



Centro
Andaluz
de Biología
del Desarrollo



**UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA,
ANATOMÍA Y BIOLOGÍA CELULAR
AREA DE BIOLOGÍA CELULAR**

**LA FOSFATASA MITOCONDRIAL PPTC7,
PUNTO DE ENCUENTRO DE LA REGULACIÓN DEL
METABOLISMO BIOENERGÉTICO Y LA AUTOFAGIA**

Isabel González Mariscal

Sevilla, 2011



Centro
Andaluz
de Biología
del Desarrollo



**UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA,
ANATOMÍA Y BIOLOGÍA CELULAR
AREA DE BIOLOGÍA CELULAR**

**LA FOSFATASA MITOCONDRIAL PPTC7,
PUNTO DE ENCUENTRO DE LA REGULACIÓN DEL
METABOLISMO BIOENERGÉTICO Y LA AUTOFAGIA**

Memoria de tesis presentada por **Isabel González Mariscal**,
Licenciado en Ciencias Ambientales para optar al grado de
DOCTOR.

El Director

CARLOS SANTOS OCAÑA
Profesor Titular Biología Celular

Sevilla, a 20 de Junio de 2011



Centro
Andaluz
de Biología
del Desarrollo



D. CARLOS SANTOS OCAÑA, DOCTOR EN CIENCIAS POR LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA Y PROFESOR TITULAR DE BIOLOGÍA CELULAR DEL ÁREA DE BIOLOGÍA CELULAR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, ANATOMÍA, Y BIOLOGÍA CELULAR DE LA UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE

INFORMA

Que **Doña Isabel González Mariscal**, Licenciada en Ciencias Ambientales, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “**La fosfatasa mitocondrial PPTC7, punto de encuentro de la regulación del metabolismo bioenergético y la autofagia**”, y que a su juicio reúne los méritos suficientes para optar al grado de Doctor en Ciencias.

Y para que conste, firmo el presente en Sevilla, a 20 de Junio de dos mil once.



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Área de Biología Celular del Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular de la Universidad Pablo de Olavide bajo la dirección del Dr. Carlos Santos Ocaña. El trabajo ha sido financiado por la Universidad Pablo de Olavide mediante la convocatoria del Plan Propio de Investigación.

CENTRO ANDALUZ DE BIOLOGÍA DEL DESARROLLO

INTRODUCCIÓN

El coenzima Q (ubiquinona o CoQ) es un lípido esencial presente en todos los organismos el cual juega un importante papel en el transporte de electrones y protones en el metabolismo bioenergético. La importancia de esta biomolécula radica en su capacidad rédox. Su forma oxidada recibe los electrones del complejo I o del complejo II de la cadena respiratoria de la mitocondria en eucariotas o de la membrana plasmática en procariontes, y su forma reducida (ubiquinol o CoQH₂) los transfiere al complejo III (Olson and Rudney 1983; Halliwell and Gutteridge 1989).

El CoQ no sólo actúa en la respiración mitocondrial (Trumpower 1990) sino también funciona como aceptor de electrones en numerosas reacciones de oxidación metabólicas, como es la síntesis de uridina (Nagy, Lacroute et al. 1992), la beta oxidación de ácidos grasos (Frerman 1988), la oxidación de sulfuro a tiosulfato (Hildebrandt and Grieshaber 2008) y como cofactor de las proteínas desacoplantes de la bomba de protones mitocondrial (Echtay, Winkler et al. 2000).

El ubiquinol es un antioxidante liposoluble con un importante papel en diversas membranas (Ernster and Dallner 1995; Navarro, Navas et al. 1998), e interviene en sistemas rédox asociados a endomembranas, (Crane and Navas 1997) y membrana plasmática (Sun, Sun et al. 1992; Villalba, Navarro et al. 1995; Santos-Ocaña, Villalba et al. 1998). El CoQH₂ puede actuar directamente como sumidero de electrones, o de manera indirecta como en el caso de la reducción del radical tocoferilo para regenerar la vitamina E.

La estructura del CoQ se basa en un anillo bencénico soluble hidroxilado con un sustituyente isoprenoide en posición 3 que le confiere el carácter hidrofóbico. La cadena de isoprenos mantiene al coenzima Q anclado a las biomembranas, y su longitud es proporcional a la hidrofobicidad de la molécula. La longitud de la cola, determinada por el número de isoprenos, varía en función de la especie. De este modo, *Escherichia coli* produce una molécula con 8 isoprenos (CoQ₈), *Saccharomyces cerevisiae* tan sólo 6 (CoQ₆), *Caenorhabditis elegans* CoQ₉, y *Schizosaccharomyces pombe* y *Homo sapiens* poseen la mayor longitud, CoQ₁₀. Algunos organismos sintetizan variedades de coenzima Q conjuntas, como es el caso de roedores (CoQ₉ y CoQ₁₀). La adición de coenzima Q exógeno con diferentes longitudes de la cola poliisoprenoide puede aumentar la respiración, pero

también puede inducir estrés oxidativo en la mitocondria y afectar a la longevidad al comportarse como un agente pro-oxidante.

La adición de coenzima Q exógeno puede aumentar o permitir la respiración (Santos-Ocana, Do et al. 2002) ya que se distribuye por todas las endomembranas celulares (Fernandez-Ayala, Brea-Calvo et al. 2005) mediante un proceso basado en la ruta endocítica (Padilla-Lopez, Jimenez-Hidalgo et al. 2009). Sin embargo, también puede inducir estrés oxidativo en la mitocondria cuando se utiliza una isoforma no natural para el organismo utilizado como por ejemplo CoQ₆ a células humanas (Fernandez-Ayala, Lopez-Lluch et al. 2005) y repercute tanto en la capacidad reproductiva (Jonassen, Davis et al. 2003) como en la longevidad de los nematodos alimentados con bacterias que producen diversas isoformas de coenzima Q (Ishii, Senoo-Matsuda et al. 2004; Yang, Gangoiti et al. 2009).

1. Funciones del coenzima Q

El coenzima Q se caracterizó a finales de los 50 como componente de la cadena respiratoria mitocondrial (Crane, Hatefi et al. 1957) y no es hasta los 90 cuando se establece el CoQ como antioxidante.

A pesar de que una de sus principales funciones está asociada a su localización en la membrana interna mitocondrial, el coenzima Q se encuentra distribuido de forma desigual en otras membranas celulares. Estudios de fraccionamiento subcelular en hepatocitos de rata mostraron que tanto las membranas de Golgi como la lisosomal poseen iguales o mayores cantidades de CoQ que las membranas mitocondriales, seguida por la membrana plasmática, y en última instancia el retículo endoplásmico (Kalen, Norling et al. 1987; Takahashi, Okamoto et al. 1993; Santos-Ocaña, Córdoba et al. 1998).

1.1. El coenzima Q es necesario para la obtención de energía.

La estructura del CoQ permite su difusión a través de la bicapa lipídica manteniendo la cabeza polar accesible en la interfase membrana-fase acuosa (Braun 1987). Dentro de la cadena respiratoria mitocondrial, el CoQ actúa como transportador móvil de electrones, recibiendo los electrones de la NADH-CoQ reductasa (complejo I) y de la succinato-CoQ reductasa (complejo II), provenientes de la oxidación de NADH y succinato respectivamente, y donándolos al complejo III

(CoQ-citocromo *c* reductasa). El complejo III transfiere los electrones al citocromo *c* que, al igual que el coenzima Q, es un elemento móvil de la cadena. El complejo IV (citocromo *c* oxidasa) transfiere los electrones del citocromo *c* al O₂. Durante este proceso se transfieren protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembrana, generando un gradiente de protones necesario para la síntesis de ATP.

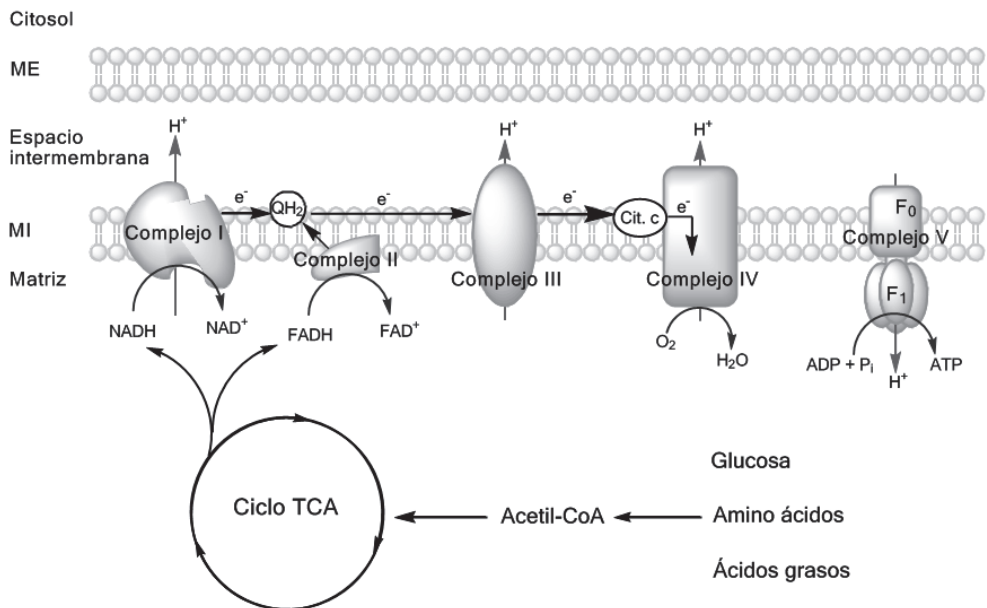


Figura 1. Cadena transportadora de electrones mitocondrial. La síntesis mitocondrial de ATP está acoplada a la oxidación en el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA). El acetyl Co-A derivado de la glucosa, amino ácidos y ácidos grasos, se oxida en el ciclo TCA para producir poder reductor en forma de NADH y FADH₂. El NADH es oxidado en el complejo I, mientras que el complejo II oxida succinato para reducir FADH a FADH₂. Los electrones viajan del complejo I y II hasta un mismo transportador móvil, el coenzima Q, el cual transfiere los electrones al complejo III. Un segundo transportador de electrones móvil, el citocromo *c*, transfiere los electrones al complejo IV. Durante el tránsito de electrones a lo largo de la cadena se produce un transporte de electrones a través de la membrana interna mitocondrial, desde la matriz al espacio intermembrana. El gradiente de protones resultante es utilizado por el complejo V, la ATP sintasa, para realizar la fosforilación de ADP a ATP.

La membrana interna mitocondrial es impermeable a los protones. Los protones se movilizan de la matriz al espacio intermembrana con la energía generada del transporte de electrones en los complejos I, III y IV, y tan sólo pueden volver a la matriz a través de un canal específico de protones (subunidad F₀ de la ATP sintetasa). La fuerza motriz generada por la entrada de protones es utilizada por la

subunidad F_1 de la ATP sintetasa para sintetizar ATP a partir de ADP. Al proceso completo de oxidaciones-reducciones y fosforilación final de adenosín difosfato se conoce como fosforilación oxidativa. Además de la función del coenzima Q en el transporte de electrones dentro de la cadena respiratoria, también se le ha asociado una función estructural en el complejo III. La CoQ-citocromo *c* reductasa posee dos sitios de unión a coenzima Q, Q_0 y Q_i , con el fin de estabilizar el radical semiquinona producido en el tránsito de los dos electrones del CoQ al citocromo *c*, capaz tan sólo de aceptar uno. Se ha descrito la presencia de dos moléculas de CoQ en el sitio Q_0 y de una molécula en el sitio Q_i (Bartoschek, Johansson et al. 2001). Estudios de nuestro grupo han mostrado la inestabilidad del complejo III en levaduras incapaces de sintetizar CoQ_6 (Santos-Ocana, Do et al. 2002). La existencia de los tres sitios de anclaje a CoQ junto a la necesidad de la presencia de esta molécula para la estabilización de las proteínas que componen el complejo III sugieren una función estructural esencial del coenzima Q en la fosforilación oxidativa.

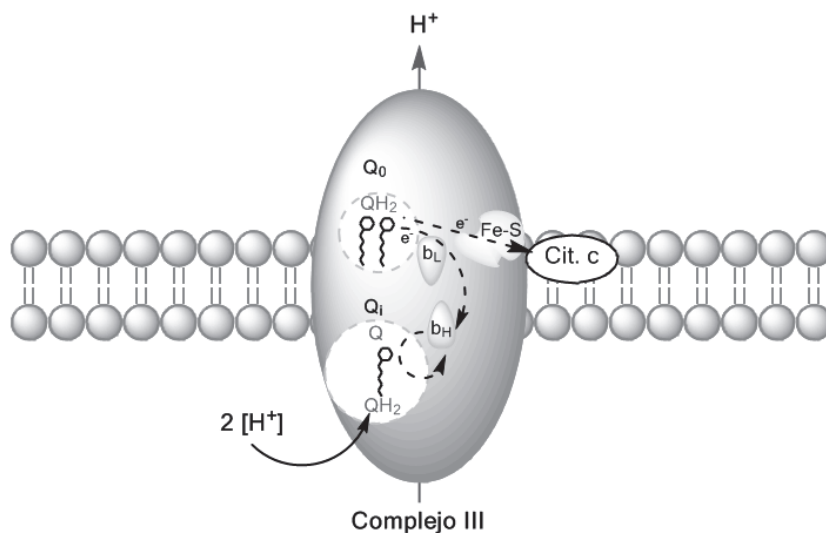


Figura 2. Complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial.

El coenzima Q también realiza la función de transporte de electrones y protones mediante ciclos de reducción y oxidación en otros sistemas aparte de en la cadena transportadora de electrones. En la membrana plasmática, el CoQ está involucrado en la activación del intercambio de Na^+/H^+ a través de la membrana, vía

cotransportador antiporte de Na^+/H^+ . La energía requerida para este proceso proviene de un gradiente de sodio, el cual es intercambiado por protones hacia el exterior de la célula. El sodio es expulsado al exterior de nuevo a través de la Na^+/K^+ ATPasa, utilizando ATP como fuente de energía, manteniendo así el potencial negativo de membrana, necesario para diversas funciones celulares y para el transporte. El CoQ está involucrado en el sistema de transporte de membrana plasmática, mediante el cual el NADH citoplasmático transfiere electrones a través del coenzima Q a aceptores tales como hierro u oxígeno fuera de la célula. Cuando este sistema se activa, la liberación de protones por el cotransportador antiporte H^+/Na^+ se incrementa. El mecanismo mediante el cual el transporte de electrones dependiente de CoQ activa el cotransportador antiporte no se conoce actualmente (Crane, Sun et al. 1991).

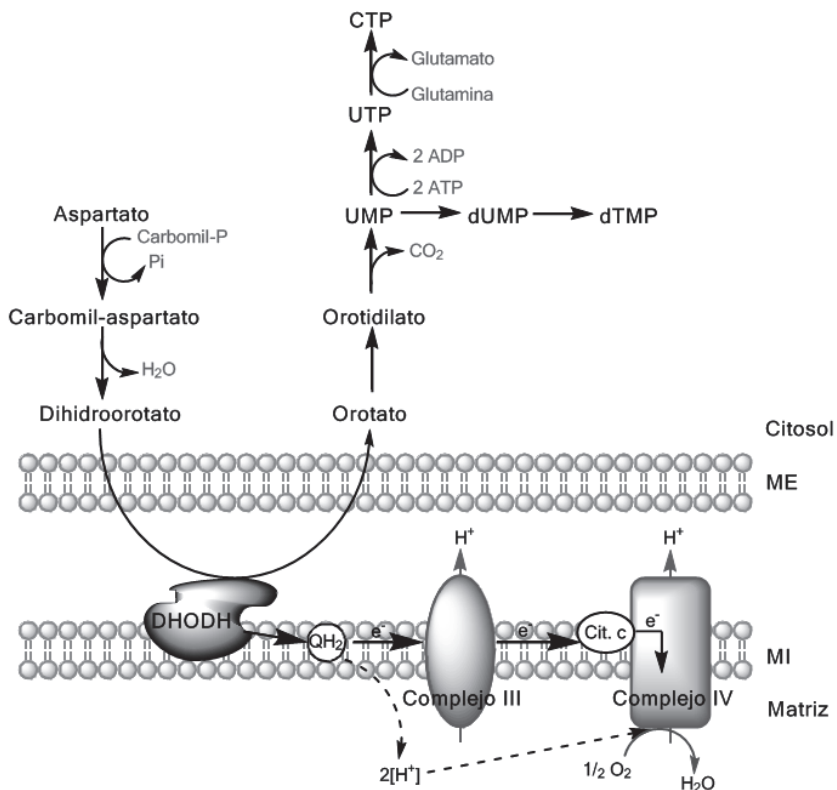


Figura 3. Síntesis de pirimidinas por la ruta del orotato.

En la mitocondria el coenzima Q se encuentra implicado en la síntesis de novo de pirimidinas por la vía del orotato (Jones 1980; Nagy, Lacroute et al. 1992). El dihidroorotato, es oxidado por la dihidroorotato deshidrogenasa de la membrana interna de la mitocondria, dando lugar a orotato, el cual es sustrato de la reacción llevada a cabo por la OMP sintasa y UMP sintasa para producir uracil monofosfato (UMP).

En el 2000, se describió la existencia de una NADH reductasa dependiente de CoQ en el lisosoma. Mediante ciclos de oxidación y reducción, el coenzima Q transfiere protones a través de la membrana del lisosoma, acidificando el lumen. En este caso no existe una síntesis acoplada de ATP debido a la ausencia de ATP sintetasa en el lisosoma. La acidificación del interior del orgánulo activa enzimas hidrolíticas para la digestión de restos celulares (Gille and Nohl 2000). Las enzimas involucradas en este sistema y los posibles sitios de unión del CoQ a la membrana lisosomal no están bien definidos. El complejo enzimático de la membrana requiere la reducción de coenzima Q por NADH citosólico y la oxidación del ubiquinol generado por oxígeno.

1.2. El coenzima Q, el único antioxidante liposoluble sintetizado por la célula

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son moléculas formadas por oxígeno que resultan químicamente reactivas. Éstas pueden ser especies radicales (con electrones libres o desapareados) como los iones de oxígeno y radicales libres, o especies no radicales como los peróxidos, tanto orgánicos como inorgánicos. Los ROS explican entre el 1-2% del oxígeno consumido por la mitocondria, y este orgánulo es considerado como el mayor productor de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en la célula a causa de pérdidas de electrones en la fosforilación oxidativa (Papa and Skulachev 1997; Temple, Perrone et al. 2005). La producción de ROS mitocondrial dependerá del estado de respiración, siendo mayor cuando el potencial mitocondrial es elevado y los niveles de ADP bajos (estado 4), al contrario que sucede en el estado 3.

Los radicales libres generados en la célula pueden dañar diversas estructuras celulares (estrés oxidativo) mediante peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas o de ADN. Los antioxidantes son agentes enzimáticos (superóxido dismutasa, peroxidasas, catalasa, tioredoxin reductasa y peroxirredoxina) o no

enzimáticos (vitamina C y E, carotenoides, glutatión, ácido α -lipóico, flavonoides y ubiquinol) que reducen el estrés oxidativo bien previniendo la formación de ROS, o bien eliminándolos.

No es hasta los 60 cuando se le asocia al CoQH₂ propiedades antioxidantes (Mellors and Tappel 1966, Frei, 1990 #1033), y su función como tal ha sido estudiada principalmente en las últimas dos décadas. En la actualidad se conoce que el coenzima Q no es tan sólo un transportador de electrones en los diferentes sistemas transportadores de electrones, sino también el único antioxidante celular lipídico de carácter endógeno. Existen estudios que evidencian un incremento de los niveles de CoQ ante situaciones de estrés (Navarro, Arroyo et al. 1999; Brea-Calvo, Rodriguez-Hernandez et al. 2006), y la suplementación con coenzima Q protege daños en el ADN por oxidación, así como de la apoptosis inducida por retirada de suero (Barroso, Gomez-Diaz et al. 1997; Fernandez-Ayala, Martin et al. 2000; Tomasetti, Alleva et al. 2001; Navas, Fernandez-Ayala et al. 2002).

El CoQ se encuentra localizado en las membranas, próximo a cadenas lipídicas insaturadas para actuar como sumidero (*scavenger*) de radicales libres. Debido a que la mayor parte del coenzima Q se encuentra en forma de ubiquinol (Takahashi, Okamoto et al. 1993) y a la existencia de enzimas en todas las membranas capaces de reducir el radical semiquinona generado por reacción con lípidos o radicales de oxígeno, hace del coenzima Q un antioxidante muy efectivo (Quinn, Fabisiak et al. 1999). Dichas enzimas son: NADH citocromo b_5 reductasa (NADH-AFR reductasa) (Villalba and Navas 2000), NAD(P)H oxidorreductasa (DT diaforasa) (Villalba and Navas 2000) y NADPH-coenzima Q reductasa (Takahashi, Okamoto et al. 1996). Recientemente se han descritos otras enzimas capaces de reducir la ubiquinona, como la lipoamida deshidrogenada, tiorredoxina reductasa y la glutatión reductasa (Olsson, Xia et al. 1999; Xia, Bjornstedt et al. 2001; Xia, Nordman et al. 2003) y un tipo de NADH citocromo b_5 reductasa de la membrana plasmática de levadura, Nqr1p (Jimenez-Hidalgo, Santos-Ocana et al. 2009).

El coenzima Q realiza una función antioxidante mediante ciclos de reducción y oxidación en la membrana plasmática (Takahashi, Okamoto et al. 1996). Este intercambio de electrones permite reducir oxidantes externos solubles utilizando NAD(P)H como donador de electrones (Crane, Sun et al. 1985; Sun, Sun et al.

1992) jugando un papel relevante en el sistema de transporte de electrones asociado a membrana plasmática.

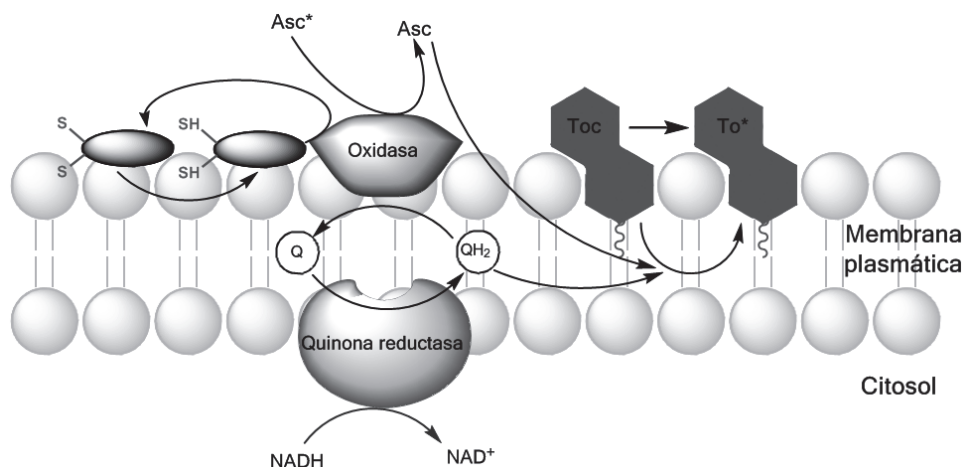


Figura 4. Transporte de electrones dependiente de coenzima Q en el sistema redox de la membrana plasmática. En la cara citosólica de la membrana plasmática, una quinona reductasa reduce el CoQ (Q) a ubiquinol (QH₂). El QH₂ transfiere los electrones a una oxidasa situada en la cara externa de la membrana plasmática, la cual es capaz de reducir los radicales libres de ascorbato extracelulares (Asc*) para mantener los niveles de ascorbato (Asc) y reducir puentes disulfuros. El ascorbato, junto al ubiquinol puede reciclar a la vitamina E para mantener reducida y bloquear la peroxidación lipídica.

Una de las funciones del sistema redox de la membrana plasmática están relacionadas con la reducción de oxidantes externos impermeables a la membrana, como es el caso del ascorbato (Gómez-Díaz, Rodríguez-Aguilera et al. 1997; Santos-Ocaña, Córdoba et al. 1998; Arroyo, Rodríguez-Aguilera et al. 2004) y el α -tocoferol (Kagan, Arroyo et al. 1998). El CoQ es capaz de realizar una reacción tipo trans, tomando los electrones del NADH y cediéndolos a radicales libres de ascorbato, y su ausencia reduce notablemente la actividad NADH oxidasa del sistema de transporte de membrana plasmática (Villalba, Navarro et al. 1995; Santos-Ocana, Villalba et al. 1998).

De este modo, el ubiquinol protege las membranas celulares directamente previniendo el inicio y la propagación de la peroxidación lipídica, evitando la formación de radicales lipoperoxilo (Ernster and Dallner 1995), o indirectamente regenerando la vitamina E (α -tocoferol) a partir del radical α -tocoferoxilo y la vitamina C (ascorbato) a partir del radical ascorbilo (Frei, Kim et al. 1990; Frei 1999; Arroyo, Navarro et al. 2000).

Como producto de este proceso, se producen moléculas de ubiquinona y semiquinona, las cuales son regeneradas mediante reacciones de reducción mono o dielectrónicas. Para ello, la NADH citocromo *b*₅ reductasa es capaz de reducir radicales semiquinonas en reacciones de reducción de un electrón utilizando NADH como donador. NQO1 (DT diaforasa) reduce en un solo paso la ubiquinona a CoQH₂ en reacciones que conllevan dos electrones (Navas, Villalba et al. 2007), evitando la formación intermediaria del radical semiquinona.

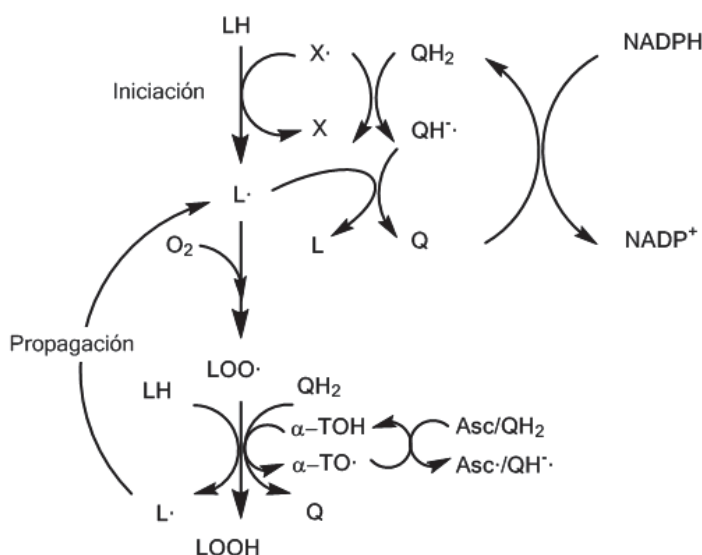


Figura 5. Sitios de acción del coenzima Q, vitamina E y ascorbato en la peroxidación lipídica. Abreviaturas; LH, ácidos grasos poliinsaturados; OH, radical hidroxilo; Fe³⁺O₂⁻, radical preferrilo; CoQH₂, coenzima Q reducido, ubiquinol; CoQH·, radical semiquinona; L, radical de ácido graso; LOO·, radical lipoperoxilo; VitE-OH, vitamina E, α-tocoferol; VitE-O, radical α-tocoferilo; Asc, ascorbato; Asc·, radical ascorbilo; LOOH, lipohidroperóxido.

Bajo condiciones de estrés oxidativo inducidos por deficiencia de selenio y α-tocoferol, los niveles de CoQ se incrementan, al igual que los niveles de NQO1 (Navarro, Arroyo et al. 1999). De manera similar, otros estudios evidencian el incremento de coenzima Q al inducir la proliferación del peroxisoma, lo cual induce una reducción de los niveles de vitamina E (Turunen, Peters et al. 2000). Levaduras deficientes en la síntesis de CoQ muestran una mayor peroxidación lipídica (Poon, Do et al. 1997). Por otro lado, la adición de CoQ *in vitro* en cultivos de linfocitos refuerza la resistencia del ADN a oxidación por peróxido de hidrógeno, mientras que la complementación con coenzima Q *in vivo*, además de proteger frente al

daño, incrementa la actividad enzimática de reparación de ADN (Tomasetti 1999; Tomasetti, Alleva et al. 2001).

Debido a que el ubiquinol protege a las membranas de la peroxidación lipídica, además de mantener reducidos antioxidantes externos como el α -tocoferol y el ascorbato, se puede considerar al CoQ un componente central y esencial del sistema antioxidante de la membrana plasmática.

La citocromo b_5 reductasa es capaz de reducir el coenzima Q en ausencia de citocromo b_5 . Su actividad representa una reacción parcial de NADH-AFR reductasa en la membrana plasmática, siendo capaz de regenerar, junto al CoQ, el ascorbato. De este modo, la citocromo b_5 reductasa mantiene los niveles reducidos de coenzima Q y de ascorbato en la célula, promoviendo las defensas antioxidantes.

La adición de coenzima Q exógeno a cultivos celulares previene tanto la peroxidación lipídica como la apoptosis inducida por retirada de suero, la cual es independiente de Bcl-2. Los antioxidantes del sistema redox de la membrana plasmática representan pues una primera defensa a estrés oxidativo, y Bcl-2 podría ser requerido para prevenir la apoptosis en caso de que esta primera barrera falle (Villalba, Navarro et al. 1997).

La apoptosis inducida por estrés está mediada por la activación de la esfingomielinasa neutral de membrana (N-SMasa), la cual libera ceramida al citosol, activando la caspasa-3. La retirada de suero induce un estrés suave que finalmente induce apoptosis, la cual puede ser prevenida por la expresión de enzimas antioxidantes intracelulares o antioxidantes no enzimáticos como el ascorbato, α -tocoferol y coenzima Q (Greenlund, Deckwerth et al. 1995; Kim, Lee et al. 2000; Villalba and Navas 2000). De hecho, el CoQ mantiene el crecimiento celular en condiciones limitantes de suero. Inhibidores del sistema redox de la membrana plasmática como la capsaicina, la cual compite con el coenzima Q, inhibe el crecimiento celular e induce apoptosis (Vaillant, Larm et al. 1996 ; Macho, Calzado et al. 1999). La adición de coenzima Q_{10} a cultivos celulares sin suero inhiben la N-SMasa, la caspasa-3 y reducen en un 80% la liberación de ceramida (Fernandez-Ayala, Martin et al. 2000 ; Navas, Fernandez-Ayala et al. 2002) inactivando finalmente el proceso de apoptosis. Esta respuesta es independiente

de Bcl-2, una proteína de la membrana externa de la mitocondria implicada en la inhibición de la apoptosis, aunque en células KO para Bcl-2 no se induce la síntesis de CoQ (Villalba and Navas 2000). En células ρ^0 , con mitocondrias defectivas, la membrana plasmática presenta mayores niveles de coenzima Q (Gómez-Díaz, Villalba et al. 1997). Estas células son más resistentes a crecimiento en medio sin suero, tienen menor peroxidación lipídica y acumulan niveles inferiores de ceramida (Barroso, Gomez-Diaz et al. 1997; Fernandez-Ayala, Martin et al. 2000).

Pero el coenzima Q puede actuar como prooxidante en ciertas condiciones y promover la apoptosis. Durante la respiración se produce el radical semiquinona, el cual puede reaccionar con oxígeno para formar superóxido, que es dismutado a peróxido de hidrógeno (Nohl 1998). Este hecho sucede preferentemente en liposomas con alto contenido en CoQ. En el resto de biomembranas, las enzimas capaces de reducir el radical semiquinona se encuentran en exceso en comparación al ciclo de oxido-reducción del CoQ. Diversos estudios han demostrado que son otros los componentes de la cadena respiratoria los principales productores de ROS, y no el coenzima Q.

1.3. El coenzima Q como agente regulador

1.3.1. El coenzima Q es cofactor de las proteínas desacoplantes

Las proteínas desacoplantes (UCPs) son proteínas transmembranas de la membrana interna de la mitocondria capaces de translocar protones hacia la matriz, desacoplando el gradiente generado por el transporte de electrones de la cadena de respiración mitocondrial de la fosforilación oxidativa (Klingenberg, Echtay et al. 1999).

De este modo se pierde síntesis de ATP en favor de producción de calor (Puigserver, Herron et al. 1992). También se han relacionado con la supresión de radicales de oxígeno. El coenzima Q es un cofactor de la función de las UCPs (Echtay, Winkler et al. 2000), siendo incapaces de translocar protones en ausencia de CoQ.

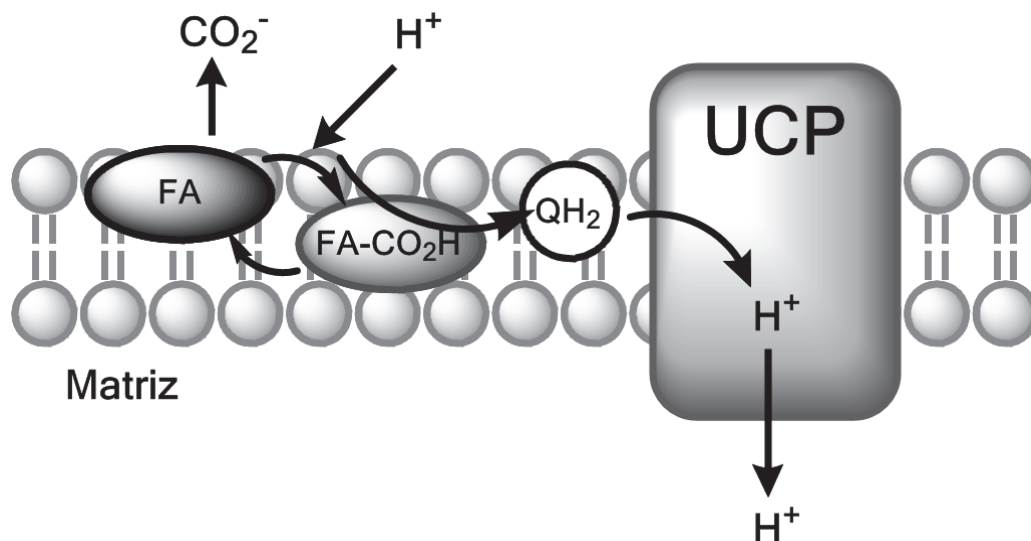


Figura 6. Proteína desacoplante de la membrana interna mitocondrial. Los ácidos grasos, en contacto con la fase acuosa, se unen a un protón, ganando hidrofobicidad, lo que permite su inserción en la bicapa lipídica. El coenzima Q es capaz de tomar el protón, el cual es canalizado por la UCP hacia la matriz.

1.3.2. El coenzima Q regula la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial

El coenzima Q también regula otro componente mitocondrial, el poro de transición de permeabilidad mitocondrial (MPTP). La membrana mitocondrial posee muy baja permeabilidad a iones y solutos, manteniendo así la energía generada por la cadena de transporte de electrones. El MPTP es un complejo de la membrana interna mitocondrial el cual es capaz de permeabilizar la membrana mediante su apertura ante elevadas concentraciones de Ca^{2+} . Se ha relacionado con procesos de apoptosis, produciendo una liberación de citocromo *c* y consecuente activación de la cascada de caspasas (Green and Kroemer 1998). Diversos estudios han mostrado una afección del MPTP por diferentes análogos del coenzima Q (Walter 2000), y el CoQ10 parece prevenir su apertura, contrarrestando los eventos apoptóticos como la depleción de ATP, liberación de citocromo *c* al citosol, activación de caspasa-9, depolarización del potencial de membrana mitocondrial y fragmentación del ADN (Papucci, Schiavone et al. 2003).

1.3.3. Implicación del coenzima Q en el control de la proliferación y diferenciación celular

Las funciones del sistema rédox de la membrana plasmática se han relacionado con el control del crecimiento celular y la diferenciación (Burón, Rodríguez-Aguilera et al. 1993). La función del CoQ en el transporte de electrones en este sistema (Sun, Sun et al. 1992; Villalba, Navarro et al. 1995) sugiere una posible relación de éste con el crecimiento. En la oxidación de NADH en la membrana plasmática se produce peróxido de hidrógeno (Ramasarma, Swaroop et al. 1981). El H₂O₂ activa factores de transcripción, como es el caso de NFκB, para la activación de la expresión génica (Kaltschmidt, Sparna et al. 1999). Sin embargo, el efecto de la adición de ferricianida como aceptor externo de electrones sobre la expresión de c-myc y c-fos en células C3H 10T1/2 (Cutry, Kinniburgh et al. 1988), dado que la ferricianida elimina el peróxido formado en la superficie celular, sugiere que el efecto en el crecimiento se debe a alteraciones del estado rédox citosólico por oxidación de NADH (Navas, Sun et al. 1988), en el cual se encuentra implicado el coenzima Q.

Agentes antiproliferativos como la adriamicina o el ácido retinóico inhiben el sistema rédox de la membrana plasmática (Crane, Sun et al. 1995), mientras que la adición al medio de oxidantes impermeables estimula el crecimiento en condiciones limitantes de suero (Crane, Sun et al. 1985; Alcaín, Burón et al. 1990; Crane, Sun et al. 1995).

Estudios en células HL-60 muestran que, tras la inducción de la diferenciación con TPA, la actividad rédox de la membrana plasmática se incrementa, modificando el ratio NAD⁺/NADH (Burón, Rodríguez-Aguilera et al. 1993). Trabajos similares en células K562 mostraron un aumento de la estabilización de ascorbato, incremento de la actividad NADH-AFR (radical libre de ascorbato) reductasa y los niveles de coenzima Q en membrana plasmática (Gómez-Díaz, Rodríguez-Aguilera et al. 1997).

La actividad de las reductasas del CoQ en la membrana plasmática se modula durante la diferenciación del eritrocito (Gómez-Díaz, Rodríguez-Aguilera et al. 1997). La activación del sistema de membrana por ascorbato en células mieloides

aumenta la diferenciación a monocitos inducida por vitamina D₃ (Lopez-Lluch, Buron et al. 1998).

Otro importante papel del sistema redox de membrana plasmática es una presunta regulación de deacetilasas dependientes de NAD⁺ por la actividad de NADH oxidorreductasas dependientes de CoQ, como es el caso de las sirtuinas (Smith, Brachmann et al. 2000). A estas enzimas se les ha atribuido un importante papel en el envejecimiento, y su activación por polifenoles como el resveratrol afecta al metabolismo celular y a la longevidad (Baur, Pearson et al. 2006; Lagouge, Arghmann et al. 2006).

2. Deficiencias de coenzima Q

La fuente principal de coenzima Q es la síntesis intracelular, aunque una pequeña cantidad es adquirida en la dieta. La complejidad de la biosíntesis del CoQ sugiere que defectos en diferentes enzimas o proteínas reguladoras de la biosíntesis pueden causar diversos síndromes clínicos.

El coenzima Q es esencial para la funcionalidad de la mitocondria, resultando inviables los mutantes nulos de alguno de los genes COQ en eucariotas superiores. En el caso de *S. cerevisiae*, dada su capacidad de realizar tanto un metabolismo respiratorio como fermentativo, los mutantes nulos son viables en medio con fuentes de carbono fermentables. Este hecho hace de la levadura un modelo de estudio no sólo de la ruta biosintética, sino también de diversas patologías mediante complementación funcional.

Una depleción de los niveles de coenzima Q genera una patología asociada a las diversas funciones del CoQ, pero especialmente debido a su implicación en la fosforilación oxidativa. De hecho, los órganos y tejidos más afectados en estas patologías son aquellos que poseen un mayor requerimiento energético, como son el sistema nervioso, el muscular y el riñón (Quinzii, Lopez et al. 2008).

Los niveles endógenos de CoQ pueden verse alterados ya sea por una deficiencia primaria causada por mutaciones en alguno de los genes implicados en su síntesis, como por una causa secundaria. Un ejemplo de deficiencia secundaria es aquella causada por inhibición de la HMG-CoA reductasa (Omura, Tomoda et al. 1987), implicada en la síntesis del precursor del anillo bencénico, el mevalonato. Tratamientos para la hipercolesterolemia y enfermedad coronaria y para la prevención de infarto como las estatinas inhiben directamente esta enzima, produciendo indirectamente una menor biosíntesis de CoQ (Deichmann, Lavie et al. 2010).

2.1. Deficiencias de coenzima Q₁₀ por un defecto en la biosíntesis endógena

La deficiencia primaria de coenzima Q₁₀ es una condición autosómica recesiva al que se le asocian al menos cinco principales fenotipos (Quinzii, DiMauro et al. 2007):

- a. Encefalomiopatía caracterizada por mioglobinuria recurrente, implicación cerebral y fibras rojo rasgadas.
- b. Enfermedad infantil multisistémica severa
- c. Ataxia cerebelosa
- d. Síndrome de Leigh con retraso en el crecimiento, ataxia y sordera
- e. Miopatía aislada

Las deficiencias de coenzima Q₁₀ son enfermedades clínica y genéticamente heterogéneas potencialmente tratables y por tanto necesitadas de un diagnóstico temprano. De forma general, la enfermedad asociada a una deficiencia de la biosíntesis de coenzima Q₁₀ se desarrolla en la infancia, apareciendo los síntomas a muy temprana edad.

En 1989 se identificaron los primeros pacientes con deficiencia de CoQ₁₀, dos hermanas con encefalomiopatía (Ogasahara, Engel et al. 1989). Desde entonces se han descrito más pacientes con el mismo cuadro clínico. De entre todos los casos, en tan sólo un paciente se ha detectado la causa molecular de este déficit, mutaciones en el gen CABC1/COQ8 (Mollet, Delahodde et al. 2008). Una biopsia muscular del paciente reveló no sólo un déficit de CoQ₁₀, sino también una acumulación de mitocondrias y de gotas lipídicas en el 10-20% de las fibras.

Más adelante, en 2001, se describió la ataxia cerebelosa, el fenotipo más común de deficiencias primarias de CoQ₁₀ (Musumeci, Naini et al. 2001). Se han descrito pacientes con mutaciones en el gen CABC1/COQ8 (Lagier-Tourenne, Tazir et al. 2008; Mollet, Delahodde et al. 2008) que han desarrollado ataxia cerebelosa juvenil.

Los casos con mayores causas moleculares descritas son del fenotipo de enfermedad infantil multisistémica. Los primeros casos detectados fueron tres hermanos, aunque no se encontró el defecto primario de la biosíntesis (Rotig, Appelkvist et al. 2000). Existe un caso descrito de mutación sin sentido en el gen COQ2 asociado a deficiencia de CoQ₁₀ en dos hermanos (Lopez-Martin, Salviati et al. 2006; Quinzii, Naini et al. 2006), en los cuales un suplemento de coenzima Q₁₀ en la dieta produjo una mejoría en ambos casos (Montini, Malaventura et al. 2008).

Otro caso de mutaciones en el gen COQ2 fue descrito por Rötig en dos hermanos, con una delección en homocigosis de un par de bases (Mollet, Giurgea et al. 2007).

Mutaciones en PDSS1 y PDSS2, homólogos a *COQ1* de *S. cerevisiae*, también se han determinado en pacientes deficientes en CoQ₁₀. El paciente con mutaciones en PDSS2 presentaba síndrome de Leigh (Lopez, Schuelke et al. 2006), y en el otro caso con mutaciones en homocigosis en el gen PDSS1 desarrolló enfermedad multisistémica (Mollet, Giurgea et al. 2007).

Otro caso de deficiencia primaria está causado por una mutación en heterocigosis en el gen COQ4. En estudios de complementación en levaduras haploides y diploides se demuestra una dominancia negativa en heterocigosis (Casarin, Jimenez-Ortega et al. 2008; Jimenez, Rodriguez-Hernandez et al. 2008).

Una de las últimas mutaciones descrita en un gen COQ, asociada a enfermedad infantil multisistémica, ha sido en COQ9 (Duncan, Bitner-Glindzic et al. 2009). De forma común, todos los casos de este fenotipo asociado a deficiencias de CoQ₁₀ presentan una depleción de sus niveles en músculo y fibroblastos y enfermedad renal.

Recientemente, en un completísimo trabajo, se han descrito 6 diferentes mutaciones en el gen COQ6 en 13 individuos de 7 familias, asociadas a síndrome nefrótico resistente a esteroides con sordera neurosensorial (Heeringa, Chernin et al. 2011). El efecto patológico de las mutaciones se comprobó mediante complementación funcional en levaduras, y el tratamiento con CoQ₁₀ en pez cebra revirtió parcialmente el fenotipo del KO en COQ6.

La deficiencia de CoQ₁₀ afecta predominantemente durante la niñez, apareciendo los primeros síntomas a muy temprana edad, pero se han presentado casos de pacientes con ataxia cerebelosa o miopatía de adulto (Musumeci, Naini et al. 2001; Van Maldergem, Trijbels et al. 2002; Lamperti, Naini et al. 2003; Gironi, Lamperti et al. 2004; Horvath, Schneiderat et al. 2006). En el caso infantil existen diversos casos de mutaciones descritas, pero las bases genéticas moleculares de la deficiencia de coenzima Q₁₀ en adultos son aun desconocidas.

2.2. Deficiencias de coenzima Q₁₀ en el envejecimiento y enfermedades asociadas

En pacientes con enfermedad de Parkinson se han encontrado niveles reducidos de coenzima Q₁₀ (Shults 2005). El daño oxidativo y la disfunción mitocondrial se han relacionado con enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson, Alzheimer, enfermedad de Huntington y ataxia de Friedreich, por lo que terapias antioxidantes con CoQ₁₀ han tomado importancia en estas enfermedades (Beal 2004). Algunos análisis clínicos sugieren un efecto beneficioso de un complemento en la dieta con elevadas dosis de CoQ₁₀ en pacientes con enfermedad de Parkinson o de ataxia de Friedreich (Shults, Oakes et al. 2002; Schapira 2006).

Durante el envejecimiento se produce un incremento de la producción de ROS y del daño oxidativo, disminución de la producción de ATP y de las defensas antioxidantes (Sohal, Kamzalov et al. 2006). Diversos estudios han diagnosticado una depleción de la biosíntesis de coenzima Q desde las fases iniciales del envejecimiento (Beyer, Burnett et al. 1985; Kalen, Appelkvist et al. 1989; Battino, Gorini et al. 1995; Turunen, Olsson et al. 2004).

2.3. Tratamientos paliativos de las deficiencias de coenzima Q₁₀

Pacientes con diversas formas de deficiencia de coenzima Q₁₀ han mostrado mejoras clínicas con un complemento oral de CoQ₁₀. Para obtener un efecto son necesarias elevadas dosis de coenzima Q₁₀ dada su hidrofobicidad y consecuente baja biodisponibilidad, además de tratamientos largos. El CoQ es una molécula lipofílica que se acumula en las biomembranas hasta alcanzar el punto de saturación, por lo que tan sólo una pequeña cantidad alcanza la mitocondria. Aunque se han detectado mejorías bioquímicas y clínicas en las anomalías musculares con complementos de CoQ₁₀ en la dieta, estos tratamientos tan sólo palian los defectos cerebrales parcialmente (Aure, Benoist et al. 2004) debido posiblemente a la irreversibilidad de los daños neuronales, además de la dificultad añadida para penetrar la barrera hematoencefálica.

Una estrategia para solventar el problema de la biodisponibilidad es la creación de antioxidantes análogos de fácil incorporación, como es el caso de la mitoquinona

(MitoQ) (Tauskela 2007). Esta molécula contiene la fracción antioxidante quinona unida covalentemente a un catión trifenilfosfónico lipofílico, que promueve su incorporación a la mitocondria. El MitoQ reduce la formación de ROS y preserva las funciones mitocondriales (Lu, Zhang et al. 2008).

Dado que la biodisponibilidad del CoQ en la dieta es muy baja, sumado a que el sistema nervioso central y músculo presentan una baja capacidad de incorporación del coenzima Q de la dieta (Bentinger, Dallner et al. 2003), y a que el mantenimiento de sus niveles en estos tejidos es de especial relevancia por su elevada dependencia del metabolismo oxidativo, es importante desarrollar mecanismos para incrementar los niveles de CoQ₁₀ en estos tejidos y órganos en procesos como el envejecimiento y varias enfermedades en las que se sucede una depleción del mismo.

Durante el envejecimiento existe un incremento del daño oxidativo debido a una mayor producción de ROS y a una disminución de la respuesta antioxidante. Por otro lado los radicales libres poseen un importante papel en la señalización y en la fisiología celular, esenciales para inducir mecanismos de protección. Un exceso en el uso de antioxidantes en condiciones innecesarias puede perjudicar el proceso de envejecimiento (Linnane, Kios et al. 2007), siendo necesario un equilibrio entre las necesidades y la complementación en la dieta con antioxidantes como el coenzima Q₁₀ para evitar tanto el defecto como el exceso.

Teniendo en cuenta tanto la biodisponibilidad como la necesidad del mantenimiento de niveles lo más cercanos a los endógenos, se hace necesario el estudio de nuevas terapias orientadas a un incremento de la biosíntesis endógena, obteniendo así no sólo un incremento de los niveles de coenzima Q, sino también en la localización apropiada.

3. Biosíntesis de coenzima Q en eucariotas

La fuente principal de CoQ en la célula es la propia síntesis *de novo*. Los primeros estudios relativos a la ruta biosintética del coenzima Q se realizaron en procariotas (Friis, Daves et al. 1966). No fue hasta 1990 cuando Tzagoloff y Dieckman establecieron las bases para el conocimiento de las enzimas implicadas mediante estudios sobre mutantes nulos en *Saccharomyces cerevisiae* (Tzagoloff and Dieckmann 1990). A pesar de que la biosíntesis de coenzima Q ha sido ampliamente estudiada en procariotas y levaduras, el conocimiento en mamíferos de esta ruta es muy limitado.

En base a señales de importación mitocondrial de las enzimas implicadas en el proceso de síntesis (Tran and Clarke 2007), tanto en levaduras como en células humanas la síntesis tiene lugar en la mitocondria, desde donde es distribuido a otras membranas de la células a través del sistema de endomembranas (Fernandez-Ayala, Brea-Calvo et al. 2005; Padilla-Lopez, Jimenez-Hidalgo et al. 2009). Sin embargo se han descrito otras localizaciones en células de mamífero (Teclebrhan, Olsson et al. 1993) y en *Pneumocystis* sp. (Kaneshiro, Basselin et al. 2006).

En el trabajo de Tzagoloff se establecieron ocho grupos de complementación deficientes en CoQ₆, denominados *coq1-coq8*, y más adelante se estableció un noveno grupo, *coq9* (Johnson, Gin et al. 2005). Barros y colaboradores describieron en 2005 un décimo mutante con defectos en la respiración y en la oxidación de NADH y succinato dependiente de CoQ (Barros, Johnson et al. 2005). Sin embargo, a diferencia del resto de mutantes deficientes en coenzima Q (*coq1-coq9*), los mutantes *coq10* poseen niveles de CoQ₆ cercanos al silvestre. Puede que Coq10p se comporte como una chaperona de unión a CoQ necesaria para el correcto funcionamiento de la ubiquinona en la cadena transportadora de electrones mitocondrial. Los homólogos humanos de los genes COQ de levadura se han identificado por homología de secuencia.

El coenzima Q es una 2,3-dimetoxi, 5-metil, 6-poliisopreno benzoquinona. El trans poliisopreno proporciona afinidad en el interior de las membranas celulares. Los dos grupos metoxi y el grupo metil contribuyen a la especificidad de la acción enzimática. El grupo funcional de la molécula es el anillo quinónico, pues mediante

reducción de éste a quinol es como se produce el transporte de electrones y protones.

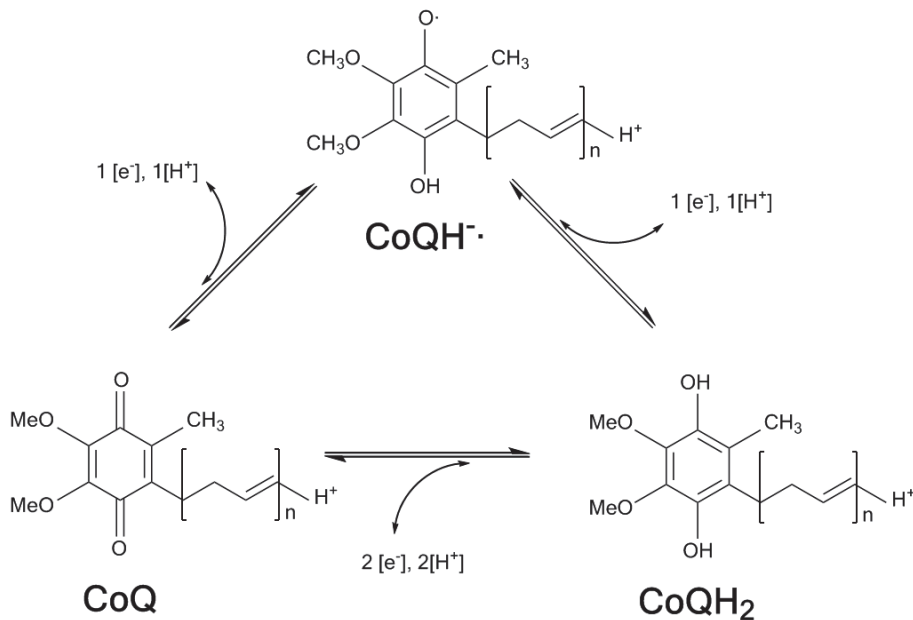


Figura 7. Química redox del coenzima Q. La ubiquinona (CoQ) puede reducirse en un sólo paso a ubiquinol (CoQH₂) mediante reacciones dielectrónicas, o bien mediante reacciones monoeléctricas, generando un radical intermediario, la semiquinona (CoQH•).

3.1. La ruta de síntesis de CoQ en eucariotas

La síntesis de coenzima Q comienza por la formación de la cabeza polar de ácido hidroxibenzoico y la cola poliisoprenoide lipofílica (Olson and Rudney 1983; Pennock 1983). El precursor aromático del anillo bencénico es el ácido 4-hidroxibenzóico (4-HB) derivado de la tirosina. En levaduras este anillo puede sintetizarse también desde corismato por la ruta del shiquimato (Goewert, Sippel et al. 1977). La síntesis de la cola proviene del dimetilalil difosfato y del isoprenil difosfato, derivado del acetil-coenzima A (acetil-CoA) por la ruta del mevalonato (Grunler, Ericsson et al. 1994).

La ruta del mevalonato comprende las reacciones comenzando por acetil-coenzima A y finalizando en farnesil pirofosfato (FPP), sustrato de la biosíntesis de coenzima Q, colesterol, dolicol y proteínas isopreniladas (Grunler, Ericsson et al. 1994). La condensación de tres moléculas de acetil-CoA forman 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A (HMG-CoA) por la acción de la acetoacetil-CoA tiolasa y la HMG-CoA

sintasa. Este producto es sustrato de la HMG-CoA reductasa para formar mevalonato. Este último paso es considerado el principal punto de regulación de la síntesis de colesterol (Gil, Brown et al. 1986; Gil, Goldstein et al. 1986).

En primer lugar la cola poliisoprenoide es ensamblada por la acción de Coq1p (poliprenil difosfato sintetasa), el cual determina su longitud en función del número de isoprenos (Okada 1998). En *S. cerevisiae* y *Arabidopsis thaliana* funciona como homo-oligómero, mientras que en *S. pombe*, ratón y humano son heterotetrámeros con dos subunidades, PDSS1 y PDSS2 (Saiki, Nagata et al. 2003; Saiki, Nagata et al. 2005). La cabeza polar es unida covalentemente a la cola formando ácido 3-poliprenil-4-hidroxibenzoico, reacción catalizada por Coq2p (4-HB polipreniltransferasa), una proteína integral de la membrana interna mitocondrial orientada a la matriz. A continuación, el anillo bencénico sufre una serie de modificaciones que dan lugar finalmente al coenzima Q. El orden de dichas reacciones no está definitivamente aceptado.

Dos fosforilaciones y una decarboxilación del mevalonato forman isopentenil pirofosfato, precursor del FPP y componente esencial para la biosíntesis de dolicol y de la cadena hidrofóbica de CoQ.

