

CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES MITOCONDRIAL, UNA NUEVA VISIÓN

POR EL ACADÉMICO DE NÚMERO
ILMO. SR. DR. D. ACISCLO PÉREZ MARTOS
DISCURSO LEÍDO EN LA SOLEMNE APERTURA DEL
CURSO DE LA ACADEMIA DE FARMACIA REINO
DE ARAGÓN EL DÍA 6 DE FEBRERO DE 2013

PRECEDIDO DE LA
MEMORIA REGLAMENTARIA
COMPENDIANDO LOS TRABAJOS DE LA CORPORACIÓN DURANTE
EL AÑO 2012 POR EL SECRETARIO DE LA ACADEMIA
ILMO. SR. DR. D. IGNACIO ANDRÉS ARRIBAS



HOSPITAL REAL Y PROVINCIAL DE NUESTRA SEÑORA DE GRACIA

Zaragoza

6 de febrero de 2013

CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES MITOCONDRIAL, UNA NUEVA VISIÓN

POR EL ACADÉMICO DE NÚMERO
ILMO. SR. DR. D. ACISCLO PÉREZ MARTOS
DISCURSO LEÍDO EN LA SOLEMNE APERTURA DEL
CURSO DE LA ACADEMIA DE FARMACIA REINO
DE ARAGÓN EL DÍA 6 DE FEBRERO DE 2013

PRECEDIDO DE LA
MEMORIA REGLAMENTARIA
COMPENDIANDO LOS TRABAJOS DE LA CORPORACIÓN
DURANTE EL AÑO 2012 POR EL SECRETARIO DE LA ACADEMIA
ILMO. SR. DR. D. IGNACIO ANDRÉS ARRIBAS



HOSPITAL REAL Y PROVINCIAL DE NUESTRA SEÑORA DE GRACIA
Zaragoza
6 de febrero de 2013

Edita:

Colegio oficial de Farmacéuticos de Zaragoza

Distribuye:

Academia de Farmacia "Reino de Aragón"

Imprime:

Cometa, S.A.

Ctra. Castellón, Km. 3,400 – 50013 Zaragoza

Depósito Legal:

Z 144-2013

Sumario

Composición de la Academia de Farmacia Reino de Aragón.....	7
Memoria de actividades del curso 2012.....	11
<i>Discurso Inaugural</i>	
Ilmo. Sr. Dr. D. Acisclo Pérez Martos	
Cadena de transporte de Electrones Mitocondrial, una nueva visión.....	17

Composición de la Academia
Relación de académicos

Académicos de número

Presidente Fundador. Académico n° 1
Dr. Don MANUEL JOSÉ LÓPEZ PÉREZ
Vicepresidente Fundador. Académico n° 2
Dr. Don SANTIAGO ANDRÉS MAGALLÓN
Tesorero Fundador. Académico n°3
Dr. Don ACISCLO PÉREZ MARTOS
Vicesecretario. Académico n° 4
Dr. Don JULIO MONTOYA VILLARROYA
Secretario. Académico n° 5
Dr. Don IGNACIO ANDRÉS ARRIBAS
Académico n° 6
Dr. Don PEDRO RONCALÉS RABINAL
Académico n° 7
Dr. Don JESÚS DE LA OSADA GARCÍA
Académica n° 8
Dra. Doña ANA ISABEL ALCALDE HERRERO
Académico n° 9
Dr. Don FAUSTO GARCÍA HEGARDT
Académica n° 10
Dra. Doña CARMEN TORRES MANRIQUE
Académica n° 11
Dra. Doña MARÍA DEL CARMEN FRANCÉS CAUSAPÉ

Académicos correspondientes

Dra. Doña ÁNGELA IDOPE TOMÁS
Dra. Doña HERMINIA NAVARRO AZNÁREZ
Dra. Doña DARÍA BERMEJO RAMOS
Dr. Don MANUEL GÓMEZ BARRERA
Dra. Doña FRANCISCA MUÑOZ ESPÍLEZ

Académico de Honor electo

Ilmo Sr. JOSÉ MARÍA ORDOVÁS

*Memoria Reglamentaria
del Curso 2012*

Ilmo. Sr. Dr. D. Ignacio Andrés Arribas

Secretario de la Academia

10 de enero de 2012

Sesión de la Junta de Gobierno de la Academia de Farmacia “Reino de Aragón”, Elección de nuevos Académicos de número: **Dra. María del Carmen Francés Causapé** y a la **Dra. Carmen Torres Manrique**. Académicos correspondientes: **Dra. María Francisca Muñoz Espílez** y **Dr. Manuel Gómez Barrera**.

16 de enero de 2012

Acto inaugural del curso académico 2012 de la Reial Acadèmia de Farmàcia de Catalunya. Asistió D. Santiago Andrés Magallón.

28 de enero de 2012

Firma del convenio de colaboración entre la Academia de Farmacia y el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Zaragoza.

9 de febrero de 2012

Conferencia para conmemorar el décimo aniversario de la secuenciación del genoma humano.

“Genómica: Conmemorando el X aniversario del Proyecto Genoma Humano”.

Dr. Juan-Ramón Lacadena.

Profesor Emérito de la Universidad Complutense de Madrid.

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.

28 de febrero de 2012

Conferencia promovida por la Academia de Farmacia “Reino de Aragón” en colaboración con el COF Zaragoza.

“Características físico-químicas de la lágrima”.

Impartida por: **Dr. Santiago Andrés Magallón**.

Colegio Oficial de Farmacéuticos de Zaragoza.

16 de abril de 2012

Conferencia promovida por la Academia de Farmacia “Reino de Aragón” en colaboración con el COF Zaragoza.

“Incretinas: nueva estrategia frente a la Diabetes tipo 2”.

Impartida por: **Dr. Acisclo Pérez Martos.**

Colegio Oficial de Farmacéuticos de Zaragoza.

12 de abril de 2012

Junta de Gobierno de la Academia de Farmacia “Reino de Aragón”.

14 de mayo de 2012

ACTO DE RECEPCIÓN ACADÉMICA DEL:

Ilustre Sr. Dr. D. Manuel Gómez Barrera.

Como académico correspondiente.

Discurso de Presentación a cargo del Ilmo. Sr. Dr. D. Santiago Andrés, académico de número y vicepresidente fundador.

Discurso de ingreso titulado:

“Una visión tenue de la farmacoconomía y evaluación económica de medicamentos”.

LUGAR: Colegio Oficial de Farmacéuticos de Zaragoza.

18-20 de mayo de 2012

Asistencia de D. Santiago Andrés a la reunión de las Academias Españolas de Farmacia celebradas en Palma de Mallorca.

24 de mayo de 2012

Conferencia promovida por la Academia de Farmacia “Reino de Aragón” en colaboración con el COF Zaragoza:

“Estatinas: Beneficios y riesgos”.

Impartida por:

Dr. Acisclo Pérez Martos. Doctor en Farmacia.

Colegio Oficial de Farmacéuticos de Zaragoza.

Martes, 5 de junio de 2012

ACTO DE RECEPCIÓN ACADÉMICA DE LA:

Ilustre. Sra. Dra. Dña. María Francisca Muñoz Espílez.

Como académica correspondiente.

Discurso de Presentación a cargo del Ilmo. Sr. Dr. D. Santiago Andrés, académico de número y vicepresidente fundador.

Discurso de ingreso titulado:

“La prestación farmacéutica a través de receta en el Servicio Aragonés de Salud”.

LUGAR: Claustro del Palacio Episcopal de Teruel.

9 de julio de 2012

Junta de Gobierno: Nombramiento de Académico De Honor: **Ilmo Sr. José María Ordovás.**

Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Monografía XXXVI: **Sistema mitocondrial: un reto en la medicina humana.**

Manuel J. López Pérez: Editor.

Manuel J. López Pérez, Julio Montoya. Autores.

Madrid 2012.

18 de octubre 2012

Apertura del curso 2012-2013 para las Reales y Excelentísimas Academias, que desarrollan su labor docente y cultural en el territorio del antiguo Reino de Aragón.

31 de octubre de 2012

ACTO DE RECEPCIÓN ACADÉMICA DE LA:

Ilustrísima Sra. Dra. Dña. Carmen Torres Manrique.

Como académica de número.

Discurso de ingreso titulado:

“La Resistencia Bacteriana a los antibióticos, siete décadas después de Fleming”.

Discurso de Contestación a cargo del Excmo. Sr. Dr. D. Manuel J. López Pérez, académico de número y Presidente fundador.

LUGAR: Real Academia de Medicina de Zaragoza.

28 de noviembre de 2012

ACTO DE RECEPCIÓN ACADÉMICA DE LA:

Ilustrísima Sra. Dra. Dña. M^a del Carmen Francés Causapé.

Como académica de número.

Discurso de ingreso titulado:

“Aconteceres y Siluetas de la Farmacia Aragonesa”.

Discurso de Contestación a cargo del Excmo. Sr. Dr. D. Manuel J. López Pérez,
académico de número y Presidente fundador.

LUGAR: Real Academia de Medicina de Zaragoza.

Conferencia Inaugural
Cadena de transporte de electrones
mitocondrial, una nueva visión

Ilmo. Sr. Dr. D. Acisclo Pérez Martos

Académico De Número

CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES MITOCONDRIAL, UNA NUEVA VISIÓN

La célula es el nivel de organización más pequeño que tiene la capacidad de autopropetuar y es la responsable de las características de los seres vivos. En ella tienen lugar todas las reacciones químicas que hacen posible la fabricación de nuevos materiales para crecer, reproducirse, repararse, autorregularse y producir la energía necesaria para subsistir.

Según la Teoría Celular Moderna formulada, entre otros, por Robert Hooke, Theodor Schwann, Rudolph Virchow... Es la unidad morfológica, fisiológica y genética de los seres vivos.

Entre las cualidades que caracterizan a las células podemos destacar:

- (I) Alto grado de complejidad química: Complejas estructuras químicas formadas por miles de moléculas diferentes.
- (II) Capacidad para autorreplicarse y ensamblarse: Una célula bacteriana puesta en condiciones ideales, es capaz de formar mil millones de células idénticas en 24 horas.
- (III) Capacidad de responder a los cambios de su entorno: adaptándose y regulando los cambios químicos que componen su metabolismo.
- (IV) Extraer la energía de su entorno y transformarla en energía útil celular que permite a las células construir su propia estructura y realizar trabajo químico, osmótico, mecánico y eléctrico. **(Diapositiva 4)**

LA MITOCONDRIA (ESTRUCTURA Y FUNCIÓN)

La estructura de la mitocondria es crucial para su funcionamiento. La mitocondria se compone de dos membranas: la externa y la interna. La membrana externa que separa a la mitocondria del citoplasma, es una bicapa lipídica con canales de porina, que hacen que esta membrana sea más permeable permitiendo el paso de moléculas menores de 10 kDa y el paso de moléculas hidrofílicas a través de ella. Debido a la poca selectividad de la membrana externa, el espacio intermembrana es químicamente similar al citoplasma. Recientemente se han demostrado, en la membrana externa, zonas de interacción con el retículo endoplasmático, conocidas con el nombre de “membranas asociadas a mitocondria” (MAM; “Mitocondria Associated Membranes”).

Esta interacción del retículo endoplasmático con la mitocondria es de gran importancia para el papel del Ca^{+2} como mensajero intracelular (Pizzo and Pozzan 2007), de hecho se ha confirmado por tomografía electrónica que alrededor del 20% de la superficie mitocondrial está en contacto directo con el retículo endoplasmático (Renken, Hsieh et al. 2009).

