., O. A. Sineshchekov, E. N. Spudich and J. L. Spudich (2003). "Spectroscopic and photochemical characterization of a deep ocean proteorhodopsin." J Biol Chem **278**(36): 33985-33991.
- Wang, Z., J. Cotney and G. S. Shadel (2007). "Human mitochondrial ribosomal protein MRPL12 interacts directly with mitochondrial RNA polymerase to modulate mitochondrial gene expression." J Biol Chem **282**(17): 12610-12618.
- Weitzel, J. M., K. A. Iwen and H. J. Seitz (2003). "Regulation of mitochondrial biogenesis by thyroid hormone." Exp Physiol **88**(1): 121-128.
- Wenz, T., F. Diaz, B. M. Spiegelman and C. T. Moraes (2008). "Activation of the PPAR/PGC-1alpha pathway prevents a bioenergetic deficit and effectively improves a mitochondrial myopathy phenotype." Cell Metab **8**(3): 249-256.

- West, A. P., G. S. Shadel and S. Ghosh (2011). "Mitochondria in innate immune responses." Nat Rev Immunol **11**(6): 389-402.
- Wibrand, F., K. Ravn, M. Schwartz, T. Rosenberg, N. Horn and J. Vissing (2001). "Multisystem disorder associated with a missense mutation in the mitochondrial cytochrome b gene." Ann Neurol **50**(4): 540-543.
- Wiedemann, N., V. Kozjak, A. Chacinska, B. Schonfisch, S. Rospert, M. T. Ryan, N. Pfanner and C. Meisinger (2003). "Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane." Nature **424**(6948): 565-571.
- Wiedemann, N., N. Pfanner and M. T. Ryan (2001). "The three modules of ADP/ATP carrier cooperate in receptor recruitment and translocation into mitochondria." EMBO J **20**(5): 951-960.
- Wittig, I., H. P. Braun and H. Schagger (2006). "Blue native PAGE." Nat Protoc **1**(1): 418-428.
- Wrutniak-Cabello, C., F. Casas and G. Cabello (2001). "Thyroid hormone action in mitochondria." J Mol Endocrinol **26**(1): 67-77.
- Wurm, C. A. and S. Jakobs (2006). "Differential protein distributions define two sub-compartments of the mitochondrial inner membrane in yeast." FEBS Lett **580**(24): 5628-5634.
- Xia, D., L. Esser, L. Yu and C. A. Yu (2007). "Structural basis for the mechanism of electron bifurcation at the quinol oxidation site of the cytochrome bc1 complex." Photosynth Res **92**(1): 17-34.
- Xin, H., V. Worriax, W. Burkhart and L. L. Spremulli (1995). "Cloning and expression of mitochondrial translational elongation factor Ts from bovine and human liver." J Biol Chem **270**(29): 17243-17249.
- Xu, F., C. Morin, G. Mitchell, C. Ackerley and B. H. Robinson (2004). "The role of the LRPPRC (leucine-rich pentatricopeptide repeat cassette) gene in cytochrome oxidase assembly: mutation causes lowered levels of COX (cytochrome c oxidase) I and COX III mRNA." Biochem J **382**(Pt 1): 331-336.
- Yamamura, T., H. Otani, Y. Nakao, R. Hattori, M. Osako, H. Imamura and D. K. Das (2001). "Dual involvement of coenzyme Q10 in redox signaling and inhibition of death signaling in the rat heart mitochondria." Antioxid Redox Signal **3**(1): 103-112.
- Yoshionari, S., T. Koike, T. Yokogawa, K. Nishikawa, T. Ueda, K. Miura and K. Watanabe (1994). "Existence of nuclear-encoded 5S-rRNA in bovine mitochondria." FEBS Lett **338**(2): 137-142.
- Zhang, M., E. Mileykovskaya and W. Dowhan (2005). "Cardiolipin is essential for organization of complexes III and IV into a supercomplex in intact yeast mitochondria." J Biol Chem **280**(33): 29403-29408.
- Zhang, Y. and L. L. Spremulli (1998). "Identification and cloning of human mitochondrial translational release factor 1 and the ribosome recycling factor." Biochim Biophys Acta **1443**(1-2): 245-250.
- Zhao, S., C. Cunha, F. Zhang, Q. Liu, B. Gloss, K. Deisseroth, G. J. Augustine and G. Feng (2008). "Improved expression of halorhodopsin for light-induced silencing of neuronal activity." Brain Cell Biol **36**(1-4): 141-154.

- Zhao, S., J. T. Ting, H. E. Atallah, L. Qiu, J. Tan, B. Gloss, G. J. Augustine, K. Deisseroth, M. Luo, A. M. Graybiel and G. Feng (2011). "Cell type-specific channelrhodopsin-2 transgenic mice for optogenetic dissection of neural circuitry function." Nat Methods **8**(9): 745-752.
- Zick, M., R. Rabl and A. S. Reichert (2009). "Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria." Biochim Biophys Acta **1793**(1): 5-19.

