

Fisiopatología de la deficiencia en CoQ. Evaluación de terapias con la mitocondria como diana terapéutica.



Grupo de Investigación CTS-101
Comunicación Intercelular
Instituto de Biotecnología
Centro de Investigación Biomédica
Parque Tecnológico Ciencias de la Salud
Departamento de Fisiología
Facultad de Medicina

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Laura García Corzo

2014

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Laura García Corzo
D.L.: GR 1028-2014
ISBN: 978-84-9028-980-8

Certificaciones

D. LUIS CARLOS LÓPEZ GARCÍA, Investigador Ramón y Cajal de la Universidad de Granada,

CERTIFICA QUE D^a. **Laura García Corzo**, Licenciada en Biología, ha realizado bajo su dirección y en el Departamento de Fisiología e Instituto de Biotecnología de la Universidad de Granada, el trabajo titulado: “**Fisiopatología de la deficiencia en CoQ. Evaluación de terapias con la mitocondria como diana terapeutica**” reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 10 Diciembre de 2013

Vº Bº Director



Luis Carlos López García

La interesada



Laura García Corzo

D. DARÍO ACUÑA CASTROVIEJO, Catedrático de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada,

CERTIFICA QUE D^a. **Laura García Corzo**, Licenciada en Biología, ha realizado bajo su dirección y en el Departamento de Fisiología e Instituto de Biotecnología de la Universidad de Granada, el trabajo titulado: “**Fisiopatología de la deficiencia en CoQ. Evaluación de terapias con la mitocondria como diana terapeutica**” reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 10 Diciembre de 2013

Vº Bº Director



Darío Acuña Castroviejo

La interesada



Laura García Corzo

Dña. Germaine Escames, Profesora titular de fisiología de la Universidad de Granada,

CERTIFICA QUE D^a. **Laura García Corzo**, Licenciada en Biología, ha realizado bajo su dirección y en el Departamento de Fisiología e Instituto de Biotecnología de la Universidad de Granada, el trabajo titulado: “**Fisiopatología de la deficiencia en CoQ. Evaluación de terapias con la mitocondria como diana terapéutica**” reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 10 Diciembre de 2013

Vº Bº Director



Germaine Escames

La interesada



Laura García Corzo

A mi familia

Agradecimientos

No puedo creer que “ya” haya llegado este momento. El momento decisivo en el que hay que demostrar y plasmar todos los conocimientos y resultados obtenidos. El ansiado, pero nunca esperado, momento de escribir la tesis doctoral. Y una vez terminado puedo decir que ha sido un verdadero placer hacerlo y ver inmortalizado el esfuerzo y duro trabajo realizado durante estos años. Esto no hubiera sido posible sin el Dr. Dario Acuña-Castroviejo y a la Dra. Germaine Escames, a los que tengo que agradecer la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación así como la disciplina y entusiasmo, necesarios para recorrer de buena forma el camino de la ciencia. Agradecer también de forma muy especial a Luis Carlos López por elegirme para iniciar este ambicioso proyecto y con ello inculcarme valores como la disciplina, tenacidad y afán de superación. Por mostrarme, que tanto en la ciencia como en la vida la perseverancia, la paciencia y la motivación son armas muy valiosas que te permiten conseguir cualquier cosa que te propongas. Puedo decir que además de ser un inmejorable instructor ha sido amigo. Gracias por mostrarme el fascinante mundo de la CoQ.

Además de ellos, no puedo olvidar a todos mis compañeros de laboratorio, a los que están y a los que se fueron, que han dado un color especial a este duro camino. A mi compañera Marta, mi “Alter-Ego”, mi Gin, mi Zape que decir más que no denoten estos calificativos, que ha sido un placer en primer lugar trasmitirte mis conocimientos y luego compartir contigo estos dos años tan intensos. A mis niñas, Caro, y las “Elenas” gracias por vuestro cariño, apoyo y complicidad. A los niños, Huayqui, Roberto, Santos, Roberto Vergano así como al nuevo fichaje, Jose por poner una nota de color y alegría en el día a día. A Irina, por sus consejos y disciplina haciendo nuestras vidas más ordenadas.

Tampoco puedo olvidar a aquellos que se fueron pero siempre formaran parte de mi vida por la amistad brindada como Anilla, Francis, Carmen, Melquiades, Eric y Araceli.

De forma importante resaltar que esta aventura me permitió conocer a una persona muy especial, que ha estado ahí en el transcurso del camino. Gracias Alberto por tu cariño, comprensión y apoyo, tanto en los buenos como en los malos momentos.

Mencionar también a todos aquellos amigos fuera del laboratorio que han escuchado y seguido atentamente todos mis acontecimientos.

Y todo esto no hubiera sido posible sin mi familia, especialmente mis padres. Ellos me han enseñado todos los valores de la vida permitiéndome ser la persona que soy. También agradecerles todo el apoyo y ánimo que me han dado en los momentos más duros y que sin duda hacen que hoy me sienta orgullosa de dedicarles esta tesis doctoral.

No puedo terminar estos agradecimientos sin antes mencionar los laboratorios del Dr. Jose Antonio Enriquez (CNIC), la Dra. Margaret Sedensky y Dr. Philip Morgan (Seattle Children's Hospital) dándome la oportunidad de seguir creciendo tanto científica como personalmente.

Finalmente, agradezco a la Red Española de Envejecimiento y Fragilidad y a la Universidad de Granada por el apoyo económico a las actividades formativas durante esta etapa predoctoral.

Contratos
&
Proyectos

A. Contratos predoctorales:

- **Tipo de contrato:** A tiempo parcial desde 1/1/2011-31/12/2013
- **Organismo:** Universidad de Granada
- **Centro:** Centro de Investigación Biomédica
- **Dept.:** Fisiología

B. Proyectos de investigación:

- **Título del proyecto:** Mouse model of coq deficiency: pathogenesis and treatment
Entidad de realización: Universidad de Granada
Investigador/es responsable/es: López LC; García-Corzo L; Luna-Sanchez M
Número de investigadores/as: 3
Entidad/es financiadora/s: Marie Curie International Reintegration Grant
Tipo de entidad: Fundación
Fecha de inicio: 01/2009 **Fecha fin:** 31/10/2013
- **Título del proyecto:** Fisiopatología y tratamiento de la deficiencia en Coenzima Q
Entidad de realización: Universidad de Granada
Investigador/es responsable/es: López LC; García-Corzo L; Luna-Sanchez M
Número de investigadores/as: 3
Entidad/es financiadora/s: CEIBioTic Granada Tipo de entidad: Universidad
Fecha de inicio: 01/05/2012 **Fecha fin:** 31/12/2012
- **Título del proyecto:** Modelos de ratón con deficiencia primaria en ubiquinona: caracterización y aproximaciones terapéuticas

Entidad de realización: Universidad de Granada

Investigador/es responsable/es: Luis Carlos López García; Laura García Corzo

Número de investigadores/as: 2

Entidad/es financiadora/s: Ministerio de Ciencia e Innovación. Investigación

Fecha de inicio: 01/01/2009

Fecha fin: 31/12/2012

- **Título del proyecto:** Studying the nephrotic syndrome associated to CoQ deficiency

Entidad de realización: Universidad de Granada

Investigador/es responsable/es: López LC; García-Corzo L; Luna-Sanchez M

Número de investigadores/as: 3

Entidad/es financiadora/s: Universidad de Granada

Fecha de inicio: 01/07/2011

Fecha fin: 30/06/2012

Publicaciones
&
Comunicaciones

Publicaciones científicas relacionadas con esta tesis

- García-Corzo L; Luna-Sanchez M; Doerrier C; Ortiz F; Escames G; Acuña-Castroviejo D; López LC. **Ubiquinol-10 ameliorates mitochondrial encephalopathy associated to CoQ deficiency.** *Enviado.*
- López LC; Venegas C; Cabrera-Vique C; García-Corzo L; Luna-Sanchez M; Acuña-Castroviejo D; Escames G. **Argan oil-contained antioxidants for human mitochondria.** *Nat Prod Commun* 2013; 8 (1): 47-50.
- García-Corzo L; Luna-Sanchez M; Doerrier C; García JA; Guarás A; Acín-Perez R; Bullejos-Peregrín J; López A; Escames G; Enriquez JA; Acuña-Castroviejo D; López LC. **Dysfunctional Coq9 Protein Causes Predominant Encephalomyopathy Associated to CoQ Deficiency.** *Human Molecular Genetics* 2013; 15;22 (6): 1233-48.
- Venegas C; Cabrera-Vique C; García-Corzo L; Escames G; Acuña-Castroviejo D; López LC. **Determination of coenzyme q(10), coenzyme q(9), and melatonin contents in virgin argan oils: comparison with other edible vegetable oils.** *Journal of Agricultural and food chemistry* 2011; 23;59(22):12102-8.

Otras publicaciones

- Ortiz F; Acuña-Castroviejo D; Doerrier C; Dayoub JC; Lopez LC; Venegas C; Vergano-Villodres R; Garcia-Corzo L; Garcia JA; Volt H; Luna-Sanchez M; Escames G. **Melatonin blunts the mitochondrion/NLRP3 connection and protects against radiation-induced oral mucositis development.** Cancer research. epub ahead of print, 2013.
- Venegas C; García JA; Escames G; Ortiz F; López A; Doerrier C; García-Corzo L; López LC; Reiter RJ; Acuña-Castroviejo D. **Extrapineal melatonin: analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations.** Journal of Pineal Research 2012; 52(2): 217-27.
- Escames G; López LC; García JA; García-Corzo L; Ortiz F; Acuña-Castroviejo D. **Mitochondrial DNA and inflammatory diseases.** Human Genetics 2012; 131(2): 161-73.
- Acuña-Castroviejo D; Carretero M; Doerrier C; López LC; García-Corzo L; Tresguerres JA; Escames G. **Melatonin protects lung mitochondria from aging.** Age 2012; 34(3): 681-92.
- Garcia JJ; Escames G; López A; García JA; García L; Acuña-Castroviejo D; García JJ; López LC. **The role of mitochondria in the aging brain and the effects of melatonin.** Current Neuropharmacology 2010; 8(3): 182-93.
- Carretero M; Escames G; López LC; Venegas C; Dayoub JC; García L; Acuña-Castroviejo D. **Long-term melatonin administration protects brain mitochondria from aging.** Journal of Pineal Research 2009; 47(2): 192-200.

Comunicaciones en congresos relacionados con esta tesis

- García-Corzo L, Luna-Sánchez M, Santos JA, Guarás A, Acín-Pérez R, Enríquez JA, Acuña-Castroviejo D, López LC. **A NEW INSIGHT ABOUT MOLECULAR ASPECTS OF COQ DEFICIENCY.** *The seventh conference of the international Coenzyme Q association 2012.*
- García-Corzo L, Luna-Sánchez M, Santos JA, Guarás A, Acín-Pérez R, Escanes G, Enríquez JA, Acuña-Castroviejo D, López LC. **UNSTABLE MITOCHONDRIAL SUPERCOMPLEXES CONTRIBUTES TO THE PATHOPHYSIOLOGY OF COQ DEFICIENCY SYNDROME.** *Joint FEPS and the Spanish Physiological Society Scientific Congress 2012.*
- García-Corzo L, Luna-Sánchez M, Santos JA, Guarás A, Acín-Pérez R, Enríquez JA, Acuña-Castroviejo D, López LC. **A NEW INSIGHT ABOUT MOLECULAR ASPECTS OF COQ DEFICIENCY.** *MIPsummer 2012: 5th MIP summer school. FEBS Workshop.*
- Garcia-Corzo L, Dorrier C, Venegas C, Escamez G, Acuña castroviejo D, López LC. **GENERATION OF A MOUSE MODEL OF COENZYME Q DEFICIENCY.** *European meeting on mitochondrial pathology (EUROMIT 8)2011.*

Abreviaturas

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

4-HB: 4-hidroxibenzoato	GFAP: Proteína ácida fibrilar glial
4-HNE: 4-hidroxinonenal	H&E: Hematoxilina-eosina
8-OHdG: 8-hidroxideoxiguanosina	HAB: 3-hexaprenil 4-aminobenzoato
ADN: Ácido desoxirribonucleico	HHB: 3-hexaprenil 4-hidroxibenzoato
ADNc: Ácido desoxirribonucleico copia	HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución
ADP: Adenosina difosfato	HPLC-EQ: Cromatografía líquida de alta resolución con detector electroquímico
ATP: Adenosina trifosfato	KCN: Cianuro potásico
BNGE: Blue native gel electroforesis	KO: Knock-out
BSA: Albúmina de suero bovino	LFB: Luxol fast blue
CABC1: Chaperona del complejo bc ₁	Mg⁺²: Magnesio
CoQ: Coenzima Q	NADH: Dinucleótido de nicotinamida adenina
CoQH₀: semiquinona	NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
CoQH₂: Ubiquinol	NBT: Nitroblue Tetrazolium
CPT: Camptotecina CTE: Cadena de transporte de electrones	pABA: ácido para-aminobenzoico
DMQ: Demetoxiubiquinona	PAS: Ácido Periódico de Schiff
ETF-DH: flavoproteína deshidrogenasa de transferencia de electrones	PDSS1: Prenildifosfato sintasa - subunidad 1
FAD: flavin adenín nucleótido	PDSS2: Prenildifosfato sintasa - subunidad 2

PTPm: Poro de transición de la permeabilidad mitocondrial

PVDF: Polifluoruro de vinilideno

RCR: Ratio de control respiratorio

RXR: Receptor reinoide X

SAM/Adomet: S-adenosimetionina

SC: Supercomplejo

Índice

Introducción	1
1. COENZIMA Q: DESCUBRIMIENTO E HISTORIA.	3
2. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LA COQ.	4
3. BIOSÍNTESIS Y DISTRIBUCION DE LA COQ.	6
3.1. PROTEÍNAS QUE INTERVIEN EN LA RUTA BIOSINTÉTICA DE LA COQ.	7
3.1.1. Coq1p.	7
3.1.2. Coq2p.	9
3.1.3. Coq3p.	10
3.1.4. Coq4p.	10
3.1.5. Coq5p.	11
3.1.6. Coq6p.	12
3.1.7. Coq7p.	13
3.1.8. Coq8p.	14
3.1.9. Coq9p.	15
3.1.10. Teoría del complejo multiproteico de biosíntesis de CoQ.	15
3.2. DISTRIBUCIÓN DE LA CoQ.	17
3.2.1. Localización a nivel de membrana.	17
3.2.2. Localización a nivel celular.	17
4. FUNCIONES DE LA COQ.	18
4.1. TRANSPORTADOR EN LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL (CTE).	19
4.2. PROTEÍNAS DESACOPLANTES.	19
4.3. PORO DE TRANSICIÓN DE PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL (PTPm).	21
4.4. ESTRÉS OXIDATIVO Y FUNCIÓN ANTIOXIDANTE.	21
4.5. OTRAS FUNCIONES CELULARES:	23
5. DEFICIENCIA EN CoQ.	24

5.1. MECANISMOS PATOLÓGICOS ASOCIADOS A LA DEFICIENCIA EN COQ: ESTUDIOS EXPERIMENTALES.	26
5.2. TRATAMIENTO EXPERIMENTAL DE LA DEFICIENCIA EN COQ.	30
6. TERAPIAS EN PACIENTES DEFICIENTES EN COQ.	31
Hipótesis y objetivos	35
Material y métodos	39
1. GENERACIÓN DEL RATÓN KNOCK-IN R239X PARA EL GEN <i>Coq9</i>.	41
2. ANIMALES Y GRUPOS EXPERIMENTALES.	43
3. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE COQ₉ Y COQ₁₀.	44
3.1. Extracción de las quinonas contenida en tejidos y plasma.	44
3.2. Extracción de las quinonas en mitocondrias aisladas.	44
3.3. Cuantificación de los componentes quinónicos.	45
4. Análisis de metabolitos intermediarios mediante cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas (MS/MS).	46
5. EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN Y/O ESTABILIDAD DE LOS SC POR BNGE.	47
5.1. Aislamiento de fracción mitocondrial de tejidos de ratón.	47
5.2. Preparación del gel de “Blue Native” de primera dimensión (1D).	48
5.3. Preparación de las muestras para Blue Native Gel Electroforesis.	48
5.4. Electroforesis desnaturalizante.	49
5.5. Transferencia e inmunodetección.	50

5.6. Ensayo de Actividad NADH Deshidrogenasa en Gel o “In Gel Activity”.	50
6. <i>PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y ANÁLISIS DE WESTERN-BLOT.</i>	51
7. <i>MEDIDA DE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL.</i>	52
8. <i>HISTOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA.</i>	55
9. <i>DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO INTRAMITOCONDRIAL DE LOS NUCLEÓTIDOS ADENÍLICOS.</i>	56
10. <i>ACTIVIDADES DE LA CTE DEPENDIENTES DE COQ.</i>	58
11. <i>CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.</i>	58
12. <i>ANÁLISIS ESTADÍSTICO.</i>	59

Resultados _____ **61**

1. <i>GENERACIÓN DEL RATÓN KNOCK-IN R239X PARA EL GEN Coq9.</i>	63
2. <i>LA PROTEÍNA DISFUNCIONAL Coq9, LA CUAL REGULA A Coq7, PRODUCE UNA DEFICIENCIA GENERALIZADA EN COQ.</i>	63
3. <i>LOS RATONES Coq9^{XX} MANIFIESTAN SEÑALES CLÍNICAS DE ENCEFALOMIOPATÍA.</i>	69
4. <i>LOS DEFECTOS EN LA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL SE RELACIONAN CON EL FENOTIPO ENCEFALOMIOPÁTICO EN RATONES Coq9^{XX}.</i>	78
5. <i>ESTRÉS OXIDATIVO EN CEREBRO DE LOS RATONES Coq9^{XX}.</i>	85
6. <i>EL DEFICIT ENERGÉTICO EN LAS NEURONAS ACTIVA LA APOPTOSIS POR LA VÍA CASPASA-INDEPENDIENTE.</i>	87

7. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON UBIQUINONA-10 Y UBIQUINOL-10 DURANTE 2 MESES SOBRE DISTINTOS PARÁMETROS.	90
7.1. NIVELES DE CoQ₁₀ EN SUERO Y TEJIDOS.	90
7.2. NIVELES DE COQ Y FUNCIÓN MITOCONDRIAL DE RATONES <i>Coq9^{XX}</i>.	91
7.3. ACTIVIDAD DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL Y SUPERCOMPLEJOS EN CEREBRO DE RATONES <i>Coq9^{XX}</i>.	93
7.4. CUADRO HISTOPATOLÓGICO Y DAÑO OXIDATIVO EN CEREBRO DE <i>Coq9^{XX}</i>.	93
8. PESO CORPORAL.	97
Discusión	105
1. LA PROTEÍNA <i>Coq9</i> CAUSA ENCEFALOMIOPATÍA ASOCIADA A LA DEFICIENCIA EN CoQ. CARACTERIZACIÓN DE UN NUEVO MODELO ANIMAL.	107
2. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON UBIQUINONA-10 Y UBIQUINOL-10 SOBRE LA ENCEFALOPATÍA MITOCONDRIAL ASOCIADA A DEFICIENCIA EN CoQ.	115
Conclusiones	125
Bibliografía	129
Anexos	157
Apéndice	165

Introducción

1. COENZIMA Q: DESCUBRIMIENTO E HISTORIA.

La Coenzima Q (ubiquinona o CoQ) fue aislada por primera vez en 1955 a partir de fracción insaponificable de mucosa intestinal de caballo y cerdo (Festenstein et al., 1955). Dos años mas tarde, Crane y colbs. (Crane et al., 1989) la aislaron a partir de mitocondrias de corazón de ternera y caracterizaron su presencia y función en la cadena respiratoria mitocondrial. En 1958, Wolf (Wolf et al., 1958) determinó su estructura, como un lípido inusual formado por un anillo de benzoquinona con actividad redox conectado a una larga cadena isoprenoide con inserción específica dentro de las membranas biológicas (Turunen et al., 2004). En 1961, Mitchell incluyó a la CoQ en su "teoría quimiosmótica" por su papel en la respiración celular, teoría por la cual recibió el Premio Nobel de Química en 1978.

Los trabajos realizados en los primeros años tras su descubrimiento fueron dirigidos al estudio de la función redox, mientras que el estudio de la actividad antioxidante cogió mayor auge a partir de la década de los 90. Inicialmente, la capacidad de síntesis y distribución de la CoQ era sólo atribuido a la membrana mitocondrial interna, lugar donde se realizaba la unica función conocida hasta el momento, esto es, transportar los electrones del complejo I y II al complejo III en la CTE.

En 1969 se corroboró la importancia de este lípido con los estudios de Ernster y colbs en partículas submitocondriales. En ellos observaron la activación y reactivación de la actividad de la NADH y

Introducción

succinato deshidrogenasa cuando se deplecionaban y reincorporaban las quinonas a las partículas submitocondriales (Ernster et al., 1969).

Estudios posteriores han descrito otras funciones asociadas a sistemas redox en membranas extramitocondriales (Crane and Navas, 1997; Santos-Ocana et al., 1998; Sun et al., 1992; Villalba et al., 1995).

2. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LA COQ.

La CoQ o 2,3-dimetoxi-5-metil-6-poliprenil-1,4-benzoquinona es un molécula lipofílica formada por un anillo de benzoquinona hidroxilado en las posiciones 1,4 unido a una cadena lateral isoprenoide, que le confiere el carácter hidrofóbico así como la solubilidad en solventes polares, siendo más soluble cuanto menos grupos isoprenos formen la cadena (

Figura 1).

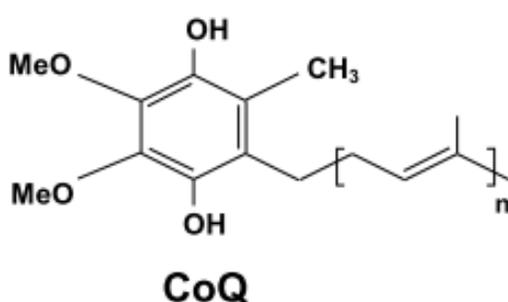


Figura 1. Estructura química de la CoQ

En la naturaleza existen distintos tipos de CoQ en función de:

- El número de moléculas isopentenilo que componen la cadena lateral. La longitud de la cadena isoprenoide varía según la

Introducción

especie. La razón de esta variabilidad inter-especie aún no se conoce, pero encontramos cadenas con 6 unidades (CoQ₆) en *Sacharomyces cerevisiae*, 8 unidades (CoQ₈) en *Escherichia coli*, 9 unidades (CoQ₉) en *Caenorabditis elegans* y 10 unidades (CoQ₁₀) en *Schizosaccharomyces pombe*. Sin embargo, también podemos encontrar especies que contienen distintas variedades como CoQ₉ y CoQ₁₀ en roedores, humanos y zebrafish o CoQ₇, CoQ₈, CoQ₉ y CoQ₁₀ en *Pneumocystis*.

- En función del estado de oxidación en que se encuentra en las membranas (**Figura 2**). En el estado totalmente oxidado se denomina ubiquinona (CoQ) que posee dos grupos cetos en posición *para*. La adición de un protón y un electrón origina la forma semiquinona (CoQH[•]). La adición del segundo protón y electrón origina la forma totalmente reducida, el ubiquinol (CoQH₂) que presenta dos grupos hidroxilos.

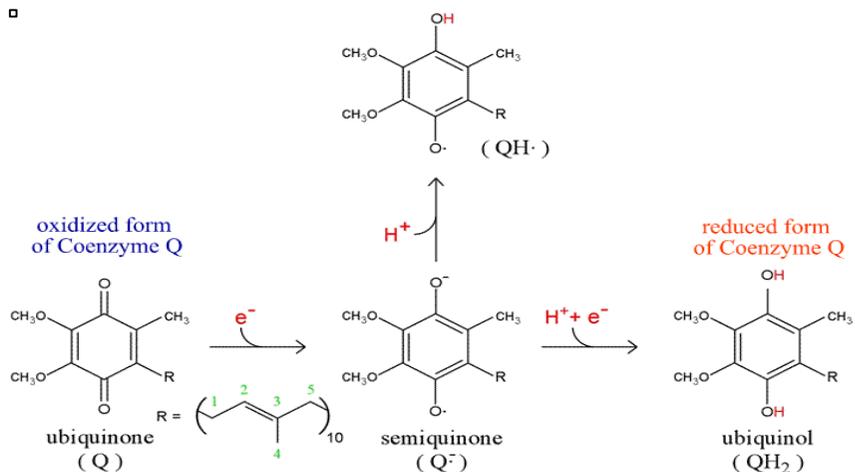


Figura 2. Estado de oxidación de las quinonas.

3. BIOSÍNTESIS Y DISTRIBUCION DE LA COQ.

La ruta biosintética de la CoQ se ha caracterizado parcialmente mediante la identificación de intermediarios biosintéticos acumulados en cepas de mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* deficientes en CoQ (Turunen et al., 2004). En la actualidad se conocen al menos once genes (*COQ1-COQ9*, *YAH1* y *ARH1*) que codifican proteínas implicadas en la biosíntesis de la CoQ en levaduras (Tran and Clarke, 2007). La función de muchas de estas proteínas en eucariotas es análoga a la de levaduras y, por consiguiente, es conocida, mientras otras como Coq4p, Coq6p y Coq9p permanecen con función desconocida.

La biosíntesis de CoQ comienza con la formación del ácido hidroxibenzoico al que se le une una cola lipofílica poliisoprenoide. El precursor aromático del anillo de benzoquinona es el 4-hidroxibenzoato (4-HB) derivado de la tirosina o fenilalanina. Por otro lado, la cadena poliisoprenoide se forma por la adición de moléculas de isopentenil difosfato, procedentes de la ruta del mevalonato, al farnesil o geranil-geranil difosfato en múltiples pasos catalizados por la poliprenil difosfato sintasa o Coq1 (Grunler et al., 1994) (**Figura 3**).

Una vez sintetizada la cadena poliisoprenoide, ésta se condensa con el 4-HB mediante una reacción de condensación catalizada por la PHB-poliprenil transferasa o Coq2p, originando una molécula intermediaria denominada ácido 3-hexaprenil-4-hidroxibenzoico (HHB) (en *S. Cerevisiae*). El orden en el que suceden las siguientes reacciones de modificación del anillo aromático es

Introducción

especulativo. Para este fin, se dan una serie de reacciones catalizadas por al menos seis enzimas, las cuales llevan a cabo reacciones de metilación, descarboxilación e hidroxilación para generar finalmente la molécula de CoQ.

3.1. PROTEÍNAS QUE INTERVIEN EN LA RUTA BIOSINTÉTICA DE LA COQ.

3.1.1. Coq1p.

En *S. cerevisiae*, la Coq1p o trans-poliprenil difosfato sintasa está codificada por el gen *COQ1* (Ashby and Edwards, 1990). La enzima cataliza la formación de la cadena poliisoprenoide siendo responsable de la longitud específica en distintas especies. (Okada et al., 1996). En *Schizosaccharomyces pombe*, ratones y humanos COQ1 es un heterotretámero compuesto por dos subunidades, PDSS1 y PDSS2 (Saiki et al., 2005; Saiki et al., 2003), mientras que en *S. cerevisiae* o *Arabidopsis thaliana* es un homo-oligómero (Jun et al., 2004). Estudios con fraccionamiento submitocondrial en *S. cerevisiae* han demostrado que la Coq1p se encuentra periféricamente asociada con la membrana mitocondrial interna en el lado de la matriz (Gin and Clarke, 2005).

En eucariotas se cree que, de todas las proteínas implicadas en la biosíntesis de la ubiquinona, es la única que presenta diferencias respecto a las estudiadas en *S. cerevisiae* (Kawamukai, 2002; Okada et al., 2004). Este enzima pertenece a la familia de trans-prenil transferasa de clase III que producen cadenas largas poliprenoides a

Introducción

diferencia de la clase I y II que producen cadenas cortas y medias. Sin embargo, existe gran homología entre las distintas isoprenil difosfato sintasas presentes en eucariotas, ya que su secuencia de aminoácidos contiene siete regiones altamente conservadas (Wang and Ohnuma, 2000).

3.1.2. Coq2p.

La Coq2p o 4-HB: polipreniltransferasa es una enzima clave que cataliza el enlace covalente entre el anillo 4-HB y la cadena poliisoprenoide, generando el primer intermediario de unión a membrana, el HHB. En *S. cerevisiae* y en *Homo sapiens*, esta enzima la codifica un gen denominado *COQ2* (Ashby et al., 1992; Forsgren et al., 2004). En otros eucariotas se han aislado y caracterizado una serie de ortólogos/homólogos (Ohara et al., 2006; Okada et al., 2004; Uchida et al., 2000). Ensayos *in vitro* en hígado de ratas demostraron que su actividad está presente sólo en mitocondrias (Momose and Rudney, 1972), si bien recientemente se ha identificado actividad polipreniltransferasa catalizada por la proteína Ubiad1 en el aparato de Golgi (Mugoni et al., 2013). La especificidad de Coq2p parece no verse afectada por la longitud de la cadena poliisoprenoide (Ashby et al., 1992; Gin and Clarke, 2005; Okada et al., 2004) pero sí por la concentración de Mg^{2+} en extractos puros de levadura (Ashby et al., 1992). Mediante estudios *in vitro* se ha demostrado que el polipéptido es importado y procesado en su totalidad dentro de la mitocondria (Leuenberger et al., 1999). Esta proteína se comporta como una proteína integral de membrana asociada a la membrana mitocondrial interna del lado de la matriz.

3.1.3. Coq3p.

Estudios *in vitro* con análogos sintéticos farnesilados han demostrado que esta enzima codificada por el gen *COQ3* cataliza dos pasos de O-metilación en la ruta biosintética (Poon et al., 1999). El gen *COQ3* fue originalmente identificado en *S. cerevisiae* (Clarke et al., 1991) por su habilidad para restaurar la biosíntesis de CoQ y la respiración en un mutante Coq3p denominado C39 (Sippel et al., 1983; Tzagoloff et al., 1975). Los homólogos de este gen, aislados en mamíferos y plantas (Avelange-Macherel and Joyard, 1998; Marbois et al., 1994), codifican proteínas cuya secuencia de aminoácidos contienen cuatro regiones conservadas en una gran familia de enzimas metiltransferasas que usan S-adenosimetionina (SAM or AdoMet) como donador de metilo (Kagan and Clarke, 1994; Niewmierzycka and Clarke, 1999). Estudios *in vitro* (Hsu et al., 1996) y de localización subcelular (Poon et al., 1999) muestran que la Coq3p se sintetiza como una pre-proteína que es importada (posee una secuencia de reconocimiento de mitocondria en el extremo N-terminal) y procesada en la mitocondria en una vía dependiente del potencial de membrana. Estudios de fraccionamiento subcelular demuestran que se trata de una proteína periférica asociada a la matriz del lado de la membrana interna mitocondrial (Poon et al., 1999).

3.1.4. Coq4p.

Proteína codificada por el gen *COQ4* y que se localiza en la matriz pegada a la membrana mitocondrial interna (Belogrudov et al., 2001). Aunque su función a día de hoy es desconocida, se ha

Introducción

especulado que podría funcionar como una hidroxilasa o carboxilasa para cualquiera de los pasos de la ruta biosintética en los que no se ha identificado la enzima catalítica (denominados como “Coq?” en la **Figura 3**). Su secuencia aminoacídica, compuesta por 335 aminoácidos, no comparte homología con otros dominios proteicos de actividad conocida. Al igual que Coq3p, contiene una secuencia de reconocimiento de importación a mitocondria.

Diversos hallazgos apuntan que Coq4p podría tener un papel estructural en el complejo multiproteico de biosíntesis de CoQ (Marbois et al., 2005). Un hecho muy significativo es la disminución de los niveles de Coq3p y Coq7p en mutantes nulos de *coq4* y recuperación de los mismos en mutantes puntuales *coq4-1* (Belogradov et al., 2001). Además, se ha observado la co-migración de su polipéptido nativo junto a Coq3p, Coq6p y Coq7p como un complejo de alto peso molecular, sugiriendo su papel estructural en el complejo multiproteico de biosíntesis de CoQ (Marbois et al., 2005; Tran et al., 2006).

3.1.5. Coq5p.

Ensayos de fraccionamiento submitocondrial han demostrado que Coq5p o 2-metoxi-6-poliprenil-1,4-benzoquinona metiltransferasa se localiza en la matriz pegada a la membrana mitocondrial interna (Baba et al., 2004), donde cataliza el único paso de C-metilación en la ruta biosintética de la CoQ, generando el intermediario 2-metoxi-5-metil-6-poliprenil-1,4-benzoquinona. En *S. cerevisiae* es codificada por el gen *COQ5*, el cual fue aislado de una librería de DNA genómico de levadura por su capacidad para restaurar la respiración en dos

Introducción

mutantes puntuales de Coq5p; *coq5-1* y *coq5-2* (Barkovich et al., 1997; Dibrov et al., 1997). Estudios genéticos muestran que el gen *COQ5* contiene cuatro regiones comunes a las proteínas de la familia AdoMet-metiltransferasas (Katz et al., 2003) y que su expresión aumenta por la presencia de glicerol y ácido oleico (Hagerman et al., 2002; Hagerman and Willis, 2002). Estudios *in vitro* con analógos farnesilados mostraron que el reconocimiento del sustrato no depende de la longitud de la cadena poliisoprenoide, y que, además, su función C-metiltransferasa es esencial para la formación del 2-metoxi-5-metil-6-poliprenil-1,4-benzoquinona. La generación del mutante nulo y mutantes puntuales de Coq5p (Lee et al., 1997) muestran que esta proteína es fundamental para la estabilidad y actividad de Coq3p y Coq4p, proporcionando evidencia de la existencia de un complejo multiproteico de biosíntesis de CoQ en levaduras.

3.1.6. Coq6p.

Proteína codificada por el gen *COQ6* y que es esencial para el crecimiento de levaduras en fuentes de carbono no fermentables (Gin et al., 2003). Cuando se sintetiza, se importa a la mitocondria de forma dependiente del potencial de membrana, para situarse periféricamente junto a la membrana mitocondrial interna en el lado de la matriz (Gin et al., 2003). Estudios previos en levaduras predijeron que el gen *COQ6* codifica para una monooxigenasa dependiente de flavina debido a que su estructura contiene una región de unión al ribitol del FAD muy conservada en una familia de hidroxilasas aromáticas de unión al FAD y NADPH (Tran and Clarke, 2007).

Introducción

Recientemente, se ha descubierto en *S. cerevisiae* que la Coq6 está involucrada exclusivamente en la C5-hidroxilación del HHB o 3-hexaprenil 4-aminobenzoato (HAB) pero no en la C1 o C6 hidroxilación posteriores en la biosíntesis de la CoQ (Ozeir et al., 2011). Esta función se realiza a través de una ruta inusual mediada por la ferredoxina Yah1 y ferredoxina reductasa Arh1 que suministra la fuente de electrones. Además, el uso de análogos sintéticos del 4-HB hidroxilados restaura tanto los niveles de CoQ como la respiración de mutantes Coq6 (Ozeir et al., 2011).

3.1.7. Coq7p.

En *S. cerevisiae* esta proteína, codificada por el gen *COQ7/CAT5* (Marbois and Clarke, 1996; Tzagoloff and Dieckmann, 1990) y caracterizada como una mono-oxigenasa está involucrada en el penúltimo paso de la biosíntesis de la CoQ. Este gen también se ha estudiado en otras especies denominándose *clk-1* en *C.elegans*, *Mclk1* o *Coq7* en ratones, *UbiF* en bacterias y *COQ7* en humanos. Pertenece a la familia de oxidasas de unión a hierro conteniendo una secuencia conservada “EXXH” de unión a ligandos de hierro (Stenmark et al., 2001). La proteína que codifica posee una localización interfacial en la membrana mitocondrial interna (Berthold and Stenmark, 2003; Stenmark et al., 2001) y cataliza la hidroxilación de la Demetoxiquinona (DMQ) a 5-hidroxiquinona.

Estudios recientes en levaduras muestran que la actividad de Coq7p podría verse regulada por los ciclos de fosforilación a la que se encuentre sometida. En ellos, el estado no fosforilado de Coq7p resultó en un incremento del contenido de CoQ₆, mientras el estado

Introducción

fosfomimético dio lugar a una disminución de los niveles del lípido (Martin-Montalvo et al., 2011). En otro estudio reciente, se ha identificado la proteína Ptc7, como una fosfatasa mitocondrial que interactúa con Coq7p para activar la biosíntesis de la CoQ y el metabolismo respiratorio, así como la función antioxidante (Martin-Montalvo et al., 2013).

3.1.8. Coq8p.

El gen *COQ8* fue inicialmente identificado como *CABC1* (Chaperona del complejo bc₁) por su habilidad para suprimir parcialmente el defecto de traducción del citocromo b debido a la mutación cbs-223 en el gen *CBS2*. Por ello, se propuso que podría funcionar como una chaperona para el citocromo b y, por la tanto, ser necesario para la función del complejo bc₁ (Brasseur et al., 1997). La disminución de la actividad bc₁ en mutantes para el gen *COQ8* sugiere por otro lado la participación de esta proteína en la biosíntesis de CoQ (Rodel, 1986). De hecho, levaduras mutantes de Coq8p no producen CoQ₆ y como consecuencia de ello son incapaces de crecer sobre una fuente de carbono no fermentable. La adición exógena de CoQ₆ rescata este defecto en el crecimiento.