La membrana interna, que define el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial, es mucho más impermeable debido a su alto contenido en cardiolipina. Esta impermeabilidad, necesaria para la generación del gradiente de protones, impide el paso de iones, por lo que la entrada de proteínas, sustratos e iones a la mitocondria depende de la presencia de proteínas de transporte específicas, que aprovechan el gradiente de protones y el ATP para llevar a cabo su función (Alberts y col 1996) (Szewczyk y Wojtczak, 2002). En la membrana interna es donde se encuentra la Cadena de Transporte de Electrones (CTE), que junto a la ATP sintasa se la conoce como el Sistema de Fosforilación Oxidativa, o sistema OXPHOS, y presenta un gran número de invaginaciones, para aumentar la superficie y permitir la inclusión de un mayor número de proteínas.

Recientemente se ha demostrado que estas invaginaciones, denominadas crestas, poseen una composición diferente con respecto a la membrana interna. En las crestas es donde realmente se sitúan los complejos del sistema OXPHOS, mientras que en el resto de la membrana interna es donde se localiza la maquinaria de importe. La diferente distribución proteica pone de manifiesto, que las crestas y la membrana interna mitocondrial son distintos subcompartimentos funcionales (Wurm and Jakobs 2006). Además, se ha visto que las crestas están conectadas con la membrana interna por uniones de un diámetro de entre 12 y 40 nm. Estas uniones reducen la continuidad entre el espacio intercrestal y entre la membrana mitocondrial interna y la membrana externa, limitando la movilidad del citocromo c y de los protones necesarios para la síntesis de ATP (Bereiter-Hahn and Jendrach 2010). **(Diapositiva 5) (Fig.1)**

Las diferencias entre la membrana interna y las crestas se observaron mediante microscopía electrónica seguida de tomografía computerizada para su reconstrucción en tres dimensiones. Las primeras aplicaciones de esta técnica en mitocondrias aisladas de hígado de rata demostraron la naturaleza tubular de las crestas mitocondriales que se extienden hacia la matriz, diferenciándose claramente de la membrana interna.

Las mitocondrias no siempre son entidades discretas, de hecho las mitocondrias aisladas son transitorias, y son capaces de moverse por el citoplasma asociadas a microtúbulos, de fusionarse (Meeusen and Nunnari 2005), (Griffin, Detmer et al. 2006), (Zhang and Chan 2007) y fisiónarse. Los cambios en el balance de fusión y fisión determinan el amplio rango de morfologías mitocondriales, desde pequeñas esferas hasta redes tubulares (Bernard et al. 2007; Chan, 2006).

Las mitocondrias son orgánulos subcelulares, de forma, longitud y número variable en función del tipo y estado metabólico celular, que están presentes en todas las células eucariotas con algunas excepciones, como los eritrocitos maduros y algunos protozoos (Cavalier-Smith 1987). Las dimensiones de las mitocondrias de una célula

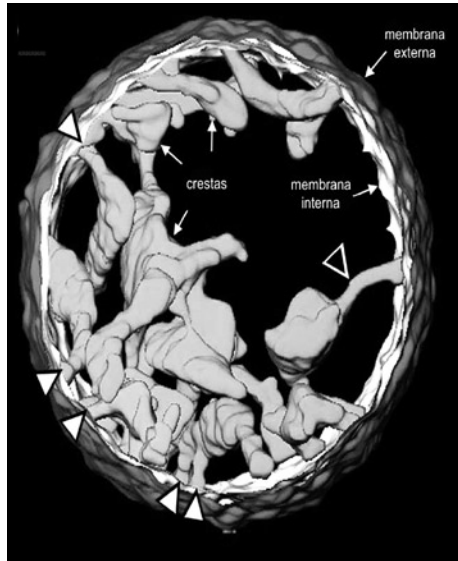


Fig.1 Tomografía de una mitocondria aislada de hígado de rata. Imagen 3D, donde se observan las crestas que son estructuras tubulares que se pueden unir entre ellas y con la membrana interna.

eucariota típica son del tamaño aproximado de una bacteria ($0,5 \times 1,0 \mu\text{m}$), y hay aproximadamente 2.000 por célula.

En ellas se produce la oxidación de los nutrientes para la obtención del 90% de la energía metabólica en forma de ATP, por lo que a menudo se las conoce como “la planta energética celular”. Con un consumo de glucosa y oxígeno es capaz de producir 80 w de potencia sin dejar productos de deshecho (solo CO_2 y H_2O) y trabajando a presión (1 atm) y temperatura constantes de 37°C , en estas condiciones pueden producir aproximadamente 100 kg diarios de ATP necesarios para auto-replicarse, realizar trabajo químico, osmótico... y mantener la actividad celular. Ya que el ATP solo se almacena en una cantidad próxima a 0,16 Mol, esto supone que el ciclo $\text{ADP} + \text{P}_i$ para dar ATP se repite más de 2.000 veces al día. (**Diapositivas 6 y 7**)

En la matriz mitocondrial se localizan las moléculas de mtDNA, las proteínas necesarias para su replicación y transcripción, los ribosomas encargados de la traducción de las proteínas codificadas en dicho genoma, que son indispensables para la formación de los complejos que forman la cadena de transporte electrónico mitocondrial, así como el resto de proteínas implicadas en los procesos metabólicos que tienen lugar en el interior de la mitocondria. Entre estos destacan el ciclo de Krebs, la β -oxidación de ácidos grasos, el ciclo de la urea, la síntesis de los centros sulfo-ferricos (hemoglobina, citocromos, etc...), síntesis de esteroides o la síntesis de pirimidinas (*Attardi and Schatz, 1988*). La mayoría de las proteínas implicadas en los procesos que tienen lugar en el interior de la matriz mitocondrial están codificadas en el DNA nuclear, por lo que deben ser traducidas en el citoplasma celular para ser importadas posteriormente al interior de la mitocondria (**Diapositivas 8 y 9**). Así pues, la biogénesis de las mitocondrias constituye

un caso único en la célula animal por encontrarse bajo el control de los dos sistemas genéticos celulares (el nuclear y el mitocondrial) que deben actuar de forma coordinada (Goffart and Wiesner, 2003; Kelly and Scarpulla, 2004). **(Diapositiva 13)**

La investigación acerca de las mitocondrias, del mtDNA, del ensamblaje de los distintos complejos del sistema OXPHOS, y su organización en la membrana interna mitocondrial, se ha visto impulsada desde finales de los años 80 por el creciente número de enfermedades provocadas por mutaciones, tanto en el mtDNA como en el DNA nuclear, que afectan al sistema OXPHOS, (Borisov, 2004; DiMauro and Schon, 2003; Wallace, 1999; Zeviani and Antozzi, 1997), la posible participación de este genoma en el proceso de envejecimiento (Chomyn and Attardi, 2003; Hance et al., 2005; Hofhaus et al., 2003; Trifunovic, 2006; Trifunovic et al., 2005; Trifunovic et al., 2004) en la carcinogénesis (Carew and Huang, 2002; Cuezva et al., 2002; Gallardo et al., 2006; Petros et al., 2005) así como la implicación de la mitocondria en el proceso de apoptosis (Green and Kroemer, 2004; Kroemer and Reed, 2000), la influencia de la variabilidad del mtDNA en la farmacogenómica (Pacheu-Grau et al. 2010) y en la respuesta a fármacos (Moreno-Loshuertos et al. 2006)

CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES

Las células han de desarrollar un trabajo para crecer y desarrollarse. La capacidad de aprovechar la energía y canalizarla en trabajo biológico es una propiedad de los seres vivos. Las células utilizan la oxidación de los nutrientes como fuente de energía para la obtención de ATP.

La energía libre de Gibbs expresa la cantidad de energía necesaria para realizar un trabajo en una reacción a presión y temperatura constante (1 atm y 37°C). Cuando una reacción tiene lugar con liberación de energía libre, se dice que es exergónica y puede transcurrir espontáneamente y se representa con signo negativo. La cantidad de energía libre que se produce en la oxidación completa de la glucosa hasta CO₂ y H₂O (respiración y/o combustión) es de $\Delta G^{\circ} = -686\text{Kcal}$. La variación de energía libre, al ser una función de estado, su valor depende de los reactantes y de los productos de la reacción, indistintamente del camino recorrido, por lo que la oxidación completa de glucosa en las células, que transcurre por no menos de 20 etapas enzimáticas en las que participan varias rutas metabólicas (glucólisis, ciclo de Krebs y CTE) así como varios compartimentos celulares (citoplasma, membranas y matrix mitocondrial), produce la misma cantidad de energía libre que su combustión en una bomba calorimétrica a CO₂ y H₂O que tiene lugar en una sola etapa. **(Diapositiva 10)**

La primera etapa de la oxidación de los alimentos tiene lugar en el citoplasma, donde parte de la energía libre de la glucosa (46 Kcal) se conserva en forma de 2ATP y 2NADH. En este proceso, la glucosa que tiene todos sus carbonos en un estadio intermedio de oxidación (COH-CHOH-CHOH-CHOH-CHOH.CH₂OH), se transforma en una secuencia de 10 reacciones catalizadas enzimáticamente que se conoce como glucólisis anaerobia, en dos moléculas de tres átomos de carbono (COOH-CO-CH₃)

piruvato, donde sus carbonos están: dos en estado total de oxidación y el tercero en estado reducido. Esta reorganización interna de los átomos de oxígeno (Oxido-reducción intramolecular) más la rotura del enlace C-C produce una liberación de energía libre de aproximadamente $\Delta G^{\circ} = -46\text{Kcal}$. Si se tiene en cuenta que la síntesis de una molécula de ATP necesita una $\Delta G^{\circ} = + 7,3 \text{ Kca}$ y se recuperan 2ATP, se puede fácilmente calcular que el rendimiento es aproximadamente del 31% $(14,3/46) \times 100$. Si consideramos que el resto de la energía se disipa en forma de calor que sirve para mantener la temperatura corporal, tendríamos un rendimiento por encima del 70%. Estas mismas consideraciones energéticas son válidas para el proceso que tiene lugar en la mitocondria en donde se produce la oxidación completa de la glucosa.

El piruvato formado, que lleva la mayor parte de la energía libre de la glucosa, penetra en la mitocondria por un transportador específico, y se transforma en acetyl-CoA. Los electrones del NADH también penetran en la mitocondria por medio de un sistema de lanzaderas, que junto con los producidos en el Ciclo de Krebs, alimentaran a la cadena de transporte de electrones.

La oxidación de acetylCoA, proveniente de la oxidación del piruvato generado en la glucólisis, del metabolismo de aminoácidos y de la β -oxidación de los ácidos grasos, en el ciclo de Krebs (*Krebs 1970*) (**Fig. 2**) genera los equivalentes de reducción NADH y FADH₂ que son el sustrato de la cadena de transporte de electrones y serán utilizados como dadores de electrones, para la obtención de energía, en el proceso conocido como fosforilación oxidativa, que es muy rentable energéticamente para la célula, ya que la oxidación completa de una molécula de glucosa conlleva la producción de 32-34 moléculas de ATP frente a las 2 moléculas de ATP producidas por la glucólisis anaerobia.