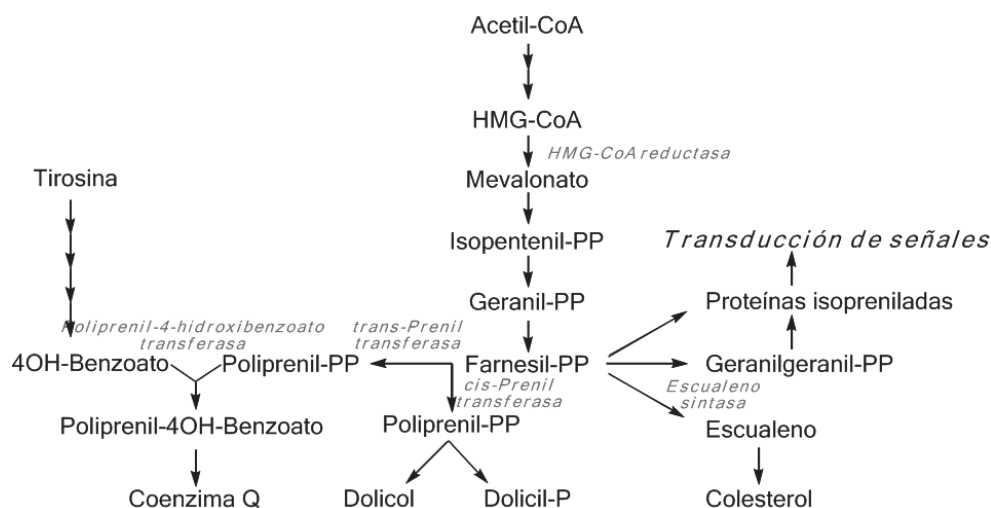


Figura 8. Ruta del mevalonato. La conversión y condensación del acetato a farnesil-PP y subsecuente biosíntesis de CoQ, colesterol y dolicol. Las enzimas implicadas aparecen en cursiva.

El 4-HB proviene del aminoácido tirosina, aunque también puede obtenerse de una fuente de fenilalanina por hidroxilación a tirosina. Dado que la tirosina es un aminoácido esencial en células animales, al contrario que en bacterias y levaduras, la disponibilidad del anillo puede ser limitante en un sistema *in vivo*. En el caso de levaduras y bacterias, el 4-HB puede sintetizarse también a partir de corismato (Meganathan 2001).

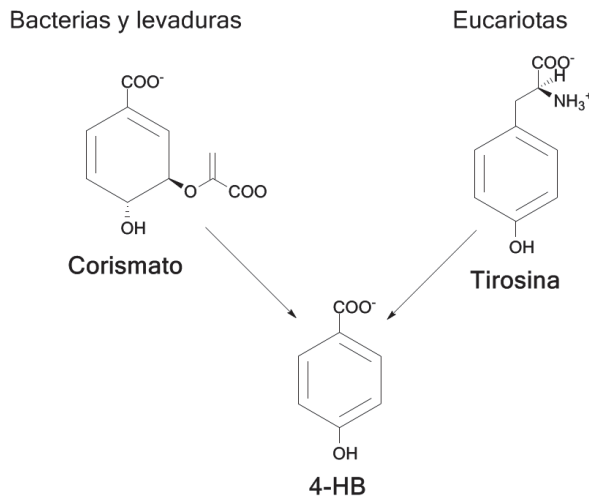


Figura 9. Síntesis del 4-hidroxibenzoato en bacterias y eucariotas.

De las nueve proteínas implicadas en la síntesis de CoQ (Coq1-Coq9p), algunas han mostrado función catalítica en la biosíntesis, mientras que la función de Coq4p, Coq6p, Coq8p y Coq9p aun requieren de caracterización. Las dos O-metilaciones de la biosíntesis son catalizadas por Coq3p (Poon, Barkovich et al. 1999); la reacción de C-metilación la lleva a cabo una C-metil transferasa, Coq5p (Baba, Belogradov et al. 2004); uno de los últimos pasos de la síntesis de CoQ está catalizado por una monooxigenasa, Coq7p, la cual hidroxila el precursor tardío 5-demetoxiubiquinol (DMQH₂) para formar 5-demetilubiquinol, a una sola modificación de su forma final, coenzima Q (Tzagoloff and Dieckmann 1990; Marbois and Clarke 1996).

La proteína Coq6 es una presunta monooxigenasa dependiente de flavina responsable de la adición del grupo hidroxilo al ácido 4-hidroxi-3-poliprenil benzoico y/o al 6-metoxi-2-poliprenilfenol, dos de los pasos sin caracterizar de la ruta de

síntesis. *COQ8/CABC1*, aunque inicialmente se identificó como *ABC1*, y se relacionó con la actividad del complejo bc_1 , Do y colaboradores demostraron que era el mismo gen (Do, Hsu et al. 2001) requerido para la biosíntesis de coenzima Q y se ha clasificado como una presunta quinasa (ADCK3) perteneciente a la familia ADCK quinasa (Leonard, Aravind et al. 1998). La función de Coq9p aun se desconoce y, a pesar de estar representado en el genoma de eucariotas, no presenta homología con otras proteínas de función conocida.

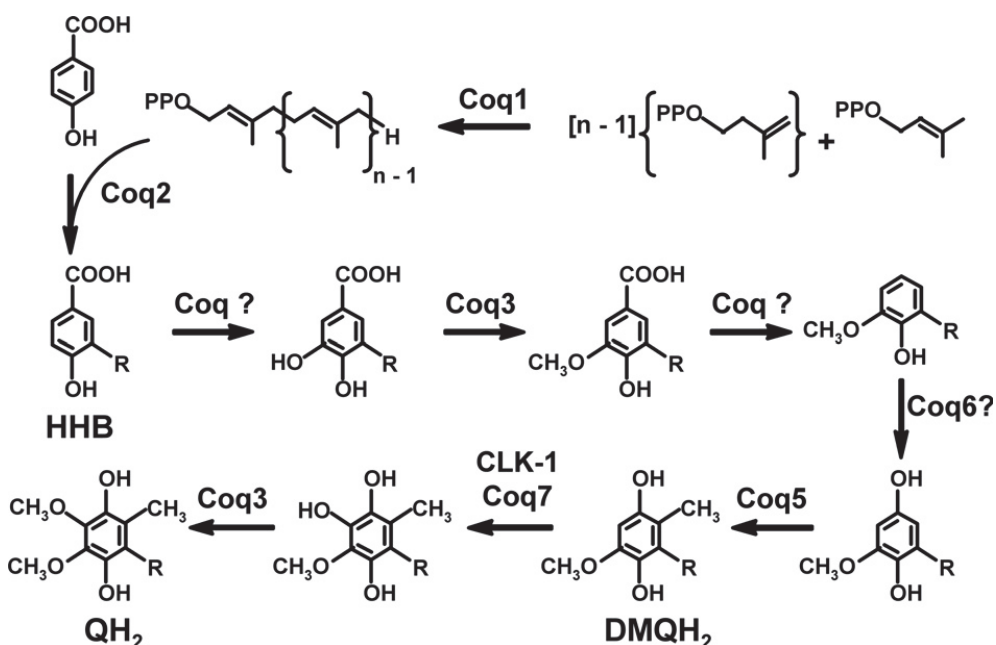


Figura 10. Ruta de síntesis de coenzima Q propuesta en eucariotas. Existen 9 proteínas implicadas en la biosíntesis del coenzima Q desde dimetilalil difosfato e isopentenil difosfato. Las funciones enzimáticas de Coq4, Coq6, Coq8 y Coq9 no han sido caracterizadas aun. La longitud de la cola poliisoprenoide (n) varía en función de la especie.

La función enzimática de la proteína codificada por el gen *COQ4* es completamente desconocida. Su secuencia peptídica no presenta homología con dominios proteicos o motivos con actividad enzimática conocida. En mutantes nulos *coq4* los niveles de las proteínas Coq3 y Coq7 se presentan disminuidos, mientras que no se afectan en el caso de mutante puntual *coq4-1* (Belogradov, Lee et al. 2001). Estudios recientes demuestran que la forma nativa de Coq4p, Coq3p, Coq6p y Coq7p migran como un complejo de alto peso molecular (Marbois, Gin et al. 2005;

Tran, Marbois et al. 2006). Estos datos sugieren una posible función estructural de Coq4p en el complejo de biosíntesis de CoQ.

Por otro lado, levaduras con una mutación puntual E194K en el gen *COQ7* (mutación de pérdida de sentido) acumulan DMQ₆ y el precursor temprano HHB. Sin embargo, una mutación sin sentido de *coq7* en la que la mitad de la proteína se pierde no produce síntesis de DMQ₆ (Padilla, Jonassen et al. 2004). En el mutante E194K, de forma análoga a lo que ocurre en el caso del mutante puntual *coq4-1*, los niveles proteicos de Coq3p, Coq4p y Coq6p son mayores que en el mutante nulo. Estos resultados apoyan la idea de que Coq7p es componente esencial de un posible complejo multienzimático, y que tanto Coq7p como el DMQ₆ estabilizan otras proteínas Coq.

3.2. La síntesis de coenzima Q requiere un complejo multienzimático en *S. cerevisiae*.

Múltiples son los estudios que evidencian la existencia de un complejo de síntesis de CoQ y sin el cual las proteínas que lo conforman se vuelven inestables y son degradadas. En *S. cerevisiae*, los mutantes nulos en los genes *COQ3-COQ9* acumulan el mismo precursor temprano, el HHB, en lugar de su correspondiente sustrato (Poon, Marbois et al. 1995), además de presentar un descenso de los niveles proteicos de Coq3-4, Coq6-7 y Coq9 (Hsu, Do et al. 2000; Belogradov, Lee et al. 2001; Baba, Belogradov et al. 2004; Gin and Clarke 2005; Tran, Marbois et al. 2006). Lo que es más, dichos mutantes presentan una actividad enzimática de Coq3 reducida, a pesar de no verse afectados los niveles de ARNm Hsu (Hsu, Do et al. 2000).

De forma similar a los mutantes puntuales de *COQ4* y *COQ7* de levaduras, los mutantes *coq5-2* y *coq5-5* poseen niveles normales de los péptidos Coq5p (Baba, Belogradov et al. 2004). En un estudio se observó la estabilización de Coq3p y Coq4p en el mutante nulo *coq7* mediante la adición de coenzima Q₆ exógeno (Tran, Marbois et al. 2006). Estos resultados son consistentes con la participación de las proteínas Coq y quizás de los intermediarios de las rutas catalizadas por estas enzimas o su producto final, el CoQ, en un complejo multienzimático.

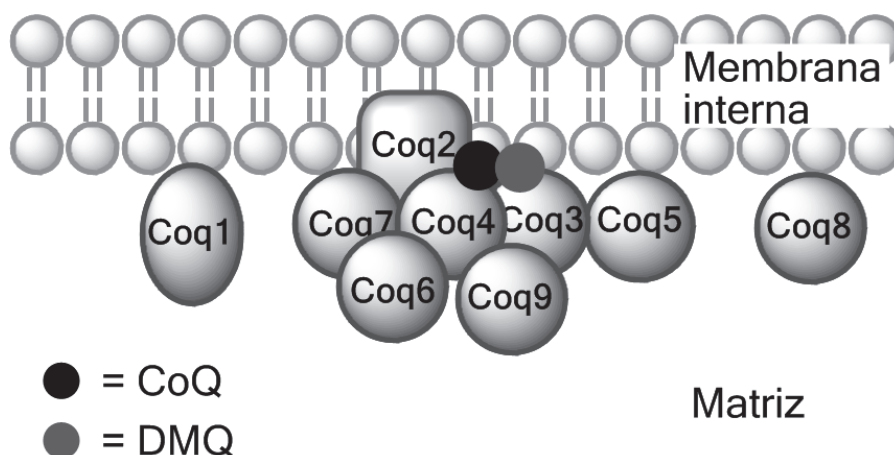


Figura 11. Modelo propuesto del complejo de síntesis de coenzima Q en levadura. La proteína Coq2 posee un dominio transmembrana que ancla el complejo a la membrana interna mitocondrial cara a la matriz. El complejo estaría formado por 6 de las proteínas Coq asociadas a la membrana a través de Coq2. Otros componentes propuestos del complejo son el DMQ₆ y el CoQ₆.

Recientemente se ha establecido una relación física entre los péptidos Coq. En diversos estudios se ha observado que las proteínas Coq2, Coq3, Coq4, Coq5, Coq6, Coq7, Coq8 y Coq9 co-eluyen como un complejo de alto peso molecular, tanto mediante cromatografía de exclusión molecular como en electroforesis nativa (Marbois, Gin et al. 2005; Tran, Marbois et al. 2006; Hsieh, Gin et al. 2007). En este modelo propuesto para el complejo de biosíntesis de coenzima Q, Coq2p, el cual es una proteína transmembrana de la membrana interna mitocondrial, serviría de anclaje del complejo (Tran and Clarke 2007), aunque no existen evidencias definitivas de este hecho, y podría encontrarse sujeto por otras proteínas o lípidos de la membrana.

4. Regulación de la biosíntesis de coenzima Q en eucariotas

4.1. Regulación en mamíferos

Aunque el coenzima Q se encuentra presente en todas las células y tejidos, lo hace de manera heterogénea. Los órganos con un mayor requerimiento energético, como el corazón, el músculo o el cerebro, presentan mayores cantidades de CoQ. La variación del contenido quinónico en función de las necesidades metabólicas de la célula indica la existencia de un sistema regulador. Los niveles de coenzima Q vienen determinados por un balance coordinado entre las enzimas biosintéticas y catabólicas, las cuales se expresan en todos los tejidos. Los conocimientos sobre cómo se regula la biosíntesis *de novo* de CoQ son muy limitados, y menores aun en el caso de mamíferos en contraposición con el modelo *S. cerevisiae*, en el cual se han llevado a cabo la mayoría de estudios.

Los niveles de CoQ varían en respuesta a diversas condiciones fisiológicas, experimentales o patológicas (Littarru and Tiano 2005). Por otro lado, una modificación tanto del número como de la morfología de la mitocondria puede influir en el contenido quinónico del tejido sin afectar al metabolismo del coenzima Q. Este fenómeno se ha observado en el ejercicio y en la adaptación al frío (Herpin, Lossec et al. 2002).

El metabolismo lipídico se encuentra regulado por el peroxisoma. Los receptores de hormona nuclear son factores de transcripción de unión a ADN dependientes de ligando que pueden controlar la expresión génica. Los inductores del peroxisoma son una clase de compuestos que actúan como ligandos de la familia de receptores esteroideos de los receptores activados por proliferadores del peroxisoma (PPAR α). Este receptor, al unirse el ligando forma un dímero con el receptor retinoide X (RXR α), dando lugar a un complejo capaz de modular la expresión de ciertos genes. El incremento de los niveles de coenzima Q mediante proliferadores del peroxisoma (Aberg, Zhang et al. 1996) indican un papel de los receptores nucleares en la regulación del metabolismo del CoQ (Turunen, Peters et al. 2000). Diversos estudios han demostrado que PPAR α no es necesario para la síntesis de coenzima Q, dado que mutantes nulos presentan niveles silvestres de CoQ, pero es necesario para su inducción durante la proliferación del peroxisoma (Turunen, Peters et al. 2000). La deficiencia de RXR α en hígado está asociada a una

depleción tanto de los niveles como de la síntesis de novo de CoQ (Bentinger, Turunen et al. 2003). Mientras que RXR α se requiere para la biosíntesis constitutiva de CoQ y para la inducción por adaptación al frío, PPAR α se requiere para el incremento de sus niveles bajo inducción de la proliferación del peroxisoma por di-etilhexil-ftalato (Wan, Cai et al. 2000; Bentinger, Turunen et al. 2003).

Los niveles de CoQ también se presentan alterados en ciertas enfermedades como el cáncer y la diabetes (Guan, Soderberg et al. 1996). Este incremento se asocia a un incremento del estrés oxidativo y del daño causado por ROS y por especies reactivas de nitrógeno.

Se han descrito diversas drogas cuyo tratamiento produce modificaciones de los niveles de coenzima Q. La acción de algunas drogas quimioterapéuticas está asociada a radicales libres y desencadenan una respuesta antioxidante en la célula. La camptotecina (CPT), utilizada para el tratamiento del cáncer, produce un incremento de los niveles de CoQ₁₀ en diversas líneas tumorales, necesario para la defensa celular y su supervivencia, además de una regulación positiva de la expresión de genes COQ y un incremento de los niveles proteicos de Coq7 (Brea-Calvo, Rodriguez-Hernandez et al. 2006). El incremento de coenzima Q está regulado por al menos la expresión de COQ4, COQ7 y COQ8. En estudios posteriores del mismo autor se describe el primer mecanismo transcripcional mediado por NF- κ B de regulación de la biosíntesis de coenzima Q. El CPT activa la expresión de COQ7 específicamente a través de una activación del factor de transcripción NF- κ B, el cual reconoce dos sitios κ B en la región flanqueante 5' del gen (Brea-Calvo, Siendones et al. 2009).

Sin embargo, otras drogas citotóxicas asociadas a un incremento del estrés oxidativo como la amitriptilina, utilizada en tratamientos antidepresivos, produce modulaciones en los niveles de CoQ de forma dependiente del tejido. Mientras que en cerebro, corazón, músculo esquelético y suero los niveles incrementan, el hígado y el pulmón muestran un grave descenso {Bautista-Ferrufino, 2011 #4471.

4.2. Regulación de la biosíntesis de coenzima Q₆ en *S. cerevisiae*

La levadura, al ser capaz de realizar un metabolismo fermentativo o respiratorio en función de la fuente de carbono disponible, presenta un patrón de regulación del

metabolismo particular. Los niveles de coenzima Q en *S. cerevisiae* están directamente correlacionados con el desarrollo de la mitocondria y la disponibilidad de oxígeno {Pennock, 1983 #4211}. La presencia de glucosa en el medio reprime el metabolismo respiratorio, disminuyendo los niveles de coenzima Q₆ (Sippel, Goewert et al. 1983). Este fenómeno ocurre también en situación de anaerobiosis.

Durante el crecimiento de la levadura en medio con glucosa como fuente de carbono, dos de los intermediarios de la síntesis de CoQ son acumulados. Uno es el precursor temprano 3-hexaprenil-4-hidroxibenzoato (HHB), sustrato primero de Coq3p. Este paso de la síntesis se ha propuesto como punto de regulación (Sippel, Goewert et al. 1983). La adición de AMP cíclico al medio inhibe la represión por glucosa de la síntesis de coenzima Q₆. Este fenómeno es independiente de la síntesis *de novo* de proteínas, puesto que la adición de cicloheximida no inhibe el incremento de los niveles de CoQ₆ (Sippel, Goewert et al. 1983). La existencia de posibles sitios de fosforilación en Coq3p y la posible actividad kinasa de otra proteína de la familia COQ como Coq8p (Tauche, Krause-Buchholz et al. 2008) apoyaría la idea de Coq3p como un punto de regulación inicial de la ruta.

Dado que la levadura pasa durante el crecimiento en glucosa desde una fase fermentativa a una fase respiratoria es esperable una modificación de las necesidades de coenzima Q₆. En la fase logarítmica del crecimiento de la levadura, aproximadamente un 80% del contenido quinónico corresponde a la forma HHB, el cual se reduce a un 38% en fase estacionaria a favor de un incremento de CoQ₆. (Poon, Marbois et al. 1995).

Los niveles de expresión de algunos genes *COQ*, tales como *COQ3*, *COQ4*, *COQ5* y *COQ7* se modulan frente a un cambio de la fuente de carbono, incrementando los niveles de ARNm al pasar de medios fermentables a glicerol Marbois (Clarke, Williams et al. 1991; Marbois and Clarke 1996; Belogrudov, Lee et al. 2001; Hagerman, Trotter et al. 2002), además de un incremento de los niveles proteicos de Coq7p (Jonassen, Proft et al. 1998).

El gen *COQ8* codifica para una potencial quinasa (Leonard, Aravind et al. 1998). El mutante nulo *coq8* presenta una variación de la composición del complejo de síntesis de coenzima Q, en el cual la proteína Coq3 no forma parte de él. Esta situación se asocia a modificaciones de la fosforilación de Coq3p, el cual presenta

en su secuencia peptídica sitios susceptibles de fosforilación por proteína quinasa A (Tauche, Krause-Buchholz et al. 2008). En el mismo estudio demuestran que Coq3p es una fosfoproteína, cuya forma fosforilada desaparece en el mutante *coq8*, sugiriendo que Coq8p es requerido para la fosforilación de Coq3p y su consecuente unión al complejo de síntesis. Otras proteínas se piensa podrían ser sustrato de Coq8, como por ejemplo Coq9, la cual ya ha sido descrita como fosfoproteína (Chi, Huttenhower et al. 2007).

En un reciente estudio, diversos mutantes *coq8* muestran variaciones en el punto isoeléctrico de Coq3p, Coq5p y Coq7p de manera dependiente de Coq8p, sugiriendo a Coq5p y Coq7p como presuntas fosfoproteínas. La complementación funcional con el gen homólogo humano, ADCK3/CABC1, rescata no sólo el crecimiento en glicerol y parcialmente los niveles de coenzima Q, sino también la fosforilación de algunas de las proteínas Coq (Xie, Hsieh et al. 2011).

Una serie de estudios evidencian la existencia de otro punto de regulación de la ruta de síntesis de coenzima Q₆. Existe otro precursor acumulable en la levadura durante su crecimiento, el DMQ₆, sustrato de la proteína Coq7, el cual es el intermediario predominante en la fase logarítmica del crecimiento de la levadura. Este precursor tardío de la biosíntesis de CoQ₆ también forma parte del complejo de síntesis (Marbois, Gin et al. 2005), pero es incapaz de desempeñar la función de coenzima Q tanto en la respiración como en la función antioxidante (Padilla, Jonassen et al. 2004).

Santos-Ocaña y colaboradores demostraron la modulación del contenido de CoQ₆ durante el crecimiento mediante la conversión a partir de DMQ₆ a su forma final. El ratio CoQ₆/DMQ₆ aumenta en el paso de fase logarítmica a fase estacionaria (Padilla, Tran et al. 2009). Sippel describió la depleción de CoQ₆ y DMQ₆ a favor de un incremento de HHB en presencia de elevadas concentraciones de glucosa (Sippel, Goewert et al. 1983). Como se ha comentado anteriormente, la expresión de genes COQ también se modula en función de la fuente de carbono, incrementando los niveles de ARNm en cultivos en glicerol. La expresión de *COQ3*, *COQ5*, *COQ7* y *COQ8* también aumenta al llegar el cultivo a fase estacionaria. Sin embargo, en medios con glucosa los niveles de expresión de los genes COQ permanecen constantes, a excepción de *COQ7*, sugiriendo que la biosíntesis de

coenzima Q₆ se sucede en dos pasos diferenciados. En primer lugar y durante el metabolismo fermentativo, se sintetiza y acumula DMQ₆, el cual sirve de fuente para la rápida síntesis de CoQ₆ ante el tránsito del metabolismo fermentativo a respiratorio mediante la inducción de la expresión de *COQ7*.

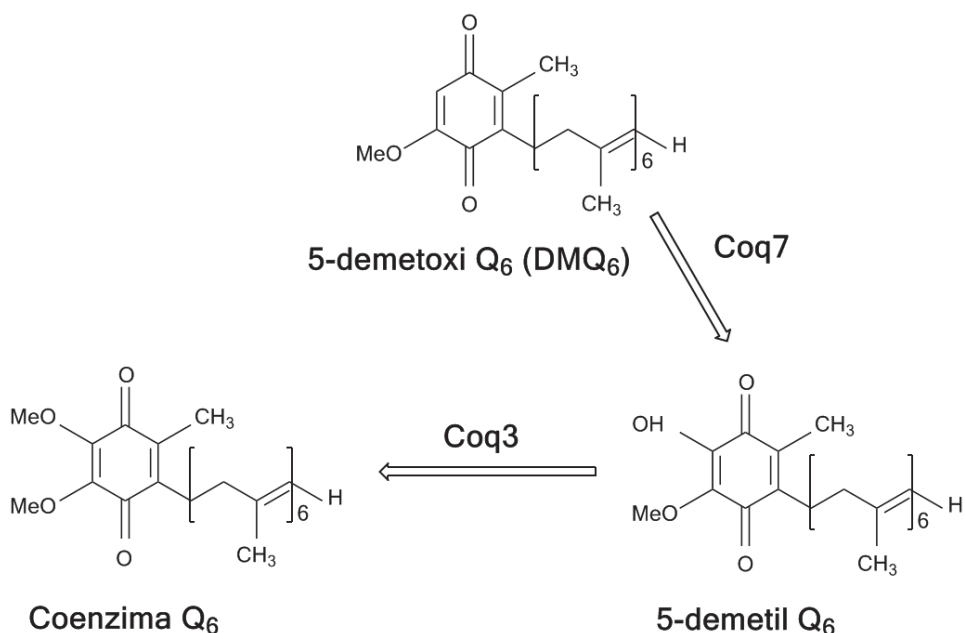


Figura 12. Esquema de los últimos pasos de la biosíntesis de coenzima Q₆. Tras la condensación de la cola poliisoprenoide a la cabeza polar para formar HHB, el anillo bencénico sufre una serie de modificaciones hasta obtener 5-demetoxiubiquinona (DMQ₆). La monooxigenasa Coq7 convierte DMQ₆ en 5-demetilubiquinona, el cual es metilado por la O-metiltransferasa Coq3 para producir CoQ₆.

Ante situaciones de estrés, las variaciones del ratio CoQ₆/DMQ₆ siguen la misma sintonía. El tratamiento con ácido linolénico, un ácido graso insaturado oxidante de membrana, produce un aumento del ratio, así como de los niveles de ARNm de *COQ3* y *COQ7* (Padilla, Tran et al. 2009) en respuesta al estrés inducido. Estudios en células tumorales muestran un incremento similar de la expresión de *COQ7* y de los niveles de coenzima Q ante estrés inducido por camptotecina (Brea-Calvo, Rodriguez-Hernandez et al. 2006).

La adición de coenzima Q₆ exógeno o la sobreexpresión de *COQ8* en el mutante *coq7* induce la síntesis *de novo* de DMQ₆, y en el primer caso además estabiliza los niveles de proteína de Coq3 y Coq4 sin alterar su expresión (Padilla, Tran et al.

2009). Estos datos evidencian la presencia de moléculas de coenzima Q en el complejo de síntesis.

Una hipótesis para explicar estos datos es la formación de un precomplejo de síntesis encargado de la primera etapa de la biosíntesis de coenzima Q₆, el cual genera moléculas de DMQ₆ acumulables en la célula. En este precomplejo no interviene Coq7p, ya que la sobreexpresión *COQ8* o la adición de CoQ₆ en mutantes *coq7* conducen a una acumulación de DMQ₆. En la segunda etapa, la unión de Coq7p y posiblemente Coq4p y Coq3p, permite la formación del complejo de síntesis y la conversión de DMQ₆ a coenzima Q₆.

4.3. Regulación de la biosíntesis de coenzima Q₆ por ciclos de fosforilación de Coq7p

Estudios llevados a cabo en nuestro grupo aportan una posible regulación de la formación del complejo de síntesis final mediante ciclos de fosforilación. La secuencia peptídica de Coq7p presenta 3 potenciales sitios de fosforilación en serina/treonina. Asimismo se muestra la implicación de estos sitios de fosforilación en la biosíntesis de coenzima Q₆ (Martin-Montalvo 2009). Se caracteriza a Coq7p como una fosfoproteína, concordando con las modificaciones del punto isoeléctrico observadas en otros estudios (Xie, Hsieh et al. 2011). El estado de fosforilación de Coq7 se modifica en respuesta a un cambio de la fuente de carbono, presentando su estado defosforilado presuntamente activo en medios con glicerol (Martin-Montalvo 2009).

En este estudio, la modificación de los sitios de fosforilación afecta la síntesis de CoQ₆, produciéndose un incremento al simular un estado de permanente defosforilación, y opuestamente una depleción al simular un estado fosforilado. Sin embargo, en ambos casos se observó una disfunción mitocondrial asociada a una disminución de las actividades asociadas a CoQ de la cadena respiratoria, un incremento de la producción de ROS y del daño oxidativo, así como una menor resistencia a estrés. Consecuentemente, las estirpes con mayor síntesis de CoQ₆ presentaban una menor longevidad cronológica que el silvestre, al contrario que la estirpe que simulaba un estado permanentemente fosforilado (Martin-Montalvo 2009). De este modo se establece un nuevo modelo de la formación del complejo

de biosíntesis de coenzima Q, en el cual la unión de Coq7p al precomplejo dependería del estado de fosforilación del mismo.

La activación por defosforilación de Coq7p es llevada a cabo por dos fosfatasas de la familia PP2C, Ptc6p y Ptc7p. Ambas enzimas son capaces de defosforilar *in vitro* a Coq7p, y los mutantes nulos *ptc6* y *ptc7* presentan un descenso de los niveles de coenzima Q₆ y de las actividades NADH-CoQ reductasa y succinato-CoQ reductasa, un descenso del ratio CoQ₆/DMQ₆, así como una disminución del estado de fosforilación *in vivo* de Coq7p. El mutante *ptc6* presentaba además una acumulación de DMQ₆ (Martin-Montalvo 2009).

Los mutantes *ptc6* y *ptc7*, a pesar de presentar un incremento del consumo de oxígeno y menor producción de ROS, indicando un mejor acoplamiento de la cadena respiratoria, muestran mayor sensibilidad a estrés oxidativo, una mayor carbonilación de proteínas, así como una disminución de la longevidad cronológica. Esto sugiere que existen otras funciones en las que estas fosfatasas se encuentran implicadas (Martin-Montalvo 2009).

5. Las fosfatasa celulares

La fosforilación reversible de proteínas podría considerarse como el mecanismo más importante de control celular de transducción de señales (Hunter 1995). En este proceso, las quinasas son responsables de la adición de grupos fosfato a ciertos residuos de amino ácidos de la proteína diana, mientras que las fosfatasa se encargan de eliminar los grupos fosfato. Las enzimas quinasas se han considerado durante mucho tiempo como altamente específicas de sustrato, contrariamente a las fosfatasa, las cuales se han considerado como enzimas mucho más flexibles, con un elevado número de sustratos. Esto ha fomentado el estudio del mecanismo de acción de las quinasas, y tan sólo en los últimos años las fosfatasa han tomado relevancia, en parte consecuencia de que el concepto de especificidad ha sido cuestionado en diversas ocasiones (Zhang, Maclean et al. 1993; Zhou, Mihindukulasuriya et al. 2002; Meskiene, Baudouin et al. 2003).

5.1. Mecanismos de acción

La fosforilación reversible y defosforilación de proteínas es la estrategia más común en las rutas de señalización celular. En el proceso de fosforilación se produce una unión covalente de un grupo fosfato a la cadena lateral de un aminoácido. Éste posee dos cargas negativas, provocando cambios estructurales en la proteína fosforilada. Las proteínas quinasas son las responsables de añadir uno o más grupos fosfatos a partir de una molécula de ATP a determinados residuos de aminoácidos del polipéptido, mientras que las proteínas fosfatasa se encargan de eliminar estos grupos fosfatos.

Las quinasas transfieren el grupo fosfato proveniente de una molécula de ATP a un grupo hidroxilo de una cadena lateral de una serina, treonina o tirosina de un polipéptido. Esta reacción se realiza gracias a la energía liberada por la hidrólisis del ATP en ADP+Pi. El proceso de fosforilación es reversible, y de esto se encargan las proteínas fosfatasa. Estas enzimas eliminan el grupo fosfato generando un cambio conformacional en la proteína.

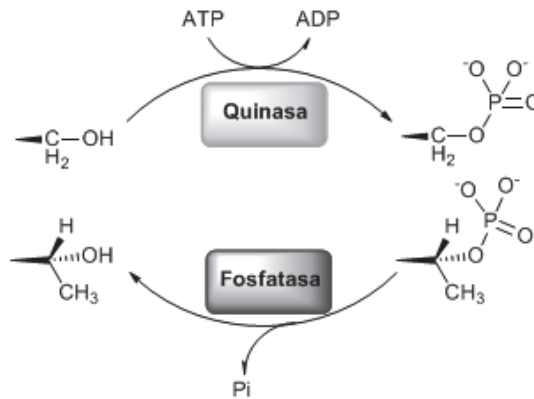


Figura 13. Fosforilación y defosforilación de residuos de serinas y treoninas de proteínas en la célula. La reacción que cataliza una proteína quinasa añade un grupo fosfato a la cadena lateral de un aminoácido, y las proteínas fosfatasas catalizan la eliminación del mismo.

La mitocondria es un orgánulo esencial para el metabolismo celular y la supervivencia, además de un sitio de convergencia e integración de la célula de rutas de señalización (Horbinski y Chu, 2005; Ravagnan et al., 2002; Newmeyer y Ferguson-Miller, 2003). En el proteoma mitocondrial se han descrito una amplia señalización por ciclos de fosforilación y defosforilación (Hopper et al., 2006).

5.2. Las familias de fosfatasas

Existen tres familias de fosfatasas en función de la especificidad de sustrato y de la conservación de dominios catalíticos (Barford, Das et al. 1998):

- Tirosina fosfatasas (PTPs), las cuales defosforilan específicamente residuos de tirosina. Contienen una subfamilia denominada fosfatasas de especificidad dual (DSPs), que también pueden defosforilar residuos de serinas y treoninas.
- Fosfoproteínas fosfatasas (PPPs), defosforilan residuos de fosfoserinas y fosfotreoninas. Son enzimas multiméricas, y presenta una subdivisión en tres distintas subfamilias (PP1, PP2A y PP2B) (Cohen 1994).
- Fosfatasas dependientes de unión a metales (PPMs), al igual que las PPPs, defosforilan residuos de Ser/Thre, pero a diferencia de éstas, son enzimas monoméricas, requieren de cationes bivalentes como el Mg^{2+} y el Mn^{2+} para su actividad y son insensibles al ácido ocadaico, un inhibidor de

fosfatasa genérico. Tan sólo presenta una subfamilia, las PP2Cs (Klumpp, Hanke et al. 1994).

5.3. La familia PP2C

Dado que las PP2Cs son enzimas monoméricas, no existe una subunidad reguladora de la actividad de las mismas. Su actividad depende de Mn^{2+} y Mg^{2+} , cuyas concentraciones intracelulares no fluctúan sustancialmente en condiciones fisiológicas. Por tanto, la regulación de esta familia de fosfatasas viene dada por modulaciones en su expresión, por procesos degradativos, sublocalización celular y/o modificaciones post-traduccionales.

En los últimos años el número de miembros de la familia PP2C ha ido aumentando constantemente, hasta al menos 16 distintos genes en humano que codifican para 22 isozimas diferentes. Existen ortólogos en todos los organismos, plantas, tanto en procariontas como en eucariotas (Schweighofer, Hirt et al. 2004), lo que indica que estas enzimas juegan un importante papel en la regulación celular. Los miembros de esta familia se han relacionado predominantemente con el crecimiento celular y la señalización inducida por estrés.

En levaduras se han descrito 7 genes de la familia (*PTC1-PTC7*) (Jiang, Whiteway et al. 2002). Al igual que en el resto de organismos, las PTCs se encuentran implicadas en la regulación del crecimiento celular y la señalización de rutas de respuesta a estrés.

Ptc6p y Ptc7p son los dos últimos miembros descritos de esta familia en *S. cerevisiae*, y junto a Ptc5p son las únicas fosfatasas PP2C localizadas en la mitocondria. Aunque se ha descrito un procesamiento de ARNm alternativo de PTC7 que codifica para un polipéptido con un dominio transmembrana que localiza en la envoltura nuclear (Ptc7u), donde media el efecto tóxico de la latrunculina A (Juneau, Nislow et al. 2009), un compuesto que interrumpe los filamentos de actina. La expresión de cada uno de las isoformas depende de la fuente de carbono. La forma predominante en medio con dextrosa es la nuclear, mientras que en medio con fuente de carbono no fermentable predomina la forma procesada (Ptc7s) que localiza en la mitocondria (Juneau, Nislow et al. 2009). Ptc7s presenta un duplete en SDS-PAGE con una diferencia de tamaño igual o menor a 1 KDa. La

modificación que causa esta diferencia de movilidad no ha sido caracterizada, pero es remarcable que la banda de menor tamaño es prácticamente inexistente en medios con dextrosa.

La actividad del complejo de la piruvato dehidrogenasa (PDH) en *S. cerevisiae* está regulada por ciclos de fosforilación, en el que se encuentran implicadas al menos dos quinasas y dos fosfatasas. Una de las fosfatasas, denominada también Ppp2p, es Ptc6p. La delección de *PTC6* disminuye drásticamente la actividad del complejo de la piruvato dehidrogenasa (PDH), y la subunidad α de la PDH (Pda1p) presenta una hiperfosforilación, disminuyendo la conversión de piruvato a acetil-CoA (Gey, Czupalla et al. 2008). En este estudio destacan la posibilidad de un papel adicional de Ptc6p, puesto que el crecimiento en fuentes de carbono no fermentables afecta con mayor gravedad al mutante *ptc6* que al mutante *pda1*.

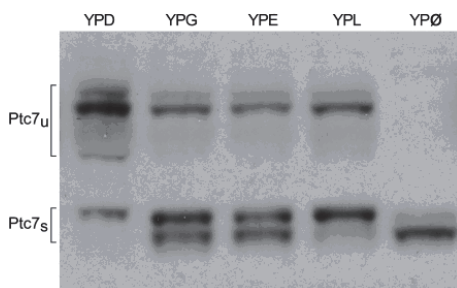


Figura 14. Procesamiento del ARNm de PTC7 en *S. cerevisiae*. La expresión de *PTC7* está regulada por la disponibilidad de fuente de carbono. Las estirpes se cultivaron en medios YP con: 2% dextrosa (YPD), 2% glicerol (YPG), 1.5% etanol (YPE), 2% lactosa (YPL) o sin fuente de carbono (YPØ).

Ptc6p se identificó en un estudio como Aup1p, una proteína con una relación sintética con la quinasa específica de autofagia Atg1p. El mutante *aup1* muestra un defecto la degradación dependiente de vacuola de la aconitasa (proteína mitocondrial) en un ensayo de mitofagia en fase estacionaria (Tal, Winter et al. 2007), mientras que un análisis con un constructo GFP mitocondrial mostró tan sólo un ligero efecto de el transporte de GFP a la vacuola (Abeliovich 2011). Bajo condiciones de inducción de mitofagia en fase estacionaria, el mutante *aup1* acumula mayores cantidades de proteínas oxidadas (Tal, Winter et al. 2007), lo que sugiere, junto a los datos previos, que Aup1p está implicado en la segregación de componentes mitocondriales defectuosos en el compartimento despolarizado, pero no para el proceso de señalización y de englobamiento (Abeliovich 2011).

La ruta de señalización retrógrada (RTG) es un mecanismo de señalización desde la mitocondria al núcleo. Recientemente de han publicado datos que implican a

Aup1p en la regulación de la RTG. El mutante *aup1* presenta un defecto de la translocación al núcleo del factor de transcripción Rtg3p durante la mitofagia en fase estacionaria (Journó, Mor et al. 2009). Este hecho es de especial relevancia para explicar la implicación de Aup1p en la mitofagia.

Los datos existentes sobre Ptc7p no abarcan un conocimiento tan amplio como en el caso de Ptc6p. Esta proteína se identificó en el 2000 y se analizó su expresión endógena en levadura, observándose una regulación a través del promotor *ACT1*, tras cambios en la fuente de carbono del cultivo (Ramos, Guldener et al. 2000). Los niveles de ARNm son mayores en cultivos en etanol que en galactosa, y casi indetectables en glucosa. En condiciones estándar, el mutante *ptc7* muestra un crecimiento similar al silvestre independientemente de la fuente de carbono. Sin embargo, en condiciones de baja concentración de oxígeno, mientras su capacidad fermentativa permanece intacta, es capaz de crecer en dextrosa a niveles del silvestre, pero no en medios con etanol o glicerol (Ramos, Guldener et al. 2000).

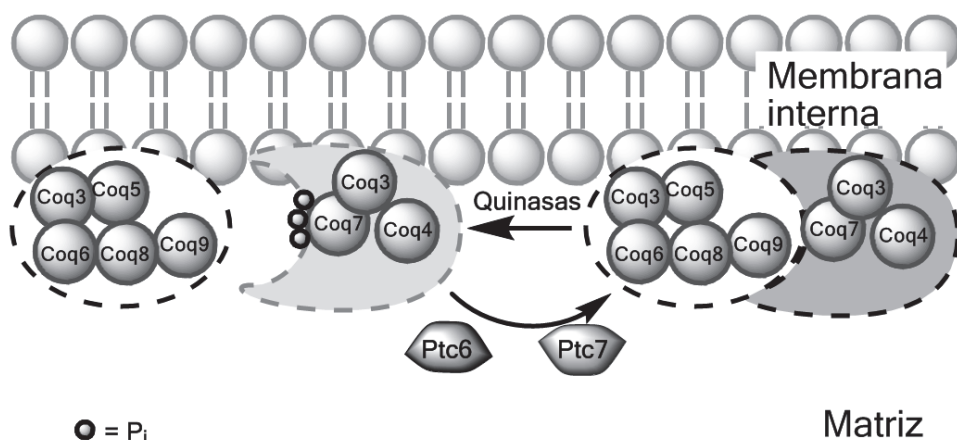


Figura 15. Regulación de la formación del complejo de biosíntesis de coenzima Q₆ en *S. cerevisiae*. La unión del precomplejo de síntesis a Coq7 es inhibido por la fosforilación de tres residuos de Ser/Tre de dicho polipéptido. En respuesta a distintos estímulos, bien Ptc6p o Ptc7p defosforila a Coq7p, permitiendo la formación del complejo final de biosíntesis y el consecuente procesamiento de DMQ₆ a CoQ₆.

En un estudio de genes afectados por estrés osmótico sostenido se detectó a *PTC7* como candidato. Mediante un análisis de expresión, se observó un relación sintética con una MAP quinasa conocida implicada en la respuesta a alta osmolaridad por glicerol (HOG). La inducción de la expresión de *PTC7* observada en condiciones de estrés osmótico no se halló en el mutante *hog1*. De este modo,

PTC7 presenta una activación dependiente de *HOG1* tras sufrir estrés osmótico (Runner and Brewster 2003).

La expresión de *PTC7* también se encuentra regulada por el factor de transcripción Hcm1p. En un reciente estudio describen la interacción de este factor de transcripción con la histona deacetilasa Sir2p, de la cual depende para su translocación al núcleo en respuesta a estrés oxidativo. La sobreexpresión de Hcm1p deriva en un incremento de la masa mitocondrial, del consumo de oxígeno y resistencia a estrés oxidativo, probablemente por la regulación positiva de las actividades de la catalasa y la Sod2p. Describen como diana de Hcm1p las rutas involucradas en la bioenergética mitocondrial, y sugieren un posible papel de este factor de transcripción en el tránsito del metabolismo fermentativo al respiratorio (Rodríguez-Colman, Reverter-Branchat et al. 2010).

En nuestro laboratorio se ha sugerido una doble función de Ptc6p y Ptc7p, regulando la biosíntesis del coenzima Q₆ en la fase postdiauxica de crecimiento (metabolismo respiratorio), y ejerciendo otro papel durante la fase estacionaria. En la regulación de la síntesis de CoQ₆, Ptc6p parece responder a estímulos de cambio de fuentes de carbono, mientras que Ptc7p responde en mayor medida a estímulos de estrés (Martin-Montalvo 2009). Este hecho podría explicar la ausencia de homólogos en eucariotas superiores de *PTC6*, mientras que *PTC7* se conserva a lo largo de la filogenia.

6. La autofagia como respuesta a condiciones cambiantes y eliminación de daños.

La autofagia (del griego auto, uno mismo, y fagos, comer) es un proceso catabólico conservado evolutivamente que conlleva el secuestro de componentes citoplasmáticos y su envío a los lisosomas para su posterior degradación. El concepto de autofagia se utilizó por primera vez a principios de los 60 por De Duve para describir la presencia de vesículas de simple o doble membrana que contienen partes de citoplasma y orgánulos en diversos estados de degradación (De Duve and Wattiaux 1966).

Ante una escasez de nutrientes, la autofagia permite una degradación de los propios componentes celulares y un reciclaje de moléculas esenciales. Además de participar en este proceso, la autofagia está implicada en la protección frente a diversas patologías (enfermedad de Parkinson, Alzheimer, cáncer, etc), en el mantenimiento de la homeostasis celular y en el desarrollo.

6.1. Tipos de autofagia

En células eucariotas, el proceso de autofagia se puede dividir en tres grandes subgrupos en función de la ruta de envío del material celular a los lisosomas (Massey, Kiffin et al. 2004; Klionsky 2005): macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas (CMA). Tanto en la macroautofagia como en la microautofagia se produce una reorganización dinámica de membrana para atrapar porciones de citoplasma, siendo capaces de secuestrar grandes estructuras como orgánulos enteros (Abeliovich and Klionsky 2001). En la macroautofagia, el secuestro del material celular sucede mediante la formación de vesículas de doble membrana, las cuales se fusionan posteriormente al lisosoma/vacuola. El mecanismo de acción de la microautofagia es considerablemente diferente. En este caso se produce un secuestro del material celular en la superficie del lisosoma mediante invaginación de la propia membrana lisosomal (Kim and Klionsky 2000). En ambos casos, la membrana producida en el cuerpo autofágico es degradada junto al cargo en el lumen del lisosoma. Por otro lado, la CMA no requiere una reorganización de membrana. En este tipo de autofagia se translocan de forma específica al lumen del lisosoma proteínas solubles desplegadas a través de chaperonas y un receptor unido a la membrana lisosomal (Kon and Cuervo 2010).

Este último tipo de autofagia se ha identificado en eucariotas superiores, pero no en levadura.

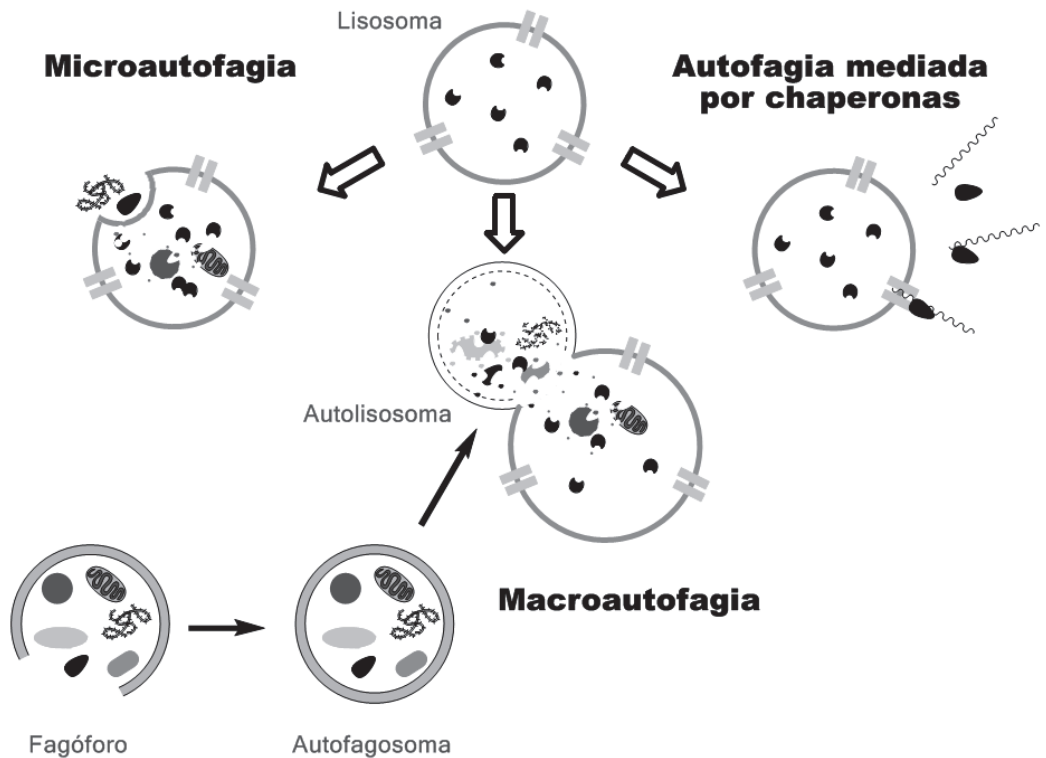


Figura 16. Tipos de autofagia en eucariotas superiores. Existen tres tipos de autofagia: (1) microautofagia, (2) macroautofagia y (3) autofagia mediada por chaperonas (CMA).

Todos los componentes citoplasmáticos, desde proteínas y ácidos nucleicos hasta orgánulos, pueden ser secuestrados por los autofagosomas, aunque hasta hace poco no estaba claro si estos orgánulos eran degradados de manera selectiva o no. Recientes estudios, muchos de ellos desarrollados en levadura, han descrito diversos subtipos de macroautofagia selectiva de mitocondrias (mitofagia), peroxisomas (pexofagia), retículo endoplásmico (reticulofagia), agregados de proteínas (agrefagia), ribosomas (ribofagia), patógenos invasivos (xenofagia) y de gotas lipídicas (lipofagia) (Lemasters 2005; Bernales, Schuck et al. 2007; Klionsky 2007; Kraft and Peter 2008). En levadura existe además una ruta de señalización del citoplasma a la vacuola (ruta Cvt) en la que se adapta el proceso de autofagia a un fin biosintético (Klionsky, Cueva et al. 1992). En esta ruta se translocan al

menos dos hidrolasas, la aminopeptidasa 1 (Ape1) y la χ -manosidasa (Ams1) a la vacuola utilizando la maquinaria autofágica.

6.2. Funciones de la macroautofagia

La macroautofagia se encuentra activa en niveles basales para el reciclaje de proteínas de vida media larga y para la eliminación de orgánulos redundantes o dañados, lo cual puede ser la conexión entre autofagia e incremento de la longevidad (Levine and Klionsky 2004). Sin embargo, este proceso de degradación puede inducirse ante diversas condiciones de estrés como la privación de nutrientes, calor y estrés oxidativo. Además, la macroautofagia ejerce un papel esencial en el desarrollo y diferenciación celular (Levine and Klionsky 2004), en diversas enfermedades como el cáncer y enfermedades neurodegenerativas (enfermedad de Parkinson, Alzheimer y Huntington) (Huang, Reggiori et al. 2007; Mizushima, Levine et al. 2008) y en la eliminación de patógenos invasivos como bacterias y virus (Levine and Deretic 2007). Asimismo, en ausencia de apoptosis, la macroautofagia podría ejercer un papel relevante en la muerte celular programada de tipo II, durante la cual se acumulan vacuolas autofágicas, aunque actualmente se piensa que, en células con una maquinaria apoptótica intacta, la autofagia es fundamentalmente un mecanismo supervivencia más que de muerte celular (Levine and Yuan 2005).

Las funciones generales admitidas para la autofagia en levaduras se centran en la función de reciclado de componentes celulares previo a la entrada de la célula en fases de resistencia como la esporulación o la fase estacionaria de crecimiento, actuando principalmente como mecanismo de supervivencia. La ausencia de genes como *ATG2* (Briza, Bogengruber et al. 2002) impide la esporulación. Este proceso es una respuesta de resistencia de las células en entornos pobres en nutrientes y permite que la célula resista a largos periodos de inanición (Barth and Thumm 2001). En células haploides la respuesta ante estas condiciones es la entrada en un proceso de resistencia denominado fase estacionaria (Werner-Washburne, Braun et al. 1993) que reduce el metabolismo celular al mínimo y se adoptan diversos cambios metabólicos que permiten la extensión de la longevidad de tipo cronológico (Lin, Manchester et al. 2001), una medida de la resistencia ante un entorno pobre en nutrientes (Alvers, Fishwick et al. 2009). En ambos casos es

requerida la respiración celular, una función característica de la mitocondria y objeto de degradación vía autofagia.

6.3. Maquinaria molecular del proceso de macroautofagia

La macroautofagia se inicia con la formación de una vesícula de doble membrana mediante que engloba el material a degradar, formando una estructura denominada autofagosoma. Esta vesícula de doble membrana se fusiona posteriormente al lisosoma, formando el autolisosoma, para proceder a la degradación y el reciclado del cargo mediante hidrólisis en el lumen lisosomal.

Actualmente se acepta que el proceso de la macroautofagia es inducible, siendo el único proceso de tráfico de membrana con esta naturaleza. Los inductores más comunes de la autofagia son la falta de nutrientes (nitrógeno o carbono) y algunos antibióticos macrólidos como la rapamicina. La autofagia se activa al perderse la inhibición producida por la quinasa TOR (*target of rapamycin*) (Carrera 2004) que en condiciones óptimas nutricionales reprime la autofagia. En el caso de células de mamífero, el mecanismo de inducción a través de mTor (homólogo de mamíferos de la quinasa de levadura TOR) es algo más complejo. En este caso mTor responde, además de a cambios nutricionales, a estímulos hormonales como la insulina y el factor de crecimiento similar a insulina-1 (IGF1) (Meijer and Codogno 2006).

De este modo, esta ruta dinámica puede dividirse en una serie de pasos consecutivos, comenzando por la inducción, reconocimiento del cargo, nucleación del autofagosoma, elongación y finalización del autofagosoma, fusión del autofagosoma al lisosoma/vacuola, degradación del autofagosoma y del cargo, y finalmente el reciclaje de las macromoléculas resultantes (Huang, Reggiori et al. 2007).

En el modelo de levadura se llevó a cabo la primera caracterización de la autofagia a nivel molecular y todos los genes implicados forman la serie ATG. Estos genes están conservados en la mayor parte de los organismos estudiados (Huang and Klionsky 2002; Klionsky 2007).

6.4. La degradación selectiva de mitocondrias por macroautofagia

En las células eucariotas, las mitocondrias son la fuente principal de ATP, además de ser un orgánulo esencial para el crecimiento celular y la supervivencia en el medio aeróbico. Así mismo, las mitocondrias juegan un papel crucial en el proceso de muerte celular programada (Nieminen 2003). Una consecuencia de la actividad mitocondrial es la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como son el superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilos. Estos ROS producen daños en proteínas, lípidos y ácidos nucleicos e inician las reacciones de peroxidación. Un daño en las proteínas y ADN mitocondriales produce una mayor generación de ROS, y la acumulación de daño mitocondrial está asociado al envejecimiento, cáncer y enfermedades neurodegenerativas. Como consecuencia, la célula ha desarrollado mecanismos específicos para asegurar un control de la calidad de éste orgánulo. Por otro lado, la célula es capaz de degradar selectivamente las mitocondrias que presenten una acumulación de daño excesivo para los sistemas de reparación. Para mantener la masa mitocondrial, se produce un reciclaje, y las nuevas mitocondrias se generan por fisión binaria de mitocondrias pre-existentes, como en la división de las bacterias. En este sentido, aunque la mitofagia pueda considerarse como un proceso de degradación, realmente se considera como un elemento más del ciclo mitocondrial (Twig, Elorza et al. 2008) donde las nuevas mitocondrias producidas por fisión se despolarizan y pasan por un control de calidad que si no es superado las lleva a su degradación por autofagia (Twig and Shirihai 2010). Esta función mantiene un equilibrio entre biogénesis y degradación, el cual puede verse alterado ante una disfunción mitocondrial. En este caso, la deficiencia de coenzima Q en fibroblastos de pacientes conduce a una mitofagia masiva (Rodriguez-Hernandez, Cordero et al. 2009) que se entiende como un mecanismo descontrolado y por tanto patológico de eliminación de mitocondrias defectuosas. En otros casos, la mitofagia ha demostrado ser un mecanismo de detoxificación tras la ingesta de alcohol ya que bloquea la despolarización mitocondrial y la acumulación de lípidos, dos efectos producidos por el etanol en los hepatocitos (Ding, Li et al. 2011). Este efecto sobre la eliminación de los acúmulos de lípidos ha permitido relacionar la regulación del metabolismo de lípidos con la macroautofagia (Singh, Kaushik et al. 2009). Otras funciones de la mitofagia son requeridas en procesos de desarrollo, como es el

caso de la maduración de reticulocitos (Mortensen, Ferguson et al. 2010). En conjunto, todo sugiere un mecanismo selectivo, pero no exento de debate.

En la actualidad, existe este debate alrededor de la existencia de una mitofagia selectiva o genérica, que se ha inclinado hacia la coexistencia de los ambos modelos tanto en levadura (Kissova, Salin et al. 2007) como en otros organismos (Kim, Rodriguez-Enriquez et al. 2007).

6.4.1. La mitofagia en *S. cerevisiae*

En la levadura, la mitofagia posee un importante papel en la eliminación del exceso de mitocondrias, aunque no existen evidencias de su implicación en el control de calidad mitocondrial (Kanki, Klionsky et al. 2011). La mitofagia se induce, no sólo ante una privación de nutrientes, sino también en fase estacionaria en medios con fuentes de carbono no fermentables, cuando disminuyen los requerimientos energéticos celulares y es necesario eliminar el exceso de la masa mitocondrial generada previamente. Sin embargo la mitofagia permanece bloqueada en medio con lactato como fuente de carbono, aun en condiciones de privación de nitrógeno (Kanki and Klionsky 2008).