Aunque su función bioquímica en la biosíntesis de Q es aún desconocida, la proteína Coq8/CAbc1 (Adck3) ha sido clasificada como una kinasa al ser identificadas cuatro regiones conservadas de la familia de las kinasas atípicas en su secuencia aminoacídica (Leonard et al., 1998). También existen evidencias de que puede actuar como regulador de la biosíntesis de CoQ, ya que su sobreexpresión en levaduras rescata a los mutantes de coq9 (Johnson et

Introducción

al., 2005), a los mutantes nulos de *coq10* (Barros et al., 2005) y restaura los niveles de CoQ₆ en mutantes nulos de *coq7* (Padilla et al., 2009). Otros estudios muestran que el estado fosforilado de la proteína Coq3p, necesario para la asociación con otras Coq en el complejo multiproteico de alto peso molecular, es dependiente de Coq8p. Por lo tanto, Coq8p parece ser fundamental para la formación del complejo multiproteico de biosíntesis de CoQ (Sippel et al., 1983).

3.1.9. Coq9p.

Proteína codificada por el gen *COQ9* identificado y caracterizado por Johnson y cols. (Johnson et al., 2005) como necesario en la biosíntesis de CoQ. Sin embargo, la función de la proteína Coq9p aún no se conoce y su estructura no guarda homología con otras proteínas de función conocida. Tras estudios de movilidad electroforética en geles SDS-PAGE se ha observado que posee un peso molecular de 25 kDa, (Hsieh et al., 2007) y un pequeño precursor que constituye una secuencia diana de mitocondria. (Johnson et al., 2005). Estudios con localización submitocondrial en *S.cerevisiae* demostraron que la Coq9p se encuentra periféricamente asociada con la membrana mitocondrial interna en el lado de la matriz (Hsieh et al., 2007).

3.1.10. Teoría del complejo multiproteico de biosíntesis de CoQ.

De acuerdo a los resultados en levaduras y bacterias, las enzimas requeridas para la biosíntesis de CoQ se organizan en un complejo multiproteico (**Figura 4**). Esta organización permitiría la canalización de metabolitos intermediarios, aumentaría la eficiencia

Introducción

catalítica y proporcionaría mecanismos para la regulación coordinada de sus componentes. Uno de los datos que apoyan la existencia del complejo multiproteico es que los mutantes nulos en *coq3-coq9* acumulan predominantemente HHB, el producto de *Coq2p* que se forma en los primeros pasos de la ruta, y no el sustrato de la reacción que catalizan. Además, los niveles basales de las proteínas *Coq3p*, *Coq4p*, *Coq6p*, *Coq7p* y *Coq9p* están disminuidos en mitocondrias aisladas de otros mutantes nulos (Hsu et al., 2000). Además, la mayoría de estas proteínas comparten una secuencia consenso de importación a la mitocondria para alcanzar una localización periférica en la membrana mitocondrial interna (Hartl et al., 1989; Neupert, 1997).

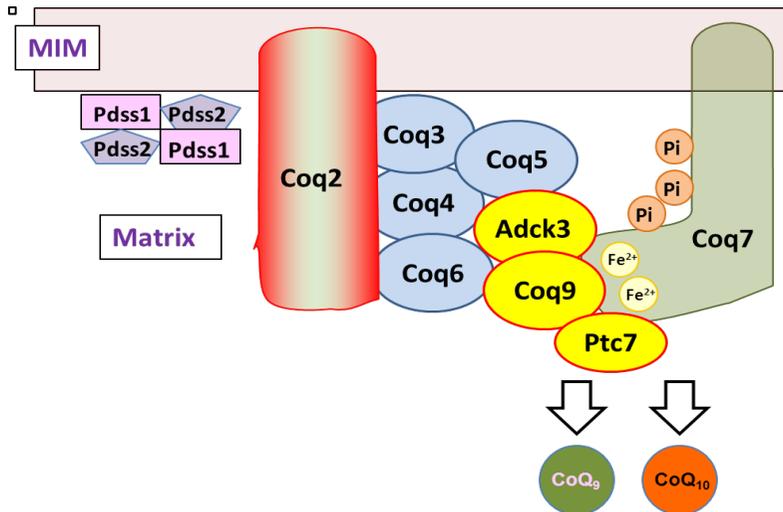


Figura 4. Imagen hipotética del complejo multiproteico de biosíntesis de CoQ

3.2. DISTRIBUCIÓN DE LA CoQ.

3.2.1. Localización a nivel de membrana.

Una vez sintetizados los lípidos de la ruta del mevalonato, incluida la ubiquinona, éstos van a tomar distintas posiciones intramembranas que serán responsables de las propiedades de la membrana. La cadena lateral poliisoprenoide de la ubiquinona se sitúa en la región central hidrofóbica de la bicapa lipídica. Se piensa que esta posición desestabiliza la membrana promoviendo un aumento de la fluidez y permeabilidad de la misma.

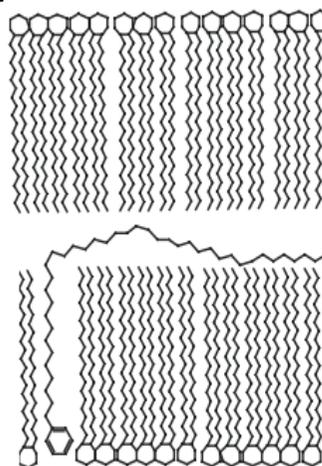


Figura 5. Localización de la CoQ en la membrana

Por otro lado, el anillo de benzoquinona queda expuesto en la cara interna o externa de la membrana, dependiendo de su requerimiento funcional.

3.2.2. Localización a nivel celular.

La ubiquinona se localiza principalmente en la membrana mitocondrial interna junto con el resto de componentes de la cadena de transporte de electrones, donde realiza su función de transporte electrones. Además, está presente en todas las membranas celulares como la membrana plasmática y endomembranas (Kalen et al., 1987;

Introducción

Takahashi et al., 1993), indicando su implicación en múltiples funciones celulares.

La presencia de la CoQ en membranas extramitocondriales sugiere la existencia de mecanismos ligados a membranas de síntesis y/o distribución. Este hecho se apoya en el hallazgo de actividad enzimática en retículo endoplasmático, aparato de Golgi y peroxisomas (Kovacs et al., 2002; Tekle et al., 2002). Sin embargo, la existencia de secuencias de reconocimiento mitocondrial en genes implicados en la biosíntesis y sus productos localizados en mitocondrias pero no en otros orgánulos, indica que la biosíntesis de la CoQ se completa en la mitocondria y desde allí es transportada a otras membranas (Baba et al., 2004; Belogradov et al., 2001; Jiang et al., 2001). Un estudio realizado en células humanas (HL-60) corroboró esta idea, administrando un precursor de la CoQ₁₀ y CoQ₉ marcada radioactivamente para observar los mecanismos de distribución de la CoQ₁₀ endógena y la CoQ₉ exógena. El estudio concluyó que la primera localización de la CoQ endógena se da en la mitocondria y que mediante una vía sensible a Brefeldina A se distribuye a otras membranas extramitocondriales. Por otro lado, la CoQ exógena se incorpora a la fracción endolisosomal y se transporta posteriormente a la mitocondria siguiendo la vía mencionada anteriormente (Fernandez-Ayala et al., 2005)

4. FUNCIONES DE LA COQ.

Una vez son sintetizadas las moléculas de CoQ, ocupan su lugar en las membranas celulares para cumplir diferentes funciones.

4.1. TRANSPORTADOR EN LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL (CTE).

La CoQ es un componente esencial de la cadena respiratoria mitocondrial. Se localiza en la membrana mitocondrial interna donde actúa como transportador de electrones desde el complejo I (NADH-ubiquinona oxidoreductasa.) y complejo II (Succinato-ubiquinona oxidoreductasa) hasta el complejo III (Ubiquinol citocromo c oxidoreductasa) (**Figura 6**). Esta transferencia de electrones se ve favorecida por la formación de estructuras macromoleculares llamadas supercomplejos mitocondriales, en los que la CoQ es un componente esencial (Acin-Perez et al., 2008). Su participación permite un flujo de electrones desde el NADH o el succinato hasta el oxígeno molecular acoplado a un flujo de protones hacia el espacio intermembrana que genera un gradiente electroquímico, el cual es aprovechado por la ATP sintasa para la síntesis de ATP.

4.2. PROTEÍNAS DESACOPLANTES.

Existen algunas evidencias que apuntan a que la CoQ pueda tener otras funciones que no están directamente relacionadas con la cadena de transporte de electrones. Una de ellas es la de funcionar como cofactor en la actividad de las proteínas desacoplantes (abreviado "UCP", del inglés "uncoupling protein"). Éstas son proteínas localizadas en la membrana mitocondrial interna que translocan H^+ desde el espacio intermembrana a la matriz mitocondrial. Por ello, y haciendo alusión a su nombre, desacoplan el gradiente de protones

Introducción

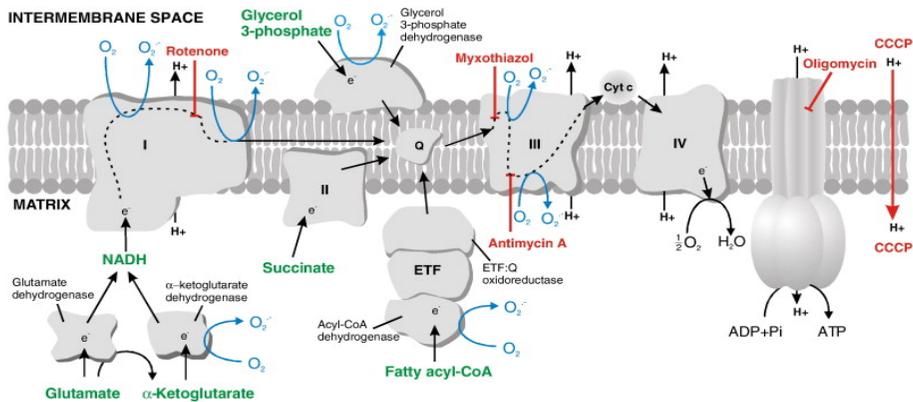


Figura 6. Participación de la CoQ en la CTE (Tahara et al., 2009).

(generado en la cadena respiratoria) de la fosforilación oxidativa, liberando la energía en forma de calor sin producción de ATP. Este mecanismo es usado por los mamíferos en la grasa parda para mantener la temperatura corporal en situaciones de bajas temperaturas (Nedergaard et al., 2001). Pues bien, Echtay y cols. mostraron que la CoQ es un cofactor obligatorio para las UCPs sobreexpresando distintos tipos de UCPs en liposomas de *E.coli*. Los liposomas eran incapaces de transportar H⁺ en ausencia de CoQ y el transporte era reactivado al añadir CoQ a las membranas en presencia de ácidos grasos. Además, la longitud de la cadena y el estado de oxidación de la CoQ es importante para la activación del transporte, siendo menos efectivo las CoQ de cadena corta (Echtay et al., 2001; Echtay et al., 2000). Sin embargo, estos estudios iniciales del papel de la CoQ en la función de las UCPs dieron pie a otros posteriores en cultivos celulares que pusieron en duda el papel fisiológico de la CoQ en la actividad de las UCPs (Esteves et al., 2004; Jaburek and Garlid, 2003).

4.3. PORO DE TRANSICIÓN DE PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL (PTPm).

El gradiente electroquímico, generado durante la transferencia de electrones en la membrana mitocondrial interna, es mantenido por la baja permeabilidad de las membranas a iones y solutos. El paso de moléculas a través de la membrana interna parece ser regulado por una serie de canales y transportadores iónicos que en conjunto se denomina PTPm y que se trata de un canal voltaje-dependiente y sensible al Ca^{2+} que juega un papel clave en la apoptosis (Green and Reed, 1998).

Varios estudios han demostrado que la longitud de la cola isoprenoide de los análogos de CoQ (Fontaine et al., 1998; Walter et al., 2002; Walter et al., 2000) modula la permeabilidad del PTPm. De esta forma la CoQ_{10} , con una cadena larga de isoprenos previene de la apertura del canal, evitando la despolarización del potencial de membrana, depleción de ATP, activación de la caspasa-9 con la liberación del citocromo c y la fragmentación del ADN en queratinocitos bajo estímulos apoptóticos (Papucci et al., 2003).

4.4. ESTRÉS OXIDATIVO Y FUNCIÓN ANTIOXIDANTE.

La mayor parte del consumo de oxígeno mitocondrial está acoplado a la síntesis de ATP, mientras que un pequeño porcentaje (alrededor del 1-2%) forma especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés “reactive oxygen species”) al reaccionar con el oxígeno electrones que se escapan de la CTE. Estas ROS pueden funcionar como señalizadores intracelulares a concentraciones fisiológicas pero en condiciones fisiopatológicas, donde hay una alta producción de

Introducción

ROS, éstos reaccionan con diferentes biomoléculas como ADN, proteínas y lípidos, oxidándolos y ocasionando daños celulares en un proceso conocido como estrés oxidativo.

Para contrarrestar un aumento de estrés oxidativo, se activan una serie de sistemas antioxidantes celulares que previenen o reparan el daño causado. Estos antioxidantes se clasifican en enzimáticos como la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa, tioredoxin reductasa y peroxiredoxina (Holmgren and Bjornstedt, 1995; Wood et al., 2003) o no enzimáticos como vitamina C y E, carotenoides, glutatión, α -ácido lipoico, flavonoides, melatonina y CoQH₂ (Chahbouni et al., 2010; Ibrahim et al., 1997; Kling et al., 2013; Schulz et al., 2000). Además, la célula adopta diferentes estrategias como respuesta al estrés oxidativo; una de ellas es incrementar la transferencia de electrones a través de la membrana plasmática (del Castillo-Olivares et al., 2000; May and Qu, 1999) o bien mantener la CoQ en su estado reducido.

La CoQ reducida de la membrana plasmática es un potente antioxidante que protege los lípidos frente al daño oxidativo y mantiene otros antioxidantes en sus formas reducidas (Beyer, 1994; Kagan et al., 1990). Estudios *in vitro* realizado en partículas submitocondriales, han revelado que el ubiquinol es capaz de inhibir la peroxidación (Takayanagi et al., 1980) pero aún no es bien establecido si la CoQ es capaz de prevenir la peroxidación lipídica en el resto de membranas celulares (Ernster and Dallner, 1995). Diversos estudios enfocados a conocer su mecanismo de acción sugieren que CoQH₂ actúa a nivel de la iniciación de la peroxidación lipídica impidiendo la

Introducción

formación del radical peroxil (LOO) en contraposición a la vitamina E que actúa depurando estos radicales (**Figura 7**).

Otros estudios también muestra como la CoQH₂ puede prevenir de la oxidación a proteínas (Forsmark-Andree et al., 1995; Forsmark-Andree et al., 1996), como también al ADN, tanto *in vitro* como *in vivo* (Ernster and Dallner, 1995; Tomasetti et al., 1999).

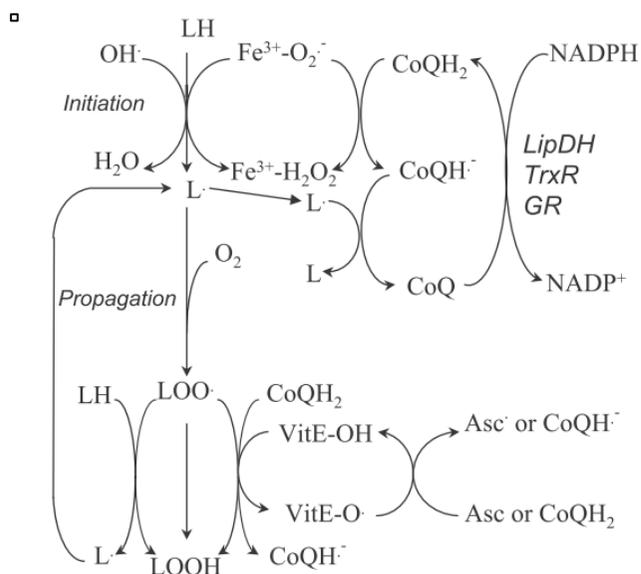


Figura 7. Función antioxidante de la CoQ (Turunen et al., 2004).

4.5. OTRAS FUNCIONES CELULARES:

La membrana plasmática de la mayoría de las células contienen NADH oxidasas dependientes de CoQ, la cuales regulan el ratio citosólico de $NAD^+/NADH$, la reducción del ascórbido y el crecimiento y diferenciación celular (Bentinger et al., 2010). Se ha descrito también que la CoQ actúa como aceptor de electrones en la reacción

Introducción

catalizada por la dihidroorotato deshidrogenasa dentro de la ruta de síntesis *de novo* de pirimidinas (Jones, 1980). Además, la oxidación de la CoQ por la CTE es necesaria para la β -oxidación por la flavoproteína ubiquinona oxidoreductasa (EC 1.5.5.1), para transportar equivalentes de reducción desde el citoplasma a la glicerol fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.99.5), para el metabolismo de la glicina por la colina deshidrogenasa (EC 1.1.99.1), metabolismo de la prolina y arginina por la prolina deshidrogenasa (EC 1.5.99.8) así como la asimilación del sulfuro por la sulfide CoQ reductasa (EC 1.8.99.1).

5. DEFICIENCIA EN CoQ.

La importancia de las funciones que desempeña la CoQ en la mitocondria la convierten en una molécula vital, cuyo déficit causa un síndrome mitocondrial con un cuadro clínico heterogéneo.

Ogasahara y cols. (Ogasahara et al., 1989) describieron los primeros casos de deficiencia en CoQ en dos hermanos que tras un desarrollo temprano normal mostraron intolerancia al ejercicio y debilidad muscular en las piernas. A los cinco años de edad ambos presentaron mioglobinuria y afectación cerebral e individualmente uno sufría convulsiones y el otro síndrome cerebeloso. Tras el estudio en biopsias musculares se detectó que estos pacientes padecían una deficiencia severa de CoQ con un marcado defecto de la cadena respiratoria mitocondrial. Además, se detectó la presencia de fibras rojas rasgadas y acumulación de gotas lipídicas en fibras de tipo I, ambas características propias de miopatías mitocondriales

Introducción

Desde entonces, se han identificado y publicado más 150 pacientes deficientes en CoQ con una gran diversidad de fenotipos clínicos. La deficiencia en CoQ está asociada a un desorden autosómico recesivo que se manifiesta con un cuadro clínico heterogéneo que se pueden agrupar en cinco grandes fenotipos:

1. Encefalomiopatía caracterizada por afectación cerebral y mioglobinuria recurrente.
2. Desorden multisistémico infantil con encefalopatía asociada usualmente a nefropatía y afectación de otros órganos.
3. Ataxia cerebelosa con atrofia del cerebelo.
4. Miopatía aislada.
5. Síndrome nefrótico resistente a esteroides.

La manifestación de estos fenotipos suele ser predominantemente temprana (82% < 13 años, incluyendo un 23% en la infancia < 12 meses). Pero también se han identificado casos en la adolescencia (7% entre 13-18 años) así como en la edad adulta (11% > 18 años) (Emmanuele et al., 2012).

La deficiencia en CoQ puede estar causada por mutaciones en genes involucrados directamente en su biosíntesis, denominándose en ese caso *deficiencia primaria en CoQ*. Dentro de este tipo se han descrito a pacientes con defectos moleculares en *PDSSI* (Mollet et al., 2007), *PDSS2* (Lopez et al., 2006), *COQ2* (Diomedi-Camassei et al., 2007; Jakobs et al., 2013; Mollet et al., 2007; Quinzii et al., 2006), *COQ6* (Heeringa et al., 2011), *COQ9* (Duncan et al., 2009), *COQ8* o

Introducción

ADCK3 (Gerards et al., 2010; Horvath et al., 2012b; Liu et al., 2013; Mollet et al., 2008) y *ADCK4* (Ashraf et al., 2013)

También se han descrito mutaciones en genes que no están relacionados con la biosíntesis de ubiquinona pero que dan lugar a deficiencia en esta molécula, denominándose *deficiencia secundaria de CoQ*. Las mutaciones identificadas hasta el momento son las halladas en el gen de la apraxina (*APTX*) causando ataxia y apraxia oculomotora (Castellotti et al., 2011; Quinzii et al., 2005), el gen de la flavoproteína deshidrogenasa de transferencia de electrones (*ETF-DH*) causando miopatía aislada (Gempel et al., 2007) y el gen *BRAF* causando un síndrome cardiofaciocutáneo (Aeby et al., 2007).

Además, se han descrito deficiencias en CoQ asociadas a mutaciones en el DNA mitocondrial (Quinzii and Hirano, 2011), asociadas a otras enfermedades como MELAS y fibromialgia (Garrido-Maraver et al., 2012), así como debido a un efecto secundario del tratamiento con estatinas (Mugoni et al., 2013).

5.1. MECANISMOS PATOLÓGICOS ASOCIADOS A LA DEFICIENCIA EN COQ: ESTUDIOS EXPERIMENTALES.

Para entender las consecuencias fisiopatológicas de la deficiencia en CoQ₁₀, en la última década se han realizado algunos estudios en fibroblastos de pacientes con deficiencia en CoQ₁₀. En primer lugar, Geromel y cols. (Geromel et al., 2001) mostraron que los fibroblastos de dos hermanos con deficiencia en CoQ₁₀ de etiología genética desconocida presentaban defectos leves en la respiración mitocondrial y en la tasa de crecimiento, pero no encontraron evidencias de aumento de producción de anión superóxido,

Introducción

peroxidación lipídica o apoptosis. Algo más tarde, López-Martín y cols. demostraron que los fibroblastos de los dos hermanos con mutación en *COQ2* (Quinzii et al., 2006) presentaban un déficit enzimático de los complejos mitocondriales dependientes de CoQ₁₀. La deficiencia de CoQ₁₀ fue acompañada por una reducción en el ritmo de crecimiento celular que fue normalizado tras el tratamiento durante 24h con CoQ₁₀ (10 µM) (Lopez-Martin et al., 2007). Por otro lado, en el laboratorio del Dr. Hirano se realizó un estudio utilizando fibroblastos con mutaciones descritas previamente, esto es, *COQ2* (Diomedici-Camassei et al., 2007; Quinzii et al., 2006), *PDSS2* (Lopez et al., 2006) y *COQ9* (Duncan et al., 2009). En condiciones metabólicas dependientes de la fosforilación oxidativa, los resultados mostraron claras diferencias entre mutantes, esto es, los mutantes en *PDSS2* y *COQ9*, con un 10-15 % de CoQ₁₀, mostraron una marcada reducción de síntesis de ATP, pero apenas signos de estrés oxidativo o alteraciones de los sistemas antioxidantes. Por el contrario, los mutantes en *COQ2*, con un 30-50 % de CoQ₁₀, mostraron una reducción parcial en la síntesis de ATP y un aumento significativo en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), acompañado de oxidación de lípidos y proteínas y muerte celular (Quinzii et al., 2010; Quinzii et al., 2008). La relación entre niveles de CoQ, defecto bioenergético y estrés oxidativo se ha confirmado también a través de la inhibición farmacológica de la biosíntesis de CoQ con análogos de 4-HB (Quinzii, Plos One 2013; Duberley KE, J Inherit Metab Dis 2013) Asimismo, Rodríguez-Hernández y cols. (Rodriguez-Hernandez et al., 2009) confirmaron que fibroblastos de pacientes con deficiencia en CoQ₁₀ (30%) debida a mutación en *COQ2* tienen un incremento de ROS. Además, mostraron que en dichos fibroblastos hay una activación del

Introducción

poro de transición mitocondrial que desencadena en apoptosis y que hay una inducción de los mecanismos de autofagia que actuarían como protección frente a la apoptosis.

Para superar las limitaciones de los sistemas *in vitro*, es decir, la escasa información que proporcionan acerca de las especificidades de tejido, en 2001 se publicó por dos grupos independientes el primer modelo de ratón deficiente en ubiquinona debido a la ausencia del gen *Coq7* (Levavasseur et al., 2001; Nakai et al., 2001), el cual codifica la proteína Coq7, una enzima que, como hemos mencionado, cataliza la hidroxilación de la demetoxiubiquinona (DMQ) produciendo 5-hydroxy-UQ (**Figura 3**) (Stenmark et al., 2001). Desafortunadamente, el ratón knock-out (KO) para *Coq7* fue embrionicamente letal (menos de 10,5 días) a causa de un fallo en la neurogénesis (Nakai et al., 2001). Los estudios de microscopía electrónica mostraron mitocondrias alargadas con lisosomas alargados que contenían restos de membranas mitocondriales (Nakai et al., 2001). Los estudios bioquímicos mostraron que la ausencia de Coq7 provocaba la acumulación de DMQ (Levavasseur et al., 2001; Nakai et al., 2001). Curiosamente, la respiración mitocondrial disminuía sólo un 40 % a pesar de la ausencia total de ubiquinona y la letalidad embrionica (Levavasseur et al., 2001), lo que sugiere que la DMQ podría poseer cierta funcionalidad en el transporte de electrones. Sin embargo, en levaduras la DMQ no muestra capacidad para funcionar como transportador electrónico, ya sea en la cadena respiratoria mitocondrial o como agente antioxidante (Padilla et al., 2004). Por tanto, cabe pensar que otras funciones de la ubiquinona podrían contribuir significativamente a la patogénesis de la deficiencia en ubiquinona. En cualquier caso, la patogénesis mitocondrial de estos ratones fue confirmada por el grupo del Dr.

Introducción

Shirasawa, mostrando que en las células embrionarias de estos ratones había un incremento significativo de apoptosis y una reducción en el potencial de membrana y en los niveles de ATP, lo cual fue parcialmente restaurado con el suplemento de 25 μM de CoQ_{10} hidrosoluble durante 5 horas (Takahashi et al., 2008).

Por otro lado, hace más de tres décadas una cepa de ratones CBA/CaH desarrolló espontáneamente una nefritis intersticial que desencadenaba en fallo renal y muerte a los 5-7 meses de edad (Lyon and Hulse, 1971). En 2004, se identificó en esta cepa una mutación homocigota en *Pdss2* (Peng et al., 2004). El fallo renal parece ser la característica clínica más importante y apreciable en estos ratones (*Pdss2*^{kd/kd}), si bien se han detectado también defectos ultraestructurales de las mitocondrias de hepatocitos y cardiomiocitos, además de pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra (Peng et al., 2004; Ziegler et al., 2011). Trabajos posteriores mostraron deficiencia de ubiquinona en hígado y riñón, así como defectos funcionales de la mitocondria en dichos tejidos (Peng et al., 2008). Los mecanismos de este efecto, por el contrario, no se estudiaron (Fernandes et al., 1978). Finalmente, hay que mencionar que recientemente se han generado dos ratones KO condicional para *Pdss2* específicos de cerebelo (Lu et al., 2011). En un caso, el ratón murió durante el desarrollo embrionario mientras que en el otro desarrolló ataxia cerebelosa a los 9,5 meses. Sin embargo, en ningún caso se determinó los niveles de CoQ a las distintas edades, lo que hace dificultosa la interpretación de los resultados (Lu et al., 2011).

5.2. TRATAMIENTO EXPERIMENTAL DE LA DEFICIENCIA EN COQ.

El tratamiento lógico y racional para la deficiencia en CoQ es el suplemento exógeno de ubiquinona-10. En este sentido, Rodríguez-Hernández y colbs. (Rodríguez-Hernandez et al., 2009) encontraron un leve aumento de la actividad del complejo II+III en los fibroblastos deficientes en CoQ₁₀ tras el tratamiento con 100 µM de ubiquinona-10 durante 72 horas (Rodríguez-Hernandez et al., 2009). En esta misma línea, López y colbs. encontraron que la bioenergética celular sólo se normalizó en tres fibroblastos deficientes en CoQ₁₀ (con mutaciones en *PDSS2* (Lopez et al., 2006), *COQ2* (Quinzii et al., 2006) y *COQ9* (Duncan et al., 2009)) tras la administración de 5 µM de ubiquinona-10 durante 1 semana pero no durante 24 h (Lopez et al., 2010). Por el contrario, el tratamiento con análogos de ubiquinona de cadena corta como CoQ₂ e idebenona no tuvo efectos sobre la bioenergética mitocondrial (Lopez et al., 2010). En consecuencia, el resultado de este estudio *in vitro* sugiere que las deficiencias primarias en CoQ₁₀ deben ser tratadas con altas concentraciones de suplemento oral de ubiquinona-10 pero no con análogos de ubiquinona de cadena corta (idebenona o CoQ₂). Además, la administración complementaria de antioxidantes de alta biodisponibilidad puede ser considerado si existe estrés oxidativo (Lopez et al., 2010). En cualquier caso, los resultados de este estudio conducen a la búsqueda de terapias alternativas que puedan aumentar la eficacia del tratamiento dado que el carácter lipofílico de la CoQ₁₀ limita en exceso sus posibilidades terapéuticas.

El tratamiento de ratones *Pdss2^{kd/kd}* con ubiquinona-10 hidrosoluble a dosis de 200-400 mg/kg b.w./día administrada en el agua

Introducción

de bebida mostró un ligero descenso del contenido de albúmina en la orina así como del grado de nefritis (Saiki et al., 2008a), si bien hubo variabilidad en los resultados y los niveles de CoQ₁₀ (y CoQ₉), ya que no aumentaron en riñón tras el tratamiento, lo que hizo sugerir a los autores, sin datos aparentes, que el efecto beneficioso del tratamiento era por una reducción del estrés oxidativo (Saiki et al., 2008a). Por otro lado, el tratamiento con probucol sí aumento los niveles de CoQ₉ y CoQ₁₀ en riñones e hígado de ratones *Pdss2^{kd/kd}*, lo que indujo una mejora en la nefritis más evidente que con el suplemento exógeno con ubiquinona-10 (Falk et al., 2011). Sin embargo, ninguno de los estudios mostraron los efectos de los tratamientos sobre la supervivencia de los ratones *Pdss2^{kd/kd}* (Falk et al., 2011; Saiki et al., 2008a). Este dato sí se mostró en el estudio de Fernandes y cols., en el cual sometieron a los ratones *Pdss2^{kd/kd}* a distintos regímenes de restricción calórica, obteniendo un 100% de supervivencia en ratones *Pdss2^{kd/kd}* con ingesta 8 calorías/día en dieta con 22% de proteínas (Fernandes et al., 1978).

6. TERAPIAS EN PACIENTES DEFIICIENTES EN COQ.

La deficiencia primaria en CoQ es una de las pocas enfermedades mitocondriales que dispone de una terapia con cierto grado de éxito. Este tratamiento es el suplemento exógeno con ubiquinona-10, si bien la respuesta al tratamiento es muy variable entre pacientes, siendo en ciertos casos inefectiva, especialmente en aquellos pacientes con síntomas neurológicos

Algunos autores han descrito que altas concentraciones de CoQ₁₀ pueden parar la progresión de la encefalopatía en un paciente con la variante multisistémica de la enfermedad. (Rotig et al., 2000;

Introducción

Salviati et al., 2005). En 2008 se describió otro caso con mutación en el gen *COQ2* y que respondió de forma positiva al suplemento con ubiquinona-10 (Montini et al., 2008). Además, parece clara la importancia de una administración temprana del tratamiento basado en un diagnóstico rápido. De la misma forma, seis pacientes que presentaban miopatía pura mejoraron después del suplemento con ubiquinona-10 (Di Giovanni et al., 2001; Gempel et al., 2007), mientras que otros dos pacientes con mutaciones en el gen *ETFDH* mejoró solo con la adición de un tratamiento con riboflavina (Gempel et al., 2007).

Por el contrario, el suplemento con ubiquinona-10 parece menos efectivo en algunas formas de ataxia, como las causadas por la mutación en el gen *ADCK3*. Este es el caso de un paciente descrito por Mollet y cols donde la terapia no tuvo un efecto apreciable (Mollet et al., 2008) o el de otro paciente que solo mejoró levemente (Lagier-Tourenne et al., 2008). De la misma forma, un paciente homocigoto para la mutación del gen *COQ9* experimentó una disminución del lactato en sangre durante la terapia con ubiquinona-10 pero no frenó el progreso del trastorno neurológico y cardiaco, no evitando, por tanto, la muerte a los dos años de vida (Duncan et al., 2009).

El motivo por el que el tratamiento fracasa en algunos casos no está claro. Un aspecto clave, como ya hemos mencionado, sería la detección temprana de la enfermedad que posibilitaría un inicio temprano del tratamiento. La dosis óptima y la formulación usada para los suplementos sería otro factor a considerar. Según las experiencias clínicas de los últimos años, actualmente la dosis recomendada es de 2400 mg diarios en adultos y hasta 30 mg/kg/día administrado en 3 dosis al día en niños (Emmanuelle et al., 2012). Otro aspecto

Introducción

importante a tener en cuenta en la ineficiencia de la terapia es la absorción de la CoQ₁₀ cuando se administra exógenamente vía oral. Por esta razón, algunos grupos de investigación y empresas farmacéuticas han trabajado para encontrar una formulación que mejore la absorción de la CoQ₁₀ cuando se administra por vía oral (Bhagavan and Chopra, 2007).

Hipótesis

&

Objetivos

Hipótesis y Objetivos

La CoQ es una molécula lipofílica que se encuentra presente en todas las membranas celulares y que se sintetiza endógenamente en la mitocondria a través de una ruta compleja de la que ignoramos algunos pasos y en la que desconocemos las funciones de algunas proteínas involucradas en dicha ruta. Entre estas proteínas está Coq9, la cual pensamos que debería tener un papel regulatorio de acuerdo a los estudios realizados en levaduras. Una vez sintetizada, la CoQ participa en diferentes reacciones redox fundamentales en el metabolismo celular. Por ello, un déficit en la biosíntesis de CoQ está asociado a un síndrome autosómico recesivo que se manifiesta con un cuadro clínico heterogéneo. La razón de esta variabilidad clínica no se conoce pero algunos factores tejido-específicos parecen ser claves, entre ellos, la formación y estabilidad de los supercomplejos mitocondriales cuyas variaciones pueden dar lugar a defectos bioenergéticos, y el grado de daño oxidativo y muerte celular.

Por otro lado, es importante destacar que un alto porcentaje de los tratamientos con suplemento exógeno de ubiquinona-10 en los pacientes con defecto molecular identificado fracasa en su propósito, especialmente aquellos pacientes con síntomas neurológicos. Este fracaso podría deberse, además de por la propia heterogeneidad clínica, a la baja absorción y biodisponibilidad de la ubiquinona-10 administrada exógenamente por vía oral, lo que limita el aumento intramitocondrial de CoQ₁₀, especialmente en cerebro y cerebelo por la dificultad extra de atravesar la barrera hematoencefálica. Por ello, es crítico evaluar estrategias terapéuticas que puedan aumentar la efectividad del tratamiento. En este sentido, la administración de ubiquinona-10 en estado reducido, ubiquinol-10, podría aumentar la

Hipótesis y Objetivos

absorción y biodisponibilidad de la molécula. Asimismo, formulaciones hidrosolubles basadas en la adición de dextrinas podrían también aumentar la absorción y biodisponibilidad de la molécula.

Para valorar estas hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

1.- Generar un modelo animal viable que permita estudiar la función de la proteína Coq9. Este modelo consistirá en un ratón Knock-in que posee dos mutaciones puntuales en el gen *Coq9* (ratón *Coq9^{XX}*), de manera similar a las identificadas en un paciente deficiente en CoQ.

2.- Realizar una caracterización bioquímica, molecular, histopatológica y fenotípica del ratón *Coq9^{XX}*, identificando diferencias entre tejidos y centrandose fundamentalmente el estudio en aspectos de bioenergética mitocondrial, estrés oxidativo y muerte celular.

3.- Evaluar el tratamiento de formulaciones solubles en agua de ubiquinona-10 y ubiquinol-10.

Material

&

Métodos

1. GENERACIÓN DEL RATÓN KNOCK-IN R239X PARA EL GEN *Coq9*.

La línea de ratones knock-in para el gen *COQ9* usada en este estudio se generó por la empresa “InGenious Targeting Laboratory” (Stony Brook, NY, USA) basándose en la información descrita previamente de la mutación identificada en humanos.

El gen *Coq9* de ratón (GenBank Accession NP_080728) está compuesto por 9 exones en el cromosoma 8 y se predice que produce una proteína de 313 aminoácidos (UniProtKB/Swiss-Prot Q8K1Z0). En el humano, el gen *COQ9* (GenBank Accession NP_064708) está compuesto por 9 exones en el cromosoma 16 y se predice que produce una proteína de 318 aminoácidos (UniProtKB/Swiss-Prot O75208). Ambas proteínas tienen un 90,9 % de identidad, incluyendo la Arginina en la posición 244 en humanos y 239 en ratón y poseen la secuencia target de importación a mitocondria.

Debido a que la completa ausencia del gen *COQ9* podría ser embriónicamente letal, tal y como ocurre en los ratones knock-out para el gen *COQ7*, para el presente estudio se generó un ratón knock-in con una mutación homóloga a la encontrada en humanos (Duncan et al., 2009), basada en una transición C > T en la posición 730 del ADNc (CCDS32459.1), prediciendo un codón de parada prematuro, R244X, en el exón 7, truncando los 75 aminoácidos terminales de la proteína. Para reproducir esto en el ratón habría que introducir una transición C > T en la posición 715 y T > A en la posición 717 del ADNc

Material y Métodos

(CCDS22550.1), lo que predice un codón de parada prematuro, R239X, en el exón 7, truncando los 75 aminoácidos terminales de la proteína.

Los pasos para generar los ratones fueron los siguiente:

- Clonaje y construcción del vector: esto incluye el análisis de la estructura del gen, el diseño de la estrategia de rastreo, diseño de la sonda, construcción y confirmación, aislamiento y confirmación del clon genómico BAC, inserción del vector y conformación de la mutación puntual y selección con neomicina y preparación del DNA para la electroporación.
- Electroporación de las células madres embrionarias con el vector y trabajo de cultivo celular para aislar los clones resistentes a antibiótico.
- Rastreo de los clones de células madres embrionarias para identificar los positivos, incluyendo la preparación del DNA de clones individuales y su confirmación.
- Microinyección de blastocitos de células madres embrionarias, implantación de blastocitos y nacimiento de las quimeras.
- Cruce de los individuos heterocigotos resultantes con ratones FLPe con el fin de eliminar el Neo cassette. El trasgen FLPe es eliminado en cruces posteriores.