Los electrones procedentes del NADH son transportados secuencialmente mediante una serie de reacciones redox a través del complejo I, la ubiquinona, el complejo III,

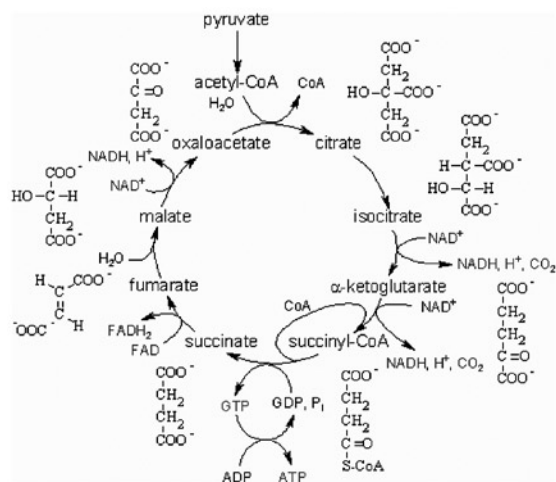


Fig 2. Esquema del ciclo de Krebs.

el citocromo c, para llegar finalmente al complejo IV, donde se los cederá al oxígeno molecular generando H_2O . De forma alternativa, los electrones del $FADH_2$, producto final de la succinato deshidrogenasa o complejo II, y de otras enzimas como la glicerol-3-P deshidrogenasa, la ETF-ubiquinona oxidorreductasa (primera enzima de la β -oxidación de los ácidos grasos) o la dihidroorotato deshidrogenasa (enzima implicada en la biosíntesis de pirimidinas), pasan a la ubiquinona y son canalizados mediante el complejo III, citocromo c y complejo IV para que lleguen hasta la reducción del oxígeno molecular.

Acoplado al transporte de electrones, los complejos I, III y IV de la cadena bombeaban protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana, generando un potencial de membrana que es aprovechado por la ATP sintasa o complejo V para impulsar la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico, cuando los protones reingresan a la matriz mitocondrial a través del complejo V, completándose el proceso de fosforilación oxidativa (Mitchell and Moyle, 1967). El potencial de membrana también es utilizado como fuente de energía para el importe de proteínas y otras moléculas, además de producir calor para mantener la temperatura corporal, en el caso de que los protones reingresen a la matriz mitocondrial a través de las proteínas desacoplantes UCP (Termogénesis). (Fig. 3) (Diapositivas 11 y 12).

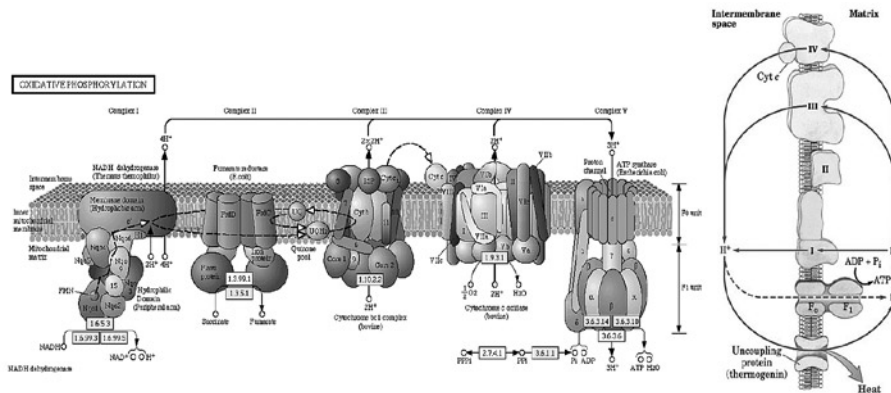


Fig. 3. Cadena de transporte de electrones y desacoplantes.

El ATP generado en este proceso, es utilizado en los distintos tejidos para mantener las necesidades energéticas celulares. Así, aquellos tejidos que tengan mayor requerimiento de ATP serán los más afectados en el caso de producirse fallos en su producción. (Fig. 4)

CARACTERÍSTICAS DEL DNA MITOCONDRIAL

El DNA mitocondrial está localizado en la matriz mitocondrial. En mamíferos, es una molécula de dos cadenas, circular cerrada, formada por aproximadamente 16,5

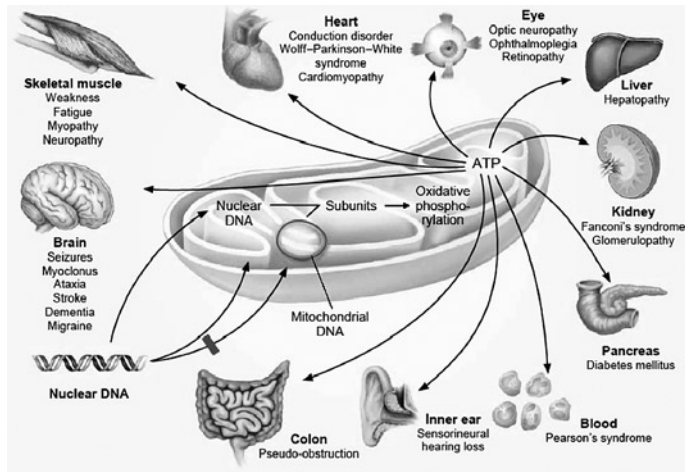


Fig.4. Tejidos afectados por depleción de ATP.

kilobases. Las células de mamífero pueden contener cientos de mitocondrias, cada una de las cuales posee, generalmente, varias copias idénticas de mtDNA ((*Robin and Wong, 1988*); (*Wiesner et al., 1992*)). Así pues, cada célula puede tener entre 1.000 y 10.000 moléculas de DNA mitocondrial que, en un individuo normal, son iguales entre sí (homoplasmia). Sin embargo, en ocasiones aparecen mutaciones en algunas moléculas de mtDNA, que coexisten con el DNA mitocondrial no mutado (heteroplasmia).

La primera secuencia completa de un DNA mitocondrial que se obtuvo fue la de humano, denominada secuencia de Cambridge, publicada en el año 1981 (*Anderson et al., 1981*) y corregida recientemente (NC_001807) (*Ingman et al., 2001*), a la que siguieron la de ratón (*Bibb et al., 1981*), modificada recientemente por nuestro grupo (NC_005089) (*Bayona-Bafaluy et al., 2003*), de vacuno (*Anderson et al., 1982*), de rata (*Gadaleta et al., 1989*) y de otros muchos mamíferos (*Wolstenholme, 1992*) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/euk_o.html).

Las dos cadenas del mtDNA son denominadas cadena pesada o H (Heavy) y cadena ligera o L (Light), en base a un diferente contenido de bases G+T (*Kasamatsu and Vinograd, 1974*). La mayor parte de la información genética del mtDNA está codificada en la cadena H. Así, mientras que esta contiene los genes para los RNAs ribosómicos (rRNA) 12S y 16S, 14 RNAs de transferencia (tRNA) y 12 polipéptidos, la cadena L codifica 8 tRNAs y un solo polipéptido.

El hecho de que los genes mitocondriales carezcan de intrones, es sólo una de las causas de que el mtDNA de mamíferos presente una organización genética extremadamente compacta. Además, en la cadena pesada, los genes se disponen uno a continuación del otro, sin tramos no codificantes intermedios ((*Anderson et al., 1981*); (*Montoya et al., 1981*); (*Ojala et al., 1981*)). De hecho, en el mtDNA humano, existe solapamiento entre los genes de la ATPasa 6 y ATPasa 8 (solapan en 46 nucleótidos) y entre los de

ND4 y ND4L (solapan en 7 nucleótidos). Asimismo, la mayor parte de genes codificantes de proteínas carecen de un codón de terminación, y solamente presentan una T o TA después del último codón y precediendo al extremo 5' del gen adyacente; el codón de terminación UAA del RNA mensajero (mRNA) se formará postranscripcionalmente por poliadenilación del extremo 3' de éste. En la **figura 5** se muestra el mapa genético del mtDNA humano, tomado como ejemplo por ser el mejor caracterizado.

Como puede observarse en esa misma figura, en la cadena pesada, los genes de los tRNAs se distribuyen a lo largo de la secuencia del DNA separando, casi con absoluta regularidad, los genes de los rRNAs y de los mRNAs. Esta disposición tiene consecuencias muy importantes para el procesamiento del RNA.

En las células metabólicamente activas de vertebrados, una gran proporción de las moléculas de mtDNA presenta una pequeña estructura, de tres cadenas, que corresponde 5 – 7 % del genoma mitocondrial y que no codifica ningún gen, llamada bucle de desplazamiento (bucle-D o *D-loop*), en la cual una cadena de ácido nucleico pequeña (entre 500 – 700 nucleótidos), complementaria a la cadena L, desplaza a la cadena H y permanece asociada de manera estable con el círculo cerrado (*Shadel and Clayton, 1997*). La pequeña cadena se encuentra unida entre los genes de tRNAPhe y tRNAPro y es esta región la que presenta mayores variaciones de tamaño y secuencia entre las diferentes especies (*Attardi and Schatz, 1988*). (**Fig. 5**)

La región del bucle-D constituye el principal lugar de control para la expresión del DNA mitocondrial, al contener el origen de replicación de la cadena pesada (OH) y los promotores para la transcripción IL e IH1.

Entre las características de este segundo genoma celular (mtDNA) pueden destacarse las siguientes:

(I) Es una molécula circular de doble cadena, sin intrones (secuencias no codificables) que se replica y transcribe en la matriz mitocondrial (*Clayton, 1982, 1991*). El

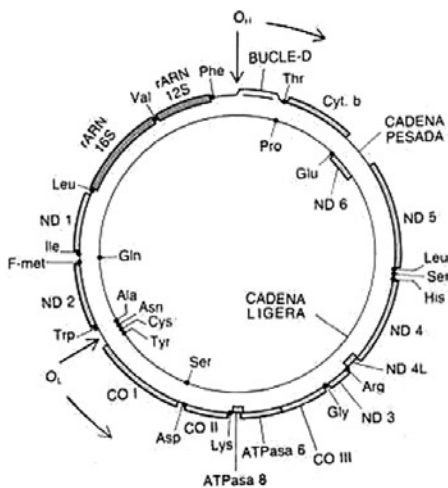


Fig 5. Mapa genético del mtDNA humano.

mtDNA de mamíferos contiene información para 37 genes: 24 RNAs necesarios para su síntesis (2 RNAs ribosómicos y 22 tRNAs) (*Anderson et al., 1981; Bayona-Bafaluy et al., 2003; Bibb et al., 1981*) y 13 proteínas, que son subunidades de complejos del sistema de fosforilación oxidativa: 7 subunidades (ND1, 2, 3, 4L, 4, 5, 6) de los 44 polipéptidos del complejo I (NADH deshidrogenasa), una subunidad (citocromo b, CYB) de los 11 polipéptidos del complejo III (ubiquinol-citocromo c oxido-reductasa), 3 subunidades (COI, II, III) de los 14 polipéptidos del complejo IV (citocromo c oxidasa) y 2 subunidades (ATPasa 6 y ATPasa 8) de las 11 proteínas del complejo V (ATP sintasa). **(Diapositiva 14)**

(II) Posee un código genético propio que difiere ligeramente del código genético universal (*Barrell et al., 1979*). Así por ejemplo, el codón UGA, que en la mitocondria codifica al aminoácido triptófano, en el código genético nuclear es una señal de parada de síntesis de proteínas. **(Diapositiva 15)**

(III) En mamíferos, cada mitocondria contiene entre 2 y 10 copias de mtDNA y cada célula, alrededor de 10^3 y 10^4 copias, dependiendo del tejido y de las necesidades energéticas de la célula. Además, es posible la existencia de varias formas alélicas del mtDNA en un mismo individuo, pudiendo diferir su proporción relativa dependiendo del tejido (*Holt et al., 1988*). Dentro de un mismo individuo pueden encontrarse distintos grados de heteroplasmia en los diferentes tejidos y suele darse la necesidad de alcanzar un umbral de porcentaje de DNA mutado para que empiecen a manifestarse los efectos patológicos de la mutación (*Mazat et al., 2001*).