Aunque la mitofagia requiere la mayor parte de las proteínas Atg, existen componentes específicos de la degradación selectiva de mitocondrias.

Atg1p es una proteína quinasa implicada en la iniciación de la autofagia y necesaria para la mitofagia específica, aunque se ha descartado que su actividad quinasa esté implicada en la activación de la mitofagia (Abeliovich, Zhang et al. 2003). La fosforilación de dicha proteína mediante la proteína quinasa dependiente de AMP Hog1p es necesaria para la activación de la mitofagia.

La proteína Uth1p es una proteína sin función conocida localizada en la membrana mitocondrial externa (Velours, Boucheron et al. 2002) aunque no se ha precisado su orientación en dicha membrana. La ausencia de Uth1p induce resistencia a rapamicina y a la privación de nutrientes (Kissova, Deffieu et al. 2004). Su papel en la mitofagia se demostró al no detectarse degradación de marcadores mitocondriales en mutantes *uth1*, aunque sí se pudo demostrar el mantenimiento de la ruta autofágica clásica.

En un análisis masivo de genes implicados en mitofagia en levadura se identificó la proteína Atg32. La delección de *ATG32* produce un defecto en la degradación de mitocondrias sin afectar a la autofagia de otros orgánulos (Kanki, Wang et al. 2009; Okamoto, Kondo-Okamoto et al. 2009). Esta proteína se localiza en la membrana externa de la mitocondria, mostrando el dominio carboxi-terminal al espacio intermembrana, y el dominio amino-terminal orientado hacia el citosol (Okamoto, Kondo-Okamoto et al. 2009). Atg32p se une a las proteínas Atg11 y Atg8. Atg11p es una proteína que interactúa con proteínas receptoras del cargo para la autofagia selectiva, lo cual hace pensar que Atg32p sea el receptor en la mitofagia (Kanki, Wang et al. 2009). Dicha interacción incrementa especialmente ante una privación de nutrientes (nitrógeno). Atg8p es un componente del autofagosoma involucrado en la expansión del mismo. Su ausencia no produce un efecto apreciable en la actividad o morfología mitocondrial.

Otra proteína determinada en el análisis génico relacionada con la mitofagia es Atg33p (Kanki, Wang et al. 2009). Esta proteína sin función conocida localiza en la membrana mitocondrial externa orientada hacia el citosol, y su delección bloquea la mitofagia en mayor medida al alcanzar la fase estacionaria, aunque también se encuentra afectada ante una privación de nitrógeno. Ptc6p (también conocida como Aup1) también está implicado en la degradación selectiva de mitocondrias en fase estacionaria (Tal, Winter et al. 2007) mediante una regulación por defosforilación del factor de transcripción de la respuesta retrógrada RTG3 (Journé, Mor et al. 2009).

6.4.2. La mitofagia en células de mamífero

Aunque la autofagia es un proceso que sucede en todos los tipos celulares en condiciones fisiológicas para el mantenimiento de las estructuras sin necesidad de ningún estímulo, también es un proceso susceptible de inducción. Existen multitud de condiciones bajo las cuales se dispara la autofagia, como es la privación de nutrientes, producción de especies reactivas de oxígeno o diversos fármacos (Lemasters 2005). Un estímulo común en el disparo de la mitofagia es la pérdida de potencial mitocondrial y un incremento en los niveles de ROS.

En células de mamífero se conocen hasta ahora dos procesos diferenciados de estimulación de la mitofagia: Nix/BNIP3L, implicado en la eliminación de la masa

mitocondrial en la maduración de los eritrocitos, y el sistema PINK1-Parkin, involucrado en el reciclaje de mitocondrias dañadas (Youle and Narendra 2011) e íntimamente relacionado con patologías como la enfermedad de Parkinson.

Nix, miembro de la familia de proteínas Bcl-2, es una proteína localizada en la membrana externa mitocondrial, desde donde interactúa con LC3, el ortólogo en mamíferos de la proteína de levadura Atg8. El estímulo de disparo de la mitofagia en la fase terminal de la maduración de los eritrocitos aún resulta desconocido. Se piensa que Nix podría ser el homólogo de Atg32p en mamíferos, aunque no se conoce si éste necesita un adaptador para su detección por el autofagosoma.

Cuando un incremento de los niveles de ROS, un agente desacoplante (como el CCCP) o daños en el ADN_m producen la despolarización de la mitocondria, la putativa proteína quinasa dependiente de PTEN-1 (PINK1) se acumula en la membrana externa mitocondrial. En ese momento, PINK1 incorpora a Parkin (PARK2), una ubiquitina ligasa E3, a la mitocondria dañada, donde ésta ubiquitina ciertas proteínas de la superficie mitocondrial (Geisler, Holmstrom et al. 2010; Geisler, Holmstrom et al. 2010; Matsuda, Sato et al. 2010; Matsuda and Tanaka 2010) como VDAC1 (porina) o las mitofusinas 1 y 2 (Mfn1/2), previniendo así la fusión de mitocondrias dañadas con otras sanas. La ubiquitinación produce la unión de proteínas adaptadoras como p62 y la histona deacetilasa 6 (HDAC6) (Lee, Nagano et al. 2010), las cuales permiten el secuestro del cargo ubiquitilado en los autofagosomas mediante unión a LC3 (Pankiv, Clausen et al. 2007) para su degradación.

6.5. Mitofagia y deficiencias de coenzima Q₁₀

La deficiencia de coenzima Q está asociada a variedad de patologías. Análisis de fibroblastos de pacientes con deficiencias de CoQ₁₀ muestran defectos en el estado metabólico celular. En estas células se han encontrado no sólo una deficiencia en las actividades de la cadena respiratoria, sino también un incremento en la producción de ROS, disminución del potencial de membrana y activación del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial -MPTP- (Rodriguez-Hernandez, Cordero et al. 2009) (Cotan, Cordero et al. 2011). Recientes estudios en fibroblastos de pacientes con déficit de CoQ₁₀ demuestran la existencia de una activación del proceso selectivo de degradación de la masa mitocondrial, mitofagia, como

mecanismo protector de la célula, dado que su inhibición resulta en muerte por apoptosis. Este proceso puede prevenirse con tratamientos antioxidantes o inhibiendo el MPTP con ciclosporina (Rodríguez-Hernandez, Cordero et al. 2009), lo cual indica que su activación es debida al daño generado por las especies reactivas de oxígeno generadas en mitocondrias disfuncionales y por la pérdida de potencial.

La mitofagia ejerce un importante papel en el mantenimiento de la homeostasis y en la eliminación de mitocondrias dañadas, y en la deficiencia de coenzima Q resulta de vital importancia para la supervivencia celular (Rodríguez-Hernandez, Cordero et al. 2009; Cotan, Cordero et al. 2011)

7. La síntesis de coenzima Q, cruce de caminos entre bioenergética celular, el reciclado de componentes celulares y la longevidad celular.

Como se ha comentado anteriormente, el mayor hándicap en el tratamiento de aquellas patologías que cursan con un déficit de CoQ₁₀ es la baja biodisponibilidad del mismo, resultando en diversas ocasiones ineficaz la complementación en la dieta para la mejoría del paciente. De este problema nace la necesidad de nuevas vías de estudio para tratamientos enfocados a incrementar los niveles endógenos del paciente, con el fin de obtener no sólo un incremento de los niveles, sino también un CoQ₁₀ funcional y en la correcta localización para ejercer su actividad. Por ello, en los últimos años un mayor número de estudios relativos a la regulación de la biosíntesis de coenzima Q se han llevado a cabo.

La conservación de una enzima fosfatasa desde levadura, pasando por insectos y nematodos, hasta mamíferos, incluido *Homo sapiens*, implicada en la regulación positiva de la síntesis de coenzima Q, convierte a Ptc7 en una susceptible diana para la búsqueda de fármacos que incrementen su actividad.

Un aumento de la actividad de PPTC7 incrementaría la función mitocondrial en dos posibles vías;

- a. Mediante un aumento de la disponibilidad de coenzima Q. Ello afectaría de forma particular a pacientes con deficiencia de coenzima Q y de forma general a pacientes con deficiencia mitocondrial.
- b. Activación de procesos de reciclado de componentes celulares como la autofagia y/o mitofagia. La eliminación de organulos inservibles o dañados podría contribuir a una mejora de pacientes con deficiencia mitocondrial.

De manera general un incremento de los niveles de coenzima Q inducido por un incremento de la actividad de PPTC7 podría paliar la pérdida producida durante el envejecimiento. Recientemente, la autofagia se ha asociado a la lista de procesos que regulan o modulan el proceso de envejecimiento (Barnett and Brewer 2011; Hubbard, Valdor et al. 2011; Markaki and Tavernarakis 2011; Santos, Correia et al. 2011). Ello potencia aun más el potencial papel de PPTC7 como cruce de caminos en la regulación del metabolismo bioenergético. Sin embargo, los datos disponibles sobre la actividad de PPTC7 corresponden al ortólogo en levadura. Se hace

necesario caracterizar la función, desconocida en este momento, de la proteína PPTC7 humana, demostrar su función molecular como una fosfatasa, y demostrar su implicación en la regulación de la bioenergética mitocondrial y su papel en la iniciación o transmisión de señales activadoras de la autofagia/mitofagia.

Estos son las cuestiones a las que intenta responder este trabajo.

OBJETIVOS

El propósito de esta tesis es elucidar los mecanismos a través de los cuales la célula regula la biosíntesis de coenzima Q₁₀. Para afrontar este estudio, y basándonos en datos previos, se han desarrollado los siguientes objetivos:

1. Caracterizar a la proteína PPTC7 como una fosfatasa mitocondrial.
2. Dilucidar la participación de PPTC7 en la regulación de la síntesis de coenzima Q₁₀ en células humanas.
3. Determinar la función de PPTC7 en la iniciación y/o regulación de la autofagia/mitofagia.
4. Relacionar la función autofágica de PPTC7 con la bioenergética celular.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

1. Caracterización de Pptc7 como una fosfatasa mitocondrial.

Desde finales de los 90, cuando se describió el primer caso de una patología asociada a un defecto en la síntesis de coenzima Q₁₀ (Bentinger, Grunler et al. 1998), los tratamientos aplicados se han limitado a la complementación con CoQ₁₀ exógeno o moléculas análogas de menor hidrofobicidad. Los resultados obtenidos de estas terapias, a pesar de que en algunos casos los pacientes presentaron mejoría, no han sido satisfactorios en todos los casos (Aure, Benoist et al. 2004), lo cual se debe en parte a la dificultad de esta molécula hidrofóbica de atravesar la barrera hematoencefálica. En los últimos años, la regulación de la biosíntesis de coenzima Q ha sido objeto de estudio debido a un creciente interés en la obtención de nuevas formas alternativas a la complementación con CoQ₁₀ en la dieta para el tratamiento de aquellas enfermedades que cursen con un déficit del mismo. La mayoría de los estudios se han generado utilizando *Saccharomyces cerevisiae* como modelo, y pocos datos de los mecanismos moleculares implicados en la regulación de síntesis de coenzima Q se han obtenido en células de mamífero.

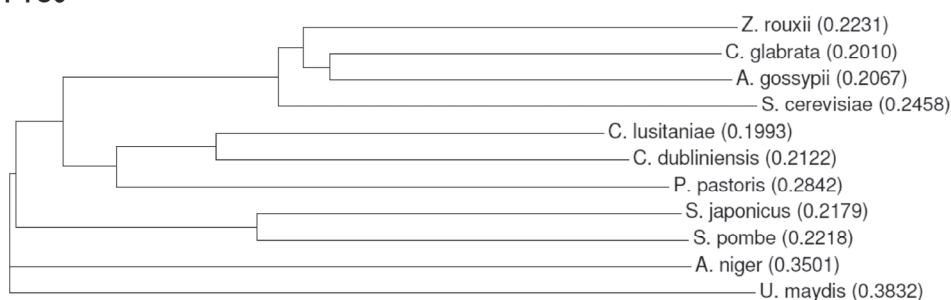
Se han descrito algunas drogas que afectan a los niveles de coenzima Q₁₀, como es el caso de la camptotecina, que regula la expresión de *COQ7* en células tumorales a través del factor de transcripción NF-κB, incrementando los niveles de CoQ₁₀ (Brea-Calvo, Siendones et al. 2009). La proteína codificada por este gen participa en la modificación de un precursor tardío de la biosíntesis de CoQ, y ha sido descrita como punto de regulación de la ruta en levadura (Padilla, Tran et al. 2009). Recientemente, trabajos de nuestro grupo han caracterizado en levaduras un sistema dual de regulación de la actividad de Coq7p por ciclos de fosforilación, mediante el cual dos enzimas fosfatasa, Ptc6p y Ptc7p, activan esta monooxigenasa, permitiendo el tránsito del precursor tardío DMQ₆ acumulado a CoQ₆ (Martin-Montalvo 2009).

Un sistema análogo de regulación ya ha sido descrito en la mitocondria asociado a la glucólisis y el ciclo del ácido tricarboxílico, dos grandes rutas de generación de energía. En *S. cerevisiae*, el complejo de la piruvato dehidrogenasa (PDH) permanece inactivo por la fosforilación de dos quinasas, y se activa por la acción de dos fosfatasa (Gey, Czupalla et al. 2008), una de las cuales es Ptc6p. En

humanos este sistema está compuesto por cuatro quinasas específicas de tejido y dos fosfatasas (Strumilo 2005), aunque no existe homología entre ninguna de ellas y Ptc6p de levadura, a pesar de pertenecer a la misma familia.

En un análisis bioinformático, mediante alineamiento de las secuencias peptídicas de Ptc6p y Ptc7p frente a una base de datos de polipéptidos (Basic Local Alignment Search Tool, BLAST-p, en NCBI), se encontraron homólogos en eucariotas superiores tan sólo de *PTC7* (Figura 1.1). El gen que codifica para la fosfatasa Ptc6p se conserva solamente en el genoma de representantes del reino Fungi.

PTC6



PTC7

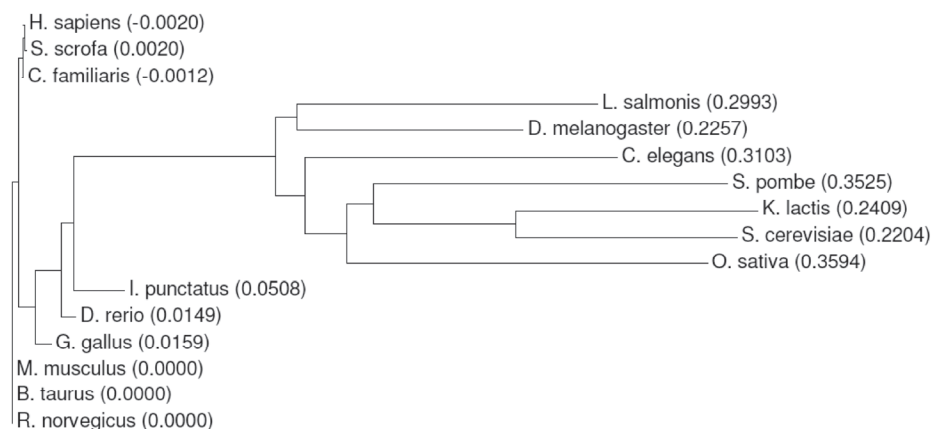


Figura 1.1. Árbol filogenético de Ptc6p y Ptc7p. La proteína Ptc7 está conservada en eucariotas, desde levaduras, pasando por nematodos e insectos, hasta humano. Por el contrario, Ptc6p se restringe al reino Fungi.

Los análisis previos de expresión de *PTC6* y *PTC7*, junto con la literatura existente, apuntan a que este sistema doble no actúa al mismo tiempo, sino que cada una de

las fosfatasas responde a diferentes estímulos. En el caso de Ptc6p parece actuar en respuesta a cambios de la fuente de carbono o en el tránsito de la fase de crecimiento exponencial a la fase estacionaria, mientras que Ptc7p parece responder mejor a estímulos de estrés. Esto puede explicar el mantenimiento en la filogenia tan sólo de *PPTC7*, puesto que Ptc6p podría estar regulando diversas rutas implicadas en el cambio metabólico, de la fermentación a la respiración, fenómeno que se pierde en el metabolismo de eucariotas superiores.

La literatura sobre Pptc7 y sus funciones en eucariotas superiores es escasa, siendo la mayoría producto de estudios de variaciones de expresión génica a gran escala. En el primer estudio desde la aparición en la base de datos de su secuencia, Linslay y sus colegas la identifican como una proteína fosfatasa 2C activada en células T (TA-PP2C). En su trabajo encuentran una regulación positiva de su expresión durante la activación de linfocitos T (Mao, Biery et al. 2004), y que se encuentra co-regulado con el transcrito interleucina-2 (IL-2). De los genes identificados, se centran en aquellos con función desconocida, de los que resultan cuatro candidatos, TA-PP2C y otros tres que previamente se habían relacionado con el metabolismo del ciclo del ácido cítrico. Más adelante, durante el desarrollo de esta tesis, aparecen dos trabajos que relacionan a *PPTC7* con mecanismos de supervivencia y con una actividad antitumoral. En 2008 Saito et al. realizan un análisis de expresión génica en células B maduras tras un tratamiento con el factor de activación de células B (BAFF), observando un incremento del transcrito de *PPTC7*. Este factor está relacionado con la supervivencia y la maduración de las células B. BAFF inhibe la apoptosis en estas células y activa a NF- κ B, aumentando la expresión de *BCL2* y otros genes de supervivencia (Saito, Miyagawa et al. 2008). Un año más tarde, en un estudio para la búsqueda de tratamientos para el rabdomiosarcoma (RMS) mediante silenciamiento de fosfatasas o quinasas, se le atribuye a Pptc7 actividad antitumoral. Mediante silenciamiento con oligos de ARN de cadena simple (siRNA) en líneas celulares de RMS alveolar, observan una disminución del crecimiento de un 60-70% al silenciar *PPTC7* (Hu, Lee et al. 2009). En ese mismo año, en un estudio sobre el perfil proteómico de mitocondrias funcionales de músculo esquelético humano se identifica por primera vez la proteína Pptc7 *in vivo*, la cual se localiza en la mitocondria (Lefort, Yi et al. 2009). Este mismo año se publicó un trabajo sobre envejecimiento utilizando como modelo

una población ecuatoriana con una mutación en el receptor de la hormona del crecimiento (GHR) que provoca una deficiencia grave de GHR y del factor de crecimiento similar a insulina-1 (IGF-1). El fenotipo más llamativo de esta población es la ausencia de casos de diabetes y cáncer. El tratamiento de células en cultivo con suero proveniente de estos individuos genera hipersensibilidad a insulina y una disminución de sus niveles. Por otro lado produce un descenso de la expresión de una serie de genes implicados en la longevidad, como *TOR* (diana de rapamicina) implicado en la inhibición de procesos de autofagia, y de *SOD2* (superóxido dismutasa 2). Entre los genes regulados positivamente se encuentra *PPTC7*, aunque en este estudio no se profundiza en la implicación del mismo en el control del envejecimiento y el cáncer o la diabetes (Guevara-Aguirre, Balasubramanian et al. 2011). Hasta ahora, no se conoce información adicional.

1.1. La proteína Pptc7 pertenece a la familia PP2C- α de fosfatasas celulares

El gen homólogo a *PTC7* en *Homo sapiens*, incluido en la base de datos de *Homologene*, es *PPTC7*, sobre el cual se centra el estudio de esta tesis.

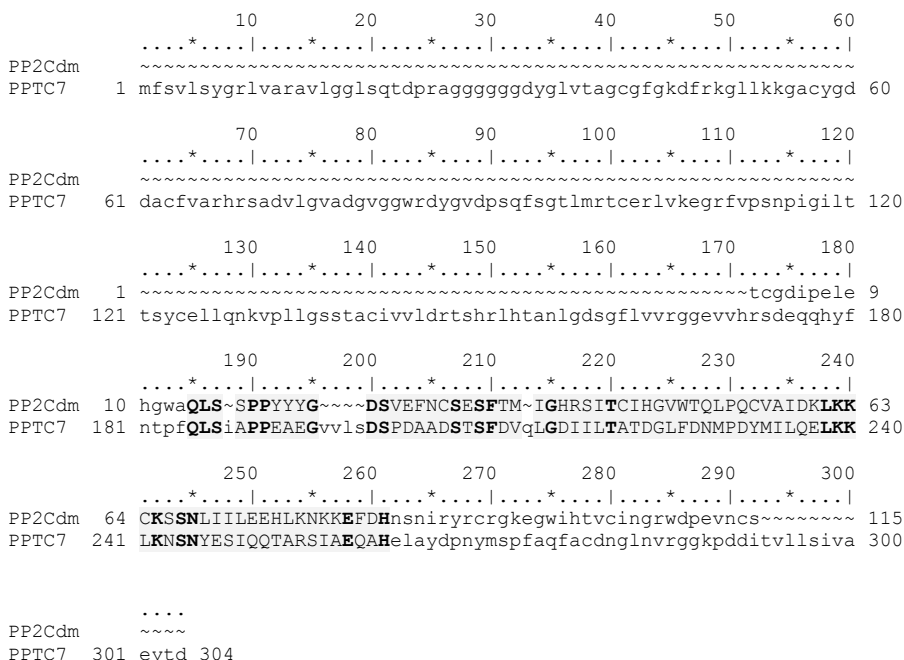


Figura 1.2. Alineamiento de la secuencia peptídica de Pptc7 con el dominio PP2C. La identidad entre el dominio de la superfamilia PP2C (PP2Cdm), formado por 77 residuos, y la secuencia de Pptc7 es del 30%, con un E-Valor de 7.3.

Dicho gen se encuentra en el cromosoma 12 (12q24.11) y codifica para una presunta fosfatasa, Pptc7, la cual, al igual que su homólogo en levadura, posee un dominio catalítico en la secuencia peptídica que la relaciona con la familia de fosfatasas de serina/treonina 2C (PP2C) (Schultz, Milpetz et al. 1998; Letunic, Doerks et al. 2009) (Figura 1.2). Tan sólo se conoce una isoforma en humanos (NP 644812), y ningún procesamiento alternativo del ARNm ha sido descrito.

El dominio catalítico PP2C se localiza en el extremo C-terminal del polipéptido, y está conservado en todos los miembros de esta familia de fosfatasas. Su estructura consiste en un sándwich central de láminas beta rodeado de hélices alfa (Bradford and Soltoff 1998) (Figura 1.3).

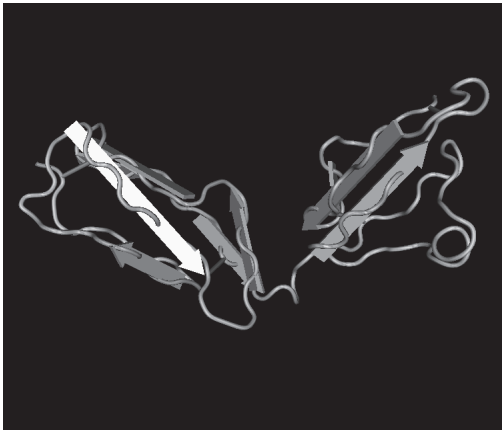


Figura 1.3. Predicción de la estructura secundaria tridimensional del dominio PP2C de Pptc7. El dominio catalítico posee una estructura característica formada un β -sándwich (las flechas marcan las láminas beta) rodeado de α -hélices (tubular).

Esta familia posee, en el dominio catalítico, un dominio de unión a metales (GO: 0046872) puesto que requieren Mg^{+2} y Mn^{+2} para su actividad (Cohen 1994; Das, Helps et al. 1996), y 11 motivos característicos altamente conservados de la secuencia peptídica (Bork, Brown et al. 1996).

En un alineamiento de secuencias proteicas (ClustalW) de homólogos de Ptc7p de diversas especies, desde levadura hasta humano, se observa que conservan, además de los mencionados dominios, los 11 motivos (Figura 1.4). Los motivos 7-11 comprenden el presunto dominio catalítico PP2C. Se ha sugerido que los motivos 5-6, los cuales se encuentran entre los más conservados, corresponden al dominio sustrato-específico o de unión a metales.

La fosfatasa mitocondrial PPTC7, punto de encuentro entre el metabolismo bioenergético y la mitofagia

MTS

H.sapiens -----MFSVLSYGR^LVARAVLGG----- 18
S.scrofa -----MFSVLSYGR^LVARAVLGG----- 18
B.taurus -----MFSVLSYGR^LVARAVLGG----- 18
M.musculus -----MFSVLSYGR^LVARAVLGG----- 18
G.gallus -----MFSVLSYGR^LVARAVLGG----- 18
D.rerio -----MFSVLSYGR^LVARAVLGG----- 18
X.laevis -----MFSVLSYGR^LVARAVLGG----- 18
C.elegans -----MVAGVRL^LLAYGR^LAVRAVFSASALDLGSTIGPE 33
S.cerevisiae -----MFANVGFRT^LLRVSRGPLYGSCSQT^LISFSKRTFYSSAKSG^LY----- 40
K.lactis -----MFI^LGIRQ^HVPRT^VFRS^MMVPVLF^AFTLY^VLLTV^FLDLY^KTL^SQRS^FSS^SAGS^NN----- 53
A.gossypii -----MFVGVGAGRL^GRGMLVAVI^AVMCHL^LITQAGFYQSAARR^F----- 40
C.albicans -----M^LSRRI^IGL^CLVL^VMSML^LTL^SSKNG^VSLGSS^FIK^TSARS^FASS^SRSY^WGGY^GKGS 58

:

H.sapiens -----LSQTDPRAGGG---GGGDYG---LVTAGCGFGKDFRKG-----L 51
S.scrofa -----LSQTDPRAGGGSGSGGGGDYG---LVTAGCGFGKDFRKG-----L 53
B.taurus -----LSQTDPRAGGGGGGGGGGDYG---LVTAGCGFGKDFRKG-----L 54
M.musculus -----LSQTDPRAGGGGGGGGGSSGDYGLV^TTAGCGFGKDFRKG-----L 57
G.gallus -----LSQTD^T-----RDYSLVTASCGFGKDFRKG-----I 44
D.rerio -----LSQTD^SR-----DYSLVSA^SF^GFGKDFRKG-----I 44
X.laevis -----LSQTD^SR-----DYSLV^TASCGFGK^DARKG-----I 44
C.elegans -----AISSGRRGLSSGSSKPKPSSE^GSPSPAPSAH^VENV^IASCA^GFPK^DMLNG^PS-----T 86
S.cerevisiae -----QSNNSHGDAYSSGS-----QSGF^TYK^TAVAF^QPKDR^DDLI^YQK^L---D 82
K.lactis -----SNSWS^SSSSS^SYS^A-----SSDA^FNY^QV^AI^AY^QPKDR^NEPI^YAK^LK---E 95
A.gossypii -----T^RQAG^TA^SY^GAG^WHG^QGS^DGL^TY^QT^AV^AFN^AKER^QD-----K 80
C.albicans -----A^R---RDY^STA^ASP^SAT^ASA^ASM^NY^DSA^LT^SV^SHY^NIA^VAF^QPK^DRE^ESN^LFK^KQ^PSP 113

:

Motivo 1 **Motivo 2**

H.sapiens LKKGACYGDDACFVARHRSADVLGVADGVGGWRDYGVDPSPQFSGTL^MTRCERLVKEGRFV 111
S.scrofa LKKGACYGDDACFVARHRSADVLGVADGVGGWRDYGVDPSPQFSGTL^MTRCERLVKEGRFV 113
B.taurus LKKGACYGDDACFVARHRSADVLGVADGVGGWRDYGVDPSPQFSGTL^MTRCERLVKEGRFV 114
M.musculus LKKGACYGDDACFVARHRSADVLGVADGVGGWRDYGVDPSPQFSGTL^MTRCERLVKEGRFV 117
G.gallus LKKGMICYGDDACFVARHRTADVLGVADGVGGWRDYGVDPSPQFSGTL^MTRCERLVKEGRFV 104
D.rerio LKKGMICYGDDACFIARHRSADVLGVADGVGGWRDYGVDPSPQFSGTL^MTRCERLVKEGRFV 104
X.laevis LKKGMICYGDDACFIARHRTADVLGVADGVGGWRDYGVDPSPQFS^ETL^MTRCERLVKEGRFV 104
C.elegans VLDKGVFGDDAWFISRFKNTFVVGVADGVGGWRKYGDPSAFSRR^LMKECEKRVQKGFDD 146
S.cerevisiae SIRSPTGEDNYFVTSNNVHDI^FAGVADGVGGWAEHGYDSSAISRELCK^MDEI^STALAEN 142
K.lactis SLQSPTGEDSYFVAPRSSSELYAGVADGIGGANHGYDSTAISRELCLAM^KSITLNS^SKD 155
A.gossypii KESSVTGEDNYFVGGSSG-LYVGVADGVGGWAAHGYDSSAISREL^CASLQ^EYAERALGS 139
C.albicans SLQSPSGEDNLFVSN^EKAGCIAVGVADGVGGWSEAGYDSSAISREL^CASLR^QFESG^TES 173

* . . ***** * * . : : * *

Motivo 3 **Motivo 4** **Motivo 5**

H.sapiens P-----SNPIGIL^TTSYCELLQNKVPL^LSSSTACIVVLD^RTSHR^LLHTANL^GDSGFLV^VRG 166
S.scrofa P-----SNPIGIL^TTSYCELLQNKVPL^LSSSTACIVVLD^RTSHR^LLHTANL^GDSGFLV^VRG 168
B.taurus P-----SNPIGIL^TTSYCELLQNKVPL^LSSSTACIVVLD^RTSHR^LLHTANL^GDSGFLV^VRG 169
M.musculus P-----SNPVGIL^TTSYCELLQNKVPL^LSSSTACIVVLD^RSSHR^LLHTANL^GDSGFLV^VRG 172
G.gallus P-----SNPVGIL^TAGYCELLQNKVPL^LSSSTACIVVLD^RTSHR^LLHTANL^GDSGFLV^VRG 159
D.rerio P-----SNPVGIL^TTSYELLQNKVPL^LSSSTACIVVLD^RQSHR^LLHTANL^GDSGFLV^VRG 159
X.laevis P-----TNPVGIL^TSSYRELLQNKVPL^LSSSTACLVVLD^RTSHR^LLHTANL^GDSGFLV^VRA 159
C.elegans P-----QKPE^SLLDYAFRASAEAPRV^G-SS^TACV^LVVH--QEK^LYSANL^GDSGFMV^VRN 198
S.cerevisiae SSKETLLTPKKIIGAAYAKIRDEKVVKVGTTAIVAHFP-SNGKLEVANL^GDSWCGV^FRD 201
K.lactis -----IAPKEL^LQMAFSSLLNEEKVEVGGTTAIVAH^LK-DDGT^LNVSNL^GDSWCGV^FRD 208
A.gossypii -----PGPKEL^LRQAYGKVRKDGIVKVGTTAVV^AQLR-PGGQLRVANL^GDSWCGV^FRE 192
C.albicans -----NPKQL^LSLAFKEVLS^SPQVEIGTTACL^GVLT-SDL^LQHVANL^GDSWCGV^FRD 225

* : : . . . : * * : . * : * * * * : . *

	Motivo 6	Motivo 7	Motivo 8	
H. sapiens	GEVVHRSDEQQHYFNTFFQLSIAPP-----EAEGVVLSDSPDAADSTSFVQLGDIIL			219
S. scrofa	GEVVHRSDEQQHYFNTFFQLSIAPP-----EAEGVVLSDSPDAADSTSFVQLGDIIL			221
B. taurus	GEVVHRSDEQQHYFNTFFQLSIAPP-----EAEGVVLSDSPDAADSTSFVQLGDIIL			222
M. musculus	GEVVHRSDEQQHYFNTFFQLSIAPP-----EAEGVVLSDSPDAADSTSFVQLGDIIL			225
G. gallus	GEVVHRSDEQQHYFNTFFQLSIAPP-----EAEGVVLSDSPDAADSTSFVQLGDIIL			212
D. rerio	GEVVHRSDEQQHYFNTFFQLSIAPP-----EAEGVVLSDSPDAADSTSFVQLGDIIL			212
X. laevis	GEVVHRSDEQQHYFNTFFQLSIAPP-----EAEGVVLSDSPDAADSTSFVQLGDIIL			212
C. elegans	GKIVSKSREQVHYFNAPFQITLPE-----GYQGFIG-DKADMADKDEMAVKKGDII			250
S. cerevisiae	SKLVFQTKFQTVGFNAPYQLSIIPEEMLKEAERRGSKYILNTPRDADEYSFQLKKKDI			261
K. lactis	CKLTFETKFOVGFNAPYQLAIIPKHIIIEAAEKNGSFIMNKPTDADDYSFKLQKNDIV			268
A. gossypii	SKLVFETAVQTLAFNTFYQLSIIPEHMLAEAAARTGRSYILNTPEDADEYFMLQSGDIV			252
C. albicans	SKLINETNFQTHNENTFFQLAKIPEEIVRQAKLQGRYIIDSPEAADEYTWLKRQDVVM			285
	:: : * **:*:**: *		:: **	:: *:::
	Motivo 8	Motivo 9	Motivo 10	
H. sapiens	TATDGLFDNMPDYMIQLKLLKNSNYESIQQTARSIAEQAHLAYDPNYS PFAQFACD			279
S. scrofa	TATDGLFDNMPDYMIQLKLLKNSNYESIQQTARSIAEQAHLAYDPNYS PFAQFACD			281
B. taurus	TATDGLFDNMPDYMIQLKLLKNSNYESIQQTARSIAEQAHLAYDPNYS PFAQFACD			282
M. musculus	TATDGLFDNMPDYMIQLKLLKNSNYESIQRARSIAEQAHLAYDPNYS PFAQFACD			285
G. gallus	TATDGLFDNMPDYMIQLKLLKNSNYESIQQTARSIAEQAHLAYDPNYS PFAQFACD			272
D. rerio	TATDGLFDNMPDYMIQLKLLKNTNYESIQQTAKSIAEQAHVLAIDPNYS PFAQFACD			272
X. laevis	TATDGLFDNMPDYMIQLKLLKNTNYESIQQTARSIAEQAHDLAYDPNYS PFAQFACD			272
C. elegans	LATDGVWDLNLSQQVLDQLKALDAG-KSNVQVEVCNALALTARRLAFDSKHNS PFAMKARE			309
S. cerevisiae	LATDGVTDNIATDDIELFLKDNAAARTNDELQLLSQKFVDNVVLSKDPNYS PFAQEI SK			321
K. lactis	LATDGVTDNIAVEDMELFLKDKIESS-QSLQDITQEFVVKVVTISKDPTFPVSFSQEYSK			327
A. gossypii	LATDGVTDNVAPEDIEMFIRDHGNMK--DLQAATEELVSEVARLSKDPNYS PFAQELQK			310
C. albicans	FATDGVTDNVIQDIELFLKDHETN--QLDDVANKFVKVVKVSKDSNFPFAQELSR			343
	****: **: : :	:: :	:: . : . : :	:: *... * * :
	Motivo 11			
H. sapiens	NG-LNVRGGKPDITVLLSIVA EYTD			304
S. scrofa	NG-LNVRGGKPDITVLLSIVA EYTD			306
B. taurus	NG-LNVRGGKPDITVLLSIVA EYTD			307
M. musculus	NG-LNVRGGKPDITVLLSIVA EYTD			310
G. gallus	NG-LNVRGGKPDITVLLSIVA EYTD			297
D. rerio	NG-LNVRGGKPDITVLLSIVA EYTD			297
X. laevis	YG-LNVRGGKPDITVLLSIVA EYTD			297
C. elegans	HG-FLAPGGKPDITVLLSIVA EYTD			330
S. cerevisiae	LTGKNYSGGKEDDITVVMVVRVD			343
K. lactis	LAGQYYSGGKEDDITVVMVVRVD			349
A. gossypii	LTGEPHIGGKEDDITVVMVVRVD			332
C. albicans	LTGQKYLGGKEDDITVVMVVRVD			365
	*** **::: :			

Figura 1.4. Alineamiento de diversos homólogos de Ptc7. Los 11 motivos característicos de la superfamilia PP2C se encuentran conservados en los homólogos de Ptc7p de distintos organismos, con algunos residuos altamente conservados (sombra gris oscura). Todos los polipéptidos poseen una predecible secuencia de importación mitocondrial (MITOPROT) (blanco sobre fondo negro) en el extremo N-terminal.

1.2. La proteína Pptc7 se localiza en la mitocondria

Un análisis de la secuencia de Pptc7 mediante el algoritmo MITOPROT (Claros 1995) revela una elevada propensión de localización mitocondrial de la proteína Pptc7, con una probabilidad del 89%. La secuencia de importación mitocondrial (Figura 1.4) posee una longitud de 11 amino ácidos, y está conservada en la mayoría de eucariotas pluricelulares, aunque en todos los casos la predicción de la sublocalización celular es la misma.

Para comprobar la veracidad de dicha predicción, se purificaron mitocondrias de células HeLa mediante centrifugación diferencial y se obtuvieron muestras puras tras cargar en gradiente de sacarosa.

Como se puede observar en la figura, Pptc7 co-fracciona con la subunidad 2 del complejo IV de la cadena mitocondrial en muestras de mitocondrias crudas y puras, así como en la fracción de mitoplastos. De este modo, podemos afirmar que Pptc7 se localiza en la mitocondria en células HeLa, previsiblemente en la matriz, dado que los mitoplastos son mitocondrias que carecen de la membrana externa, y la secuencia peptídica de Pptc7 no revela ningún previsible dominio transmembrana (predicción de proteína soluble por SOSUI, en Expasy).

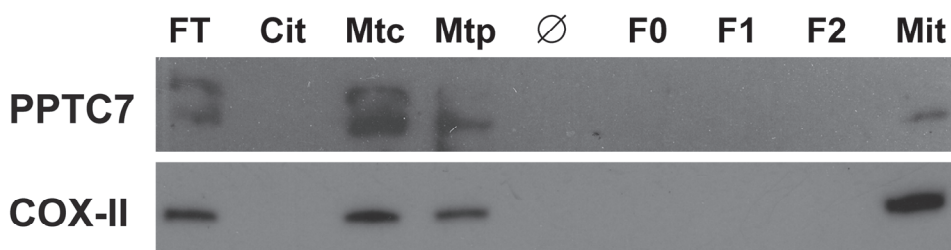


Figura 1.5. Pptc7 localiza en la mitocondria. Tras resolver muestras puras de mitocondria en una SDS-PAGE, se bloteó con anti-Pptc7. Como control se utilizó anti-COX II. FT, fracción total; Cit, citoplasma y núcleo; Mtc, fracción enriquecida en mitocondria; Mtp, mitoplasto, F0-F2, otras fracciones del gradiente de sacarosa; Mit, mitocondria pura.

En levadura se han descrito dos isoformas de Ptc7p por un procesamiento alternativo del ARNm, codificando para una proteína nuclear (Ptc7u) y otra mitocondrial (Ptc7s). En el caso de Pptc7, ninguna isoforma ha sido descrita hasta el momento, y mediante centrifugación diferencial no hemos detectado la presencia de esta proteína en la fracción núcleo-citoplasma (Figura 1.5). en levadura, la presencia del transcrito Ptc7u es dependiente de la fuente de carbono. Puede que esta isoforma no se conserve en eucariotas superiores, o que tan sólo se traduzca en determinadas situaciones.

1.3. La proteína GST-Pptc7 recombinante muestra actividad fosfatasa *in vitro* y se comporta como una fosfatasa de la familia PP2C.

El análisis bioinformático de la secuencia peptídica anota una supuesta fosfatasa de serinas/treoninas tipo 2C (PP2C), pero hasta ahora no ha sido descrita dicha actividad en esta proteína.

Existen diversos métodos para determinar actividad fosfatasa en proteínas recombinantes purificadas (Maehama, Taylor et al. 2000; Brautigan, Brown et al. 2005). Estos ensayos muestran la capacidad de una proteína de defosforilar *in vitro* ciertos sustratos.

La familia PP2C se caracteriza por su dependencia de Mg^{+2} o Mn^{+2} para su actividad y por su insensibilidad a inhibidores genéricos de la actividad de proteínas fosfatasas pertenecientes a otras familias, como son el ortovanadato sódico (Na_2VO_4) y el ácido ocadaico. Estas enzimas no poseen además ningún inhibidor específico de su actividad, lo que genera ciertas dificultades en su estudio. Para los ensayos realizados de actividad es esencial la adición de dichos cationes divalentes, además de un control con inhibidores genéricos.

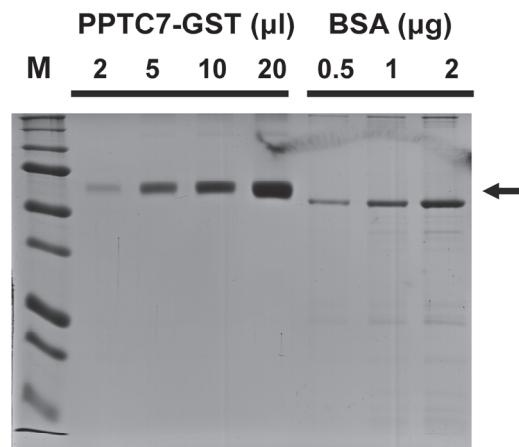


Figura 1.6. Purificación de GST-Pptc7. Tinción de plata de las muestras de proteína purificadas resueltas en una electroforesis 1D desnaturalizante en geles de acrilamida. GST-Pptc7 posee un tamaño de aproximadamente 58 KDa. Para la cuantificación se utilizó BSA.

Para comprobar la actividad catalítica de Pptc7, se purificaron dos versiones de la proteína recombinante. Una versión unida a un *tag* GST (plásmido pGEX) en el extremo amino terminal, y otra unida a un *tag* MBP (plásmido pMAL). Dado que la

secuencia de importación mitocondrial se procesa al transportarse a la mitocondria, se eliminó de la proteína recombinante. La purificación se llevó a cabo en bacterias mediante unión por afinidad a esferas de sefarosa. Durante la purificación se mantuvieron condiciones no desnaturalizantes. Tanto la pureza como la concentración del extracto se cuantificaron en geles de acrilamida y tinción de plata (Figura 1.6).

Se realizaron diversos ensayos *in vitro* para determinar la actividad fosfatasa. Como control positivo se utilizó la proteína recombinante GST-Pp2 α , y como control negativo albúmina de suero bovino (BSA).

1.4. Pptc7 es capaz de defosforilar al sustrato orgánico paranitrofenil-fosfato

En un ensayo colorimétrico se utilizó como sustrato paranitrofenil-fosfato (pNPP), un sustrato orgánico no peptídico de carácter genérico que puede ser defosforilado por fosfatasas pertenecientes a cualquier familia. El pNPP, al ser defosforilado, genera paranitrofenol (*p*-nitrofenol), un producto cromogénico con absorbancia a 405 nm (Mackintosh and Moorhead 1993).

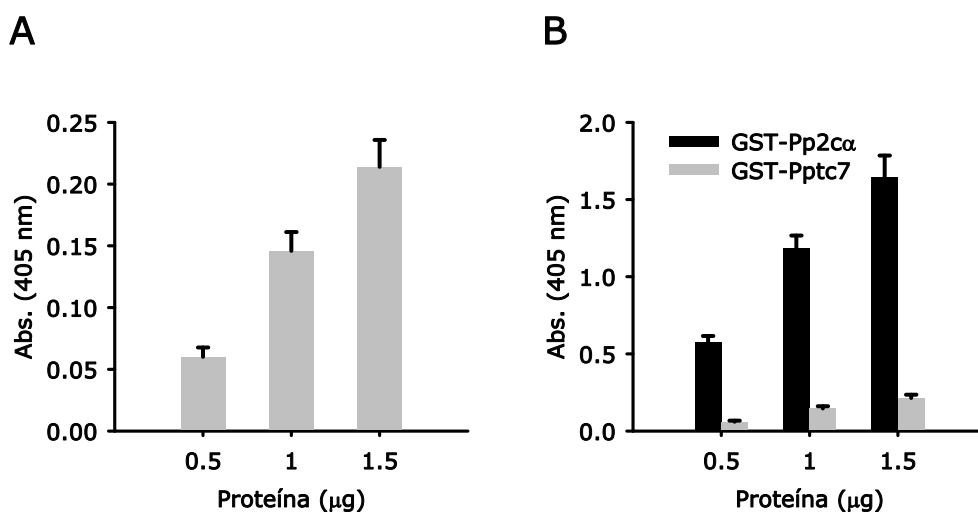


Figura 1.7. Pptc7 posee actividad p-NPP fosfatasa. Ensayo de defosforilación de paranitrofenil-fosfato. La liberación del grupo fosfato (formación de paranitrofenol) se cuantificó mediante espectrofotometría a 405 nm. **A:** En el ensayo se utilizaron 0.5, 1 y 1.5 μ g de la proteína recombinante purificada GST-Pptc7. **B:** Como control positivo se utilizó GST-Pp2 α . Como control negativo se utilizó BSA a la misma concentración que la enzima. Los valores corresponden al promedio de al menos tres ensayos independientes \pm SD.

La proteína recombinante GST-Pptc7 mostró actividad, la cual, aunque resultó menor que el control positivo GST-Pp2c α , se encuentra dentro del rango aceptado en la literatura (Brautigan, Brown et al. 2005). La actividad se realizó con cantidades crecientes de fosfatasa, observándose un incremento de la absorbancia dependiente de la concentración de enzima (Figura 1.7). La actividad específica para dicho ensayo es de $66,79 \pm 1,054$ nmol/min/mg proteína.

1.5. Pptc7 requiere Mg^{2+} y Mn^{2+} para su actividad en un ensayo pNPP

Las fosfatasas tipo PP2C, como ya se ha comentado anteriormente, requieren Mg^{+2} y Mn^{+2} para su actividad. La sustitución de ambos cationes por otro metal bivalente como el Fe^{+2} al realizar el ensayo pNPP disminuye la formación de paranitrofenol (Figura 1.8.A). El uso de otro metal no bivalente como el Fe^{3+} elimina por completo la actividad de GST-Pptc7 (Figura 1.8.B). Es por tanto necesaria la presencia de los cofactores específicos de PP2C para una actividad óptima de Pptc7, sugiriendo su inclusión en esta familia de fosfatasas.

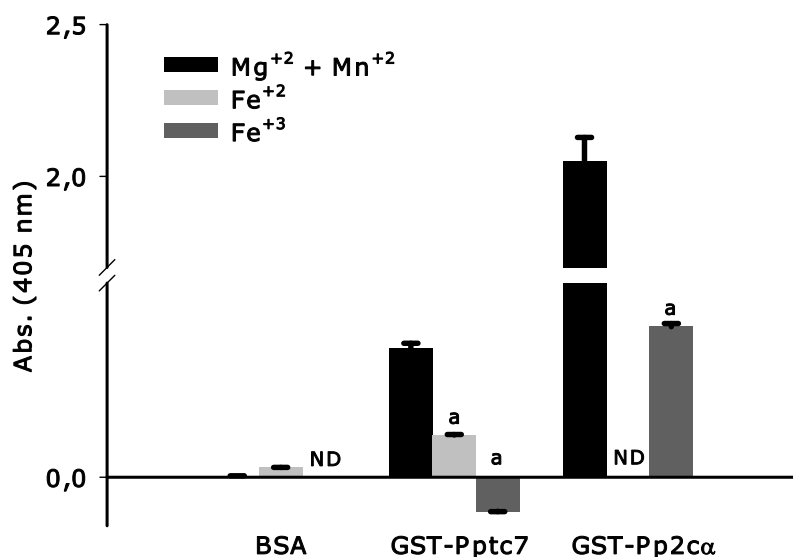


Figura 1.8. La actividad pNPP fosfatasa de GST-Pptc7 requiere Mg^{+2} y Mn^{+2} como cofactores. Ensayo fosfatasa con paranitrofenilfosfato con Mg^{+2} y Mn^{+2} o con Fe^{+2} o Fe^{+3} como cofactores. En el ensayo se utilizaron 1.5 μ g de GST-Pptc7. Como control negativo se utilizó la misma cantidad de BSA, y como control positivo GST-Pp2c α . Media de al menos tres ensayos independientes \pm SD, $P < 0.003$

1.6. Caracterización de la cinética básica de Pptc7 con pNPP

Mediante el ensayo con paranitrofenil-fosfato, y utilizando Mn^{+2} y Mg^{+2} como cofactores, se determinaron a su vez los parámetros cinéticos. La actividad se cuantificó utilizando 1 μg de GST-Pptc7 y concentraciones crecientes de pNPP en un rango de 0-16 mM. Como puede apreciarse en la figura, la actividad de la proteína recombinante mostró una cinética de Michaelis-Menten, aumentando la velocidad de la actividad de la enzima al incrementar las concentraciones crecientes de sustrato, hasta llegar a una velocidad máxima (Figura 1.9).

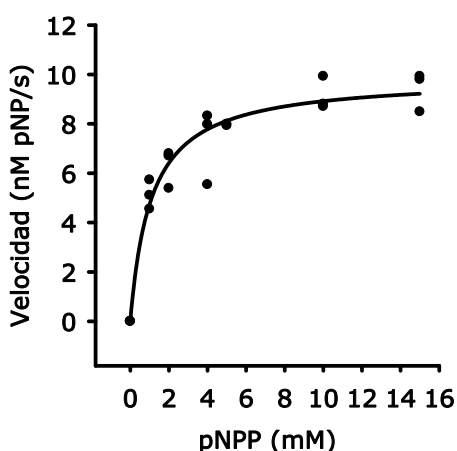


Figura 1.9. Cinética de Michaelis-Menten. Cuantificación de la formación de p-nitrofenol a partir de concentraciones crecientes de p-nitrofenil-fosfato para una cantidad fija de 1 μg de GST-Pptc7.

Para el cálculo de V_{max} y de K_m se realizó una representación del diagrama de Lineweaver-Burk. Para este ensayo, la velocidad máxima es de $10,01 \pm 0,28$ nM pNPP.cm/s, con una $K_m=1,0339 \pm 0,1341$ mM. Los valores de K_m entran dentro del rango descrito para PNPP de 0.5-10 mM (Pot, Woodford et al. 1991; Takai and Mieskes 1991; Zhuo, Clemens et al. 1993) para las condiciones descritas del ensayo.

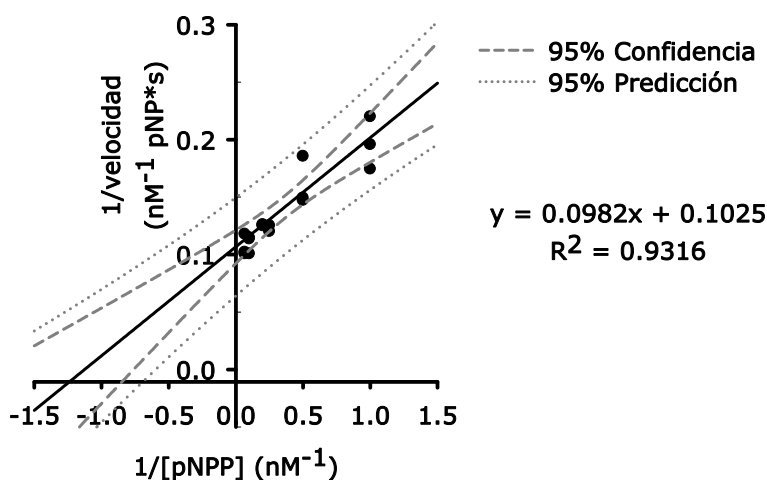


Figura 1.10. Representación de Lineweaver-Burk. Los parámetros cinéticos de la actividad fosfatasa de GST-Pptc7 sobre el sustrato pNPP se obtuvieron mediante una representación de la inversa de la velocidad de reacción frente a la inversa de la concentración de sustrato.

Estos datos nos reafirman la idea de que Pptc7 es una fosfatasa, y que su actividad pNPP presenta una cinética clásica de Michaelis-Menten.

1.7. Pptc7 defosforila otros sustratos orgánicos como el DiFMUP

Dada la baja actividad obtenida en comparación al control positivo Pp2ca, se decidió realizar otro ensayo de actividad fosfatasa con un sustrato orgánico alternativo. Para ello se utilizó 6,8-difluoro-4-metilumbeliferil fosfato (DiFMUP), sustrato utilizado ampliamente para la caracterización de fosfatasas pertenecientes a cualquier subfamilia. Este compuesto, al ser defosforilado libera 6,8-difluoro-metilumbeliferona, el cual emite fluorescencia, pudiéndose cuantificar mediante un fluorímetro.

Al igual que en el ensayo anterior, se utilizaron BSA y GST- Pp2ca como controles negativo y positivo respectivamente. En este caso se añadieron 0.5 µg de enzima (o BSA) a la reacción. Para comprobar la no interferencia del tag GST en la actividad, se utilizaron ambas versiones de proteína recombinante purificada, GST-Pptc7 y MBP-Pptc7.

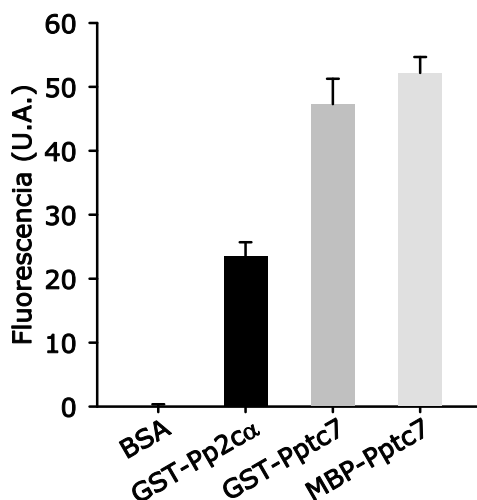


Figura 1.11. Determinación de la actividad DiFMUP fosfatasa de Pptc7. Determinación por emisión de fluorescencia (unidades arbitrarias) de la defosforilación de 6,8-difluoro-4-metilumbeliferil fosfato. Ensayo con 0.5 µg de BSA (Control negativo), GST-Pp2α (Control positivo), GST-Pptc7 o MBP-Pptc7. Los valores corresponden a la media de al menos tres medidas ±SD de tres ensayos independientes.

La capacidad de la proteína recombinante GST-Pptc7 y MBP-Pptc7 de defosforilar este sustrato es mayor que el control positivo en ambos casos, y similar entre ellas, descartando que el resultado obtenido en el ensayo anterior fuese producto de un artefacto y que el *tag* interfiera en la actividad de la misma. Podemos determinar que Pptc7 presenta actividad fosfatasa en ensayos *in vitro* con sustratos orgánicos no peptídicos, para lo cual requiere específicamente los metales bivalentes Mn^{+2} y Mg^{+2} .

1.8. La proteína Pptc7 defosforila *in vitro* péptidos fosforilados y su actividad no se ve afectada por inhibidores genéricos de fosfatasa.

Para determinar la capacidad de la enzima de defosforilar, no sólo un sustrato orgánico, sino un fosfopéptido, se realizó un ensayo colorimétrico Malachite Green. En este caso se utilizaron igualmente GST-Pp2α y BSA como controles positivo y negativo respectivamente. Dos péptidos fosforilados fueron sustrato de la reacción. Uno de ellos es de carácter genérico, pudiendo ser defosforilado por fosfatasa sin discriminar a qué familia pertenece, mientras que el otro no es defosforilable por miembros de la familia de serinas/treoninas fosfatasa PP1, a la cual en principio Pptc7 no pertenece. El reactivo Malachite Green reacciona con el grupo fosfato

liberado, virando el pico de absorbancia a 610 nm, pudiéndose cuantificar mediante espectrofotometría la defosforilación de los fosfopéptidos.

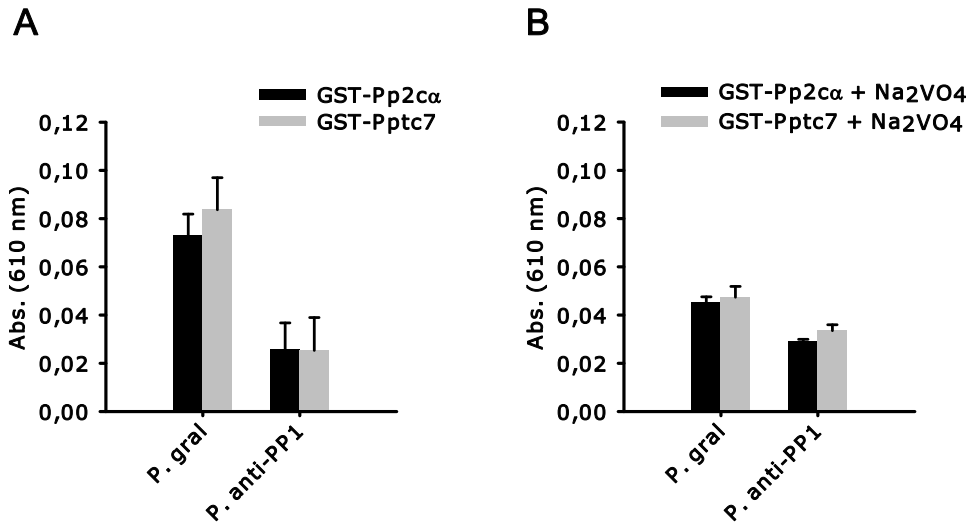


Figura 1.12. Determinación de la actividad fosfatasa de Pptc7 sobre fosfopéptidos. Cuantificación por espectrofotometría a 610 nm de la defosforilación de péptidos fosforilados, genérico y excluyente de fosfatasa PP1. Valores correspondientes a la media de tres ensayos \pm SD. **A:** ensayo con 2 μ g de GST-Pp2c α y 2 μ g de GST-Pptc7. **B:** Ensayo con 2 μ g de GST-Pp2c y 2 μ g de GST-Pptc7 con 10 mM de ortovanadato sódico.