Para generar la mutación puntual se usan unos primers (**anexo 1.1**) distintos que los usados para realizar el *screening* (**anexo 1.2**).

2. ANIMALES Y GRUPOS EXPERIMENTALES.

Los animales se estabularon en el servicio de experimentación animal del Centro de Investigación Biomédica de la Universidad de Granada, en zona SPF y bajo un ambiente controlado de fotoperiodo (un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad) y temperatura (22°C). El acceso al agua fue continuo durante todos los experimentos. Los ratones utilizados tienen una edad comprendida entre 1-6 meses.

Los grupos experimentales usados son los siguientes:

- Ratones wild-type o $Coq9^{+/+}$
- Ratones homocigotos $Coq9^{X/X}$
- Ratones homocigotos $Coq9^{X/X}$ + Vehículo
- Ratones homocigotos $Coq9^{X/X}$ + Q₁₀
- Ratones homocigotos $Coq9^{X/X}$ + Q₁₀H₂

El tratamiento consiste en la administración de vehículo, ubiquinona-10 o ubiquinol-10 en el agua de bebida a una dosis de 240 mg/kg/día. El tratamiento comienza a la edad de 1 mes y finaliza a la edad de 3 meses con su sacrificio. Tanto la ubiquinona-10 como el ubiquinol-10 han sido proporcionados por Kaneka Corporation (Japón) como una formulación soluble en agua constituida por dextrinas, goma arábica y ácido ascórbico. El tratamiento en el agua de bebida se cambia dos veces por semana.

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a las normas de experimentación animal en España establecidas en el RD53/2013.

3. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE COQ₉ Y COQ₁₀.

La determinación de los componentes lípidos fue llevada a cabo mediante la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, del inglés “high performance liquid chromatography”) acoplada a un detector electroquímico (HPLC-EQ) (Lopez et al., 2010).

3.1. Extracción de las quinonas contenida en tejidos y plasma.

La extracción de las quinonas se realizó a partir de 20-40 mg de tejidos como cerebro, cerebelo, hígado o músculo esquelético y de 10 mg para riñón o corazón. Todas las muestras se homogenizan en 350 μ l de agua miliQ a 11.000 rpm con un homogeneizador de cristal-teflón (Stuart Scientific). El homogenado obtenido se sonica (Sonuplus HD-2070) para romper las membranas mitocondriales y de él se separan: 10 μ l para determinar la concentración de proteínas (Bradford et al.) y 50 μ l que se transfieren a un eppendorf que contiene 950 μ l de 1-propanol. La mezcla resultante se agita durante 2 minutos en “vortex” y se centrifuga a 11300 g durante 5 minutos. Para la determinación cromatográfica se utilizan 200 μ l del sobrenadante obtenido y se transfiere a un vial de HPLC para su inyección (dependiendo del tejido será necesario realizar una dilución adicional con 1-propanol).

3.2. Extracción de las quinonas en mitocondrias aisladas.

De cada fracción mitocondrial, previamente extraída, se toma el volumen necesario para tener 100 μ g de mitocondrias, se transfieren a un eppendorf de 1,5 ml y se resuspenden en 990 μ l de H₂O milliQ.

Material y Métodos

A continuación, las muestras se transfieren a un tubo de vidrio con tafeo de rosca que contiene 1 ml de SDS 0,1 M. Tras agitar brevemente la mezcla se añade 1 ml de etanol y 2 ml de hexano, se agita durante 2 minutos en “vortex” (rompiendo así las membranas mitocondriales) y se centrifuga a 2000 g durante 5 minutos. La fase superior resultante, que contiene las quinonas y el hexano, se transfiere a un vial de centelleo con pipetas Pasteur de vidrio (con cuidado de no coger nada de la fase inferior). A la fase inferior que queda en el tubo de vidrio se le añade 2,5 ml de hexano, se agita en “vortex” durante 1 minuto y se vuelve a centrifugar a 2000 g durante 5 minutos. La fase superior resultante se transfiere al mismo vial de centelleo con pipetas Pasteur de vidrio sumándose a la anterior y el extracto de hexano se evapora con un flujo leve de Nitrógeno gas. Finalmente, se añade 150 µl de 1-propanol al tubo de centelleo con el residuo lipídico, se mezcla con agitación suave y se transfiere a un vial de HPLC para su inyección.

3.3. Cuantificación de los componentes quinónicos.

Los componentes lipídicos de los extractos se separan en un sistema HPLC Gilson equipado con una columna Symmetry[®] C18 3.5 µm, 4,6x150 mm (Waters) en fase reversa y usando una fase móvil (**anexo 2.1**) a un flujo de 0.9 ml/min.

Las quinonas se cuantifican con un detector electroquímico ESA Coulochem III (ECD) y una célula analítica 2010 (E1, -600 mV; E2, +350 mV). Las hidroquinonas presentes en las muestras se oxidan previamente con una célula de guarda dispuesta en modo oxidado (E +900 mV)

Material y Métodos

Las quinonas se identifican a partir de los tiempos de retención de los estándares individuales y realizando una curva patrón (0, 25, 100 y 300 ng/ml). Finalmente, los resultados se integran el software del sistema HPLC (Titulion) y se obtienen los valores en ng CoQ/ml.

4. Análisis de metabolitos intermediarios mediante cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas (MS/MS).

Los extractos lipídicos se obtienen por el mismo procedimiento descrito para la cuantificación de CoQ. Las muestras se analizan usando un sistema de cromatografía líquida de alta calidad acoplado a un detector Xevo TOS de espectrómetro de masas (MS/MS) con espray de ionización (Waters Corporation). La columna analítica de separación usa es una BEH C18, 1.7 μ m, 2.1 x 50 mm (Waters, España).

La fase móvil utilizada consiste en metanol y 5 mM de acetato de amonio con un flujo constante de 0.3 m/min. Las temperaturas de secado y nebulización aplicadas son de 150 y 300 °C respectivamente. El nitrógeno se usa como gas de secado (150 l/h) y como gas de nebulización (500 l/h), mientras que el argón se usa como gas de colisión (0.14 ml/min). El análisis de espectrometría de masas se realiza en modo de barrido de masa, restringiéndolo entre 600 y 950 uma para mejorar la sensibilidad del análisis.

5. EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN Y/O ESTABILIDAD DE LOS SC POR BNGE.

5.1. Aislamiento de fracción mitocondrial de tejidos de ratón.

Tras sacrificar a los animales, se extraen rápidamente cerebro, cerebelo, riñón, hígado, músculo esquelético y corazón, se lavan en solución salina y se homogenizan en un homogeneizador de cristal-teflón (Stuart Scientific).

Riñón e hígado se homogenizan (1:4 p/v) en medio de homogenización A (**anexo 2.2**) ; cerebro y cerebelo se homogenizan (1:5 p/v) en medio de homogenización A que además contiene albúmina libre de ácidos grasos al 0.2%; el corazón se homogeniza a (1:10 p/v) en medio de homogenización B (**anexo 2.3**) ; y músculo esquelético se homogeniza a (1:20 p/v) en medio de homogenización C (**anexo 2.4**). Todos los tejidos se homogenizan a 600 rpm, excepto cerebro y cerebelo que se homogenizan a 500 rpm. Todo el proceso se realiza en hielo para mantener una temperatura de 4°C.

Los homogenados obtenidos de cerebro, cerebelo, riñón, hígado y corazón se centrifugan a 1.000 g durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se centrifuga a 14.400 g durante 2 minutos a 4°C del que se obtiene el pellet mitocondrial.

El homogenado resultante de músculo esquelético se centrifuga a 600 g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante (S1) se reserva en hielo y el pellet se resuspende en 8 volúmenes de medio C y se centrifuga a 600 g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido (S2) se combina con el anterior (S1) y se centrifuga a 17.000 g durante

Material y Métodos

10 minutos a 4°C. El pellet obtenido se resuspende en 10 volúmenes de medio A y se centrifuga a 7.000 g durante 10 minutos a 4°C. El nuevo pellet se resuspende en 1 volumen de medio D (**anexo 2.5**) y se centrifuga a 3.000 g durante 10 minutos a 4°C.

Los pellets mitocondriales de todos los tejidos se resuspenden en 75 µl (corazón y cerebelo), 120 µl (músculo esquelético, riñón y cerebro) y 700 µl (hígado) de los correspondientes medios de homogenización. Una alícuota de cada muestra se reserva para la determinación de proteínas y el resto se almacenan a -80°C para su posterior uso.

5.2. Preparación del gel de “Blue Native” de primera dimensión (1D).

La primera dimensión se realizó utilizando geles de Acrilamida: Bis-acrilamida en condiciones no desnaturizantes.

Para subfraccionar las proteínas mitocondriales en los distintos complejos de la cadena respiratoria, el gel se preparó en gradiente de poliacrilamida del 3% al 13% (**anexo 3.1**) que permite una mayor resolución para el peso molecular de las proteínas de interés. Para ello se utilizó un formador de gradientes acoplado a una bomba de vacío (Minipuls3, Gilson) a un flujo constante de 17.

5.3. Preparación de las muestras para Blue Native Gel Electroforesis.

En primer lugar, de las alícuotas obtenidas se toman el volumen necesario para tener 100 µg de mitocondrias y se centrifugan a 17.000 g durante 3 minutos a 4°C. Los pellets mitocondriales se resuspenden en

Material y Métodos

un medio específico para mitocondrias (**anexo 2.8**) para obtener una concentración de mitocondrias de 10 mg/ml. A continuación las proteínas de membranas se solubilizan por la adición de digitonina (4g/g) e incuban durante 5 minutos en hielo.

Después de centrifugar a 17.000 g durante 30 minutos a 4°C, el sobrenadante se transfirió a otro tubo al que se le añade 3 µl de tampón de carga (**anexo 2.9**), quedando las muestras preparadas para cargar en el gel de electroforesis. Se cargan aproximadamente 100 µg de proteínas por calle.

5.4. Electroforesis desnaturalizante.

Tras cargar las muestras, se inicia la electroforesis en el sistema electroforético Mini-PROTEAN[®] Tetra Cell (Bio-rad). Para facilitar la entrada de las proteínas en el gel concentrador la electroforesis se inicia a 90 V durante 30 min y se aumenta a 300 V durante 1:15 hora una vez las proteínas hayan penetrado en el gel separador. Durante todo el proceso el amperaje se limita a 15 mA/gel y se realiza a 4°C.

Para retirar el exceso de Serva Blue G, que puede interferir en pasos posteriores del ensayo, se cambia el Buffer Cátodo A por el Buffer Cátodo B, una vez el frente haya migrado las dos terceras partes del gel.

Una vez acabada la electroforesis, el gel fue utilizado para su transferencia a membrana de PVDF e inmunodetección de las subunidades de los diferentes complejos y para la medida de la actividad NADH Deshidrogenasa en Gel o “In Gel Activity”,

5.5. Transferencia e inmunodetección.

Las proteínas se transfieren a membranas de PVDF (Inmobilon ®-P, Millipore) mediante el sistema Trans-Blot SD Transfer Cell (Bio-Rad) aplicando un voltaje constante de 100 V durante 1 hora a 4°C.

Para la transferencia, se coloca el gel y la membrana, que es pre-tratada con metanol durante 1 min, entre dos papeles Whatman humedecidos con tampón de transferencia (**anexo 2.10**).

Posteriormente, las membranas se hibridaron con anticuerpos específicos de las proteínas de interés (**anexo 4.1**) y las señales se detectan empleando el sistema “Enzyme Chemiluminescence Plus” (ECL plus) (GE Healthcare).

Las cuantificación de las bandas se realiza en un escáner Image Station 2000R (Kodak, Spain) y el software usado fue Kodak 1D 3.6.

5.6. Ensayo de Actividad NADH Deshidrogenasa en Gel o “In Gel Activity”.

Para llevar a cabo la medida de la actividad del complejo I mitocondrial, se utiliza el protocolo previamente descrito por Nijtmans, y cols. con ligeras modificaciones (Artal-Sanz et al., 2003).

Se trata de una técnica colorimétrica basada en la oxidación del NADH que conlleva a la reducción del NBT que se hace insoluble y precipita dejando un depósito de color violeta en el sitio catalítico del

Material y Métodos

complejo I, lo que permite medir la actividad relativa de la enzima sobre el gel.

Los geles nativos de primera dimensión, se incuban con solución *In gel* (**anexo 2.11**) a temperatura ambiente y en oscuridad durante 1 hr.

6. PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y ANÁLISIS DE WESTERN-BLOT.

Se lleva a cabo en homogenado, fracción mitocondrial y nuclear de cerebro y corazón. La obtención de homogenado de ambos tejidos se realiza homogenizando, una vez extraído del animal, en solución de homogenización A (**anexo 2.12**) en un homogeneizador de cristal-teflón (Stuart Scientific, mod. SS2) a 11000 rpm. Posteriormente, el homogenado se sonica y centrifuga a 1000 g durante 5 min a 4°C. El sobrenadante resultante se usa para análisis de western blot.

Para el aislamiento de mitocondrias de cerebro, una vez extraído el tejido, se homogeniza en solución de homogenización B (**anexo 2.13**) en un homogeneizador de cristal-teflón a 600 rpm. Tras obtener el homogenado se sonica y centrifuga a 1000 g durante 5 min a 4°C. El sobrenadante se centrifuga a 17000 g durante 2 min a 4°C. El pellet resultante, que contiene la fracción mitocondrial, se lava en 1.5 ml de solución de homogenización B en las mismas condiciones a la última centrifugación. Finalmente el pellet obtenido se resuspende en 100 µl de solución de homogenización A y se almacena a -80°C.

Para el aislamiento de fracción nuclear de cerebro, tras su extracción, se lava en solución salina y homogeniza en 0.5 ml solución

Material y Métodos

fosfatasa inhibidora (**anexo 2.14**) en un homogeneizador de teflón a 600 rpm. El homogenado obtenido se centrifuga a 300 g durante 5 min a 4°C y el pellet obtenido se resuspende en 0.25 ml de tampón isotónico frío (**anexo 2.15**). Tras incubar la mezcla durante 15 min a 4°C se añaden 50 µl de IGEPAL al 10% y se centrifuga a 14000 g durante 1 min a 4°C. El pellet nuclear resultante se resuspende en 100 µl de tampón de lisis (**anexo 2.16**) y se incuba durante 30 min a 4°C en agitación. Después de realizar un breve “vortex” se centrifuga a 14000 g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante resultante constituye la fracción nuclear, se hacen alícuotas y se almacena a -80°C.

Tras cargar las muestras, 40 µg de proteínas, se inicia la electroforesis en geles homogéneos PhastGel™ del 12.5 usando un sistema electroforético PhastSystem (GE Healthcare Europe GmbH, España). Las proteínas se transfieren a membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare Europe GmbH, España) e hibridadas con los anticuerpos de interés (**anexo 4.1**). Las señales se detectan empleando el sistema “Enzyme Chemiluminescence Plus” (ECL plus) (GE Healthcare).

Las cuantificación de las bandas se realiza en un escáner Image Station 2000R (Kodak, Spain) y el software usado fue Kodak 1D 3.6.

7. MEDIDA DE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL.

Para medir la respiración mitocondrial, es necesario que las mitocondrias estén frescas e intactas. Por ello, tras sacrificar a los animales, se extrae en hielo rápidamente cerebro, riñón, músculo esquelético y corazón.

Material y Métodos

Músculo esquelético y corazón se sumergen en solución de proteinasa K a una concentración de 1mg/ml (30 s para corazón y 60 s para músculo). Tras la corta incubación para disgregar las fibras musculares, ambos tejidos se homogenizan (proporción 1:10 p/v) en tampón de aislamiento (**anexo 2.17**) en un homogeneizador de cristal-teflón a 800 rpm. El homogenado de cada tejido se centrifuga a 1.000 g durante 5 minutos a 4°C (centrífuga Beckman Avanti™ 30, rotor de ángulo fijo F1010) y el sobrenadante resultante se centrifuga a 23000 g durante 10 min a 4°C. El pellet mitocondrial obtenido de la centrifugación se resuspende en 1 mil de tampón de aislamiento y se vuelve a centrifugar a 13000 g durante 3 min a 4°C. De esta centrifugación se obtiene el pellet crudo mitocondrial final que se resuspende en medio MiRO5 (**anexo 2.18**) El sobrenadante resultante se resuspende en tampón de aislamiento para determinar la concentración de proteínas y para el ensayo de la respiración mitocondrial.

El riñón se homogeniza (proporción 1:10 p/v) en solución A de respiración (**anexo 2.19**) en un homogeneizador de cristal-teflón a 800 rpm. El homogenado obtenido se centrifuga a 500 g durante 7 min a 4°C y el sobrenadante resultante se centrifuga a 7800 g durante 10 min a 4°C. Entonces el pellet obtenido se resuspende en solución B (**anexo 2.20**) de respiración y se reserva una alícuotas para determinación de proteínas. El resto de muestra se centrifuga a 6000 g durante 10 min a 4°C. De esta centrifugación se obtiene un pellet que se resuspende en solución A de respiración y se centrifuga nuevamente a 6000 g durante 10 min a 4°C. El pellet final crudo mitocondrial se resuspende en medio MiRO5.

Material y Métodos

El cerebro se homogeniza (proporción 1:10 p/v) en solución C de respiración (**anexo 2.21**) en un homogeneizador de cristal-teflón a 500 rpm. El homogenado obtenido se centrifuga a 13000 g durante 3 min a 4°C dando lugar a un pellet y un sobrenadante (S1) que se reserva en hielo. El pellet se vuelve a resuspender en 5 ml de solución A de respiración y se centrifuga a 13000 g durante 3 min a 4°C. De esta centrifugación se obtiene el sobrenadante (S2) que se combina con el anterior y se centrifuga a 21200 g durante 10 min a 4°C. El pellet mitocondrial de esta última centrifugación se resuspende en 0.85 ml de solución A de respiración que contiene 15% de Percoll. La mezcla se transfiere a un tubo de ultracentrífuga que contiene un gradiente de percoll formado por 1 ml al 40% y 1 ml al 23%. Finalmente, la mezcla se somete a una centrifugación de 63000 g durante 30 min a 4°C. La fracción mitocondrial pura se halla entre las fracciones de 23% y 40% de percoll. Tras su recuperación se realiza dos lavados con solución A de respiración a 10300 g durante 10 min a 4°C y el pellet resultante se suspende en medio MiRO5.

El consumo de oxígeno mitocondrial es medido polarográficamente en un respirómetro de alta resolución usando un oxígrafo-2k OROBOROS. La respiración en mitocondrias aisladas (0.09 - 0.1 mg proteínas/ml en cerebro, 0.2 – 0.6 mg proteínas/ml en riñones; 0.01 – 0.03 mg de proteínas/ml en corazón, 0.01 – 0.03 mg proteínas/ml en músculo esquelético) contenidas en 2 ml de medio MiRO5 que previamente ha sido equilibrado en ambas cámaras a 37°C saturado con aire por agitación a 750 rpm (se agita durante 30 minutos antes de usar). La secuencia de medidas realizadas para los distintos estados de respiración es el siguiente: el consumo de oxígeno en el estado 2 es medido en presencia de 10 mM de glutamato + 2 mM de

Material y Métodos

malato (respiración a través del complejo I) o 10 mM de succinato + 2.5 μ M de rotenona (respiración a través del complejo II); Entonces, la máxima respiración mitocondrial (estado 3) se estimula por la adición de 0.25 mM de ADP y éste se acaba en su totalidad se determina el estado 4 en mitocondrias de cerebro.

En mitocondrias de riñón, corazón y músculo esquelético el estado 4 se mide por la adición de 3 mg/ml de oligomicina (estado 4_o). Los valores correspondientes al estado 3 o 4 se expresan pmol de O₂ /s x mg proteína. El RCR (ratio de control respiratorio) es calculado como el ratio del estado 3 y 4.

8. HISTOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA.

Tras sacrificar los animales, se extraen el cerebro, cerebelo, riñón, corazón, músculo esquelético e hígado con mucho cuidado (para no desorganizar la estructura tisular) y se fijan en formalina seguidos de la inclusión en parafina en una estación confinada para ello (modelo EG1150H+C de Leica®). A partir de los bloques se obtuvieron secciones de tejido en parafina de 4 μ m de grosor mediante un micrótopo semimotorizado (modelo RM 2145 de Leica®) y se procesaron para su tinción.

Para la valoración histológica de los tejidos se realizó una técnica rutinaria con Hematoxilina-eosina (H&E) para determinar la presencia de lesiones histológicas. Con la técnica de tricrómico de Masson (TCM) se valoró el tejido conjuntivo fibroso, que constituye un mecanismo de respuesta a procesos inflamatorios. La técnica de Ácido

Material y Métodos

Periódico de Schiff (PAS) se utiliza para ver el grosor de las membranas basales de los glomérulos, como indicador de lesión renal. Y finalmente, la técnica de Luxol fast blue (LFB), usada por su afinidad por los lípidos de la vaina de mielina y por tanto útil para detectar anomalías en el sistema nervioso.

Para la inmunohistoquímica, se evaluaron distintos anticuerpos mediante la técnica de estreptavidina-biotina-peroxidasa. Los anticuerpos junto con la casa comercial y referencia se detallan en el **anexo 4.2**.

Para realizar la técnica de TUNEL se usa un kit comercial (ApopTagw Plus Peroxidase in situ Apoptosis Detection Kit, Code: S7101, Millipore)

9. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO INTRAMITOCONDRIAL DE LOS NUCLEÓTIDOS ADENÍLICOS.

Entre los diferentes métodos que se pueden usar para medir moléculas de fosfato de alta energía, la cromatografía líquida de alta resolución muestra la ventaja de permitir la medida de todos los nucleótidos fosforilados en un solo experimento.

Los niveles intramitocondriales de nucleótidos de adenina se determinan por HPLC con una columna de intercambio iónico ProPac PA1 (4.6 x 250 mm, Dionex) y un gradiente binario de carbonato amónico 0.3 M y agua (Pissarek y cols., 1999).

Los animales se sacrifican por dislocación cervical, y sus cuerpos son congelados inmediatamente en nitrógeno líquido para

Material y Métodos

evitar la rápida degradación *postmortem* que pueden sufrir los nucleótidos energéticos. Una vez congelado el ratón se coloca en un placa fría donde serán extraídos todos los tejidos. De éstos se extraen 50 mg de tejido y se homogenizan en 500 μ l de ácido perclórico 0.5 M y se mantiene en hielo durante 10 minutos. Tras la incubación en frío, los homogenados se centrifugan a 25000 g durante 10 minutos a 4°C, precipitando de este modo las proteínas (centrifuga Beckman Avanti 30). Los pellets obtenidos se congelan a -80°C para determinar la concentración de proteínas y cada sobrenadante se mezcla con 4 μ l de carbonato potásico 4 M para neutralizar el ácido, centrifugando seguidamente a 12000 g durante 10 minutos a 4°C. Los sobrenadante obtenidos se usan para las medidas en HPLC.

Tras estabilizar la columna con fase móvil (previamente filtrada a tamaño de poro de 0.45 μ m), se inyectan 20 μ l de cada muestra en el sistema del HPLC. La composición de la fase móvil se describe en el **anexo 2.22**. Las muestras corrieron a una tasa de flujo isocrático de 1.5 ml/min a través de una columna de fase reversa Kromasil® C18 (5 mm; 4.6 \times 250 mm).

Para la calibración, se usa agua como blanco y la curva estándar se realiza con las siguientes concentraciones de cada nucleótido (AMP, ADP y ATP): 15 mM, 30 mM y 60 mM cuyos tiempos de retenciones son 3.4, 6.9 y 11.8 minutos respectivamente. Las absorbancias de la curva y de las muestras son medidas con un detector ultravioleta a 254 nm y la concentración de cada nucleótido en las muestras es calculada según el área de cada pico formado (Pissarek y cols., 1999). Los niveles de nucleótidos de adenina se expresan en nmol/mg de proteínas.

10. ACTIVIDADES DE LA CTE DEPENDIENTES DE COQ.

La medida de estas actividades se realiza en partículas submitocondriales. Para su obtención, se extrae el volumen necesario de muestras que contenga 100 µg proteínas y seguidamente son suspendidas y sonicadas en 100 µl de 0.1 M de buffer fosfato, pH 7.5.

La medida de la actividad del complejo I+III se basa en la reducción del citocromo C y se mide, en presencia del buffer de reacción (**anexo 2.23**), a 550 nm (Kirby et al., 2007).

La actividad del complejo II+III, medida en presencia del buffer de reacción (**anexo 2.24**), se inicia con la adición de 0.1 mM citocromo C y la disminución de la absorbancia es medida a 550 nm (Kirby et al., 2007).

Los resultados se expresan, en ambas actividades, como nmol cyt c red/min/mg proteína.

11. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.

La cantidad de proteína se determinó mediante el método de Bradford (Bradford 1975). Por duplicado medimos cada muestra en placas de espectrofotómetro donde se añaden 200 µl de reactivo de Bradford y 10 µl de muestra. La mezcla se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente, protegida de la luz para que se pueda producir la reacción y en suave agitación.

La medida se lleva a cabo en un espectrofotómetro de placas (Bio-Tek Power-Wave_x Microplate Scanning Spectrophotometer) a una longitud de onda de 595 nm. Previamente se realizó una recta patrón con concentración conocida de BSA (albúmina de suero bovino)

Material y Métodos

para poder estimar, por extrapolación la concentración proteica de toda la batería de muestras.

12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos son expresados como la media \pm DE (desviación estándar) de 7 a 10 individuos por duplicado. Para comparar la media entre los diferentes grupos se ha usado un análisis de la t de Student, o una ANOVA de una vía con un test post hoc de Tukey, considerando un valor de P menor de 0.05 como estadísticamente significativo.

Resultados

1. GENERACIÓN DEL RATÓN KNOCK-IN R239X PARA EL GEN *Coq9*.

El gen *COQ9* se identificó y caracterizó como un gen requerido en la ruta biosintética de la CoQ en *S. Cerevisiae* (Johnson et al., 2005). Años después, Duncan y cols. (Duncan et al., 2009) identificó un paciente con deficiencia en CoQ₁₀ que poseía dos mutaciones puntuales en el gen *COQ9*. A pesar de estos hallazgos, la función específica de la proteína Coq9 en la ruta biosintética sigue siendo desconocida.

Para estudiar la función de la Coq9p en mamíferos, hemos generado un ratón mutante para el gen *Coq9*. La **Figura 8** muestra el procedimiento llevado a cabo para generar la mutación R239X (c.715 C>T and c.717>A) en células madres embrionarias (ES), la cual es homóloga a la mutación detectada en humanos, es decir, el cambio R244X (Duncan et al., 2009) (ver detalle en material y métodos). El cruce de ratones heterocigotos (*Coq9*^{+/*X*}) dio lugar a una distribución mendeliana normal de ratones wild-type (*Coq9*^{+/+}), heterocigotos (*Coq9*^{+/*X*}) y homocigotos Knock-in (*Coq9*^{*X/X*}).

2. LA PROTEÍNA DISFUNCIONAL *Coq9*, LA CUAL REGULA A *Coq7*, PRODUCE UNA DEFICIENCIA GENERALIZADA EN COQ.

El gen murino *Coq9* (GenBank Accession NP_080728) está compuesto por 9 exones y está localizado en el cromosoma 8,

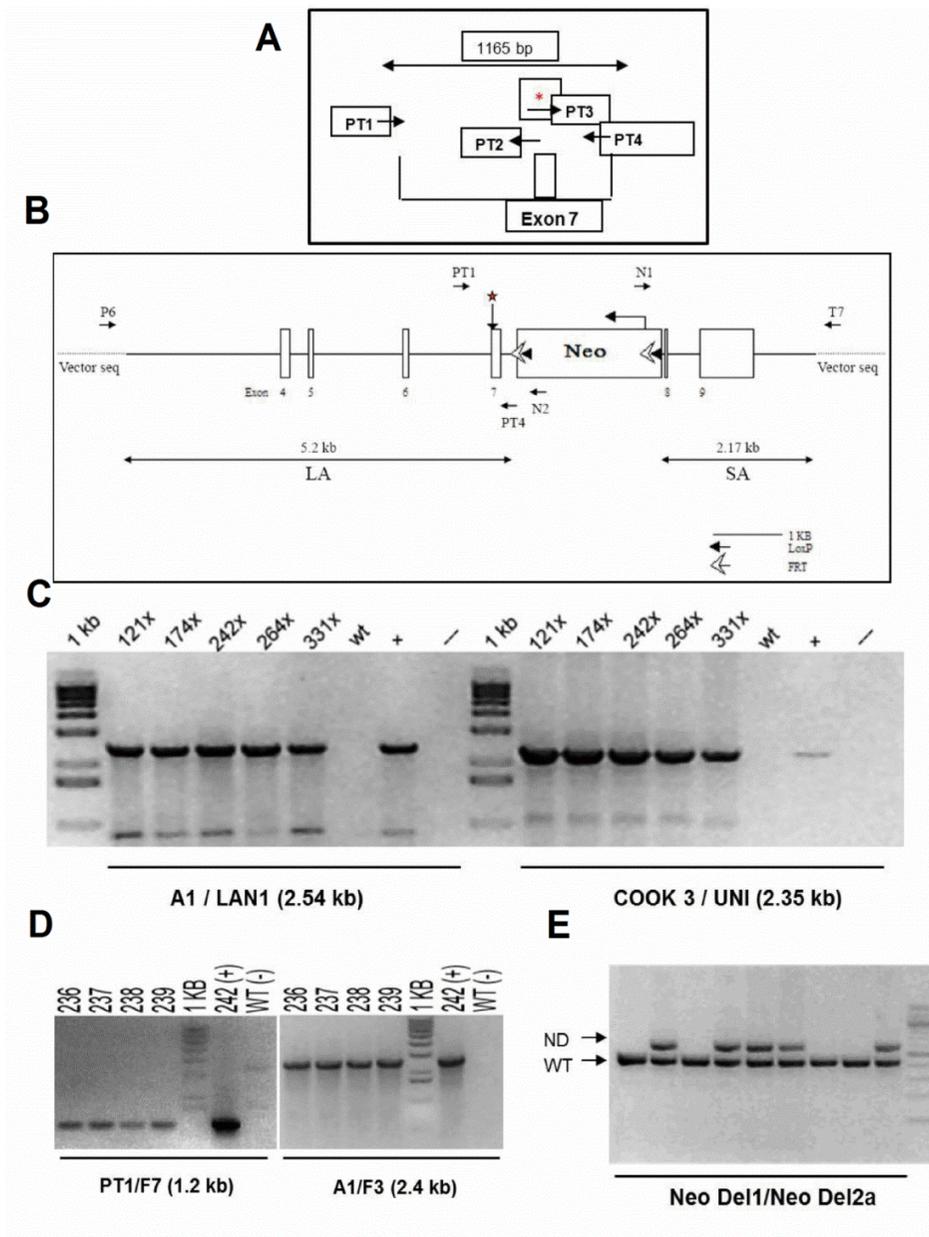


Figura 8. Generación del ratón knock-in R239X para el gen *Coq9*. (A) Posición de los primers usados para generar la mutación puntual. (B) Diana del vector para el gen *Coq9*. (C) Confirmación por PCR de la expansión de los clones. Los clones 121, 174, 242, 264 y 331 se seleccionan para inyección. (D) Confirmación de la integración de la mutación puntual y el brazo corto de homología. (E) PCR para detectar la delección del NeoCassete. ND= Neo delección.

codificando para una proteína de 313 aminoácidos (UniProtKB/Swiss-Prot Q8K1Z0). Como resultado de la modificación genética, la predicción es que el ratón *Coq9^{XX}* produzca una proteína truncada que pierde la una porción de 75 aminoácidos en el extremo C-terminal. Para confirmar la presencia de dicha proteína truncada en el ratón mutante, se realizó un estudio de inmunodetección usando un anticuerpo frente a la región C-terminal de la proteína Coq9. Como era de esperar, se detectó una proteína de aproximadamente 21 kDa en el ratón wild-type, pero no el mutante (**Figura 9A**). Desafortunadamente, el anticuerpo frente a la región N-terminal de la proteína Coq9 no está disponible comercialmente para este estudio, no pudiendo demostrar la presencia de la proteína truncada en el mutante.

No obstante, si la proteína Coq9 está involucrada en la biosíntesis de la CoQ, una proteína disfuncional produciría una deficiencia severa de este lípido. Tras separar y cuantificar los extractos de quinonas por HPLC, comprobamos que los ratones *Coq9^{XX}* muestran una reducción significativa de los niveles de CoQ₉ (la forma mayoritaria de ubiquinona en roedores) y CoQ₁₀ en los tejidos estudiados (cerebro, cerebelo, corazón, riñones, músculo esquelético e hígado) comparados con los ratones *Coq9^{+/+}* (**Figura 9B y 10**). El porcentaje de reducción fue ligeramente superior en riñones, corazón, cerebro y cerebelo, seguidos de músculo esquelético e hígado (**Tabla1**). Estos resultados confirman que la Coq9p está involucrada en la ruta biosintética de la CoQ.

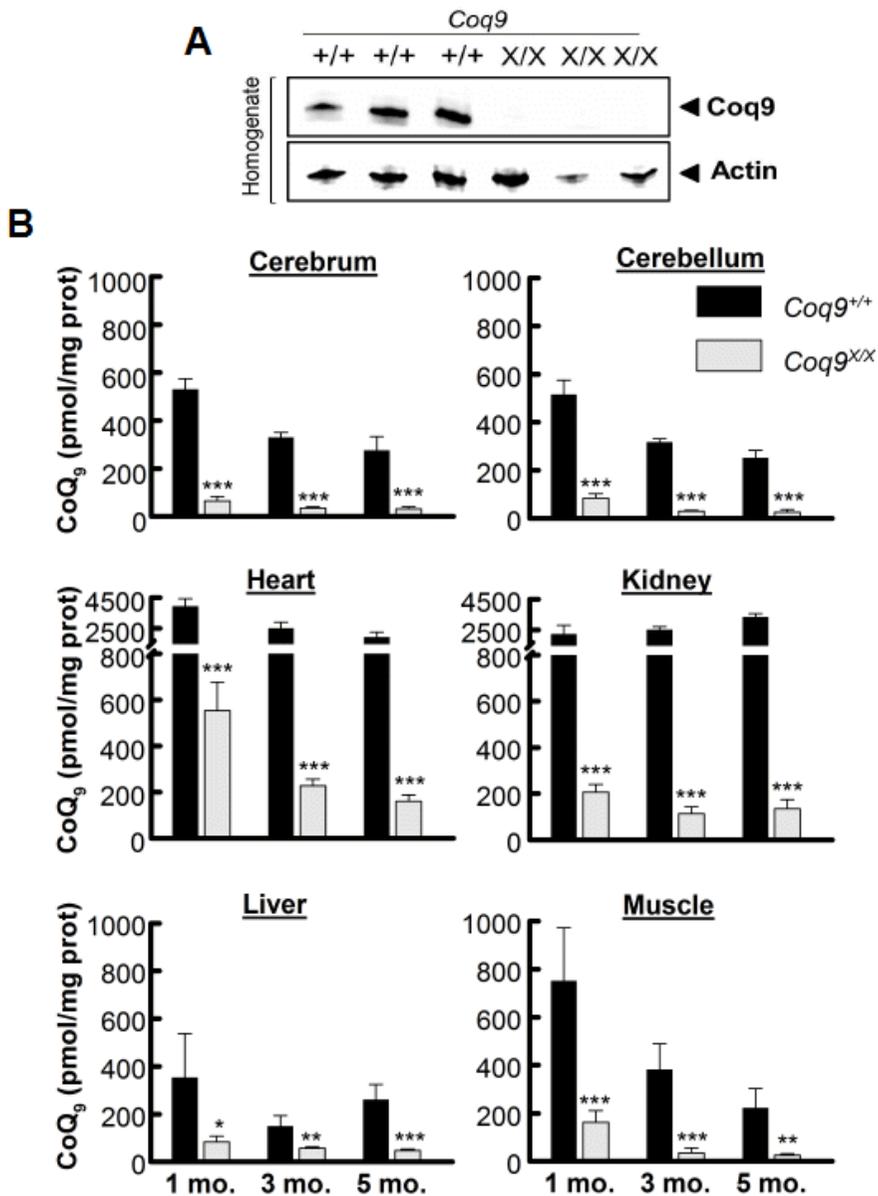


Figura 9. Mutaciones en el gen *Coq9* murino genera una proteína disfuncional y deficiencia en CoQ generalizada. (A) Western blot representativo de la proteína Coq9 en homogenado de corazón procedentes de ratones *Coq9*^{+/+} y *Coq9*^{X/X}. **(B)** Niveles de CoQ₉ en homogenado de tejidos procedentes de ratones *Coq9*^{+/+} (N=10) y *Coq9*^{X/X} (N=10) a 1,3 y 5 meses de edad. Los datos son expresados como la media ±DE. * *P* < 0.05; ** *P* < 0.001; ****P* < 0.005 vs. *Coq9*^{+/+}.