(IV) Se transmite por herencia materna, no mendeliana (*Giles et al., 1980; Sutovsky et al., 1999*). Debido a que el espermatozoide tiene entre 13 y 20 mitocondrias localizadas en la pieza media del flagelo, cuya misión es producir energía (ATP) para la motilidad flagelar, mientras que el óvulo tiene aproximadamente unas 100.000 mitocondrias. Al producirse la fecundación solo entra en el óvulo la cabeza del espermatozoide con su carga de DNA nuclear, pero las mitocondrias que están en la pieza media del flagelo, no penetran en el óvulo, (en caso de hacerlo serían selectivamente eliminadas). **(Diapositiva 16).**

(V) Presenta una alta tasa de mutación (10 veces superior a la del DNA nuclear) debido a la exposición del mtDNA a las especies reactivas de oxígeno que se generan en el metabolismo oxidativo en el interior de la mitocondria, y a la ausencia de sistemas eficientes para su reparación (*Brown et al., 1979; Cantatore and Saccone, 1987; Gray, 1989*). Las mutaciones pueden ser patológicas dando lugar a las enfermedades mitocondriales, o ser mutaciones neutras que son representativas de la variabilidad y sirven de base para estudios evolutivos, filogenéticos y de migraciones. **(Diapositiva 17)**

(VI) El mtDNA no es manipulable, por lo que no se pueden transformar las mitocondrias, ni hacer mutagénesis dirigida para alterar un gen determinado y además el mtDNA de una especie es incompatible con el nDNA de otra especie diferente. Estas características dificultan el estudio de genética funcional del mtDNA. **(Diapositiva 18)**

ESTUDIOS DE GENÉTICA FUNCIONAL (MODELOS CELULARES Y ANIMALES)

En nuestro grupo, cuyo nombre es GENOXPHOS (acrónimo de genética funcional del sistema OXPHOS) estamos realizando estudios de genética funcional del mtDNA a tres niveles:

- (I) Obtención de una colección de mutantes en el mtDNA de ratón caracterizada genéticamente, actualmente es la mayor y más completa existente, ya que hemos conseguido obtener mutantes en todos los complejos de la cadena (CTE). Esta colección de mutantes se establece tanto en fibroblastos inmortalizados de ratón como en células pluripotenciales embrionarias (ES) mediante la transferencia de mitocondrias portadoras de mutaciones. Asimismo, mantenemos una colección de células ES de ratón portadoras de mutaciones en genes individuales del mtDNA.
- (II) Investigar los fundamentos moleculares que sustentan los fenotipos asociados a variantes polimórficas no patológicas en los mtDNA de ratón y de humanos, para entender la contribución de la variabilidad poblacional en procesos degenerativos asociados al envejecimiento, respuesta a fármacos (*Moreno los Huertos et al. 2006*), predisposición a sordera (*Johnson K.R. et al. 2001*), incluso la capacidad de aprendizaje (*Roubertoux PL. et al. (2003)*).
- (III) Exploración de estrategias de terapia génica de defectos asociados al mtDNA con expresión alotópica de genes codificados en el mtDNA y la xenoexpresión de enzimas monoapépticas de hongos o bacterias capaces de restaurar la oxidación del NADH y CoQ y de la fuerza protomotriz que dirige la síntesis de ATP en las mitocondrias.

Las primeras líneas celulares carentes de mtDNA (líneas ρ^0) fueron generadas de levadura a principio de la década de los 70, por tratamiento con Bromuro de Etidio (*Goldring et al., 1970*); (*Nagley and Linnane, 1970*)). Posteriormente fueron generadas líneas ρ^0 de mamíferos (*Desjardins et al., 1986*); (*King and Attardi, 1989*)). La falta de mtDNA no implica la ausencia de mitocondrias en las líneas celulares ρ^0 , aunque implica la ausencia del sistema OXPHOS y por lo tanto estas células sólo son capaces de obtener energía a través de la glucólisis anaerobia.

La generación de modelos tanto celulares como animales, para el estudio de genética funcional y patologías mitocondriales, se ha visto frenada por la imposibilidad de transformar mitocondrias y de mutar selectivamente un gen (mutagénesis dirigida). Además, el elevado número de copias (1.000-10.000) de mtDNA en células de mamífero dificulta que una mutación en una molécula entre miles de copias produzca un fenotipo observable.

Para solventar estos problemas, en nuestro grupo hemos diseñado y puesto a punto una nueva metodología para realizar mutaciones al azar que posteriormente, y por secuenciación del mtDNA se localiza el gen donde se han producido la mutación, y al mismo tiempo se disminuye el número de copias del mtDNA y se expanden los clones obtenidos hasta conseguir unas células en las que todo el mtDNA esté mutado

(homoplasmia), (*Acin-Pérez et al. 2004; Bayona-Bafaluy et al. 2008*). Para ello, se tratan las células con el mutageno Tri-Metil-Psoraleño (TMP) y se irradian con luz ultravioleta, para producir mutaciones al azar. Posteriormente, se tratan con Bromuro de Etidio, que es un agente que impide la replicación del DNA (siendo más sensible el mtDNA que el nuclear), con objeto de reducir el número de copias del mtDNA, (en situaciones ideales a una copia por célula), una posterior expansión clonal originaría una nueva línea celular, donde la mutación estaría en homoplasmia (todos los mtDNA iguales) o en un grado pequeño de heteroplasmia, suficiente para producir un fenotipo identificable. Por último se procede a la selección de los posibles mutantes. Para ello se siembran (en placas de 96 pocillos) en paralelo y por duplicado en un medio con glucosa y en otro con galactosa; aquellas células que mueran en galactosa, es porque tienen la cadena dañada y al no ser fermentable no pueden obtener ATP por la vía glucolítica. Recogemos su pareja del medio de glucosa que viven gracias al ATP obtenido en la glucólisis, y las crecemos en una placa petri. Estas células nos servirán como dadoras de mitocondrias. **(Diapositiva 19)**

A las células obtenidas con las mitocondrias mutadas en homoplasmia se les elimina el núcleo y las usamos como dadoras de mitocondrias. Se fusionan con otras células a las que se les ha suprimido el mtDNA, (células ρ^0), que sirven como donadoras de núcleo, así obtenemos unas células transmitocondriales con nDNA intacto y mtDNA portando la mutación que nos interesa estudiar. **(Diapositiva 20)**

Para obtener modelos animales de patología mitocondrial, nos basamos en que las mitocondrias solo se heredan por vía materna. Se obtienen fibroblastos de ratón portando una determinada mutación en su mtDNA, a estas células se les elimina el núcleo, y sirven como donadoras de mitocondrias. Se fusionan con células ES (células madre embrionarias) tratadas con Rodamina 6G que elimina el mtDNA, por lo que sirven como donadoras de núcleo. Las células así transformadas se inyectan en blastocisto y se reimplantan en ratonas pseudogestantes. La descendencia de estas ratonas, portarán la mutación mitocondrial deseada. **(Diapositivas 21, 22, 23, 24, 25 y 26, las tres últimas son películas)**

MUTACIONES EN CITOCROMO B

Una de las particularidades de muchos de los defectos genéticos que afectan a genes del sistema OXPHOS en humanos, es la variabilidad en las manifestaciones fenotípicas a nivel sintomático, bioquímico, molecular y genético (*DiMauro and Schon 2003*). En particular la descripción de defectos combinados en los complejos I+III, en pacientes que solamente presentan un defecto genético en el complejo III (Ubiquinol citocromo c reductasa). Este fenómeno no es simétrico ya que pacientes con un defecto genético en el complejo I nunca está asociado a defectos en el complejo III. **(Diapositivas 27 y 28)**

La mayoría de los defectos genéticos asociados al complejo III, hasta la fecha, son debidos a mutaciones en el citocromo b (*Andreu et al 1998, 1999; Lamantea 2002*), que es el único gen codificado en el mtDNA y que es esencial para el ensamblaje del complejo III.

Para investigar la causa molecular de estas observaciones hemos usado modelos celulares de ratón y de humano, deficientes del complejo III que presentan mutaciones en el citocromo b. Las células de ratón, tienen una mutación que causa un cambio de base en la posición G15263A, que al traducirse a proteína cambia un Glutamico por Lisina en la posición 373 (E373K), localizada en el extremo carboxi-terminal de la proteína (**Diapositiva 29**). Las células humanas presentan un defecto en el citocromo b por una microdelección de 4 bases, que causa la pérdida del citocromo b e impide el ensamblaje del complejo III. En ambos casos, hemos observado que la falta de ensamblaje del complejo III produce una dramática pérdida del complejo I. Así mismo, hemos obtenido idéntico resultado en una biopsia de músculo de un paciente que presentaba una mutación (G142X) (Glicina142desconocido) (*Bruno et al 2003*), confirmando que la interdependencia del ensamblaje de los complejos también es relevante en células diferenciadas. Para este estudio, hemos empleado células de ratón L929 a las que se les induce mutagenesis al azar, como hemos explicado anteriormente. Se seleccionan las células mutadas en el citocromo b (a estas células las llamamos células A22). Puesto que la mutación se ha realizado al azar, es posible que el daño en el sistema OXPHOS pueda ser debido a una alteración del DNA nuclear. Para eliminar esta posibilidad transferimos las mitocondrias de A22 a una célula receptora a la que se le han eliminado las mitocondrias, pero tienen el núcleo intacto, a estas células las llamamos FA22. Por secuenciación y por electroforesis del mtDNA tratado con la enzima de restricción BbsI, concluimos que el defecto genético era debido a la mutación G15263A. Esta mutación no aparece en la línea celular original L929.

En la literatura hay descritos pacientes con mutaciones en el complejo III con dos fenotipos diferentes, a saber (**Diapositiva 28**):

Pacientes de tipo A sin actividad del complejo III pero con actividad en el complejo I
Pacientes del tipo B sin actividad del complejo III, y tampoco en el complejo I.

Para ver si nuestras células A22 y FA22 mimetizaban alguno de estos fenotipos, analizamos independientemente, en mitocondrias aisladas, la actividad del complejo I y la actividad del complejo II (complejo de origen nuclear, por lo que no le afecta la alteración mitocondrial), y la normalizamos frente a la actividad de Citrato Sintasa (una enzima mitocondrial que participa en el ciclo de Krebs de origen nuclear). Observamos que la actividad del complejo I estaba severamente afectada en las líneas A22 y FA22, mientras que no se modificaba en los controles isogénicos. Asimismo, y como era de esperar la actividad del complejo II no está alterada en ninguna línea celular (**Diapositiva 29**). Si analizamos por electroforesis las muestras de músculo del paciente observamos que se comporta con un fenotipo de tipo B, es decir, al no ensamblar el complejo III, por llevar una mutación, tampoco ensambla el complejo I. (**Diapositiva 31**)

Con objeto de discernir si la falta de actividad del complejo I era debido a la presencia física del complejo III, o a la falta de actividad de dicho complejo, tratamos las células con Antimicina y/o Mixotiazol, dos inhibidores de la actividad del complejo III. En ambos casos observamos que no hay actividad del complejo III pero el complejo I no se ve alterado ni siquiera después de dos semanas de tratamiento. Este hecho nos

confirma que la pérdida de ensamblaje y de actividad del complejo I depende de la presencia física del complejo III, y no de su actividad. **(Diapositiva 32)**

SUPERCOMPLEJOS RESPIRATORIOS

A pesar del conocimiento detallado de la estructura de cada uno de los complejos respiratorios del sistema OXPHOS, la organización supramolecular de los mismos es poco conocida. Actualmente, existen dos modelos que intentan explicarla.