GST-Pptc7 mostró actividad sobre ambos fosfopéptidos, descartando así la posibilidad de que pertenezca a la familia de fosfatasa PP1. Al contrario que en el ensayo pNPP o la determinación fluorimétrica con DiFMUP, los niveles de actividad se asemejaron al control positivo.

El ortovanadato sódico es un inhibidor de la actividad de fosfatasa alcalinas y de la familia PTP. Al realizar el ensayo sobre fosfopéptidos añadiendo este compuesto, se mantuvo la actividad de ambas enzimas (Figura 1.12.B). Este dato, junto a la capacidad de defosforilar el péptido anti-PP1, delimita la clasificación de Pptc7, excluyéndola de otras familias de fosfatasa.

Por tanto podemos afirmar que la purificación de las proteínas recombinantes GST-Pptc7 y MBP-Pptc7 ofrece unas enzimas no desnaturalizadas y con un plegamiento tal que no afecta a su actividad. Pptc7 es una enzima fosfatasa no perteneciente a las familias PTP o PP1, que requiere los cationes bivalentes Mg⁺² y Mn⁺² para su

actividad, los cuales son insustituibles por otros cofactores tales como Fe^{+2} o Fe^{+3} , y que es capaz de defosforilar fosfoproteínas.

2. Participación de Pptc7 en la regulación de la síntesis de coenzima Q₁₀

La biosíntesis de coenzima Q es llevada a cabo por un complejo multiprotéico formado por los polipéptidos codificados por los genes *COQ*. Los datos actuales sobre la regulación de la actividad de dicho complejo son escasos. En un reciente estudio en nuestro grupo se ha descrito el primer sistema de regulación post-traducciona l de la síntesis de CoQ en el modelo de levadura. Mediante ciclos de fosforilación y defosforilación, se modula la actividad de Coq7p (Martin-Montalvo 2009). El presunto homólogo de Pptc7 en levadura, Ptc7p, es una de las enzimas encargadas de realizar esta regulación. Sería necesario determinar si esta función también corresponde a esta fosfatasa en humanos.

2.1. La proteína Pptc7 humana complementa funcionalmente al mutante del gen homólogo en *Saccharomyces cerevisiae*.

El conocimiento de las funciones de Pptc7 en la célula y las rutas en las que opera es prácticamente nulo. La relación que guarda por similitud de la secuencia peptídica con Ptc7p de *S. cerevisiae* sugiere una posible implicación en la biosíntesis del coenzima Q. Observar una reversión del fenotipo del mutante *ptc7* mediante complementación funcional con el gen humano nos permitiría afirmar si *PPTC7* es realmente el gen homólogo al de levadura, manteniendo tanto la especificidad de sustrato como su función evolutiva.

El mutante *ptc7* presenta una disminución de los niveles quinónicos, así como una deficiencia de las actividades mitocondriales del mismo (Martin-Montalvo 2009). Para determinar si *PPTC7* es capaz de complementar dicho mutante se atendieron estos principales parámetros, determinando los niveles de CoQ₆, las actividades mitocondriales y el consumo de oxígeno.

2.1.1. La sobreexpresión de *PPTC7* en el mutante de levadura *ptc7* reestablece los niveles de coenzima Q₆.

La complementación funcional de genes humanos en levaduras, a parte de ser una herramienta muy potente para el diagnóstico de enfermedades de origen genético (Lopez-Martin, Salviati et al. 2006; Casarin, Jimenez-Ortega et al. 2008; Heeringa, Chernin et al. 2011), también genera información sobre la homología entre genes de levadura y otros organismos.

Una vez determinada la actividad de Pptc7 era necesario realizar una complementación funcional del mutante *ptc7* en *S. cerevisiae*. De este modo comprobamos si la función de Ptc7p se mantiene en la filogenia y realmente Pptc7 es el homólogo.

El fenotipo del mutante *ptc7* había sido analizado previamente en nuestro grupo (Martin-Montalvo 2009). Al ser una enzima que podría estar regulando la actividad de Coq7p, se analizó el contenido de coenzima Q₆ en el mutante para el gen que codifica para dicha fosfatasa.

Extractos lipídicos obtenidos a partir de mitocondrias purificadas se separaron mediante cromatografía líquida de alta resolución y se analizó el contenido quinónico mediante detección con un detector electroquímico (HPLC-ECD). Las muestras de mitocondria se purificaron a partir de cultivos en YPD o YPG de 5 días. Los resultados mostraron que la estirpe Δ PPTC7, a pesar de ser capaz de sintetizar CoQ₆ y, por tanto, de crecer en medios con fuente de carbono no fermentables, presenta un descenso del 25-40% respectivamente en YPD e YPG del contenido de coenzima Q₆ (Martin-Montalvo 2009).

Para la complementación se obtuvieron estirpes transformadas con un vector de expresión en levaduras portando el gen propio *PPTC7*(Δ PPTC7y7) o el presunto gen homólogo humano *PPTC7* (Δ PPTC7h7). Se utilizó un plásmido de expresión dependiente de doxiciclina, pCM189 (Gari, Piedrafita et al. 1997; Belli, Gari et al. 1998), cuya expresión es independiente de la fuente de carbono. El vector contiene a su vez un gen que permite su selección por auxotrofia (*URA3*). Como controles se utilizaron una estirpe silvestre y una mutante para *PPTC7* transformadas con el plásmido pCM189 vacío (Wt y Δ PPTC7 respectivamente)

Para mantener la selección de las estirpes transformantes se cultivaron durante 5 días en SDc -ura con glucosa al 2%. De igual modo se purificaron mitocondrias, y los extractos lipídicos obtenidos de éstas se separaron por HPLC, analizándose el contenido de Q₆ mediante el detector electroquímico.

Tanto la estirpe complementada con el gen de levadura *PPTC7* como la transformada con pCM189-*PPTC7* recuperan los niveles de CoQ₆ hasta unos niveles semejantes al silvestre (Figura 2.1). Esos datos demuestran que el descenso del contenido quinónico del mutante *PPTC7* se debe a la ausencia de este

gen, y que el presunto homólogo *PPTC7* conserva la función relativa a la síntesis de coenzima Q, siendo capaz de complementar funcionalmente el mutante de levadura.

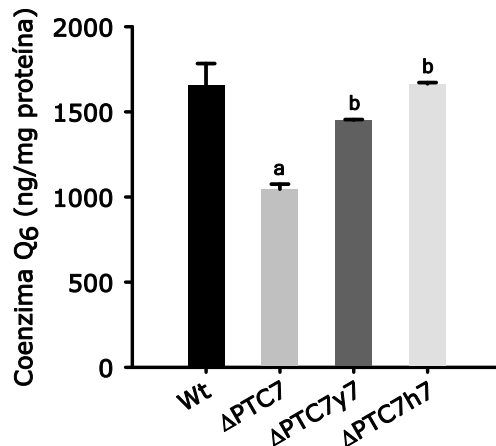


Figura 2.1. Cuantificación del contenido de coenzima Q₆. Extracción y cuantificación de lípidos a partir de 1 mg de proteína de muestras de mitocondria cruda. El extracto lipídico complejo se resolvió mediante HPLC. El coenzima Q₆ se cuantificó por detector electroquímico. Las cantidades representadas corresponden a las estirpes silvestre (Wt), mutante *ptc7* (Δ PTC7), *ptc7* complementado con *PTC7* (Δ PTC7 γ 7) o con *PPTC7* (Δ PTC7h7). Valores correspondientes a la media \pm DS de tres medidas de un experimento representativo. a: diferencia significativa respecto al silvestre P<0.002; b: diferencia significativa respecto al mutante P<0.001.

2.1.2. La síntesis de novo de coenzima Q₆ se encuentra estimulada en el mutante *ptc7*

La biosíntesis de coenzima Q₁₀ comienza por la incorporación de la cabeza polar, el ácido para-hidroxibenzoico (pHB), a la cola poliisoprenoide. Un método para analizar la velocidad de biosíntesis de CoQ₁₀ es la cuantificación de la incorporación del precursor soluble radiomarcado ([¹⁴C]pHB). Para determinar el índice de incorporación se realizó un pulso con pHB radiomarcado en cultivos de estirpes de levadura silvestre, mutante *ptc7* y complementadas durante 2 horas en medio SDc -ura glucosa 2% en cultivos a una D.O_{660nm} de 2. Las muestras se recogieron por centrifugación y se realizó una extracción con hexano sobre células completas mediante rotura con bolas de vidrio (ver *Material y Métodos*). Las muestras se resolvieron en una cromatografía de capa fina (TLC), y la fracción correspondiente al coenzima Q₆ se cuantificó en el contador de centelleo.

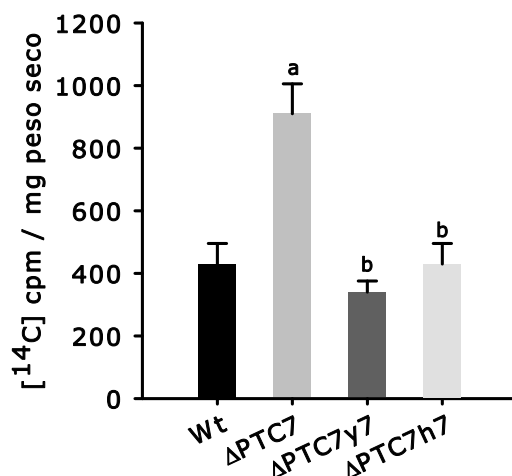


Figura 2.2. Incorporación de pHB radiomarcado en el mutante *ptc7* y en las estirpes complementadas. Análisis de muestras lipídicas del [¹⁴C]pHB incorporado en las estirpes silvestre (Wt), mutante *ptc7* (ΔPTC7) y complementadas con el gen *PTC7* (ΔPTC7y7) o *PPTC7* (ΔPTC7h7) mediante cuantificación de [¹⁴C] en el contador de centelleo. Las muestras se resolvieron en cromatografía de capa fina previamente a la cuantificación. Datos correspondientes a la media de valores por triplicado de un experimento representativo ± DS. a: diferencia significativa respecto al silvestre (Wt); b: diferencia significativa respecto al mutante *ptc7* (ΔPTC7) P<0.002

La velocidad de síntesis de CoQ₆ en el mutante *ptc7* es el doble al obtenido en la estirpe silvestre (Figura 2.2). Este fenotipo se recupera al complementar el mutante con el gen *PTC7* o con *PPTC7*, disminuyendo la incorporación de [¹⁴C]pHB hasta los niveles del silvestre. En principio estos datos pueden resultar contradictorios al descenso de los niveles de CoQ₆. Es importante resaltar que la ruta de síntesis de coenzima Q₆ no se encuentra alterada, como ocurre en los diferentes mutantes *coq*. Las deficiencias primarias se caracterizan por un defecto del propio complejo de síntesis, mientras que en las deficiencias secundarias, aunque presentan igualmente una disminución de los niveles de CoQ, el complejo de síntesis es funcional. Este incremento en la incorporación de pHB puede deberse al déficit mismo, el cual podría producir un incremento de la actividad del complejo.

2.1.3. La complementación funcional heteróloga recupera los niveles de actividad de la cadena respiratoria en el mutante *ptc7*.

Una de las principales funciones del coenzima Q radica en el transporte de electrones desde el complejo I o el complejo II al complejo III de la cadena

respiratoria mitocondrial (Trumpower 1990; Brandt and Trumpower 1994). El decremento de los niveles quinónicos en el mutante da lugar a una disminución de las actividades de la cadena transportadora de electrones dependientes de CoQ₆ (Martin-Montalvo 2009). Recuperar esta disfunción mitocondrial es esencial para mostrar una complementación funcional completa, no tan sólo una recuperación del contenido de coenzima Q₆, sino también de sus funciones en la célula.

Se analizaron las actividades específicas NADH-citocromo *c* reductasa (I+III) y succinato-citocromo *c* reductasa (II+III) de la cadena de muestras de mitocondrias purificadas obtenidas a partir de cultivos en SDC -ura. Se utilizaron tanto las estirpes silvestre y mutante para *PTC7* transformadas con el plásmido vacío pCM189 como las estirpes complementadas. Para el ensayo se utilizaron 50 µg de proteína de mitocondria cruda fresca, y la actividad mostrada refleja la diferencia de actividad con y sin sustrato (NADH para I+III o succinato sódico para la actividad II+III) en presencia y ausencia de antimicina A.

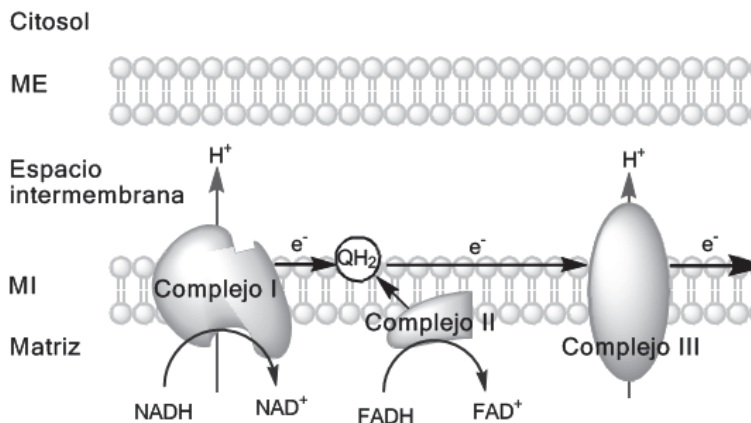


Figura 2.3. Esquema de la actividad del coenzima Q en la cadena transportadora de electrones mitocondrial. Las actividades denominadas I+III y II+III reflejan el flujo de electrones desde el NADH o el succinato hasta el complejo III, en un transporte que implica al coenzima Q.

En ambos casos las actividades se recuperaron al complementar con *PTC7*, aunque no completamente. En el caso de su homólogo *PPTC7* el fenotipo se revirtió prácticamente hasta el nivel del silvestre, tanto en la actividad NADH-citocromo *c* reductasa como en la actividad succinato-citocromo *c* reductasa (Figura 2.4).

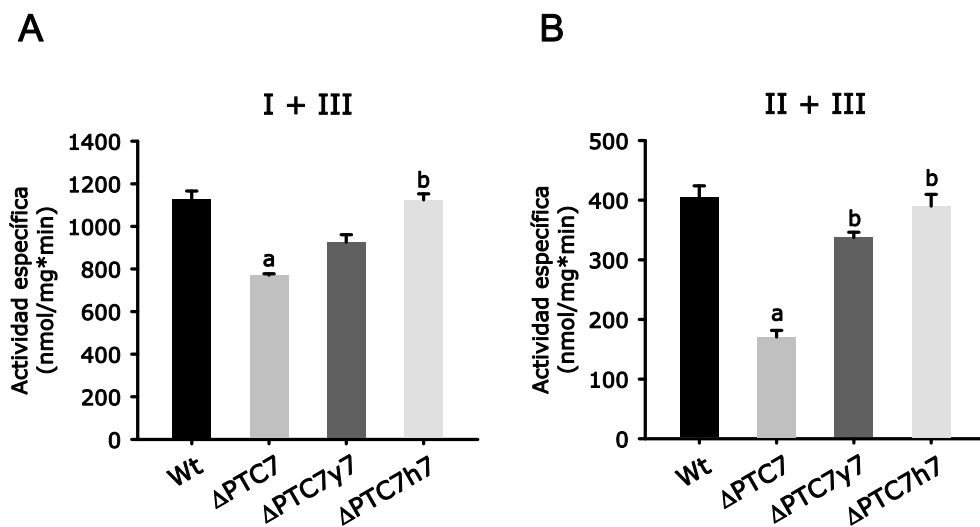


Figura 2.4. Cuantificación de las actividades mitocondriales dependientes de CoQ. Actividad específica de 50 μg de proteína de un extracto de mitocondria ante un exceso de sustrato (NADH/succinato sódico). Cuantificación en base a la reducción de citocromo *c*. A: actividad NADH-citocromo *c* reductasa; B: actividad succinato-citocromo *c* reductasa. Datos de actividad específica expresados en nmol de citocromo *c* reducido por mg de proteína mitocondrial por minuto. Los datos corresponden a la media \pm DS de tres medidas de un experimento representativo. a: diferente respecto al silvestre $p < 0.0001$; b: diferente respecto al mutante $p < 0.0001$

En este ensayo se muestran las actividades máximas *in vitro* de cada complejo, es decir, ante exceso de sustrato del complejo I o del complejo II, la máxima capacidad de reducción del citocromo *c*, cuantificando así la funcionalidad del tramo de la cadena transportadora de electrones en la que es necesaria la actividad redox del coenzima Q. Por tanto las alteraciones mostradas se corresponden a una menor disponibilidad de coenzima Q_6 . No obstante, es necesario comprobar a nivel fisiológico la actividad del sistema de fosforilación oxidativa para determinar una verdadera disfunción de la mitocondria.

2.1.4. La complementación funcional con *PPTC7* revierte los niveles de consumo de oxígeno en el mutante *ptc7*

El consumo de oxígeno es una medida completa de la respiración de células *in vivo*. Analiza la cantidad de oxígeno reducido por el último complejo IV de la cadena transportadora de electrones, la citocromo *c* oxidasa, utilizando el NADH y el succinato obtenido en las rutas catabólicas, para finalmente formar H_2O , NAD^+ y fumarato, además de un gradiente de protones que servirá para generar ATP.

Este ensayo amplía la información que ofrecen las actividades de la cadena de forma individual, dando una idea del estado de salud de la mitocondria dentro del contexto de la célula.

Para poder cuantificar el oxígeno consumido en el proceso de respiración ha de añadirse cianuro potásico (CNK) para inhibir el complejo IV, determinando así los electrones utilizados para reducir el oxígeno específicamente en el complejo IV y no el oxígeno consumido en producción de ROS. De este modo los datos corresponden al consumo por respiración, sensible a inhibidores de la cadena.

Se analizó y cuantificó el consumo de oxígeno de respiración en cultivos de 3 ml a 1 DO_{660nm} en medio YPG de las estirpes silvestre, Δ PPTC7, y las complementadas. En el caso del mutante el consumo de oxígeno incrementa en un 180% (Figura 2.5). Dado que corresponde a la diferencia de consumo en ausencia y presencia de CNK, no puede atribuirse a una mayor producción de ROS. La generación de especies reactivas del oxígeno ya había sido cuantificada en levaduras silvestre y mutante para el gen *PPTC7* (Martin-Montalvo 2009), observándose un descenso significativo en la producción tanto de peróxido de hidrógeno como de superóxido en muestras de mitocondria purificada de la estirpe mutante en comparación con la silvestre.

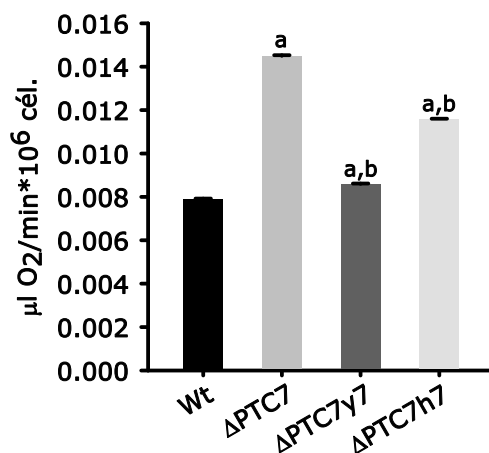


Figura 2.5. Consumo de oxígeno de la estirpe mutante y de las estirpes complementadas. a: diferente respecto al silvestre $P < 0.001$; b: diferente respecto al mutante $P < 0.001$

Este dato en principio podría resultar contradictorio al obtenido en las actividades mitocondriales en el mutante *ptc7*. La cuantificación de las actividades de la cadena transportadora de electrones se realiza sobre muestras de mitocondrias purificadas, y no de células enteras como es el caso de la determinación del consumo de oxígeno. El acrecentamiento en el consumo de oxígeno podría deberse a un mejor acoplamiento de la cadena transportadora de electrones, aunque también existen estados de la levadura en los que se encuentra presente una determinada masa mitocondrial poco funcional, como es el caso de la entrada en fase estacionaria. Al relativizar los datos de actividad de la cadena transportadora de electrones por mitocondria se podría obtener un resultado completamente diferente al obtenido al relativizar el consumo de oxígeno por número de células, sin necesidad de variar la masa mitocondrial.

Estos datos junto a los anteriores reflejan una disfunción mitocondrial en el mutante *ptc7* causada por la deficiencia de coenzima Q₆, la cual se refleja en una disminución de las actividades de la cadena respiratoria que implican al CoQ₆. *Pptc7* actúa con una función homóloga a la de *Ptc7p*, y la sobreexpresión heteróloga de *PPTC7* en dicho mutante revierte el fenotipo en los parámetros cuantificados.

2.2. *Pptc7* defosforila in vitro a la fosfoproteína Coq7 humana y de levadura

En el modelo de levadura la formación del complejo de biosíntesis de coenzima Q₆ depende del estado de fosforilación de algunas proteínas Coq (Xie, Hsieh et al. 2011). La proteína Coq7 de *S. cerevisiae* ha sido descrita como una fosfoproteína (Martin-Montalvo 2009), con un dominio de fosforilación de serinas/treoninas presente tras la secuencia de importación mitocondrial. Dichos sitios de fosforilación determinan la actividad de Coq7p, y su eliminación (sustitución por alanina) incrementa la capacidad catalítica de esta monooxigenasa.

La secuencia peptídica de hCoq7 se analizó mediante el programa bioinformático NetPhos 2.0 (Blom, Gammeltoft et al. 1999) para determinar los posibles sitios de fosforilación (Figura 2.6). Al igual que Coq7p, su homólogo humano presenta un previsible dominio de fosforilación de serinas/treonina al final de la secuencia de importación mitocondrial, en el extremo N-terminal.

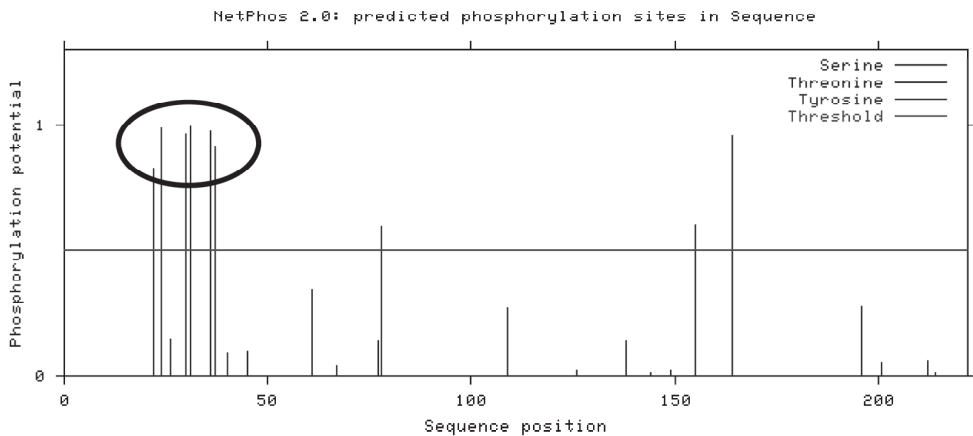


Figura 2.6. Predicción bioinformática de los sitios de fosforilación de hCoq7. Análisis bioinformático de la secuencia peptídica de hCoq7 mediante el programa NetPhos. Aparece un previsible dominio de serinas/treoninas en el extremo N-terminal del polipéptido.

2.2.1. Purificación de la proteína hCoq7

En primer lugar era importante comprobar que dicho dominio hace de hCoq7 una fosfoproteína. Mediante el sistema de *GST-gene fusion* se puede clonar y expresar el gen de interés fusionado a GST de tamaño completo (26 kDa) de *S. japonicum*. Esto permite la purificación en un paso de las proteínas recombinantes mediante matrices de afinidad (glutacion). Este sistema ofrece la posibilidad de purificar grandes cantidades de proteína, aunque exista una gran controversia sobre la fosforilación de GST (Srivenugopal, Shou et al. 2001). El sistema de fusión posee una región de corte con trombina para escindir el *tag*. Se purificó la proteína recombinante GST-hCoq7 a partir de bacteria (Figura 2.7, A) y se realizaron diversas pruebas con tal fin, obteniendo en todo caso una degradación parcial o total de la proteína hCoq7 (Figura 2.7, A y B), sin obtener una liberación satisfactoria de GST.

Puesto que no era posible separar el *tag* de la proteína recombinante, se optó por realizar una cromatografía de exclusión molecular (CEM) para obtener una muestra más pura (Figura 2.7, D), y evitar así contaminaciones con fosforilaciones de productos inespecíficos de la purificación. Se seleccionó la fracción #3 para los ensayos detallados a continuación.

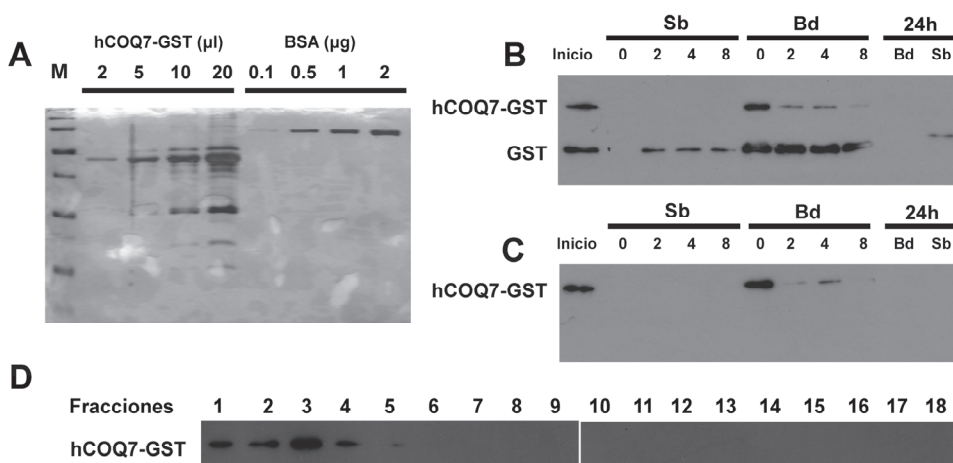


Figura 2.7. Purificación de GST-hCoq7. **A:** Tinción de plata de las muestras de proteína recombinante purificada resueltas en gel de acrilamida en SDS-PAGE. El tamaño de la proteína recombinante es de 50 KDa aproximadamente. **B:** WB anti GST del producto de la digestión con trombina. GST-hCoq7 unida a esferas de sefarosa se incubó con trombina a distintos tiempos. Las muestras correspondientes al remanente en las esferas (Bd) o liberadas al sobrenadante por acción de la trombina (Sb) se resolvieron en una SDS-PAGE. **C:** WB anti hCoq7 del producto de la digestión con trombina de la proteína recombinante unida a esferas de sefarosa. **D:** WB anti-hCoq7 de las distintas fracciones de la CEM. de GST-hCoq7.

2.2.2. La proteína hCoq7 se fosforila en ensayos *in vitro*.

Una vez obtenida la proteína pura se realizó un ensayo de fosforilación *in vitro* con proteína quinasa A comercial (PKA) y ATP radiomarcado con P³².

Una vez purificada la proteína recombinante por CEM, GST-hCoq7 de la fracción #3 se unió a esferas de glutatión-sefarosa para realizar el ensayo quinasa. El ensayo se llevó a cabo a una temperatura constante idónea para la actividad de la PKA. Tras la fosforilación, las esferas se lavaron con buffer (50 mM Tris HCl, 25 mM β-glicerol fosfato, 5 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 1 mM ditiotreitól) y se procedió a la digestión con trombina durante 2, 4 y 6 horas .

Las muestras se resolvieron en una SDS-PAGE y se detectó la fosforilación tanto por la radiactividad acumulada mediante *Typhoon 9410 scanner* como por tinción específica de proteínas fosforiladas con Pro-Q *Diamond*. La presencia de GST se analizó por *Western Blot*. (Figura 2.8).

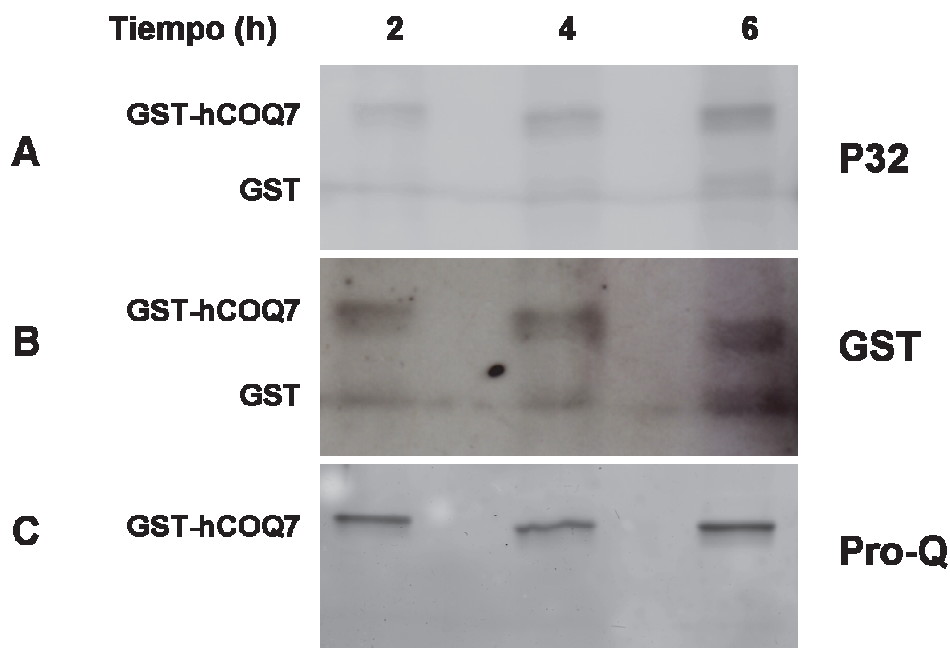


Figura 2.8. Fosforilación *in vitro* de GST-hCoq7. Ensayo de fosforilación con PKA y [γ -³²P]ATP y posterior digestión con trombina a distintos tiempos. **A:** Detección del P32 incorporado por fosforilación a la proteína recombinante mediante *Typhoon 9410 scanner*. **B:** WB anti-GST de las muestras fosforiladas y digeridas. **C:** Detección de la fosforilación mediante tinción con Pro-Q Diamond

Se observa en la imagen de la figura 2.7 una degradación de la proteína recombinante a las 6 horas de digestión con trombina, pero el *tag* GST continúa presente en la muestra (Figura 2.8, B). Aunque la tinción con ProQ generó una imagen limpia en la que sólo se detecta GST-hCoq7 como sustrato fosforilado (Figura 2.8, C), en el escáner con *Typhoon* aparece una segunda banda de menor intensidad correspondiente a GST fosforilado (Figura 2.8, A y B).

Debido a la imposibilidad de liberar la proteína de interés del *tag* de fusión, y a que éste mostraba señal de fosforilación, se utilizó como control negativo GST purificado a igualdad de número de moléculas en un ensayo similar al anterior. Tanto la proteína recombinante como el control negativo se unieron a las esferas de sefarosa, sobre las cuales se realizó el ensayo quinasa con [γ -³²P]ATP. Las esferas se lavaron y se cuantificó la radiactividad remanente en el contador de centelleo

(Figura 2.9). A pesar de que GST mostró incorporación de P^{32} , la diferencia con la fosforilación mostrada por GST-hCoq7 es significativa.

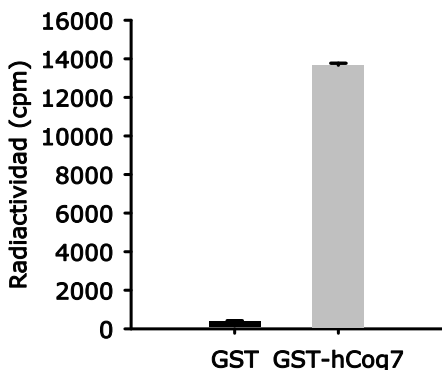


Figura 2.9. Fosforilación *in vitro* de GST-hCoq7. Cuantificación en el contador de centelleo del P^{32} acumulado en los polipéptidos GST libre y GST-hCoq7 al someterlos a un ensayo quinasa con PKA y $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Ensayo PKA con 1 μg de proteína recombinante. Los datos se refieren a cuentas por millón para el mismo número de moléculas del *tag* libre que de la proteína recombinante.

A pesar de que el *tag* GST es susceptible de ser fosforilado, los datos obtenidos nos indican que *in vitro* hCoq7 es una fosfoproteína, y que la purificación de la proteína recombinante no afecta al dominio de fosforilación.

2.2.3. Defosforilación de hCoq7 por Pptc7

Una vez caracterizada la capacidad de fosforilación sobre hCoq7, se realizó un ensayo fosfatasa sobre la proteína recombinante fosforilada unida a esferas de sefarosa.

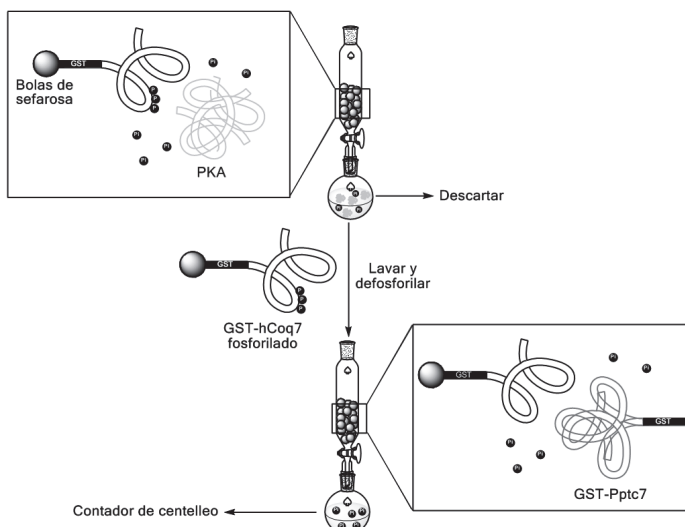


Figura 2.10. Proceso de fosforilación y defosforilación de proteínas unidas a esferas de sefarosa.

No sólo se utilizó GST-Pptc7 para defosforilar a hCoq7, sino también su homólogo de levaduras GST-Ptc7, y GST-Ptc6, la otra fosfatasa implicada en regulación de la síntesis de coenzima Q₆ en *S. cerevisiae*.

Se volvió a unir GST-hCoq7 a las esferas de glutatión-sefarosa para realizar el ensayo quinasa, tras el cual se lavaron para evitar contaminación con PKA, y se procedió a realizar el ensayo fosfatasa con las proteínas purificadas GST-Pptc7, GST-Ptc7 y GST-Ptc6 (Figura 2.10). La liberación de fosfatos se cuantificó recogiendo el sobrenadante y cuantificándolo en el contador de centelleo.

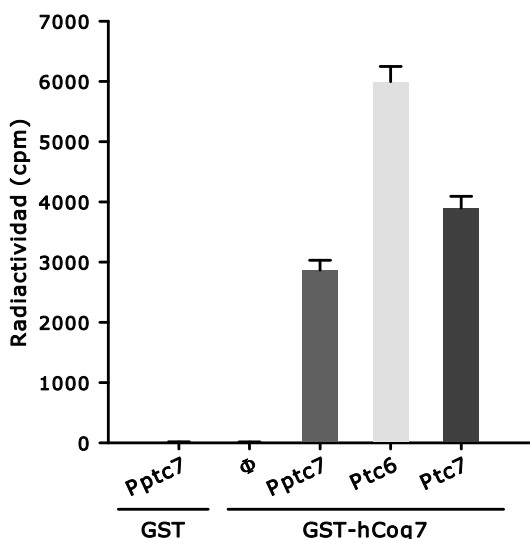


Figura 2.11. Defosforilación de hCoq7 *in vitro* por las fosfatases Pptc7, Ptc7 y Ptc6. GST-hCoq7 fosforilado se incubó en tampón fosfatasa con las enzimas purificadas. Como control negativo se incubó GST-hCoq7 en el mismo tampón sin fosfatasa (Φ). Para ver si la defosforilación se debe al *tag*, se incubó GST libre fosforilado con GST-Pptc7 (GST+PPTC7).

El resultado obtenido indica que hCoq7 no sólo es una fosfoproteína, sino que es susceptible de defosforilarse por Pptc7 *in vitro*, además de por las dos fosfatases de levadura (Figura 2.11). En paralelo, una muestra de GST-hCoq7 sin fosfatases no mostró liberación de fosfato. Para descartar que la liberación obtenida provenga del *tag* GST, se incubó una muestra del *tag* con Pptc7, obteniendo un resultado negativo, y corroborando la defosforilación de hCoq7 por estas tres enzimas.

Las fosfatases PP2C son monoméricas, no poseen una subunidad catalítica y otra reguladora como los miembros de otras familias de fosfatases, y poseen una amplia especificidad de sustrato. Sus dianas vienen determinadas, entre otros, por la sublocalización dentro de la célula. La enzima fosfatasa Pptc7 es capaz de

defosforilar la fosfoproteína hCoq7 *in vitro*, y ambas presentan una secuencia de importación a la mitocondria. La localización de Coq7p (Jonassen, Proft et al. 1998) es la misma descrita que para Pptc7, y la capacidad de Ptc7p de defosforilar Coq7p *in vivo* ya ha sido determinada en nuestro grupo anteriormente (Martin-Montalvo 2009). De este modo podemos afirmar que hCoq7 es un potencial sustrato de defosforilación de Pptc7 en el modelo de células humanas.

2.3. La expresión de *PPTC7* afecta a los niveles de coenzima Q₁₀

2.3.1. Sobreexpresión y silenciamiento de *PPTC7*

El hecho de que *PPTC7* revierta el fenotipo en el mutante de su homólogo en levaduras no implica necesariamente que su función se mantenga íntegra en células de mamífero. Para ello determinamos, en células de mamífero en cultivo, el fenotipo que produce un incremento o un descenso de los niveles de expresión de dicho gen.

Ensayos *in vitro* sobre hCoq7 mostraron la capacidad de Pptc7 de defosforilar esta fosfoproteína. En trabajos anteriores en nuestro grupo de investigación (Martin-Montalvo 2009) se demostró que la actividad monooxigenasa de Coq7p se incrementa al permanecer la proteína defosforilada, y se reduce al simular un estado de permanente fosforilación. Este hecho se refleja en variaciones del contenido quinónico en la levadura. De manera análoga los niveles de coenzima Q₆ descienden en el mutante nulo para *PTC7*, fenotipo que se revierte al complementar con *PPTC7*. Dichas variaciones del contenido en CoQ₆ producen una clara deficiencia de las actividades mitocondriales en las que éste se encuentra implicado directamente (Figura 2.4).

Para los estudios en células en cultivo se utilizaron células HeLa por su facilidad de manipulación. Con el fin de estudiar las posibles variaciones en niveles de CoQ₁₀, reflejo de la presunta modificación en la actividad monooxigenasa de hCoq7, se procedió al silenciamiento mediante siRNA específico para *PPTC7* (HeLa *PPTC7* KD) y en paralelo la sobreexpresión transitoria del mismo mediante plásmidos de expresión en células de mamíferos (HeLa *PPTC7*SE).

En el caso del silenciamiento fue necesaria la realización de un silenciamiento doble para observar un descenso a nivel de proteína y no tan *sólo* de ARNm. Las células se silenciaron con una mezcla de tres siRNAs (Ambion), utilizando como

control un siRNA negativo. Como agente de transfección se utilizó oligofectamine (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante para células HeLa. Se realizó un primer silenciamiento y tras 48 horas se sembraron a la confluencia apropiada para el segundo silenciamiento. Las células se recogieron a las 48 horas del segundo silenciamiento y se homogeneizaron para la extracción de CoQ₁₀ y para la extracción de proteínas y ARN. El grado de silenciamiento se cuantificó mediante RT-PCR y *Western Blot*, observando no sólo una disminución de los niveles de ARN mensajero, sino también de los niveles de proteína (Figura 2.12, B).

Para la sobreexpresión se clonó el gen *PPTC7* a partir de ARN comercial en el plásmido pGEMT de expresión en bacterias utilizando los primers hPPTC7clonF y hPPTC7clonR, los cuales amplifican el gen completo excluyendo el promotor (ver tabla de primers en materiales y métodos).

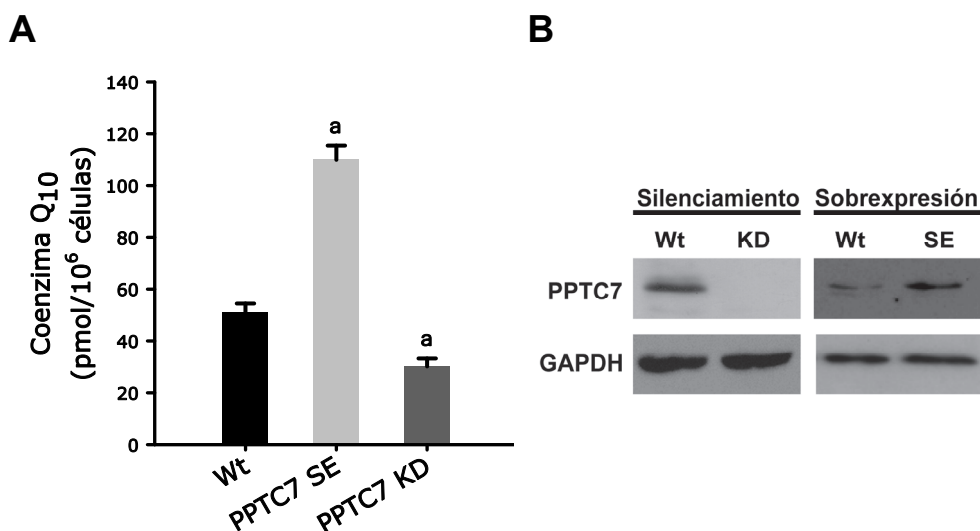


Figura 2.12. Modificación de los niveles de coenzima Q₁₀ en las células HeLa *PPTC7* SE y KD. Cuantificación del contenido quinónico de extractos lipídicos a partir de un extracto de 10 millones de células enteras. Las muestras complejas se separaron y detectaron mediante HPLC-ECD. Valores correspondientes a la media de al menos tres repeticiones independientes \pm DS. $P < 0.001$

Una vez secuenciada la construcción, se reamplificó mediante TD-PCR el gen añadiendo unas secuencias de corte XhoI y XbaI en los extremos 5' y 3' respectivamente para ligar el fragmento en pcDNA[™]3.1/*myc*-His B. Este plásmido contiene el promotor del citomegalovirus humano para obtener elevados niveles de

expresión, además de la posibilidad de clonar junto con un epítipo myc y un *tag* de polihistidinas. Para una apropiada iniciación de la traducción el inserto debía contener una secuencia Kozak (Kozak 1987; Kozak 1990) (G/A)NNATGG, para lo cual debió añadirse una alanina tras la metionina del codón de iniciación. Las células HeLa se transfectaron de forma transitoria utilizando lipofectamine 2000 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante para dicha línea celular, y se homogeneizaron del mismo modo que las células silenciadas a las 48 horas de la transfección.

2.3.2. Niveles coenzima Q₁₀ en células HeLa *PPTC7KD* y *SE*.

La extracción de lípidos se realizó a partir de homogenado de un millón de células y se separaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cuantificando el contenido de CoQ₁₀ mediante un detector electroquímico (ECD). Como se puede observar en la figura, los niveles quinónicos disminuyen al silenciar *PPTC7* en un 40%, y aumentan hasta duplicar los niveles del silvestre en las células *PPTC7SE* (Figura 2.12, A).

Podemos afirmar que *Pptc7* está implicado en la regulación de la biosíntesis de coenzima Q₁₀ en células humanas en cultivo, y que es capaz de defosforilar a *hCoq7 in vitro*. La sobreexpresión de *PPTC7* produce un aumento de los niveles de CoQ₁₀ considerable, llegando al doble de los niveles del silvestre. El silenciamiento afecta gravemente al estado de la célula, resultando en un incremento de la muerte celular, y dificultando por ello la obtención de material suficiente para realizar las cuantificaciones necesarias. Este fenómeno puede deberse probablemente a la depleción de los niveles de coenzima Q₁₀ a casi la mitad del contenido del silvestre, lo cual puede considerarse una deficiencia suficiente de CoQ₁₀ como para generar una patología. En el caso de *S. cerevisiae* la obtención del doble mutante *ptc6-ptc7* no resultó posible, tanto por recombinación homóloga delecionando uno de los genes en el fondo mutante de la otra fosfatasa como por genética clásica. El cruce de diploides generó una estirpe con dificultad en la esporulación, probablemente debido a una deficiencia energética grave. Al forzar las condiciones de esporulación se obtuvo un reparto aberrante de las ascas, no obteniendo en ningún caso un doble mutante. Este hecho puede deberse a la necesidad de la presencia de al menos una de las

fosfatasas para un correcto metabolismo bioenergético, y la ausencia de ambas produce inviabilidad celular en la levadura.

La implicación de *Pptc7* en la regulación de la biosíntesis de coenzima Q se mantiene en la filogenia desde *Saccharomyces cerevisiae* hasta *Homo sapiens*. Estudios en nuestro laboratorio de transgénicos silenciados para el homólogo de *PPTC7* en *Drosophila melanogaster* mostraron una afección grave en el desarrollo. Los transgénicos fueron obtenidos mediante el sistema UAS/GAL4 (sistema activador de la transcripción). Al realizar los cruces y obtener la progenie silenciada, aunque las larvas no presentaron un déficit, (posiblemente debido a herencia materna) las pupas sí mostraron una deficiencia de aproximadamente un 40% del contenido quinónico. Y lo que es más relevante, el desarrollo se detuvo en estado pupa, sin obtener individuos adultos (Guerra, I. comunicación personal). Quedaría por indagar en la verdadera afección de la síntesis de CoQ en este modelo, y elucidar si es esta deficiencia el verdadero motivo de la parada del desarrollo.

2.3.3. La sobreexpresión de *PPTC7* conduce a una disminución de la síntesis de *ново* de coenzima Q₁₀

Dada la diferencia de incorporación de [¹⁴C]pHB en el mutante *ptc7* de *S. cerevisiae*, se realizó una determinación de la velocidad de síntesis de coenzima Q₁₀ en células HeLa tras la sobreexpresión de PPTC7. Para ello se transfectaron de forma transitoria células HeLa con pcDNA-PPTC7 y como control se utilizó el plásmido vacío. A las 48 horas de la transfección se incubaron las células con pHB radiomarcado, y se recogieron a las 24 horas. Se realizó una extracción lipídica rápida con isopropanol y las muestras se cargaron en una TLC para separar los distintos compuestos. El marcaje del coenzima Q₁₀ se cuantificó en el contador de centelleo.

La sobreexpresión de *PPTC7* conduce a una disminución de la incorporación de [¹⁴C]pHB frente a la línea silvestre, a pesar de que la línea *PPTC7SE* presenta el doble del contenido total. En este caso ocurre algo concordante a lo observado en levadura, presentando menor velocidad de síntesis aquella estirpe con mayores niveles de coenzima Q. En nuestro grupo de investigación se ha observado que deficiencias primarias en pacientes producidas por una mutación en un gen *COQ*

conducen a una disminución tanto de los niveles totales de coenzima Q como de la velocidad de síntesis de fibroblastos de pacientes en cultivo (Rodríguez-Hernández, A., comunicación personal).

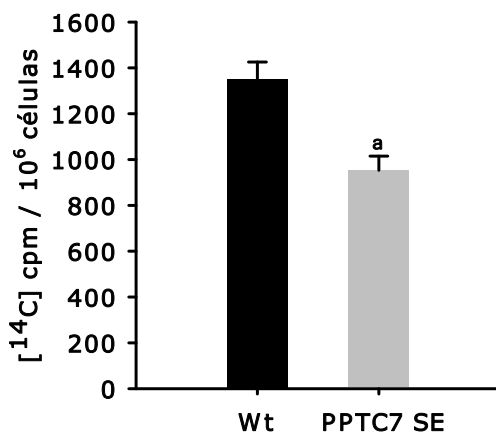


Figura 2.13. Incorporación de pHB radiomarcado en células HeLa PPTC7 SE y silvestre. Las células silvestre (Wt) y transfectadas con pcDNA-PPTC7 (PPTC7 SE) se incubaron 24 horas con [¹⁴C]pHB. Las células se homogeneizaron y se los extractos lipídicos purificados se resolvieron en TLC. El [¹⁴C] correspondiente al coenzima Q₁₀ se cuantificó en el contador de centelleo. Valores correspondientes a la media ± DS de datos por triplicado de un experimento representativo. P<0.002

Por otro lado, deficiencias secundarias de coenzima Q generan, a pesar de la disminución de los niveles de CoQ, un aumento de la velocidad de síntesis. Así ocurre en pacientes que presentan mutaciones en uno de los genes ADCK, presuntamente implicado en la regulación de la biosíntesis de coenzima Q₁₀ (Vázquez-Fonseca, L., comunicación personal). La enfermedad de Batten se asocia a una mutación en el gen CLN3; levadura mutante en el gen BTN1, ortólogo de CLN3 (Pearce, D.A. et al., 1999), y a la que se le asocia una deficiencia secundaria de coenzima Q, posee mayor incorporación de pHB que la estirpe silvestre (Padilla-López, S., comunicación personal). Este conjunto de datos casan con la hipótesis planteada con anterioridad. Ante una deficiencia de coenzima Q, el complejo de síntesis se activa para paliar el déficit, incrementando la velocidad de incorporación de pHB.

Por otro lado, a las 48 horas de la transfección ya se observa el doble del contenido de coenzima Q₁₀ que en las células control (Figura 2.12, A). En las membranas

celulares puede existir un límite saturante de coenzima Q, y podría ocurrir que ante un exceso de CoQ₁₀ se reprima la síntesis.

2.4. Establecimiento de una línea celular estable de sobreexpresión de *PPTC7* mediante retrovirus

El establecimiento de una línea estable de sobreexpresión de *PPTC7* se hizo necesario al requerir mayor material para la realización de diversos ensayos en los que el número de células era limitante.

Para ello se optó por la estrategia de infección mediante partículas lentivíricas (Dull, Zufferey et al. 1998). Las partículas lentivíricas son generadas a partir de un empaquetamiento de diversos plásmidos en células 293T: el vector de empaquetamiento (contiene los genes necesarios para generar las proteínas estructurales del virión y de funciones de empaquetamiento), el vector de envoltura (pseudotipado de la envoltura con proteína G del virus de la estomatitis vesicular, VSV-G) y el plásmido que porta el gen de interés a transducir.

Los lentivirus obtenidos del proceso de empaquetamiento son utilizados para transducir tanto células en cultivo como diversos tejidos de organismos pluricelulares. Al realizar la infección sobre células en cultivo, generan casi un 100% de transducción, permitiendo así obtener una población heterogénea de sobreexpresión (Figura 2.14, A).

Para obtener el plásmido de sobreexpresión se subclonó *PPTC7* con el promotor del CMV desde pcDNA3-1B a un plásmido compatible con el sistema de empaquetamiento, pPGK (cedido por Cuervo, A. M.). Dicho vector aporta a su vez GFP para comprobar la eficiencia de la transducción.

Con el fin de obtener una línea estable silenciada se empaquetaron lentivirus utilizando un shRNA para *PPTC7* (SIGMA, MISSION library). En este caso el plásmido aporta el gen de resistencia a puomicina, pudiendo seleccionar tras la transducción los clones positivos.

Una vez obtenidas las partículas lentivíricas se infectaron tanto células SH-SY5Y de neuroblastoma humano como fibroblastos de ratón NIH-3T3 usando como vector polibreno. La transducción se llevó a cabo durante 48 horas antes de la apropiada comprobación y/o selección de clones.

La sobreexpresión de *PPTC7* se comprobó resolviendo extractos proteicos de ambas estirpes (OE) en SDS-PAGE y posterior Western Blot con anticuerpo para Pptc7.

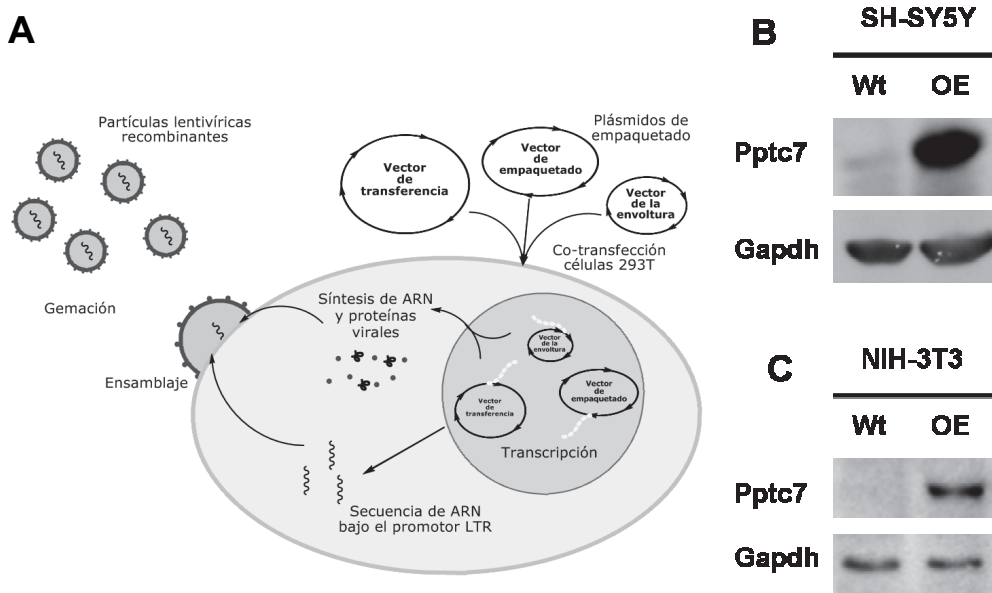


Figura 2.14. Detección de la sobreexpresión de Pptc7 en líneas estables. WB de extractos proteicos resueltos mediante SDS-PAGE. **A:** esquema del proceso de empaquetamiento y transducción de partículas lentivíricas. **B:** Línea estable de células SH-SY5Y, WB anti-Pptc7. **C:** Línea estable de células NIH-3T3, WB anti-c-myc.

Al realizar la infección con las partículas lentivíricas de silenciamiento, la viabilidad celular se redujo drásticamente, perdiendo la línea celular. Este hecho concuerda con los datos obtenidos de la parada del desarrollo de moscas. Favorecer el metabolismo glucolítico mediante adición de glucosa al medio disminuye la mortandad de la línea, aunque no lo suficiente como para obtener un elevado número de células.

2.4.1. La sobreexpresión de PPTC7 de manera estable incrementa los niveles de coenzima Q₁₀

En primer lugar se determinaron los niveles de CoQ₁₀ en la línea estable SH-SY5Y OE. Se cultivaron células hasta el 80% de confluencia y se recogieron por centrifugación. Se realizó un extracto lipídico mediante extracción con hexano y las muestras se resolvieron por cromatografía líquida de alta resolución. Para analizar

el contenido de coenzima Q₁₀ se utilizó un detector electroquímico acoplado (HPLC-ECD). Como estándar interno se añadió coenzima Q₆. y los valores se relativizaron a millones de células.