Curiosamente, en los cromatogramas de HPLC obtenido de los mutantes, además de CoQ₉ y CoQ₁₀, se observa también la presencia de dos picos anormales, cuyos tiempos de retención fueron de 12.5 y 17.6 minutos, inmediatamente anterior a los picos de CoQ₉ (13.5 min) y CoQ₁₀ (18.8 min) (**Figura 11A y 12**). Unos picos similares ya habían sido observados con anterioridad en fibroblastos procedentes del paciente con mutación en el gen *COQ9* (Duncan et al., 2009). Estos picos podrían constituir intermediarios de la ruta biosintética de la CoQ y, por consiguiente, identificarlos sería interesante para entender la función de la proteína Coq9. Por ello, se procede a su aislamiento e identificación de estos picos por UPLC acoplado a un espectrómetro de masas. El espectro de masas del lípido con tiempo de retención de 12.5 min mostró un pico de ión molecular [M + H]⁺ de 765.7 que coincide con uno de los metabolitos de la ruta biosintética, la Demetoxiubiquinona 9 (DMQ₉) (masa teórica [C₅₃H₈₀O₃]= 764.61) (**Figura 11B**). Todos los tejidos analizados en el mutante muestra acumulación de este metabolito, siendo el ratio CoQ₉/DMQ₉ menor en riñones, corazón y músculo esquelético que en cerebro y cerebelo (**Figura 13**).

La DMQ₉ es el sustrato para la proteína Coq7, la cual cataliza su hidroxilación para producir 5-hidroxiubiquinona (**Figura 3**). Previamente se ha descrito que los homocigotos del ratón Knock-out para el gen *Coq7* acumulan DMQ₉ y no producen CoQ₉ (Levavasseur et al., 2001; Nakai et al., 2001). Sin embargo, los tejidos procedentes.

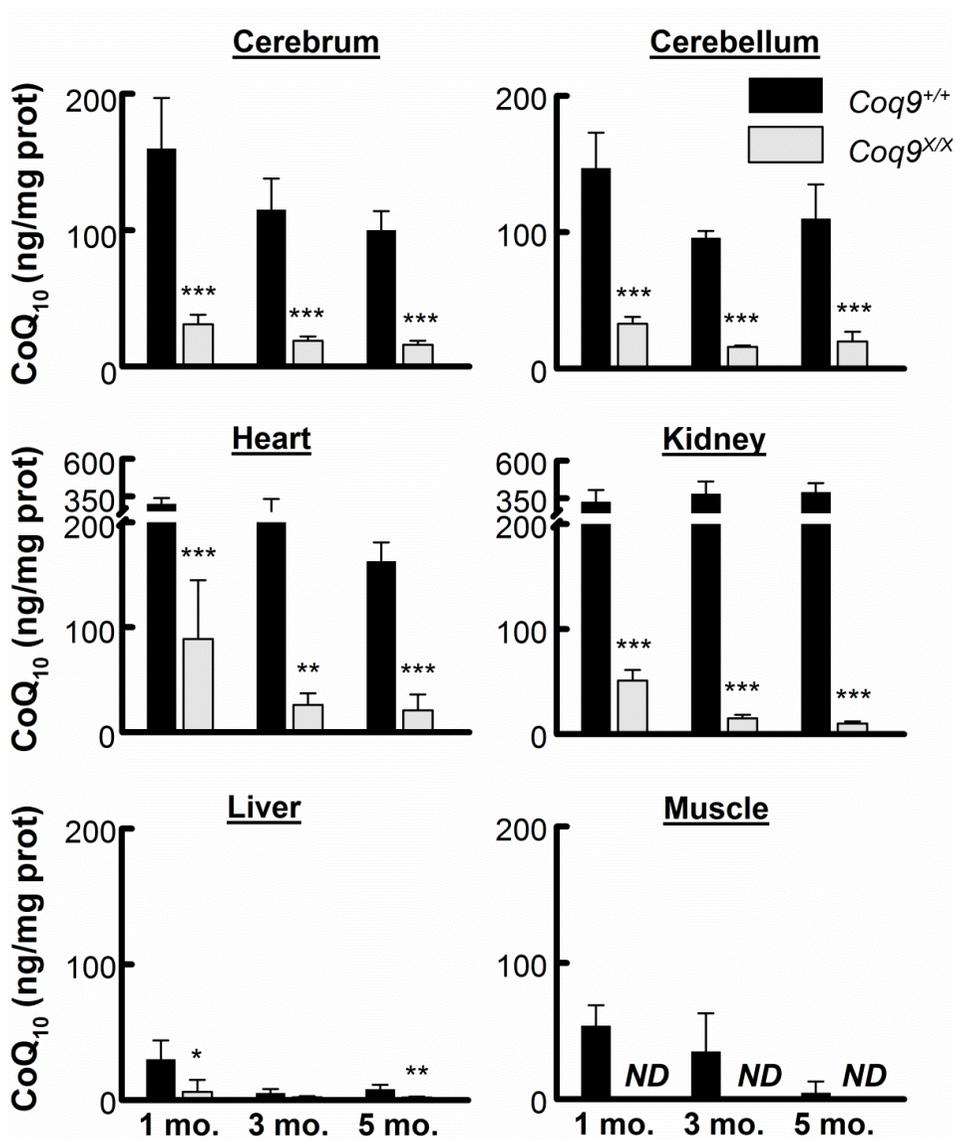


Figura 10. Mutaciones en el gen *Coq9* murino genera deficiencia de CoQ generalizada. Niveles de CoQ₁₀ en homogenado de tejidos de ratones *Coq9*^{+/+} (N=10) y *Coq9*^{X/X} (N=10) a la edad de 1,3 y 5 meses de vida. Los datos son expresados como la media ±DE * *P* < 0.05; ***P* < 0.001; ****P* < 0.005 vs. *Coq9*^{+/+}.

del ratón Knock-in *Coq9^{X/X}* contienen ambos metabolitos, DMQ₉ y CoQ₉. Por tanto, nuestros resultados sugieren que la proteína Coq9 podría regular de forma directa o indirecta a la Coq7p. El siguiente paso fue, por tanto, cuantificar los niveles de la proteína Coq7 por western-blot. Los resultados mostraron que los niveles de la proteína Coq7 estaban reducidos significativamente en ratones *Coq9^{X/X}* en comparación con los *Coq9^{+/+}* (**Figura 11C**). Puesto que algunos autores han propuesto en levaduras la existencia de un complejo multiproteico de síntesis de CoQ, determinamos también los niveles de otras 2 proteínas biosintéticas, Coq6p y Adck3. Sin embargo, no se observan cambios significativos en los niveles de Coq6p y Adck3, sugiriendo que la reducción de los niveles de Coq7p en los ratones *Coq9^{X/X}* sería por un mecanismo específico de relación entre Coq9p y Coq7p.

3. LOS RATONES *Coq9^{X/X}* MANIFIESTAN SEÑALES CLÍNICAS DE ENCEFALOMIOPATÍA.

Los niveles reducidos de CoQ en diversos tejidos del ratón *Coq9^{X/X}* recuerda a algunos casos clínicos asociados con la deficiencia en CoQ en humanos (Emmanuele et al., 2012). Con objeto de comprender la heterogeneidad clínica asociada a la deficiencia en CoQ, realizamos en primer lugar una caracterización fenotípica e histológica de este modelo experimental. Los ratones mutantes homocigotos son claramente distinguibles de los ratones wild-type (Emmanuele et al., 2012). Los ratones homocigotos *Coq9^{X/X}* tras su nacimiento no presentan signos de anormalidad mostrando peso, distribución de sexos y crecimiento normal. A partir del primer mes de

Tissue	Age	% CoQ ₉	% CoQ ₁₀
Cerebrum	1 mo.	12.3	19.2
	3 mo.	10.8	16.5
	5 mo.	11.5	16.1
Cerebellum	1 mo.	16.3	22.2
	3 mo.	10.5	16.6
	5 mo.	10	18.8
Heart	1 mo.	14	29.7
	3 mo.	9.5	9.8
	5 mo.	8.3	12.6
Kidney	1 mo.	9.3	15.5
	3 mo.	4.8	4
	5 mo.	4	2.5
Liver	1 mo.	23.6	19.4
	3 mo.	37.4	38.8
	5 mo.	18.3	24
Skeletal muscle	1 mo.	21.7	ND
	3 mo.	9	ND
	5 mo.	11.7	ND

Tabla 1. Porcentaje residual de niveles de CoQ₉ y CoQ₁₀. Niveles residuales de CoQ₉ y CoQ₁₀ (%) en homogenado de tejidos de ratones *Coq9^{XX}* (N=10) respecto a ratones *Coq9^{+/+}* a la edad de 1,3 y 5 meses de vida. ND= No detectable.

vida los ratones mutantes experimentan una pérdida de peso y tamaño corporal y tisular (**Figura 14A-C**). Curiosamente los ratones *Coq9^{XX}*

sufren una pérdida del pelo corporal entre los días 20-22 de vida (**Figura 14D**), recuperándolo en su totalidad en el siguiente ciclo piloso. Este hecho ya ha sido observado con anterioridad en un modelo de ratón deficiente para el complejo I (Kruse et al., 2008; Leong et al., 2012).

El estudio de la actividad locomotora, evaluado por la capacidad ambulatoria de los ratones en un circuito cerrado durante 30 minutos, muestra que los ratones mutantes poseen una menor actividad que los wild-type a los 3 meses de vida. Además, esta actividad es significativamente menor a la edad de 5 meses (**Figura 14E**). Del mismo modo, el número de levantamientos verticales efectuados sobre las piernas traseras están ligeramente disminuidos en los ratones $Coq9^{X/X}$ a la edad de 3 meses comparados con el ratón $Coq9^{+/+}$, siendo la disminución significativamente menor a los 5 meses de edad (**Figura 14F**).

El análisis de los niveles de metabolitos en orina, como albúmina, creatinina, glucosa y magnesio, no mostró diferencias entre ratones $Coq9^{+/+}$ y $Coq9^{X/X}$ (**Tabla 2**), descartando en principio el fenotipo nefrótico.

Entre los 3 y 6 meses de vida, se observa que los ratones $Coq9^{X/X}$ desarrollan una rápida y progresiva parálisis de las extremidades. Este hecho sugiere la implicación del sistema nervioso central en la patología de la enfermedad. En dicho rango de edad (3-6 meses) todos los mutantes comienzan a manifestar un fenotipo con *síntomas moderados (SM)* representado por pérdida de peso y ligeras alteraciones de la marcha. Este fenotipo, en un estadio más avanzado da

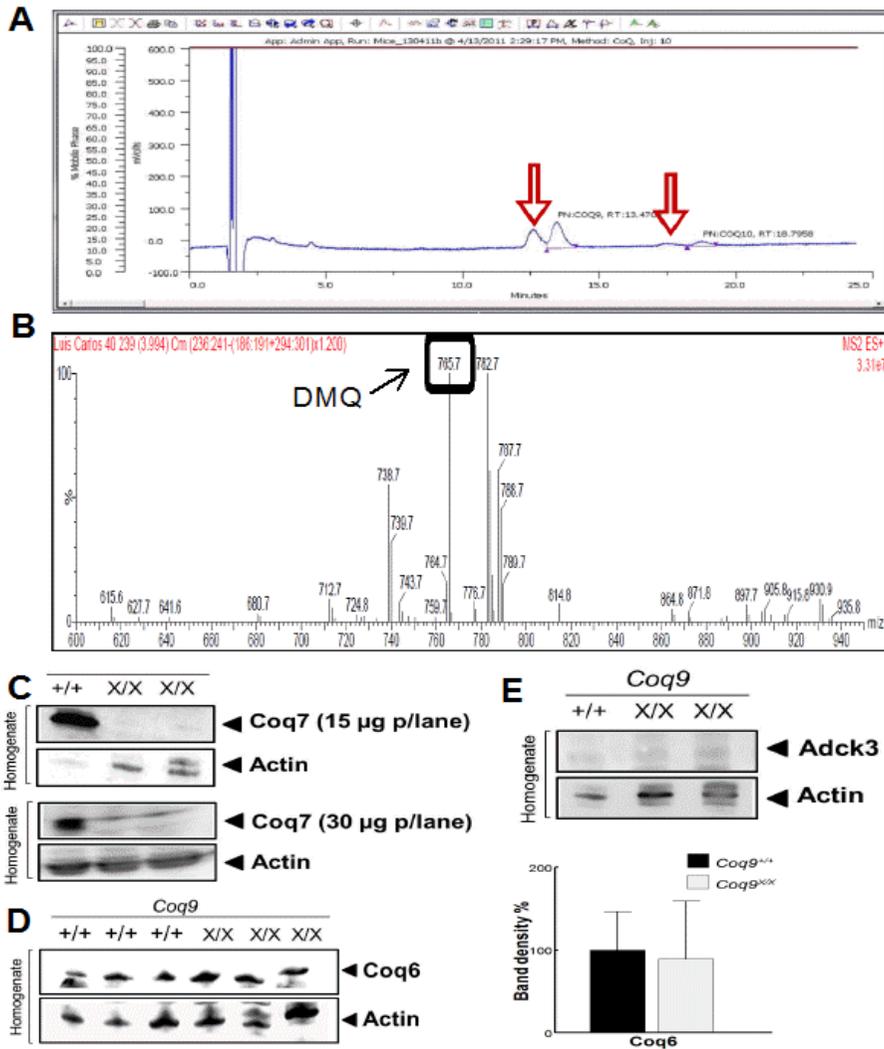


Figura 11. La función de la proteína Coq9 en la ruta biosintética de la CoQ. (A) Cromatograma de separación y cuantificación de CoQ₉ y CoQ₁₀ en cerebro de ratones *Coq9^{X/X}*. Identificación de dos picos anormales con tiempo de retención de 12.5 y 17.6 minutos **(B)** Espectrometría de masas del pico con tiempo de retención de 12.5 min. **(C-E)** Western-blot representativo de proteínas implicadas en la biosíntesis de CoQ en homogenado de corazón de ratones *Coq9^{+/+}* (N=6) y *Coq9^{X/X}* (N=6). **(C)** Niveles de expresión de Coq7p (15 µg y 30 µg de proteínas son corridos en gel) y actina como control de carga. **(D)** Niveles de expresión de Coq6p y actina como control de carga. Los resultados se cuantifican por densitometría de bandas (panel de la derecha) y son expresados como la media ± DE. **(E)** Niveles de expresión de la proteína Adck3 y actina como control de carga.

lugar otro caracterizado por *síntomas severos (SS)* donde los mutantes manifiestan una rápida y severa parálisis de las extremidades (**Figura 14G**).

El fenotipo observado en los ratones $Coq9^{X/X}$ determina una muerte prematura: los mutantes empiezan a morir a partir de los 3 meses de edad, a los 4 meses mueren aproximadamente el 50% llegando al 100% de muertes alrededor de los 6 meses. En todos los casos, una vez el ratón presenta el fenotipo severo la muerte se produce como máximo 24 horas después. Estos resultados sugieren que los ratones $Coq9^{X/X}$ desarrollan la variante encefalopática asociada a la deficiencia en CoQ.

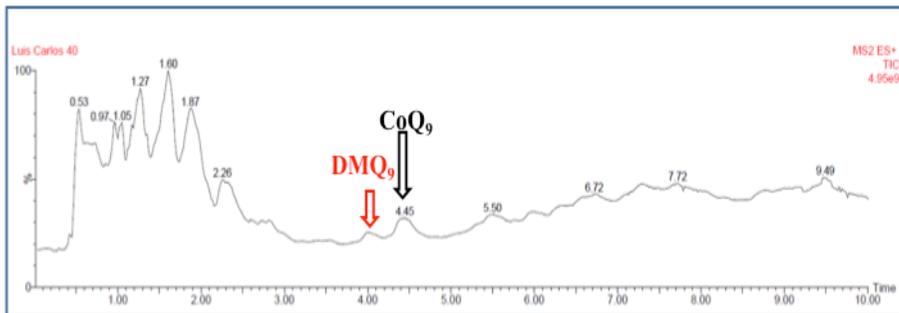


Figura 12. Cromatograma de HPLC con detección MS/MS en modo scan entre 600 a 950 uma. El Cromatograma muestra la acumulación de un metabolito anormal, identificado como la DMQ₉, en corazón de ratones $Coq9^{X/X}$.

Para determinar si el fenotipo observado en el ratón mutante tiene relación con cambios anatomopatológico, se lleva a cabo un análisis histopatológico en distintas secciones de tejidos:

- Con la tinción de hematoxilina-eosina (H&E) en cerebro de ratones $Coq9^{XX}$ se observa una intensa vacuolización en la sustancia blanca y en el bulbo raquídeo, más evidente en ratones con fenotipo SS. Además, se observa muerte neuronal caracterizada por la presencia de núcleos picnóticos desplazados hacia la periferia de los cuerpos neuronales (**Figura 15A**). Estas observaciones sugieren que los mutantes desarrollan una degeneración esponjiforme y muerte neuronal.

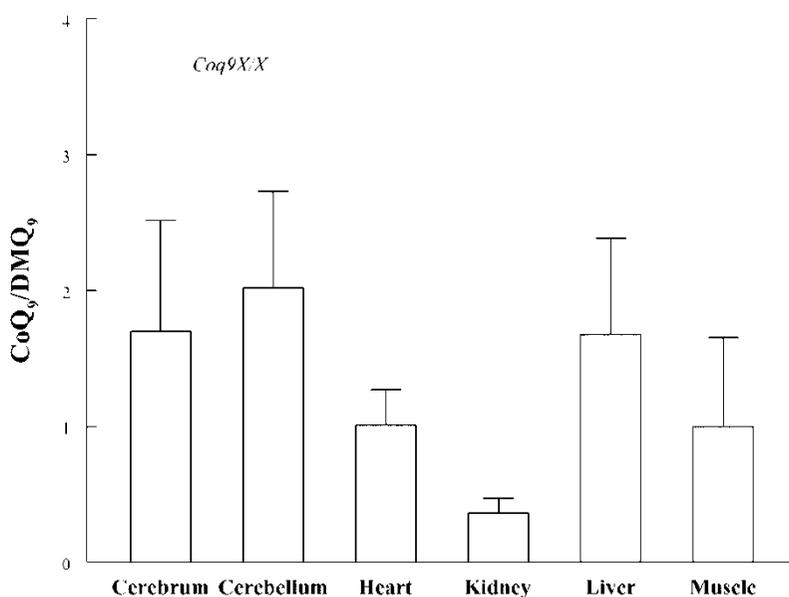


Figura 13. Proporción CoQ₉/DMQ₉ en homogenado de tejidos. Se evalúa en diferentes tejidos procedente de ratones $Coq9^{XX}$ (N=10) a los 3 meses de vida. Los datos son expresados como la media ±DE.

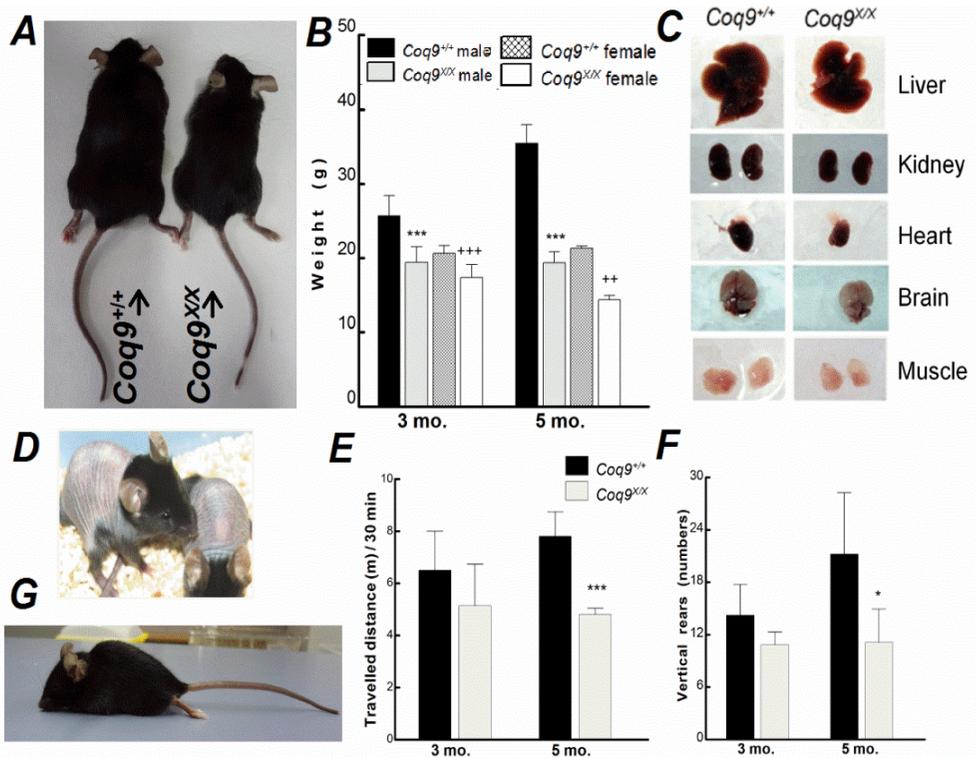


Figura 14. Caracterización fenotípica del ratón *Coq9^{XX}*. (A) Imagen representativa de la diferencia de tamaño entre los ratones *Coq9^{+/+}* y *Coq9^{XX}* (B) Peso corporal de machos y hembras *Coq9^{+/+}* (N=20) y *Coq9^{XX}* (N=20) a los 3 y 5 meses de vida. Los datos son expresados como la media \pm SD *** $P < 0.005$ vs. machos *Coq9^{+/+}*; ### $P < 0.01$; #### $P < 0.005$ vs. hembras *Coq9^{+/+}*. (C) Imagen representativa del tamaño de cerebro, corazón, riñones, hígado y músculo esquelético de ratones *Coq9^{+/+}* (panel de la izquierda) y ratones *Coq9^{XX}* (panel de la derecha) a los 3 meses de edad. (D) Fotografía de un mutante con pérdida de pelo corporal entre los 20-22 días de vida (E y F) Test “Open field” de ratones *Coq9^{+/+}* (N=16) y *Coq9^{XX}* (N=16) de 3 y 5 meses de vida. Distancia recorrida y número de levantamientos verticales medidos en intervalos de 30 min. Los datos se expresan como la media \pm DE * $P < 0.05$; *** $P < 0.005$ vs. *Coq9^{+/+}*. (G) Vista lateral de un mutante que manifiesta fenotipo con síntomas severos representado por parálisis severa de las piernas.

- Con la tinción de Luxol fast blue (LFB) se observa una clara desmielinización e incremento de células de la glía en el puente y en el bulbo raquídeo de ratones *Coq9^{XX}*. Además, en las neuronas se puede observar una reducción en el número de cuerpos de Nissl, signo característico observado en otras encefalopatías. Ambas observaciones son más evidentes en los mutantes con SS (**Figura 15A**).
- Con La tinción tricrómica de Masson (TCM) en el músculo esquelético de las piernas traseras (vastus lateralis) se muestra una ligera pérdida de mielina de las fibras nerviosas en los ratones *Coq9^{XX}* (**Figura 15B**). Asimismo, el corazón de los ratones *Coq9^{XX}* muestra signos de fibrosis caracterizado por un incremento de tejido conectivo entre células cardíacas. Ambas observaciones son más evidentes en los mutantes con SS (**Figura 15B**).
- Finalmente, la tinción del ácido periódico de Schiff (PAS) no revela ninguna diferencia entre riñones de ratones wild-type y homocigotos (**Figura 15B**), sugiriendo nuevamente la ausencia de enfermedad renal.

	3 mo.		5 mo.	
	<i>Coq9^{+/+}</i>	<i>Coq9^{XX}</i>	<i>Coq9^{+/+}</i>	<i>Coq9^{XX}</i>
Urea	4.6 ± 6.2	5.5 ± 5.8	4.6 ± 1.9	7.1 ± 3.4
Creatinine	25.3 ± 10.5	24.0 ± 10.0	31.0 ± 1.5	28,4 ± 5.3
Glucose	6.4 ± 5.8	5.7 ± 2.1	13.1 ± 2.5	18.2 ± 5.1
Magnesium	16.8 ± 2.4	23.41 ± 9.2	21.1 ± 0.2	27.0 ± 12.3
Albumin	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.07 ± 0.02

Tabla 2. Niveles de metabolitos (mg/dl) en la orina. Se evalúan la concentración en orina de urea, creatinina, glucosa, magnesio y albúmina de ratones *Coq9^{+/+}* (N=7) y *Coq9^{XX}* (N=7) a los 3 y 5 meses de vida. Los datos son expresados como la media ±DE.

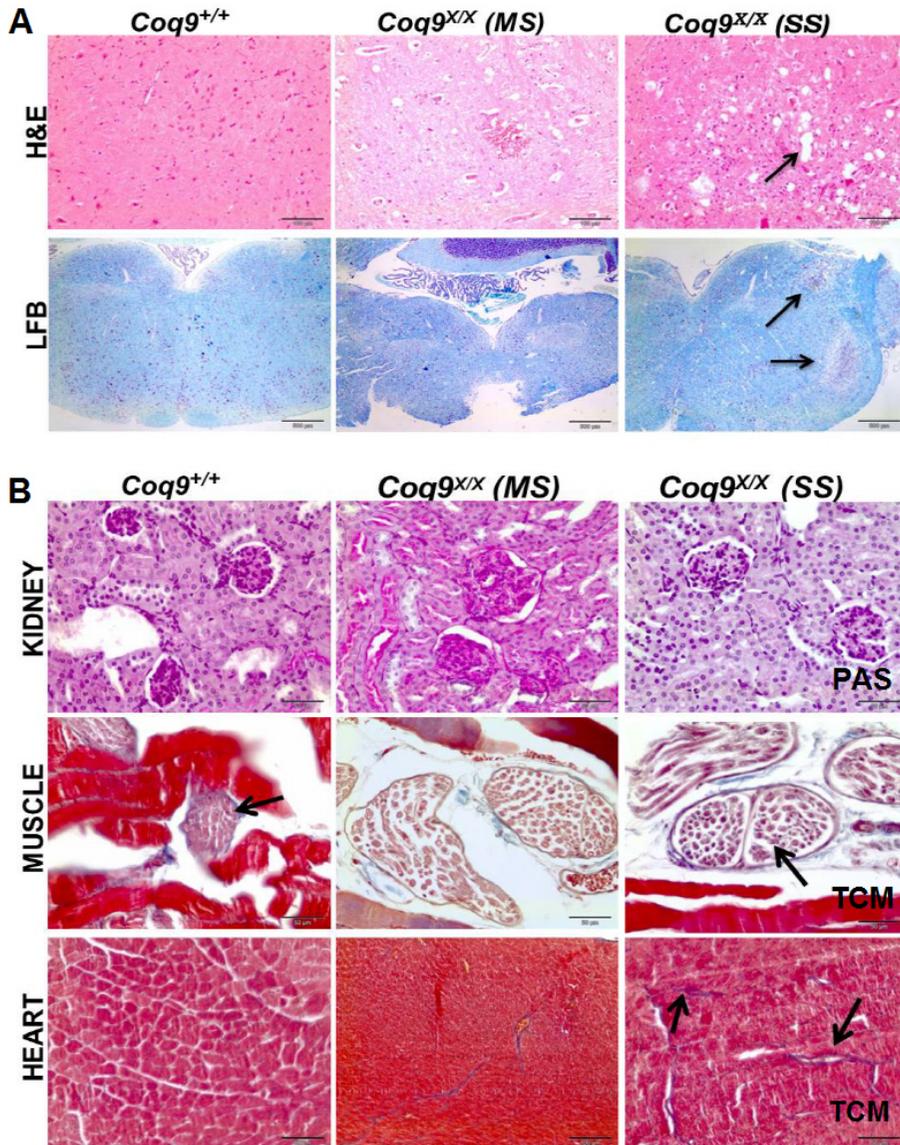


Figura 15. Tinción histológica de secciones de tejidos de ratones *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{XX} (MS) y *Coq9*^{XX} (SS). (A) Tinción de H&E en puente (panel superior, escala 100 μ m). Las flechas señalan vacualización en ratones con SS. Tinción de LFB en tronco encefálico (panel inferior escala 500 μ m). Las flechas señalan áreas de desmielinización. (B) Tinción PAS no revela alteraciones histológicas (panel superior). Tinción TCM en músculo esquelético muestra severa desmielinización de fibras nerviosas (panel medio) e incremento de tejido conectivo entre células cardiacas en ratones *Coq9*^{XX} con SS (panel inferior). Escala 50 μ m.

Considerando los cambios histopatológicos hallados en cerebro realizamos seguidamente ensayos inmunohistoquímicos en distintas secciones del mismo. El análisis de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) revela un incremento en el número de astrocitos en ratones *Coq9^{XX}*, los cuales presentan cuerpos celulares alargados, especialmente en puente, cerebelo y encéfalo (**Figura 16A-B**). La inmunohistoquímica realizada con el anticuerpo primario tubulina beta III (TUJ1) revela pérdida de dendritas de las neuronas en ratones *Coq9^{XX}*, más evidente en ratones con SS (**Figura 16A-B**). Por el contrario, la inmunohistoquímica realizada usando anticuerpo frente a oligodendrocitos no revela ninguna diferencia entre ratones wild-type y homocigotos (**Figura 16A**), a excepción de un área de daño observada en el puente que no se tiñó con ninguna tinción usada.

Por lo tanto, los resultados histopatológicos encontrados en el ratón *Coq9^{XX}* indican signos de una encefalomiopatía predominante con degeneración espongiiforme, astrogliosis y muerte neuronal.

4. LOS DEFECTOS EN LA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL SE RELACIONAN CON EL FENOTIPO ENCEFALOMIOPÁTICO EN RATONES *Coq9^{XX}*.

A pesar de que los niveles de CoQ se encuentran reducidos en todos los tejidos, el órgano más dañado en los ratones *Coq9^{XX}* es el cerebro. Esto se ve reflejado también en el análisis de los niveles basales de ATP donde se parecía una disminución significativa de los niveles de ATP sólo en cerebro (**Figura 17A**). Esta reducción de ATP se debe a un defecto en la respiración mitocondrial acoplada a la

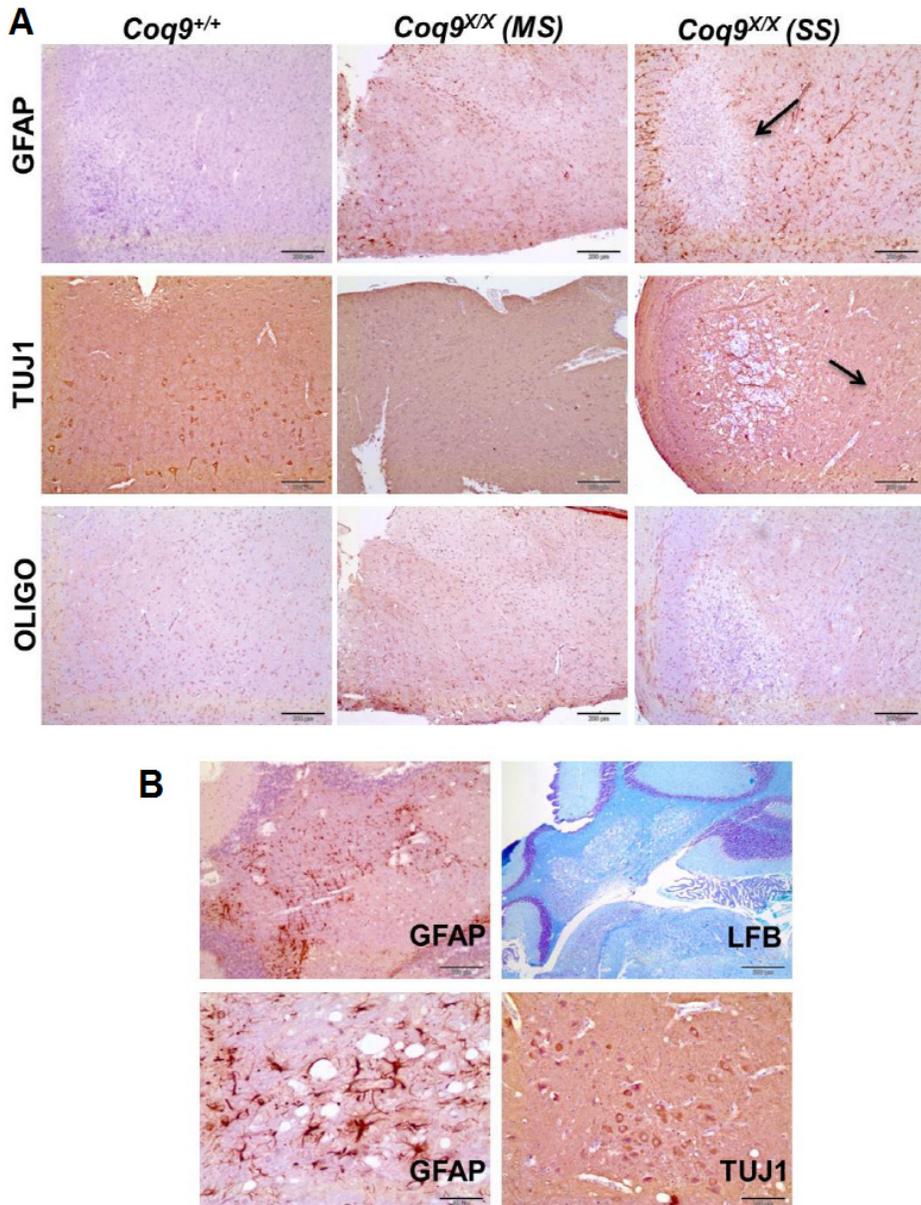


Figura 16. Tinción histológica e inmunohistoquímica de secciones cerebrales de ratones *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{XX} (MS) y *Coq9*^{XX} (SS). (A) Anti-GFAP (panel superior, escala 200 μm). La flecha señala un área ausente de tinción en el puente de ratones *Coq9*^{XX} (SS). Anti-tubulina β-III (TUJ1) (panel medio, escala 200 μm). La flecha señala mayor pérdida dendrítica en el puente de ratones *Coq9*^{XX} (SS). Anti-oligodendrocitos (panel inferior, escala 200 μm). (B) Anti-GFAP y LFB, TUJ1 de cerebelo de homocigotos (escala 200 μm).

fosforilación oxidativa, como lo demuestra la disminución del índice ATP/ADP (**Figura 17B**).

Debido a que la CoQ es un componente esencial de la cadena respiratoria mitocondrial, la depleción de ATP en cerebro debe reflejar un defecto en la respiración mitocondrial. En efecto, la respiración estimulada por ADP (estado 3) está reducida en cerebro de los ratones *Coq9^{XX}* usando sustratos para el complejo I (**Tabla 3**) y para el complejo II (succinato) (**Tabla 4**). Sin embargo, el estado 4 usando

sustratos para el complejo I está incrementado (**Tabla 3**) mientras disminuye cuando se usan sustratos para el complejo II (**Tabla 4**). Estos resultados sugieren que la respiración a través del complejo I está parcialmente desacoplada en el cerebro de los ratones *Coq9^{XX}*. Como consecuencia de esto, el índice de control respiratorio (RCRs) está reducido significativamente en cerebro (**Figura 17C**). La disminución del RCR por glutamato+malato fue mayor (64%) que la reducción encontrada con succinato (36%). Este hecho sugiere que la respiración a través del complejo I se ve más afectada que la que cursa a través del complejo II en cerebro de los ratones homocigotos.

Por otro lado, las mitocondrias de músculo esquelético y corazón de ratones *Coq9^{XX}* muestran una reducción global del consumo de oxígeno (**Tabla 3 y 4**), aunque no muestran cambios en el RCR (**Figura 17C-D**). En el caso del riñón, no se encontraron diferencias en la respiración mitocondrial a través del complejo I entre los ratones *Coq9^{XX}* y wild-type, mientras el estado 3 y 4 está ligeramente reducido a través del complejo II (**Tabla 4**). Aun así, no se encontraron

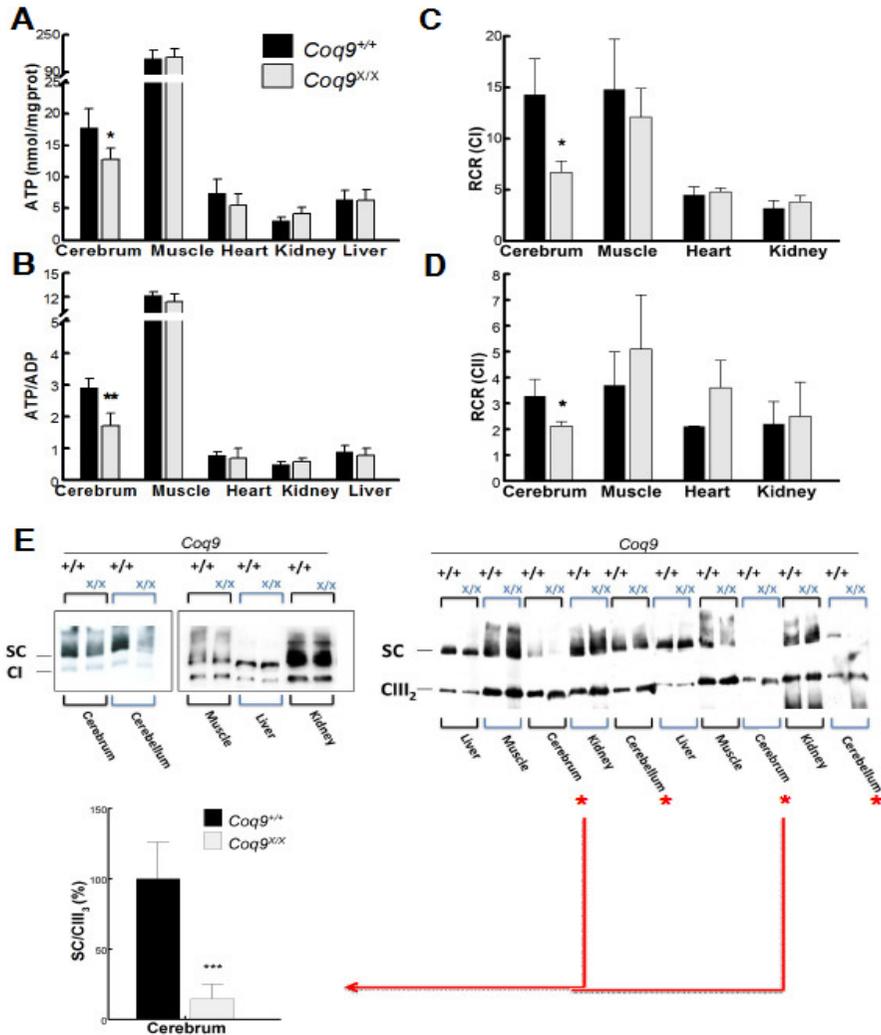


Figura 17. Evaluación de la bioenergética en tejidos y mitocondrias de ratones de 3 meses de vida. (A) Niveles de ATP en diferentes tejidos y (B) ratio ATP/ADP de ratones *Coq9*^{+/+} (N=7) y *Coq9*^{X/X} (N=7). Los datos son expresados como la media \pm SD **P* < 0.05; ***P* < 0.01 vs. *Coq9*^{+/+}. (C-D) Media de la respiración mitocondrial, con N=5 animales por grupo, representada por el RCR usando (C) glutamato/malato como sustrato para el complejo I (D) succinato como sustrato para el complejo II. Los datos son expresados como la media \pm DE **P* < 0.05. (E) “BNGE” seguido de inmunodetección para los SC mitocondriales en ratones *Coq9*^{+/+} (N=7) y *Coq9*^{X/X} (N=7). Las membranas se incuban con anti-NDUFA9 (panel izquierdo) y anti-Core I (panel derecho) para detectar complejo I y III respectivamente. El asterisco rojo indica las diferencias entre *Coq9*^{+/+} y *Coq9*^{X/X}. Densitometría de banda correspondiente al ratio SC/CIII (panel inferior izquierdo). Los datos son expresados como la media \pm DE **P* < 0.005 vs. *Coq9*^{+/+}.

diferencias en el RCR entre ratones $Coq9^{+/+}$ y $Coq9^{XX}$. (**Figura 17C-D**).