Según el modelo de “estado fluido” (*Rich, 1984*), los complejos I al IV difunden libremente en la membrana interna mitocondrial, de forma que la transferencia de electrones se produce gracias a las colisiones que, aleatoriamente, ocurren entre los diferentes complejos. El hecho de que los cinco complejos respiratorios puedan ser purificados fisiológicamente activos y mediante experimentos de dilución lipídica a partir de membranas mitocondriales aisladas, apoya este modelo, (*Hackenbrock et al 1986*).

El otro modelo propuesto, el denominado modelo de “estado sólido” (*Lenaz, 2001*); (*Lenaz and Genova, 2006*)), difiere radicalmente del modelo anterior y propone una nueva organización de la cadena de transporte electrónico en la que los complejos I, III y IV se encuentran agregados en supercomplejos que contienen diferentes proporciones estequiométricas de cada complejo individual (figura 11.A) (*Schagger and Pfeiffer, 2000*); (*Stroh et al., 2004*); (*Schafer et al., 2006*)); (*Dudkina et al., 2005*). Esta organización implica un transporte de electrones más eficiente (*D’Aurelio et al., 2006*); (*Genova et al., 2005*)).

La existencia de este modelo de “estado sólido”, propone que todos los complejos, excepto el complejo II se asocian en una estructura supramolecular, llamada respirasoma, y se apoya en muy diversas observaciones experimentales que no pueden ser explicadas por el modelo de “estado fluido”, entre ellas podemos citar:

- (I) La mutación de genes estructurales de un determinado complejo afecta a la estabilidad de otros complejos respiratorios. Así, mientras que el complejo III es indispensable para la estabilización del complejo I y la formación de supercomplejos (*Acin-Perez et al., 2004*); (*Schagger et al., 2004*), el complejo IV no interviene en la estabilidad de los complejos I y III, aunque sí en los niveles relativos de los mismos (*Diaz et al., 2006*; *Schagger et al., 2004*). Cuando el complejo I no está presente, aunque no es posible la formación del supercomplejo, los complejos restantes pueden ensamblarse y estabilizarse; estudios cinéticos basados en el control de flujo indican la existencia de unidades funcionales mayores que los complejos respiratorios individuales (*Bianchi et al., 2004*).
- (II) Análisis mediante electroforesis en geles nativos o mediante centrifugación en gradiente de sacarosa, y estudios de microscopía electrónica demuestran asociaciones de los diferentes complejos y la formación de supercomplejos respiratorios (*Schagger and Pfeiffer, 2000*; *Dudkina et al., 2005*; *Schafer et al., 2006*).

Estos modelos están ahora considerados como casos extremos de una situación más dinámica en la cual, el respirasoma (complejos I-III-IV), los supercomplejos (I-III y III-IV) y una población de complejos libres, coexisten. El papel de los supercomplejos no está claro, hay evidencias de que el complejo I se estabiliza por su interacción con el complejo III o IV (R. Acín-Peréz 2004; U. D. Vempati 2009) y que se incrementa el flujo de electrones por actuar como canalización de sustrato. Pero estas ideas entran en conflicto con los “pool” de los transportadores móviles CoQ y citocromo c (M.L. Genova et al 2005; G. Lenaz and M.L. Genova 2007). El mayor obstáculo para aceptar la función respiratoria de los supercomplejos, es la falta de evidencia de su función “in vivo”. Para validar el modelo de los supercomplejos, se necesitan evidencias genéticas y funcionales, así como explicar el papel de los “pool” de transportadores móviles CoQ y citocromo c.

Por otra parte, para el estudio de los supercomplejos hay que desorganizar la membrana donde se encuentran, con objeto de extraerlos. Para ello la membrana se trata con detergentes tales como el Dodecilmaltosido (DDM) o digitonina. Uno de los primeros argumentos en contra de la formación de los supercomplejos es la duda razonable de que su formación fuera un artefacto experimental proveniente del tratamiento con detergentes. Para despejar esta incógnita, en nuestro grupo tratamos las mitocondrias aisladas con varios detergentes, y a distintas concentraciones, y observamos que la formación de los supercomplejos no era dependiente del detergente empleado para su extracción. Así mismo, probamos con distintos tipos de electroforesis (Western, Electroforesis Blue-Native y Electroforesis con actividad en gel, separación en electroforesis bidimensional revelando con anticuerpos monoclonales específicos) y en todos los casos aparecían los supercomplejos (**Diapositivas 33, 34 y 35**).

Por último, nos planteamos que si los supercomplejos son verdaderas estructuras funcionales “in vivo” deben de cumplir los siguientes requisitos (**Diapositiva 36**):

- (I) Ser totalmente dependientes de la presencia de los complejos individuales.
- (II) Su formación debe ser posterior a la formación de los complejos individuales, es decir deben cumplir una cinética de formación.
- (III) Los supercomplejos deben contener CoQ y citocromo c.
- (IV) Deben transferir electrones entre ellos y entre el NADH y el O₂.

En una electroforesis donde se ponen de manifiesto los supercomplejos midiendo en el gel la actividad del complejo I (NADH deshidrogenasa) se aprecia en la calle de las células control (WT = Wild Type) actividad en todas las bandas donde aparece el complejo I. En la calle donde se ha eliminado el complejo I (C I knock out) (ko), no se aprecia actividad en ninguna banda (todos los supercomplejos aislados tienen C I). En la calle del C III ko, solo hay actividad en la banda 6, donde solo hay C I. En la calle correspondiente a la ausencia del complejo IV, solo se aprecia actividad en las bandas 1, 5 y 6, precisamente en aquellas donde no está presente el complejo IV. En la calle control negativo, es decir en la que se han puesto mitocondrias de células p⁰ (células sin mtDNA) no aparece ninguna actividad. Podemos confirmar que la primera

condición; los supercomplejos son totalmente dependientes de la presencia de los complejos individuales. **(Diapositiva 37)**

Para comprobar la segunda condición, realizamos un experimento de marcaje metabólico (experimento de pulso-caza), para ello incubamos las células con un aminoácido marcado radiactivamente (^{35}S -Metionina), las proteínas sintetizadas in vitro incorporaran el aminoácido radiactivo, y se harán visibles al revelar las placas de la electroforesis. Transcurrida una hora de incubación, se retira el medio radiactivo y se sustituye por metionina sin marcar y se vuelve a incubar durante 24 horas, y tomando muestras a distintos tiempos podemos visualizar la cinética de formación de los supercomplejos. Efectivamente a medida que transcurre el tiempo van apareciendo las bandas de los supercomplejos. **(Diapositiva 38)**

La detección del citocromo c y del CoQ se realiza por dos técnicas diferentes. El citocromo c se detecta por inmunodetección en una electroforesis bidimensional de las bandas de supercomplejos, y vemos que aparece en todas las bandas donde hay asociación de complejos individuales. Mientras que la presencia del CoQ se detecta por el tiempo de retención por HPLC (High Performance Liquid Chromatography), aparece en la banda que se ha analizado, que es la que tiene todos los complejos. **(Diapositiva 39)**

La última condición que deben cumplir las asociaciones de los complejos es la de ser capaces de transferir electrones entre ellos y al O_2 . Para confirmarla, extraemos de un gel electroforético de BN la banda 3 que porta los cuatro complejos, y medimos el consumo de oxígeno por método polarográfico, para ello la ponemos a respirar en un electrodo de oxígeno (electrodo de Clark) **(Diapositiva 40 y 41)**, y se observa que cuando ponemos NADH empieza a consumir oxígeno, que se paraliza al añadir rotenona que es un inhibidor específico del complejo I. Al añadir succinato como dador de electrones que entra al nivel del complejo II, se vuelve a consumir oxígeno, hasta que se añade Antimicina que es un inhibidor del complejo III. Si en ese momento añadimos al medio TMPD (Tetra Metil Phenilén Diamina) que es un dador de electrones del complejo IV, empieza otra vez a consumir oxígeno hasta que se añade cianuro potásico (CNK) que compete con el oxígeno por captar electrones, en ese momento se detiene la respiración. Con ello demostramos que los complejos extraídos de un gel son funcionales y transportan electrones hasta el oxígeno.

Recientemente, basándose en estos datos, nuestro grupo ha propuesto un nuevo modelo de cadena de transporte de electrones que explica estas objeciones y que concilia los dos modelos tradicionales, el modelo fluido y el modelo sólido, como casos extremos de organización en respuesta a las necesidades energéticas de la célula **(Diapositivas 42, 43 y 44)** (Acín-Pérez, R *et al.* 2008). En dicho modelo, llamado “plasticity model” proporcionamos evidencia experimental convincente de la existencia de superensamblajes respiratorios que permite a las células adaptarse a diferentes fuentes de carbono. Esta organización dinámica, reformula la función, regulación y homeostasis del metabolismo bioenergético en células eucariotas, de forma que según las necesidades energéticas celulares los complejos se pueden asociar de muy diversas formas (Lapuente-Brun *et al.* 2013). Al mismo tiempo, resolvemos las observaciones contradic-

torias del uso del CoQ por el CII aislado, cuando no se encuentra ensamblado en supercomplejo, y la demostración de la existencia otro “pool” de CoQ para el CIII, así como de citocromo c libre para la forma más abundante del CIV ya que puede recibir electrones desde el NADH y de FADH₂. Hemos aclarado el papel del ensamblaje entre los complejos I/III y III/IV, e identificamos la proteína Cox7a21 como el primer factor de ensamblaje de supercomplejos, en mamíferos, para la que nosotros proponemos el nombre de SCAFI (Supercomplexes Assembly Factor I).

BIBLIOGRAFÍA

- Acín-Pérez, R., Bayona-Bafaluy, M.P., Fernandez-Silva, P., Moreno-Loshuertos, R., Perez-Martos, A., Bruno, C., Moraes, C.T., and Enriquez, J.A. (2004). Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria. *Mol Cell* 13, 805-815.
- Acín-Pérez, R., Fernandez-Silva, P., Peleato, M.L., Perez-Martos, A., and Enriquez, J.A. (2008). Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell* 32, 529-539.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., et al. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290, 457-465.
- Andreu, A.L., Bruno, C., Shanske, S., Shtilbans, A., Hirano, M., Krishna, S., Hayward, L., Systrim, D.S., Brown, R.H., Jr and Di Mauro, S. (1998). Missense mutation in the mtDNA cytochrome b gene in a patient with myopathy. *Neurology* 51, 1444-1447.
- Andreu, A.L., Hanna, M.G., Reichmann, H., Bruno, C., Penn, A.S., Tanji, K., Pallotti, F., Iwata, S., Bonilla, E., Lach, B., et al. (1999). Exercise intolerance due to mutations in the cytochrome b gene of mitochondrial DNA. *N Engl J Med* 341, 1037-1044.
- Attardi, G., and Schatz, G. (1988). Biogenesis of mitochondria. *Annu Rev Cell Biol* 4, 289-333.
- Barrell, B.G., Bankier, A.T., and Drouin, J. (1979). A different genetic code in human mitochondria. *Nature* 282, 189-194.
- Bayona-Bafaluy, M.P., Acin-Perez, R., Mullikin, J.C., Park, J.S., Moreno-Loshuertos, R., Hu, P., Perez-Martos, A., Fernandez-Silva, P., Bai, Y., and Enriquez, J.A. (2003). Revisiting the mouse mitochondrial DNA sequence. *Nucleic Acids Res* 31, 5349-5355.
- Bayona-Bafaluy, M.P., Movilla, N., Perez-Martos, A., Fernandez-Silva, P., and Enriquez, J.A. (2008). Functional genetic analysis of the mammalian mitochondrial DNA encoded peptides: a mutagenesis approach. *Methods Mol Biol* 457, 379-390.
- Benard, G., Bellance, N., James, D., Parrone, P., Fernandez, H., Letellier, T., and Rossignol, R. (2007). Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *J Cell Sci* 120, 838-848.
- Bereiter-Hahn J, Jendrach M. (2010) Mitochondrial dynamics. *Int Rev Cell Mol Biol*. 284:1-65.