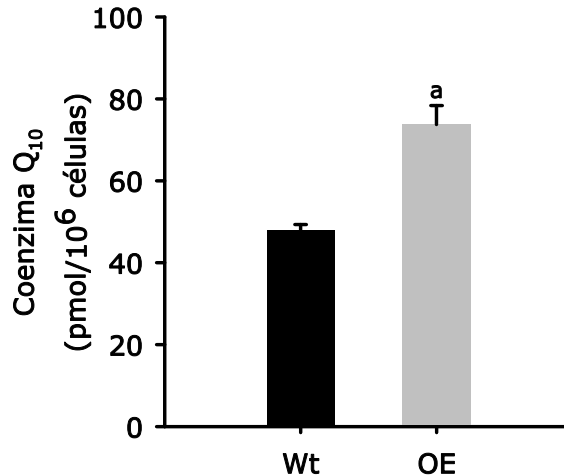


Figura 2.15. Determinación de los niveles de Coenzima Q₁₀ en la línea estable SH-SY5Y OE. Se cultivaron células SH-SY5Y silvestre (Wt) y sobreexpresando de manera estable PPTC7 (OE) hasta el 80% de confluencia. Las células se homogeneizaron y la extracción lipídica se resolvió mediante HPLC. El contenido de quinonas se detectaron mediante un detector electroquímico. Como estándar interno se utilizó CoQ₆. Los datos corresponden a pmoles de coenzima Q₁₀ por millón de células. P<0,001

Como se observa en la figura 2.15, la sobreexpresión de PPTC7 de manera estable produce igualmente un incremento de los niveles de coenzima Q₁₀, aunque dicho aumento no resulta tan acusado como en las líneas de sobreexpresión transitorias. En la transfección, el fenotipo se observa tras 48 horas de sobreexpresión. En ese caso se observa el primer efecto obtenido a causa del incremento de los niveles de Pptc7, mientras que en la línea estable las células se encuentran adaptadas a esa nueva situación, y pueden aparecer mecanismos compensatorios, como puede ser una activación del reciclaje del contenido celular.

2.4.2. La línea estable SH-SY5Y OE presenta una disminución de la síntesis de *novo* de coenzima Q₁₀

Para corroborar los datos obtenidos mediante transfección transitoria, se cuantificó la síntesis de *novo* de CoQ₁₀ en la línea estable de sobreexpresión de PPTC7. De igual modo se realizó un pulso de 24 horas con pHB radiomarcado.

Como se observa en la figura, las diferencias obtenidas en este caso son mucho mayores, disminuyendo la incorporación en más de un 75% respecto al silvestre. En la sobreexpresión transitoria la medición de la velocidad de síntesis se realiza a las 72 horas de la transfección, mientras que en la línea SH-SY5Y OE las células se encuentran adaptadas a la sobreexpresión, acentuando aun más la diferencia de actividad. Además, los niveles de sobreexpresión obtenidos en la línea estable son mucho mayores a los alcanzados con la transfección con pcDNA-PPTC7.

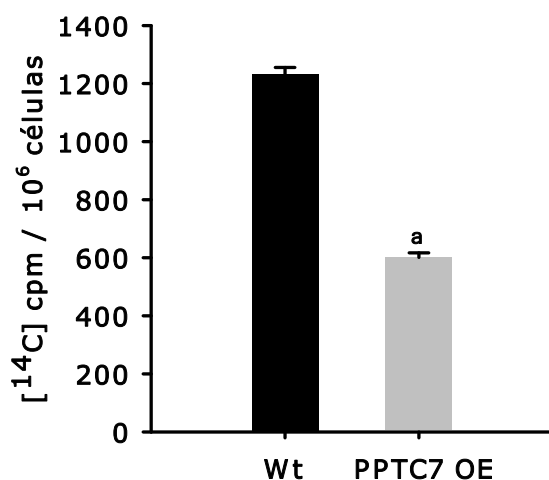


Figura 2.16. Síntesis de *ново* de coenzima Q₁₀. Cuantificación del [¹⁴C] incorporado tras un pulso de 24 horas con [¹⁴C]pHB. Las muestras se resolvieron en TLC y se cuantificaron en el contador de centelleo. Los datos corresponden a la media ± DS de tres medidas de un experimento representativo. P<0,001

2.4.3. Las actividades mitocondriales no se ven afectadas tras la sobreexpresión de PPTC7

Una de las principales funciones del coenzima Q es el transporte de electrones dentro de la cadena respiratoria mitocondrial. Éste actúa como transportador móvil inmerso en la membrana interna mitocondrial, cediendo los electrones que les donan el complejo I o el complejo II, provenientes en primera instancia de la oxidación de NADH o succinato respectivamente, al complejo III. Además, el CoQ forma parte de la estructura del complejo III, estabilizándolo. La cuantificación de las actividades independientes de los complejos de la cadena es un índice de

funcionalidad mitocondrial, utilizado ampliamente en el diagnóstico de pacientes con déficit de CoQ₁₀.

El mutante de levadura *ptc7* presentaba una disminución de las actividades dependientes de coenzima Q₆ (Complejo I+III y II+III), reflejo de los bajos niveles del mismo. Esta deficiencia se recuperaba mediante complementación funcional con *PPTC7*. Dado que los niveles de coenzima Q₁₀ aumentaban hasta duplicar los valores del silvestre al sobreexpresar *PPTC7* en células humanas, se procedió a cuantificar su actividad en la cadena transportadora de electrones, así como la del resto de complejos.

El análisis se llevó a cabo a partir de un extracto total de células silvestres o de la línea OE, solubilizando con digitonina. Las medidas se realizaron en condiciones saturantes de sustrato y de receptor de electrones. Las actividades dependientes de CoQ no se ven afectadas al sobreexpresar *PPTC7*, a pesar de poseer mayores niveles de coenzima Q₁₀. Las actividades de los complejos independientes de coenzima Q tampoco están afectadas de manera significativa. Los datos mostrados en la figura 2.17 están referidos, al igual que los datos de CoQ₁₀, a miligramos de proteínas del extracto total. La actividad citrato sintasa tampoco se ve afectada en esta línea celular.

2.4.4. La sobreexpresión de *PPTC7* incrementa el consumo de oxígeno

El hecho de no tener un incremento de las actividades de los complejos de la cadena respiratoria no implica necesariamente que el consumo de oxígeno no se afecte, ya que éste es una medida de cuánto oxígeno se reduce *in vivo* en células enteras a partir del NADH y succinato sintetizados por la propia célula. En células humanas, descensos en los niveles de ubiquinona están relacionados con un menor consumo de oxígeno (Bautista-Ferrufino, Cordero et al. 2011), como ocurre en fibroblastos de piel tras un tratamiento con amitriptilina, un antidepresivo tricíclico que produce un decremento de los niveles de proteínas mitocondriales y de CoQ₁₀.

La adición de MitoQ₁₀, un análogo del coenzima Q, a células HepG2 y células endoteliales de aorta bovina produce un incremento de la respiración (Fink, O'Malley et al. 2009; Plecita-Hlavata, Jezek et al. 2009).

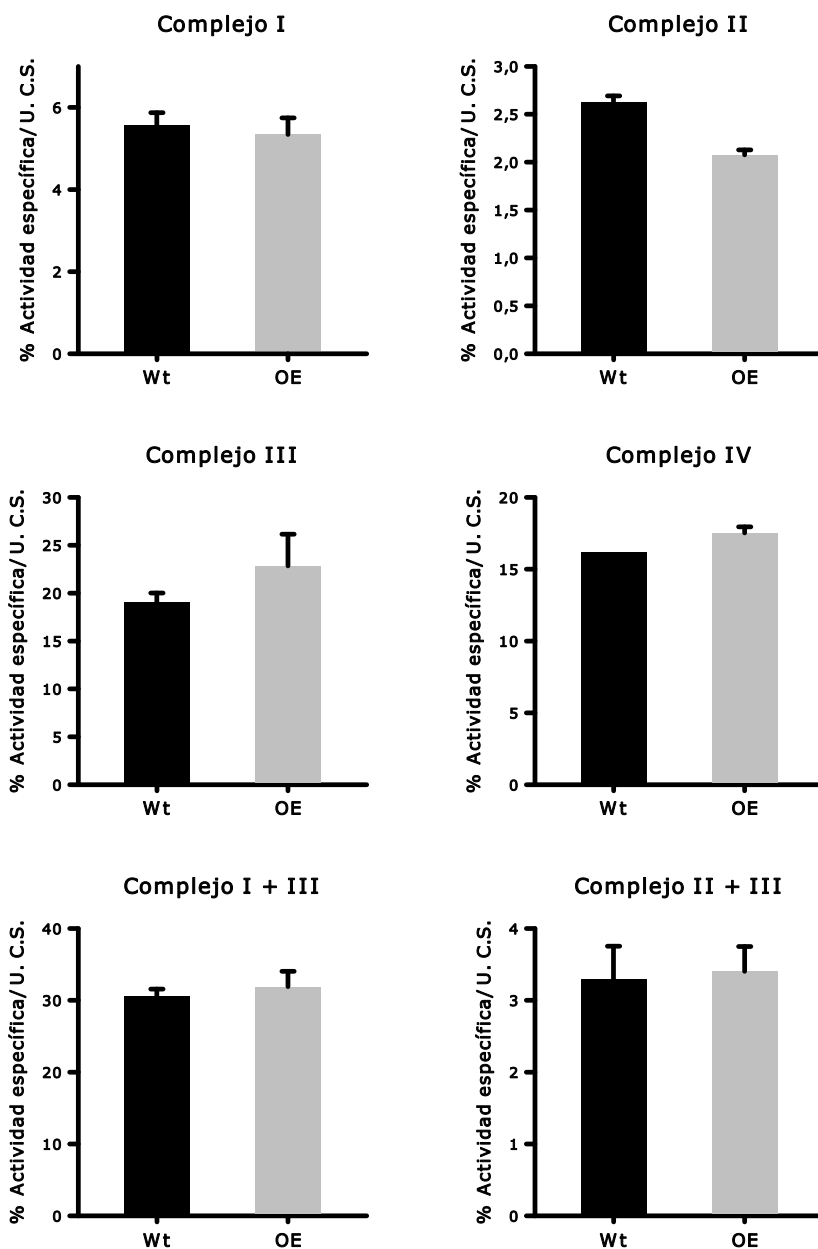


Figura 2.17. Cuantificación de las actividades mitocondriales en la línea SH-SY5Y OE. Análisis completo de las actividades específicas de los complejos de la cadena transportadora de electrones mitocondrial. Las medidas se realizaron sobre extracto total solubilizado con digitonina, y están referidas a actividad citrato sintasa. Valores correspondientes a la media \pm DS de medidas por triplicado.

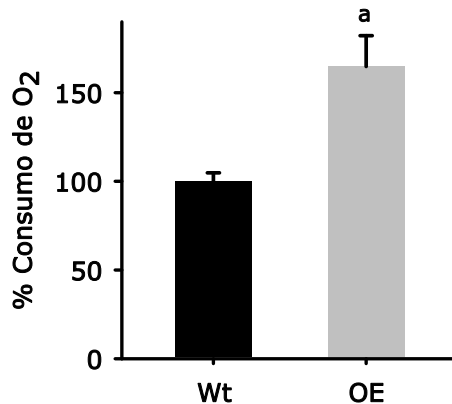


Figura 2.18. Cuantificación del consumo de oxígeno en la línea estable SH-SY5Y *PPTC7* OE. Determinación del consumo mediante electrodo de Clarke. Datos relativizados al consumo de la línea silvestre. Valores correspondientes a la media de triplicados \pm DS. $P < 0.005$

Para poder realizar una medición sobre un elevado número de células se utilizó una línea celular, SH-SY5Y, estable para sobreexpresión de *PPTC7*. Las medidas se realizaron por triplicado sobre 5 millones de células resuspendidas en 3 mL de medio completo fresco. Para determinar el consumo debido a respiración se añadió CNK para inhibir la actividad de la cadena, asumiéndose que la diferencia entre el consumo con y sin cianuro potásico se debe exclusivamente a la reducción por respiración. En la figura 2.18 puede observarse que el incremento de la expresión de *PPTC7* causa un aumento del consumo de oxígeno por respiración en células *in vivo*. La transfección transitoria para sobreexpresar *PPTC7* incrementa los niveles de coenzima Q₁₀ al doble que una línea silvestre, y dicho incremento de los niveles totales de ubiquinona se refleja en un aumento del consumo de oxígeno respiratorio de hasta un 40%.

El coenzima Q₁₀ producido, por tanto, se encuentra disponible en la membrana para realizar una correcta fosforilación oxidativa, consumiendo más oxígeno sin necesidad de incrementar las actividades de los complejos. Estos datos se explicarían con un mejor acoplamiento del consumo de oxígeno en la cadena transportadora de electrones, reflejo de una masa mitocondrial con una funcionalidad óptima.

2.4.5. El ciclo celular no se afecta al sobreexpresar PPTC7

El incremento de los niveles de coenzima Q₁₀ por número de células podría explicarse si las células que sobreexpresan PPTC7 sufriesen una parada en fase S o simplemente fuesen de mayor tamaño, requiriendo una mayor cantidad de organelas. Para comprobar tanto el ciclo celular como estimar el tamaño celular se realizó un análisis por citometría de flujo con tinción con ioduro de propidio (IP).

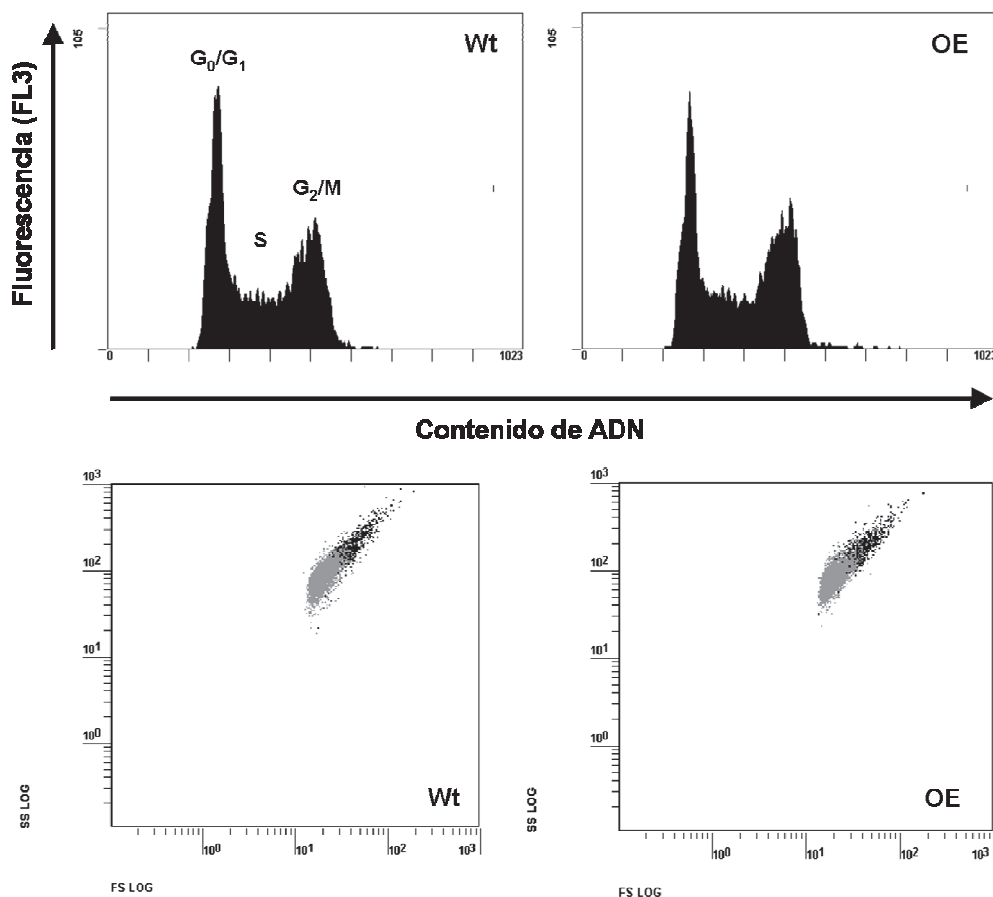


Figura 2.19. La sobreexpresión de PPTC7 no altera el ciclo celular. Determinación del ciclo celular mediante citometría. Las células silvestre (Wt) y SH-SY5Y OE (OE) se cultivaron durante 24 horas, se recogieron por centrifugación y se fijaron con etanol frío durante al menos 24 horas a -20°C. Las células se tiñeron con ioduro de propidio y se analizaron mediante citometría. Los datos corresponden a la fluorescencia (FL3) de un experimento representativo de tres. El tamaño se determinó mediante el ratio SS/FS.

Las células se fijaron con etanol 96% 4°C y se tiñeron con IP según se describe en materiales y métodos. La línea SH-SY5Y OE no mostró ninguna alteración en el ciclo celular, tal y como se observa en la figura 2.19. Tampoco se apreciaron cambios sustanciales en el tamaño celular, indicando que el incremento del contenido de coenzima Q₁₀ se debe a un aumento de éste en las membranas celulares.

2.4.6. Producción de ROS

Como se ha comentado anteriormente, la estirpe de levadura mutante *ptc7* presentaban una mayor producción de ROS y carbonilación de proteínas (Martin-Montalvo 2009).

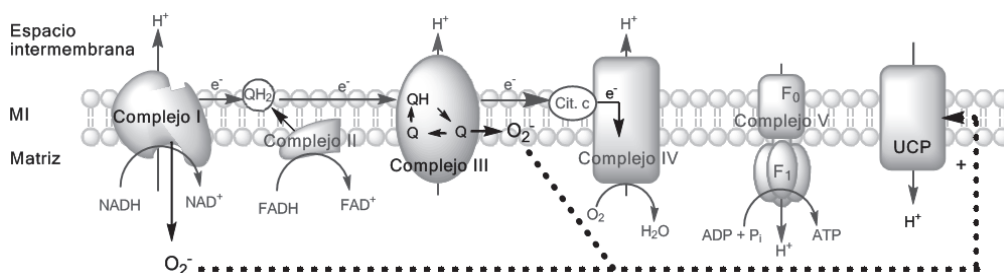


Figura 2.20. Producción de ROS en la cadena transportadora de electrones.

La mitocondria está considerada como el mayor productor de superóxido en la célula (Green and Grover 2000; Chance 2004). El anión superóxido en la cadena respiratoria mitocondrial se produce mayoritariamente en el complejo III, en el ciclo del CoQ, como resultado de la pérdida de un electrón generado por la semiquinona (Han, Antunes et al. 2002), aunque también se produce en el complejo I (Raha and Robinson 2000). El anión superóxido corresponde al primer paso de reducción del oxígeno, anterior al peróxido de hidrógeno. La detoxificación de este producto viene dada por la superóxido dismutasa, la cual lo transforma en H₂O₂. La toxicidad de esta especie reactiva de oxígeno radica en su capacidad de generar otros ROS y de penetrar las membranas celulares, pudiendo producir daños en diversas moléculas orgánicas que conforman las estructuras de la célula, desestabilizándolas.

El coenzima Q puede ejercer dos papeles muy diferentes frente al estrés oxidativo. Su principal papel es el de antioxidante, aunque como hemos comentado, puede

actuar como pro-oxidante al generar ROS en su ciclo redox. Un estudio en levadura muestra que elevados niveles de coenzima Q no siempre significan una mejora en el estado de la mitocondria. Una serie de mutaciones puntuales en *COQ7* simulando un estado defosforilado y, por tanto, permanentemente activo, mostró que, a pesar de los elevados niveles quinónicos, la producción de ROS era mayor que el silvestre, al igual que una estirpe deficiente en la síntesis de CoQ₆ (Martin-Montalvo 2009).

Mediante dihidroetidio y MitoSox se cuantificó el anión superóxido producido en la célula y de forma específica en la mitocondria respectivamente. Se observa un drástico descenso en los niveles de superóxido en ambos casos.

Los niveles totales de O₂⁻ son menores en la línea estable OE (Figura 2.21) en comparación con la línea silvestre de células SH-SY5Y.

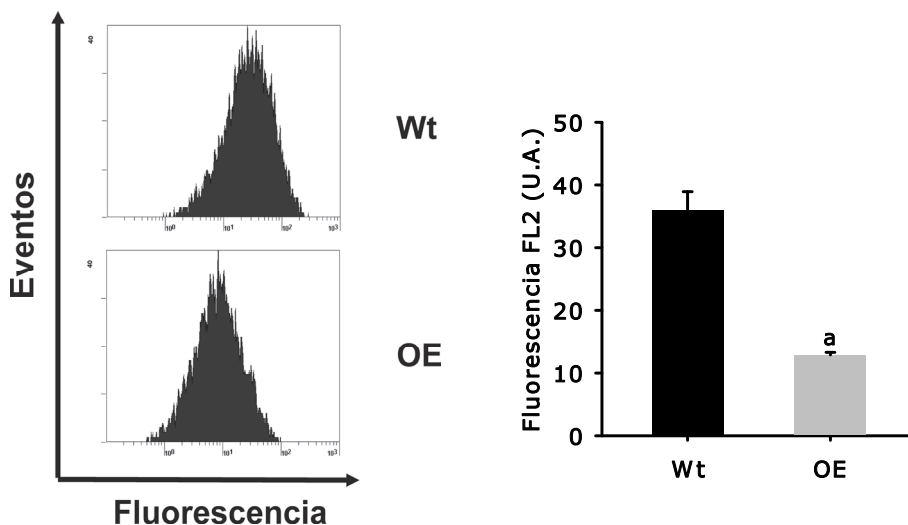


Figura 2.21. Cuantificación de los niveles de anión superóxido en la célula. Análisis por citometría de la oxidación de hidroetidio (media de la fluorescencia FL2) *in vivo* de cultivos de la línea silvestre (Wt) y de la línea estable de sobreexpresión (OE). Datos correspondientes a la media de al menos tres medidas \pm DS. $P < 0.001$

En la mitocondria, la cual está considerada como el mayor productor de superóxido en la célula, los niveles también son menores (Figura 2.22), indicando un mejor funcionamiento del transporte de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial, contrario al defecto observado en el mutante KO de levaduras.

El análisis por citometría de la producción de ROS es limitado debido al GFP expresado en la línea estable de SH-SY5Y, de modo que tan *sólo* fue posible analizar la producción del anión superóxido.

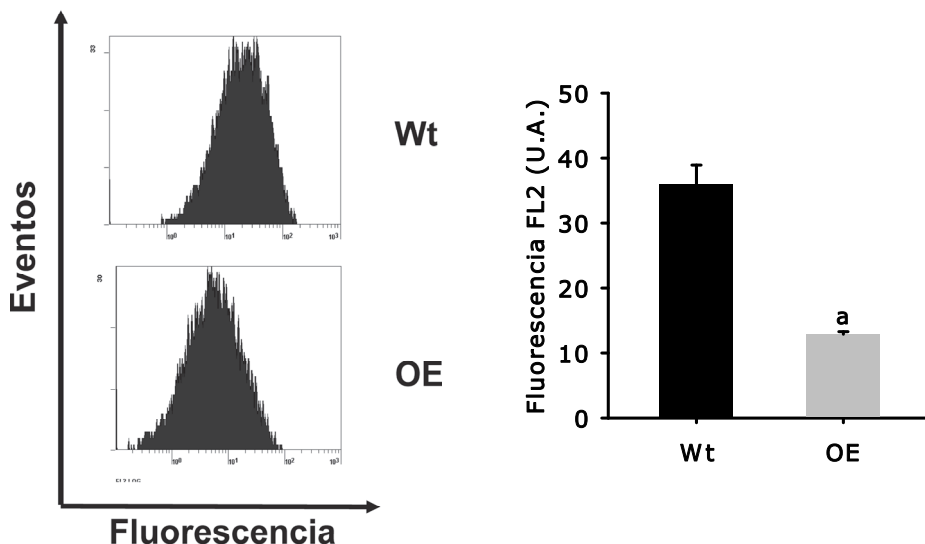


Figura 2.22. Cuantificación de la producción anión superóxido en la mitocondria. Análisis por citometría mediante tinción con MitoSox in vivo. Datos correspondientes a la media de al menos tres valores de fluorescencia FL2 independientes \pm DS. $P < 0.001$

Este dato, junto al consumo de oxígeno, se puede interpretar como un mejor acoplamiento de la fosforilación oxidativa. Por tanto, los elevados niveles de coenzima Q_{10} obtenidos en la línea OE no sólo actúan en la mitocondria como transportador de electrones, sino que lo hace de una manera más eficiente.

Los incrementos de los niveles de coenzima Q_{10} no implican un aumento de las actividades de la cadena transportadora de electrones ni de la actividad citrato sintasa, manteniendo el tamaño celular, pero sí producen un aumento del consumo de oxígeno por respiración y una disminución de la producción de ROS. Esta mayor eficiencia en el metabolismo respiratorio podría explicarse no sólo con un aumento de los niveles quinónicos, sino también con una mejor calidad de la masa mitocondrial. Mediante diversos mecanismos, la célula mantiene un reciclaje del material intracelular dañado. Este proceso es llevado a cabo por los lisosomas a través de la autofagia, o por el proteosoma. Previamente se ha asociado a Ptc6p, una de las fosfatasas que regulan la biosíntesis de coenzima Q_6 en *S. cerevisiae*,

con la mitofagia (Tal et al., 2007). En los últimos años se ha descrito en células de mamífero un sistema específico de degradación de mitocondrias dañadas a través del sistema dual PINK/Parkin (Springer and Kahle, 2011), mediante el cual se eliminan las mitocondrias defectuosas, evitando así la generación de ROS producida por un metabolismo mitocondrial aberrante. Ptc6 parece conectar en levadura el metabolismo bioenergético, modulando la biosíntesis de CoQ₆, y el reciclaje de las mitocondrias. Ante la ausencia de Ptc6 en eucariotas superiores, Pptc7 podría ejercer como modulador de ambas rutas. Dada la similitud del fenotipo de ambos mutantes fosfatasa en levadura, salvo el estímulo de disparo de su expresión, no parece descabellado pensar que sea Pptc7 quien asuma el papel en eucariotas superiores, en los cuales no es necesario un reajuste metabólico como en el caso de la levadura.

3. Participación de Pptc7 en el proceso de autofagia/mitofagia

Diversos estudios demuestran que fibroblastos de pacientes con deficiencia de coenzima Q₁₀ muestran, además de una disfunción mitocondrial, un incremento de los niveles de ROS, activación de la permeabilidad transitoria mitocondrial (MPTP) y un incremento de la degradación específica de mitocondrias por macroautofagia (mitofagia). Este proceso es revertido por la adición de antioxidantes como la ciclosporina, y se ha descrito como un sistema de defensa celular frente al daño por estrés oxidativo (Rodríguez-Hernandez, Cordero et al. 2009). La activación del MPTP produce una depolarización del potencial de membrana mitocondrial, señal que dispara el proceso de mitofagia. La autofagia es un sistema de control de la calidad celular, para el mantenimiento de sus estructuras, pero una autofagia masiva puede generar daños celulares y contribuir a la patología en sí (Levine and Yuan 2005). Un reciente estudio asocia la deficiencia secundaria de coenzima Q₁₀ en fibroblastos de pacientes MELAS con un disparo de la mitofagia, además de un defecto en la eliminación de los autofagosomas (Cotan, Cordero et al. 2011).

3.1. Análisis de la autofagia en células SH-SY5Y estables para sobreexpresión de *PPTC7*

La fosfatasa Ptc6p en levadura se encuentra implicada en dos procesos diferentes aunque interrelacionados. Ante una modificación de la fuente de carbono disponible a una no fermentable, y por tanto, la necesidad de una adaptación y un cambio metabólico, Ptc6p activa Coq7p para inducir la biosíntesis de CoQ₆ (Martin-Montalvo 2009) y media en el disparo de la degradación selectiva de las mitocondrias (Tal, Winter et al. 2007). Se conoce que un estado alterado de la bioenergética de la mitocondria dispara la mitofagia en levaduras (Priault, Salin et al. 2005). Éste es el primer mecanismo molecular descrito que medie entre estas dos rutas tan íntimamente relacionadas con la bioenergética. La regulación por Ptc7p se estimula ante situaciones de estrés oxidativo, aunque ninguna implicación en la mitofagia ha sido descrita para esta fosfatasa. La ausencia de homólogos de *PTC6* en eucariotas superiores deja a Pptc7 como protagonista único en la regulación por defosforilación de la actividad de hCoq7, pero la función en la autofagia queda hasta ahora sin ningún representante. Es por ello que se decidió observar la existencia de alguna perturbación en el proceso degradativo de material celular al sobreexpresar *PPTC7* en células humanas.

3.1.1. La sobreexpresión de *PPTC7* produce un incremento de la degradación de proteínas en la célula

Una estrategia general para monitorizar la degradación de proteínas de vida media larga, las cuales tienden a ser degradadas mayoritariamente por autofagia en vez de por otros procesos (proteosoma, autofagia mediada por chaperonas -CMA-, etc), es el pulso y caza. Para ello, se realiza un pulso con aminoácidos radiomarcados, el cual debe ser lo suficientemente largo como para garantizar un marcaje del *pool* de proteínas (Klionsky, Cuervo et al. 2007). Para evitar la metabolización del aminoácido liberado, se seleccionó uno que fuese poco metabolizado y fácilmente intercambiado a través de la membrana plasmática, como la leucina marcada con tritio (^3H).

Ciertamente, la distinción entre proteínas de vida media larga o corta no es del todo correcta. Prácticamente todas las proteínas celulares son degradadas por la ruta lisosomal de autofagia (Kopitz, Kisen et al. 1990). Para estimar la degradación por rutas no lisosomales se utilizaron inhibidores de la proteólisis lisosomal como el cloruro de amonio o la leupeptina (Fuertes, Martin De Llano et al. 2003). Con el fin de obtener una medida más específica de la degradación por autofagia, se utilizó 3-metiladenina (3MA), un inhibidor selectivo de la macroautofagia (Seglen and Gordon 1982).

De forma similar a las levaduras, la privación de nutrientes induce la autofagia en células de mamífero (Mizushima, Yamamoto et al. 2004). Como método general para inducir la macroautofagia, las células se sometieron a una privación de suero tras el pulso con ^3H -Leu.

Se sembraron células SH-SY5Y y células NIH-3T3 silvestres o sobreexpresando *PPTC7* a una densidad de 50.000 células/pocillo en placas de 12 pocillos, y se añadió medio D-MEM completo con ^3H -Leu, dejando la incorporación del marcaje durante 48 horas. Se lavaron las células para eliminar cualquier posible resto de radiactividad y se añadieron los distintos medios (con o sin suero) con o sin inhibidores de proteasas (cloruro de amonio y leupeptina -N/L-) o inhibidores de macroautofagia (3MA), incluyendo en el medio 250 mM de leucina no radiomarcada.

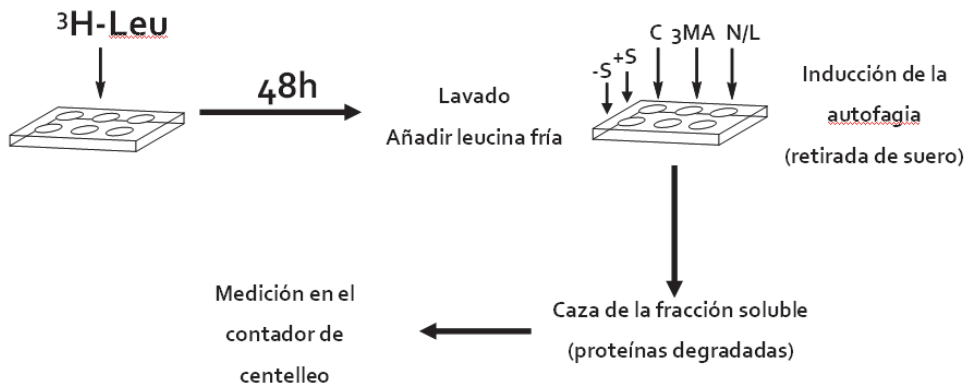


Figura 3.1. Esquema del pulso y caza

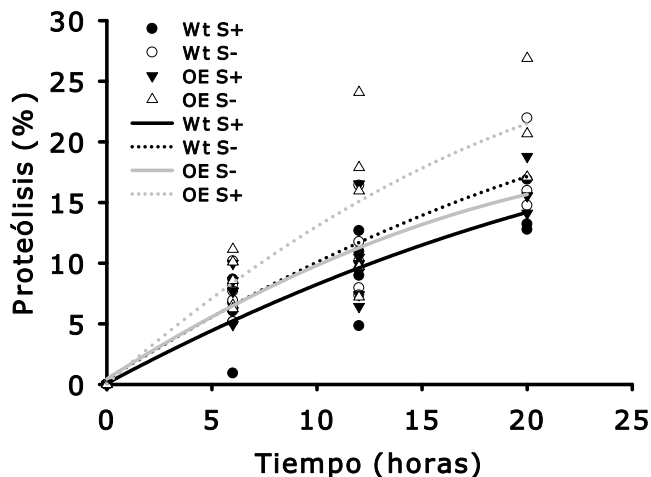
La caza se llevó a cabo recogiendo 50 μL de medio a las 0, 6, 12 y 20 horas. Para cuantificar la liberación de aminoácidos y evitar una posible contaminación con proteínas o restos celulares, las muestras se precipitaron añadiendo 9% de TCA y BSA 4 mg/ml, y posteriormente se filtraron antes de cuantificar la radioactividad en el contador de centelleo. Para relativizar al total de la incorporación, a las 20 horas se realizó un homogenado total de las células y se cuantificó en el contador de centelleo igualmente.

La determinación del ratio de degradación ante la retirada de suero con respecto a la degradación en las células cultivadas con suero (degradación S-/degradación S+) aporta información sobre la capacidad de respuesta ante este estímulo. Un ratio mayor corresponde a una mayor sensibilidad del sistema degradativo celular a la retirada de suero del medio.

En la línea de sobreexpresión de SH-SY5Y se aprecia un leve incremento de la degradación basal en medio con suero en comparación al silvestre (Figura 3.2, A). Pero no solamente existe una mayor degradación de base, sino que la respuesta a la retirada de suero es mayor al sobreexpresar *PPTC7* (Figura 3.2, B). Estas diferencias no son muy acusadas, lo cual pudiera deberse a otros factores limitantes en el proceso de degradación. Para este caso sería conveniente el estudio del efecto del silenciamiento en la degradación total. La imposibilidad de obtener una línea estable silenciada para *PPTC7* resulta un *handicap* a lo largo de este trabajo.

El uso de inhibidores de la proteólisis produce una disminución de la liberación de ^3H -Leu al medio en ambos casos de manera similar (Figura 3.3, A), aunque en el caso de la línea OE existe una mayor degradación lisosomal a las 12 horas de la retirada de suero en comparación al silvestre (Figura 3.3, B).

A



B

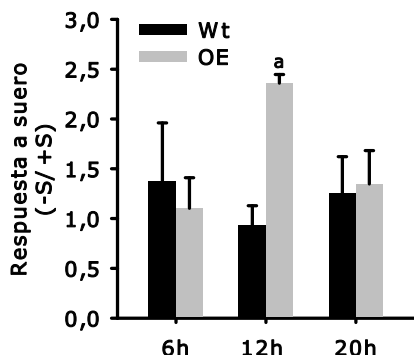


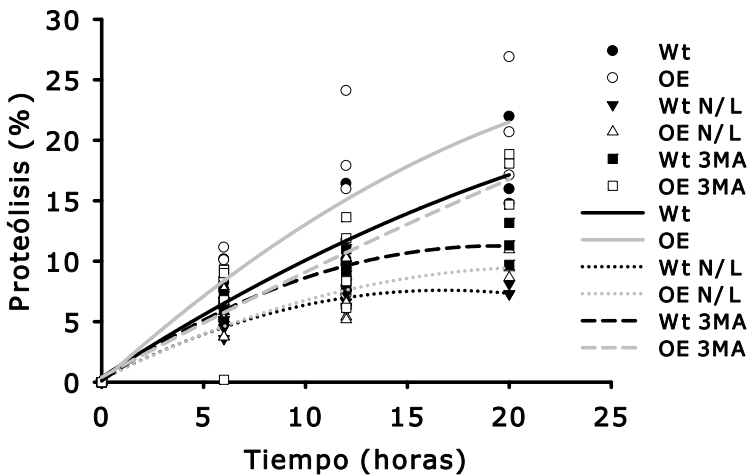
Figura 3.2. Disparo de la degradación de proteínas ante la retirada de suero en células SH-SY5Y silvestre y OE. Cuantificación mediante pulso y caza con leucina radiomarcada con ^3H de la degradación total de proteínas en células silvestre y OE. **A:** porcentaje de degradación total respecto al total de radiactividad incorporada en condiciones de cultivo con (+S) o sin suero (-S). **B:** respuesta a la retirada de suero de cada una de las estirpes (degradación -S/degradación +S). Valores correspondientes a la media de al menos tres ensayos \pm DS. $P < 0.001$

Al añadir 3MA al medio la liberación disminuye en menor medida que en el caso anterior (Figura 3.3, A). Esta diferencia marca la degradación producida por otras rutas como la debida a la autofagia mediada por chaperonas o la microautofagia. Se observa una diferencia significativa en la inhibición de la macroautofagia a partir de las 12 horas, posiblemente debida a procesos compensatorios. El ratio obtenido al relativizar la degradación en presencia de inhibidores de proteasas frente a la degradación sin inhibidores da una idea de la

degradación resultante de la acción de proteasas, excluyendo la acción del proteosoma (Figura 3.3, B). Este ratio confirma que el incremento producido en la degradación en la línea SH-SY5Y OE se debe a un incremento de la actividad lisosomal.

En el caso de la línea de fibroblastos de ratón (NIH-3T3), las diferencias fueron mucho menores, aunque se mantiene la tendencia a una mayor degradación (Figura 3.4, A). En este caso los niveles de sobreexpresión de *PPTC7* eran mucho menores que los conseguidos en SH-SY5Y, lo cual podría explicar la atenuación del resultado.

A



B

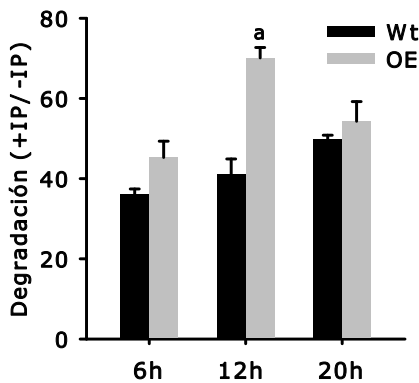
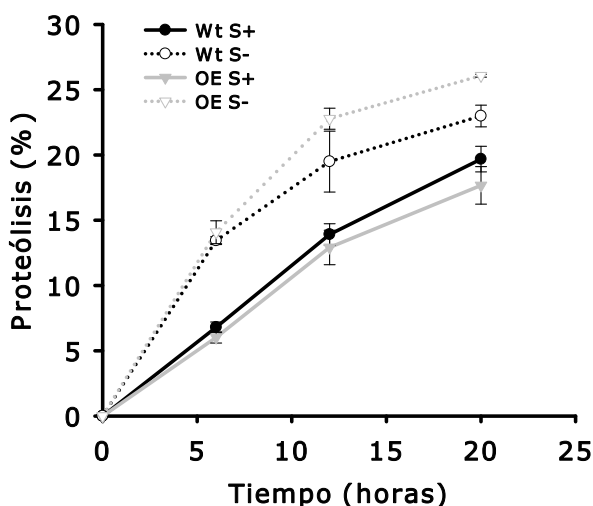


Figura 3.3. Cuantificación de la proteólisis total al inducir la autofagia en células SH-SY5Y silvestres y OE. Pulso con $^3\text{H-Leu}$ en las líneas silvestre y OE y caza tras retirar el suero +/- inhibidores de proteasas (N/L) o inhibidor de la macroautofagia (3MA). **A:** Porcentaje de degradación respecto al total de radiactividad incorporada tras la retirada de suero, +/- inhibidores (N/L o 3MA). **B:** Degradación lisosomal (porcentaje de proteólisis con inhibidores de proteasas por nivel de proteólisis sin inhibidores de proteasas). Valores correspondientes a la media de al menos tres ensayos \pm DS. $P < 0.002$

Sin embargo, debido a la naturaleza más resistente de este tipo celular, los resultados fueron mucho más robustos.

En este caso, aunque la degradación basal es similar al silvestre, la respuesta a la retirada de suero es mayor en todos los casos en la línea OE en comparación con el silvestre (Figura 3.4), aunque sólo de manera significativa a las 12 y 20 horas de retirada de suero.

A



B

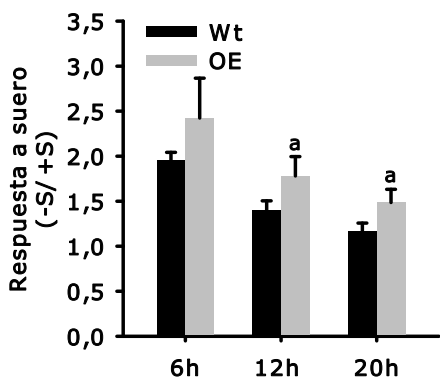


Figura 3.4. Proteólisis ante la retirada de suero en las líneas celulares NIH-3T3 silvestres y OE. Pulso con ^3H -Leu y seguimiento de la degradación tras la activación de la autofagia. **A:** Porcentaje de proteólisis tras un pulso con ^3H -Leu. Valores en cultivos +/- suero. **B:** Respuesta de cada línea celular ante la retirada de suero. Valores correspondientes a la media de al menos tres ensayos \pm DS. $P < 0.05$.

3.1.2. El sistema de degradación por macroautofagia se encuentra regulado positivamente en la línea de sobreexpresión de *PPTC7*.

LC3 es el homólogo humano de Atg8, implicado en la formación del fagóforo en el proceso de la macroautofagia. En su forma libre es soluble (LC3-I), y se modifica a su forma conjugada a fosfolípido (LC3-II o LC3-PE) para formar el autofagosoma (Kabeya, Mizushima et al. 2000). Una vez formado el autofagosoma, éste se fusiona al lisosoma para formar el autolisosoma y degradar el cargo. Una vez se encuentra en dicho compartimento, finalmente LC3-II es degradado (Tanida, Minematsu-Ikeguchi et al. 2005). De este modo, mientras la aparición de LC3-II corresponde bien a una activación de la macroautofagia o bien a un defecto en la fusión del lisosoma al autofagosoma, un incremento de los niveles de su forma conjugada tras un tratamiento con inhibidores de la proteólisis indican un correcto flujo del cargo al autolisosoma.

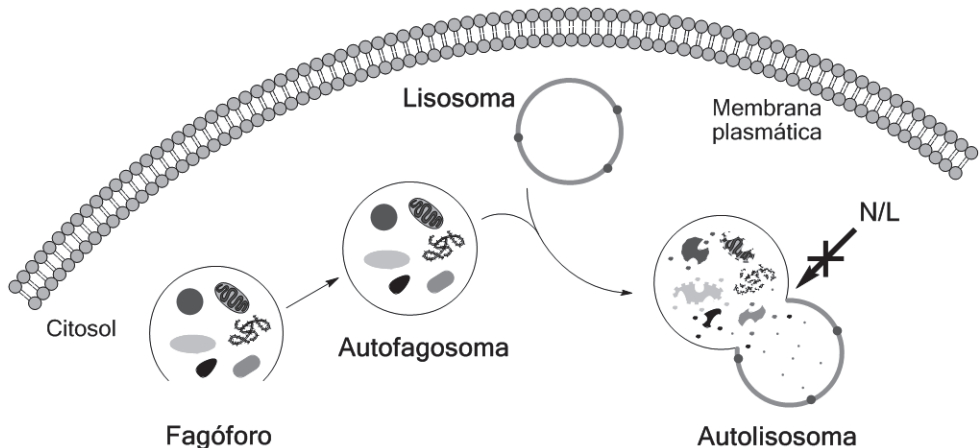


Figura 3.5. Modelo de estudio del flujo de autofagosomas a autolisosomas. La adición de inhibidores de proteasas (PI) como el cloruro de amonio (N) y la leupeptina (L) inhiben la degradación del cargo de los autofagosomas. Esto permite cuantificar, mediante un ratio +PI/-PI, el contenido de los autofagosomas que es finalmente degradado.

Para comprobar el flujo de LC3 en la línea de SH-SY5Y estable para sobreexpresión de *PPTC7* se cultivaron en medio sin suero durante 6 y 12 horas. El tratamiento con cloruro de amonio y leupeptina 20 μ M y 100 μ M respectivamente se realizó durante 4 horas. Las células se recogieron y se homogeneizaron en RIPA buffer. Del extracto de proteínas, 100 μ g de cada muestra se resolvieron en una SDS-PAGE con transferencia a membrana de nitrocelulosa y se reveló con un anticuerpo contra LC3 (Cell Signaling). Para cuantificar el flujo se realizó una

cuantificación densitométrica (ImageJ) de la banda correspondiente a LC3-II, y se realizó un cociente entre el valor obtenido con el tratamiento con N/L con respecto a la ausencia de inhibidores. Dicho cociente valora la proporción de autolisosomas por autofagosomas formados, la cual genera un valor de degradación.

Como se puede observar, el nivel basal de degradación de SH-SY5Y-*PPTC7* se encuentra considerablemente más elevado con respecto al silvestre (Figura 3.6, A y B), al igual que ocurría en el experimento de pulso y caza. Pero en este caso la degradación corresponde específicamente a un proceso de macroautofagia (flujo de LC3 I a LC3 II). La autofagia está activa a nivel basal en casi todos los tipos celulares, reflejo del reciclaje de proteínas de larga vida media y de la eliminación de estructuras dañadas (revisado en Noboru Mizushima, 2007). *Pptc7* parece favorecer la ruta de la macroautofagia, sin necesidad de un estímulo previo.

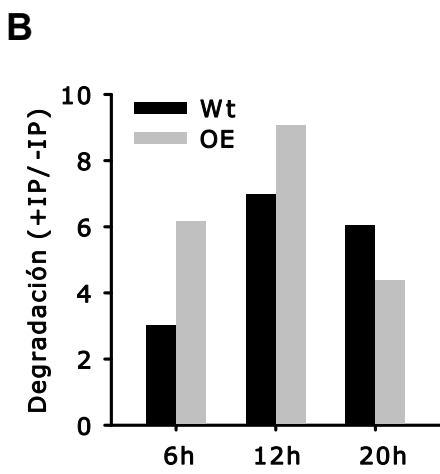
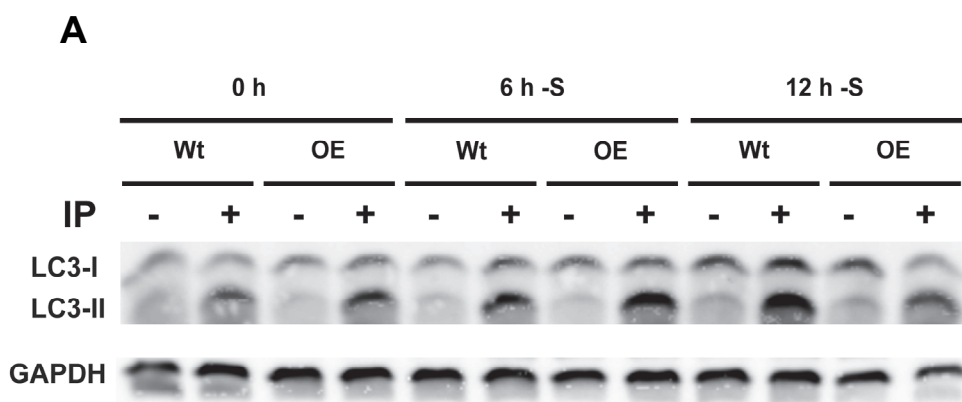
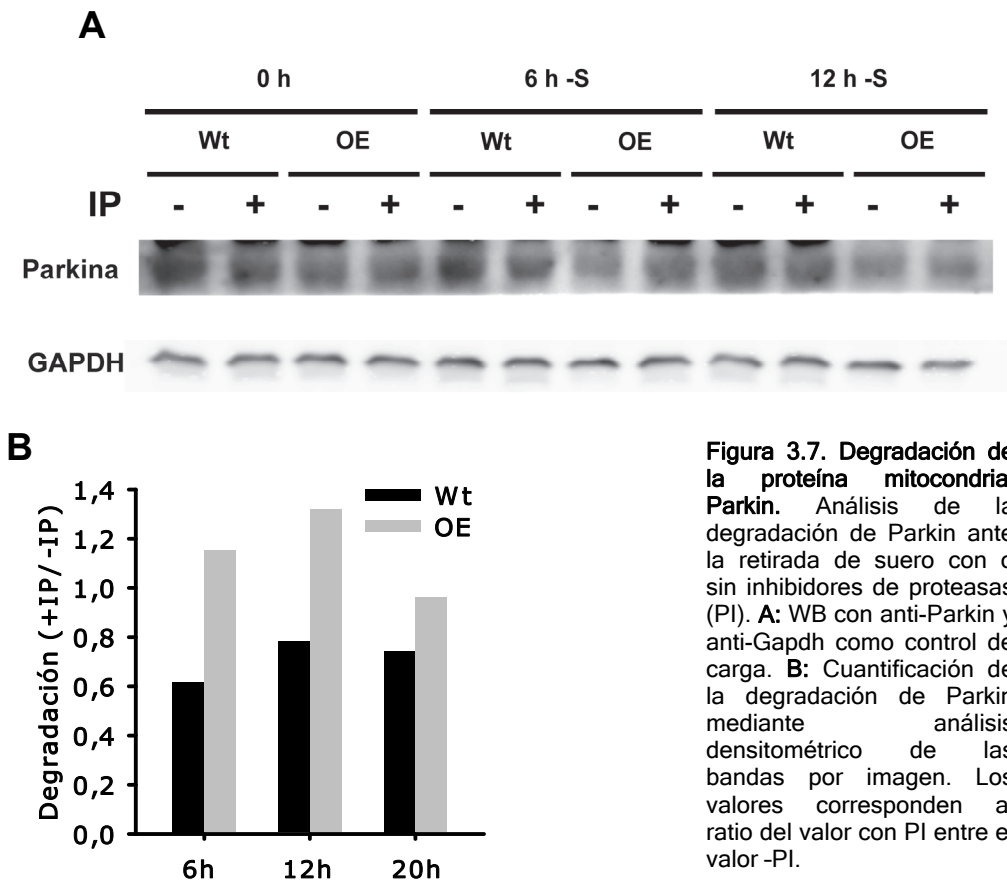


Figura 3.6. Análisis de la capacidad de formación de autofagosomas y autolisosomas en células SH-SY5Y silvestres y OE. Se cultivaron las distintas líneas celulares en medio sin suero +/- inhibidores de proteasas (PI). Muestras de proteína tomadas a tiempo 0, 6 y 12 horas se resolvieron en SDS-PAGE. **A:** WB con anti-LC3 y Gapdh. **B:** cuantificación del flujo de LC3-II. Las bandas del WB se cuantificaron por densitometría (ImageJ). Se representan los valores del ratio + PI/-PI.

La respuesta a la retirada de suero generada en la línea estable de sobreexpresión vuelve a ser mayor en este caso, observándose un incremento de la degradación de LC3-II a las 6 horas de retirada de suero que supera los niveles del silvestre (Figura 3.6, B).

En el proceso selectivo de mitofagia, Parkin, una E3 ubiquitin ligasa, posee un importante papel. Dicha proteína transloca a la mitocondria mediante PINK1, una proteína quinasa de la membrana externa mitocondrial que se acumula en mitocondrias dañadas (Narendra et al., 2008). Al observar el flujo de Parkin se observa un incremento de su degradación tanto a niveles basales como tras la retirada de suero en la línea SH-SY5Y OE, indicando una mayor tasa de eliminación de la mitocondria (Figura 3.7, B).



Por otro lado, los niveles proteicos de Parkin en la línea OE son menores en condiciones basales que en células silvestres. Esto podría ser indicativo de un proceso alternativo a PINK1/Parkin de señalización en la mitofagia.

Un análisis de la degradación basal de una proteína de la membrana interna mitocondrial, como es la subunidad 2 de la citocromo *c* oxidasa, revela un incremento de la mitofagia en la línea SH-SY5Y OE respecto al silvestre (Figura 3.8, B). Esta degradación se traduce en una disminución leve de los niveles proteicos, la cual no implica una disminución de la actividad del complejo IV (Figura 2.13).

La mitofagia puede inducirse por la producción de ROS (Kim et al, 2007). En nuestro modelo, aun siendo los niveles de ROS considerablemente mayores en el silvestre en comparación con SH-SY5Y OE (Figura 2.16 y 2.17), los mecanismos de autofagia parecen estar regulados positivamente en la línea estable de sobreexpresión de *PPTC7*.

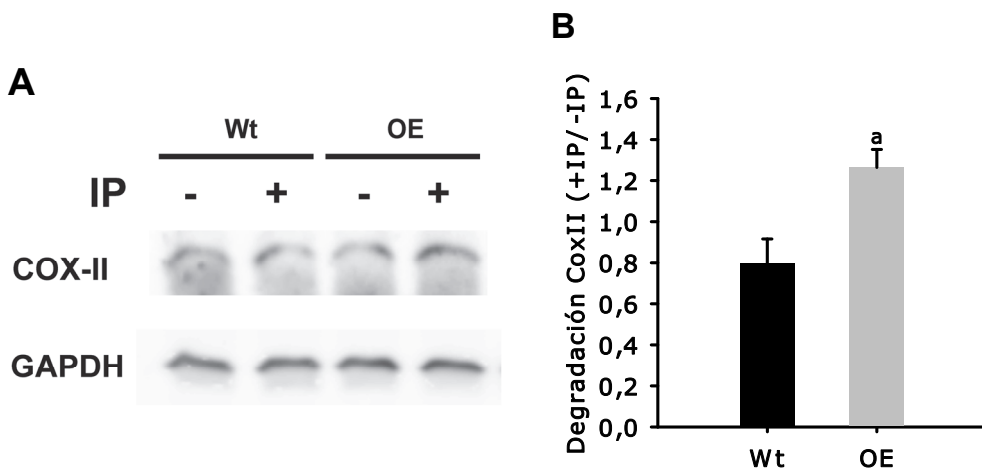


Figura 3.8. Degradación de la subunidad II del complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial. Cuantificación de la degradación basal de un marcador mitocondrial. A: WB anti-COX II de extractos proteicos resueltos en SDS-PAGE provenientes de células SH-SY5Y silvestres o OE con un tratamiento +/- inhibidores de proteasas durante 4h. B: Cuantificación de la degradación de la subunidad II de la citocromo *c* oxidasa. Ratio de los valores densitométricos con inhibidores respecto a sin inhibidores.

En este supuesto, Pptc7 estaría ejerciendo un control de la calidad de la mitocondria mediante su degradación, y una mejora en el proceso respiratorio, con un transporte de electrones mejor acoplado y una disminución en la producción de ROS.

3.2. Ptc7p, al igual que Ptc6p, se encuentra implicado en la degradación selectiva de mitocondrias en *Saccharomyces cerevisiae*.

La levadura ofrece un modelo de fácil manipulación para el estudio de la autofagia. Al igual que en la ruta de síntesis de coenzima Q, la mayoría de los genes ATG (genes de autofagia) han sido descritos en *S. cerevisiae*. En los últimos 2 años diversos estudios en este modelo han desvelado mecanismos de degradación selectiva de la mitocondria, proceso al cual se le conoce por el nombre de mitofagia (Kanki, Wang et al. 2009; Okamoto, Kondo-Okamoto et al. 2009). Dada su fácil manipulación y a la existencia de recientes herramientas bioquímicas desarrolladas para su estudio, se realizó un análisis del estado de la autofagia y la mitofagia en los mutantes fosfatasas *PTC6* y *PTC7* de levadura.

3.2.1. La ausencia de *PTC6* o *PTC7* no inhibe el proceso de autofagia ante la privación de nitrógeno

Una deficiencia en la degradación selectiva de mitocondrias puede provenir de un defecto en la ruta de señalización, nucleación, elongación o maduración del fagóforo, fusión del mismo con el lisosoma o un fallo en la degradación del cargo.

Para poder determinar si Ptc7p es necesario para macroautofagia inespecífica o para autofagia selectiva de mitocondrias, se utilizó un plásmido que expresa Atg8p fusionado a GFP en el extremo C-terminal bajo su propio promotor (Suzuki, Kirisako et al. 2001). Atg8-GFP es un marcador del fagóforo, el compartimento de secuestro inicial que forma el autofagosoma, y una población de esta proteína permanece asociada a la vesícula completa. GFP en constructos de fusión es relativamente estable en el lumen de la vacuola, y frecuentemente se libera como una proteína intacta tras ser transportada a la vacuola (Shintani and Klionsky 2004). De este modo, en una estirpe silvestre, al inducir macroautofagia mediante privación de nitrógeno, se puede observar mediante *Western Blot* la liberación del *tag* de la quimera.