En virtud de los resultados obtenidos en mitocondrias de cerebro, se realizó la medida de la actividad I+III para confirmar el defecto bioenergético y se observó que los ratones $Coq9^{XX}$ tienen reducidos significativamente los niveles de la actividad dependiente de CoQ y que ésta sólo se recupera parcialmente con la adición de decilubiquinona. (**Figura 18**). Esto sugiere la presencia de un daño estructural que impediría la recuperación total de la actividad del CI+III tras la adición de decilubiquinona. En este sentido, sabemos que los complejos respiratorios mitocondriales se ensamblan para formar estructuras supramoleculares más eficientes llamados *supercomplejos respiratorios (SC)* o *respirasomas*, los cuales se comportan como una entidad fisiológica y funcional (Acin-Perez et al., 2008). Puesto que la CoQ está presente en algunas variantes de SC (Acin-Perez et al., 2008), es razonable pensar que la formación y estabilidad de estos supercomplejos podrían verse afectadas con una deficiencia en CoQ.

Para saber si la base del déficit bioenergético observado se corresponde con alteraciones en la formación y/o estabilidad de los SC, se hace una valoración de estas estructuras en diversos tejidos. Para ello, se realiza un análisis de electroforesis en geles nativos (BNGE) e inmunodetección con anticuerpos frente a proteínas de los complejos respiratorios. Cuando las membranas se incuban con anti-NDUFA9, un anticuerpo frente a una subunidad del complejo I, no se observan diferencias en la cantidad de complejo I que forma SC entre ratones

	State 3 – CI (pmol/(s * mg pt))		State IV – CI (pmol/(s * mg pt))	
	<i>Coq9</i> ^{+/+}	<i>Coq9</i> ^{X/X}	<i>Coq9</i> ^{+/+}	<i>Coq9</i> ^{X/X}
Cerebrum	4594 ± 283	3268 ± 65 ***	328 ± 59	496 ± 73 **
Skeletal. M	6766 ± 1004	2375 ± 326 ***	464 ± 138	204 ± 73 *
Kidney	811 ± 78	921 ± 76	262 ± 85	243 ± 21
Heart	1796 ± 381	1220 ± 383 *	401 ± 56	254 ± 59 *

Tabla 3. Consumo de Oxígeno mitocondrial bajo condiciones de estimulación de ADP (estado 3) y cuando el ADP se agota (estado 4). Se usan sustratos (glutamato+malato) para el complejo I mitocondrial. Los datos son expresados como la media ±DE con N= 5 animales por grupo. $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.005$ versus *Coq9*^{+/+}.

	State 3 – CII (pmol/(s * mg pt))		State 4 – CII (pmol/(s * mg pt))	
	<i>Coq9</i> ^{+/+}	<i>Coq9</i> ^{X/X}	<i>Coq9</i> ^{+/+}	<i>Coq9</i> ^{X/X}
Cerebrum	7508 ± 1184	2907 ± 614 ***	2310 ± 218	1368 ± 241***
Skeletal. M	6265 ± 1442	3842 ± 1777 *	1676 ± 259	785 ± 448 *
Kidney	2639 ± 974	1596 ± 471	1228 ± 46	672 ± 164 **
Heart	5572 ± 2428	4830 ± 1971	2649 ± 1149	1398 ± 261 *

Tabla 4. Consumo de Oxígeno mitocondrial bajo condiciones de estimulación de ADP (estado 3) y cuando el ADP se agota (estado 4). Se usa succinato como sustrato para el complejo II mitocondrial. Los datos son expresados como la media ±DE con N= 5 animales por grupo * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.005$ versus *Coq9*^{+/+}.

Coq9^{+/+} y *Coq9*^{X/X} a los 3 meses de edad (**Figura 17E**). A excepción de cerebro y cerebelo donde la cantidad de complejo I está disminuida (**Figura 17E**).

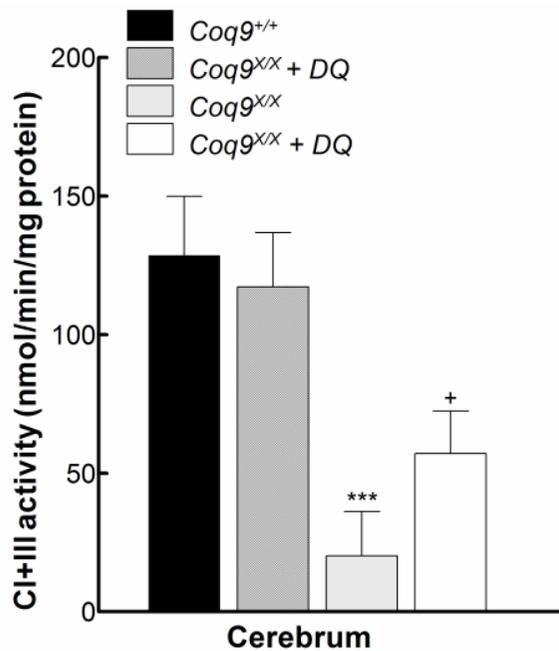


Figura 18. Actividad del CI+III en mitocondria de cerebro. Esta actividad se mide en ratones *Coq9*^{+/+} (N=5) y *Coq9*^{XX} (N=5) a los 3 meses de vida. También se mide la actividad añadiendo 5 μ M decilubiquinona (DQ). Los datos son expresados como la media \pm DE. **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.005 versus *Coq9*^{+/+}.

También se realizó inmunodetección del complejo III, usando un anticuerpo que reconoce a la subunidad Core I. En este caso, se observa que el cerebro y cerebelo de ratones *Coq9*^{XX} (**Figura 17E**) presentan un aumento de los niveles de complejo III libre respecto al que forma SC (**Figura 17E**). Por lo tanto, el cerebro de los ratones *Coq9*^{XX} muestran una correlación directa entre el déficit de CoQ, aumento del complejo III libre, respiración mitocondrial y síntesis de ATP.

5. ESTRÉS OXIDATIVO EN CEREBRO DE LOS RATONES *Coq9^{X/X}*

Las deficiencias de los componentes de la cadena respiratoria mitocondrial, en algunos casos, están asociadas al incremento de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), que pueden inducir un aumento de daño oxidativo. En el caso particular de la deficiencia en CoQ, algunos autores han descrito un incremento del estrés oxidativo cuando los niveles residuales de CoQ se encuentran entre el 30-45% en fibroblastos humanos (Quinzii et al., 2010; Quinzii et al., 2008; Quinzii et al., 2012) o 46-76% en líneas celulares de neuronas humanas (Duberley et al., 2013).

Con el fin de conocer si el estrés oxidativo está involucrado en la patología del cerebro en ratones *Coq9^{X/X}*, se lleva a cabo una detección inmunohistoquímica de 8-OHdG y MDA, dos marcadores de daño oxidativo, en distintas secciones cerebrales. El análisis de dichos marcadores revela un aumento en el número de células positivas frente a la 8-OHdG en los ratones *Coq9^{X/X}* (**Figura 19A-B**), así como un incremento en la intensidad de la tinción en el puente (**Figura 19C-F**). En el caso del 4-HNE, no se apreciaron diferencias importantes entre ratones *Coq9^{+/+}* y *Coq9^{X/X}*, si bien algunas neuronas del encéfalo de los mutantes mostraron un incremento de intensidad de este marcador (**Figura 19G-H**).

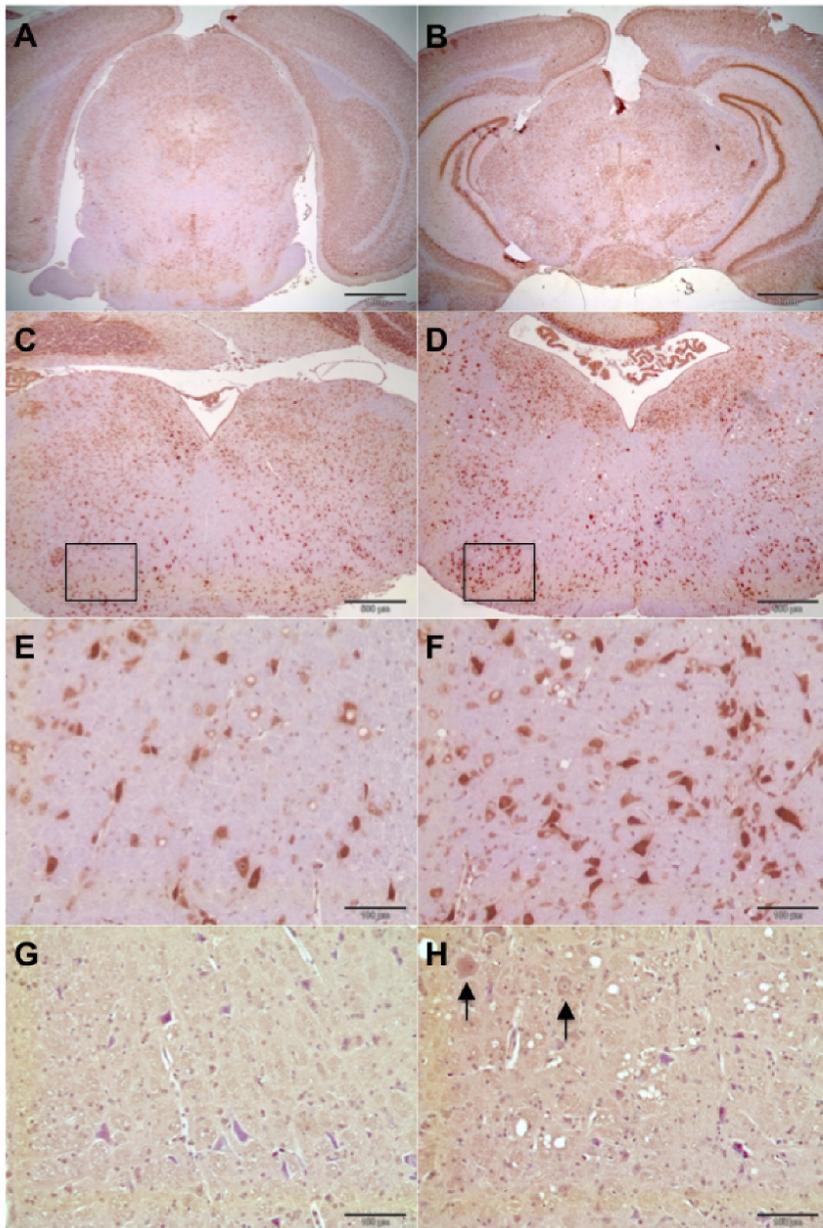


Figura 19. Evaluación del daño oxidativo en cerebro. (A-F) Inmunohistoquímica para 8-OHdG en cerebro de ratones (A, C y E) *Coq9*^{+/+} y (B, D y F) *Coq9*^{XX} a los 3 meses de vida (escala: A y B, 1mm; C y D, 500 μm; E y F, 100 μm). (G-H) Inmunohistoquímica para 4-HNE de ratones (G) *Coq9*^{+/+} y (H) *Coq9*^{XX} a los 3 meses de vida (escala, 100 μm).

6. EL DEFICIT ENERGÉTICO EN LAS NEURONAS ACTIVA LA APOPTOSIS POR LA VÍA CASPASA-INDEPENDIENTE.

El fallo bioenergético y aumento de daño oxidativo puede inducir la muerte neuronal observada en los ratones mutantes. Para dilucidar las causas que sobrellevan la muerte neuronal inicialmente se realizó el ensayo de TUNEL, que detecta la fragmentación del DNA que puede ser como resultado de la apoptosis, en distintas secciones cerebrales. Las imágenes obtenidas de cerebros de ratones *Coq9^{X/X}* con MS no muestran presencia de neuronas apoptóticas (**Figura 12A**). Sin embargo, en un estadio más avanzado de la enfermedad, donde los *Coq9^{X/X}* presentan síntomas severos, se observa la aparición de células apoptóticas en el puente y encéfalo (**Figura 12A**). A partir de este dato que confirma muerte neuronal, realizamos un estudio de expresión de una serie de factores relacionados con la apoptosis. Mediante western blot detectamos que los niveles de caspasa-3 y p53, ambos considerados factores pro-apoptóticos, están disminuidos significativamente en cerebro de ratones mutantes.

Además, se evalúa también la expresión de la proteína bcl2 como factor anti-apoptótico, y se observa un aumento significativo de la misma. Estos resultados sugieren que la muerte celular no se produce por activación de la vía de las caspasas. Por ello, pasamos a evaluar una vía de muerte celular por apoptosis pero independiente de las caspasas. Para dicho fin, se mide la expresión del factor de inducción de apoptosis (AIF) en cerebro. La liberación de este factor localizado en las membranas mitocondriales y su translocación al núcleo

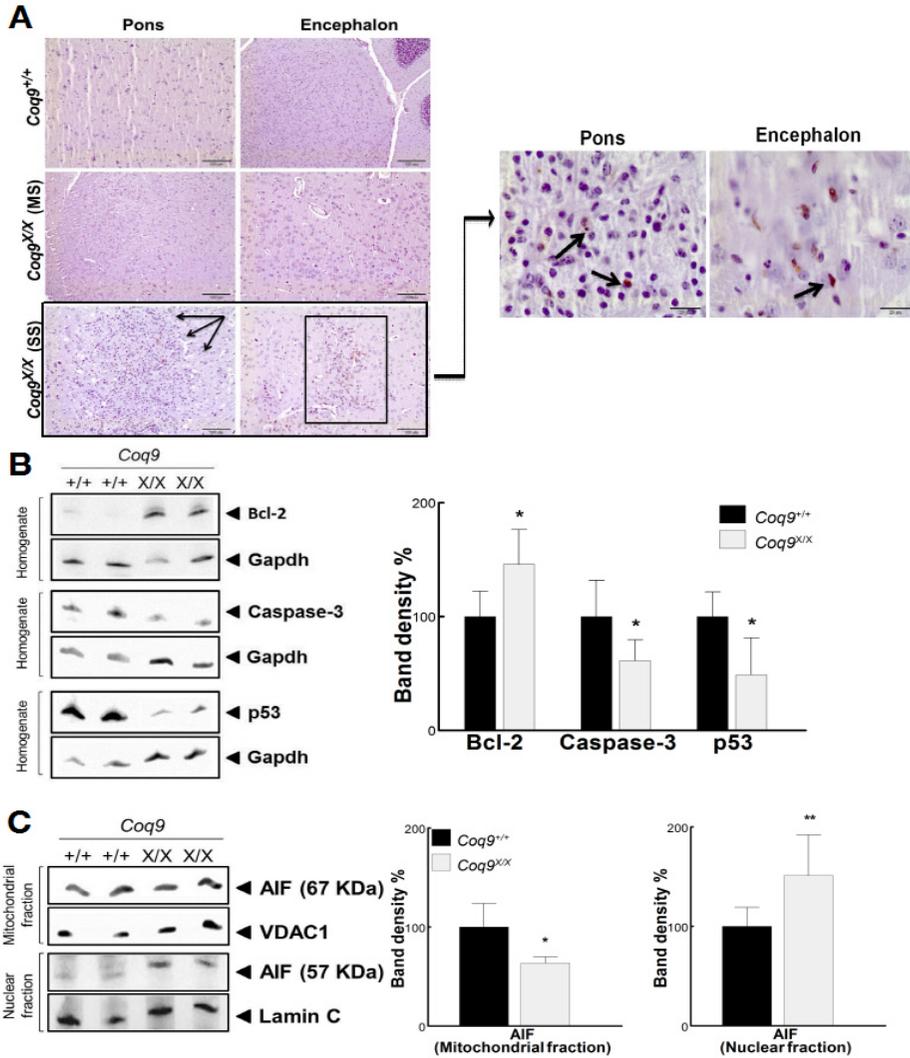


Figura 20. Marcadores apoptóticos en cerebro a los 3 meses de edad. (A) Ensayo de “TUNEL” en puente y encéfalo de ratones *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{XX} (SS) y *Coq9*^{XX} (MS). Las flechas señalan cuerpos apoptóticos en ambas áreas cerebrales de ratones *Coq9*^{XX} (SS) (escala 100 μ m). (B) Análisis de la vía apoptótica mitocondrial dependiente de caspasas en ratones *Coq9*^{+/+} (N=7) y *Coq9*^{XX} (N=7). Los resultados se cuantifican por densitometría (panel derecho) y los datos se expresan como la media \pm DE. **P* < 0.05 vs *Coq9*^{+/+}. (C) Análisis de la vía apoptótica mitocondrial independiente de caspasas en ratones *Coq9*^{+/+} (N=7) y *Coq9*^{XX} (N=7). Los resultados se cuantifican por densitometría (panel derecho) y los datos son expresados como la media \pm DE. **P* < 0.05; ***P* < 0.01 vs *Coq9*^{+/+}.

promueve las señales que inician la muerte celular, como la condensación de los cromosomas y fragmentación del DNA. Los análisis por western blot revelan una disminución del factor en mitocondria junto con un aumento en núcleo de los ratones $Coq9^{XX}$ con respecto a los ratones $Coq9^{+/+}$. Estos resultados sugieren una translocación de AIF de la mitocondria al núcleo y, en consecuencia, una activación de la vía independiente de las caspasas.

Experimental group	Plasma CoQ ₁₀ (μM)
$Coq9^{+/+}$	UND
$Coq9^{XX} + V$	UND
$Coq9^{XX} + Q_{10}$	1.4 ± 0.7
$Coq9^{XX} + Q_{10}H_2$	2.1 ± 0.7

Tabla 5. Concentración de CoQ₁₀ en ratones $Coq9^{XX}$ después de dos meses de tratamiento. Los datos son expresados como la media ±DE de 7 animales por grupo. V= Vehículo; Q₁₀= ubiquinona-10; Q₁₀H₂= ubiquinol-10; UND= no detectable.

7. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON UBIQUINONA-10 Y UBIQUINOL-10 DURANTE 2 MESES SOBRE DISTINTOS PARÁMETROS.

7.1. NIVELES DE CoQ₁₀ EN SUERO Y TEJIDOS.

Tras la administración de ambos tratamientos se produce un incremento de los niveles de CoQ₁₀ en plasma de ratones *Coq9^{XX}*. Los niveles de CoQ₁₀ detectados en los mutantes son superiores cuando se administra ubiquinol-10 que cuando se administra ubiquinona-10 (**Tabla 5**). El tratamiento con el vehículo no produce ningún efecto sobre los niveles de CoQ del plasma. En tejidos, tras la administración de ubiquinona-10 se observa un incremento significativo de CoQ₁₀ sólo en hígado y músculo esquelético. Sin embargo, cuando se administra ubiquinol-10 se produce un aumento significativo generalizado, en cerebro, cerebelo, corazón, riñón, hígado y músculo esquelético. (**Figura 21**). El incremento de los niveles de CoQ₁₀ después del tratamiento es paralelo a la disminución del índice CoQ₉/CoQ₁₀ (**Figura 22**), indicando que estas terapias no afectan a los niveles de CoQ₉. Hay que destacar también que el aumento de los niveles de CoQ₁₀ es mayor en hígado y músculo esquelético seguidos de corazón, riñón, cerebro y cerebelo. En el caso de corazón y músculo esquelético los niveles alcanzados de CoQ₁₀ en los mutantes es similar a los wild-type, mientras que el hígado es el que más CoQ₁₀ acumula tras el tratamiento con ubiquinona-10 y ubiquinol-10 (**Figura 21**).

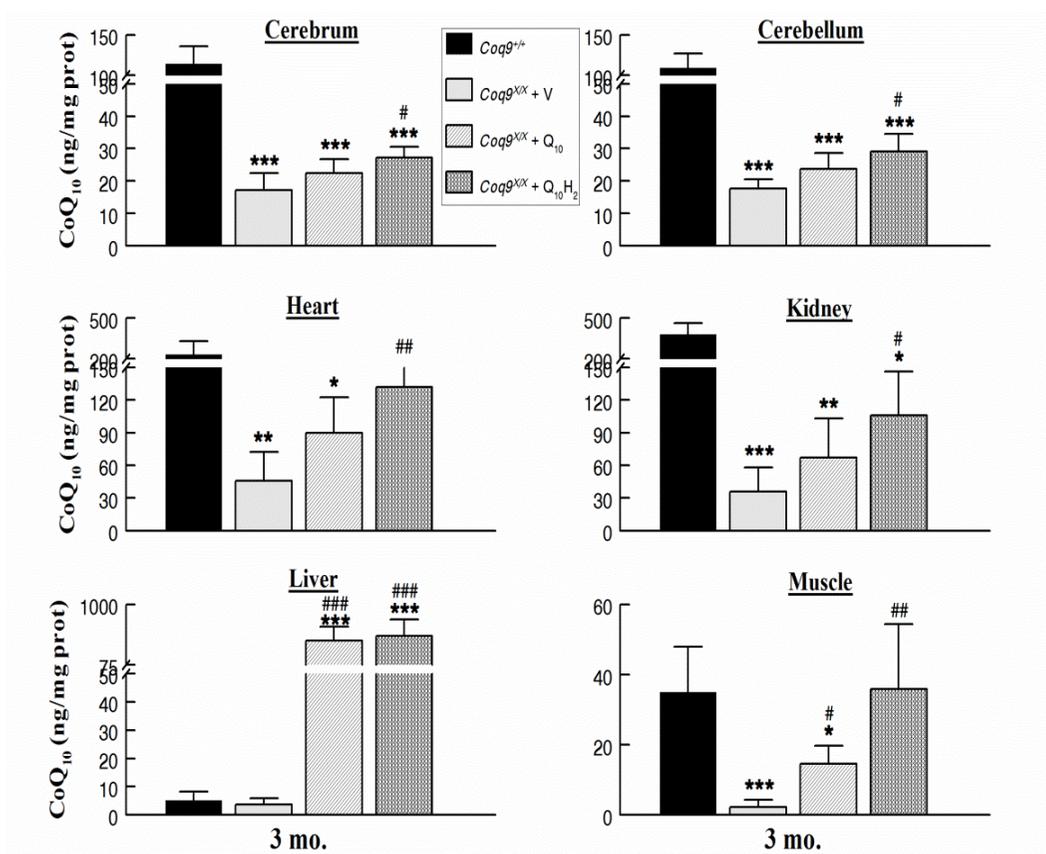


Figura 21. Niveles de CoQ₁₀ en homogenado de tejido de ratones *Coq9^{XX}* después de dos meses de tratamiento. Niveles de CoQ₁₀ en cerebro, cerebelo, corazón, riñón, hígado y músculo esquelético de ratones *Coq9^{+/+}* (N=10), *Coq9^{XX} + V* (N=10), *Coq9^{XX} + Q₁₀* (N=10) y *Coq9^{XX} + Q₁₀H₂* (N=10). Los datos son expresados como la media ±DE. V = vehículo; Q₁₀ = ubiquinona-10; Q₁₀H₂ = ubiquinol-10. **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.005 vs. *Coq9^{+/+}*; #*P* < 0.05; ###*P* < 0.01 vs. *Coq9^{XX} + V*.

7.2. NIVELES DE COQ Y FUNCIÓN MITOCONDRIAL DE RATONES *Coq9^{XX}*.

Tras dos meses de tratamiento, se observa un aumento de los niveles de CoQ₁₀ mitocondrial en los ratones *Coq9^{XX}* tratados con ubiquinol-10, mientras el suplemento con vehículo o ubiquinona-10 no

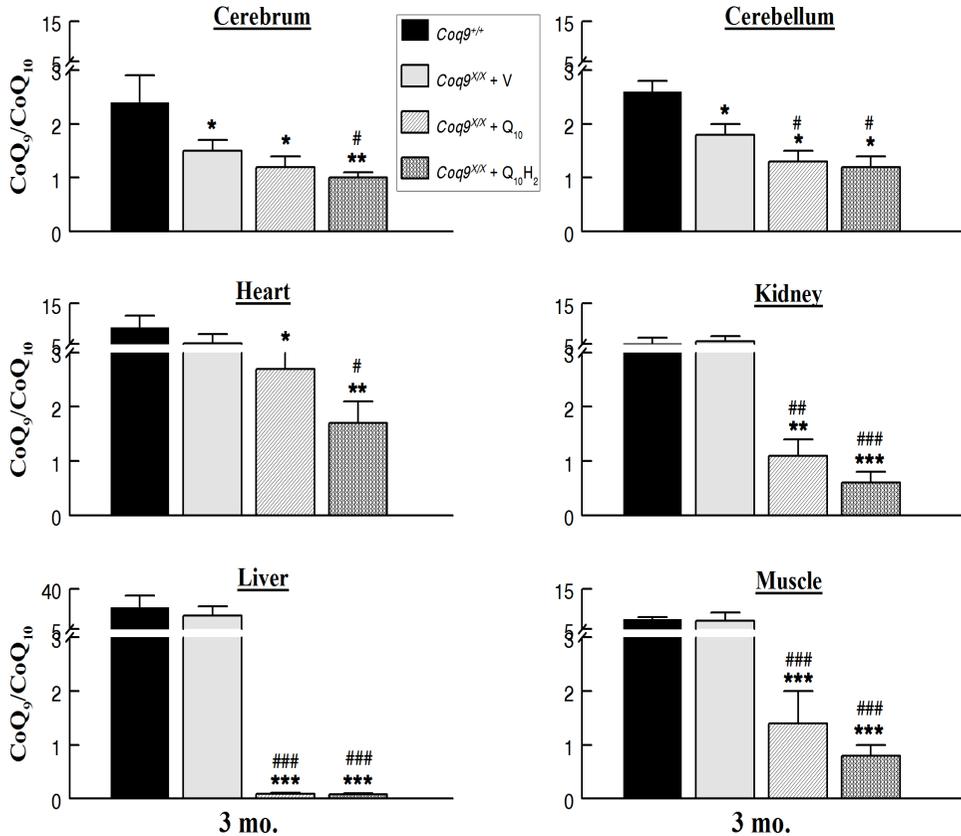


Figura 22. Niveles de CoQ₁₀ en homogenado de tejido de ratones *Coq9*^{XX} después de dos meses de tratamiento. Ratio CoQ₉/CoQ₁₀ de cerebro, cerebelo, corazón, riñón, hígado y músculo esquelético de ratones *Coq9*^{+/+} (N=10), *Coq9*^{XX} + V (N=10), *Coq9*^{XX} + Q₁₀ (N=10) y *Coq9*^{XX} + Q₁₀H₂ (N=10). Los datos son expresados como la media ±DE. V = vehículo; Q₁₀ = ubiquinona-10; Q₁₀H₂ = ubiquinol-10. **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.005 vs. *Coq9*^{+/+}; #*P* < 0.05; ##*P* < 0.01; ###*P* < 0.01 vs. *Coq9*^{XX} + V.

tiene efecto (**Figura 23A**). El tratamiento con ubiquinol-10 también incrementa el pool total de CoQ mitocondrial (CoQ₉+CoQ₁₀) (**Figura 23B**) disminuyendo el índice CoQ₉/CoQ₁₀ (**Figura 23C**).

7.3. ACTIVIDAD DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL Y SUPERCOMPLEJOS EN CEREBRO DE RATONES *Coq9^{XX}*.

El incremento de los niveles de CoQ₁₀ en mitocondrias de cerebro de ratones *Coq9^{XX}* tras el tratamiento con ubiquinol-10 induce un incremento significativo de la actividad CI+III (**Figura 23D**) y la normalización de la actividad del CII+III (**Figura 23E**). Por el contrario, la administración de vehículo o ubiquinona-10 no produce ningún cambio en las actividades respiratorias dependientes de CoQ (**Figura 23D-E**).

El incremento de dichas actividades tras el tratamiento con ubiquinol-10 no se debe al aumento de la formación de SC I/III debido a que el índice I/III / CIII libre permanece reducido en todos los homocigotos tratados, ya sea con vehículo, ubiquinona-10 o ubiquinol-10, con respecto al wild-type (**Figura 24A-C**). Asimismo, el índice SC I/III / CI libre (**Figura 25A**) y la actividad en gel del CI fue similar en todos los grupos experimentales (**Figura 25B**).

7.4. CUADRO HISTOPATOLÓGICO Y DAÑO OXIDATIVO EN CEREBRO DE *Coq9^{XX}*.

Los ratones *Coq9^{XX}* muestran vacualización de la sustancia blanca, astrogliosis reactiva severa, reducción de las dendritas neuronales e incremento del daño oxidativo al DNA, especialmente en el diencéfalo y tronco encefálico. El tratamiento con vehículo en los ratones *Coq9^{XX}* no produjo ningún cambio a nivel histopatológico ya que seguían presentando vacualización de la sustancia blanca (

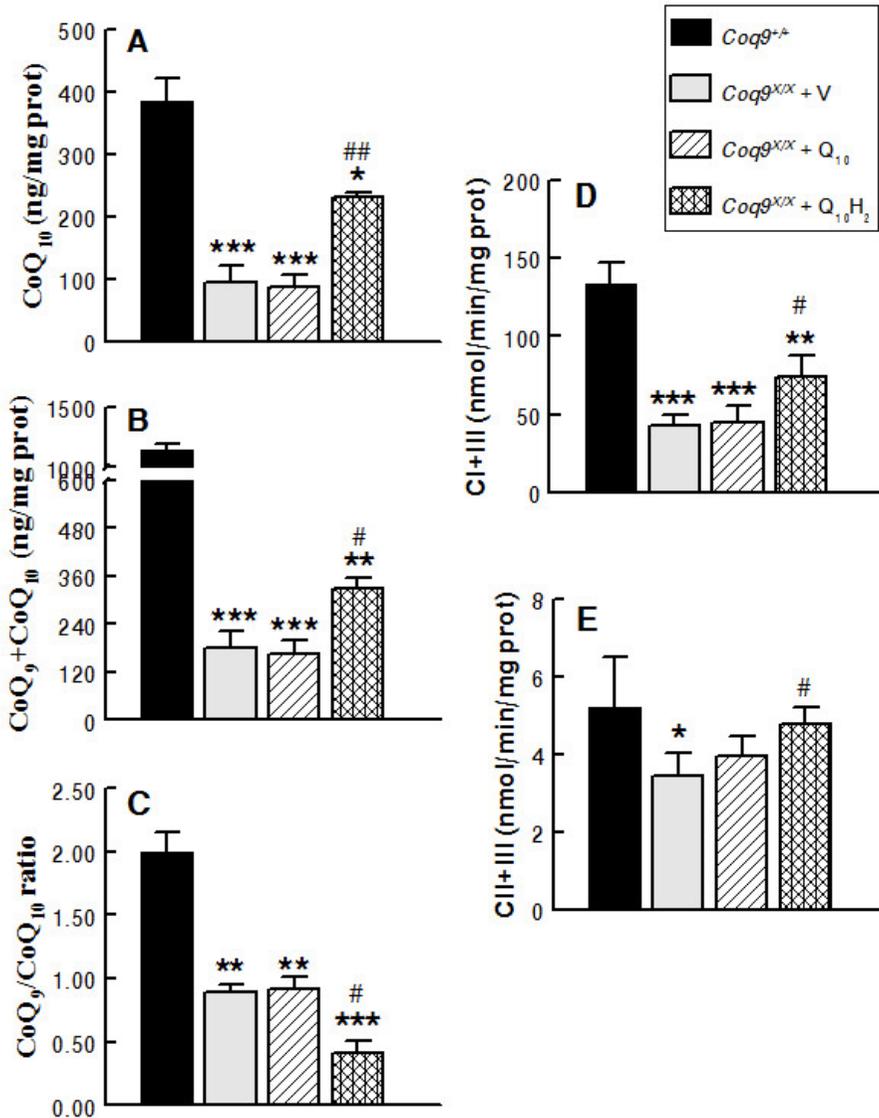


Figura 23. Niveles mitocondriales de CoQ y actividad de la cadena respiratoria dependiente de CoQ en cerebro de ratones *Coq9^{XX}* después de dos meses de tratamiento. (A) niveles de CoQ₁₀, (B) niveles de CoQ₉+CoQ₁₀ y (C) ratio CoQ₉/CoQ₁₀ de ratones *Coq9^{+/+}* (N=7), *Coq9^{XX} + V* (N=7), *Coq9^{XX} + Q₁₀* (N=7) y *Coq9^{XX} + Q₁₀H₂* (N=7). (D) Actividad mitocondrial de los complejos I+III y (E) actividad mitocondrial de los complejos II+III. Los datos son expresados como la media ±DE. V = vehículo; Q₁₀ = ubiquinona-10; Q₁₀H₂ = ubiquinol-10. **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.005 vs. *Coq9^{+/+}*; #*P* < 0.05; ##*P* < 0.01 vs. *Coq9^{XX} + V*.

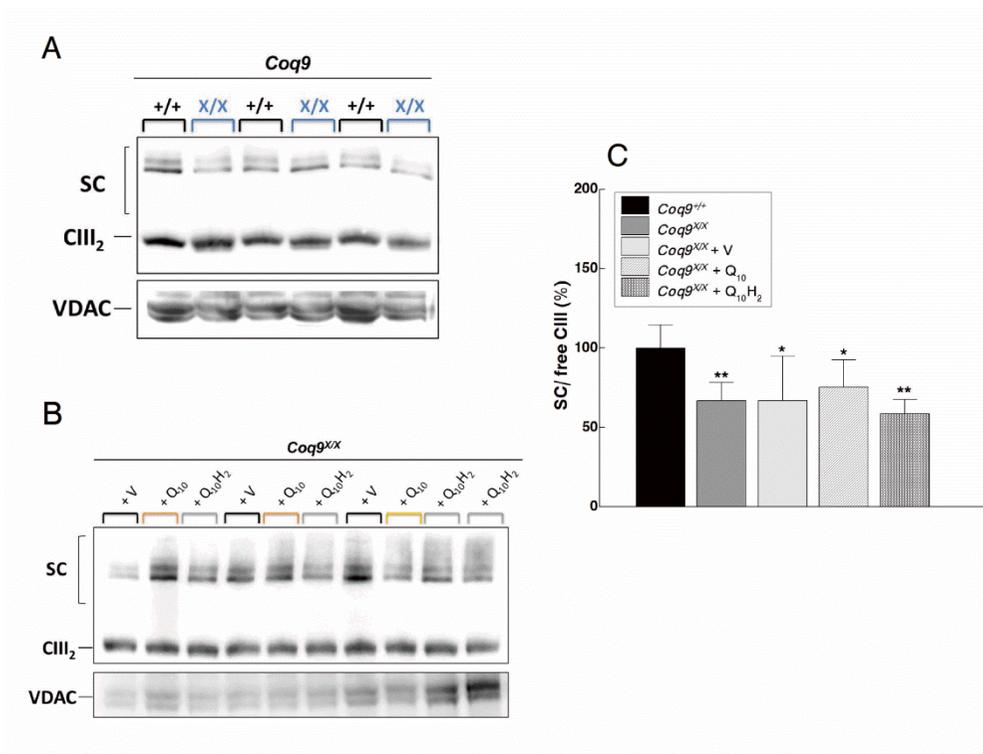


Figura 24. Estudio del ensamblaje y/o estabilidad de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial en cerebro de ratones *Coq9^{X/X}* después de dos meses de tratamiento. “Blue-native” gel electrophoresis (BNGE) e inmunodetección del CIII asociado a SC mitocondrial en ratones de 3 meses (A) *Coq9^{+/+}* (N=7) y *Coq9^{X/X}* (N=7); (B) *Coq9^{X/X}* + V (N=7), *Coq9^{X/X}* + Q₁₀ (N=7) y *Coq9^{X/X}* + Q₁₀H₂ (N=7). Anti-Core I para detectar el complejo III y anti-VDAC1 como control de fracción mitocondrial. (C) Densitometría del ratio SC/CIII libre tomando como el 100% los valores del ratón *Coq9^{+/+}*. Los datos son expresados como la media ±DE. V = vehículo; Q₁₀ = ubiquinona-10; Q₁₀H₂ = ubiquinol-10. **P* < 0.05; ***P* < 0.01 vs. *Coq9^{+/+}*.