- Bianchi, C., Genova, M.L., Parenti Castelli, G., and Lenaz, G. (2004). The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly: kinetic evidence using flux control analysis. *J Biol Chem* 279, 36562-36569.
- Bibb, M.J., Van Etten, R.A., Wright, C.T., Walberg, M.W., and Clayton, D.A. (1981). Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell* 26, 167-180.
- Borisov, V.B. (2004). Mutations in respiratory chain complexes and human diseases. *Ital J Biochem* 53, 34-40.
- Brown, W.M., George, M., Jr., and Wilson, A.C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 1967-1971.
- Bruno, C., Santorelli, F.M., Assereto, S., Tonoli, E., Tessa, A., Traverso, M., Scapolan, S., Bado, M., Tedeschi, S., and Minetti, C. (2003). Progressive exercise intolerance associated with a new muscle-restricted nonsense mutation (G142X) in the mitochondrial cytochrome b gene. *Muscle Nerve* 28, 508-511.
- Cavalier-Eukaryotes with no mitochondria. *Nature* 326, 332-333.
- Smith, T. (1987).
- Cantatore, P., and Saccone, C. (1987). Organization, structure, and evolution of mammalian mitochondrial genes. *Int Rev Cytol* 108, 149-208.
- Carew, J.S., and Huang, P. (2002). Mitochondrial defects in cancer. *Mol Cancer* 1, 9.
- Clayton, D.A. (1982). Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* 28, 693-705.
- Cuezva, J.M., Krajewska, M., de Heredia, M.L., Krajewski, S., Santamaria, G., Kim, H., Zapata, J.M., Marusawa, H., Chamorro, M., and Reed, J.C. (2002). The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer Res* 62, 6674-6681.
- Chan, D.C. (2006). Mitochondrial Fusion and Fission in Mammals. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 22, 79-99.
- Chomyn, A., and Attardi, G. (2003). MtDNA mutations in aging and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 304, 519-529.
- D'Aurelio, M., Gajewski, C.D., Lenaz, G., and Manfredi, G. (2006). Respiratory chain supercomplexes set the threshold for respiration defects in human mtDNA mutant cybrids. *Hum Mol Genet* 15, 2157-2169.
- Diaz, F., Fukui, H., Garcia, S., and Moraes, C.T. (2006). Cytochrome c oxidase is required for the assembly/stability of respiratory complex I in mouse fibroblasts. *Mol Cell Biol* 26, 4872-4881.
- DiMauro, S., and Schon, E.A. (2003). Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med* 348, 2656-2668.
- Dudkina, N.V., Eubel, H., Keegstra, W., Boekema, E.J., and Braun, H.P. (2005). Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 3225-3229.
- Gadaleta, G., Pepe, G., De Candia, G., Quagliariello, C., Sbisà, E., and Saccone, C. (1989). The complete nucleotide sequence of the *Rattus norvegicus* mitochondrial genome: cryptic signals revealed by comparative analysis between vertebrates. *J Mol Evol* 28, 497-516.

- Gallardo, M.E., Moreno-Loshuertos, R., Lopez, C., Casqueiro, M., Silva, J., Bonilla, F., Rodriguez de Cordoba, S., and Enriquez, J.A. (2006). m.6267G>A: a recurrent mutation in the human mitochondrial DNA that reduces cytochrome c oxidase activity and is associated with tumors. *Hum Mutat* 27, 575-582.
- Genova, M.L., Bianchi, C., and Lenaz, G. (2005). Supercomplex organization of the mitochondrial respiratory chain and the role of the Coenzyme Q pool: pathophysiological implications. *Biofactors* 25, 5-20.
- Giles, R.E., Blanc, H., Cann, H.M., and Wallace, D.C. (1980). Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 6715-6719.
- Goffart, S., and Wiesner, R.J. (2003). Regulation and co-ordination of nuclear gene expression during mitochondrial biogenesis. *Exp Physiol* 88, 33-40.
- Goldring ES, Grossman LI, Krupnick D, Cryer DR, Marmur J. (1970) The petite mutation in yeast. Loss of mitochondrial deoxyribonucleic acid during induction of petites with ethidium bromide. *J Mol Biol.* Sep 14;52(2):323-35.
- Gray, M.W. (1989). Origin and evolution of mitochondrial DNA. *Annu Rev Cell Biol* 5, 25-50.
- Green, D.R., and Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305, 626-629.
- Griffin, E.E., Detmer, S.A., and Chan, D.C. (2006). Molecular mechanism of mitochondrial membrane fusion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research* 1763, 482-489.
- Hackenbrock CR, Chazotte B, Gupte SS. (1986) The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J Bioenerg Biomembr.* Oct;18(5):331-68.
- Hance, N., Ekstrand, M.I., and Trifunovic, A. (2005). Mitochondrial DNA polymerase gamma is essential for mammalian embryogenesis. *Hum Mol Genet* 14, 1775-1783.
- Hofhaus, G., Berneburg, M., Wulfert, M., and Gattermann, N. (2003). Live now–pay by ageing: high performance mitochondrial activity in youth and its age-related side effects. *Exp Physiol* 88, 167-174.
- Holt, I.J., Harding, A.E., and Morgan-Hughes, J.A. (1988). Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 331, 717-719.
- Inman, D. M., Sappington, R. M., Horner, P. J., and Calkins, D. J. (2006). Quantitative correlation of optic nerve pathology with ocular pressure and corneal thickness in the DBA/2 mouse model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47, 986-996.
- Johnson KR, Zheng QY, Bykhovskaya Y, Spirina O, Fischel-Ghodsian N. (2001). A nuclear-mitochondrial DNA interaction affecting hearing impairment in mice. *Nat Genet.* Feb;27(2):191-4.
- Kasamatsu, H., and Vinograd, J. (1974). Replication of circular DNA in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* 43, 695-719.

- Kelly, D.P., and Scarpulla, R.C. (2004). Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev* 18, 357-368.
- King, M.P., and Attardi, G. (1989). Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* 246, 500-503.
- Krebs, H.A. (1970). The history of the tricarboxylic acid cycle. *Perspect Biol Med* 14, 154-170.
- Kroemer, G., and Reed, J.C. (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 6, 513-519.
- Lamantea, E., Carrara, F., Mariotti, C., Morandi, L., Tiranti, V., and Zeviani, M. (2002). A novel nonsense mutation (Q352X) in the mitochondrial cytochrome b gene associated with a combined deficiency of complexes I and III. *Neuromuscul Disord* 12, 49-52.
- Lapunte-Brun, Esther Raquel Moreno-Loshuertos, Rebeca Acín-Pérez, Ana Latorre-Pellicer, Carmen Colás, Eduardo Balsa, Ester Perales-Clemente, Pedro M. Quirós, Enrique Calvo, M. A. Rodríguez-Hernández, Plácido Navas, Raquel Cruz, Ángel Carracedo, Carlos López-Otín, Acisclo Pérez-Martos, Patricio Fernández-Silva, Erika Fernández-Vizarra and José Antonio Enríquez. (2013). Assembly of respiratory supercomplexes determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science* (en prensa).
- Lenaz G. (2001) A critical appraisal of the mitochondrial coenzyme Q pool. *FEBS Lett.* Dec 7;509(2):151-5.
- Lenaz, G., and Genova, M.L. (2007). Kinetics of integrated electron transfer in the mitochondrial respiratory chain: random collisions vs. solid state electron channeling. *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C1221-1239.
- Mazat, J.P., Rossignol, R., Malgat, M., Rocher, C., Faustin, B., and Letellier, T. (2001). What do mitochondrial diseases teach us about normal mitochondrial functions... that we already knew: threshold expression of mitochondrial defects. *Biochim Biophys Acta* 1504, 20-30.
- Meeusen, S.L., and Nunnari, J. (2005). How mitochondria fuse. *Current Opinion in Cell Biology* 17, 389-394.
- Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191, 144-148.
- Mitchell, P., and Moyle, J. (1967). Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. *Nature* 213, 137-139.
- Montoya, J., Ojala, D., and Attardi, G. (1981). Distinctive features of the 5 terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs. *Nature* 290, 465-470.
- Moreno-Loshuertos, R., Acín-Pérez, R., Fernandez-Silva, P., Movilla, N., Perez-Martos, A., Rodriguez de Cordoba, S., Gallardo, M.E., and Enriquez, J.A. (2006). Differences in reactive oxygen species production explain the phenotypes associated with common mouse mitochondrial DNA variants. *Nat Genet* 38, 1261-1268.

- Nagley P, Linnane AW. (1970) Mitochondrial DNA deficient petite mutants of yeast. *Biochem Biophys Res Commun.* Jun 5;39(5):989-96.
- Ojala, D., Montoya, J., and Attardi, G. (1981). tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature* 290, 470-474.
- Pacheu-Grau David , Aurora Gómez-Durán, Manuel J. López-Pérez, Julio Montoya, Eduardo Ruiz-Pesini. (2010) Mitochondrial pharmacogenomics: barcode for antibiotic therapy. *Drug Discovery Today.* Vol. 15, Issues 1–2, Pages 33–39
- Petros, J.A., Baumann, A.K., Ruiz-Pesini, E., Amin, M.B., Sun, C.Q., Hall, J., Lim, S., Issa, M.M., Flanders, W.D., Hosseini, S.H., et al. (2005). mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 719-724.
- Pizzo P, Pozzan T. (2007) Mitochondria-endoplasmic reticulum choreography: structure and signaling dynamics. *Trends Cell Biol.* Oct;17(10):511-7.
- Renken C, Hsieh CE, Marko M, Rath B, Leith A, Wagenknecht T, Frank J, Mannella CA. (2009) Structure of frozen-hydrated triad junctions: a case study in motif searching inside tomograms. *J Struct Biol.* Feb;165(2):53-63.
- Rich, P. R. (1984). Electron and proton transfers through quinones and cytochrome bc complexes. *Biochim Biophys Acta* 768, 53-79.
- Robin, E. D., and Wong, R. (1988). Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *J Cell Physiol* 136, 507-513.
- Roubertoux PL, Sluyter F, Carlier M, Marcet B, Maarouf-Veray F, Chérif C, Marican C, Arrechi P, Godin F, Jamon M, Verrier B, Cohen-Salmon C. (2003). Mitochondrial DNA modifies cognition in interaction with the nuclear genome and age in mice. *Nat Genet.* 2003 Sep;35(1):65-9.
- Schafer, E., Seelert, H., Reifschneider, N.H., Krause, F., Dencher, N.A., and Vonck, J. (2006). Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem* 281, 15370- 15375.
- Schagger, H., de Coo, R., Bauer, M.F., Hofmann, S., Godinot, C., and Brandt, U. (2004). Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I. *J Biol Chem* 279, 36349-36353.
- Schagger, H., and Pfeiffer, K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *Embo J* 19, 1777-1783.
- Shadel, G. S., and Clayton, D. A. (1997). Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu Rev Biochem* 66, 409-435.
- Stroh, A., Anderka, O., Pfeiffer, K., Yagi, T., Finel, M., Ludwig, B., and Schagger, H. (2004). Assembly of respiratory complexes I, III, and IV into NADH oxidase supercomplex stabilizes complex I in *Paracoccus denitrificans*. *J Biol Chem* 279, 5000-5007.
- Sutovsky, P., Moreno, R.D., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C., and Schatten, G. (1999). Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature* 402, 371-372.
- Szewczyk A, Wojtczak L. (2002) Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacol Rev.* Mar;54(1):101-27.