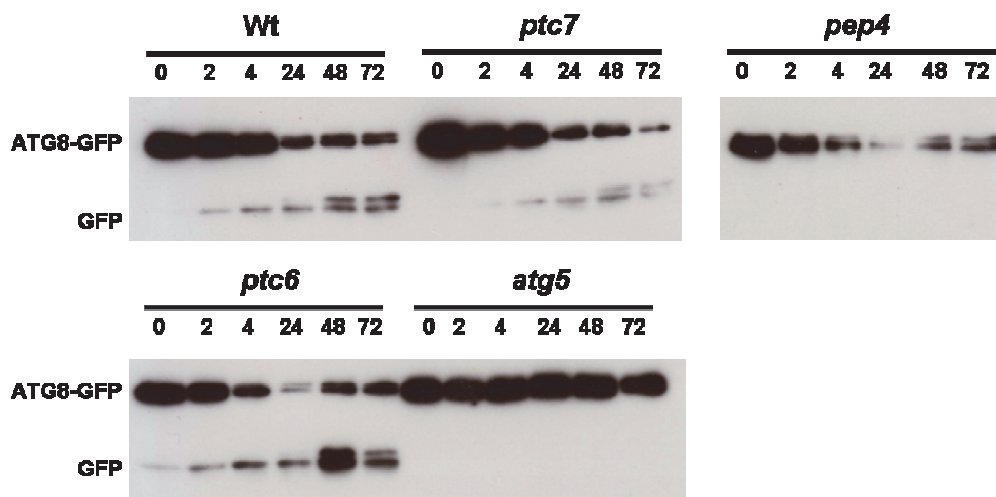


Figura 3.9. Análisis de la macroautofagia mediante liberación de GFP del constructo Atg8-GFP. Cultivos de los diversos mutantes en YPD se pasaron a medio SDc-N para activar la autofagia por privación de nitrógeno. Se recogieron muestras a las 0, 2, 4, 24, 48 y 72 horas y se resolvieron en una SDS-PAGE. WB anti-GFP.

Se seleccionaron mutantes en un gen implicado en la elongación y maduración del fagóforo (Tsukada and Ohsumi 1993) -ATG5- y otro en la maduración de proteasas vacuolares (Woolford, Daniels et al. 1986) -PEP4- como controles, además de una estirpe silvestre y los mutantes fosfatasa, y se transformaron con el plásmido Atg8-GFP. Se hicieron cultivos en YPD, y en la fase exponencial se pasaron a medio sin nitrógeno (SDc-N) para inducir la mitofagia. En la figura 3.9 se observa como en el mutante *atg5*, en el cual no se llega a formar el fagóforo, no se produce liberación de GFP. Lo mismo ocurre en el mutante *pep4*, el cual no es capaz de degradar el cargo que llega a la vacuola, y tampoco se observa degradación de la proteína recombinante Atg8-GFP. Sin embargo, en ambos mutantes para las fosfatasa *ptc6* y *ptc7*, así como en el silvestre, se produce una degradación de Atg8p y la concomitante liberación de GFP, indicando que tanto la inducción de la macroautofagia como la formación del autofagosoma no son el motivo de la falta de degradación de las mitocondrias. Sin embargo sí puede apreciarse una ligera deficiencia en el mutante *ptc7*.

3.2.2. Los mutantes *ptc6* y *ptc7* presentan un defecto en la degradación de porina en condiciones de privación de nitrógeno

La proteína Ptc6 (Aup1) fue identificada a como una fosfatasa implicada en la regulación de la mitofagia en fase estacionaria (Tal, Winter et al. 2007). Anteriormente se ha demostrado la implicación de esta fosfatasa en la regulación de la síntesis de coenzima Q₆ en levaduras (Martin-Montalvo 2009). Aup1p regula la translocación al núcleo de Rtg3p/Rtg1p. Rtg3p es un factor de transcripción que activa la ruta de la respuesta retrógrada (RTG) y la ruta TOR (macroautofagia). Esta relación entre Ptc6p y RTG explica la relación de la fosfatasa con la mitofagia, dado que la respuesta retrógrada regula la mitofagia en fase estacionaria (Journon, Mor et al. 2009). Posteriormente se ha descrito un protocolo para la monitorización de mitofagia, en el cual las células son sometidas a un cambio tanto de la fuente de carbono como de la disponibilidad de nitrógeno (Kissova, Salin et al. 2007). En su trabajo, cultiva levaduras en medio con lactato, favoreciendo la biosíntesis mitocondrial, para después pasarlas a medio SDc -N, en el cual la masa mitocondrial es dispensable, además de requerir un reciclado del material innecesario ante la falta de nitrógeno. Kanki destaca la importancia de la fuente de carbono, puesto que aun a pesar de no disponer de nitrógeno en el medio, si las células permanecen en lactato la mitofagia ocurre a niveles muy bajos (Kanki, Kang et al. 2009).

En nuestro estudio, las distintas estirpes se cultivaron en medio SD completo con glucosa como fuente de carbono y se indujo la autofagia mediante un cambio a SDc sin fuente de nitrógeno durante 120 horas. Este protocolo presenta una modificación del método descrito por Kissova. En este caso no se indujo la biogénesis mitocondrial previo a la privación de nitrógeno, por lo que la monitorización debió realizarse a tiempos más largos. Se tomaron muestras a distintos tiempos y se cargaron en geles de acrilamida y se resolvió en una SDS-PAGE. Al revelar contra porina, una proteína de membrana externa mitocondrial, se observa un descenso de los niveles de dicha proteína en el caso del silvestre. En la estirpe mutante para *ATG5* este decremento de los niveles de porina no sucede como consecuencia de un defecto en la maquinaria autofágica, así como en mutantes para *PEP4*. Como era de esperar, en el caso del mutante *ptc6* también existe un defecto en la eliminación de mitocondrias. Esta deficiencia se repite en la

estirpe *ptc7* a pesar de no haber aparecido en *screenings* anteriores de genes implicados en mitofagia, al igual que ya sucedió con Ptc6p (Tsukada and Ohsumi 1993) (Kanki, Wang et al. 2009). De este modo, Ptc7p se convierte en la novena proteína mitocondrial implicada en mitofagia en levaduras.

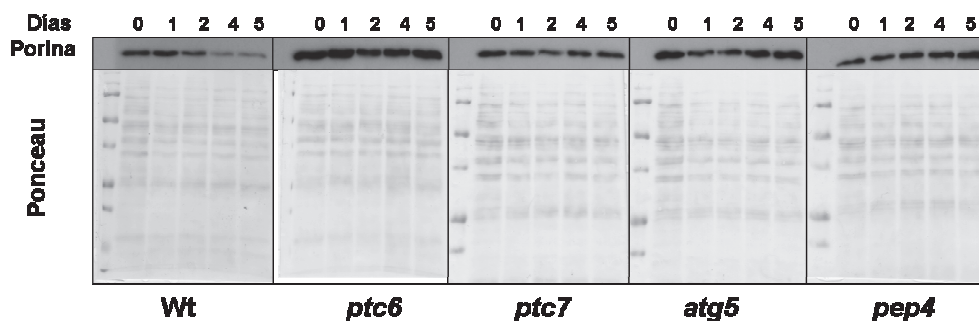


Figura 3.10. Determinación de defectos en la mitofagia en la deprivación de nitrógeno. Las estirpes se cultivaron en medio YPD, y en fase exponencial se pasaron a medio sin nitrógeno SDc-N. Muestras tomadas a 0, 24, 48, 96 y 120 horas se resolvieron en SDS-PAGE. En la imagen WB con anti-porina y ponceau de la membrana de nitrocelulosa.

3.2.3. Las estirpes que sobreexpresan *PTC7* o *PPTC7* poseen mayores niveles de mitofagia en fase estacionaria.

Otra técnica para monitorizar mitofagia también hace uso de la diferencia del tiempo de degradación del GFP de proteínas recombinantes en la vacuola. Para ello se generan estirpes transformantes que expresan una proteína de origen mitocondrial fusionada a GFP. En este caso se utilizó Om45p, una proteína de la membrana externa mitocondrial (Kanki, Kang et al. 2009).

Previamente se ha descrito en *S. cerevisiae* el proceso de mitofagia en fase estacionaria (Tal, Winter et al. 2007) bajo condiciones de respiración, usando lactato como fuente de carbono. En este supuesto, levaduras silvestres cultivadas en estas condiciones, muestran una mitofagia masiva a los 3 días. En este proceso, al contrario que en el protocolo anterior, no existe un cambio de medio, y las células son cultivadas en condiciones en las que la fosforilación oxidativa está activa completamente. En esta situación se piensa que existe una selección de mitocondrias, y no una eliminación de lo dispensable, representando un mecanismo de control de la calidad.

Se transformó una estirpe con OM45-GFP insertado en el genoma con los plásmidos pCM189 vacío, pCM189-*PTC7* o pCM189-*PPTC7* para obtener una

estirpe silvestre y estirpes con sobreexpresión de los dos genes homólogos. Se cultivaron las diversas líneas en YPD y posteriormente se pasaron a medio YPL durante 5 días. Se tomaron puntos siguiendo el protocolo anterior para porina, se resolvió en SDS-PAGE y se bloteó con anticuerpo para GFP.

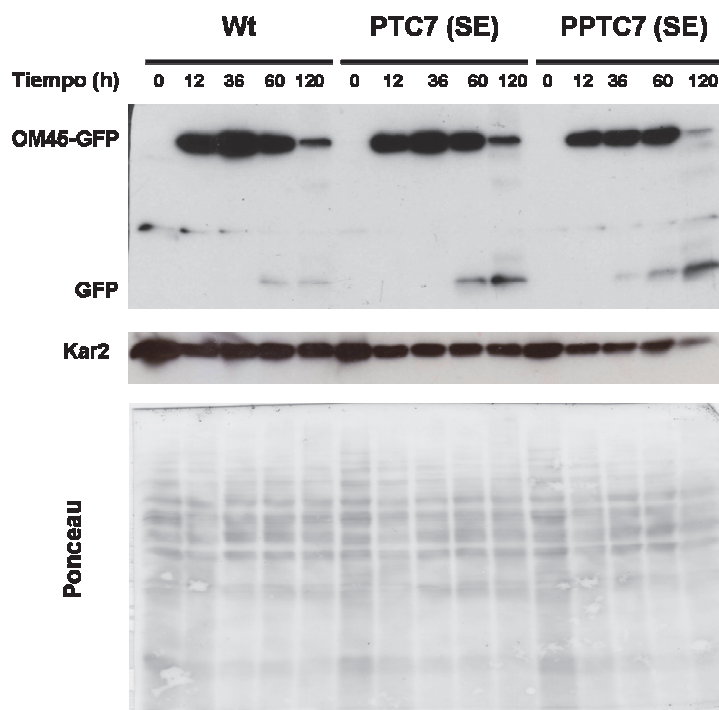


Figura 3.11. Monitorización de la mitofagia en fase estacionaria en estirpes con sobreexpresión de *PTC7* y *PPTC7*. Levaduras OM45-GFP silvestre, sobreexpresando *PTC7* (SEPTC7) o *PPTC7* (SEPPTC7) se cultivaron en YPD y en fase exponencial se pasaron a YPL. Muestras tomadas a 0, 12, 36, 60 y 120 horas se resolvieron en SDS-PAGE. A: WB con anti-GFP y anti-Kar2.

El punto cero corresponde al cultivo previo en YPD, y se puede observar el incremento de la masa mitocondrial a las 12 horas en medio con lactato. En la levadura silvestre se dispara la mitofagia a los 3 días, pudiendo verse la liberación de GFP de la quimera. Tanto en la levadura que sobreexpresa *PTC7* como la estirpe portadora de su homólogo humano se observa un incremento de la cantidad total de liberación de GFP. En el caso de la estirpe que expresa *PPTC7*, el proceso de mitofagia se adelanta incluso a las 36 horas de cultivo en YPL, y a los 5 días prácticamente la totalidad del pool de Om45-GFP ha desaparecido en favor de GFP libre (Figura 3.11).

Para comprobar que este proceso es exclusivo de la mitocondria, se monitorizó a su vez Kar2p, un marcador de retículo endoplásmico. Los niveles de esta proteína no disminuyeron de manera significativa (Figura 3.11), indicando que el incremento de la degradación es específico de una regulación positiva de la mitofagia.

Los datos obtenidos en levadura apuntan a una relación entre la regulación del metabolismo bioenergético, a través de la síntesis de coenzima Q, y el reciclaje específico de mitocondrias (mitofagia), mediado por la acción de Ptc7p. En células de mamífero, Ppct7 regula la síntesis de CoQ₁₀ y a la vez promueve la autofagia, manteniendo la célula en un estado más saludable. Las células que sobreexpresan *PPTC7* presentan un incremento del contenido de coenzima Q₁₀ y consumen mayores niveles de oxígeno, aunque producen menores cantidades de ROS, síntoma de una masa mitocondrial sana. Además, existe una relación entre esta fosfatasa y el mantenimiento de la funcionalidad de los componentes celulares a través de un apropiado reciclaje de las mitocondrias.

La sobreexpresión de *PPTC7* en células de mamífero y de *PTC7* en levadura conduce a un incremento de la degradación del material celular. Un aumento del reciclaje de la masa mitocondrial podría explicar una disminución de la producción de ROS, así como el incremento de la carbonización de proteínas y la disminución de la longevidad del mutante *ptc7* (Martin-Montalvo 2009). Sin embargo no explicaría el incremento de la síntesis de coenzima Q. Una regulación coordinada de ambas rutas lleva al mantenimiento de la homeostasis celular, manteniendo por un lado un metabolismo eficiente y por otro una masa mitocondrial sana. Un sistema equilibrado en este aspecto se encuentra en el modelo de restricción calórica, la cual genera un estrés leve que produce un efecto hormético que protege a la célula.

4. La interrelación mitofagia -bionérgica y Pptc7

4.1. Expresión de *PPTC7* en condiciones de estrés

4.1.1. El estrés oxidativo incrementa los niveles de ARNm de *PPTC7*

El coenzima Q es un antioxidante que funciona protegiendo a la célula ya sea previniendo la peroxidación lipídica o regenerando otros antioxidantes como pueden ser el ascorbato y el α -tocoferol (Kagan, Tyurina et al. 1998)

Si ciertamente Pptc7 regula la biosíntesis de coenzima Q, su expresión génica estará sujeta a modulaciones ante ciertas situaciones en las que los niveles de quinona se incrementen, como puede ser una situación de estrés oxidativo leve. Aunque se han descrito múltiples situaciones en las que los niveles de CoQ descienden (envejecimiento, enfermedades degenerativas, tratamiento con estatinas, cardiomiopatías) (Eggens, Elmberger et al. 1989; Kalen, Appelkvist et al. 1989; Folkers, Langsjoen et al. 1990; Mortensen 2003, Shults, 1999), existen estímulos que inducen una regulación positiva de su biosíntesis.

Estudios en levadura han descrito como activador de la síntesis de coenzima Q₆ a agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno y el ácido linolénico (Padilla, Tran et al. 2009).

Sin embargo, se conoce muy poco sobre la regulación de la biosíntesis de coenzima Q₁₀ en células de mamífero. Tratamientos de estrés como puede ser el CPT producen un incremento de los niveles de ubiquinona (Brea-Calvo, Rodríguez-Hernández et al. 2006) a través del factor de transcripción Nf- κ B en células H460 (Brea-Calvo, Siendones et al. 2009).

El coenzima Q mitocondrial protege específicamente contra estrés bioquímico como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Alleva, Tomasetti et al. 2001). Tras un tratamiento con 400 μ M de peróxido de hidrógeno, se observó la expresión de *PPTC7* en células HeLa mediante RT-PCR. El H₂O₂ es un agente oxidante que produce un estrés oxidativo el cual induce finalmente apoptosis. El tratamiento con peróxido de hidrógeno fue de 24 horas dada su toxicidad. Bajo dichas circunstancias, el nivel de expresión de *PPTC7* aumenta más de 5 veces frente al cultivo control (Figura 4.1), indicando una respuesta a nivel de ARN mensajero a una situación de estrés.

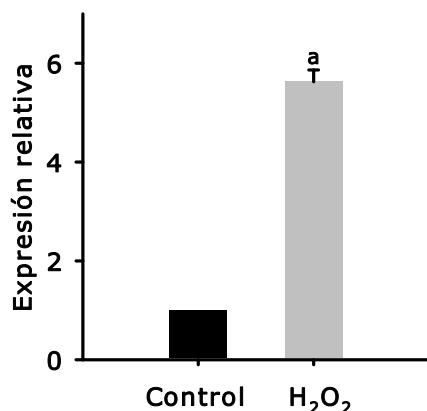


Figura 4.1. Determinación de la expresión de *PPTC7* ante estrés por H₂O₂. Células HeLa se trataron con 400 μ M de peróxido de hidrógeno durante 24 horas. La expresión se determinó mediante RT-PCR. Valores relativizados a la expresión de GAPDH. Los valores se corresponden a la media de al menos tres medidas \pm DS. $P < 0.001$

4.1.2. Inducción de la expresión de *PPTC7* ante la retirada de suero

La retirada de suero es un modelo para el estudio de los mecanismos involucrados en la inducción de la apoptosis causada por un estrés leve. Ante este estímulo se promueve la generación de ROS y se incrementan los niveles de antioxidantes como la superóxido dismutasa, el α -tocoferol y el CoQ (Greenlund, Deckwerth et al. 1995) (Villalba and Navas 2000) para prevenir el proceso apoptótico. La adición de coenzima Q evita la peroxidación lipídica, la liberación de ceramidas y la muerte celular (Navarro, Arroyo et al. 1999; Fernandez-Ayala, Martin et al. 2000; Navas, Fernandez-Ayala et al. 2002).

Por otro lado, la generación de ROS provocada por la privación de nutrientes produce un disparo de los mecanismos de autofagia de la célula (Scherz-Shouval and Elazar 2007; Scherz-Shouval, Shvets et al. 2007). Durante este proceso se produce peróxido de hidrógeno derivado de la mitocondria que inhibe la acción proteolítica de Atg4 sobre Atg8 conjugado a fosfatidiletanolamina, promoviendo finalmente la formación del autofagosoma.

La retirada de suero del medio en células HeLa produce una sobreexpresión de *PPTC7* a las 24 horas de privación nutricional, que alcanza hasta más de 6 veces los niveles basales de expresión a las 48 horas.

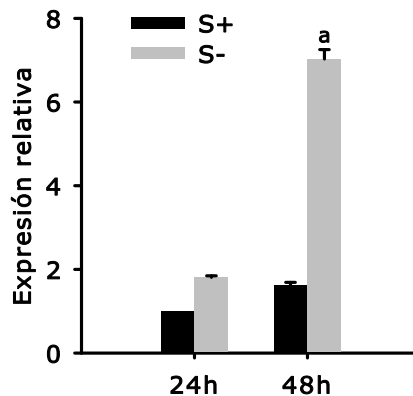


Figura 4.2. Análisis de la expresión de *PPTC7* ante la retirada de suero. Células HeLa se cultivaron con o sin suero (S + y S - respectivamente) durante 24 y 48 horas. La expresión se determinó mediante RT-PCR, tomando como gen de referencia *GADPH*. Media de al menos tres ensayos \pm DS. $P < 0.001$

El incremento de la expresión de *PPTC7* en situaciones de estrés junto a la disminución de la producción de ROS al sobreexpresar *PPTC7* mediante transducción indica un papel protector de esta fosfatasa en la célula.

4.2. Regulación de la expresión de *PPTC7* en células en restricción calórica

El descenso de los niveles de glucosa de la dieta produce un efecto similar a la privación de nutrientes, generando ROS en la célula y activando la autofagia (Morselli, Galluzzi et al. 2009; Morselli, Maiuri et al. 2010; Morselli, Maiuri et al. 2010). Para analizar esta relación obtuvimos una línea de cultivo de células HeLa adaptadas a un crecimiento en DMEM 1gr/L glucosa y se comparó la expresión de *PPTC7* con respecto a células HeLa en DMEM 4.5gr/L glucosa. Los niveles de expresión en restricción calórica (RC) son considerablemente mayores al control (Figura 4.3, B). La retirada de suero del medio de esta línea celular continúa produciendo un incremento de los niveles de ARNm aunque en menor medida (Figura 4.3, A), posiblemente debido a que ya existe una regulación al alza de su transcripción. Este incremento, sin embargo, no se produce en el caso de *COQ7*, no dándose por tanto una regulación transcripcional de éste como repuesta a la retirada de suero.

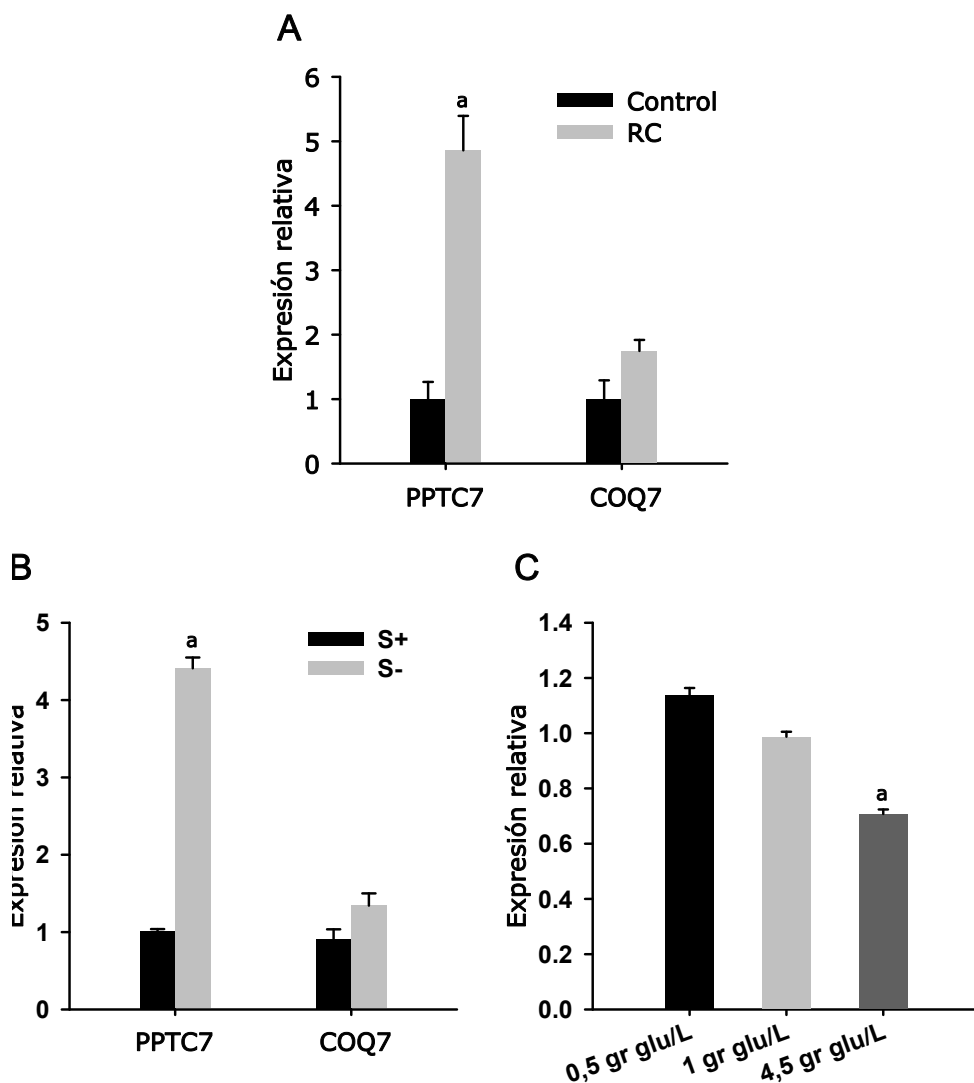


Figura 4.3. Expresión de *PPTC7* en bajas concentraciones de glucosa. **A:** Análisis mediante RT-PCR de la expresión de *PPTC7* y *COQ7* en células HeLa adaptadas a crecer en medio con una concentración de 1gr de glucosa/L en comparación con células HeLa control (4.5 gr glucosa/L medio). **B:** Análisis de la expresión de *PPTC7* y *COQ7* en las células HeLa en RC ante la retirada de suero. Las células se cultivaron durante 48 horas en medio con (S+) o sin suero (S-). **C:** Modulación de la expresión de *PPTC7* en células HeLa RC al cultivarlas 24 horas en medios con 0.5, 1 ó 4.5 gr glucosa/L. Como gen calibrador se utilizó GAPDH. Los datos corresponden a la media de al menos tres ensayos \pm DS. $P < 0.001$

Con el fin de confirmar si las variaciones de la expresión de *PPTC7* se debían a la modificación del contenido de glucosa, la línea en RC se cultivó durante 24 horas en concentraciones crecientes (4.5gr) y decrecientes (0.5gr) de glucosa y se

observó la modulación de la expresión de *PPTC7*. Aunque los cambios no son tan notables como en los casos anteriores, se puede apreciar una tendencia a disminuir los niveles de transcrito al aumentar los niveles de glucosa en medio, indicando que la expresión de *PPTC7* es sensible al contenido de glucosa en el medio.

4.3. Fenotipo de la línea celular HeLa adaptada a bajas concentraciones de glucosa.

4.3.1. Niveles de coenzima Q₁₀

Aunque es bien conocido el efecto beneficioso del coenzima Q ante el estrés generado por la retirada de nutrientes (Barroso, Gomez-Diaz et al. 1997), hasta ahora no se habían observado variaciones de los niveles de ubiquinona en restricción calórica.

Se cultivaron las células HeLa control y la línea adaptada RC durante 24 horas hasta un 80 % de su confluencia y se realizó una extracción de lípidos a partir de un homogenado total. Las muestras se separaron por cromatografía líquida de alta resolución y se analizó el contenido de CoQ₁₀ (Figura 4.4). La línea RC presentó un incremento de hasta el doble de los niveles de coenzima Q₁₀ que la línea control, de manera similar al fenotipo obtenido con la sobreexpresión de *PPTC7*.

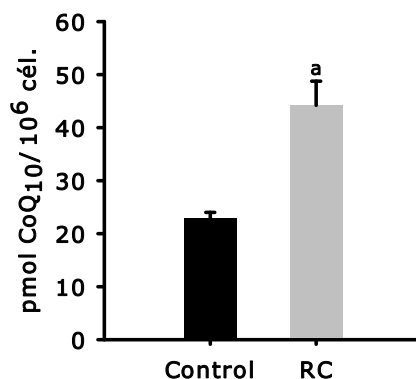


Figura 4.4. Cuantificación del contenido de coenzima Q₁₀ en la línea de células HeLa RC. Se cultivaron células control y RC hasta el 80% de confluencia, se homogeneizaron y se realizó una extracción de lípidos. Como estándar interno se utilizó CoQ₆. La mezcla compleja se separó mediante HPLC y se detectaron las quinonas mediante un detector electroquímico. Los datos corresponden a pmoles de coenzima Q₁₀ por millón de células. P<0,01

4.3.2. Las células HeLa RC incorporan menos pHB que las control

La velocidad de síntesis de coenzima Q₁₀ se determinó mediante la incorporación de [¹⁴C]pHB durante 24 horas. Al igual que ocurre en el caso de la sobreexpresión de *PPTC7* mediante transfección o transducción, la velocidad de la biosíntesis se encuentra disminuida en las células HeLa RC. En este caso se trata de células adaptadas a unas condiciones de baja concentración de glucosa, y no a una modulación artificial de la expresión de *PPTC7*. En comparación con los casos anteriores, la diferencia en la velocidad de síntesis es menor en las células transfectadas de manera transitoria, y mayor en las células HeLa RC ($\Delta\text{velocidad}_{\text{PPTC7SE}} < \Delta\text{velocidad}_{\text{PPTC7OE}} < \Delta\text{velocidad}_{\text{HeLa RC}}$).

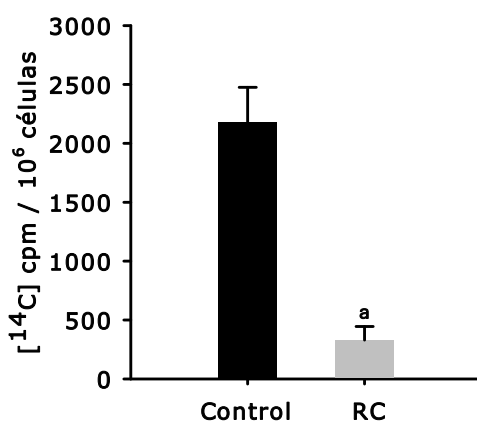


Figura 4.5. Velocidad de síntesis de Coenzima Q₁₀ en células HeLa RC vs. HeLa control. Las células HeLa control y HeLa RC se cultivaron durante 24 horas en presencia de [¹⁴C]pHB. Se realizó una extracción de lípidos rápida y las muestras se resolvieron en cromatografía de capa fina. La incorporación se cuantificó en el contador de centelleo. Datos de incorporación en cpm/millón de células, correspondientes a la media \pm DS de valores por triplicado de un experimento representativo. $P < 0.001$

4.3.3. Actividad de la cadena respiratoria

La línea RC presenta un crecimiento más lento que las células HeLa control, y elevados niveles de CoQ₁₀. Este hecho refleja un cambio metabólico en estas células al crecer en bajas concentraciones de glucosa. Dado que las líneas tumorales presentan una disminución del metabolismo respiratorio, y estas células poseen altos niveles de coenzima Q₁₀, se procedió al análisis de las actividades de la cadena transportadora de electrones. Para ello se realizó un extracto total de

células permeabilizadas con digitonina, y se analizaron las actividades en condiciones saturantes de sustrato.

Al igual que ocurre con las células que sobreexpresan *PPTC7*, a pesar del incremento de los niveles de coenzima Q₁₀, no se observa un incremento de las actividades de la cadena en las que éste se encuentra implicado, tanto relativizándolo a miligramos totales de proteína como a actividad citrato sintasa, reflejo de la cantidad de mitocondria activa en el extracto.

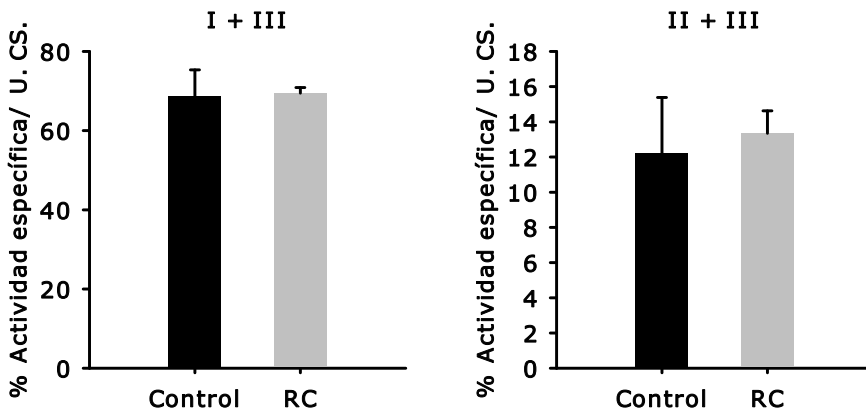


Figura 4.5. Actividades de la cadena transportadora de electrones en las que interviene el coenzima Q. Determinación de la actividad específica por miligramo de proteína de un extracto total o referido como porcentaje respecto a la actividad citrato sintasa de células control y RC.

Esta medida es la actividad máxima en presencia de un exceso de sustrato, y no tiene por que reflejar la actividad natural en la célula. Con el fin de conocer el estado de la cadena completa *in vivo* se midió el consumo de oxígeno mediante electrodo de Clarke en células enteras.

4.3.4. Consumo de oxígeno

Al cuantificar mediante electrodo de Clarke el consumo de oxígeno de células enteras se aprecia un descenso notable del mismo en las células HeLa RC. Sin embargo, al añadir CNK 1mM para inhibir la actividad del complejo IV se observa que prácticamente la totalidad del consumo de oxígeno de las células cultivadas en 1 gr glucosa/L corresponde a respiración mitocondrial, mientras que en el caso de

las células HeLa control apenas se produce efecto en el consumo del oxígeno, procediendo el mismo de producción de ROS en la célula.

Junto con los datos de actividad de la cadena transportadora de electrones, este ensayo indica que al poseer una mayor cantidad de CoQ₁₀ no existe mayor actividad del mismo en la cadena respiratoria, sino un mejor acoplamiento con la fosforilación oxidativa. Este hecho debería reflejarse a su vez en un descenso en la producción de ROS.

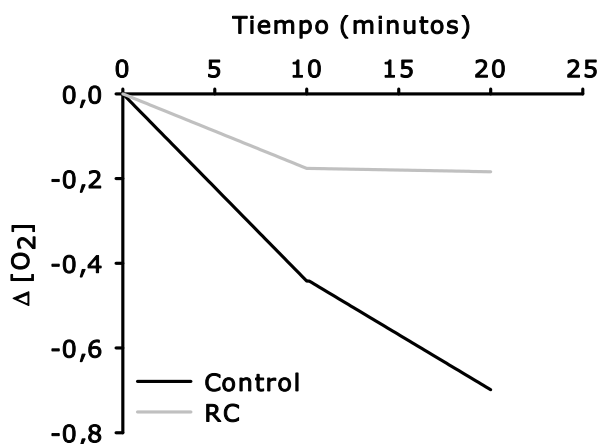


Figura 4.6. Consumo de oxígeno de la línea de células HeLa RC frente a HeLa control. Se determinó el consumo mediante un electrodo de Clarke *in vivo* en 5 millones de células HeLa cultivadas a 4.5 gr de glucosa/L o a 1 gr glucosa/L. se monitorizó durante 10 minutos, tras los cuales se añadió CNK 1 mM para inhibir el consumo por respiración. Se monitorizó 10 minutos más. Los datos se representan en descenso de la concentración de oxígeno por minuto.

4.3.5. Producción de ROS

Se realizó un análisis completo de la producción de especies reactivas del oxígeno mediante citometría de flujo, tanto a nivel celular como a nivel mitocondrial, para confirmar los indicios obtenidos en la cuantificación del consumo de oxígeno.

Como ya se ha comentado anteriormente, la mitocondria es la mayor fuente de producción de superóxido en la célula (Green and Grover 2000; Chance 2004), generado por pérdida de electrones en el complejo III mayoritariamente (Han, Antunes et al. 2002).

Se cuantificó el O_2^- producido en la célula o más específicamente en la mitocondria mediante diversos *trackers* visualizados por citometría de flujo. El dihidroetidio marca la producción de superóxido total, mientras el MitoSox indica específicamente aquel producido por la mitocondria. En la figura 4.7 podemos observar que las células HeLa RC generan menos superóxido en ambos niveles. Estos datos confirman un mejor funcionamiento de la fosforilación oxidativa en este modelo.

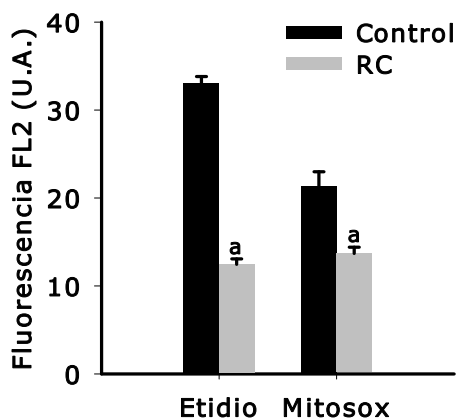


Figura 4.7. Determinación de la producción del radical superóxido en células HeLa RC. Las células HeLa control y RC se incubaron con hidroetidio o MitoSox y se analizaron mediante citometría. Los datos corresponden a la media \pm DS del valor de fluorescencia (FL2) de al menos tres experimentos. $P < 0.005$

Como resultado de la detoxificación del anión superóxido producido por la mitocondria, éste es convertido en peróxido de hidrógeno en la matriz mitocondrial por la superóxido dismutasa (MnSOD) (Fridovich 1997) para posteriormente ser eliminado por la catalasa, glutatión peroxidasa (GPX) o peroxirredoxina III (Green, Brand et al. 2004). El O_2^- generado por el Complejo I se libera exclusivamente al lado matricial de la membrana interna, mientras que el Complejo III libera superóxido tanto a la cara matricial como el espacio intermembrana y al citosol (Han 2001; St-Pierre, Buckingham et al. 2002). El superóxido liberado al citosol es convertido de modo similar a H_2O_2 por la CuZnSOD (Jezek and Hlavata 2005; Temple, Perrone et al. 2005).

Para la determinación del peróxido de hidrógeno se utilizó diclorodihidrofluoresceína y dihidro-rodamina (más específico de mitocondria) y se analizó por citometría. En el caso del peróxido de hidrógeno, las células HeLa cultivadas en

1 gr glucosa/L también presentan menores niveles que las células control, aunque no llega a ser significativa en el caso específico de la rodamina (Figura 4.8). El potencial mitocondrial de membrana se genera al bombear protones desde la matriz al espacio intermembrana, un proceso dependiente de sustrato y del transporte electrónico, compensado por un transporte de protones en la dirección opuesta en un proceso denominado fuga de protones. Dicho potencial es utilizado por el complejo V para generar ATP. Una pérdida de este potencial será el resultado de cualquier proceso que devuelva los protones a la matriz, como puede ser la apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (MPTP), o la acción de proteínas desacoplantes (UCPs), interacción de ácidos grasos con proteínas mitocondriales, algunas drogas o químicos o un trastorno general de la membrana interna (Chan, Truong et al. 2005; Khailova, Prikhodko et al. 2006; Seifert, Bezaire et al. 2008))

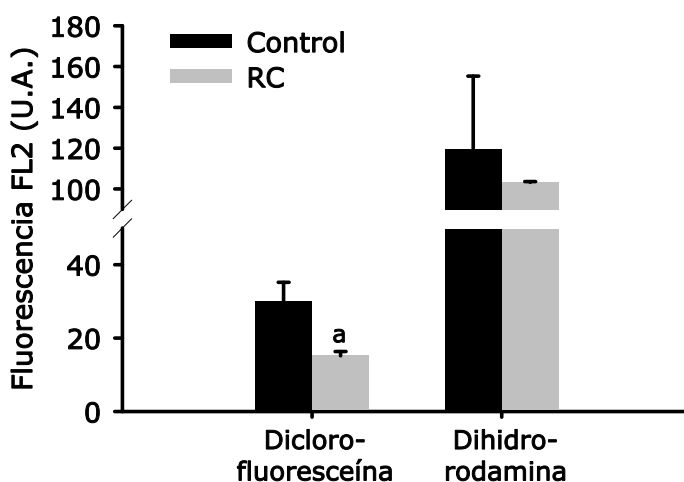


Figura 4.8. Producción de peróxido de hidrógeno *in vivo* en células HeLa RC. Las células se trataron con dicloro-fluoresceína o dihidro-rodamina durante 30 minutos y se analizaron por citometría. Valores correspondientes a la media \pm DS de la fluorescencia FL2 de experimentos por triplicado. $P < 0.002$

El óxido nítrico (NO) puede disminuir la respiración en la mitocondria y disparar el proceso apoptótico al inhibir la citocromo oxidasa. (Brown and Borutaite 2001). Puede interactuar con el superóxido generando el radical peroxinitrito (ONOO-) (Huie and Padmaja 1993; Padmaja and Huie 1993; Erusalimsky and Moncada

2007), el cual puede dañar proteínas involucradas en el transporte de electrones (Radi, Rodriguez et al. 1994).

El fluorocromo DAF-FM (4-Amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína) detecta los radicales de óxido nítrico. De nuevo las células RC generan menores cantidades de radicales libres, que en este caso llega a reducirse hasta en un 50% de manera significativa.

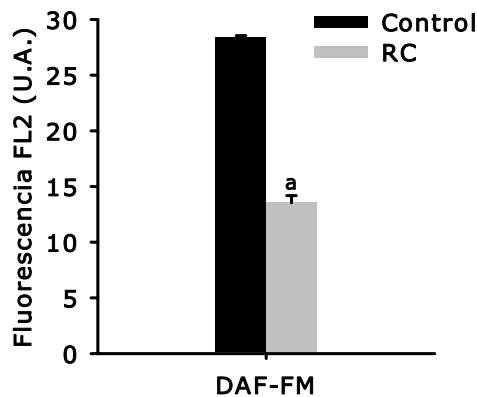


Figura 4.9. Cuantificación del radical óxido nítrico en células HeLa RC. Se sembraron células HeLa control y RC 24 horas antes del tratamiento. Las células se incubaron con DAF-FM durante 30 minutos y se recogieron por centrifugación. La producción del óxido nítrico se determinó mediante citometría. Valores de fluorescencia FL2 correspondientes a la media \pm DS de experimentos por triplicado. $P < 0.001$

Se utilizaron rodamina 123 y DASPMI (4-(4-(dimetilamino)stiril) -N-metilpiridinio ioduro) (Invitrogen), los cuales son secuestrados específicamente por mitocondrias activas, aportando información sobre el estado del potencial mitocondrial. Como se observa en la figura 4.10, al realizar un análisis mediante citometría de flujo, las células HeLa RC poseen menor potencial que las células HeLa cultivadas en 4.5 gr glucosa/L.

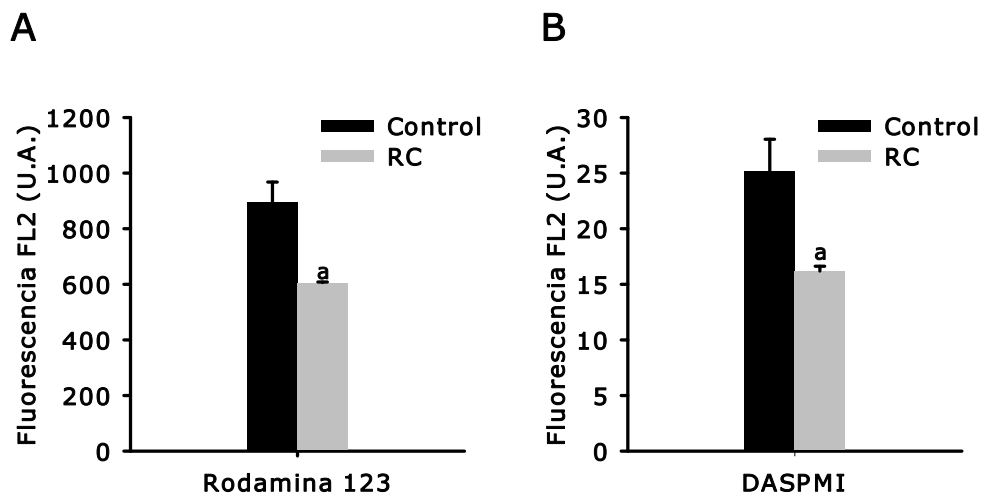


Figura 4.10. Potencial mitocondrial de las células HeLa RC respecto a células HeLa control. Análisis por citometría de la tinción *in vivo* con Rodamina 123 y DASPMI de células HeLa control y RC. Los datos corresponden a la media \pm DS de valores provenientes de tres experimentos. $P < 0.002$

Estos datos junto a la menor producción de ROS y los datos obtenidos sobre el consumo de oxígeno apuntan a una actividad respiratoria más eficiente, al igual que ocurría con las células con sobreexpresión de *PPTC7*. De este modo, las células HeLa RC parecen mimetizar el efecto producido por la sobreexpresión artificial de *PPTC7*.

RESUMEN

El coenzima Q (CoQ) es un componente esencial de la bioenergética y de la protección antioxidante de la célula. Esto se debe en parte a su estructura, formada por una cabeza polar y una cola poliisoprenoide, que le permite insertarse y moverse en las biomembranas. Y por otro lado a su capacidad rédox, ejerciendo un importante papel en el transporte de electrones en diversos sistemas, siendo la función más relevante la que acontece en la cadena respiratoria mitocondrial y en la regeneración de antioxidantes celulares.

El creciente número de estudios de enfermedades que cursan con un déficit de coenzima Q₁₀ han permitido incrementar el conocimiento sobre el papel del CoQ en la fisiología celular. La depleción de los niveles de coenzima Q se ha asociado, no sólo a una causa primaria por defectos en la biosíntesis del mismo, sino también a enfermedades neurodegenerativas y al envejecimiento.

El mayor *handicap* en el tratamiento de estas patologías se debe a la baja biodisponibilidad del coenzima Q. El CoQ es el único antioxidante lipídico sintetizado por la célula. Su carácter lipofílico, necesario para el ejercicio de sus funciones, se convierte en un inconveniente en las terapias basadas en la complementación en la dieta con coenzima Q, especialmente para el acceso a órganos como el cerebro a través de la barrera hematoencefálica, uno de los más dañados ante una deficiencia metabólica. Hasta ahora las estrategias de los tratamientos se enfocaban en la obtención de análogos con baja hidrofiliidad, aunque recientemente, y cada vez más, se hace patente la necesidad de terapias alternativas basadas en la estimulación de la síntesis endógena.

Excepto en organismos unicelulares como bacterias y levaduras, la deficiencia total de coenzima Q no existe en la naturaleza, y tan *sólo* deficiencias de un cierto porcentaje son relativamente viables. Por ello, una estimulación de la biosíntesis de CoQ₁₀ en dichos pacientes podría restaurar o al menos paliar el fenotipo disfuncional. Sobre la biosíntesis de coenzima Q, numerosos estudios en *Saccharomyces cerevisiae* han establecido una serie de genes que codifican para proteínas implicadas en dicha ruta, los genes COQ (*COQ1-COQ10*). El conocimiento sobre esta ruta en mamíferos es muy limitado, aunque menos datos existen en la literatura sobre la regulación de la biosíntesis de coenzima Q.

En levadura se han establecido diversos puntos de regulación en la ruta biosintética. Uno de ellos es Coq7p, una monooxigenasa implicada en catabolizar uno de los últimos pasos de la síntesis. La actividad de esta proteína está regulada en levadura por ciclos de fosforilación y defosforilación, activándose por la acción de dos fosfatasa, Ptc6p y Ptc7p. En el trabajo desarrollado en esta tesis doctoral se describe el primer mecanismo biomolecular a través del cual se regula la biosíntesis de coenzima Q₁₀ en células humanas en cultivo de manera endógena.

En una búsqueda de homólogos de las fosfatasa implicadas en la regulación de Coq7p, se encontraron tan sólo homólogos de Ptc7p en eucariotas superiores, quedando Ptc6p relegado al reino Fungi. En humanos, éste corresponde a Pptc7, una presunta fosfatasa. Análisis *in silico* de la secuencia peptídica de esta proteína determina que pertenece a la familia de serinas/treoninas fosfatasa dependientes de metales, PP2C. Mediante una caracterización bioquímica, se determina la actividad de Pptc7 como proteína fosfatasa en ensayos *in vitro*. Para su actividad fosfatasa requiere los cofactores Mg⁺² y Mn⁺², los cuales son insustituibles por otros metales como Fe⁺² o Fe⁺³. Esta dependencia de Mn⁺² y Mg⁺² es característica de la familia PP2C de fosfatasa monoméricas. Además, su actividad no se ve afectada por el inhibidor de fosfatasa genérico ortovanadato sódico, al igual que los otros miembros de la misma familia.

Una de las mayores diferencias con otras familias de fosfatasa es la ausencia de subunidad reguladora. Por ello su regulación viene dada por modulación de su expresión y por la sublocalización celular. El complejo de biosíntesis de coenzima Q se localiza en la mitocondria, así como hCoq7. La secuencia peptídica de Pptc7 muestra, en ensayos *in silico* una potencial secuencia de importación mitocondrial. Mediante fraccionamiento se comprueba que efectivamente, Pptc7 se transloca a la mitocondria.

El mutante *ptc7* presenta una depleción de los niveles de coenzima Q₆ y de sus actividades asociadas de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, así como un incremento del consumo de oxígeno *in vivo* en células enteras. Estos datos indican una disfunción mitocondrial causada por la deficiencia de CoQ₆, la cual es revertida al complementar la estirpe mutante con el propio gen de levadura o con el heterólogo humano. Mediante complementación funcional se observa que

el fenotipo del mutante para *PTC7* en levadura se recupera al sobreexpresar *PPTC7*, confirmando la homología entre ambas fosfatasas.

En ensayos *in vitro* se describe a la proteína humana hCoq7 como una fosfoproteína, la cual es capaz de ser defosforilada por Pptc7.

La manipulación de la expresión de *PPTC7* en células humanas en cultivo produce una modulación de los niveles de coenzima Q₁₀. La sobreexpresión de *PPTC7* transitoria duplica los niveles de CoQ₁₀ de una línea control, mientras que su silenciamiento produce, en 48 horas, una depleción del 50%. Este silenciamiento afecta al estado de la célula de tal modo que el establecimiento de una línea estable silenciada es inviable. En moscas el silenciamiento de *PPTC7* produce un defecto en el desarrollo y una consecuente parada en los primeros estadios de la pupa, además de una deficiencia del contenido quinónico. En el caso de levadura, mientras que el mutante simple *ptc7* o *ptc6* resultan viables, el doble mutante es letal.

Aunque los niveles de coenzima Q₁₀ se incrementan, la velocidad de síntesis se encuentra disminuida en las células que sobreexpresan *PPTC7*. En la levadura mutante *ptc7* se observa un incremento de la incorporación del precursor pHB radiomarcado con [¹⁴C] con respecto al silvestre. Este efecto se ha observado en otros estudios del grupo sobre deficiencias secundarias de coenzima Q. En pacientes con deficiencias primarias de CoQ₁₀, el complejo de biosíntesis del mismo presenta un defecto, y la velocidad de síntesis de coenzima Q₁₀ es menor en comparación con células provenientes de individuos sanos. En una deficiencia secundaria, las diversas proteínas que componen la ruta de síntesis de coenzima Q se encuentran intactas, siendo capaces de realizar el proceso correctamente. En este caso, los bajos niveles de CoQ, obtenidos a causa de un defecto en un punto fuera de la propia ruta de síntesis, pueden estimular la actividad del complejo de biosíntesis con el fin de paliar la deficiencia. Por ello no es de extrañar que la incorporación de pHB se encuentre incrementada en estos casos.

A pesar de presentar un incremento de los niveles de CoQ₁₀ en células que sobreexpresan *PPTC7*, las actividades de la cadena no se ven afectadas, aunque sí presentan un incremento del consumo de oxígeno por respiración. Estos datos, junto con una menor producción de ROS, tanto a nivel celular como mitocondrial, sugieren un mejor acoplamiento de la fosforilación oxidativa y una actividad de la

cadena transportadora de electrones mitocondrial más eficiente. Un reciclaje competente de la masa mitocondrial elimina aquellos orgánulos dañados y potencialmente dañinos para la célula, obteniendo una menor liberación de ROS provenientes del mal funcionamiento de la cadena transportadora de electrones.

Estudios recientes relacionan diferentes patologías asociadas a deficiencias de coenzima Q₁₀ con procesos de mitofagia como sistema de defensa ante el daño generado por mitocondrias disfuncionales, ante la necesidad de un reciclaje de las mismas. En levadura, Ptc6p está implicado en dos procesos íntimamente relacionados, la biosíntesis de coenzima Q₆ y la degradación selectiva de mitocondrias ante un cambio en la fuente de carbono. De tal manera, en la adaptación a fuentes de carbono no fermentables y ante la necesidad de activar el metabolismo respiratorio, dispara la biosíntesis de CoQ₆. Ante una situación contraria de adaptación al metabolismo fermentativo, activa la mitofagia para la eliminación de la masa mitocondrial residual. En células de mamífero la mitofagia, a excepción de la ejercida en la diferenciación de los eritrocitos, se compone de un nivel basal para el mantenimiento de la homeostasis celular, y de una degradación selectiva de aquellas mitocondrias disfuncionales que presentan una pérdida del potencial mitocondrial e incremento en la producción de ROS. En levadura Ptc7p responde, a diferencia que Ptc6p, a estímulos de estrés. Un estrés leve posee un efecto hormético en la célula, generando una respuesta antioxidante. Este es el caso de la restricción calórica y de compuestos ampliamente estudiados como el resveratrol. Sin embargo, un estrés oxidativo más fuerte puede generar graves daños en las estructuras celulares y finalmente muerte por apoptosis. La cadena transportadora de electrones mitocondrial es uno de los mayores productores de ROS en la célula. Una degradación selectiva de las mitocondrias dañadas es esencial para el mantenimiento celular.

Líneas estables para la sobreexpresión de *PPTC7* presentan un incremento de los procesos degradativos celulares, incluyendo la degradación de proteínas mitocondriales, ante una retirada de suero. La monitorización de la autofagia en los mutantes *ptc6* y *ptc7* de levadura revela un papel esencial de ambas en el proceso de degradación selectivo de mitocondrias, pero no en la macroautofagia ante la privación de nitrógeno. Por otro lado, la sobreexpresión de las fosfatasas Ptc7 y Pptc7 en levadura silvestre produce un incremento de la mitofagia en fase

estacionaria. Los mecanismos a través de los cuales Pptc7 regula la actividad autofágica de mitocondrias continúan siendo desconocidos.

Las pautas de expresión de *PPTC7* se corresponden tanto a situaciones de incremento de coenzima Q como situaciones de disparo de la autofagia, incrementando los niveles de ARNm ante diversas situaciones de estrés. Ante un insulto con un estrés leve, la célula activa los mecanismos de defensa antioxidante, incrementando, entre otros, los niveles de coenzima Q. Para ello es necesaria una activación de la regulación del complejo de biosíntesis, modulada por la acción de Pptc7 sobre hCoq7. Cuando el daño producido no puede solventarse, es necesaria la activación de mecanismos de reciclaje con el fin de atenuar el efecto oxidativo, especialmente al tratarse de la mitocondrias. Un daño en este orgánulo puede producir un incremento de la producción de ROS, acentuando el trastorno producido. Ante esta situación, Pptc7 podría activar la mitofagia selectiva, manteniendo así la calidad del contenido celular.

La restricción calórica se ha considerado ampliamente en la literatura por los efectos beneficiosos que supone un estrés moderado para la homeostasis celular. En estas situaciones de estrés moderado, los mecanismos de respuesta antioxidante se encuentran regulados positivamente, como es el caso del coenzima Q. En una línea de células HeLa adaptadas a crecer en medio con menos del 25% de glucosa (RC) que la línea original, se sintetiza del orden de dos veces más coenzima Q₁₀, al igual que ocurre al sobreexpresar *PPTC7*. La expresión de este gen se encuentra regulada positivamente en esta línea RC, mientras que la expresión de *COQ7* no se afecta, apuntando a una regulación post-traducciona de su actividad. En una caracterización de esta línea se observa que los niveles de CoQ₁₀ no afectan las actividades de la cadena respiratoria pero sí produce una fosforilación oxidativa mejor acoplada, disminuyendo considerablemente la generación de ROS.

Por tanto, en un sistema *in vivo* sin manipulación génica, ante una situación de estrés moderado, la expresión de *PPTC7* se regula positivamente, estimulando la síntesis de coenzima Q₁₀ del mismo modo que al generar líneas de sobreexpresión del mismo, y las mitocondrias funcionan de una manera más eficiente y funcional. Diversos estudios han determinado el disparo de la autofagia en condiciones de restricción calórica y el efecto beneficioso que éste acarrea.

Recientes estudios describen regulaciones por ciclos de fosforilación y defosforilación de las proteínas implicadas en la mitofagia. La proteína quinasa activada por AMP (AMPK) es un sensor intracelular de la disponibilidad de nutrientes y de estrés. Esta quinasa fosforila Ulk1, ortólogo en mamífero de la proteína quinasa de levadura Atg1, implicada en la iniciación de la autofagia y requerido para el proceso específico de degradación de mitocondrias. Esta fosforilación es requerida para una correcta mitofagia. La inducción de la expresión de *PTC7* en levadura ante un estrés osmótico depende de Hog1p, una de las dos MAPKs descritas en el proceso de fosforilación de Atg1 en levadura.