Figura 26C-D), proliferación de astrocitos en diencéfalo (**Figura 26K-L**), así como incremento de oxidación al DNA tanto en diencéfalo como en septo-estriado (**Figura 27C, D, K, L**) comparados con el ratón *Coq9^{+/+}* (**Figura 26A, B, I, J; Figura 27A, B, I, J**). El tratamiento con

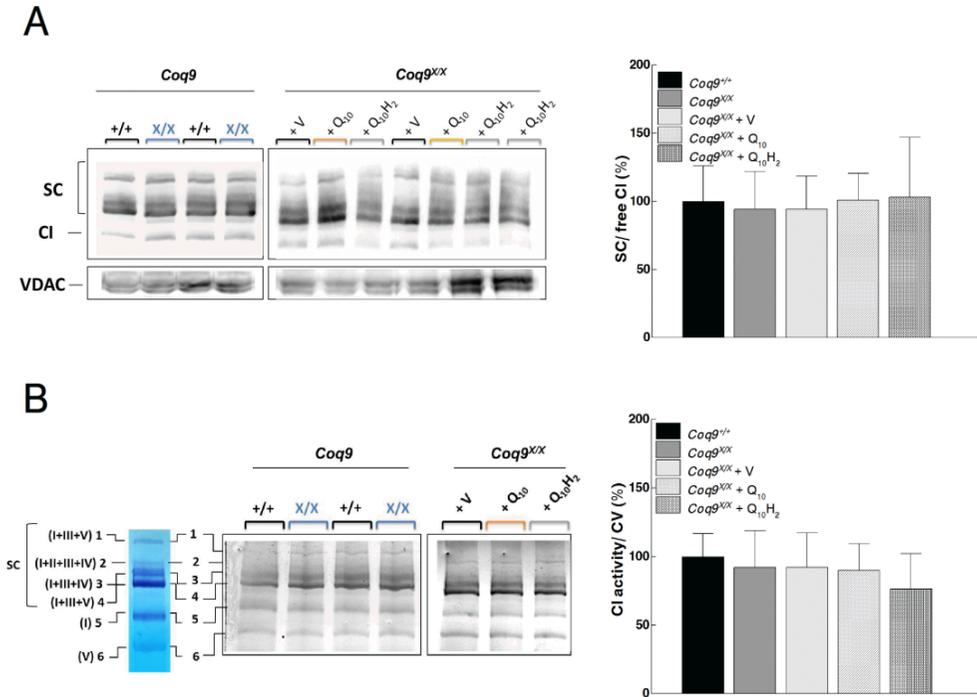


Figura 25. Estudio del ensamblaje y/o estabilidad de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial en cerebro de ratones $Coq9^{X/X}$ después de dos meses de tratamiento. “Blue-native” gel electrophoresis (BNGE) e inmunodetección del CI asociado a SC mitocondrial en ratones de 3 meses (A) $Coq9^{+/+}$ (N=7), $Coq9^{X/X}$ (N=7), $Coq9^{X/X} + V$ (N=7), $Coq9^{X/X} + Q_{10}$ (N=7) y $Coq9^{X/X} + Q_{10}H_2$ (N=7). Anti-Nudfa9 para detectar el CI y anti-VDAC1 como control de fracción mitocondrial. Densitometría del ratio SC/CI libre tomando como el 100% los valores del ratón $Coq9^{+/+}$ (B) Actividad en gel del CI en ratones $Coq9^{+/+}$ (N=7), $Coq9^{X/X}$ (N=7), $Coq9^{X/X} + V$ (N=7), $Coq9^{X/X} + Q_{10}$ (N=7) y $Coq9^{X/X} + Q_{10}H_2$ (N=7). Densitometría de la actividad del CI (SC + CI libre) normalizada por la densitometría correspondiente al CV y tomando como el 100% los valores del ratón $Coq9^{+/+}$. Los datos son expresados como la media \pm DE. V = vehículo; Q_{10} = ubiquinona-10; $Q_{10}H_2$ = ubiquinol-10. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs. $Coq9^{+/+}$.

ubiquinona-10 no reduce ni la vacualización (**Figura 26E-F**) ni la astrogliosis (**Figura 26M-N**) en diencefalo, mientras que la inmunoreactividad frente a 8-OHdG estuvo ligeramente disminuida en diencefalo (**Figura 27E-F**) y en septo-estriado (**Figura 27M-N**). Por el contrario, el tratamiento con ubiquinol-10 redujo la vacualización (**Figura 26G-H**), y astrogliosis (**Figura 26O-P**) en diencefalo así como el daño oxidativo al DNA en diencefalo (**Figura 27G-H**) y septo estriado (**Figura 27O-P**). En tronco encéfalico, sin embargo, no se apreciaron diferencias entre el tratamiento con ubiquinona-10 y ubiquinol-10 reduciéndose en ambos casos la astrogliosis y la oxidación al ADN y aumentando la inmunoreactividad neuronal (**Figura 28-29**).

La histología realizada en riñón, músculo esquelético y corazón es similar en todos los grupos experimentales (**Figura 30**).

8. PESO CORPORAL.

Los ratones $Coq9^{XX}$ manifiestan una disminución del peso corporal entre 1-5 meses de vida. El suplemento oral con vehículo no induce cambios en el peso de los mutantes. Por el contrario, tras la administración del tratamiento durante 2 meses con ubiquinona-10 y ubiquinol-10 se observa un aumento en el peso tanto de machos (**Figura 31A**) como de hembras (**Figura 31B**) $Coq9^{XX}$. Aun así, el incremento del peso es mayor con ubiquinol-10 que con ubiquinona-10 en ambos sexos (**Figura 31A-B**).

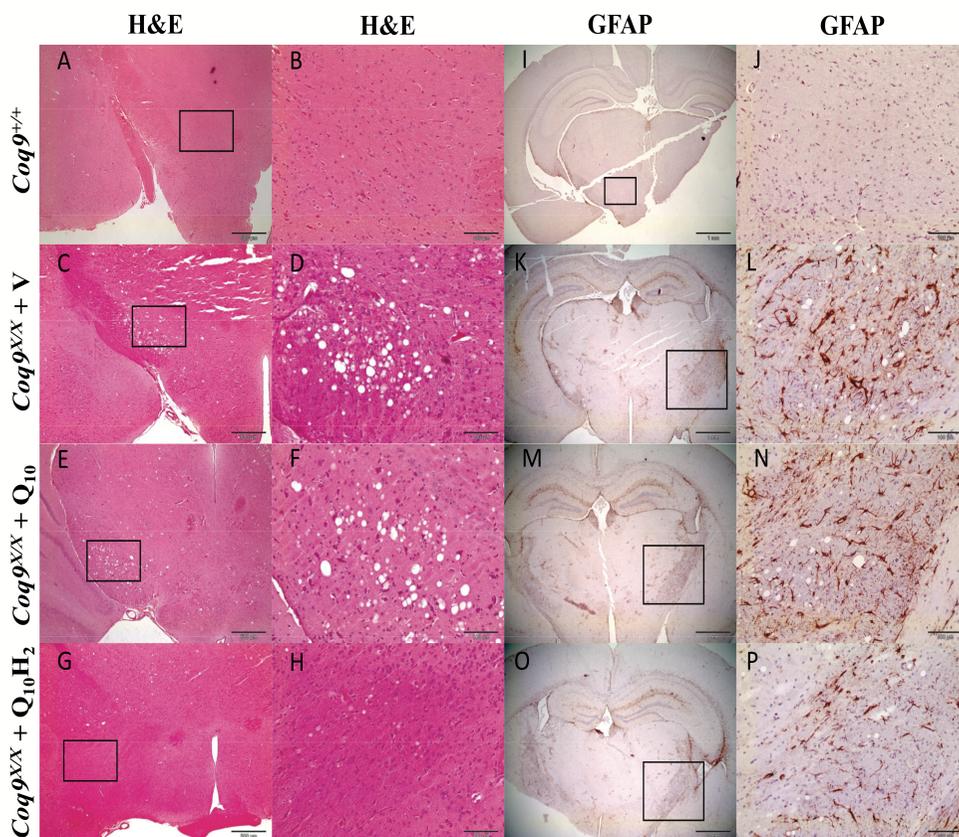


Figura 26. Cambios estructurales y distribución de astrocitos en diencefalo después de dos meses de tratamiento. (A-H) Hematoxilina-eosina (H&E) de ratones (A-B) *Coq9*^{+/+} (N=3) (C-D) *Coq9*^{XX} + V (N=3), (E-F) *Coq9*^{XX} + Q₁₀ (N=3) y (G-H) *Coq9*^{XX} + Q₁₀H₂ (N=3). (I-P) Inmunohistoquímica para GFAP de ratones (I-J) *Coq9*^{+/+} (N=3) (K-L) *Coq9*^{XX} + V (N=3), (M-N) *Coq9*^{XX} + Q₁₀ (N=3) y (O-P) *Coq9*^{XX} + Q₁₀H₂ (N=3). V = vehículo; Q₁₀ = ubiquinona-10; Q₁₀H₂ = ubiquinol-10. (A, C, E y G) y (I, K, M, O), escala, 500 μ m; (B, D, F y H) y (J, L, N y P), escala, 100 μ m.

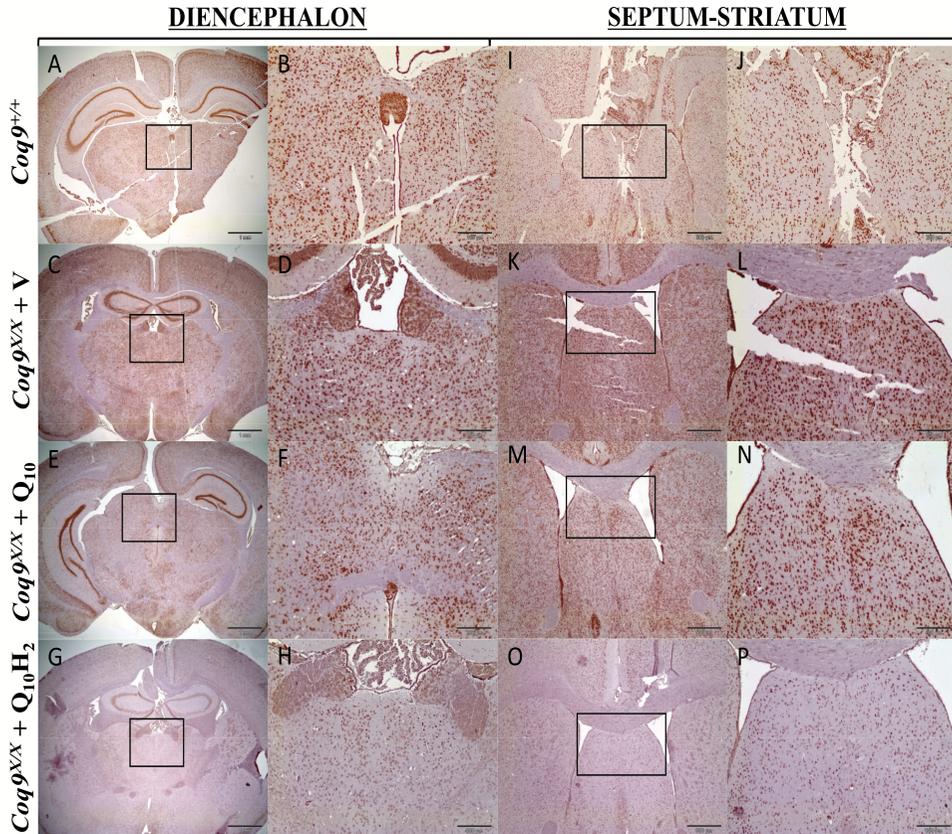


Figura 27 . Inmunohistoquímica para 8-OHdG después de dos meses de tratamiento. (A-H) en diencefalo y (I-P) en septo-estriado de ratones (A, B, I, J) *Coq9*^{+/+} (N=3) (C, D, K, L) *Coq9*^{XX} + V (N=3), (E, F, M, N) *Coq9*^{XX} + Q₁₀ (N=3) y (G, H, O, P) *Coq9*^{XX} + Q₁₀H₂ (N=3). V = vehículo; Q₁₀ = ubiquinona-10; Q₁₀H₂ = ubiquinol-10. (A, C, E, G), escala, 1 mm; (I, K, M, O), escala, 500 μm; (B, D, F, H) y (J, L, N, P), escala, 200 μm.

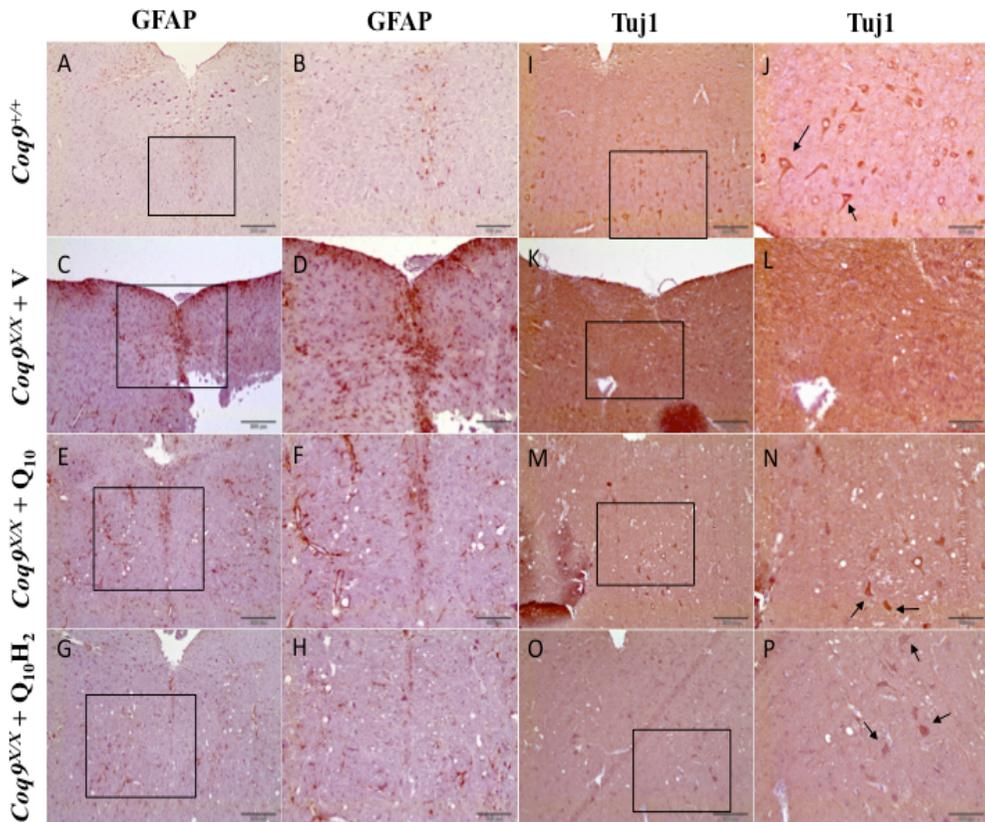


Figura 28. Cambios estructurales y distribución de astrocitos en tronco encefálico después de dos meses de tratamiento. (A-H) Inmunohistoquímica para GFAP de ratones **(A-B)** $Coq9^{+/+}$ (N=3), **(C-D)** $Coq9^{XX} + V$ (N=3), **(E-F)** $Coq9^{XX} + Q_{10}$ (N=3) y **(G-H)** $Coq9^{XX} + Q_{10}H_2$ (N=3). **(I-P)** Tubulina β -III (TUJ1 de ratones **(I-J)** $Coq9^{+/+}$ (N=3), **(K-L)** $Coq9^{XX} + V$ (N=3), **(M-N)** $Coq9^{XX} + Q_{10}$ (N=3) and **(O-P)** $Coq9^{XX} + Q_{10}H_2$ (N=3). V = vehículo; Q_{10} = ubiquinona-10; $Q_{10}H_2$ = ubiquinol-10. **(A-G)**, escala, 500 μ m; **(I-O)**, escala, 200 μ m; **(B-H)** y **(J-P)**, escala, 100 μ m.

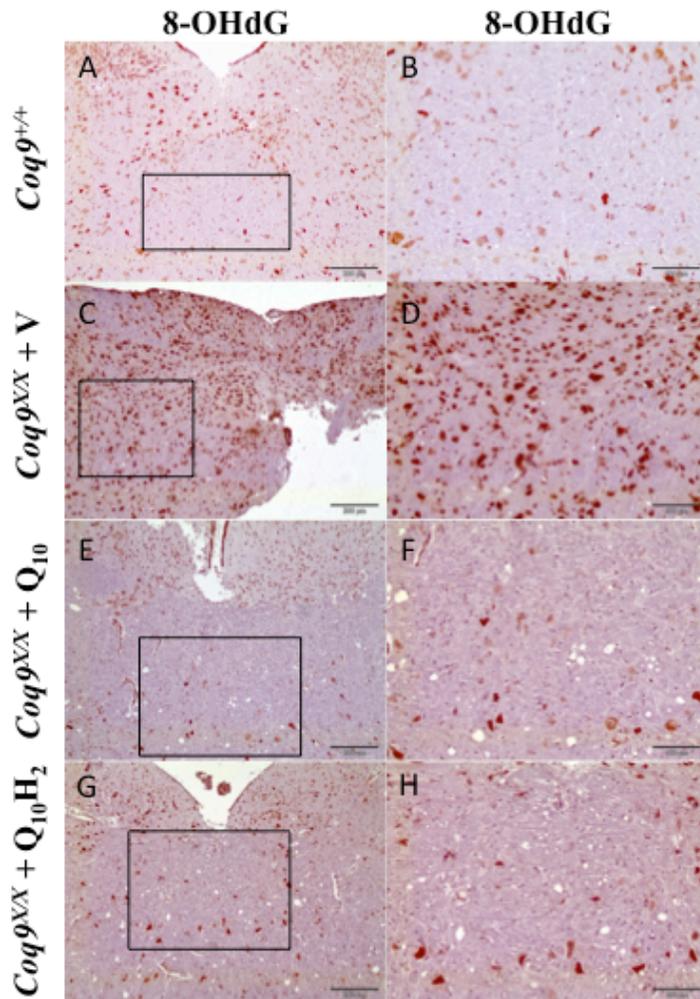


Figura 29. Inmunohistoquímica para marcadores de estrés oxidativo en tronco encefálico después de dos meses de tratamiento. 8-OHdG de ratones (A-B) *Coq9*^{+/+} (N=3), (C-D) *Coq9*^{XX} + V (N=3), (E-F) *Coq9*^{XX} + Q₁₀ (N=3) y (G-H) *Coq9*^{XX} + Q₁₀H₂ (N=3). V = vehicle; Q₁₀ = ubiquinona-10; Q₁₀H₂ = ubiquinol-10. (A-G), escala, 200 μ m; (B-H), escala, 100 μ m.

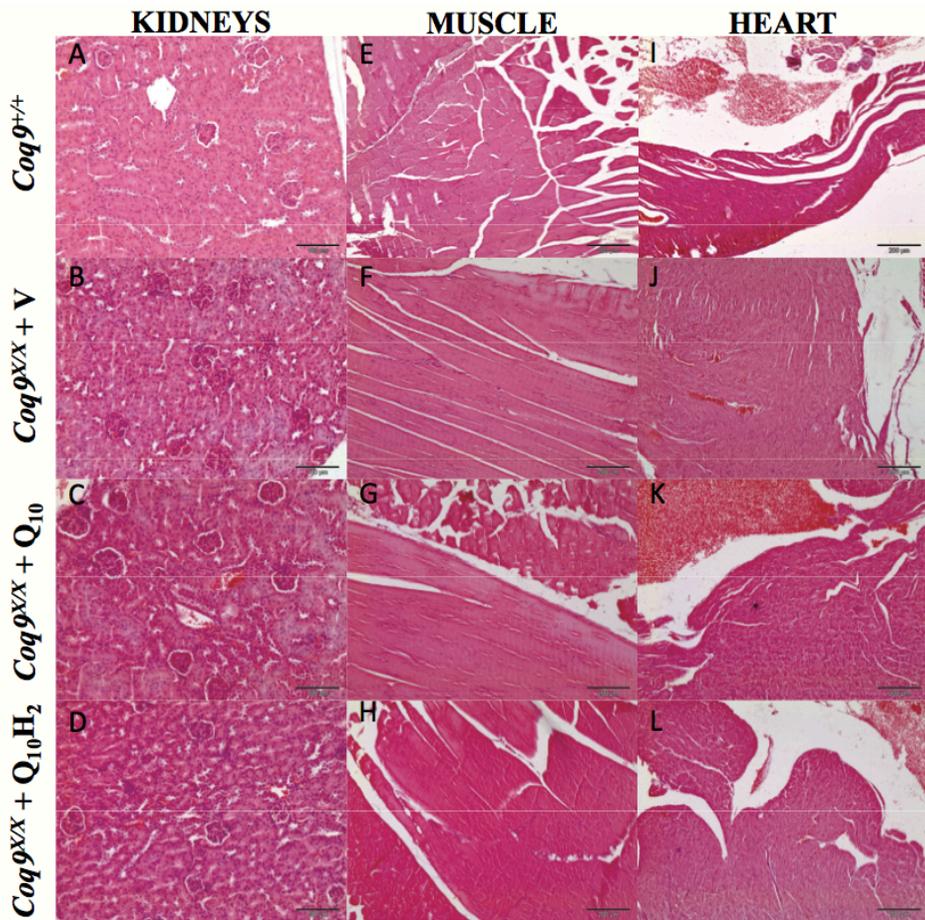


Figura 30. Cambios estructurales evaluados por tinción de hematoxilina-eosina (H&E) en diferentes tejidos después de dos meses de tratamiento. (A-D) riñones, (E-H) músculo esquelético y (I-L) corazón de ratones (A, E, I) *Coq9*^{+/+}, (B, F, J) *Coq9*^{XX} + V (N=3), (C, G, K) *Coq9*^{XX} + Q₁₀ (N=3) and (D, H, L) *Coq9*^{XX} + Q₁₀H₂ (N=3). V = vehículo; Q₁₀ = ubiquinona-10; Q₁₀H₂ = ubiquinol-10. (A-D), escala, 100 μ m; (E-L), escala, 200 μ m.

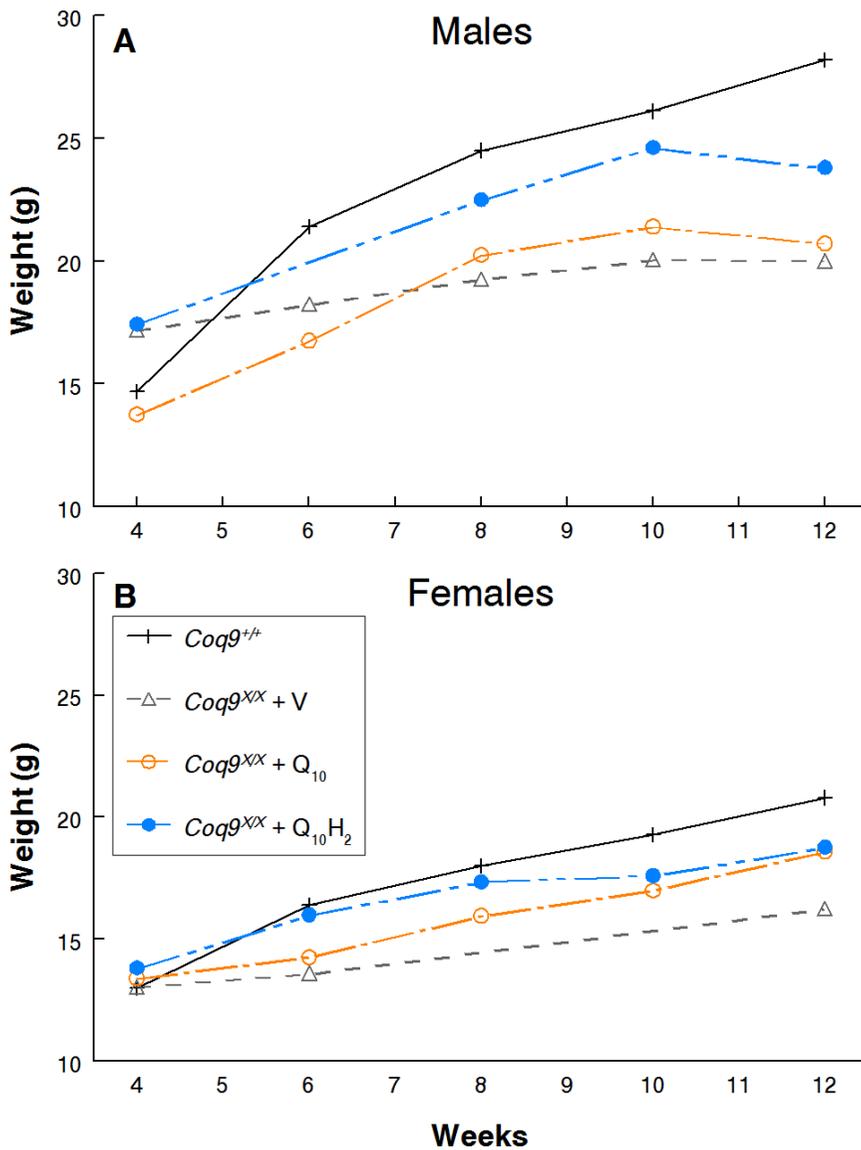


Figura 31. Evolución del peso corporal tras dos meses de tratamiento. (A) Machos y **(B)** hembras de los grupos experimentales *Coq9*^{+/+} (N=10), *Coq9*^{XX} + V (N=10), *Coq9*^{XX} + Q₁₀ (N=10) and *Coq9*^{XX} + Q₁₀H₂ (N=10). V = vehículo; Q₁₀ = ubiquinona-10; Q₁₀H₂ = ubiquinol-10.

Discusión

1. LA PROTEÍNA Coq9 CAUSA ENCEFALOMIOPATÍA ASOCIADA A LA DEFICIENCIA EN CoQ. CARACTERIZACIÓN DE UN NUEVO MODELO ANIMAL.

Desde los primeros hallazgos en humanos de mutaciones que originan deficiencia en CoQ a la actualidad, ha surgido un creciente interés por identificar los diferentes pasos de su ruta biosintética, su regulación, así como los mecanismos patogénicos asociados a su deficiencia de este componente lipídico.

En humanos, la deficiencia en CoQ se ha descrito como un desorden autosómico recesivo que se caracteriza por presentar un cuadro clínico heterogéneo. Las causas de esta heterogeneidad clínica se conocen escasamente y las hipótesis planteadas se han generado a partir de algunos estudios en modelos celulares (Duberley et al., 2013; Geromel et al., 2001; Quinzii et al., 2006; Quinzii et al., 2013; Quinzii et al., 2010; Quinzii et al., 2008) poca información *in vivo* debido a la ausencia de modelos animales que recapitulen los diferentes fenotipos clínicos. En este estudio, hemos generado y caracterizado el primer modelo animal que muestra signos bioquímicos, moleculares, histológicos y fenotípicos que se asemejan a la encefalomiopatía mitocondrial asociada a la deficiencia de CoQ. El modelo generado es un ratón Knock-in para el gen *Coq9* que contiene dos mutaciones puntuales de manera similar a las encontradas en el paciente descrito por Rahmna y cols. (Duncan et al., 2009) y al que denominamos *Coq9^{XX}*.

La biosíntesis de la CoQ es un proceso complejo que se conoce en parte gracias a los estudios realizados en bacterias y levaduras. En la actualidad, aunque se conoce la función de muchas de las proteínas involucradas en la ruta biosintética, aún permanece con función desconocida alguna de ellas, entre las se encuentra la Coq9p. La participación de la proteína Coq9 en la biosíntesis de la CoQ fue inicialmente descrita en mutantes de levaduras para el gen *Coq9*, los cuales no producían CoQ₆ (Johnson et al., 2005). Además, el mutante puntual para el gen *Coq9* de levaduras que sobreexpresa *adck3* (*coq8/Cabc1*) en un plásmido multicopia posee una biosíntesis parcial de CoQ₆ y acumulan DMQ₆ (Johnson et al., 2005; Xie et al., 2012). Los ratones *Coq9^{XX}* tienen niveles constitutivos de *Adck3* y muestran, de forma similar al mutante puntual para el gen *Coq9* en levaduras, niveles reducidos de Coq9p y acumulación de DMQ₉ (Johnson et al., 2005; Xie et al., 2012). La DMQ₉ es el sustrato para la reacción que cataliza la Coq7p. Teniendo en cuenta esto, pensamos que Coq7p puede requerir a la Coq9p para realizar su función normal. Los niveles reducidos de Coq7p junto con los niveles normales de Coq6p y *Adck3*, otras enzimas en la ruta biosintética de CoQ, confirmaría esta premisa. En este sentido, las predicciones bioinformáticas (Kihara Bioinformatics Laboratory, IN, USA) nos dan una probabilidad alta de que Coq9 pueda funcionar como una proteína ligadora de metal/ión/cación. Puesto que, Coq7p es una proteína perteneciente a la familia de las carboxilasas con un centro catalítico di-férrico (Stenmark et al., 2001), cabe pensar que, al igual que otras proteínas de esta naturaleza, Coq9p podría ser importante para la conformación de los grupos férricos en el centro catalítico. Por ello, la presencia de una Coq9p truncada origina

una reducción de los niveles de Coq7p, pero no de otras proteínas que intervienen en la ruta biosintética de la CoQ, y esta reducción se traduce en menor uso de la DMQ₉, que se acumula, y menor formación de CoQ. En este sentido pensamos que la Coq9p podría desempeñar un papel importante en la modulación de la conformación de este centro catalítico. Además, estudios recientes donde co-localizan la Coq7p y Coq9p en podocitos de ratas avalan la idea de que ambas proteínas podrían interaccionar entre sí (Heeringa et al., 2011).

Una vez se producen las moléculas de CoQ, éstas juegan un papel crucial en el sistema OXPHOS transfiriendo electrones desde el complejo I y II hacia el complejo III (Genova and Lenaz, 2011; Lenaz and Genova, 2007). El sistema OXPHOS está organizado en asociaciones supramoleculares eficientes o SC, donde parece que la CoQ tiene especial importancia por constituir parte de un tipo de SC denominado *respirasoma* verdadero (Acin-Perez et al., 2008). Acín-Pérez y cols. observaron este tipo de asociación y además demostraron *in vivo* que el complejo I, casi en su totalidad, se encuentra formando asociaciones físicas con el complejo III. La importancia de esta asociación es tal que la eliminación del complejo III desestabilizaría al complejo I promoviendo su degradación. Curiosamente este fenómeno no es recíproco ya que la eliminación del complejo I no desestabilizaría al complejo III, pero modificaría su distribución en la membrana mitocondrial entre su forma libre o asociada a SC (Acin-Perez et al., 2004). Teniendo en cuenta estas observaciones previas, nuestro objetivo fue evaluar las consecuencias de un déficit de CoQ sobre el sistema OXPHOS. Para dicho fin, evaluamos la distribución de los complejos respiratorios así como su

asociación en SC en nuestro modelo animal deficiente en CoQ. Los ratones *Coq9^{XX}*, que presentan una amplia deficiencia de CoQ en diferentes tejidos, mostraron un incremento del complejo III libre. De todos los tejidos evaluados y con déficit en CoQ tan solo observamos estos resultados en cerebro. Por otro lado, la medida de la actividad del complejo I+III, nos mostró una reducción de dicha actividad en el cerebro de los ratones mutantes. Curiosamente, la actividad se restauraba sólo parcialmente al añadir decilubiquinona, lo que podría explicarse con ese problema estructural en la formación o estabilidad del supercomplejo. Estos resultados fueron en paralelo a una reducción en la respiración mitocondrial y de los niveles de ATP en cerebro. Por el contrario, no se observan alteraciones en el resto de tejidos ni diferencias en los ratios mitocondriales I/III entre ratones *Coq9^{+/+}* y *Coq9^{XX}*, manifestando un adecuado acoplamiento de la respiración mitocondrial y niveles de ATP normales. Por lo tanto, nuestros estudios sugieren que la reducción en la formación de SC es un evento crítico que reduce la síntesis de ATP. No está claro, sin embargo, el motivo por el que el cerebro es el único tejido afectado, pero una posible explicación nos la daría las diferencias en tipos de proteínas que poseen las mitocondrias de distintos tejidos (con una variabilidad aproximada del 40%), lo que sugiere la existencia de diferencias en la organización y funcionamiento de las mitocondrias de diferentes tejidos (Mootha et al., 2003). Otra posibilidad es el papel específico de *Coq7p* sobre la distribución de CoQ en cada tejido. En este sentido, se ha observado en ratones *Mclk-1^{+/-}* (*Coq7^{+/-}*), otro modelo de ratón deficiente en CoQ, que la distribución submitocondrial de la ubiquinona, referida a la proporción entre la membrana interna y externa mitocondrial, afecta a

la respiración (Lapointe et al., 2012). Por otro lado, la acumulación de DMQ₉ en los distintos tejidos de los ratones *Coq9^{XX}* no parece ser un factor crítico del daño bioenergético observado en el cerebro debido a que tanto cerebro como cerebelo muestran índices CoQ₉/DMQ₉ superiores a otros tejidos. Además, sabemos que la DMQ₉ no es funcional para la respiración mitocondrial (Lenaz et al., 1968) y por ello los ratones que acumulan DMQ₉ y no producen CoQ son letales durante el desarrollo embrionario (Levavasseur et al., 2001; Nakai et al., 2001). Además, la acumulación de DMQ₉ no parece producir efectos deletéreos sobre la CTE ya que los mutantes para el gen *Coq9* y *Coq7* de levaduras no son funcionalmente distinguibles de otros mutantes deficientes en CoQ (Tran and Clarke, 2007). Todos estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de realizar un estudio exhaustivo que clarifique si la pérdida de SC en cerebro es un fenómeno exclusivamente molecular o dependiente de los niveles de CoQ.

Una de las consecuencias de la depleción energética observada en cerebro es un incremento de la apoptosis neuronal. Probablemente este hecho sea resultado de la translocación de AIF desde la mitocondria al núcleo, una ruta de muerte celular independiente de la vía de las caspasas. La ruta dependiente de AIF parece ser particularmente importante en la inducción de la apoptosis en neuronas (Seiler et al., 2008; Susin et al., 1999). Un estudio reciente muestra que la muerte celular inducida como consecuencia de la ausencia de la glutatión peroxidasa mitocondrial (GPx4), fue mediada a través de la translocación de este factor al núcleo (Seiler et al., 2008). El mismo estudio también muestra que la caspasa 3 no estaba activada en las

células *GPx4^{-/-}* y la sobreexpresión de Bcl2 no prevenía de la muerte celular por apoptosis (Seiler et al., 2008). Estos resultados se asemejan a los encontrados en el cerebro de los ratones *Coq9^{X/X}*.

Otra cuestión importante es si la depleción energética es la única causa de la muerte celular por la vía independiente de las caspasas. En este sentido, Takahashi y cols. (Takahashi et al., 2008) sugirieron que fallo bioenergético es el causante del incremento de apoptosis en embriones de ratones Knock-out para *Coq7*. Sin embargo, otros estudios apuntan que también pueden contribuir otros factores como es el caso de estrés oxidativo. En este sentido, la muerte celular en fibroblastos deficientes en CoQ está asociada con una combinación de aumento de estrés oxidativo y disminución de la síntesis de ATP (Lopez et al., 2010; Quinzii et al., 2010). Igualmente, se ha observado la combinación de estos dos factores en neuronas corticales (Lang-Rollin et al., 2003). No obstante, hay que tener cuenta que el mecanismo para inducir la apoptosis puede ser diferente dependiendo del tipo celular o tejido. En vista de los acontecimientos observados podemos pensar que una situación similar se podría estar produciendo en el cerebro de los ratones *Coq9^{X/X}*, donde observamos un incremento en la 8-OHdG y acumulación de 4-HNE en algunas neuronas, a la vez que un déficit bioenergético. Por tanto, estos resultados, junto con los observados en riñón de ratones mutantes *Pdss2*, sugieren que el estrés oxidativo está involucrado en la patología de la deficiencia en CoQ *in vivo* (Falk et al., 2011; Quinzii et al., 2013). Futuros estudios con un evaluación exhaustiva de la generación de ROS, daño oxidativo y defensas antioxidantes en los ratones *Coq9^{X/X}* podrían ser de utilidad.

Finalmente, para obtener una visión global de los mecanismos patogénicos en cada uno de los tejidos, realizamos una evaluación histopatológica de los ratones *Coq9^{X/X}*. Las imágenes obtenidas de cerebro muestran una pérdida de dendritas y muerte neuronal, desmielinización en sustancia blanca y puente. Asimismo, en el músculo esquelético de las piernas traseras observamos una pérdida de fibras y el corazón exhibe signos de fibrosis. La muerte neuronal también indujo astrogliosis reactiva, un proceso que pueden poseer un efecto beneficioso en una fase inicial; sin embargo, cuando la respuesta progresa en el tiempo, la astrogliosis reactiva puede ser deletérea (Sofroniew, 2009). Esta fase tardía de la astrogliosis reactiva puede ser identificada por la típica formación de cicatrices, algo que es claramente aparente en el cerebro de los ratones *Coq9^{X/X}* con SS.

Los mecanismos patológicos específicos de tejidos descritos en el ratón *Coq9^{X/X}* abre nuevas posibilidades de interpretación de la función y organización mitocondrial. Además, algunos de estos mecanismos son común a otras encefalomiopatías mitocondriales así como a otros desórdenes neurodegenerativos y neuromusculares. Estas coincidencias confirmarían la similitud y requerimientos mitocondriales entre mitocondrias del mismo tejido.

2. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON UBIQUINONA-10 Y UBIQUINOL-10 SOBRE LA ENCEFALOPATÍA MITOCONDRIAL ASOCIADA A DEFICIENCIA EN CoQ.

El modelo de ratón generado no sólo supone un buen modelo experimental para probar terapias que combatan la deficiencia en CoQ, sino también para otras enfermedades relacionadas con la mitocondria.

Unas de las terapias actualmente usadas, ya sea por sus efectos antioxidantes o paliativos en la CTE, es la ubiquinona-10 como suplemento oral. Este tratamiento ha mostrado resultados contradictorios en diversas enfermedades, tanto en el caso de las deficiencias primaria o secundaria en CoQ₁₀, como desórdenes mitocondriales y neurológicos, entre los que encontramos la enfermedad de Parkinson, Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica y enfermedad de Huntington (Dumont et al., 2011; Emmanuele et al., 2012; Kaufmann et al., 2009; Littarru et al., 2011; Parikh et al., 2009). La controversia en los resultados observados puede deberse a la baja absorción y biodisponibilidad de esta molécula (Bentinger et al., 2003; Emmanuele et al., 2012; Lopez et al., 2010). La ubiquinona-10 que se usa normalmente, es un producto en polvo que es insoluble en agua, mientras que presenta solubilidad parcial en lípidos y soluciones orgánicas y, como consecuencia de ello, su absorción en los tejidos es limitada. Además, uno de los grandes problemas que supone su uso terapéutico es la baja captación en el cerebro debido a su incapacidad por atravesar la barrera hematoencefálica, lo que se suma a su limitación para alcanzar la membrana interna mitocondrial (Bentinger et al., 2003; Lopez et al., 2010). Para intentar incrementar la absorción de la ubiquinona-10, se han diseñado diferentes formulaciones que actualmente están disponibles en el mercado. Estas formulaciones incluyen tabletas de comprimidos en polvos, pastillas masticables, capsulas duras, capsulas blandas conteniendo una suspensión oleosa y

soluciones solubles (Bhagavan and Chopra, 2007). Recientemente, se ha diseñado una nueva fórmula basada en la habilidad de las dextrinas para incrementar la solubilidad de este lípido en agua sin producir efectos tóxicos para el organismo (Prosek et al., 2008). En nuestro estudio hemos usado la formulación de ubiquinona-10 soluble en agua a una dosis de 240 mg/kg/día, el cual es equivalente a 30 mg/kg/día en humanos (Montini et al., 2008; Salviati et al., 2012). El elección de esta dosis se hace de acuerdo a la relación del área y superficie corporal (Reagan-Shaw et al., 2008) y su administración durante dos meses en el agua de bebida es capaz de incrementar los niveles de CoQ₁₀ en plasma de ratones *Coq9^{XX}*. Sin embargo, los niveles de CoQ₁₀ en plasma de ratones *Coq9^{XX}* tratados con ubiquinona-10 o ubiquinol-10 son, en general, más bajos que los niveles de CoQ₁₀ en plasma obtenido en humanos después del suplemento con diferentes formas de CoQ. Estas diferencias pueden deberse a: (i) la CoQ₁₀ es la forma mayoritaria de CoQ en humanos pero no en roedores y, por lo tanto, podría absorberse mejor en humanos; (ii) en humanos, la concentración más alta de CoQ₁₀ encontrada en plasma se alcanza después de 6-12 horas de recibir una única dosis (Miles, 2007). Por ello, si las muestras de sangre fueron obtenidas en este periodo de tiempo, la concentración de CoQ₁₀ deberían ser las máximas. En nuestro modelo experimental, sin embargo, la ubiquinona-10 o el ubiquinol-10 son administrados crónicamente en el agua de bebida, no en una única dosis. Además, los roedores son animales nocturnos y beben más agua en este periodo del día que se corresponde con el de mayor actividad. Debido a que la sangre es extraída en período diurno, la concentración de CoQ₁₀ en plasma no refleja la máxima concentración de CoQ₁₀.

En cualquier caso, el incremento de la concentración de CoQ₁₀ en plasma de ratones *Coq9^{XX}* tratados con ambos tratamientos, se refleja en un incremento de los niveles de CoQ₁₀ en tejidos. Cerebro y cerebelo son los tejidos más desfavorecidos en este sentido debido a la dificultad de atravesar la barrera hematoencefálica. Por el contrario, el hígado es el tejido que mayor incremento de los niveles de CoQ₁₀ experimenta y esto puede explicarse por su mecanismo de absorción en el sistema gastrointestinal. Después del vaciado gástrico, la CoQ₁₀ es absorbida en el intestino delgado, junto con otros lípidos en forma de quilomitrón, para luego ser captada por las células hepáticas. En el hígado, la CoQ₁₀ es incorporada a lipoproteínas y liberada a la sangre, donde es distribuida al resto de tejidos (Miles, 2007).

Otros estudios experimentales han usado la ubiquinona-10 en suspensión oleosa, denominada LiQsorb, a una dosis de 200 y 400 mg/kg/día durante 3-4 meses. Tras su administración no se observó incremento de los niveles de CoQ₁₀ en riñones de ratones mutantes en *Pdss2* (*Pdss2^{kd/kd}*), otro modelo de ratón deficiente en CoQ (Saiki et al., 2008b). De manera similar, Wang and Hekimi encontraron un incremento moderado de los niveles de CoQ₁₀ en hígado de ratones *Mcl1^{liver-KO}* cuando se administraba una dosis de 300-400 mg/kg/día durante 7 meses (Wang and Hekimi, 2013). En nuestro estudio, sin embargo, tras la administración del tratamiento observamos un importante de los niveles de CoQ₁₀ en riñón e hígado de los ratones mutantes, doblándose los niveles en el caso de los riñones e incluso superando los niveles de CoQ₁₀ en ratones wild-type en el caso del hígado. Estos resultados sugieren que la formulación soluble en agua basada en dextrinas posee mejor absorción, biodisponibilidad y

captación por el tejido que la formulación oleosa. Estos resultados corroboran además las conclusiones de algunos estudios realizados en humanos y perros donde afirman que la formulación soluble en agua de ubiquinona-10 basada en dextrinas posee mayor biodisponibilidad que la formulación basada en aceite (Prosek et al., 2008; Zmitek et al., 2008). En este mismo sentido, un paciente con deficiencia en CoQ, retraso mental, encefalomiopatía y caracteres dimórficos, no experimentaron mejoría alguna en los síntomas tras el tratamiento con ubiquinona-10 administrada en cápsulas de gel blando oleosa (Salviati et al., 2012).

Hay que destacar también que el incremento de los niveles de CoQ₁₀ en tejidos después del tratamiento con ubiquinol-10 se reflejó en un aumento de CoQ₁₀ en las mitocondrias de cerebro de ratones *Coq9^{X/X}*. Como consecuencia, el suplemento con ubiquinol-10 fue capaz de incrementar las actividades de la CTE dependiente de CoQ, mientras la forma oxidada no tuvo este efecto a nivel de la mitocondria. Estos resultados son esperanzadores ya que aumentaría las posibilidades de éxito de la terapia al mejorar uno de los grandes problemas de las terapias con CoQ₁₀, esto es, su incapacidad para alcanzar a la mitocondria, especialmente en cerebro.

El tratamiento con ubiquinol-10 (o ubiquinona-10) fue, sin embargo, incapaz de normalizar el ratio SC/CIII libre en cerebro y cerebelo observado en los ratones *Coq9^{X/X}*. Estos resultados pueden explicar el hecho de que la actividad del CI+III en cerebro de mutantes tratados con ubiquinol-10 fue la mitad de la actividad en ratones wild-type. Estos resultados podrían explicarse por tres posibilidades: (i) el

incremento de los niveles de CoQ₁₀ tras dos meses de tratamiento con ubiquinol-10 no es suficiente para normalizar el ratio SC/CIII y la actividad del CI+III; (ii) la acumulación de DMQ₉ en los ratones *Coq9^{X/X}* no se corrige con este tratamiento, pudiendo inhibir parcialmente la transferencia de electrones entre el complejo I y la CoQ, tal como fue observado en los mutantes *clk-1* (análogo de Coq7 en humanos y ratón del nematodo *Caenorhabditis elegans* (Yang et al., 2011); (iii) el tratamiento con ubiquinol-10 no modifica los niveles de CoQ₉, la forma mayoritaria de CoQ en roedores. En este sentido, llama la atención que en humanos y roedores la CoQ se sintetiza en dos formas homólogas, CoQ₉ y CoQ₁₀, distinguibles entre sí por la longitud de su cola poliprenil. El sentido biológico de sintetizar dos moléculas con presumiblemente la misma función es desconocido y resulta ilógico desde un punto de vista de los principios en los que se rige la economía celular. En general, las variaciones observadas en los contenidos de CoQ₉ y CoQ₁₀ de cada tejido del ratón, así como el índice entre ambas moléculas abren la puerta a plantear la hipótesis de que cada una de ellas pueda tener un función biológica específica y que, en consecuencia, unos niveles óptimos de ambas se necesario para una adecuada función mitocondrial. En el caso del cerebro y cerebelo de ratones *Coq9^{X/X}*, el índice CoQ₉/CoQ₁₀ disminuye cuando se mide en homogenado y en mitocondrias aisladas siendo incluso menor después del tratamiento con ubiquinol-10 (**Figura 22 y 23C**). Sería interesante, por tanto, poder desarrollar y evaluar terapias enfocadas en aumentar la biosíntesis de CoQ₉ y/o CoQ₁₀ con el fin de aproximarnos a las concentraciones fisiológicas de ambos.

Además de su papel bioenergético, la CoQ₁₀ es uno de los antioxidantes endógenos más potentes en la célula (Turunen et al., 2004). Varios autores han descrito que la deficiencia en CoQ viene acompañada de un incremento en la producción de ROS y daño oxidativo a biomoléculas, causando un incremento en la muerte celular *in vitro* (Quinzii et al., 2010; Quinzii et al., 2008) e *in vivo* (Quinzii et al., 2013). En este sentido, los ratones *Coq9^{XX}* también muestran un incremento de la 8-OHdG en bulbo raquídeo, diencéfalo y septo-estriado (Fig 5 y 4s). Ambos tratamientos, ubiquinona-10 y ubiquinol-10 redujeron la reactividad frente a la 8-OHdG, pero la reducción fue mayor en el caso del ubiquinol-10. Estas observaciones ponen de manifiesto que el ubiquinol-10 es captado mejor por los tejidos que la ubiquinona-10, además de su mayor capacidad antioxidante y/o un efecto en reducir el escape de electrones a través de la CTE.

En paralelo a los cambios bioquímicos tras los tratamientos, el suplemento con ubiquinol-10 redujo la vacualización y astrogliosis en bulbo raquídeo y diencéfalo de ratones *Coq9^{XX}*, resultando en un incremento del peso corporal. De nuevo el ubiquinol-10 fue más efectivo que la ubiquinona-10, reduciendo en este caso los cambios histopatológicos en los ratones *Coq9^{XX}*. Estos resultados son particularmente importantes ya que los pacientes con deficiencia en CoQ₁₀ muestran respuestas variables al tratamiento con ubiquinona-10 y, en algunos casos, el tratamiento o bien falla o no muestra una clara respuesta, posiblemente debido a la baja absorción de la ubiquinona-10 en los tejidos (Emmanuele et al., 2012). Dentro de la variabilidad de la respuestas al suplemento con ubiquinona-10, los síntomas musculares en paciente con encefalomiopatía y miopatía pura mejoraron en general

después de la terapia (Gempel et al., 2007; Horvath et al., 2006; Lalani et al., 2005; Sobreira et al., 1997), lo que refleja una mayor absorción de la CoQ₁₀ en músculo. En otros pacientes que presentan la forma multisistémica, a causa de mutaciones en los genes *PDSSI* o *COQ2*, el tratamiento con ubiquinona-10 consiguió resultados positivos consiguiendo frenar la progresión de la encefalopatía y mejorar los síntomas miopáticos (Montini et al., 2008; Quinzii et al., 2006; Rotig et al., 2000), así como la función renal en otros pacientes (Diomedici-Camassei et al., 2007). Por el contrario, en un paciente con una mutación homocigota en el gen *COQ9*, la terapia con ubiquinona-10 produjo una reducción del lactato en sangre pero no impidió el empeoramiento neurológico y cardiaco posterior que culminó con la muerte a los dos años de vida (Duncan et al., 2009). De manera similar, a pesar del tratamiento con ubiquinona-10, un paciente con mutación en el gen *PDSS2* manifestó convulsiones intratables y murió a los 8 meses de vida (Lopez et al., 2006); y un paciente con síndrome de Leigh que mostraba hepatopatología e hipertrofia cardiaca después de una mejora clínica inicial murió a los 3 años de edad (Leshinsky-Silver et al., 2003). Los datos publicados de otros dos pacientes con mutaciones en el gen *COQ6* y tratados con ubiquinona-10, describe una mejoría de la proteinuria que sufrían ambos individuos, pero un fracaso en la corrección del defecto auditivo en uno de ellos (Heeringa et al., 2011). En los pacientes con ataxia cerebelosa también se han observado respuestas variables al suplemento con ubiquinona-10, mostrando en algunos casos mejoría después del tratamiento (Artuch et al., 2006; Lagier-Tourenne et al., 2008; Pineda et al., 2010; Quinzii et al., 2005; Terracciano et al., 2012) y en otros casos fracaso (Aure et al., 2004;

D'Arrigo et al., 2008; Horvath et al., 2012a; Lamperti et al., 2003; Mollet et al., 2008; Terracciano et al., 2012). Otros estudios demuestran que son necesarias dosis más altas para observar un efecto cuando se usa ubiquinona-10 comparados con el ubiquinol-10. Concretamente, en el caso de un paciente con deficiencia en CoQ₁₀ debido a una mutación en el gen *COQ4*, que presentaba retraso mental, encefalomiopatía y caracteres dimórficos recibió tratamiento con ubiquinol-10 a una dosis de 15mg/kg/día y tuvo la misma eficiencia que la ubiquinona-10 a dosis 30 mg/kg/día (Salviati et al., 2012). Esta observación clínica junto con nuestros resultados sugiere que el suplemento con ubiquinol-10 podría mejorar la eficiencia mostrada por el tratamiento con ubiquinona-10. Esto sería especialmente importante para los pacientes que padecen encefalopatía o ataxia cerebelosa asociada a la deficiencia en CoQ₁₀.

Conclusiones

Del presente estudio podemos concluir:

1. La proteína Coq9 parece regular específicamente a la proteína Coq7 en la ruta biosintética de la CoQ.
2. La presencia de una proteína Coq9 disfuncional y/o déficit de CoQ en cerebro causa un aumento de los niveles de complejo III libre y descenso del SC. Esto conlleva a una disminución de la respiración mitocondrial y síntesis de ATP.
3. La disfunción mitocondrial en cerebro induce un aumento de daño oxidativo y muerte celular activada por una vía independiente de la ruta de las caspasas.
4. La forma encefalopática de la deficiencia en CoQ es progresiva y cursa con muerte neuronal, astrogliosis severa y degeneración espongiiforme.
5. La fórmula soluble en agua del ubiquinol-10 presenta una mejor absorción por los tejidos que la ubiquinona-10. Esta mejora resulta en un aumento de los niveles de CoQ₁₀ en homogenado de tejidos y en mitocondrias de cerebro en ratones *Coq9^{X/X}*.
6. El ubiquinol-10 es más efectivo que la ubiquinona-10, ya que reduce la vacuolización, astrogliosis, estrés oxidativo e incrementa el peso corporal en ratones *Coq9^{X/X}*.
7. A pesar de la mejora, el tratamiento con ubiquinol-10 no rescata completamente el fenotipo encefalopático de los ratones *Coq9^{X/X}*. Teniendo en cuenta que tanto roedores como humanos producen CoQ₉ y CoQ₁₀, sería interesante

desarrollar y evaluar nuevas terapias encaminadas a incrementar los niveles de ambas quinonas.

Bibliografía

Acin-Perez, R., Bayona-Bafaluy, M.P., Fernandez-Silva, P., Moreno-Loshuertos, R., Perez-Martos, A., Bruno, C., Moraes, C.T., and Enriquez, J.A. (2004). Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria. *Molecular cell* 13, 805-815.

Acin-Perez, R., Fernandez-Silva, P., Peleato, M.L., Perez-Martos, A., and Enriquez, J.A. (2008). Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Molecular cell* 32, 529-539.

Aeby, A., Sznajder, Y., Cave, H., Rebuffat, E., Van Coster, R., Rigal, O., and Van Bogaert, P. (2007). Cardiofaciocutaneous (CFC) syndrome associated with muscular coenzyme Q10 deficiency. *Journal of inherited metabolic disease* 30, 827.

Artal-Sanz, M., Tsang, W.Y., Willems, E.M., Grivell, L.A., Lemire, B.D., van der Spek, H., and Nijtmans, L.G.J. (2003). The mitochondrial prohibitin complex is essential for embryonic viability and germline function in *Caenorhabditis elegans* (vol 278, pg 32091, 2003). *Journal of Biological Chemistry* 278, 40416-40416.

Artuch, R., Brea-Calvo, G., Briones, P., Aracil, A., Galvan, M., Espinos, C., Corral, J., Volpini, V., Ribes, A., Andreu, A.L., et al. (2006). Cerebellar ataxia with coenzyme Q10 deficiency: diagnosis and follow-up after coenzyme Q10 supplementation. *Journal of the neurological sciences* 246, 153-158.

Ashby, M.N., and Edwards, P.A. (1990). Elucidation of the deficiency in two yeast coenzyme Q mutants. Characterization of the structural gene encoding hexaprenyl pyrophosphate synthetase. *The Journal of biological chemistry* 265, 13157-13164.

Ashby, M.N., Kutsunai, S.Y., Ackerman, S., Tzagoloff, A., and Edwards, P.A. (1992). COQ2 is a candidate for the structural gene encoding para-hydroxybenzoate:polyprenyltransferase. *The Journal of biological chemistry* 267, 4128-4136.

Ashraf, S., Gee, H.Y., Woerner, S., Xie, L.X., Vega-Warner, V., Lovric, S., Fang, H., Song, X., Cattran, D.C., Avila-Casado, C., et al. (2013). ADCK4 mutations promote steroid-resistant nephrotic

syndrome through CoQ10 biosynthesis disruption. *The Journal of clinical investigation* *123*, 5179-5189.

Aure, K., Benoist, J.F., Ogier de Baulny, H., Romero, N.B., Rigal, O., and Lombes, A. (2004). Progression despite replacement of a myopathic form of coenzyme Q10 defect. *Neurology* *63*, 727-729.

Avelange-Macherel, M.H., and Joyard, J. (1998). Cloning and functional expression of AtCOQ3, the Arabidopsis homologue of the yeast COQ3 gene, encoding a methyltransferase from plant mitochondria involved in ubiquinone biosynthesis. *Plant J* *14*, 203-213.

Baba, S.W., Belogradov, G.I., Lee, J.C., Lee, P.T., Strahan, J., Shepherd, J.N., and Clarke, C.F. (2004). Yeast Coq5 C-methyltransferase is required for stability of other polypeptides involved in coenzyme Q biosynthesis. *The Journal of biological chemistry* *279*, 10052-10059.

Barkovich, R.J., Shtanko, A., Shepherd, J.A., Lee, P.T., Myles, D.C., Tzagoloff, A., and Clarke, C.F. (1997). Characterization of the COQ5 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence for a C-methyltransferase in ubiquinone biosynthesis. *The Journal of biological chemistry* *272*, 9182-9188.

Barros, M.H., Johnson, A., Gin, P., Marbois, B.N., Clarke, C.F., and Tzagoloff, A. (2005). The *Saccharomyces cerevisiae* COQ10 gene encodes a START domain protein required for function of coenzyme Q in respiration. *The Journal of biological chemistry* *280*, 42627-42635.

Belogradov, G.I., Lee, P.T., Jonassen, T., Hsu, A.Y., Gin, P., and Clarke, C.F. (2001). Yeast COQ4 encodes a mitochondrial protein required for coenzyme Q synthesis. *Archives of biochemistry and biophysics* *392*, 48-58.

Bentinger, M., Dallner, G., Chojnacki, T., and Swiezewska, E. (2003). Distribution and breakdown of labeled coenzyme Q10 in rat. *Free radical biology & medicine* *34*, 563-575.

Bentinger, M., Tekle, M., and Dallner, G. (2010). Coenzyme Q--biosynthesis and functions. *Biochemical and biophysical research communications* 396, 74-79.

Beyer, R.E. (1994). The role of ascorbate in antioxidant protection of biomembranes: interaction with vitamin E and coenzyme Q. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 26, 349-358.

Bhagavan, H.N., and Chopra, R.K. (2007). Plasma coenzyme Q10 response to oral ingestion of coenzyme Q10 formulations. *Mitochondrion* 7 *Suppl*, S78-88.

Brasseur, G., Tron, P., Dujardin, G., Slonimski, P.P., and BrivetChevillotte, P. (1997). The nuclear ABC1 gene is essential for the correct conformation and functioning of the cytochrome bc(1) complex and the neighbouring complexes II and IV in the mitochondrial respiratory chain. *European Journal of Biochemistry* 246, 103-111.

Castellotti, B., Mariotti, C., Rimoldi, M., Fancellu, R., Plumari, M., Caimi, S., Uziel, G., Nardocci, N., Moroni, I., Zorzi, G., et al. (2011). Ataxia with oculomotor apraxia type1 (AOA1): novel and recurrent aprataxin mutations, coenzyme Q10 analyses, and clinical findings in Italian patients. *Neurogenetics* 12, 193-201.

Chahbouni, M., Escames, G., Venegas, C., Sevilla, B., Garcia, J.A., Lopez, L.C., Munoz-Hoyos, A., Molina-Carballo, A., and Acuna-Castroviejo, D. (2010). Melatonin treatment normalizes plasma pro-inflammatory cytokines and nitrosative/oxidative stress in patients suffering from Duchenne muscular dystrophy. *Journal of pineal research* 48, 282-289.

Clarke, C.F., Williams, W., and Teruya, J.H. (1991). Ubiquinone biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation and sequence of COQ3, the 3,4-dihydroxy-5-hexaprenylbenzoate methyltransferase gene. *The Journal of biological chemistry* 266, 16636-16644.

Crane, F.L., Hatefi, Y., Lester, R.L., and Widmer, C. (1989). Isolation of a quinone from beef heart mitochondria. 1957. *Biochimica et biophysica acta* 1000, 362-363.

Crane, F.L., and Navas, P. (1997). The diversity of coenzyme Q function. *Molecular aspects of medicine* 18 Suppl, S1-6.

D'Arrigo, S., Riva, D., Bulgheroni, S., Chiapparini, L., Castellotti, B., Gellera, C., and Pantaleoni, C. (2008). Ataxia with oculomotor apraxia type 1 (AOA1): clinical and neuropsychological features in 2 new patients and differential diagnosis. *Journal of child neurology* 23, 895-900.

del Castillo-Olivares, A., Nunez de Castro, I., and Medina, M.A. (2000). Dual role of plasma membrane electron transport systems in defense. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 35, 197-220.

Di Giovanni, S., Mirabella, M., Spinazzola, A., Crociani, P., Silvestri, G., Broccolini, A., Tonali, P., Di Mauro, S., and Servidei, S. (2001). Coenzyme Q10 reverses pathological phenotype and reduces apoptosis in familial CoQ10 deficiency. *Neurology* 57, 515-518.

Dibrov, E., Robinson, K.M., and Lemire, B.D. (1997). The COQ5 gene encodes a yeast mitochondrial protein necessary for ubiquinone biosynthesis and the assembly of the respiratory chain. *The Journal of biological chemistry* 272, 9175-9181.

Diomedi-Camassei, F., Di Giandomenico, S., Santorelli, F.M., Caridi, G., Piemonte, F., Montini, G., Ghiggeri, G.M., Murer, L., Barisoni, L., Pastore, A., et al. (2007). COQ2 nephropathy: a newly described inherited mitochondriopathy with primary renal involvement. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 18, 2773-2780.

Duberley, K.E., Abramov, A.Y., Chalasani, A., Heales, S.J., Rahman, S., and Hargreaves, I.P. (2013). Human neuronal coenzyme Q10 deficiency results in global loss of mitochondrial respiratory chain activity, increased mitochondrial oxidative stress and reversal of ATP

synthase activity: implications for pathogenesis and treatment. *Journal of inherited metabolic disease* 36, 63-73.

Dumont, M., Kipiani, K., Yu, F., Wille, E., Katz, M., Calingasan, N.Y., Gouras, G.K., Lin, M.T., and Beal, M.F. (2011). Coenzyme Q10 decreases amyloid pathology and improves behavior in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 27, 211-223.

Duncan, A.J., Bitner-Glindzicz, M., Meunier, B., Costello, H., Hargreaves, I.P., Lopez, L.C., Hirano, M., Quinzii, C.M., Sadowski, M.I., Hardy, J., et al. (2009). A nonsense mutation in COQ9 causes autosomal-recessive neonatal-onset primary coenzyme Q10 deficiency: a potentially treatable form of mitochondrial disease. *American journal of human genetics* 84, 558-566.

Echtay, K.S., Winkler, E., Frischmuth, K., and Klingenberg, M. (2001). Uncoupling proteins 2 and 3 are highly active H(+) transporters and highly nucleotide sensitive when activated by coenzyme Q (ubiquinone). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 1416-1421.

Echtay, K.S., Winkler, E., and Klingenberg, M. (2000). Coenzyme Q is an obligatory cofactor for uncoupling protein function. *Nature* 408, 609-613.

Emmanuele, V., Lopez, L.C., Berardo, A., Naini, A., Tadesse, S., Wen, B., D'Agostino, E., Solomon, M., DiMauro, S., Quinzii, C., et al. (2012). Heterogeneity of coenzyme Q10 deficiency: patient study and literature review. *Archives of neurology* 69, 978-983.

Ernster, L., and Dallner, G. (1995). Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochimica et biophysica acta* 1271, 195-204.

Ernster, L., Lee, I.Y., Norling, B., and Persson, B. (1969). Studies with ubiquinone-depleted submitochondrial particles. Essentiality of ubiquinone for the interaction of succinate dehydrogenase, NADH

dehydrogenase, and cytochrome b. *European journal of biochemistry / FEBS* 9, 299-310.

Esteves, T.C., Echtay, K.S., Jonassen, T., Clarke, C.F., and Brand, M.D. (2004). Ubiquinone is not required for proton conductance by uncoupling protein 1 in yeast mitochondria. *Biochemical Journal* 379, 309-315.

Falk, M.J., Polyak, E., Zhang, Z., Peng, M., King, R., Maltzman, J.S., Okwuego, E., Horyn, O., Nakamaru-Ogiso, E., Ostrovsky, J., et al. (2011). Probucol ameliorates renal and metabolic sequelae of primary CoQ deficiency in *Pdss2* mutant mice. *EMBO molecular medicine* 3, 410-427.

Fernandes, G., Yunis, E.J., Miranda, M., Smith, J., and Good, R.A. (1978). Nutritional inhibition of genetically determined renal disease and autoimmunity with prolongation of life in *kdkd* mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 2888-2892.

Fernandez-Ayala, D.J., Brea-Calvo, G., Lopez-Lluch, G., and Navas, P. (2005). Coenzyme Q distribution in HL-60 human cells depends on the endomembrane system. *Biochimica et biophysica acta* 1713, 129-137.

Festenstein, G.N., Heaton, F.W., Lowe, J.S., and Morton, R.A. (1955). A constituent of the unsaponifiable portion of animal tissue lipids (λ max. 272 m μ). In *The Biochemical journal*, pp. 558-566.

Fontaine, E., Ichas, F., and Bernardi, P. (1998). A ubiquinone-binding site regulates the mitochondrial permeability transition pore. *The Journal of biological chemistry* 273, 25734-25740.

Forsgren, M., Attersand, A., Lake, S., Grunler, J., Swiezewska, E., Dallner, G., and Climent, I. (2004). Isolation and functional expression of human COQ2, a gene encoding a polyprenyl transferase involved in the synthesis of CoQ. *The Biochemical journal* 382, 519-526.

Forsmark-Andree, P., Dallner, G., and Ernster, L. (1995). Endogenous ubiquinol prevents protein modification accompanying lipid

peroxidation in beef heart submitochondrial particles. *Free radical biology & medicine* *19*, 749-757.

Forsmark-Andree, P., Persson, B., Radi, R., Dallner, G., and Ernster, L. (1996). Oxidative modification of nicotinamide nucleotide transhydrogenase in submitochondrial particles: effect of endogenous ubiquinol. *Archives of biochemistry and biophysics* *336*, 113-120.

Garrido-Maraver, J., Cordero, M.D., Monino, I.D., Pereira-Arenas, S., Lechuga-Vieco, A.V., Cotan, D., De la Mata, M., Oropesa-Avila, M., De Miguel, M., Bautista Lorite, J., et al. (2012). Screening of effective pharmacological treatments for MELAS syndrome using yeasts, fibroblasts and cybrid models of the disease. *British journal of pharmacology* *167*, 1311-1328.

Gempel, K., Topaloglu, H., Talim, B., Schneiderat, P., Schoser, B.G., Hans, V.H., Palmafy, B., Kale, G., Tokatli, A., Quinzii, C., et al. (2007). The myopathic form of coenzyme Q10 deficiency is caused by mutations in the electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase (ETFHDH) gene. *Brain : a journal of neurology* *130*, 2037-2044.

Genova, M.L., and Lenaz, G. (2011). New developments on the functions of coenzyme Q in mitochondria. *BioFactors* *37*, 330-354.

Gerards, M., van den Bosch, B., Calis, C., Schoonderwoerd, K., van Engelen, K., Tijssen, M., de Coo, R., van der Kooij, A., and Smeets, H. (2010). Nonsense mutations in CABC1/ADCK3 cause progressive cerebellar ataxia and atrophy. *Mitochondrion* *10*, 510-515.

Geromel, V., Kadhon, N., Ceballos-Picot, I., Chretien, D., Munnich, A., Rotig, A., and Rustin, P. (2001). Human cultured skin fibroblasts survive profound inherited ubiquinone depletion. *Free Radic Res* *35*, 11-21.

Gin, P., and Clarke, C.F. (2005). Genetic evidence for a multi-subunit complex in coenzyme Q biosynthesis in yeast and the role of the Coq1 hexaprenyl diphosphate synthase. *The Journal of biological chemistry* *280*, 2676-2681.

Gin, P., Hsu, A.Y., Rothman, S.C., Jonassen, T., Lee, P.T., Tzagoloff, A., and Clarke, C.F. (2003). The *Saccharomyces cerevisiae* COQ6 gene encodes a mitochondrial flavin-dependent monooxygenase required for coenzyme Q biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* 278, 25308-25316.

Green, D.R., and Reed, J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.

Grunler, J., Ericsson, J., and Dallner, G. (1994). Branch-point reactions in the biosynthesis of cholesterol, dolichol, ubiquinone and prenylated proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1212, 259-277.

Hagerman, R.A., Trotter, P.J., and Willis, R.A. (2002). The regulation of COQ5 gene expression by energy source. *Free radical research* 36, 485-490.

Hagerman, R.A., and Willis, R.A. (2002). The yeast gene COQ5 is differentially regulated by Mig1p, Rtg3p and Hap2p. *Bba-Gene Struct Expr* 1578, 51-58.

Hartl, F.U., Pfanner, N., Nicholson, D.W., and Neupert, W. (1989). Mitochondrial Protein Import. *Biochimica et biophysica acta* 988, 1-45.

Heeringa, S.F., Chernin, G., Chaki, M., Zhou, W., Sloan, A.J., Ji, Z., Xie, L.X., Salviati, L., Hurd, T.W., Vega-Warner, V., et al. (2011). COQ6 mutations in human patients produce nephrotic syndrome with sensorineural deafness. *The Journal of clinical investigation* 121, 2013-2024.

Holmgren, A., and Bjornstedt, M. (1995). Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods in enzymology* 252, 199-208.

Horvath, R., Czermin, B., Gulati, S., Demuth, S., Houge, G., Pyle, A., Dineiger, C., Blakely, E.L., Hassani, A., Foley, C., et al. (2012a). Adult-onset cerebellar ataxia due to mutations in CABPC1/ADCK3. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 83, 174-178.

Horvath, R., Czermin, B., Gulati, S., Demuth, S., Houge, G., Pyle, A., Dineiger, C., Blakely, E.L., Hassani, A., Foley, C., et al. (2012b). Adult-onset cerebellar ataxia due to mutations in *CABC1/ADCK3*. *J Neurol Neurosurg Ps* 83, 174-178.

Horvath, R., Schneiderat, P., Schoser, B.G., Gempel, K., Neuen-Jacob, E., Ploger, H., Muller-Hocker, J., Pongratz, D.E., Naini, A., DiMauro, S., et al. (2006). Coenzyme Q10 deficiency and isolated myopathy. *Neurology* 66, 253-255.

Hsieh, E.J., Gin, P., Gulmezian, M., Tran, U.C., Saiki, R., Marbois, B.N., and Clarke, C.F. (2007). *Saccharomyces cerevisiae* Coq9 polypeptide is a subunit of the mitochondrial coenzyme Q biosynthetic complex. *Archives of biochemistry and biophysics* 463, 19-26.

Hsu, A.Y., Do, T.Q., Lee, P.T., and Clarke, C.F. (2000). Genetic evidence for a multi-subunit complex in the O-methyltransferase steps of coenzyme Q biosynthesis. *Biochimica et biophysica acta* 1484, 287-297.

Hsu, A.Y., Poon, W.W., Shepherd, J.A., Myles, D.C., and Clarke, C.F. (1996). Complementation of *coq3* mutant yeast by mitochondrial targeting of the *Escherichia coli* UbiG polypeptide: evidence that UbiG catalyzes both O-methylation steps in ubiquinone biosynthesis. *Biochemistry* 35, 9797-9806.

Ibrahim, W., Lee, U.S., Yeh, C.C., Szabo, J., Bruckner, G., and Chow, C.K. (1997). Oxidative stress and antioxidant status in mouse liver: effects of dietary lipid, vitamin E and iron. *The Journal of nutrition* 127, 1401-1406.

Jaburek, M., and Garlid, K.D. (2003). Reconstitution of recombinant uncoupling proteins - UCP1,-2, and-3 have similar affinities for ATP and are unaffected by coenzyme Q(10). *Journal of Biological Chemistry* 278, 25825-25831.

Jakobs, B.S., van den Heuvel, L.P., Smeets, R.J., de Vries, M.C., Hien, S., Schaible, T., Smeitink, J.A., Wevers, R.A., Wortmann, S.B., and Rodenburg, R.J. (2013). A novel mutation in *COQ2* leading to fatal

infantile multisystem disease. *Journal of the neurological sciences* 326, 24-28.

Jiang, N., Levavasseur, F., McCright, B., Shoubridge, E.A., and Hekimi, S. (2001). Mouse CLK-1 is imported into mitochondria by an unusual process that requires a leader sequence but no membrane potential. *The Journal of biological chemistry* 276, 29218-29225.

Johnson, A., Gin, P., Marbois, B.N., Hsieh, E.J., Wu, M., Barros, M.H., Clarke, C.F., and Tzagoloff, A. (2005). COQ9, a new gene required for the biosynthesis of coenzyme Q in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 280, 31397-31404.

Jones, M.E. (1980). Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals: genes, enzymes, and regulation of UMP biosynthesis. *Annual review of biochemistry* 49, 253-279.

Jun, L., Saiki, R., Tatsumi, K., Nakagawa, T., and Kawamukai, M. (2004). Identification and subcellular localization of two solanesyl diphosphate synthases from *Arabidopsis thaliana*. *Plant & cell physiology* 45, 1882-1888.

Kagan, R.M., and Clarke, S. (1994). Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes. *Archives of biochemistry and biophysics* 310, 417-427.

Kagan, V., Serbinova, E., and Packer, L. (1990). Antioxidant effects of ubiquinones in microsomes and mitochondria are mediated by tocopherol recycling. *Biochemical and biophysical research communications* 169, 851-857.

Kalen, A., Norling, B., Appelkvist, E.L., and Dallner, G. (1987). Ubiquinone biosynthesis by the microsomal fraction from rat liver. *Biochimica et biophysica acta* 926, 70-78.

Katz, J.E., Dlakic, M., and Clarke, S. (2003). Automated identification of putative methyltransferases from genomic open reading frames. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 2, 525-540.

Kaufmann, P., Thompson, J.L., Levy, G., Buchsbaum, R., Shefner, J., Krivickas, L.S., Katz, J., Rollins, Y., Barohn, R.J., Jackson, C.E., et al. (2009). Phase II trial of CoQ10 for ALS finds insufficient evidence to justify phase III. *Annals of neurology* 66, 235-244.

Kawamukai, M. (2002). Biosynthesis, bioproduction and novel roles of ubiquinone. *Journal of bioscience and bioengineering* 94, 511-517.

Kirby, D.M., Thorburn, D.R., Turnbull, D.M., and Taylor, R.W. (2007). Biochemical assays of respiratory chain complex activity. *Methods in cell biology* 80, 93-119.

Kling, B., Bucherl, D., Palatzky, P., Matysik, F.M., Decker, M., Wegener, J., and Heilmann, J. (2013). Flavonoids, Flavonoid Metabolites, and Phenolic Acids Inhibit Oxidative Stress in the Neuronal Cell Line HT-22 Monitored by ECIS and MTT Assay: A Comparative Study. *Journal of natural products*.