- Trifunovic, A. (2006). Mitochondrial DNA and ageing. *Biochim Biophys Acta* 1757, 611-617.
- Trifunovic, A., Hansson, A., Wredenberg, A., Rovio, A.T., Dufour, E., Khvorostov, I., Spelbrink, J.N., Wibom, R., Jacobs, H.T., and Larsson, N.G. (2005). Somatic mtDNA mutations cause aging phenotypes without affecting reactive oxygen species production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 17993-17998.
- Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J.N., Rovio, A.T., Bruder, C.E., Bohlooly, Y.M., Gidlof, S., Oldfors, A., Wibom, R., et al. (2004). Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 429, 417-423.
- Vempati UD, Han X, Moraes CT. (2009). Lack of cytochrome c in mouse fibroblasts disrupts assembly/stability of respiratory complexes I and IV. *J Biol Chem.* Feb 13;284(7):4383-91.
- Wallace, D.C. (1999). Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283, 1482-1488. Wallace, D.C., Brown, M.D., and Lott, M.T. (1999). Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene* 238, 211-230.
- Wiesner, R. J., Ruegg, J. C., and Morano, I. (1992). Counting target molecules by exponential polymerase chain reaction: copy number of mitochondrial DNA in rat tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 183, 553-559.
- Wolstenholme, D. R. (1992). Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *Int Rev Cytol* 141, 173-216.
- Wurm CA, Jakobs S. (2006) Differential protein distributions define two sub-compartments of the mitochondrial inner membrane in yeast. *FEBS Lett.* Oct 16;580(24):5628-34.
- Zeviani, M., and Antozzi, C.(1997).Mitochondrial disorders. *Mol Hum Reprod* 3,133148.
- Zhang, Y., and Chan, D.C. (2007). New insights into mitochondrial fusion. *FEBS Lett.* May 22;581(11):2168-73.

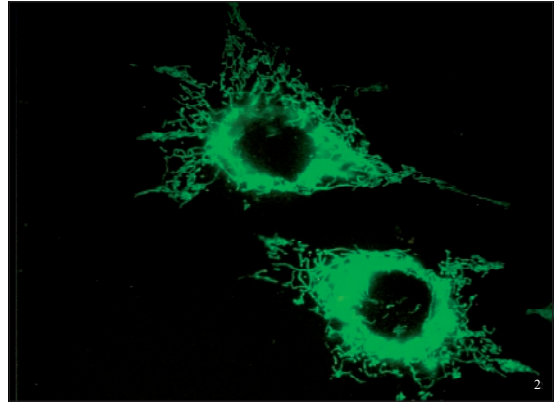
CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES MITOCONDRIAL,
UNA NUEVA VISION



ACISCLO PEREZ MARTOS

6 FEBRERO 2013

1

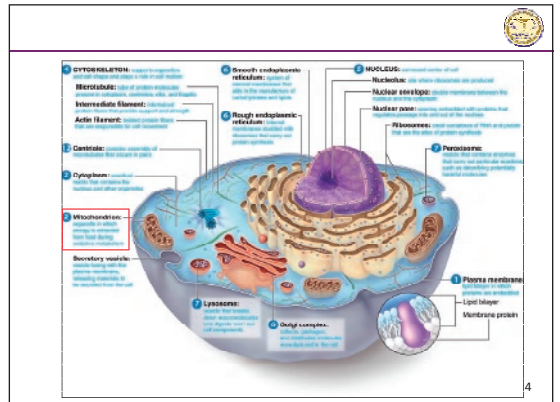


2

Contenido

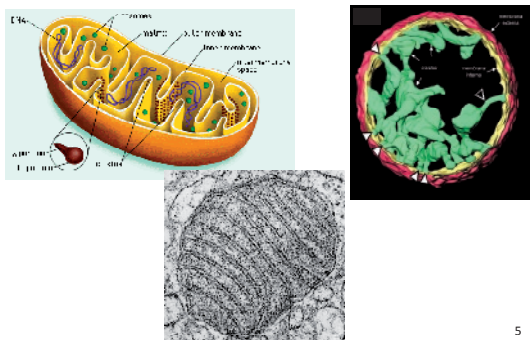
- 1 MITOCONDRIA – energética, estructura y función
- 2 CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES
- 3 CARACTERISTICAS DEL mtDNA
- 4 ESTUDIOS DE GENETICA FUNCIONAL – modelos celulares y animales
- 5 MUTACIONES EN CYT b – caracterización, análisis de ensamblaje de complejos
- 6 SUPERCOMPLEJOS RESPIRATORIOS
- 7 NUEVA PROPUESTA DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES

3



4

1 MITOCONDRIA



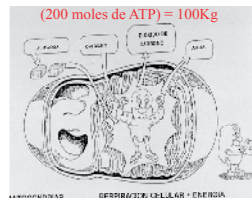
5

1 MITOCONDRIA

- ¿Se podría construir una maquina con estas características?
- Combustible Glucosa y oxígeno
 - Potencia 80W
 - Productos de deshecho CO_2 y H_2O
 - Temperatura 37°C (constante)
 - Presión 1atm (constante)

!!! Y QUE SEA COMESTIBLE!!!

(200 moles de ATP) = 100Kg



6

3 CADENA TRANSPORTE ELECTRONES

nADN

mtADN

¿100 proteínas?

13 proteínas

13

3 CARACTERÍSTICAS DNA MITOCONDRIAL (mtDNA)

El mtDNA es una molécula de doble hebra circular. Sin intrones
16.569 pares de bases. 37 genes. 2rRNA. 22 tRNA. 13 Proteínas

1 del Complejo 3

2 del complejo V

3 Del complejo IV

7 del Complejo I

14

3 CARACTERÍSTICAS DNA MITOCONDRIAL (mtDNA)

Posee un código genético propio

Diferencias entre los códigos genéticos

Nuclear

Mitocondrial

First letter	Second letter	Third letter	Amino acid
U	U	U	Phe
U	U	C	Leu
U	U	A	Leu
U	U	G	Leu
U	C	U	Phe
U	C	C	Pro
U	C	A	Pro
U	C	G	Pro
U	A	U	Tyr
U	A	C	Tyr
U	A	A	Tyr
U	A	G	Tyr
U	G	U	Cys
U	G	C	Cys
U	G	A	Cys
U	G	G	Cys
C	U	U	Pro
C	U	C	Leu
C	U	A	Leu
C	U	G	Leu
C	C	U	Pro
C	C	C	Pro
C	C	A	Pro
C	C	G	Pro
C	A	U	Tyr
C	A	C	Tyr
C	A	A	Tyr
C	A	G	Tyr
C	G	U	Cys
C	G	C	Cys
C	G	A	Cys
C	G	G	Cys
A	U	U	Phe
A	U	C	Leu
A	U	A	Leu
A	U	G	Leu
A	C	U	Pro
A	C	C	Pro
A	C	A	Pro
A	C	G	Pro
A	A	U	Tyr
A	A	C	Tyr
A	A	A	Tyr
A	A	G	Tyr
A	G	U	Cys
A	G	C	Cys
A	G	A	Cys
A	G	G	Cys
G	U	U	Phe
G	U	C	Leu
G	U	A	Leu
G	U	G	Leu
G	C	U	Pro
G	C	C	Pro
G	C	A	Pro
G	C	G	Pro
G	A	U	Tyr
G	A	C	Tyr
G	A	A	Tyr
G	A	G	Tyr
G	G	U	Cys
G	G	C	Cys
G	G	A	Cys
G	G	G	Cys

15

3 CARACTERÍSTICAS DNA MITOCONDRIAL (mtDNA)

El número de copias de mtDNA varía con el tipo de célula
El mtDNA se hereda únicamente a través de la línea materna

20 mitocondrias

100,000 mitocondrias

16

3 CARACTERÍSTICAS DNA MITOCONDRIAL (mtDNA)

Tasa de mutación 10 veces superior al nDNA

A.- Mutaciones neutras
Variabilidad

B.- Mutaciones patológicas
Enfermedades mitocondriales

1953

2003

17

3 CARACTERÍSTICAS DNA MITOCONDRIAL (mtDNA)

El mtDNA no es manipulable "in vivo":

- No se pueden transformar mitocondrias
- No se puede realizar mutagénesis dirigida.

+

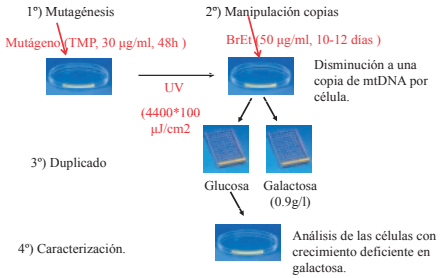
El mtDNA de una especie es incompatible con el nDNA de otra.

Dificultad en la generación de modelos celulares y animales para estudios de genética funcional y de las patologías mitocondriales

18



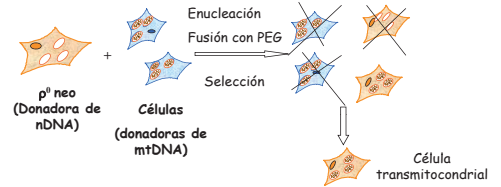
Generación y aislamiento de líneas celulares con mutaciones en su mtDNA



19



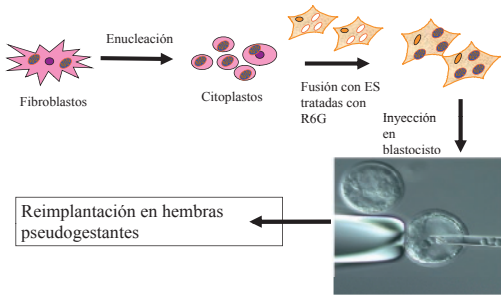
¡¡¡PODEMOS TRANSFERIR MITOCONDRIAS ENTERAS!!!