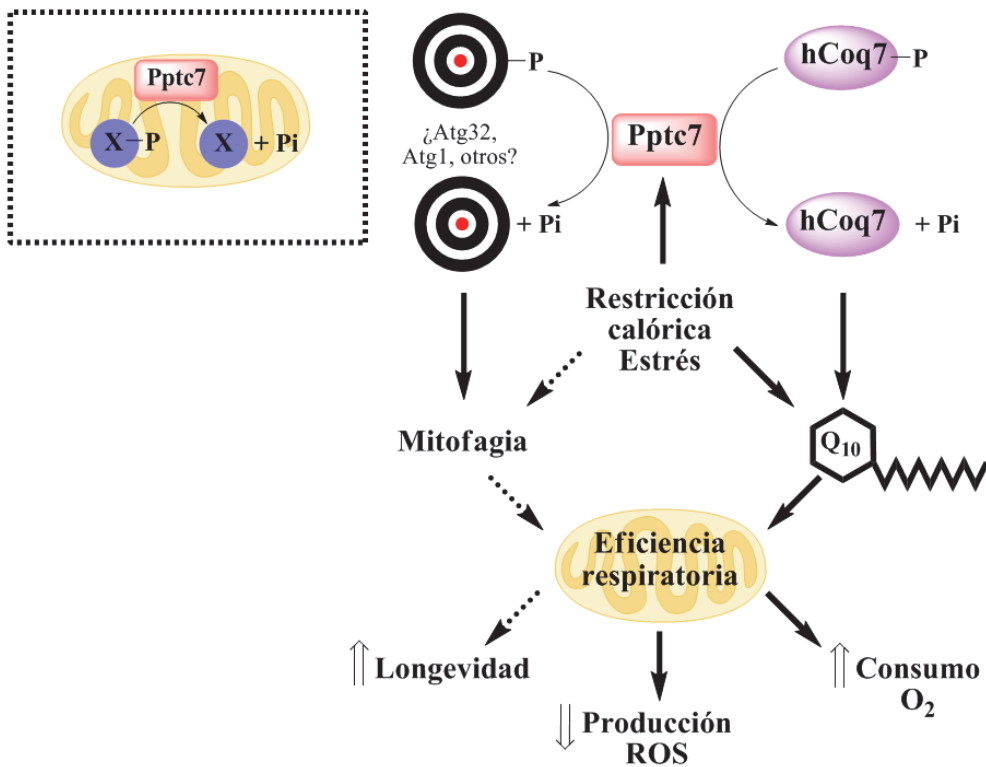


Figura 5.1. Esquema del modo de acción de Pptc7 sobre el metabolismo bioenergético y la mitofagia

Por otro lado, la proteína de levadura Atg32, considerada un receptor mitocondrial de la mitofagia, presenta dos serinas fosforiladas requeridas para su interacción con Atg11 y para la mitofagia. Sin embargo, la sustitución de dichas serinas por ácido aspártico o glutámico para mimetizar la fosforilación no resultan funcionales para la mitofagia. Esto hace suponer que Atg32 no sólo requiere de la fosforilación,

sino también de una eliminación de los grupos fosfatos mediante una fosfatasa, lo cual no es posible en el caso de la sustitución de las serinas. Ambas proteínas, Ulk1 y Nix (proteína de mamífero sobre la cual se ha sugerido ser homólogo de Atg32), podrían ser presuntas dianas de Pptc7 en el disparo de la mitofagia.

En la literatura se ha asociado *PPTC7* con mecanismos de supervivencia y actividad antitumoral. Además, un estudio reciente sobre una población con una mutación en la hormona del crecimiento la cual produce una grave deficiencia de la misma y de IGF-1, revela un incremento de la respuesta antioxidante y de los mecanismos de autofagia en células cultivadas con suero de individuos de dicha población. Estas células presentan un incremento de la expresión de *PPTC7*.

Pptc7 es el primer sistema descrito de regulación post-traducciona l de la biosíntesis de coenzima Q₁₀ en células de mamífero, además del primer nexo entre esta ruta y la degradación específica de mitocondrias. Ambas rutas se encuentran relacionadas en multitud de situaciones, y se han descrito ampliamente en la enfermedad (MELAs, Fibromialgia, Parkinson, etc.). Los datos de esta tesis doctoral destacan a Pptc7 como posible diana para el estudio de tratamientos que activen dicha enzima, paliando las deficiencias generadas en las diversas patologías que cursan con un déficit de coenzima Q₁₀, tanto por incrementar su síntesis endógena como por estimular la mitofagia, eliminando así selectivamente aquellas mitocondrias disfuncionales.

CONCLUSIONES

1. Pptc7 es una fosfatasa mitocondrial perteneciente a la familia PP2C.
2. PPTC7 es el homólogo humano del gen PTC7 de *Saccharomyces cerevisiae*, siendo capaz de complementar funcionalmente el fenotipo del mutante.
3. hCoq7 es una fosfoproteína en ensayos *in vitro*.
4. Pptc7 defosforila hCoq7 *in vitro*.
5. Pptc7 activa la biosíntesis de coenzima Q₁₀ en células en cultivo, y la inhibición de su expresión produce una línea celular no viable.
6. La sobreexpresión de PPTC7 no produce ningún efecto significativo en las actividades de la cadena respiratoria mitocondrial.
7. La sobreexpresión de PPTC7 genera un incremento del consumo de oxígeno respiratorio en células enteras y una disminución de la producción de ROS.
8. La macroautofagia está activada en la línea estable de sobreexpresión de PPTC7.
9. Ptc6p y Ptc7p están implicados en la degradación selectiva de mitocondrias pero no en el proceso de macroautofagia en *S. cerevisiae*.
10. PPTC7 se expresa en condiciones de estrés.
11. Células HeLa en restricción calórica incrementan la expresión de PPTC7 y su fenotipo mimetiza el efecto de la sobreexpresión mediante transducción-transfección.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Bacterias

1.1. Estirpes, medios y cultivo

Para llevar a cabo las transformaciones y para mantener las construcciones de plásmidos se utilizó la estirpe de *Escherichia coli* DH5 α (F-, ϕ 80d/*lacZ* Δ M15, Δ (*lacZYA-argF*)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(r_k^- , m_k^+), *phoA*, *supE44*, λ^- , *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*).

La estirpe de *E. coli* BL21 (*B F- dcm ompT hsdS(rB-mB) gal*) se utilizó para la purificación de proteínas recombinantes.

Las estirpes de bacterias se cultivaron de forma rutinaria en medio Luria Broth (LB), 1% tripton, 0.5% extracto de levadura y 1% NaCl (Pronadisa). Cuando fue necesario se usó ampicilina a una concentración final de 10 μ g/ml. Los cultivos fueron incubados a 37°C en agitación (200 rpm.)

1.2. Determinación del crecimiento de los cultivos de bacterias

Para cuantificar el crecimiento de las bacterias en cultivos líquidos se determinó la densidad óptica a 600 nm.

1.3. Transformación de bacterias con ADN plasmídico

Para la transformación de bacterias con ADN plasmídico se utilizaron bacterias competentes obtenidas mediante el método del CaCl₂. Los cultivos a DO_{600nm} igual a 0,5 se centrifugaron y resuspendieron en 50 mM de CaCl₂ frío. Se incubaron durante 2 horas a 4°C, se lavaron y se resuspendió la pella de nuevo en CaCl₂ a 0,125 DO_{600nm}/ml. Se tomaron 50 μ l de las bacterias competentes e inmediatamente se incubaron con 30 ng de ADN plasmídico durante 30 minutos en frío, y se sometió a un choque térmico de 42°C durante 2 minutos para permeabilizar la membrana. Tras una incubación a 37°C de 30 minutos, las bacterias transformadas se sembraron en placas selectivas.

2. Levaduras

2.1. Estirpes, medios y cultivo

Las estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* se obtuvieron de EUROSCARF (European Saccharomyces Cerevisiae Archive for Functional Análisis):

Estirpe	Genotipo
BY4742	MATa ; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0
ΔPTC6	BY4742, MATa; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; YCR079w::kanMX4
ΔPTC7	BY4742, MATa; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; YHR076w::kanMX4
ΔATG5	BY4742, MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YPL149w::kanMX4
ΔPEP4	BY4742 MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YPL154c::kanMX4
OM45-GFP	MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; GFP(S65T)::HIS3MX6 (Invitrogen)

Los medios y los protocolos de manipulación de las estirpes se basaron en manuales básicos de laboratorio (Campbell and Duffus 1988; Guthrie and Fink 1991).

- Medios ricos: Las estirpes de levaduras fueron cultivadas de forma rutinaria en medio rico (2% extracto de levadura, 1% peptona) usando como fuente de carbono azúcares fermentables como la dextrosa al 2% (YPD) o fuentes no fermentables como el glicerol al 2% (YPG).
- Medios selectivos: Para las estirpes transformadas se usó como medio selectivo un medio sintético sin uracilo (SDc-URA) (1,7 g/L de YNB, 3,5/L g de sulfato amónico, 1 g/L de fosfato potásico monobásico y 1,73 g/L de una mezcla de aminoácidos esenciales y nucleótidos sin uracilo (Sigma) con glucosa (2%) o galactosa (2%) como fuente de carbono ajustado a pH 6.

- Otros medios: Para inducir la formación de mitocondrias las levaduras se cultivaron en un medio rico con lactosa como fuente de carbono (YPL). Para la inducción de la autofagia se usó medio SDc-URA sin fuentes de nitrógeno, usando como fuente de carbono glucosa al 2% (Cheong and Klionsky 2008). Para inducir específicamente mitofagia se cultivaron en el mismo medio usando en este caso lactosa al 2% como fuente de carbono (Kanki, Kang et al. 2009).

Para los cultivos en medio sólido se añadió 2% de agar al medio líquido. Todos los cultivos en medio líquido o sólido se incubaron a 30°C.

2.2. Determinación de la masa y concentración celular

En el caso de los cultivos líquidos de levaduras se determinó la densidad óptica a 660 nm. En fase exponencial una unidad de densidad óptica se corresponde con 26 millones de células/ml, 2.6 mg peso fresco ó 0.8 mg de peso seco, mientras que en fase estacionaria se equipara a 18 millones de células/ml, 1.8 mg de peso fresco ó 0.45 mg de peso seco (Serrano 1988).

2.3. Transformación de levaduras con ADN plasmídico

Las distintas estirpes de levaduras fueron transformadas con DNA plasmídico usando el método del acetato de litio (Agatep, Kirkpatrick et al. 1999) salvo algunas modificaciones.

Se recogieron levaduras crecidas hasta 1 unidad de DO_{660nm} mediante centrifugación, se lavaron con agua estéril y se incubaron durante 5' en acetato de litio 0,1 M a temperatura ambiente. Tras este primer paso se añadieron los siguientes componentes estériles en este orden:

- 240 μ l PEG 50%
- 36 μ l acetato de litio 1M
- 10 μ l ADNss 10 mg/ml (*Salmon Testes DNA*, Sigma)
- 5 μ l plásmido
- 40 μ l H₂Odd.

Se mezcló con vórtex 30'' y se incubó 30' a 30°C. Posteriormente se sometieron a un choque térmico a 42°C 30', se recogieron por centrifugación y se incubaron en medio YPD durante 2 horas a 30°C.

Las levaduras se sembraron en placas selectivas.

2.4. Obtención de mutantes por delección

Para deleccionar el gen de interés se utilizaron casetes de delección obtenidos mediante amplificación por PCR de un conjunto de plásmidos denominado Del Marker Set distribuido por EUROSCARF. La amplificación se llevó a cabo de acuerdo al método publicado previamente (Gueldener, Heinisch et al. 2002). Se utilizaron tanto marcadores de resistencia a higromicina como auxotrofias HIS o LEU.

Se tomaron 20 ml de un cultivo a 1 DO_{660nm}, se lavó con agua estéril y se resuspendió en 100 µl de TE/LiAc (10 mM Tris HCl pH 7.5, 1 mM EDTA y 100 mM acetato de litio). Se añadieron 20 mg de ADNss, 10 µl del producto de PCR y se incubó 10' a temperatura ambiente. Se añadieron 260 µl de una solución de PEG al 50% en 10 mM Tris HCl pH 7.5, 1 mM EDTA y 100 mM acetato de litio y la mezcla se incubó a 30°C durante 1 h. Tras la adición de 43 µl de DMSO, se aplicó un choque térmico de 5' a 42°C. Las transformaciones se lavaron en agua estéril y se incubaron 2 horas a 30°C en agitación con YPD. Posteriormente se sembraron en las placas selectivas correspondientes.

3. Cultivos celulares de mamífero

3.1. Tipos celulares, medios y cultivo

Se han utilizado diversos tipos de células de mamífero. Las células HeLa se han adquirido de la American Type Culture Collection. Las células HeLa fueron cultivadas en medio DMEM (Gibco) suplementado con solución antibiótica/antimicótico (Sigma) y 10% de suero fetal bovino (FBS). De forma rutinaria la concentración de glucosa fue de 4.5 g/L y 1 g/L para establecer condiciones de restricción calórica.

Las células SH-SY5Y, derivadas de neuroblastoma humano, y fibroblastos de ratón 3T3-NIH fueron utilizadas para generar líneas estables de sobreexpresión. Se

cultivaron en medio DMEM, 4.5 g/L de glucosa y 10% de FBS. Para las transfecciones con ADN plasmídico o con siRNA oligos, se utilizó medio Opti-MEM (Gibco) al 5% de FBS. Las células 293T se usaron para producir lentivirus. Todas las células se cultivaron a 37 °C y 5% CO₂.

3.2. Determinación de la concentración y viabilidad celular

Para confirmar el buen estado de los cultivos se determinó la viabilidad celular de forma periódica. Aunque gran parte de las células muertas quedan en suspensión en el medio, algunas permanecen adheridas a la superficie. Las células en suspensión se eliminaron retirando el medio y lavando con PBS 1x. Para levantar la monocapa de células adheridas se utilizó tripsina a 37°C. La viabilidad del cultivo se determinó mediante tinción con *Trypan Blue* y posterior observación al microscopio en cámara de Neubauer.

3.3. Obtención de líneas de sobreexpresión transitorias mediante transfección de DNA plasmídico en células HeLa

Para transfectar células HeLa con DNA plasmídico se utilizó Lipofectamine 2000 (Invitrogen) como agente de transfección. Se siguieron las recomendaciones del fabricante salvo pequeñas modificaciones. En el momento de la transfección la confluencia celular fue del 80% en medio DMEM sin antibióticos, 5% FBS. Para la formación de los complejos agente-plásmido se utilizó Opti-MEM I Reduced Serum Medium sin suero. Las células se incubaron con los complejos de transfección a 37°C en un incubador de CO₂ durante 8 horas, se les cambió el medio por medio DMEM fresco sin antibióticos, 5% FBS. El fenotipo se observó a las 48-60 horas de la transfección.

3.4. Obtención de líneas silenciadas mediante transfección de oligos siRNA en células HeLa

Los estudios de silenciamiento génico fueron llevados a cabo mediante interferencia de RNA con oligos de RNA de interferencia (siRNA). Para la transfección de siRNA (Ambion) se utilizó Oligofectamine (Invitrogen) como agente de transfección, siguiendo las recomendaciones del fabricante con algunas modificaciones para su optimización. La confluencia celular fue del 50% en el momento del silenciamiento en medio DMEM sin antibióticos al 5% FBS. Los

complejos siRNA-Oligofectamine fueron incubados 20' a temperatura ambiente en medio Opti-MEM I Reduced Serum Medium sin suero. Las células se incubaron con los complejos durante 8 horas en un incubador de CO₂ a 37°C, y posteriormente se les añadió suero hasta una concentración final del 5%. A las 72 horas después del silenciamiento las células se lavaron con PBS 1x, se levantaron con tripsina y se sembraron para realizar un segundo silenciamiento. Tras 48 horas del segundo silenciamiento se observó el fenotipo.

3.5. Empaquetamiento de partículas lentivíricas mediante cotransfección de vectores de empaquetado en células 293T

Para obtener las partículas lentivíricas se utilizaron células 293T, sembradas a una confluencia del 50-60%. Previo a la transfección, las células se incubaron en medio Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)-GlutaMAX, 10% de FBS. El ADN plasmídico para una placa se preparó como sigue:

- Plásmido ENV (VSV-G), 3µg
- Plásmido pMDL/pRRE (empaquetamiento de III generación), 5 µg
- Plásmido REV 2.5, µg
- Plásmido con el vector de transferencia, 15 µg

La mezcla se hizo hasta un volumen máximo de 150 µl junto con H₂O. Se añadieron 300 µl de TE 0,1x (TE 1x: 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8) estéril y 50 µl de CaCl₂ 2,5 M. La mezcla se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se añadieron 500 µl de HBS 2x (280 mM NaCl, 100 mM HEPES-NaOH, 1,5 mM Na₂HPO₄, pH 7,1) gota a gota mientras se aplica vórtex a máxima velocidad. Rápidamente, la mezcla total se añadió al cultivo de células. Se cultivaron durante 16 horas a 37°C con el ADN plasmídico precipitado, y se sustituyó el medio por 8 ml de D-MEM 10% FBS y 1% PSF. Pasadas 24 horas, el medio se recogió y se centrifugó a 2000 xg 3 minutos para eliminar restos celulares, y se filtró con filtros 0,45 µm. Las fracciones alícuotas de lentivirus se almacenaron a - 80°C.

3.6. Obtención de líneas estables mediante transducción con partículas lentivíricas

Las células SH-SY5Y se sembraron un día antes de la transducción a una densidad de 50.000 células/pocillo en placas de 6 pocillos. Para la infección se utilizaron 0,5 ml del sobrenadante obtenido de partículas lentivíricas y 8 µg/ml de Polybrene (Santa Cruz Biotechnology) para incrementar la eficiencia. Tras 16 horas se añadió 1 ml de medio DMEM complementado. Tras 48 horas se comprobó la eficacia de la transducción mediante señal GFP en microscopio de fluorescencia, y la sobreexpresión mediante SDS-PAGE, electrotransferencia e inmunotinción (WB).

En el caso de lentivirus para silenciamiento por shRNA, tras el primer pase de células se añadió puromicina para seleccionar las células transducidas.

3.7. Cuantificación de ROS y potencial mitocondrial mediante citometría de flujo

La producción de superóxidos se determinó tratando las células con hidroetidio (genérico) o MitoSox (específico de la mitocondria). En el caso de los peróxidos de hidrógeno se utilizaron diclorodihidrofluoresceína y dihidrorodamina, más específica de la mitocondria. Para determinar el potencial mitocondrial se trataron con DAF-FM. Las células se sembraron en placas de 12 pocillos, se incubaron con cada tratamiento a una concentración final de 5 µM en medio durante 30 minutos, se lavaron con PBS 1x y se tripsinizaron para su posterior análisis mediante citómetro de flujo Epics® XL (Coulter). La población se seleccionó mediante FS y SS, y la fluorescencia se cuantificó con el detector FL1 (525 ± 20 nm), excepto para hidroetidio y MitoSox, para los cuales se utilizó FL2 (585 ± 20 nm) o FL3 (625 ± 20 nm). Todos los fluorocromos fueron adquiridos a Molecular Probes.

3.8. Determinación del ciclo celular mediante citometría de flujo

Las células, sembradas en placas de 6 pocillos a una densidad de 50.000 células/cm², se recogieron por centrifugación a 500 xg, 5 minutos a 4°C y se fijaron en etanol 70% a 4°C. Se almacenaron a -20°C durante al menos 24 horas. Una vez fijadas las células, se lavaron dos veces con tampón Hanks 1x frío (Biorad), se resuspendieron en 1 ml de tampón de tinción de ADN (PBS pH 7,5, 0,1% Tritón X-100, 0,1 mM EDTA, 50 µg/ml ARNasa-A y 50 µg/ml de yoduro de propidio) y la

tinción se llevó a cabo durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. La fluorescencia se cuantificó mediante un citómetro Epics® XL (Coulter).

3.9. Análisis de la degradación de proteínas mediante pulso y caza con ³H-leucina

Se sembraron 60.000 células/pocillo en placas de 12 pocillos el día anterior. El pulso se realizó con 500 µl de medio DMEM completo con 2 µCi ³H-leucina/ml de medio durante 48 horas. Tras la incorporación del aminoácido radiomarcado, las células se lavaron con Hanks 1x y se añadieron 400 µl de medio DMEM con o sin suero con 250 mM de leucina no radiomarcada. A cada pocillo se añadieron los inhibidores, N/L (20 µM NH₄⁺Cl⁻, 100 µM leupeptina) o 3MA (10 mM 3-metiladenina), o ninguno de los anteriores.

Se dejó la incorporación de la leucina fría durante 20 minutos, y se recogió el punto cero. Para ello, en una placa de filtro de 96 pocillos se añadieron 70 µl TCA 20%, 50 µl del medio y 30 µl BSA 20 mg/ml para precipitar las proteínas. Las placas se filtraron para evitar contaminación con restos celulares. Se recogieron muestras a las 0, 6, 12 y 48 horas. Tras el último punto se lavaron las células con Hanks 1x y se homogeneizaron con 400 µl de buffer de lisis RIPA.

Finalmente se tomaron 20 µl de cada muestra (incluido el homogenado final) y 180 µl de líquido de centelleo y se cuantificaron en el contador de centelleo durante 5 minutos/muestra.

4. Métodos de biología molecular

4.1. Diseño de cebadores

Los cebadores utilizados para PCR así como aquellos utilizados para realizar las secuenciaciones se diseñaron mediante el programa informático *Primer Premier* 5.0 (Biosoft). Para la determinación de la expresión génica mediante PCR a tiempo real se utilizaron cebadores diseñados por el programa *Beacon Designer* 4.0 (Biosoft).

4.2. Amplificación de PPTC7 y hCOQ7 mediante PCR y clonaje en vectores

Ambos genes se amplificaron a partir de ARN comercial de cerebelo (Clontech) mediante RT-PCR para la obtención del ADNc (RevertAid M-MuL V Reverse,

Fermentas) y posterior PCR. Para amplificar el gen *PPTC7* completo se utilizaron los primers hPPTC7clonF y hPPTC7clonR, y en el caso de hCOQ7 los primers hCOQ7pGEMTF y hCOQ7pGEMTR. Los productos se clonaron en un plásmido comercial *pGEM-T Easy Vector* (Promega) mediante asas-T y a partir de ahí se obtuvieron los amplicones necesarios para generar las diversas construcciones utilizadas. Para ello se realizaron *Touch Down* PCR (ver tabla adjunta) utilizando en la mayoría de los casos Taq polimerasa (MBL-Taq DNA polimerasa) o Pfu polimerasa (MBL-Pfu polimerasa).

Los fragmentos de PCR se seleccionaron tras realizar una electroforesis de ADN en geles de agarosa-TBE con bromuro de etidio al 1%. Una vez obtenidos los productos de PCR se clonaron en el vector comercial *pGEM-T Easy Vector* y se transformaron en bacterias *E. coli* DH5 α . El vector porta el gen *AMP1* de resistencia a ampicilina, lo que permitió la selección de transformantes positivos mediante el cultivo en presencia de dicho antibiótico, y con la ayuda de un *kit* comercial se realizó una purificación de ADN plasmídico (MBlotech).

Ciclo	Repeticiones	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	1	Desnaturalización	95°C	5
2	24	Desnaturalización	95°C	1
		Alineamiento	62°C (Δ -0,5°C/min)	1
		Extensión	72°C	2
3	6	Desnaturalización	95°C	1
		Alineamiento	50°C	1
		Extensión	72°C	2
4	1	Extensión	72°C	10

Tras comprobar por secuenciación la idoneidad del fragmento de PPTC7, se subclonó utilizando los mismos primers en el vector comercial de expresión en levadura pYES.1/V5-His-TOPO (Invitrogen) mediante asas-T. A los productos de

PCR obtenidos por Pfu polimerasa, se les añadieron las asas-A mediante una incubación 20' a 72°C con dATP 2 mM y Taq polimerasa.

Para clonar PPTC7 en el plásmido de expresión en levaduras pCM189 se usaron los cebadores hPTC7pCMF y hPTC7pCMR y se clonó el producto en *pGEM-T Easy Vector*. El plásmido pGEMT-PPTC7pCM y pCM189 se digirieron con BamHI y con PstI, y ambos se ligaron mediante T4-DNA Ligasa (Fermentas). En el caso del plásmido de expresión en células de mamífero pcDNA3-1b se clonó usando los oligos PTC7pcDNAF y PTC7pcDNAR y la digestión se realizó con las enzimas XhoI y XbaI. Otra versión se obtuvo para generar un transcrito en fase con el *tag c-myc* del vector pcDNA3-1b. En este caso se utilizó como antisentido el cebador PTC7pcFASE, subclonándose del mismo modo en el vector pcDNA3-1b. Para clonar el gen PPTC7 en el plásmido de expresión de proteínas recombinantes en bacterias (pGEX) se utilizaron los cebadores hPTC7BamHF y hPTC7SallR, digiriendo los fragmentos con BamHI y con Sall (Fermentas). En el plásmido pPGK se subclonó PPTC7 a partir de pcDNA3-1b-PPTC7, digiriendo con las enzimas BglII y PmeI (Fermentas) un fragmento que comprende el promotor CMV del plásmido y el inserto de PPTC7 en fase con el *tag c-myc*. Los bordes se hicieron romos con Klenow (Promega). El plásmido pPGK se digirió con EcoRV (Fermentas) la cual genera extremos romos. El inserto se trató con fosfatasa alcalina (BioLab) y se ligó con T4-DNA ligasa en el plásmido digerido.

COQ7 se clonó en *pGEM-T Easy Vector* utilizando como molde pGEMT-hCOQ7 y los primers hCOQ7BamHIF y hCOQ7XhoIR. Tras su secuenciación, el fragmento se digirió con las enzimas BamHI y XhoI, al igual que el plásmido pGEX, donde se subclonó por ligación con T4-DNA ligasa.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Molde	Finalidad
hPTC7clonF	ATGTTCTCGGTCCTCTCGTAC	PPTC7 (cDNA)	Clonaje en <i>pGEM-T Easy Vector</i>
hPTC7clonR	GGATCAGCACACATGGCAGGGGA	PPTC7 (cDNA)	Clonaje en <i>pGEM-T Easy Vector</i>
hCOQ7pGEMTF	CAACGAAGTGGTTGCTTTT	COQ7 (cDNA)	Clonaje en <i>pGEM-T Easy Vector</i>
hCOQ7pGEMTR	AGACAGGCCAAAACCTGGACA	COQ7 (cDNA)	Clonaje en <i>pGEM-T Easy Vector</i>
hPTC7intF	TGGTG TAGGAGGCTGGAGAG	PPTC7 clonado	Comprobación por PCR
hPTC7intR	AGCGATTGAGAGCTGGAATG	PPTC7 clonado	Comprobación por PCR
hPTC7pCMF	ATGGATCCATGTTCTCGGTCCCTCTCGTACG	pGEMT-PPTC7	Clonaje en pCM189
hPTC7pcFASE	CACTC TAGA TAGTCTGTATACTAGCCACTA	pGEMT-PPTC7	Clonaje en pcDNA3-1b en fase
hPTC7BamHF	GGGGGATCCGTGGCCCGCCCGCTGCT	pGEMT-PPTC7	Clonaje en pGEX
hPTC7SallR	CACGTCGACGGATCAGCACACACATGGCAGGGGA	pGEMT-PPTC7	Clonaje en pGEX

hCOQ7BamHI	GTTGGATCCATGAGTTGGCCCGGGG	pGEMT-hCOQ7	Clonaje en pGEX
hCOQ7XhoI	TGTCTCGAGGTTTCTTGCAAATGTCACCTGGT	pGEMT-hCOQ7	Clonaje en pGEX
PPTC7RTF	GGCGGGGACTACGGACTG	PPTC7 (cDNA)	PCR a tiempo real
PPTC7RTR	CTCTCCAGCCTCCTACACCATC	PPTC7 (cDNA)	PCR a tiempo real
hCOQ7RTF	AGTTCTGATGCCCTTG TG	COQ7 (cDNA)	PCR a tiempo real
hCOQ7RTR	GTTG7A GTGATGTGCTATGC	COQ7 (cDNA)	PCR a tiempo real

4.3. Plásmidos utilizados

Nombre	Características	Huésped
pGEM-T Easy	Plásmido comercial de clonación de productos de PCR por asas-T	<i>E. coli</i> (DH5α)
pGEX-PPTC7	pGEX-4-T1-PPTC7-GST <i>tag</i> (purificación de GST-Pptc7)	<i>E. coli</i> (BL21)
pGEX-hCOQ7	pGEX-4-T1-hCOQ7-GST <i>tag</i> (purificación de GST-hCoq7)	<i>E. coli</i> (BL21)
pcDNA-PPTC7	pcDNA3-1b-PPTC7 (sobrexpresión de PPTC7 en células de mamífero)	Células HeLa
pcDNA-PPTC7F	pCM189-PPTC-myc-6xHIS <i>tag</i> (sobrexpresión de PPTC7 en células de mamífero)	Levadura
pCM-PPTC7	pCM189-PPTC7 (Sobrexpresión de PPTC7 en levadura)	Levadura
ATG8-GFP	pRS316-ATG8-GFP <i>tag</i> (Expresión de la proteína recombinante Atg8-GFP en levaduras)	Levadura
pPGK-PPTC7	Plásmido de empaquetamiento de lentivirus para cotransducción de PPTC7 y GFP	Células de mamífero

4.4. Comprobación de transformantes por PCR y digestión con enzimas de restricción

Se utilizaron dos técnicas para comprobar los transformantes positivos. En primer lugar se realizaron PCR desde colonias con los cebadores internos del gen *PPTC7*, hPPTC7intF y hPPTC7intR.

Para confirmar los resultados se realizó una digestión sobre los plásmidos con las enzimas de restricción (Fermentas) utilizadas para la clonación en cada plásmido.

4.5. Secuenciaciones de los clonajes

Todas las construcciones se analizaron mediante secuenciación. Este análisis se llevó a cabo en plásmidos purificados desde las colonias que resultaron positivas

en las pruebas de PCR y de digestión. En las secuenciaciones se utilizaron los cebadores internos del gen *PPTC7* en la mayoría de los casos. En el caso de los vectores pGEM-T Easy y pYES2.1/V5-His-TOPO se utilizaron los cebadores T7 y SP6, y Gal1 y V5 respectivamente, proporcionados por el fabricante del vector.

En el caso de las secuenciaciones directas desde levadura se realizaron a partir de PCR desde colonias, utilizando los mismos cebadores que en el caso de los análisis en bacterias.

Las secuenciaciones fueron llevadas a cabo por la empresa Eurofins MWG Synthesis GmbH (Ebersberg, Alemania).

4.6. Extracción de ADN genómico de levadura

Para amplificar los genes de levadura que posteriormente se clonaron y transformaron, se extrajo ADN genómico (ADNg) según el método descrito previamente (Philippsen, Stotz et al. 1991). El ADNg se extrajo de cultivos de 30 ml en YPD a 2×10^8 células/ml. Las células se recogieron mediante centrifugación, se lavaron con agua destilada y se resuspendieron en 3 ml de sorbitol 0,9 M, EDTA 0,1 M, DTT 50 mM y fosfato potásico 20 mM pH 7,5. Se le añadió 0,25 mg de Zymoliasa 20T y se incubó durante 90 minutos en agitación a 37°C.

Una vez obtenidos los esferoplastos, se centrifugaron y se resuspendieron en 3 ml Tris-HCl 50 mM pH 8 y EDTA 50 mM. La suspensión se incubó con 0,3 ml SDS 10% a 65°C durante 30 minutos. Se añadió posteriormente 1 ml de acetato potásico 5 M manteniéndose en hielo durante 1 hora. Tras centrifugar a 15.000 rpm durante 30 minutos se separó el sobrenadante que se mezcló con un volumen igual de etanol absoluto. Se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos y se lavó el pellet con etanol al 70%. Se resuspendió en 300 µl de tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8). La contaminación con RNA se eliminó tratando la muestra durante 30 minutos a 37°C con 15 µl de una solución 10 mg/ml de RNAsa libre de DNAsa. Se añadieron 300 µl de fenol/cloroformo (1:1), se mezcló por inversión, se centrifugó 10 minutos y al sobrenadante se le añadió 15 µl de 3 M de acetato sódico y 900 µl de isopropanol. Tras centrifugar 10 minutos la pella se lavó con etanol 80%, se eliminó todo el exceso de etanol en el *Speed-Vac* y se resuspendió en 100-300 µl de tampón TE.

4.7. Extracción de ADN genómico a partir de colonias de levadura

Para realizar la PCR de comprobación de transformaciones se extrajo ADN_g a partir de colonias. Para ello se transfirieron colonias frescas a tubos con 100 µl de tampón de lisis (Tris-HCl 100 mM, pH 7.5, SDS 0.5%, y EDTA 30 mM), se mezclaron con vórtex 5" y se lisaron las células incubándolas 15 minutos a 95°C. Se precipitaron los restos celulares incubando con 50 µl de acetato potásico 5 M durante 20 minutos en hielo. Se eliminaron los restos celulares por centrifugación y al sobrenadante se le añadió 150 µl de cloroformo. Tras centrifugar se recogió la fase acuosa para precipitar el ADN con 70 µl de isopropanol. La pella se lavó con etanol 95%, y tras secarla en el *Speed-Vac* se resuspendió en 50 µl de tampón TE.

4.8. Extracción de ARN de cultivos celulares

Se utilizó *easy-BLUE Total RNA Extraction Kit* (iNtRON Biotechnology), siguiendo las instrucciones del fabricante. El proceso se realizó con material tratado con agua-DPEC. Una vez obtenido el ARN se trataron las muestras con DNAasal Amplification Grade (Sigma) durante 30 minutos para eliminar posibles contaminaciones con ADN genómico.

4.9. Cuantificación de ADN/ARN

Las purificaciones de ADN plasmídico, genómico y de ARN se cuantificaron mediante espectrofotometría (Nanodrop ND-1000 de Nanodrop). En todos los casos se seleccionaron las muestras que presentaron un ratio 260 nm/280 nm de 1.6-1.9 para el ADN y entre 1.8-2 para el ARN. Para descartar la degradación de las muestras de ARN y su pureza se resolvieron mediante electroforesis en geles de agarosa-TBE al 1%.

4.10. Síntesis de cDNA mediante RT-PCR

La reacción de transcripción reversa se realizó mediante *iScript cDNA Síntesis Kit* (Bio-Rad), y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se obtuvo el cDNA a partir de 0.5 µg de ARN para realizar posteriores PCR a tiempo real.

Previamente a la síntesis de cDNA, las muestras se trataron con *DNase I Amplification Grade* (Sigma) para eliminar posibles contaminaciones con ADN. Se siguieron las instrucciones del fabricante. La reacción se detuvo añadiendo 5 mM

de EDTA como agente quelante y desnaturalizando la DNasa I a 70°C durante 10 minutos.

4.11. Medida de la expresión génica mediante PCR a tiempo real

La PCR a tiempo real se realizó con SensiMix SYBR & Fluorescein Kit (Quantace), siguiendo las instrucciones del fabricante, con 2 µl de cDNA en un volumen final de reacción de 25 µl. Como gen constitutivo se utilizó GAPDH. Los cebadores se diseñaron con similar temperatura de fusión para poder determinar la expresión de diversos genes en las mismas condiciones de PCR, siendo la concentración final en la reacción de 0.2 µM. El programa utilizado en el termociclador fue el

Ciclo	Repeticiones	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	1	Activación enzimática	95°C	10:00
2	35	Adquisición del dato al final del tercer paso	95°C	00:15
			X°C (según Tm del cebador)	00:30
			72°C	00:30
3	>80	Análisis de la curva de melting	95°C	01:00
			55°C	01:00
			55°C (Δ0,5°C/ciclo)	00:10

determinado por el fabricante, en el que se incluye una curva de fusión para determinar la especificidad de cada producto de PCR.

Para cada pareja de cebadores se realizó una recta de calibrado para definir la eficiencia de los mismos. El ratio de expresión se calculó con el método de $2^{-\Delta\Delta CP}$ (Pfaffl 2001).

5. Métodos bioquímicos

5.1. Purificación de proteínas recombinantes

La expresión de proteínas recombinantes se indujo en la estirpe de bacteria BL21 transformada con el plásmido pGEX-PPTC7. La inducción se realizó durante 3

horas a 18°C con 0,4 mM de IPTG y 2% (v/v) de etanol 96% para inducir la expresión de chaperonas y facilitar así un correcto plegamiento de las proteínas recombinantes.

Las bacterias se lisaron en tampón GST (Tris-HCl 0,1 M pH8, NaCl 0,2 M, β -mercaptoetanol 15 mM, pefabloc 1 mM, leupeptina 1 mM, pepstatina 1 mM y ditiotreitól 1 mM), con 1:2000 p/v de lisozima, EDTA 0,6 M, pefabloc 0,25 mM, LBTI 0,5 mM y 1:2000 v/v Tritón-X-100, a -80°C durante 12 horas. Tras la lisis se añadió 0,1 mg de ADnasa I (Sigma) y 7,5 mM de MgCl₂, durante 10 minutos a temperatura ambiente. El homogenado se centrifugó a 12.000 x g durante 45 minutos a 4°C.

El sobrenadante se incubó a 4°C con 3 ml de esferas de glutatión-sefarosa (GST) (GE Healthcare). Tras 12 horas se lavaron y se eluyó la proteína con 1:3000 p/v de glutatión reducido (GSH) en tampón de elución (Tris-HCl 0.1 M pH8 y NaCl 0,2 M). El eluido se dializó para eliminar el GSH a 4°C durante 12 horas en 50% de glicerina, MOPS-NaOH 50 mM pH 7, β -mercaptoetanol 4,5 mM, pefabloc 0,1 mM. La proteína se almacenó a -20°C hasta su uso. Las muestras se cuantificaron tras realizar una electroforesis PAGE con tinción de plata, incluyendo una recta de calibrado con BSA.

5.2. Extracción de proteínas de células de mamífero en cultivo

Las células se recogieron por centrifugación y se homogeneizaron en RIPA Buffer (Pierce) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La lisis se llevó a cabo durante 5 minutos en hielo, y posteriormente se eliminaron los restos celulares mediante una centrifugación a 14.000 x g 15 minutos a 4°C.

5.3. Extracción de proteínas de levadura

Se tomaron 10 millones de células en 500 μ l de agua y se lisaron con 100 μ l de NaOH 2 M con β -mercaptoetanol al 35% durante 15 minutos en hielo. Las proteínas se precipitaron con 100 μ l de TCA 3 M, se incubaron 15 minutos a 4°C y se centrifugaron 10 minutos a 10.000 x g. La pella se lavó con acetona, y después de secarla se resolubilizó en 30 μ l de SDS 5% y 30 μ l de tampón de carga (LB 1x). Posteriormente se cargó en un gel de acrilamida la mitad del volumen de la muestra.

5.4. Cuantificación de proteínas por Bradford

Para cuantificar las muestras de proteína se utilizó el método de Bradford (Bradford 1976) con el reactivo BIO-RAD Protein Assay (Bio-Rad), en presencia de NaOH. Se determinó la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro, junto con una recta de calibrado con γ -globulina (0-28 μ g).

5.5. Resolución de muestras complejas de proteínas en SDS-PAGE e inmunodetección

Tras someter las muestras de extractos proteicos a electroforesis desnaturizante en SDS (SDS-PAGE) y transferirlas a membranas de nitrocelulosa, se llevó a cabo una inmunodetección con anticuerpos específicos.

Se utilizaron mini-geles de acrilamida (EZ-Run 12.5% Protein Gel Solution, Fisher Scientific) de 1.5 mm de grosor, y la electroforesis se realizó a intensidad de corriente constante de 35 mA por cada gel, en un sistema Mini Protean III de Bio-Rad, con EZ-Run Running Buffer 1x (Fisher Scientific). Para la electrotransferencia se utilizaron membranas de nitrocelulosa (Amersham-Pharmacia) humedecidas en tampón de transferencia (Tris base 48 mM, Glicina 39 mM, metanol 20%, pH 9-9.4), mediante el sistema Trans-Blot SD Transfer Cell (Bio-Rad), a voltaje constante de 25 V durante 1 hora. Previamente se estabilizaron los geles en tampón de transferencia durante 30 minutos. Como control de la transferencia y para visualizar el perfil de bandas generado se tiñó la membrana con una solución de Rojo Ponceau al 0,5% en acético al 1%.

El bloqueo se hizo con TTBS (Tris-HCl 20 mM pH 7,6, NaCl 150 mM, Tween20 0,05%) con 5% de Blotting Grade Blocker non-fat dry milk (Bio-Rad) durante 30 minutos. Las incubaciones con los anticuerpos fueron de 12 horas a 4°C en el caso del primario y de 30 minutos a 1 hora a temperatura ambiente en el caso del secundario (marcados en todos los casos con peroxidasa de rábano, HRP).

El revelado se llevó a cabo con Immun-Star Chemiluminescent kit (Bio-Rad) en la mayoría de los casos, y para detectar proteínas minoritarias Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore), y se realizó en un revelador automático (Amersham-Pharmacia).

Las imágenes obtenidas en el revelado fueron procesadas en un densitómetro GS-800 (Bio-Rad), con el software Quantity One 4.4.1 (Bio-Rad).

5.6. Ensayos de actividad fosfatasa in vitro

5.6.1. Ensayo p-NPP

La actividad fosfatasa fue determinada en 50 μ l de tampón fosfatasa (50 mM Tris-HCl pH 8,0, ditriotreitol 1 mM, $MnCl_2$ 10 mM y $MgCl_2$ 5 mM) añadiendo 1 μ g de proteína recombinante y 5 mM de *para*-nitrofenil fosfato (*p*-NPP) (Biorad). Tras 30 minutos la reacción se detuvo al añadir 200 μ l de SDS 0,5% y se determinó la absorbancia a 410 nm en un lector de placas (Eldex). En el ensayo se incluyó como control negativo GST purificado. El coeficiente de extinción molar del paranitrofenol-fosfato es $18 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Mackintosh and Moorhead 1993).

5.6.2. Ensayo con fosfopéptidos

Para determinar la actividad fosfatasa con péptidos fosforilados se utilizó el método del verde malaquita. En este ensayo se añadieron 2 μ g de proteína recombinante en tampón fosfatasa (ver ensayo *p*-NPP), y 5 μ M de péptidos fosforilados en un volumen final de 50 μ l. Tras 15 minutos se detuvo la reacción al añadir 100 μ l de verde malaquita (Upstate). Se permitió el desarrollo de la reacción colorimétrica durante 15 minutos y se determinó la absorbancia a 620 nm en un lector de placas (Eldex). Como control negativo se realizó una reacción sin enzima.

5.6.3. Ensayo DiFMUP

Mediante el sustrato 6,8-difluoro-4-metilumbeliferil fosfato (Molecular Probes) se determinó la actividad fosfatasa de proteínas purificadas a pH ácido. Para el ensayo se utilizaron 0.5 μ g de proteína en un volumen total de reacción de 500 μ l con $MnCl_2$ 10 mM y $MgCl_2$ 10 mM y DiFMUP 0.2 mM. La reacción se llevó a cabo durante 1 hora a 37°C, y se paró aumentando el pH mediante la adición de 500 μ l de borato sódico 50 mM. La actividad se cuantificó mediante fluorimetría (excitación 358 nm, emisión 455 nm).

5.7. Fosforilación in vitro con PKA de proteínas recombinantes purificadas

La proteína recombinante GST-hCOQ7 (100 μ g) se fosforiló *in vitro* unida a las esferas de glutatión-sefarosa con 5 unidades de la subunidad catalítica de Proteína

Kinasa A (Sigma), 0,1 μCi [γ - ^{32}P]ATP (Perkin Elmer) en 50 μl de tampón kinasa (Tris HCl 50 mM, β -glicerol fosfato 25 mM, MgCl_2 5 mM, MnCl_2 1 mM, ditiotreitól 1 mM, y 200 μM de ATP frío) durante 1 hora a 30°C. Posteriormente se lavaron las esferas para eliminar el [γ - ^{32}P]ATP sobrante y la PKA fosforilada, y se cuantificó la fosforilación total mediante un contador de centelleo.

5.8. Defosforilación in vitro de la proteína recombinante GST-Coq7 purificada

Una vez fosforilada GST-hCOQ7, se incubó, unida a las esferas de sefarosa, en 250 μl de tampón fosfatasa (ver ensayo *p*-NPP) y 2.5 μg de fosfatasa recombinante purificada durante 30 minutos a 30°C. Se cuantificó en el contador de centelleo la mitad de la muestra, y la otra se filtró para eliminar las proteínas unidas a las esferas de sefarosa y se cuantificó en el CC tanto la radiactividad remanente en las proteínas como la liberada por acción de la defosforilación.

5.9. Purificación de mitocondrias por subfraccionamiento celular

5.9.1. Purificación de esferoplastos y mitocondrias de levaduras

Se siguió el método de Glick (Glick and Pon 1995). Se recogieron los cultivos por centrifugación, se lavaron con agua destilada y se calculó su peso fresco. Cada gramo de peso fresco se resuspendió en 5 ml de tampón A (Tris- SO_4 100 mM, pH 9.4, DTT 10 mM) y se incubó durante 30 minutos con agitación suave a 30°C para facilitar la posterior acción de la Zymoliasa. Se centrifugó y se resuspendió en 2 ml de tampón B (Fosfato potásico 20 mM, pH 7.4 y sorbitol 1,2 M), añadiendo de 2,5 a 3,5 mg de Zymoliasa 20T (Seikagaku Corporation) y se incubó durante 60-90 minutos a 30°C en agitación hasta obtener esferoplastos.

Los esferoplastos se centrifugaron a 4°C, 4000 x g durante 5 minutos. La pella se lavó con 10 ml de tampón B y se resuspendió en 10 ml de tampón C, que está compuesto de Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 y manitol 0,6 M. En este momento se añaden 100 μl de PMSF 100 mM y a continuación se introduce todo en un homogenizador Dounce (vidrio-vidrio). Los esferoplastos se rompieron mediante 25-30 golpes de homogenizador. El paso siguiente es la centrifugación a 1500 x g durante 5 minutos a 4°C para eliminar restos de componentes celulares. El sobrenadante se centrifugó a 12.000 x g durante 15 minutos a 4°C. Tras la

centrifugación la pella está formada por una fracción de membrana enriquecida en mitocondria cruda. Estos dos últimos pasos se repiten añadiendo 12 ml de tampón C para aumentar la pureza del extracto de mitocondrias. Por último se resuspende en un volumen de 0,5 ml de tampón C.

5.9.2. Purificación de MAM y mitocondrias de células de mamífero

Las células se recogieron a 4°C por centrifugación a 500 x g durante 5' y se lavaron dos veces con PBS frío. El pellet se resuspendió en tampón hipoosmótico (HEPES 2 mM pH 7,4, MgCl₂ 0,15 mM, KCl 10 mM, EGTA 0,5 mM, citocalasina 20 uM, e inhibidores de proteasas 10 µg/ml) y se trataron en un homogeneizador de vidrio esmerilado (Tenbroeck). Una vez comprobada la rotura celular, se añadió sacarosa a una concentración final de 0,32 M. Las células sin lisar y los núcleos se eliminaron por centrifugación a 1000 x g durante 10 minutos a 4°C. Las mitocondrias se purificaron por centrifugación diferencial a 12.000 x g durante 15 minutos, obteniéndose en el sobrenadante el citosol. La pella se lavó dos veces centrifugando 10 minutos a 1.000 x g. Esta fracción enriquecida se conoce como mitocondria cruda.

Para obtener una fracción pura se cargó en un gradiente de sacarosa (1,6 M, 1,4 M, 1,2 M, 1 M, 0,8 M) en HEPES 2 mM pH 7,4 y se centrifugó a 4°C durante 90 minutos a 95.000 g. Las mitocondrias se localizan en la fase F3 (1,2-1,4 M sacarosa), las MAM en la fase F1 (0,8-1 M) y los mitoplastos en la fase F4 (1,4-1,6 M).

5.10. Determinación de las actividades de la cadena transportadora de electrones mitocondrial

Para las medidas de actividades de los distintos complejos redox de la cadena se utilizaron 50 µg de mitocondria cruda de levaduras. Se cuantificó la actividad de muestras frescas sin congelar para evitar pérdidas de actividad.

En el caso de células de mamífero en cultivo, se recogen por centrifugación y se digitonizan las muestras. Para ello se resuspenden en 2 ml de tampón A (MOPS 20 mM, Sacarosa 0,25 M) y se añaden 40 µg de digitonina por millón de células. Se incuban las muestras a 4°C 5 minutos y se centrifugan 3 minutos a 5000 xg a 4°C. La pella se resuspenden en 3 ml de tampón B (tampón A con EDTA 1 mM) y se

centrifugan 3 minutos a 10.000 xg a 4°C. La pella obtenida se resuspende en 200 µl de tampón KP 20 mM pH 7.4 y se congelan en nitrógeno líquido. Una vez descongeladas se sonicán durante 5 segundos. Las muestras se enviaron a Selten Diagnosis para el análisis de las actividades de la cadena transportadora de electrones.

5.10.1. Actividad NADH-citocromo c reductasa (complejo I+III)

La determinación de esta actividad enzimática se realizó en tampón fosfato sódico 40 mM pH 7,4, KCN 250 µM, 50 µg de muestra y 50 µM de citocromo *c* a 30°C en agitación. La reacción se inició tras añadir el NADH a una concentración final de 0,2 mM. La actividad específica se determinó calculando la diferencia de absorbancia a 550 nm antes y después de iniciar la reacción. Coeficiente de extinción molar del citocromo *c* reducido $\epsilon=18,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. El ensayo se realizó en presencia y ausencia de antimicina 100 µg/ml como inhibidor específico del complejo III.

5.10.2. Actividad succinato-citocromo c reductasa (complejo II+III)

Se realizó como la actividad del complejo I+III pero en lugar de NADH se utilizó 40 mM succinato sódico.

5.11. Cuantificación del consumo de oxígeno *in vivo* en electrodo de Clarke

El consumo de oxígeno en células vivas se determinó mediante el uso de un electrodo de Clarke (YSI incorporated 5300A Biological Oxygen Monitor).

La medida de consumo en levadura se llevó a cabo con 3 ml de cultivo en YPG a una unidad de $\text{DO}_{660\text{nm}}/\text{ml}$ a 30°C durante 20 minutos, tras los cuales se añadió cianuro potásico a una concentración final de 1 mM para inhibir la respiración en el complejo IV. La medida de consumo de oxígeno respiratorio corresponde a la diferencia entre las medidas con y sin CNK. A 30°C la concentración de oxígeno en medio es de 4.83 µl de O_2/ml .

En el caso de células humanas, el consumo de oxígeno se midió con 5 millones de células en medio DMEM completo durante 15 minutos a 37°C, y se añadió 1 mM final de CNK para cuantificar el consumo por respiración. A 37°C la concentración de oxígeno en el medio es 4.83 µl de O_2/ml .

5.12. Síntesis de pHB radiomarcado

La L-tirosina radiomarcada se secó en un *Speed-Vac* (5 mL de L-[U-¹⁴C]-tirosina 103.5 µM en etanol al 2%) en tubos Pyrex®. Tras secarse, se añadieron 17,5 µl de NaOH 10 M y 25 µl de KOH 10 M y se mezclaron mediante vórtex. La mezcla se congeló en nitrógeno líquido y se liofilizó durante 48 horas para evitar la degradación de la L-[U-¹⁴C]-Tirosina durante la síntesis. La reacción de síntesis se llevó a cabo sumergiendo el tubo en PEG-400 a 270°C durante 5', en un baño de arena precalentado. Una vez enfriado se despegó el precipitado del fondo del tubo con 400 µl de H₂SO₄ al 25% (mediante vórtex y sonicación). La extracción del [¹⁴C]pHB se realizó añadiendo 800 µl de acetato de etilo al 100%, agitando con vórtex y se centrifugando 1.000 x g 5' a 4°C, recuperándose la fase superior de acetato de etilo. La extracción se repitió tres veces y el acetato de etilo se lavó por triplicado con agua destilada, tras lo cual se secó en el *Speed-Vac*. El residuo seco se resuspendió en 200 µl de etanol. La pureza y el rendimiento se calcularon mediante TLC con isopropanol:hidróxido amónico:agua 8:1:1 y tinción con yodo. Se obtuvo un rendimiento del 30% y una pureza del 95%.

5.13. Extracción de compuestos quinónicos

5.13.1. Extracción de lípidos de mitocondrias de levaduras

El método utilizando ha sido descrito previamente (Santos-Ocana, Do et al. 2002). Un volumen correspondiente a 1 mg de proteína de mitocondria cruda se llevó a 500 µl con agua y se mezcló con 500 µl de SDS 2% y 500 ng de CoQ₉ como estándar interno para calcular la eficiencia de la extracción. La extracción se realizó con 2 ml de etanol:isopropanol 95:5 y 5 ml de hexano. Para separar las fases etanol-hexano (soluble-orgánica) se centrifugó 5 minutos a 2.000 x g. La fase orgánica se recuperó y la extracción se repitió tres veces. La fase orgánica se secó en un rotavapor, con vacío, a 35°C y potencia del rotor del 65%. El residuo seco se resuspendió en etanol HPLC-Grade y se volvió a secar en el *Speed-Vac* durante 2-3 horas a 50°C. Finalmente se resuspendió en 250 µl de etanol 100 % de calidad HPLC. La misma cantidad de estándar interno se mezcló con 1 ml de etanol y se secó en el *Speed-Vac*.

5.13.2. Extracción de lípidos de células de mamífero:

Esta extracción es similar a la descrita previamente para mitocondria de levadura. Se utilizan 500 ng de CoQ₉ como estándar interno y la muestra se homogeniza previamente en agua destilada. Se calcula tanto el número de células extraídas como la proteína.

5.13.3. Extracción rápida de compuestos lipídicos:

La muestra se resuspende en 1 volumen de solución acuosa (PBS 1x), se mezcla con 3 volúmenes de isopropanol. Se aplica una serie de mezcla con vórtex durante 1' y reposo a temperatura ambiente 1', por triplicado. Finalmente, se centrifugó la mezcla durante a 16.000 xg, 10' a 4°C y se recogió la fase no acuosa que se filtró con un filtro de PTFE (Acrodisc, Gelman Laboratory) de 45 µm para eliminar posibles restos celulares. El extracto se secó, se resuspendió en etanol 96% y se cargó directamente en una TLC.

5.13.4. Extracción desde células enteras de levadura

Las células se recogen mediante centrifugación (3.000 xg, 5' a 4°C), se lavan con agua y se calcula el peso fresco de la pella de células. Se añade 10 veces el peso fresco de células en bolas de vidrio de 0.5 mm de diámetro y 3.5 veces de agua. Se aplica vórtex a máxima potencia durante 2 minutos. Después se añaden 9 ml de metanol y 6 ml de hexano. Se aplica vórtex durante 1 minuto y se retira el hexano de la parte superior. Se añaden de nuevo 5 ml de hexano y se aplica vortéx igual que antes, recuperando de nuevo el hexano. Este proceso se repite una vez más y todo el hexano se seca en el rotavapor de acuerdo al apartado 5.13.1. El resto del proceso es similar que en el apartado 5.13.1.

5.14. Cuantificación de compuestos quinónicos de muestras complejas

5.14.1. Separación de lípidos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Se utilizó una columna de fase reversa Kromasil C-18 termostatizada a 40°C con un horno de columna, acoplada a un detector ultravioleta en serie Diode Array 166 (Beckman Coulter) y un detector electroquímico (ESA Coulochem III). La célula guarda se situó tras el inyector automático a +500 mV para oxidar tanto la fase

móvil como la muestra, y la célula analítica se ajustó a E1= -500 mV y E2= +500 mV. Como fase móvil se utilizó metanol/etanol/isopropanol 704/192/80 con perclorato de litio 1,38 mM a un flujo constante de 1 ml/min. El estándar externo se compuso de la misma quinona utilizada en el estándar interno más la quinona de interés (CoQ₆ en el caso de levaduras, CoQ₁₀ en humanos). El cromatograma se analizó mediante el software 32 Karat 5.0 (Beckman Coulter).

5.14.2. Separación de compuestos lipídicos por cromatografía en capa fina (TLC)

Para analizar la incorporación de pHB radiomarcado (*p*-hidroxibenzoato) los extractos lipídicos se cargaron en una placa TLC (Merck Silica Gel G60 F254 20x10 cm). Como estándar se cargaron 2 µl de de coenzima Q₁₀ 1 mM. Para la separación se utilizó una fase móvil hexano:éter 90:20. Para visualizar los lípidos se reveló con vapor de yodo y posteriormente se separó de sílice de placa y se cuantificó en el contador de centelleo.