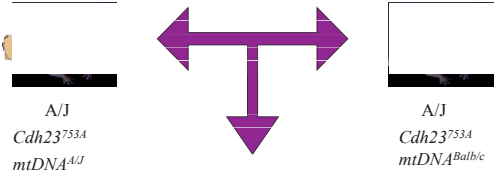
20



Inyección de células ES portadoras de la mutación en blastocisto



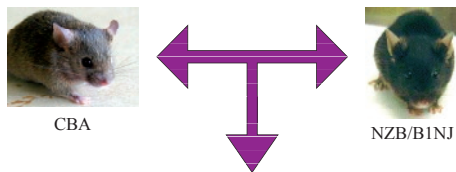
21



- *Cdh23*^{733A} causa sordera asociada a la edad
- mtADN A/J en A/J desarrolla sordera mas joven
- mtDNA Balb/c en A/J desarrolla sordera mas tarde

Johnson et al Nat Gen 27:191-194 (2001)

22



- CBA es "más listo" que NZB/B1NJ
- mtADN NZB/B1NJ en CBA lo vuelve MENOS listo
- mtADN CBA en NZB/B1NJ lo vuelve MAS listo

Roubertoux et al Nat Gen 35:65-69 (2003)

23



SIN PATOLOGIA



24



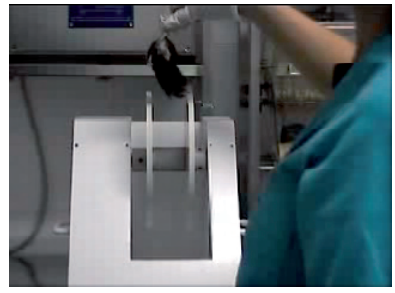
10% mtDNA mutado



25



80% mtDNA mutado



26



Colección de células mutantes

Complex	Gen	Phenotype protein	Phenotype Complex
III	cyt b	Cyt b ko	III

27



FENOTIPOS EN PACIENTES CON MUTACIONES EN CYT b



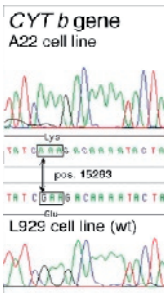
Ensayos Bioquímicos:	CI	III	CIV	CV
Pacientes tipo A	+	-	+	
Pacientes tipo B	-	-	+	

“La mayoría de los pacientes descritos cursan con intolerancia al ejercicio y la mutación solo se encuentra en músculo”

28



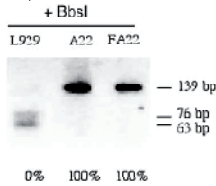
CARACTERIZACIÓN DE LA MUTACION DEL CYT b



Molecular Cell, Vol. 13, 805-815, March 28, 2004. Copyright ©2004 by Cell Press

Respiratory Complex III Is Required to Maintain Complex I in Mammalian Mitochondria

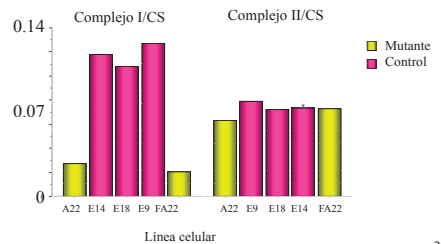
Rebeca Acán-Pérez,^{1,2} María Pilar Bayona-Bafalluy,^{1,2,4} Patricia Fernández-Sáez,¹ Roque Moreno-Loshuertos,¹ Acisclo Pérez-Martos,¹ Claudio Brana,¹ Carlos T. Moraes,¹ and José A. Enriquez^{1*}



29



A22 SE COMPORTA BIOQUÍMICAMENTE COMO LOS PACIENTES TIPO B

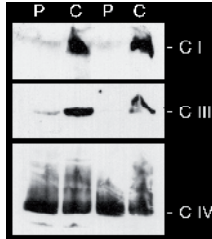


30



ANÁLISIS DEL ENSAMBLAJE DE LOS COMPLEJOS

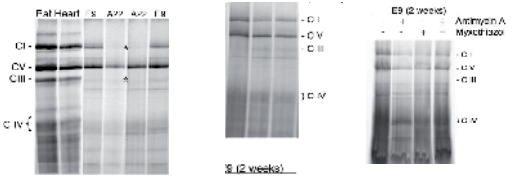
EL C I NO ESTÁ ENSAMBLADO EN MÚSCULOS DE PACIENTES QUE NO ENSAMBLAN EL C III



31



ANÁLISIS DEL ENSAMBLAJE DE LOS COMPLEJOS



LA ASUENCIA FÍSICA DEL C III AFECTA AL ENSAMBLAJE DEL C I

LA ASUENCIA DE ACTIVIDAD DEL C III NO AFECTA AL ENSAMBLAJE DE C I

32

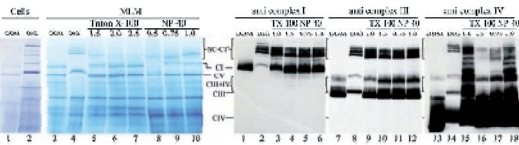


Molecular Cell Article

LA FORMACIÓN DE SUPERCOMPLEJOS NO DEPENDE DEL DETERGENTE EMPLEADO PARA EXTRAERLOS

Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes

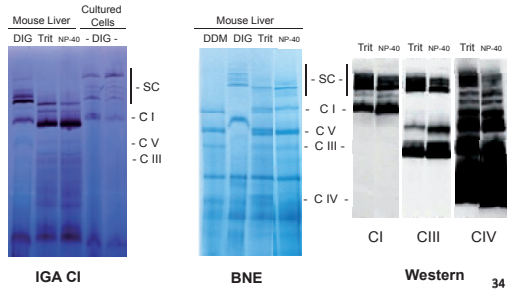
Rebeca Acín-Pérez,¹ Patricia Fernández-Silva,¹ María Luisa Peleato,¹ Acisclo Pérez-Martos,¹ and Jose Antonio Enriquez^{2,*}
¹Departamento de Bioquímica, Universidad de Zaragoza, Miguel Servet, 177, 50013 Zaragoza, Spain
²Correspondence: enriquez@unizar.es
 DOI:10.1016/j.molcel.2008.10.021



33



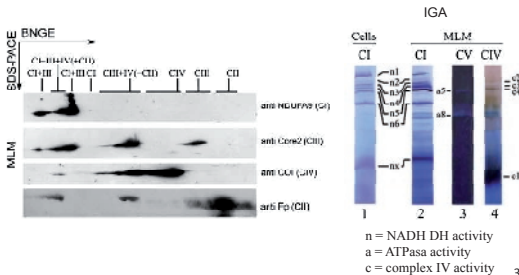
LA FORMACIÓN DE SUPERCOMPLEJOS NO DEPENDE DEL DETERGENTE EMPLEADO PARA EXTRAERLOS



34



IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LOS SUPERCOMPLEJOS



35



SI LAS BANDAS DE SC SON VERDADERAS ESTRUCTURAS *IN VIVO* DEBERÁN CUMPLIR LAS SIGUIENTES CONDICIONES:

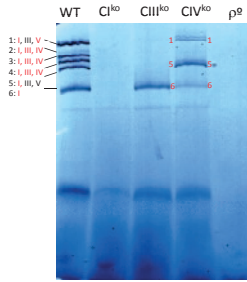
- A Ser totalmente dependientes de la presencia de los complejos individuales
- B Su formación debe ser posterior a la de los complejos individuales.
- C Los supercomplejos deberían contener CoQ y Cyt c
- D Deberán ser capaces de transferir electrones entre ellos y desde el NADH al O₂

36

6 SUPERCOMPLEJOS RESPIRATORIOS



A Ser totalmente dependientes de la presencia de los complejos individuales



Método: supercomplejos en células sin:

- Complejo I: ND4 ko
- Complejo III: Cyt b ko
- Complejo IV: COI ko

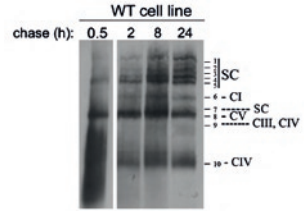
Actividad de NADH Deshidrogenasa

37

6 SUPERCOMPLEJOS RESPIRATORIOS



B Su formación debe ser posterior a la de los complejos individuales



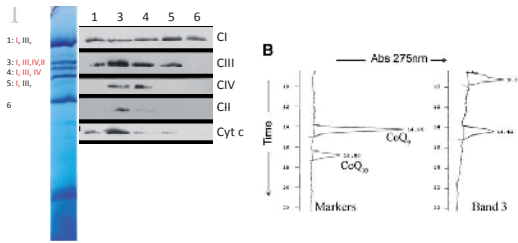
Marcaje metabólico.
Experimento de pulso – caza

38

6 SUPERCOMPLEJOS RESPIRATORIOS



C Los supercomplejos deberían contener CoQ y Cyt c

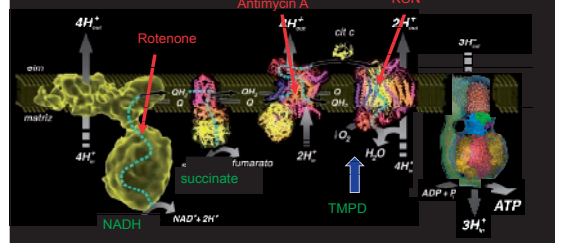


La presencia del citocromo c se realiza por inmunodetección

La presencia de CoQ puede ser investigada por HPLC

39

RESPIRATORY ACTIVITY OF SUPERCOMPLEXES



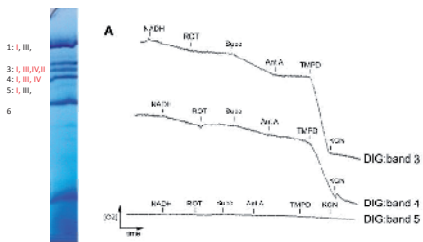
ATPase movie created by Said Samuaga in collaboration with John Walker and Andrew Leslie.

40

6 SUPERCOMPLEJOS RESPIRATORIOS



D Deberán ser capaces de transferir electrones entre ellos y desde NADH al O₂

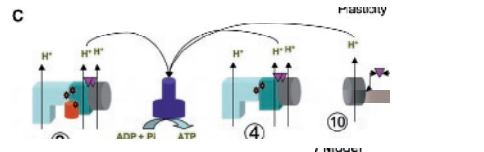


41

7 NUEVA VISIÓN DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES

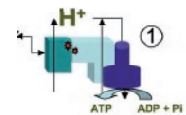


Rich, P. R. (1984). Electron and proton transfers through quinones and cytochrome bc complexes. *Biochim Biophys Acta* 768, 53-79.



Lenaz, G. (2001) A critical appraisal of the mitochondrial coenzyme Q pool. *FEBS Lett.* Dec 7, 509(2):151-5.

Lenaz, G., and Genova, M.L. (2007). Kinetics of integrated electron transfer in the mitochondrial respiratory chain: random collisions vs. solid state electron channeling. *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C1221-1239.



42

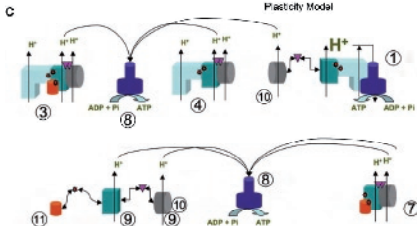


Molecular Cell

Article

Molecular Cell 32, 529–539, November 21, 2008

Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes

Rebeca Acín-Pérez,¹ Patricio Fernández-Silva,¹ María Luisa Peleato,¹ Acisclo Pérez-Martos,¹ and José Antonio Enriquez^{1,2*}

Cox7a21 = SCAFI (Supercomplexes Assembly Factor)

43



Assembly of respiratory supercomplexes determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain

Esther Lapuente-Brunz², Raquel Moreno-Loshuertos²† Rebeca Acín-Pérez¹, Ana Latorre-Pellicer¹, Carmen Colás¹, Eduardo Balsal^{1,3}, Ester Perales-Clemente¹, Pedro M. Quirós⁵, Enrique Calvo¹, M. A. Rodríguez-Hernández⁴, Plácido Navas⁴, Raquel Cruz⁶, Ángel Carracedo⁶, Carlos López-Otín⁵, Acisclo Pérez-Martos², Patricio Fernández-Silva², Erika Fernández-Vizarra⁷ and José Antonio Enriquez^{1, 2 *} (EN PRENSA)