BIBLIOGRAFÍA

- Abeliovich, H. (2011). "Stationary-phase mitophagy in respiring *Saccharomyces cerevisiae*." *Antioxid Redox Signal* 14(10): 2003-2011.
- Abeliovich, H. and D. J. Klionsky (2001). "Autophagy in yeast: mechanistic insights and physiological function." *Microbiol Mol Biol Rev* 65(3): 463-479.
- Abeliovich, H., C. Zhang, et al. (2003). "Chemical genetic analysis of Apg1 reveals a non-kinase role in the induction of autophagy." *Mol Biol Cell* 14(2): 477-490.
- Aberg, F., Y. Zhang, et al. (1996). "Increases in tissue levels of ubiquinone in association with peroxisome proliferation." *Chem Biol Interact* 99(1-3): 205-218.
- Agatep, R., R. D. Kirkpatrick, et al. (1999, 1999). "Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by the lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol (LiAc/ss-DNA/PEG) protocol." Retrieved 2001.
- Alcaín, F. J., M. I. Burón, et al. (1990). "Ascorbate free radical stimulates the growth of a human promyelocytic leukemia cell line." *Cancer Res.* 50: 5887-5891.
- Alleva, R., M. Tomasetti, et al. (2001). "Coenzyme Q blocks biochemical but not receptor-mediated apoptosis by increasing mitochondrial antioxidant protection." *FEBS Lett* 503(1): 46-50.
- Alvers, A. L., L. K. Fishwick, et al. (2009). "Autophagy and amino acid homeostasis are required for chronological longevity in *Saccharomyces cerevisiae*." *Aging Cell* 8(4): 353-369.
- Alvers, A. L., M. S. Wood, et al. (2009). "Autophagy is required for extension of yeast chronological life span by rapamycin." *Autophagy* 5(6): 847-849.
- Arroyo, A., F. Navarro, et al. (2000). "Interactions between ascorbyl free radical and coenzyme Q at the plasma membrane." *J Bioenerg Biomembr* 32(2): 199-210.
- Arroyo, A., J. C. Rodriguez-Aguilera, et al. (2004). "Stabilization of extracellular ascorbate mediated by coenzyme Q transmembrane electron transport." *Methods Enzymol* 378: 207-217.

Aure, K., J. F. Benoist, et al. (2004). "Progression despite replacement of a myopathic form of coenzyme Q₁₀ defect." *Neurology* 63(4): 727-729.

Baba, S. W., G. I. Belogradov, et al. (2004). "Yeast Coq5 C-methyltransferase is required for stability of other polypeptides involved in coenzyme Q biosynthesis." *J Biol Chem* 279(11): 10052-10059.

Barford, D., A. K. Das, et al. (1998). "The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 27: 133-164.

Barnett, A. and G. J. Brewer (2011). "Autophagy in Aging and Alzheimer's Disease: Pathologic or Protective?" *J Alzheimers Dis*.

Barros, M. H., A. Johnson, et al. (2005). "The *Saccharomyces cerevisiae* COQ₁₀ gene encodes a START domain protein required for function of coenzyme Q in respiration." *J Biol Chem* 280(52): 42627-42635.

Barroso, M. P., C. Gomez-Diaz, et al. (1997). "Plasma membrane ubiquinone controls ceramide production and prevents cell death induced by serum withdrawal." *J Bioenerg Biomembr* 29(3): 259-267.

Barth, H. and M. Thumm (2001). "A genomic screen identifies *AUT8* as a novel gene essential for autophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Gene* 274(1-2): 151-156.

Bartoschek, S., M. Johansson, et al. (2001). "Three Molecules of Ubiquinone Bind Specifically to Mitochondrial Cytochrome *bc₁* Complex." *J. Biol. Chem.* 276(38): 35231-35234.

Battino, M., A. Gorini, et al. (1995). "Coenzyme Q content in synaptic and non-synaptic mitochondria from different brain regions in the ageing rat." *Mech Ageing Dev* 78(3): 173-187.

Baur, J. A., K. J. Pearson, et al. (2006). "Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet." *Nature* 444(7117): 337-342.

Bautista-Ferrufino, M. R., M. D. Cordero, et al. (2011). "Amitriptyline induces coenzyme Q deficiency and oxidative damage in mouse lung and liver." *Toxicol Lett* 204(1): 32-37.

Beal, M. F. (2004). "Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in Alzheimer's and Parkinson's diseases and coenzyme Q₁₀ as a potential treatment." *J Bioenerg Biomembr* 36(4): 381-386.

Belli, G., E. Gari, et al. (1998). "An activator/repressor dual system allows tight tetracycline-regulated gene expression in budding yeast." *Nucleic Acids Res* 26(4): 942-947.

Belogradov, G. I., P. T. Lee, et al. (2001). "Yeast *COQ4* encodes a mitochondrial protein required for coenzyme Q synthesis." *Arch Biochem Biophys* 392(1): 48-58.

Bentinger, M., G. Dallner, et al. (2003). "Distribution and breakdown of labeled coenzyme Q₁₀ in rat." *Free Radic Biol Med* 34(5): 563-575.

Bentinger, M., J. Grunler, et al. (1998). "Phosphorylation of farnesol in rat liver microsomes: properties of farnesol kinase and farnesyl phosphate kinase." *Arch Biochem Biophys* 353(2): 191-198.

Bentinger, M., M. Turunen, et al. (2003). "Involvement of retinoid X receptor alpha in coenzyme Q metabolism." *J Mol Biol* 326(3): 795-803.

Bernales, S., S. Schuck, et al. (2007). "ER-phagy: selective autophagy of the endoplasmic reticulum." *Autophagy* 3(3): 285-287.

Beyer, R. E., B. A. Burnett, et al. (1985). "Tissue coenzyme Q (ubiquinone) and protein concentrations over the life span of the laboratory rat." *Mech Ageing Dev* 32(2-3): 267-281.

Blom, N., S. Gammeltoft, et al. (1999). "Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites." *J Mol Biol* 294(5): 1351-1362.

Bork, P., N. P. Brown, et al. (1996). "The protein phosphatase 2C (PP2C) superfamily: detection of bacterial homologues." *Protein Sci* 5(7): 1421-1425.

Bradford, M. D. and S. P. Soltoff (1998). "Involvement of protein kinases and phosphatases in tyrosine phosphorylation of PKCdelta in rat parotid acinar cells exposed to secretory stimuli." *Eur J Morphol* 36 Suppl: 176-180.

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.

Brandt, U. and B. Trumpower (1994). "The protonmotive Q cycle in mitochondria and bacteria." *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 29(3): 165-197.

Braun, H. P. (1987). "The transport of hydrophobic ions across lipid bilayers." *Biochim Biophys Acta* 903(2): 292-302.

Brautigan, D. L., M. Brown, et al. (2005). "Allosteric activation of protein phosphatase 2C by D-chiro-inositol-galactosamine, a putative mediator mimetic of insulin action." *Biochemistry* 44(33): 11067-11073.

Brea-Calvo, G., A. Rodriguez-Hernandez, et al. (2006). "Chemotherapy induces an increase in coenzyme Q₁₀ levels in cancer cell lines." *Free Radic Biol Med* 40(8): 1293-1302.

Brea-Calvo, G., E. Siendones, et al. (2009). "Cell survival from chemotherapy depends on NF-kappaB transcriptional up-regulation of coenzyme Q biosynthesis." *PLoS One* 4(4): e5301.

Briza, P., E. Bogengruber, et al. (2002). "Systematic analysis of sporulation phenotypes in 624 non-lethal homozygous deletion strains of *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* 19(5): 403-422.

Brown, G. C. and V. Borutaite (2001). "Nitric oxide, mitochondria, and cell death." *IUBMB Life* 52(3-5): 189-195.

Burón, M. I., J. C. Rodríguez-Aguilera, et al. (1993). "Transplasma membrane redox system in HL-60 cells is modulated during TPA-induced differentiation." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192(2): 439-445.

Campbell, I. and J. H. Duffus (1988). *Yeast, a practical approach*. Oxford, Oxford University Press.

- Carrera, A. C. (2004). "TOR signaling in mammals." *J Cell Sci* 117(Pt 20): 4615-4616.
- Casarin, A., J. C. Jimenez-Ortega, et al. (2008). "Functional characterization of human COQ4, a gene required for Coenzyme Q₁₀ biosynthesis." *Biochem Biophys Res Commun* 372(1): 35-39.
- Chan, K., D. Truong, et al. (2005). "Drug-induced mitochondrial toxicity." *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 1(4): 655-669.
- Chance, B. (2004). "Mitochondrial NADH redox state, monitoring discovery and deployment in tissue." *Methods Enzymol* 385: 361-370.
- Cheong, H. and D. J. Klionsky (2008). "Biochemical methods to monitor autophagy-related processes in yeast." *Methods Enzymol* 451: 1-26.
- Chi, A., C. Huttenhower, et al. (2007). "Analysis of phosphorylation sites on proteins from *Saccharomyces cerevisiae* by electron transfer dissociation (ETD) mass spectrometry." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(7): 2193-2198.
- Clarke, C. F., W. Williams, et al. (1991). "Ubiquinone biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation and sequence of *COQ3*, the 3,4-dihydroxy-5-hexaprenylbenzoate methyltransferase gene." *J Biol Chem* 266(25): 16636-16644.
- Claros, M. G. (1995). "MitoProt, a Macintosh application for studying mitochondrial proteins." *Comput Appl Biosci* 11(4): 441-447.
- Cohen, P. (1994). "The discovery of protein phosphatases: from chaos and confusion to an understanding of their role in cell regulation and human disease." *Bioessays* 16(8): 583-588.
- Cotan, D., M. D. Cordero, et al. (2011). "Secondary coenzyme Q₁₀ deficiency triggers mitochondria degradation by mitophagy in MELAS fibroblasts." *Faseb J*. En prensa.
- Crane, F. L. and P. Navas (1997). "The diversity of coenzyme Q function." *Mol Aspects Med* 18 Suppl: S1-6.
- Crane, F. L., I. L. Sun, et al. (1985). "Transplasma-membrane redox systems in growth and development." *Biochim Biophys Acta* 811(3): 233-264.

Crane, F. L., I. L. Sun, et al. (1991). "Electron and proton transport across the plasma membrane." *J Bioenerg Biomembr* 23(5): 773-803.

Crane, F. L., I. L. Sun, et al. (1995). "Coenzyme Q10, plasma membrane oxidase and growth control." *J. Mol. Asp. Med.* 2: 1-11.

Crane, F. L., Y. Hatefi, et al. (1957). "Isolation of a quinone from beef heart mitochondria." *Biochim Biophys Acta* 25(1): 220-221.

Cutry, A. F., A. J. Kinniburgh, et al. (1988). "Transforming growth factor alpha (TGF alpha) induction of C-FOS and C-MYC expression in C3H 10T1/2 cells." *Biochem Biophys Res Commun* 152(1): 216-222.

Das, A. K., N. R. Helps, et al. (1996). "Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution." *Embo J* 15(24): 6798-6809.

De Duve, C. and R. Wattiaux (1966). "Functions of lysosomes." *Annu Rev Physiol* 28: 435-492.

Deichmann, R., C. Lavie, et al. (2010). "Coenzyme Q₁₀ and statin-induced mitochondrial dysfunction." *Ochsner J* 10(1): 16-21.

Ding, W. X., M. Li, et al. (2011). "Selective taste of ethanol-induced autophagy for mitochondria and lipid droplets." *Autophagy* 7(2): 248-249.

Do, T. Q., A. Y. Hsu, et al. (2001). "A Defect in Coenzyme Q Biosynthesis Is Responsible for the Respiratory Deficiency in *Saccharomyces cerevisiae abc1* Mutants." *J. Biol. Chem.* 276(21): 18161-18168.

Dull, T., R. Zufferey, et al. (1998). "A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system." *J Virol* 72(11): 8463-8471.

Duncan, A. J., M. Bitner-Glindzicz, et al. (2009). "A nonsense mutation in COQ9 causes autosomal-recessive neonatal-onset primary coenzyme Q₁₀ deficiency: a potentially treatable form of mitochondrial disease." *Am J Hum Genet* 84(5): 558-566.

Echtay, K. S., E. Winkler, et al. (2000). "Coenzyme Q is an obligatory cofactor for uncoupling protein function." *Nature* 408(6812): 609-613.

Eggens, I., P. G. Elmberger, et al. (1989). "Polyisoprenoid, cholesterol and ubiquinone levels in human hepatocellular carcinomas." *Br J Exp Pathol* 70(1): 83-92.

Ernster, L. and G. Dallner (1995). "Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function." *Biochim. Biophys. Acta* 1271: 195-204.

Erusalimsky, J. D. and S. Moncada (2007). "Nitric oxide and mitochondrial signaling: from physiology to pathophysiology." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27(12): 2524-2531.

Fernandez-Ayala, D. J., G. Brea-Calvo, et al. (2005). "Coenzyme Q distribution in HL-60 human cells depends on the endomembrane system." *Biochim Biophys Acta* 1713(2): 129-137.

Fernandez-Ayala, D. J., G. Lopez-Lluch, et al. (2005). "Specificity of coenzyme Q₁₀ for a balanced function of respiratory chain and endogenous ubiquinone biosynthesis in human cells." *Biochim Biophys Acta* 1706(1-2): 174-183.

Fernandez-Ayala, D. J., S. F. Martin, et al. (2000). "Coenzyme Q protects cells against serum withdrawal-induced apoptosis by inhibition of ceramide release and caspase-3 activation." *Antioxid Redox Signal* 2(2): 263-275.

Fink, B. D., Y. O'Malley, et al. (2009). "Mitochondrial targeted coenzyme Q, superoxide, and fuel selectivity in endothelial cells." *PLoS One* 4(1): e4250.

Folkers, K., P. Langsjoen, et al. (1990). "Lovastatin decreases coenzyme Q levels in humans." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(22): 8931-8934.

Forte, M. and P. Bernardi (2005). "Genetic dissection of the permeability transition pore." *J Bioenerg Biomembr* 37(3): 121-128.

Frei (1999). "Molecular and biological mechanisms of antioxidant action." *Faseb J*. 963-972.

Frei, B., M. C. Kim, et al. (1990). "Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(12): 4879-4883.

Frerman, F. E. (1988). "Acyl-CoA dehydrogenases, electron transfer flavoprotein and electron transfer flavoprotein dehydrogenase." *Biochem Soc Trans* 16(3): 416-418.

Fridovich, I. (1997). "Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters." *J Biol Chem* 272(30): 18515-18517.

Friis, P., G. D. Daves, Jr., et al. (1966). "Isolation of ubiquinone-5, new member of ubiquinone group." *Biochem Biophys Res Commun* 24(2): 252-256.

Fuertes, G., J. J. Martin De Llano, et al. (2003). "Changes in the proteolytic activities of proteasomes and lysosomes in human fibroblasts produced by serum withdrawal, amino-acid deprivation and confluent conditions." *Biochem J* 375: 75-86.

Gari, E., L. Piedrafita, et al. (1997). "A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* 13(9): 837-848.

Geisler, S., K. M. Holmstrom, et al. (2010). "PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1." *Nat Cell Biol* 12(2): 119-131.

Geisler, S., K. M. Holmstrom, et al. (2010). "The PINK1/Parkin-mediated mitophagy is compromised by PD-associated mutations." *Autophagy* 6(7): 871-878.

Gey, U., C. Czupalla, et al. (2008). "Yeast pyruvate dehydrogenase complex is regulated by a concerted activity of two kinases and two phosphatases." *J Biol Chem* 283(15): 9759-9767.

Gil, G., J. L. Goldstein, et al. (1986). "Cytoplasmic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase from the hamster. I. Isolation and sequencing of a full-length cDNA." *J Biol Chem* 261(8): 3710-3716.

Gil, G., M. S. Brown, et al. (1986). "Cytoplasmic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase from the hamster. II. Isolation of the gene and characterization of the 5' flanking region." *J Biol Chem* 261(8): 3717-3724.

Gille, L. and H. Nohl (2000). "The existence of a lysosomal redox chain and the role of ubiquinone." *Arch Biochem Biophys* 375(2): 347-354.

Gin, P. and C. F. Clarke (2005). "Genetic evidence for a multi-subunit complex in coenzyme Q biosynthesis in yeast and the role of the Coq1 hexaprenyl diphosphate synthase." *J Biol Chem* 280(4): 2676-2681.

Gironi, M., C. Lamperti, et al. (2004). "Late-onset cerebellar ataxia with hypogonadism and muscle coenzyme Q10 deficiency." *Neurology* 62(5): 818-820.

Glick, B. S. and L. A. Pon (1995). "Isolation of highly purified mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*." *Methods In Enzymology* 260: 213-223.

Goewert, R. R., C. J. Sippel, et al. (1977). "The isolation and identification of a novel intermediate in ubiquinone-6 biosynthesis by *Saccharomyces cerevisiae*." *Biochem Biophys Res Commun* 77(2): 599-605.

Gómez-Díaz, C., J. C. Rodríguez-Aguilera, et al. (1997). "Antioxidant ascorbate is stabilized by NADH-coenzyme Q₁₀ reductase in the plasma membrane." *J. Bioenerg. Biomembr.* 29(3): 251-257.

Gómez-Díaz, C., J. M. Villalba, et al. (1997). "Ascorbate stabilization is stimulated in HL-60 cells by CoQ₁₀ increase at the plasma membrane." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234: 79-81.

Green, D. and G. Kroemer (1998). "The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria?" *Trends Cell Biol.* 8: 267-271.

Green, D. W. and G. J. Grover (2000). "The IF(1) inhibitor protein of the mitochondrial F(1)F(0)-ATPase." *Biochim Biophys Acta* 1458(2-3): 343-355.

Green, K., M. D. Brand, et al. (2004). "Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes." *Diabetes* 53 Suppl 1: S110-118.

Greenlund, L. J., T. L. Deckwerth, et al. (1995). "Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: a role for reactive oxygen species in programmed neuronal death." *Neuron* 14(2): 303-315.

Grunler, J., J. Ericsson, et al. (1994). "Branch-point reactions in the biosynthesis of cholesterol, dolichol, ubiquinone and prenylated proteins." *Biochim Biophys Acta* 1212(3): 259-277.

Guan, Z., M. Soderberg, et al. (1996). "Lipid composition in scrapie-infected mouse brain: prion infection increases the levels of dolichyl phosphate and ubiquinone." *J Neurochem* 66(1): 277-285.

Gueldener, U., J. Heinisch, et al. (2002). "A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast." *Nucleic Acids Res* 30(6): e23.

Guevara-Aguirre, J., P. Balasubramanian, et al. (2011). "Growth hormone receptor deficiency is associated with a major reduction in pro-aging signaling, cancer, and diabetes in humans." *Sci Transl Med* 3(70): 70ra13.

Guthrie, C. and G. R. Fink (1991). *Guide to yeast genetics and molecular biology*. San Diego, Academic Press.

Hagerman, R. A., P. J. Trotter, et al. (2002). "The regulation of *COQ5* gene expression by energy source." *Free Radic Res* 36(4): 485-490.

Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge (1989). *Free Radicals in Biology and Medicine*. London, Clarendon Press.

Han (2001). "Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space." *Biochem. J.* 234: 112-117.

Han, D., F. Antunes, et al. (2002). "Mitochondrial superoxide anion production and release into intermembrane space." *Methods Enzymol* 349: 271-280.

Heeringa, S. F., G. Chernin, et al. (2011). "COQ6 mutations in human patients produce nephrotic syndrome with sensorineural deafness." *J Clin Invest* 121(5): 2013-2024.

Herpin, P., G. Lossec, et al. (2002). "Effect of age and cold exposure on morphofunctional characteristics of skeletal muscle in neonatal pigs." *Pflugers Arch* 444(5): 610-618.

Hildebrandt, T. M. and M. K. Grieshaber (2008). "Three enzymatic activities catalyze the oxidation of sulfide to thiosulfate in mammalian and invertebrate mitochondria." *FEBS J* 275(13): 3352-3361.

Horvath, R., P. Schneiderat, et al. (2006). "Coenzyme Q₁₀ deficiency and isolated myopathy." *Neurology* 66(2): 253-255.

Hsieh, E. J., P. Gin, et al. (2007). "*Saccharomyces cerevisiae* Coq9 polypeptide is a subunit of the mitochondrial coenzyme Q biosynthetic complex." *Arch Biochem Biophys* 463(1): 19-26.

Hsu, A., T. Do, et al. (2000). "Genetic evidence for a multi-subunit complex in the O-methyltransferase steps of coenzyme Q biosynthesis." *Biochem. Biophys. Acta* 1484: 287-297.

Hu, K., C. Lee, et al. (2009). "Small interfering RNA library screen of human kinases and phosphatases identifies polo-like kinase 1 as a promising new target for the treatment of pediatric rhabdomyosarcomas." *Mol Cancer Ther* 8(11): 3024-3035.

Huang, J., F. Reggiori, et al. (2007). "The transmembrane domain of acid trehalase mediates ubiquitin-independent multivesicular body pathway sorting." *Mol Biol Cell* 18(7): 2511-2524.

Huang, W. P. and D. J. Klionsky (2002). "Autophagy in yeast: a review of the molecular machinery." *Cell Struct Funct* 27(6): 409-420.

Hubbard, V. M., R. Valdor, et al. (2011). "Selective autophagy in the maintenance of cellular homeostasis in aging organisms." *Biogerontology*. En prensa.

Huie, R. E. and S. Padmaja (1993). "The reaction of NO with superoxide." *Free Radic Res Commun* 18(4): 195-199.

Hunter, T. (1995). "Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling." *Cell* 80(2): 225-236.

Ingrell, C. R., M. L. Miller, et al. (2007). "NetPhosYeast: prediction of protein phosphorylation sites in yeast." *Bioinformatics* 23(7): 895-897.

Ishii, N., N. Senoo-Matsuda, et al. (2004). "Coenzyme Q10 can prolong *C. elegans* lifespan by lowering oxidative stress." *Mech Ageing Dev* 125(1): 41-46.

Jezeq, P. and L. Hlavata (2005). "Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism." *Int J Biochem Cell Biol* 37(12): 2478-2503.

Jiang, L., M. Whiteway, et al. (2002). "The *YHR076w* gene encodes a type 2C protein phosphatase and represents the seventh PP2C gene in budding yeast." *FEBS Lett* 527(1-3): 323-325.

Jimenez, J. C., M. A. Rodriguez-Hernandez, et al. (2008). Primary CoQ₁₀ deficiency due to COQ4 mutation in a child with mental retardation and myoglobinuria. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 372 (2008) 35-39

Jimenez-Hidalgo, M., C. Santos-Ocana, et al. (2009). "*NQR1* controls lifespan by regulating the promotion of respiratory metabolism in yeast." *Aging Cell* 8(2): 140-151.

Johnson, A., P. Gin, et al. (2005). "*COQ9*, a New Gene Required for the Biosynthesis of Coenzyme Q in *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Biol. Chem.* 280(36): 31397-31404.

Jonassen, T., D. E. Davis, et al. (2003). "Reproductive fitness and quinone content of *Caenorhabditis elegans* clk-1 mutants fed coenzyme Q isoforms of varying length." *J Biol Chem* 278(51): 51735-51742.

Jonassen, T., M. Proft, et al. (1998). "Yeast Clk-1 homologue (Coq7/Cat5): a mitochondrial protein in coenzyme Q synthesis." *J. Biol. Chem.* 273: 3351-3357.

Jones, M. E. (1980). "Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals: genes, enzymes, and regulation of UMP biosynthesis." *Annu Rev Biochem* 49: 253-279.

Journé, D., A. Mor, et al. (2009). "Aup1-mediated regulation of Rtg3 during mitophagy." *J Biol Chem* 284(51): 35885-35895.

Juneau, K., C. Nislow, et al. (2009). "Alternative splicing of *PTC7* in *Saccharomyces cerevisiae* determines protein localization." *Genetics* 183(1): 185-194.

Kabeya, Y., N. Mizushima, et al. (2000). "LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing." *Embo J* 19(21): 5720-5728.

Kagan, V. E., A. Arroyo, et al. (1998). "Plasma membrane NADH-coenzyme Q0 reductase generates semiquinone radicals and recycles vitamin E homologue in a superoxide-dependent reaction." *FEBS Lett* 428(1-2): 43-46.

Kagan, V. E., Y. Y. Tyurina, et al. (1998). "Role of coenzyme Q and superoxide in vitamin E cycling." *Subcell Biochem* 30: 491-507.

Kalen, A., B. Norling, et al. (1987). "Ubiquinone biosynthesis by the microsomal fraction from rat liver." *Biochimica Et Biophysica Acta* 926: 70-78.

Kalen, A., E. L. Appelkvist, et al. (1989). "Age-related changes in the lipid compositions of rat and human tissues." *Lipids* 24(7): 579-584.

Kaltschmidt, B., T. Sparna, et al. (1999). "Activation of NF-kappa B by reactive oxygen intermediates in the nervous system." *Antioxid Redox Signal* 1(2): 129-144.

Kaneshiro, E. S., M. Basselin, et al. (2006). "Ubiquinone synthesis and its regulation in *Pneumocystis carinii*." *J Eukaryot Microbiol* 53(6): 435-444.

Kanki, T. and D. J. Klionsky (2008). "Mitophagy in yeast occurs through a selective mechanism." *J Biol Chem* 283(47): 32386-32393.

Kanki, T., D. J. Klionsky, et al. (2011). "Mitochondria autophagy in yeast." *Antioxid Redox Signal* 14(10): 1989-2001.

Kanki, T., D. Kang, et al. (2009). "Monitoring mitophagy in yeast: the Om45-GFP processing assay." *Autophagy* 5(8): 1186-1189.

Kanki, T., K. Wang, et al. (2009). "A genomic screen for yeast mutants defective in selective mitochondria autophagy." *Mol Biol Cell* 20(22): 4730-4738.

Kanki, T., K. Wang, et al. (2009). "Atg32 is a mitochondrial protein that confers selectivity during mitophagy." *Dev Cell* 17(1): 98-109.

Khailova, L. S., E. A. Prikhodko, et al. (2006). "Participation of ATP/ADP antiporter in oleate- and oleate hydroperoxide-induced uncoupling suppressed by GDP and carboxyatractylate." *Biochim Biophys Acta* 1757(9-10): 1324-1329.

Kim (2000). "Caspase-Dependent and -Independent Events in Apoptosis Induced by Hydrogen Peroxide."

Kim, H., T. H. Lee, et al. (2000). "Role of peroxiredoxins in regulating intracellular hydrogen peroxide and hydrogen peroxide-induced apoptosis in thyroid cells." *J Biol Chem* 275(24): 18266-18270.

Kim, I., S. Rodriguez-Enriquez, et al. (2007). "Selective degradation of mitochondria by mitophagy." *Arch Biochem Biophys* 462(2): 245-253.

Kim, J. and D. J. Klionsky (2000). "Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells." *Annu Rev Biochem* 69: 303-342.

Kissova, I. B. and N. Camougrand (2009). "Glutathione participates in the regulation of mitophagy in yeast." *Autophagy* 5(6): 872-873.

Kissova, I., B. Salin, et al. (2007). "Selective and non-selective autophagic degradation of mitochondria in yeast." *Autophagy* 3(4): 329-336.

Kissova, I., M. Deffieu, et al. (2004). "Uth1p is involved in the autophagic degradation of mitochondria." *J Biol Chem* 279(37): 39068-39074.

Klingenberg, M., K. S. Echtay, et al. (1999). "Structure-function relationship in UCP1." *Int J Obes Relat Metab Disord* 23 Suppl 6: S24-29.

Klionsky, D. J. (2005). "The molecular machinery of autophagy: unanswered questions." *J Cell Sci* 118(Pt 1): 7-18.

Klionsky, D. J. (2007). "Monitoring autophagy in yeast: the Pho8Delta60 assay." *Methods Mol Biol* 390: 363-371.

Klionsky, D. J., A. M. Cuervo, et al. (2007). "Methods for monitoring autophagy from yeast to human." *Autophagy* 3(3): 181-206.

Klionsky, D. J., R. Cueva, et al. (1992). "Aminopeptidase I of *Saccharomyces cerevisiae* is localized to the vacuole independent of the secretory pathway." *J Cell Biol* 119(2): 287-299.

Klumpp, S., C. Hanke, et al. (1994). "A membrane-bound protein phosphatase type 2C from *Paramecium tetraurelia*. Purification, characterization, and cloning." *J Biol Chem* 269(52): 32774-32780.

Kon, M. and A. M. Cuervo (2010). "Chaperone-mediated autophagy in health and disease." *FEBS Lett* 584(7): 1399-1404.

Kopitz, J., G. O. Kisen, et al. (1990). "Nonselective autophagy of cytosolic enzymes by isolated rat hepatocytes." *J Cell Biol* 111(3): 941-953.

Kozak, M. (1987). "Effects of intercistronic length on the efficiency of reinitiation by eucaryotic ribosomes." *Mol Cell Biol* 7(10): 3438-3445.

Kozak, M. (1990). "Downstream secondary structure facilitates recognition of initiator codons by eukaryotic ribosomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(21): 8301-8305.

Kraft, C. and M. Peter (2008). "Is the Rsp5 ubiquitin ligase involved in the regulation of ribophagy?" *Autophagy* 4(6): 838-840.

Lagier-Tourenne, C., M. Tazir, et al. (2008). "ADCK3, an ancestral kinase, is mutated in a form of recessive ataxia associated with coenzyme Q₁₀ deficiency." *Am J Hum Genet* 82(3): 661-672.

Lagouge, M., C. Argmann, et al. (2006). "Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α ." *Cell* 127(6): 1109-1122.

Lamperti, C., A. Naini, et al. (2003). "Cerebellar ataxia and coenzyme Q₁₀ deficiency." *Neurology* 60(7): 1206-1208.

Lee, J. Y., Y. Nagano, et al. (2010). "Disease-causing mutations in parkin impair mitochondrial ubiquitination, aggregation, and HDAC6-dependent mitophagy." *J Cell Biol* 189(4): 671-679.

Lefort, N., Z. Yi, et al. (2009). "Proteome profile of functional mitochondria from human skeletal muscle using one-dimensional gel electrophoresis and HPLC-ESI-MS/MS." *J Proteomics* 72(6): 1046-1060.

Lemasters, J. J. (2005). "Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging." *Rejuvenation Res* 8(1): 3-5.

Leonard, C. J., L. Aravind, et al. (1998). "Novel Families of Putative Protein Kinases in Bacteria and Archaea: Evolution of the "Eukaryotic" Protein Kinase Superfamily." *Genome Res.* 8(10): 1038-1047.

Letunic, I., T. Doerks, et al. (2009). "SMART 6: recent updates and new developments." *Nucleic Acids Res* 37(Database issue): D229-232.

Levine, B. and D. J. Klionsky (2004). "Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy." *Dev Cell* 6(4): 463-477.

Levine, B. and J. Yuan (2005). "Autophagy in cell death: an innocent convict?" *J Clin Invest* 115(10): 2679-2688.

Levine, B. and V. Deretic (2007). "Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity." *Nat Rev Immunol* 7(10): 767-777.

Lin, S. S., J. K. Manchester, et al. (2001). "Enhanced Gluconeogenesis and Increased Energy Storage as Hallmarks of Aging in *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Biol. Chem.* 276(38): 36000-36007.

Linnane, A. W., M. Kios, et al. (2007). "Coenzyme Q(10)--its role as a prooxidant in the formation of superoxide anion/hydrogen peroxide and the regulation of the metabolome." *Mitochondrion* 7 Suppl: S51-61.

Littarru, G. P. and L. Tiano (2005). "Clinical aspects of coenzyme Q₁₀: an update." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 8(6): 641-646.

Lopez, L. C., M. Schuelke, et al. (2006). "Leigh syndrome with nephropathy and CoQ₁₀ deficiency due to decaprenyl diphosphate synthase subunit 2 (PDSS2) mutations." *Am J Hum Genet* 79(6): 1125-1129.

Lopez-Lluch, G., M. I. Buron, et al. (1998). "Redox regulation of cAMP levels by ascorbate in 1,25-dihydroxy- vitamin D₃-induced differentiation of HL-60 cells." *Biochem J* 331 (Pt 1): 21-27.

Lopez-Martin, J. M., L. Salviati, et al. (2007). Missense mutation of the COQ2 gene causes defects of bioenergetics and de novo pyrimidine synthesis: *Human Mol. Gen.* 16-9 1091-1097.

Lu, C., D. Zhang, et al. (2008). "Is antioxidant potential of the mitochondrial targeted ubiquinone derivative MitoQ conserved in cells lacking mtDNA?" *Antioxid Redox Signal* 10(3): 651-660.

Macho, A., M. A. Calzado, et al. (1999). "Selective induction of apoptosis by capsaicin in transformed cells: the role of reactive oxygen species and calcium." *Cell Death Differ* 6(2): 155-165.

Mackintosh, C. and G. Moorhead (1993). Assay and purification of proteins (serine/threonine) phosphatases. *Protein Phosphorylation: A Practical Approach*. D. G. Hardie, IRL Press. 1: 153-183.

Maehama, T., G. S. Taylor, et al. (2000). "A sensitive assay for phosphoinositide phosphatases." *Anal Biochem* 279(2): 248-250.

Mao, M., M. C. Biery, et al. (2004). "T lymphocyte activation gene identification by coregulated expression on DNA microarrays." *Genomics* 83(6): 989-999.

Marbois, B. N. and C. F. Clarke (1996). "The *COQ7* gene encodes a protein in *Saccharomyces cerevisiae* necessary for ubiquinone biosynthesis." *J. Biol. Chem.* 271(6): 2995-3004.

Marbois, B., P. Gin, et al. (2005). "Coq3 and Coq4 define a polypeptide complex in yeast mitochondria for the biosynthesis of coenzyme Q." *J Biol Chem* 280(21): 20231-20238.

Markaki, M. and N. Tavernarakis (2011). "The role of autophagy in genetic pathways influencing ageing." *Biogerontology*. En prensa.

Martin-Montalvo, A. (2009). Caracterización de la función de la proteína Coq7 de *Saccharomyces cerevisiae* en la regulación de la síntesis de coenzima Q. *Fisiología, Anatomía y Biología Celular*. Sevilla, Pablo de Olavide. PhD: 235.

Massey, A., R. Kiffin, et al. (2004). "Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy." *Int J Biochem Cell Biol* 36(12): 2420-2434.

Matsuda, N. and K. Tanaka (2010). "Uncovering the roles of PINK1 and parkin in mitophagy." *Autophagy* 6(7): 952-954.

Matsuda, N., S. Sato, et al. (2010). "PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy." *J Cell Biol* 189(2): 211-221.

Meganathan, R. (2001). "Ubiquinone biosynthesis in microorganisms." FEMS Microbiol Lett 203(2): 131-139.

Meijer, A. J. and P. Codogno (2006). "Signalling and autophagy regulation in health, aging and disease." Mol Aspects Med 27(5-6): 411-425.

Mellors, A. and A. L. Tappel (1966). "The inhibition of mitochondrial peroxidation by ubiquinone and ubiquinol." J Biol Chem 241(19): 4353-4356.

Meskiene, I., E. Baudouin, et al. (2003). "Stress-induced protein phosphatase 2C is a negative regulator of a mitogen-activated protein kinase." J Biol Chem 278(21): 18945-18952.

Mizushima, N., A. Yamamoto, et al. (2004). "*In vivo* analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker." Mol Biol Cell 15(3): 1101-1111.

Mizushima, N., B. Levine, et al. (2008). "Autophagy fights disease through cellular self-digestion." Nature 451(7182): 1069-1075.

Mollet, J., A. Delahodde, et al. (2008). "CABC1 gene mutations cause ubiquinone deficiency with cerebellar ataxia and seizures." Am J Hum Genet 82(3): 623-630.

Mollet, J., I. Giurgea, et al. (2007). "Prenyldiphosphate synthase, subunit 1 (PDSS1) and OH-benzoate polyprenyltransferase (COQ2) mutations in ubiquinone deficiency and oxidative phosphorylation disorders." J Clin Invest 117(3): 765-772.

Montini, G., C. Malaventura, et al. (2008). "Early coenzyme Q₁₀ supplementation in primary coenzyme Q₁₀ deficiency." N Engl J Med 358(26): 2849-2850.

Morselli, E., L. Galluzzi, et al. (2009). "Autophagy mediates pharmacological lifespan extension by spermidine and resveratrol." Aging (Albany NY) 1(12): 961-970.

Morselli, E., M. C. Maiuri, et al. (2010). "Caloric restriction and resveratrol promote longevity through the Sirtuin-1-dependent induction of autophagy." Cell Death Dis 1(1): e10.

Morselli, E., M. C. Maiuri, et al. (2010). "The life span-prolonging effect of sirtuin-1 is mediated by autophagy." Autophagy 6(1): 186-188.

Mortensen, M., D. J. Ferguson, et al. (2010). "Loss of autophagy in erythroid cells leads to defective removal of mitochondria and severe anemia in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(2): 832-837.

Mortensen, S. A. (2003). "Overview on coenzyme Q₁₀ as adjunctive therapy in chronic heart failure. Rationale, design and end-points of "Q-symbio"--a multinational trial." *Biofactors* 18(1-4): 79-89.

Musumeci, O., A. Naini, et al. (2001). "Familial cerebellar ataxia with muscle coenzyme Q₁₀ deficiency." *Neurology* 56(7): 849-855.

Nagy, M., F. Lacroute, et al. (1992). "Divergent evolution of pyrimidine biosynthesis between anaerobic and aerobic yeasts." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(19): 8966-8970.

Navarro, F., A. Arroyo, et al. (1999). "Protective role of ubiquinone in vitamin E and selenium-deficient plasma membranes." *Biofactors* 9(2-4): 163-170.

Navarro, F., P. Navas, et al. (1998). "Vitamin E and selenium deficiency induces expression of the ubiquinone- dependent antioxidant system at the plasma membrane." *Faseb J* 12(15): 1665-1673.

Navas, P., D. M. Fernandez-Ayala, et al. (2002). "Ceramide-dependent caspase 3 activation is prevented by coenzyme Q from plasma membrane in serum-deprived cells." *Free Radic Res* 36(4): 369-374.

Navas, P., I. L. Sun, et al. (1988). Relationship between NAD⁺/NADH levels and animal cell growth. F. L. Crane, D. J. Morré and H. Löw. New York, Plenum Publishing Corporation: 339-347.

Navas, P., J. M. Villalba, et al. (2007). "The importance of plasma membrane coenzyme Q in aging and stress responses." *Mitochondrion* 7 Suppl: S34-40.

Nieminen, A. L. (2003). "Apoptosis and necrosis in health and disease: role of mitochondria." *Int Rev Cytol* 224: 29-55.

Nieminen, A. L. (2003). "Apoptosis and necrosis in health and disease: role of mitochondria." *Int Rev Cytol* 224: 29-55.

Nohl (1998). "Antioxidant-Derived prooxidante formation from ubiquinol"

Ogasahara, S., A. G. Engel, et al. (1989). "Muscle coenzyme Q deficiency in familial mitochondrial encephalomyopathy." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(7): 2379-2382.

Okada (1998). "Biological significance of the side chain length of ubiquinone in *Saccharomyces cerevisiae*." *FEBS Lett* 431, 241-244.

Okamoto, K., N. Kondo-Okamoto, et al. (2009). "A landmark protein essential for mitophagy: Atg32 recruits the autophagic machinery to mitochondria." *Autophagy* 5(8): 1203-1205.

Olson, R. E. and H. Rudney (1983). "Biosynthesis of ubiquinone." *Vitam Horm* 40: 1-43.

Olsson, J. M., L. Xia, et al. (1999). "Ubiquinone is reduced by lipoamide dehydrogenase and this reaction is potently stimulated by zinc." *FEBS Lett* 448(1): 190-192.

Omura, S., H. Tomoda, et al. (1987). "Potent inhibitory effect of antibiotic 1233A on cholesterol biosynthesis which specifically blocks 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase." *J Antibiot (Tokyo)* 40(9): 1356-1357.

Padilla, S., T. Jonassen, et al. (2004). "Demethoxy-Q, An Intermediate of Coenzyme Q Biosynthesis, Fails to Support Respiration in *Saccharomyces cerevisiae* and Lacks Antioxidant Activity." *J. Biol. Chem.* 279(25): 25995-26004.

Padilla, S., U. C. Tran, et al. (2009). "Hydroxylation of demethoxy-Q₆ constitutes a control point in yeast coenzyme Q₆ biosynthesis." *Cell Mol Life Sci* 66(1): 173-186.

Padilla-Lopez, S., M. Jimenez-Hidalgo, et al. (2009). "Genetic evidence for the requirement of the endocytic pathway in the uptake of coenzyme Q₆ in *Saccharomyces cerevisiae*." *Biochim Biophys Acta* 1788(6): 1238-1248.

Padmaja, S. and R. E. Huie (1993). "The reaction of nitric oxide with organic peroxy radicals." *Biochem Biophys Res Commun* 195(2): 539-544.

Pankiv, S., T. H. Clausen, et al. (2007). "p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy." *J Biol Chem* 282(33): 24131-24145.

- Papa, S. and V. P. Skulachev (1997). "Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging." *Mol Cell Biochem* 174(1-2): 305-319.
- Papucci, L., N. Schiavone, et al. (2003). "Coenzyme Q₁₀ prevents apoptosis by inhibiting mitochondrial depolarization independently of its free radical scavenging property." *J Biol Chem* 278(30): 28220-28228.
- Pennock, J. F. (1983). "The biosynthesis of chloroplastidic terpenoid quinones and chromanols." *Biochem Soc Trans* 11(5): 504-510.
- Petiot, A., E. Ogier-Denis, et al. (2000). "Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells." *J Biol Chem* 275(2): 992-998.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic Acids Res* 29(9): e45.
- Philippsen, P., A. Stotz, et al. (1991). "DNA of *Saccharomyces cerevisiae*." *Methods Enzymol* 194: 169-182.
- Plecita-Hlavata, L., J. Jezek, et al. (2009). "Pro-oxidant mitochondrial matrix-targeted ubiquinone MitoQ₁₀ acts as anti-oxidant at retarded electron transport or proton pumping within Complex I." *Int J Biochem Cell Biol* 41(8-9): 1697-1707.
- Poon, W. W., B. N. Marbois, et al. (1995). "3-Hexaprenyl-4-hydrobenzoic acid forms a predominant intermediate pool in ubiquinone biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 320(2): 305-314.
- Poon, W. W., R. J. Barkovich, et al. (1999). "Yeast and rat Coq3 and *Escherichia coli* UbiG polypeptides catalyze both O-methyltransferase steps in coenzyme Q biosynthesis." *J Biol Chem* 274(31): 21665-21672.
- Poon, W. W., T. Q. Do, et al. (1997). "Sensitivity to treatment with polyunsaturated fatty acids is a general characteristic of the ubiquinone-deficient yeast coq mutants." *J. Mol. Asp. Med.*: 121-127.
- Pot, D. A., T. A. Woodford, et al. (1991). "Cloning, bacterial expression, purification, and characterization of the cytoplasmic domain of rat LAR, a receptor-like protein tyrosine phosphatase." *J Biol Chem* 266(29): 19688-19696.

Powers, R. W., M. Kaeberlein, et al. (2006). "Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling." *Genes Dev* 20(2): 174-184.

Priault, M., B. Salin, et al. (2005). "Impairing the bioenergetic status and the biogenesis of mitochondria triggers mitophagy in yeast." *Cell Death Differ* 12(12): 1613-1621.

Puigserver, P., D. Herron, et al. (1992). "Induction and degradation of the uncoupling protein thermogenin in brown adipocytes *in vitro* and *in vivo*. Evidence for a rapidly degradable pool." *Biochem J* 284 (Pt 2): 393-398.

Quinn, P. J., J. P. Fabisiak, et al. (1999). "Expansion of antioxidant function of vitamin E by coenzyme Q." *Biofactors* 9(2-4): 149-154.

Quinzii, C. M., L. C. Lopez, et al. (2008). "Human CoQ₁₀ deficiencies." *Biofactors* 32(1-4): 113-118.

Quinzii, C. M., S. DiMauro, et al. (2007). "Human coenzyme Q₁₀ deficiency." *Neurochem Res* 32(4-5): 723-727.

Quinzii, C., A. Naini, et al. (2006). "A mutation in para-hydroxybenzoate-polyprenyl transferase (COQ2) causes primary coenzyme Q₁₀ deficiency." *Am J Hum Genet* 78(2): 345-349.

Radi, R., M. Rodriguez, et al. (1994). "Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite." *Arch Biochem Biophys* 308(1): 89-95.

Raha, S. and B. H. Robinson (2000). "Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing." *Trends Biochem Sci* 25(10): 502-508.

Ramasarma, T., A. Swaroop, et al. (1981). "Generation of hydrogen peroxide on oxidation of NADH by hepatic plasma membranes." *J Bioenerg Biomembr* 13(5-6): 241-253.

Ramos, C. W., U. Guldener, et al. (2000). "Molecular analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* YHR076w gene." *IUBMB Life* 50(6): 371-377.

Rodriguez-Colman, M. J., G. Reverter-Branchat, et al. (2010). "The forkhead transcription factor Hcm1 promotes mitochondrial biogenesis and stress resistance in yeast." *J Biol Chem* 285(47): 37092-37101.

Rodriguez-Hernandez, A., M. D. Cordero, et al. (2009). "Coenzyme Q deficiency triggers mitochondria degradation by mitophagy." *Autophagy* 5(1): 19-32.

Rotig, A., E. L. Appelkvist, et al. (2000). "Quinone-responsive multiple respiratory-chain dysfunction due to widespread coenzyme Q₁₀ deficiency." *Lancet* 356(9227): 391-395.

Runner, V. M. and J. L. Brewster (2003). "A genetic screen for yeast genes induced by sustained osmotic stress." *Yeast* 20(10): 913-920.

Saiki, R., A. Nagata, et al. (2003). "Fission yeast decaprenyl diphosphate synthase consists of Dps1 and the newly characterized Dlp1 protein in a novel heterotetrameric structure." *Eur J Biochem* 270(20): 4113-4121.

Saiki, R., A. Nagata, et al. (2005). "Characterization of solanesyl and decaprenyl diphosphate synthases in mice and humans." *FEBS J* 272(21): 5606-5622.

Saito, Y., Y. Miyagawa, et al. (2008). "B-cell-activating factor inhibits CD20-mediated and B-cell receptor-mediated apoptosis in human B cells." *Immunology* 125(4): 570-590.

Santos, R. X., S. C. Correia, et al. (2011). "Effects of rapamycin and TOR on aging and memory: implications for Alzheimer's disease." *J Neurochem* 117(6): 927-936.

Santos-Ocaña, C., F. Córdoba, et al. (1998). "Coenzyme Q₆ and iron reduction are responsible for the extracellular ascorbate stabilization at the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Biol. Chem.* 273 (14): 8099-8105.

Santos-Ocana, C., J. M. Villalba, et al. (1998). "Genetic evidence for coenzyme Q requirement in plasma membrane electron transport." *J Bioenerg Biomembr* 30(5): 465-475.

Santos-Ocana, C., T. Q. Do, et al. (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.

Schapira, A. H. (2006). "Mitochondrial disease." *Lancet* 368(9529): 70-82.

Scherz-Shouval, R. and Z. Elazar (2007). "ROS, mitochondria and the regulation of autophagy." *Trends Cell Biol* 17(9): 422-427.

Scherz-Shouval, R., E. Shvets, et al. (2007). "Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4." *Embo J* 26(7): 1749-1760.

Schultz, J., F. Milpetz, et al. (1998). "SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(11): 5857-5864.

Schweighofer, A., H. Hirt, et al. (2004). "Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling." *Trends Plant Sci* 9(5): 236-243.

Seglen, P. O. and P. B. Gordon (1982). "3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(6): 1889-1892.

Seifert, E. L., V. Bezaire, et al. (2008). "Essential role for uncoupling protein-3 in mitochondrial adaptation to fasting but not in fatty acid oxidation or fatty acid anion export." *J Biol Chem* 283(37): 25124-25131.

Serrano, R. (1988). " H^+ -ATPase from plasma membranes of *Saccharomyces cerevisiae* and *Avena sativa* roots: purification and reconstitution." *Methods Enzymol.* 157: 533-544.

Shintani, T. and D. J. Klionsky (2004). "Autophagy in health and disease: a double-edged sword." *Science* 306(5698): 990-995.

Shults, C. W. (2005). "Therapeutic role of coenzyme Q(10) in Parkinson's disease." *Pharmacol Ther* 107(1): 120-130.

Shults, C. W., D. Oakes, et al. (2002). "Effects of coenzyme Q₁₀ in early Parkinson disease: evidence of slowing of the functional decline." *Arch Neurol* 59(10): 1541-1550.

Singh, R., S. Kaushik, et al. (2009). "Autophagy regulates lipid metabolism." *Nature* 458(7242): 1131-1135.

Sippel, C. J., R. R. Goewert, et al. (1983). "The regulation of ubiquinone-6 biosynthesis by *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* 258(2): 1057-1061.

Smith, J. S., C. B. Brachmann, et al. (2000). "A phylogenetically conserved NAD⁺-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(12): 6658-6663.

Sohal, R. S., S. Kamzalov, et al. (2006). "Effect of coenzyme Q₁₀ intake on endogenous coenzyme Q content, mitochondrial electron transport chain, antioxidative defenses, and life span of mice." *Free Radic Biol Med* 40(3): 480-487.

Springer, W. and P. Kahle (2011). "Regulation of PINK1-Parkin-mediated mitophagy." *Autophagy* 7(3): 266-278.

Srivenugopal, K. S., J. Shou, et al. (2001). "Enforced expression of wild-type p53 curtails the transcription of the O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase gene in human tumor cells and enhances their sensitivity to alkylating agents." *Clin Cancer Res* 7(5): 1398-1409.

St-Pierre, J., J. A. Buckingham, et al. (2002). "Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain." *J Biol Chem* 277(47): 44784-44790.

Strumilo, S. (2005). "Short-term regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex." *Acta Biochim Pol* 52(4): 759-764.

Sun, I. L., E. E. Sun, et al. (1992). "Requirement for coenzyme Q in plasma membrane electron transport." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(23): 11126-11130.

Suzuki, K., T. Kirisako, et al. (2001). "The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation." *Embo J* 20(21): 5971-5981.

Takahashi, T., T. Okamoto, et al. (1993). "Distribution of ubiquinone and ubiquinol homologues in rat tissues and subcellular fractions." *Lipids* 28(9): 803-809.

Takahashi, T., T. Okamoto, et al. (1996). "Characterization of NADPH-dependent ubiquinone reductase activity in rat liver cytosol: effect of various factors on ubiquinone-reducing activity and discrimination from other quinone reductases." *J. Biochemistry* 119(2): 256-263.

Takai, A. and G. Mieskes (1991). "Inhibitory effect of okadaic acid on the p-nitrophenyl phosphate phosphatase activity of protein phosphatases." *Biochem J* 275 (Pt 1): 233-239.

Tal, R., G. Winter, et al. (2007). "Aup1p, a yeast mitochondrial protein phosphatase homolog, is required for efficient stationary phase mitophagy and cell survival." *J Biol Chem* 282(8): 5617-5624.

Tanida, I., N. Minematsu-Ikeguchi, et al. (2005). "Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy." *Autophagy* 1(2): 84-91.

Tauche, A., U. Krause-Buchholz, et al. (2008). "Ubiquinone biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the molecular organization of O-methylase Coq3p depends on Abc1p/Coq8p." *FEMS Yeast Res* 8(8): 1263-1275.

Tauskela, J. S. (2007). "MitoQ--a mitochondria-targeted antioxidant." *IDrugs* 10(6): 399-412.

Teclebrhan, H., J. Olsson, et al. (1993). "Biosynthesis of the side chain of ubiquinone:trans-prenyltransferase in rat liver microsomes." *J Biol Chem* 268(31): 23081-23086.

Temple, M. D., G. G. Perrone, et al. (2005). "Complex cellular responses to reactive oxygen species." *Trends Cell Biol* 15(6): 319-326.

Tomasetti (1999). "Coenzyme Q10 Enrichment Decreases Oxidative DNA Damage in Human Lymphocytes." *Free Rad. Biol. Med.* 1027-1035.

Tomasetti, M., R. Alleva, et al. (2001). "In vivo supplementation with coenzyme Q₁₀ enhances the recovery of human lymphocytes from oxidative DNA damage." *Faseb J* 15(8): 1425-1427.

Tran, U. C. and C. F. Clarke (2007). "Endogenous synthesis of coenzyme Q in eukaryotes." *Mitochondrion* 7 Suppl: S62-71.

Tran, U. C., B. Marbois, et al. (2006). "Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* coq7 mutants by mitochondrial targeting of the *Escherichia coli* UbiF

polypeptide: two functions of yeast Coq7 polypeptide in coenzyme Q biosynthesis." J Biol Chem 281(24): 16401-16409.

Trumpower, B. L. (1990). "The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome *bc₁* complex." J Biol Chem 265 (20): 11409-11412.

Tsukada, M. and Y. Ohsumi (1993). "Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*." FEBS Lett 333(1-2): 169-174.

Turunen, M., J. M. Peters, et al. (2000). "Influence of peroxisome proliferator-activated receptor alpha on ubiquinone biosynthesis." J Mol Biol 297(3): 607-614.

Turunen, M., J. Olsson, et al. (2004). "Metabolism and function of coenzyme Q." Biochim Biophys Acta 1660(1-2): 171-199.

Twig, G. and O. S. Shirihai (2010). "The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy." Antioxid Redox Signal.

Twig, G., A. Elorza, et al. (2008). "Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy." Embo J 27(2): 433-446.

Tzagoloff, A. and C. L. Dieckmann (1990). "PET genes of *Saccharomyces cerevisiae*." Microbiological Reviews 54 (3): 211-225.

Vaillant, F., J. A. Larm, et al. (1996). "Effectors of the mammalian plasma membrane NADH-oxidoreductase system. Short-chain ubiquinone analogues as potent stimulators." J Bioenerg Biomembr 28(6): 531-540.

Van Maldergem, L., F. Trijbels, et al. (2002). "Coenzyme Q-responsive Leigh's encephalopathy in two sisters." Ann Neurol 52(6): 750-754.

Velours, G., C. Boucheron, et al. (2002). "Dual cell wall/mitochondria localization of the 'SUN' family proteins." FEMS Microbiol Lett 207(2): 165-172.

Velours, G., C. Boucheron, et al. (2002). "Dual cell wall/mitochondria localization of the 'SUN' family proteins." FEMS Microbiol Lett 207(2): 165-172.

Villalba, J. M. and P. Navas (2000). "Plasma membrane redox system in the control of stress-induced apoptosis." Antioxid Redox Signal 2(2): 213-230.

Villalba, J. M., F. Navarro, et al. (1995). "Coenzyme Q reductase from liver plasma membrane: Purification and role in trans-plasma-membrane electron transport." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4887-4891.

Villalba, J. M., F. Navarro, et al. (1997). "Role of cytochrome *b₅* reductase on the antioxidant function of coenzyme Q in the plasma membrane." *Mol Aspects Med* 18(Suppl): S7-13.

Walter (2000). "Three Classes of Ubiquinone Analogs Regulate the Mitochondrial Permeability Transition Pore through a Common Site." *J Biol Chem* 275 29521-28.

Wan, Y. J., Y. Cai, et al. (2000). "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha-mediated pathways are altered in hepatocyte-specific retinoid X receptor alpha-deficient mice." *J Biol Chem* 275(36): 28285-28290.

Werner-Washburne, M., E. Braun, et al. (1993). "Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Microbiological Reviews* 57(2): 383-401.

Woolford, C. A., L. B. Daniels, et al. (1986). "The *PEP4* gene encodes an aspartyl protease implicated in the posttranslational regulation of *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar hydrolases." *Mol Cell Biol* 6(7): 2500-2510.

Xia, L., M. Bjornstedt, et al. (2001). "Reduction of ubiquinone by lipoamide dehydrogenase. An antioxidant regenerating pathway." *Eur J Biochem* 268(5): 1486-1490.

Xia, L., T. Nordman, et al. (2003). "The mammalian cytosolic selenoenzyme thioredoxin reductase reduces ubiquinone. A novel mechanism for defense against oxidative stress." *J Biol Chem* 278(4): 2141-2146.

Xie, L. X., E. J. Hsieh, et al. (2011). "Expression of the human atypical kinase ADCK3 rescues coenzyme Q biosynthesis and phosphorylation of Coq polypeptides in yeast *coq8* mutants." *Biochim Biophys Acta* 1811(5): 348-360.

Yang, Y. Y., J. A. Gangoiti, et al. (2009). "The effect of different ubiquinones on lifespan in *Caenorhabditis elegans*." *Mech Ageing Dev* 130(6): 370-376.

Youle, R. J. and D. P. Narendra (2011). "Mechanisms of mitophagy." *Nat Rev Mol Cell Biol* 12(1): 9-14.

Zhang, Z. Y., D. Maclean, et al. (1993). "A continuous spectrophotometric and fluorimetric assay for protein tyrosine phosphatase using phosphotyrosine-containing peptides." *Anal Biochem* 211(1): 7-15.

Zhou, G., K. A. Mihindikulasuriya, et al. (2002). "Protein phosphatase 4 is involved in tumor necrosis factor-alpha-induced activation of c-Jun N-terminal kinase." *J Biol Chem* 277(8): 6391-6398.

Zhuo, S., J. C. Clemens, et al. (1993). "Expression, purification, crystallization, and biochemical characterization of a recombinant protein phosphatase." *J Biol Chem* 268(24): 17754-17761.