Kovacs, W.J., Olivier, L.M., and Krisans, S.K. (2002). Central role of peroxisomes in isoprenoid biosynthesis. *Progress in lipid research* 41, 369-391.

Kruse, S.E., Watt, W.C., Marcinek, D.J., Kapur, R.P., Schenkman, K.A., and Palmiter, R.D. (2008). Mice with mitochondrial complex I deficiency develop a fatal encephalomyopathy. *Cell metabolism* 7, 312-320.

Lagier-Tourenne, C., Tazir, M., Lopez, L.C., Quinzii, C.M., Assoum, M., Drouot, N., Busso, C., Makri, S., Ali-Pacha, L., Benhassine, T., et al. (2008). ADCK3, an ancestral kinase, is mutated in a form of recessive ataxia associated with coenzyme Q10 deficiency. *American journal of human genetics* 82, 661-672.

Lalani, S.R., Vladutiu, G.D., Plunkett, K., Lotze, T.E., Adesina, A.M., and Scaglia, F. (2005). Isolated mitochondrial myopathy associated with muscle coenzyme Q10 deficiency. *Archives of neurology* 62, 317-320.

Lamperti, C., Naini, A., Hirano, M., De Vivo, D.C., Bertini, E., Servidei, S., Valeriani, M., Lynch, D., Banwell, B., Berg, M., et al. (2003). Cerebellar ataxia and coenzyme Q10 deficiency. *Neurology* 60, 1206-1208.

Lang-Rollin, I.C., Rideout, H.J., Noticewala, M., and Stefanis, L. (2003). Mechanisms of caspase-independent neuronal death: energy depletion and free radical generation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23, 11015-11025.

Lapointe, J., Wang, Y., Bigras, E., and Hekimi, S. (2012). The submitochondrial distribution of ubiquinone affects respiration in long-lived Mcl1^{+/-} mice. *The Journal of cell biology* 199, 215-224.

Lee, P.T., Hsu, A.Y., Ha, H.T., and Clarke, C.F. (1997). A C-methyltransferase involved in both ubiquinone and menaquinone biosynthesis: Isolation and identification of the *Escherichia coli* ubiE gene. *Journal of bacteriology* 179, 1748-1754.

Lenaz, G., Daves, G.D., Jr., and Kfolkers, K. (1968). Organic structural specificity and sites of coenzyme Q in succinoxidase and DPNH-oxidase systems. *Archives of biochemistry and biophysics* 123, 539-550.

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

Leonard, C.J., Aravind, L., and Koonin, E.V. (1998). Novel families of putative protein kinases in bacteria and archaea: evolution of the "eukaryotic" protein kinase superfamily. *Genome research* 8, 1038-1047.

Leong, D.W., Komen, J.C., Hewitt, C.A., Arnaud, E., McKenzie, M., Phipson, B., Bahlo, M., Laskowski, A., Kinkel, S.A., Davey, G.M., et al. (2012). Proteomic and metabolomic analyses of mitochondrial complex I-deficient mouse model generated by spontaneous B2 short interspersed nuclear element (SINE) insertion into NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 4 (Ndufs4) gene. *The Journal of biological chemistry* 287, 20652-20663.

Leshinsky-Silver, E., Levine, A., Nissenkorn, A., Barash, V., Perach, M., Buzhaker, E., Shadmurov, M., Polak-Charcon, S., Lev, D., and Lerman-Sagie, T. (2003). Neonatal liver failure and Leigh syndrome possibly due to CoQ-responsive OXPHOS deficiency. *Molecular genetics and metabolism* 79, 288-293.

Leuenberger, D., Bally, N.A., Schatz, G., and Koehler, C.M. (1999). Different import pathways through the mitochondrial intermembrane space for inner membrane proteins. *The EMBO journal* 18, 4816-4822.

Levavasseur, F., Miyadera, H., Sirois, J., Tremblay, M.L., Kita, K., Shoubridge, E., and Hekimi, S. (2001). Ubiquinone is necessary for mouse embryonic development but is not essential for mitochondrial respiration. *The Journal of biological chemistry* 276, 46160-46164.

Littarru, G.P., Tiano, L., Belardinelli, R., and Watts, G.F. (2011). Coenzyme Q(10), endothelial function, and cardiovascular disease. *BioFactors* 37, 366-373.

Liu, Y.T., Hersheson, J., Plagnol, V., Fawcett, K., Duberley, K.E., Preza, E., Hargreaves, I.P., Chalasani, A., Laura, M., Wood, N.W., et al. (2013). Autosomal-recessive cerebellar ataxia caused by a novel ADCK3 mutation that elongates the protein: clinical, genetic and biochemical characterisation. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*.

Lopez, L.C., Quinzii, C.M., Area, E., Naini, A., Rahman, S., Schuelke, M., Salviati, L., Dimauro, S., and Hirano, M. (2010). Treatment of CoQ(10) deficient fibroblasts with ubiquinone, CoQ analogs, and vitamin C: time- and compound-dependent effects. *PloS one* 5, e11897.

Lopez, L.C., Schuelke, M., Quinzii, C.M., Kanki, T., Rodenburg, R.J., Naini, A., DiMauro, S., and Hirano, M. (2006). Leigh syndrome with nephropathy and CoQ10 deficiency due to decaprenyl diphosphate synthase subunit 2 (PDSS2) mutations. *American journal of human genetics* 79, 1125-1129.

Lopez-Martin, J.M., Salviati, L., Trevisson, E., Montini, G., DiMauro, S., Quinzii, C., Hirano, M., Rodriguez-Hernandez, A., Cordero, M.D., Sanchez-Alcazar, J.A., et al. (2007). Missense mutation of the COQ2 gene causes defects of bioenergetics and de novo pyrimidine synthesis. *Hum Mol Genet* 16, 1091-1097.

Lu, S., Lu, L.Y., Liu, M.F., Yuan, Q.J., Sham, M.H., Guan, X.Y., and Huang, J.D. (2011). Cerebellar defects in Pdss2 conditional knockout mice during embryonic development and in adulthood. *Neurobiol Dis*.

Lyon, M.F., and Hulse, E.V. (1971). An inherited kidney disease of mice resembling human nephronophthisis. *J Med Genet* 8, 41-48.

Marbois, B., Gin, P., Faull, K.F., Poon, W.W., Lee, P.T., Strahan, J., Shepherd, J.N., and Clarke, C.F. (2005). Coq3 and Coq4 define a polypeptide complex in yeast mitochondria for the biosynthesis of coenzyme Q. *The Journal of biological chemistry* 280, 20231-20238.

Marbois, B.N., and Clarke, C.F. (1996). The COQ7 gene encodes a protein in *Saccharomyces cerevisiae* necessary for ubiquinone biosynthesis. *The Journal of biological chemistry* 271, 2995-3004.

Marbois, B.N., Hsu, A., Pillai, R., Colicelli, J., and Clarke, C.F. (1994). Cloning of a rat cDNA encoding dihydroxypolyprenylbenzoate methyltransferase by functional complementation of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant deficient in ubiquinone biosynthesis. *Gene* 138, 213-217.

Martin-Montalvo, A., Gonzalez-Mariscal, I., Padilla, S., Ballesteros, M., Brautigam, D.L., Navas, P., and Santos-Ocana, C. (2011). Respiratory-induced coenzyme Q biosynthesis is regulated by a phosphorylation cycle of Cat5p/Coq7p. *The Biochemical journal* 440, 107-114.

Martin-Montalvo, A., Gonzalez-Mariscal, I., Pomares-Viciano, T., Padilla-Lopez, S., Ballesteros, M., Vazquez-Fonseca, L., Gandolfo, P., Brautigam, D.L., Navas, P., and Santos-Ocana, C. (2013). The phosphatase Ptc7 induces coenzyme Q biosynthesis by activating the hydroxylase Coq7 in yeast. *The Journal of biological chemistry* 288, 28126-28137.

May, J.M., and Qu, Z.C. (1999). Ascorbate-dependent electron transfer across the human erythrocyte membrane. *Biochimica et biophysica acta* 1421, 19-31.

Miles, M.V. (2007). The uptake and distribution of coenzyme Q10. *Mitochondrion* 7 *Suppl*, S72-77.

Mollet, J., Delahodde, A., Serre, V., Chretien, D., Schlemmer, D., Lombes, A., Boddaert, N., Desguerre, I., de Lonlay, P., de Baulny, H.O., et al. (2008). CABC1 gene mutations cause ubiquinone deficiency with cerebellar ataxia and seizures. *American journal of human genetics* 82, 623-630.

Mollet, J., Giurgea, I., Schlemmer, D., Dallner, G., Chretien, D., Delahodde, A., Bacq, D., de Lonlay, P., Munnich, A., and Rotig, A. (2007). Prenyldiphosphate synthase, subunit 1 (PDSS1) and OH-benzoate polyprenyltransferase (COQ2) mutations in ubiquinone deficiency and oxidative phosphorylation disorders. *The Journal of clinical investigation* 117, 765-772.

Momose, K., and Rudney, H. (1972). 3-Polyprenyl-4-hydroxybenzoate synthesis in the inner membrane of mitochondria from p-hydroxybenzoate and isopentenylpyrophosphate. A demonstration of isoprenoid synthesis in rat liver mitochondria. *The Journal of biological chemistry* 247, 3930-3940.

Montini, G., Malaventura, C., and Salviati, L. (2008). Early coenzyme Q10 supplementation in primary coenzyme Q10 deficiency. *The New England journal of medicine* 358, 2849-2850.

Mootha, V.K., Bunkenborg, J., Olsen, J.V., Hjerrild, M., Wisniewski, J.R., Stahl, E., Bolouri, M.S., Ray, H.N., Sihag, S., Kamal, M., et al.

(2003). Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria. *Cell* *115*, 629-640.

Mugoni, V., Postel, R., Catanzaro, V., De Luca, E., Turco, E., Digilio, G., Silengo, L., Murphy, M.P., Medana, C., Stainier, D.Y.R., et al. (2013). Ubiad1 Is an Antioxidant Enzyme that Regulates eNOS Activity by CoQ10 Synthesis. *Cell* *152*, 504-518.

Nakai, D., Yuasa, S., Takahashi, M., Shimizu, T., Asami, S., Isono, K., Takao, T., Suzuki, Y., Kuroyanagi, H., Hirokawa, K., et al. (2001). Mouse homologue of *coq7/clk-1*, longevity gene in *Caenorhabditis elegans*, is essential for coenzyme Q synthesis, maintenance of mitochondrial integrity, and neurogenesis. *Biochemical and biophysical research communications* *289*, 463-471.

Nedergaard, J., Golozoubova, V., Matthias, A., Asadi, A., Jacobsson, A., and Cannon, B. (2001). UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochimica et biophysica acta* *1504*, 82-106.

Neupert, W. (1997). Protein import into mitochondria. *Annual review of biochemistry* *66*, 863-917.

Niewmierzycka, A., and Clarke, S. (1999). S-Adenosylmethionine-dependent methylation in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of a novel protein arginine methyltransferase. *The Journal of biological chemistry* *274*, 814-824.

Ogasahara, S., Engel, A.G., Frens, D., and Mack, D. (1989). Muscle coenzyme Q deficiency in familial mitochondrial encephalomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *86*, 2379-2382.

Ohara, K., Yamamoto, K., Hamamoto, M., Sasaki, K., and Yazaki, K. (2006). Functional characterization of OsPPT1, which encodes p-hydroxybenzoate polyprenyltransferase involved in ubiquinone biosynthesis in *Oryza sativa*. *Plant & cell physiology* *47*, 581-590.

Okada, K., Ohara, K., Yazaki, K., Nozaki, K., Uchida, N., Kawamukai, M., Nojiri, H., and Yamane, H. (2004). The AtPPT1 gene encoding 4-hydroxybenzoate polyprenyl diphosphate transferase in ubiquinone biosynthesis is required for embryo development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology* *55*, 567-577.

Okada, K., Suzuki, K., Kamiya, Y., Zhu, X., Fujisaki, S., Nishimura, Y., Nishino, T., Nakagawa, T., Kawamukai, M., and Matsuda, H. (1996). Polyprenyl diphosphate synthase essentially defines the length of the side chain of ubiquinone. *Biochimica et biophysica acta* *1302*, 217-223.

Ozeir, M., Muhlenhoff, U., Webert, H., Lill, R., Fontecave, M., and Pierrel, F. (2011). Coenzyme Q biosynthesis: Coq6 is required for the C5-hydroxylation reaction and substrate analogs rescue Coq6 deficiency. *Chemistry & biology* *18*, 1134-1142.

Padilla, S., Jonassen, T., Jimenez-Hidalgo, M.A., Fernandez-Ayala, D.J., Lopez-Lluch, G., Marbois, B., Navas, P., Clarke, C.F., and Santos-Ocana, C. (2004). Demethoxy-Q, an intermediate of coenzyme Q biosynthesis, fails to support respiration in *Saccharomyces cerevisiae* and lacks antioxidant activity. *J Biol Chem* *279*, 25995-26004.

Padilla, S., Tran, U.C., Jimenez-Hidalgo, M., Lopez-Martin, J.M., Martin-Montalvo, A., Clarke, C.F., Navas, P., and Santos-Ocana, C. (2009). Hydroxylation of demethoxy-Q6 constitutes a control point in yeast coenzyme Q6 biosynthesis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* *66*, 173-186.

Papucci, L., Schiavone, N., Witort, E., Donnini, M., Lapucci, A., Tempestini, A., Formigli, L., Zecchi-Orlandini, S., Orlandini, G., Carella, G., et al. (2003). Coenzyme q10 prevents apoptosis by inhibiting mitochondrial depolarization independently of its free radical scavenging property. *The Journal of biological chemistry* *278*, 28220-28228.

Parikh, S., Saneto, R., Falk, M.J., Anselm, I., Cohen, B.H., Haas, R., and Medicine Society, T.M. (2009). A modern approach to the

treatment of mitochondrial disease. Current treatment options in neurology *11*, 414-430.

Peng, M., Falk, M.J., Haase, V.H., King, R., Polyak, E., Selak, M., Yudkoff, M., Hancock, W.W., Meade, R., Saiki, R., et al. (2008). Primary coenzyme Q deficiency in Pdss2 mutant mice causes isolated renal disease. *PLoS Genet* *4*, e1000061.

Peng, M., Jarett, L., Meade, R., Madaio, M.P., Hancock, W.W., George, A.L., Jr., Neilson, E.G., and Gasser, D.L. (2004). Mutant prenyltransferase-like mitochondrial protein (PLMP) and mitochondrial abnormalities in kd/kd mice. *Kidney Int* *66*, 20-28.

Pineda, M., Montero, R., Aracil, A., O'Callaghan, M.M., Mas, A., Espinos, C., Martinez-Rubio, D., Palau, F., Navas, P., Briones, P., et al. (2010). Coenzyme Q(10)-responsive ataxia: 2-year-treatment follow-up. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* *25*, 1262-1268.

Poon, W.W., Barkovich, R.J., Hsu, A.Y., Frankel, A., Lee, P.T., Shepherd, J.N., Myles, D.C., and Clarke, C.F. (1999). Yeast and rat Coq3 and Escherichia coli UbiG polypeptides catalyze both O-methyltransferase steps in coenzyme Q biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* *274*, 21665-21672.

Prosek, M., Butinar, J., Lukanc, B., Fir, M.M., Milivojevic, L., Krizman, M., and Smidovnik, A. (2008). Bioavailability of water-soluble CoQ10 in beagle dogs. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* *47*, 918-922.

Quinzii, C., Naini, A., Salviati, L., Trevisson, E., Navas, P., Dimauro, S., and Hirano, M. (2006). A mutation in para-hydroxybenzoate-polyprenyl transferase (COQ2) causes primary coenzyme Q10 deficiency. *American journal of human genetics* *78*, 345-349.

Quinzii, C.M., Garone, C., Emmanuele, V., Tadesse, S., Krishna, S., Dorado, B., and Hirano, M. (2013). Tissue-specific oxidative stress and loss of mitochondria in CoQ-deficient Pdss2 mutant mice. *FASEB*

journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 27, 612-621.

Quinzii, C.M., and Hirano, M. (2011). Primary and secondary CoQ(10) deficiencies in humans. *BioFactors* 37, 361-365.

Quinzii, C.M., Kattah, A.G., Naini, A., Akman, H.O., Mootha, V.K., DiMauro, S., and Hirano, M. (2005). Coenzyme Q deficiency and cerebellar ataxia associated with an aprataxin mutation. *Neurology* 64, 539-541.

Quinzii, C.M., Lopez, L.C., Gilkerson, R.W., Dorado, B., Coku, J., Naini, A.B., Lagier-Tourenne, C., Schuelke, M., Salviati, L., Carrozzo, R., et al. (2010). Reactive oxygen species, oxidative stress, and cell death correlate with level of CoQ10 deficiency. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24, 3733-3743.

Quinzii, C.M., Lopez, L.C., Von-Moltke, J., Naini, A., Krishna, S., Schuelke, M., Salviati, L., Navas, P., DiMauro, S., and Hirano, M. (2008). Respiratory chain dysfunction and oxidative stress correlate with severity of primary CoQ10 deficiency. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22, 1874-1885.

Quinzii, C.M., Tadesse, S., Naini, A., and Hirano, M. (2012). Effects of inhibiting CoQ10 biosynthesis with 4-nitrobenzoate in human fibroblasts. *PloS one* 7, e30606.

Reagan-Shaw, S., Nihal, M., and Ahmad, N. (2008). Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22, 659-661.

Rodel, G. (1986). Two yeast nuclear genes, CBS1 and CBS2, are required for translation of mitochondrial transcripts bearing the 5'-untranslated COB leader. *Current genetics* 11, 41-45.

Rodriguez-Hernandez, A., Cordero, M.D., Salviati, L., Artuch, R., Pineda, M., Briones, P., Izquierdo, L.G., Cotan, D., Navas, P., and Sanchez-Alcazar, J.A. (2009). Coenzyme Q deficiency triggers mitochondria degradation by mitophagy. *Autophagy* 5.

Rotig, A., Appelkvist, E.L., Geromel, V., Chretien, D., Kadhon, N., Edery, P., Lebideau, M., Dallner, G., Munnich, A., Ernster, L., et al. (2000). Quinone-responsive multiple respiratory-chain dysfunction due to widespread coenzyme Q10 deficiency. *Lancet* 356, 391-395.

Saiki, R., Lunceford, A.L., Shi, Y., Marbois, B., King, R., Pachuski, J., Kawamukai, M., Gasser, D.L., and Clarke, C.F. (2008a). Coenzyme Q10 supplementation rescues renal disease in *Pdss2kd/kd* mice with mutations in prenyl diphosphate synthase subunit 2. *Am J Physiol Renal Physiol* 295, F1535-F1544.

Saiki, R., Lunceford, A.L., Shi, Y., Marbois, B., King, R., Pachuski, J., Kawamukai, M., Gasser, D.L., and Clarke, C.F. (2008b). Coenzyme Q10 supplementation rescues renal disease in *Pdss2kd/kd* mice with mutations in prenyl diphosphate synthase subunit 2. *American journal of physiology. Renal physiology* 295, F1535-1544.

Saiki, R., Nagata, A., Kainou, T., Matsuda, H., and Kawamukai, M. (2005). Characterization of solanesyl and decaprenyl diphosphate synthases in mice and humans. *The FEBS journal* 272, 5606-5622.

Saiki, R., Nagata, A., Uchida, N., Kainou, T., Matsuda, H., and Kawamukai, M. (2003). Fission yeast decaprenyl diphosphate synthase consists of *Dps1* and the newly characterized *Dlp1* protein in a novel heterotetrameric structure. *European journal of biochemistry / FEBS* 270, 4113-4121.

Salviati, L., Sacconi, S., Murer, L., Zacchello, G., Franceschini, L., Laverda, A.M., Basso, G., Quinzii, C., Angelini, C., Hirano, M., et al. (2005). Infantile encephalomyopathy and nephropathy with CoQ10 deficiency: a CoQ10-responsive condition. *Neurology* 65, 606-608.

Salviati, L., Trevisson, E., Rodriguez Hernandez, M.A., Casarin, A., Pertegato, V., Doimo, M., Cassina, M., Agosto, C., Desbats, M.A.,

Sartori, G., et al. (2012). Haploinsufficiency of COQ4 causes coenzyme Q10 deficiency. *Journal of medical genetics* 49, 187-191.

Santos-Ocana, C., Villalba, J.M., Cordoba, F., Padilla, S., Crane, F.L., Clarke, C.F., and Navas, P. (1998). Genetic evidence for coenzyme Q requirement in plasma membrane electron transport. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 30, 465-475.

Schulz, J.B., Lindenau, J., Seyfried, J., and Dichgans, J. (2000). Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *European journal of biochemistry / FEBS* 267, 4904-4911.

Seiler, A., Schneider, M., Forster, H., Roth, S., Wirth, E.K., Culmsee, C., Plesnila, N., Kremmer, E., Radmark, O., Wurst, W., et al. (2008). Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death. *Cell metabolism* 8, 237-248.

Sippel, C.J., Goewert, R.R., Slachman, F.N., and Olson, R.E. (1983). The regulation of ubiquinone-6 biosynthesis by *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 258, 1057-1061.

Sobreira, C., Hirano, M., Shanske, S., Keller, R.K., Haller, R.G., Davidson, E., Santorelli, F.M., Miranda, A.F., Bonilla, E., Mojon, D.S., et al. (1997). Mitochondrial encephalomyopathy with coenzyme Q10 deficiency. *Neurology* 48, 1238-1243.

Sofroniew, M.V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in neurosciences* 32, 638-647.

Stenmark, P., Grunler, J., Mattsson, J., Sindelar, P.J., Nordlund, P., and Berthold, D.A. (2001). A new member of the family of di-iron carboxylate proteins. Coq7 (clk-1), a membrane-bound hydroxylase involved in ubiquinone biosynthesis. *The Journal of biological chemistry* 276, 33297-33300.

Sun, I.L., Sun, E.E., Crane, F.L., Morre, D.J., Lindgren, A., and Low, H. (1992). Requirement for coenzyme Q in plasma membrane electron

transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 11126-11130.

Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., et al. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-446.

Tahara, E.B., Navarete, F.D.T., and Kowaltowski, A.J. (2009). Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. *Free Radical Bio Med* 46, 1283-1297.

Takahashi, M., Shimizu, T., Moriizumi, E., and Shirasawa, T. (2008). Clk-1 deficiency induces apoptosis associated with mitochondrial dysfunction in mouse embryos. *Mechanisms of ageing and development* 129, 291-298.

Takahashi, T., Okamoto, T., Mori, K., Sayo, H., and Kishi, T. (1993). Distribution of ubiquinone and ubiquinol homologues in rat tissues and subcellular fractions. *Lipids* 28, 803-809.

Takayanagi, R., Takeshige, K., and Minakami, S. (1980). NADH- and NADPH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles. Dependence on the rate of electron flow in the respiratory chain and an antioxidant role of ubiquinol. *The Biochemical journal* 192, 853-860.

Tekle, M., Bentinger, M., Nordman, T., Appelkvist, E.L., Chojnacki, T., and Olsson, J.M. (2002). Ubiquinone biosynthesis in rat liver peroxisomes. *Biochemical and biophysical research communications* 291, 1128-1133.

Terracciano, A., Renaldo, F., Zanni, G., D'Amico, A., Pastore, A., Barresi, S., Valente, E.M., Piemonte, F., Tozzi, G., Carrozzo, R., et al. (2012). The use of muscle biopsy in the diagnosis of undefined ataxia with cerebellar atrophy in children. *European journal of paediatric neurology : EJPN : official journal of the European Paediatric Neurology Society* 16, 248-256.

Tomasetti, M., Littarru, G.P., Stocker, R., and Alleva, R. (1999). Coenzyme Q10 enrichment decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Free radical biology & medicine* 27, 1027-1032.

Tran, U.C., and Clarke, C.F. (2007). Endogenous synthesis of coenzyme Q in eukaryotes. *Mitochondrion* 7 *Suppl*, S62-71.

Tran, U.C., Marbois, B., Gin, P., Gulmezian, M., Jonassen, T., and Clarke, C.F. (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. *The Journal of biological chemistry* 281, 16401-16409.

Turunen, M., Olsson, J., and Dallner, G. (2004). Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochimica et biophysica acta* 1660, 171-199.

Tzagoloff, A., Akai, A., Needleman, R.B., and Zulch, G. (1975). Assembly of the mitochondrial membrane system. Cytoplasmic mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with lesions in enzymes of the respiratory chain and in the mitochondrial ATPase. *The Journal of biological chemistry* 250, 8236-8242.

Tzagoloff, A., and Dieckmann, C.L. (1990). PET genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological reviews* 54, 211-225.

Uchida, N., Suzuki, K., Saiki, R., Kainou, T., Tanaka, K., Matsuda, H., and Kawamukai, M. (2000). Phenotypes of fission yeast defective in ubiquinone production due to disruption of the gene for p-hydroxybenzoate polyprenyl diphosphate transferase. *Journal of bacteriology* 182, 6933-6939.

Villalba, J.M., Navarro, F., Cordoba, F., Serrano, A., Arroyo, A., Crane, F.L., and Navas, P. (1995). Coenzyme Q reductase from liver plasma membrane: purification and role in trans-plasma-membrane electron transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 4887-4891.

Walter, L., Miyoshi, H., Leverage, X., Bernard, P., and Fontaine, E. (2002). Regulation of the mitochondrial permeability transition pore by ubiquinone analogs. A progress report. *Free radical research* 36, 405-412.

Walter, L., Nogueira, V., Leverage, X., Heitz, M.P., Bernardi, P., and Fontaine, E. (2000). Three classes of ubiquinone analogs regulate the mitochondrial permeability transition pore through a common site. *The Journal of biological chemistry* 275, 29521-29527.

Wang, K.C., and Ohnuma, S. (2000). Isoprenyl diphosphate synthases. *Biochimica et biophysica acta* 1529, 33-48.

Wang, Y., and Hekimi, S. (2013). Mitochondrial respiration without ubiquinone biosynthesis. *Human molecular genetics* 22, 4768-4783.

Wolf, D.E., Hoffman, C.H., Trenner, N.R., Arison, B.H., Shunk, C.H., Linn, B.O., Mcpherson, J.F., and Folkers, K. (1958). Coenzyme Q .1. Structure Studies on the Coenzyme Q-Group. *J Am Chem Soc* 80, 4752-4752.

Wood, Z.A., Poole, L.B., and Karplus, P.A. (2003). Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* 300, 650-653.

Xie, L.X., Ozeir, M., Tang, J.Y., Chen, J.Y., Jaquinod, S.K., Fontecave, M., Clarke, C.F., and Pierrel, F. (2012). Overexpression of the Coq8 kinase in *Saccharomyces cerevisiae* coq null mutants allows for accumulation of diagnostic intermediates of the coenzyme Q6 biosynthetic pathway. *The Journal of biological chemistry* 287, 23571-23581.

Yang, Y.Y., Vasta, V., Hahn, S., Gangoiti, J.A., Opheim, E., Sedensky, M.M., and Morgan, P.G. (2011). The role of DMQ(9) in the long-lived mutant clk-1. *Mechanisms of ageing and development* 132, 331-339.

Ziegler, C.G., Peng, M., Falk, M.J., Polyak, E., Tsika, E., Ischiropoulos, H., Bakalar, D., Blendy, J.A., and Gasser, D.L. (2011).

Parkinson's disease-like neuromuscular defects occur in prenyl diphosphate synthase subunit 2 (Pdss2) mutant mice. *Mitochondrion*.

Zmitek, J., Smidovnik, A., Fir, M., Prosek, M., Zmitek, K., Walczak, J., and Pravst, I. (2008). Relative bioavailability of two forms of a novel water-soluble coenzyme Q10. *Annals of nutrition & metabolism* 52, 281-287.

Anexos

ANEXO 1: PRIMERS

1.1 PRIMERS USADOS PARA GENERAR LA MUTACIÓN PUNTUAL

PT1: 5'- AAC TCC TCC CCA TCT TGA CCT G -3'

PT2: 5'- TCA GCG GGT GTA CCA GTT AAA CTG CAG-3'

PT3:5'TCTGCAGTTTAACTGGTACACCCGCTGAGCAGTGCTGGCCG
GCATCTAC -3'

PT4 (BsiWI): 5'- acttagtaCGTACGTAC GGA CAA CAC AAC CAC AGA
CAG -3'

1.2 PRIMERS PARA HACER SCREENER

N1: 5' -TGCGAGGCCAGAGGCCACTTGTGTAGC- 3'

N2: 5' -TTCCTCGTGCTTTACGGTATCG- 3'

P6: 5' -GAGTGCACCATATGGACATATTGTC- 3'

T7: 5' -TAATGCAGGTAAACCTGGCTTATCG- 3'

A1: 5' - TTT AGA GGG CAG AGT TAC CAG AG

A2: 5' - AGT GGC AGC TGT TCA CAC AGA G

AT1: 5' - TCA GAG GTA CAG AAA GAG CCT G

AT2: 5' - ACT CCA CTG TGA GAC TCA TAG GC

LAN1: 5' - CCA GAG GCC ACT TGT GTA GC

COOK3: 5' - TGA TTG TGA CAG AAC AGG GCA C

COOK4: 5' - TGG AAA GAC GTT TGG GAC AGT C

UNI: 5' - AGC GCA TCG CCT TCT ATC GCC TTC

F3: 5'- GCA TAA GCT TGG ATC CGT TCT TCG GAC -3'

F7: 5'- GGA ACT TCG CTA GAC TAG TAC GCG TG -3'

Neo Del 1: 5'- GGT GTC CAG AGG GCT ATA TG-3'

Neo Del 2a: 5'- GCC TGG GTC AGA TTC TCT TA-3'

ANEXO 2: SOLUCIONES

SOLUCIÓN	COMPOSICIÓN
1. Fase móvil para medir los compuestos quinónicos en HPLC	500 ml de metanol 500 ml de etanol 15 ml 2-propanol 15 ml ácido acético 50 mM acetato sódico
2. Medio A de homogenización	320 mM sacarosa 1 mM EDTA Tris-10 mM HCl pH 7.4
3. Medio B de homogenización	750 mM sacarosa 225 mM sorbitol 1 mM EGTA BSA al 0.1% 10 mM Tris-HCl pH 7.4
4. Medio C de homogenización	120 mM KCl 20 mM HEPES 2mM MgCl ₂ 1 mM EGTA BSA (5mg/ml de tampón) pH 7.4
5. Medio D de homogenización	300 mM sacarosa 2 mM HEPES 0.1 mM EGTA
6. AB mix 48:1,5	48 g de Acrilamida 1,5 g de Bis-Acrilamida
7. Buffer 3x	150 mM Bis-Tris 1.5 M ácido 6-aminohexanoico pH 7
8. Medio de resuspensión de mitocondrias	100 mM ácido 6-aminohexanoico Bis-50 mM Tris-HCl pH 7.0
9. Tampón de carga nativas	5% Serva Blue G-250 100 mM 6-aminohexanoico
10. Solución de transferencia	25 mM Tris 192 mM glicina 20% metanol pH 8.3.
11. Solución <i>In gel</i>	0.14 mM Tris/HCl pH 7.4 10 mM NADH

Anexos

	1 mg/ml NTB
12. Solución de homogenización A	50 mM Tris-HCl 1% Triton X-100 1 mM Ditioneitol pH 7.6 Cocktel de inhibidores de proteasas
13. solución de homogenización B	0.32 M sucrose 10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA 0.2% BSA pH 7.4, Cocktel de inhibidores de proteasas
14. solución fosfatasa inhibidora	10 mM tampon fosfato 150 mM NaCl 2.7 mM KCl 125 mM NaF 250 mM b-glicerofosfato, 250 mM p-nitrofenil fosfato 25 mM NaVO ₃ pH 7.5
15. Tampón isotónico frío	20 mM HEPES pH 7.5 5 mM NaF 5 ml de 0.1 M Na ₂ MoO ₄ 0.1 mM EDTA
16. Tampón de lisis	20 mM HEPES pH 7.9 20% glicerol 420 mM NaCl 1.5 mM MgCl ₂ 0.2 mM EDTA 20 mM NaF 0.5 mM ditioneitol 1 mg/ml leupeptina 0.2 mM fenilmetilsulfonilfluorida
17. Tampón de aislamiento	250 mM sacarosa 2 mM EDTA 10 mM Tris 0.5% BSA pH 7.4
18. medio MiRO5	0.5 mM EGTA 3 mM MgCl ₂ 20 mM Taurina 10 mM KH ₂ PO ₄ 20 mM HEPES 110 mM D -sacarosa 60 mM ácido lactobiónico 0.1% BSA pH 7
19. Solución A de respiración	250 mM sacarosa 0.5 mM Na ₂ EDTA 10 mM Tris

	1% BSA pH 7.4
20. Solución B de respiración	250 mM sacarosa 0.5 mM Na ₂ EDTA 10 mM Tris pH 7.4
21. Solución C de respiración	0.32 M sacarosa 1 mM EDTA-K 10 mM Tris-HCl pH 7.4
22. Fase móvil HPLC para compuestos adenílicos	100 mM fosfato potásico pH 7 1 mM tetrabutilamonio hidrógeno sulfato 1.5%. acetonitrilo
23. Buffer de reacción actividad CI+III	0.5 mM KCN 0.2 mM NADH 0.1 mM citocromo c.
24. Buffer de reacción actividad CI+III	0.5 mM KCN 0.3 mM succinato 0.01mM rotetona

ANEXO 3: COMPOSICIÓN GELES

3.1. GELES NATIVOS DE POLIACRILAMIDA

Composición Gradiente	3% RESOLVING	13% RESOLVING	4% STACKING
AB mix 48:1,5 * ⁶	0,305 ml	0,866 ml	0,25 ml
Buffer 3x * ⁷	1,667 ml	1,111 ml	1 ml
Agua milliQ	3 ml	0,713 ml	1,75 ml
Glicerol al 87%	-----	0,643 ml	-----
APS 20%	20 µl	7 µl	12,5 µl
TEMED	4 µl	3 µl	3 µl

ANEXO 4: ANTICUERPOS

4.1. ANTICUERPOS USADOS EN INMUNODETECCIÓN EN MEMBRANAS

Anticuerpo	Casa comercial/Referencia
Anti-COQ7	Cedido por Hekimi, McGill University, Canada
Anti-COQ6	Santa Cruz Biotechnology, sc-107506
Anti-COQ9	Santa Cruz Biotechnology, sc-271892
Anti-COQ9	Abcam, ab104189
Anti-NRF-1	Santa Cruz Biotechnology, sc-33771
Anti-PGC-1 α	Santa Cruz Biotechnology, sc-13067
Anti-Bcl-2	Santa Cruz Biotechnology, sc-492
Anti-caspasa-3	Santa Cruz Biotechnology, sc-136219
Anti-p53	Santa Cruz Biotechnology, sc-6243
Anti-AIF	Santa Cruz Biotechnology, sc-55519
Anti- β -actina	Santa Cruz Biotechnology, sc-47778
Anti-GAPDH	Santa Cruz Biotechnology, sc-25778
Anti-actina	Santa Cruz Biotechnology, sc-1616
Anti-VIDAC1	Abcam, ab14734
Anti-Lamina A/C	Santa Cruz Biotechnology, sc6215
Anti-NUDFA9	Abcam, ab14713
Anti-ubiquinol-Citocromo C Reductasa proteina Core I	Abcam, ab110252
Anti-conejo IG peroxidasa conjugada con caballo	Santa Cruz Biotechnology, Inc
Anti-ratón IG peroxidasa conjugada con caballo	Santa Cruz Biotechnology, Inc
Anti-cabra IG peroxidasa conjugada con caballo	Santa Cruz Biotechnology, Inc

4.2 ANTICUERPOS USADOS EN INMUNOHISTOQUÍMICA

Anticuerpo	Casa comercial/Referencia
Anti-GFAP	Millipore, MAB360
Anti-oligodendrocitos	Millipore, MAB1580
Anti-tubulina β -III	Covance, MMS-435P
Anti-8-OHdG	QED Bioscience, 12501
Anti-4-HNE	Alpha Diagnostic, HNE11-S

Apéndice

Dysfunctional Coq9 protein causes predominant encephalomyopathy associated with CoQ deficiency

Laura García-Corzo^{1,2}, Marta Luna-Sánchez^{1,2}, Carolina Doerrier^{1,2}, José A. García^{1,2}, Adela Guarás³, Rebeca Acín-Pérez³, Javier Bullejos-Peregrín^{1,2}, Ana López^{1,2}, Germaine Escames^{1,2}, José A. Enríquez³, Darío Acuña-Castroviejo^{1,2} and Luis C. López^{1,2,*}

¹Instituto de Biotecnología, Centro de Investigación Biomédica, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Armilla, Granada, Spain, ²Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada, Spain and ³Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III, Madrid, Spain

Received October 21, 2012; Revised November 27, 2012; Accepted December 12, 2012

Coenzyme Q10 (CoQ₁₀) or ubiquinone is a well-known component of the mitochondrial respiratory chain. In humans, CoQ₁₀ deficiency causes a mitochondrial syndrome with an unexplained variability in the clinical presentations. To try to understand this heterogeneity in the clinical phenotypes, we have generated a Coq9 Knockin (R239X) mouse model. The lack of a functional Coq9 protein in homozygous Coq9 mutant (Coq9^{X/X}) mice causes a severe reduction in the Coq7 protein and, as consequence, a widespread CoQ deficiency and accumulation of demethoxyubiquinone. The deficit in CoQ induces a brain-specific impairment of mitochondrial bioenergetics performance, a reduction in respiratory control ratio, ATP levels and ATP/ADP ratio and specific loss of respiratory complex I. These effects lead to neuronal death and demyelination with severe vacuolization and astrogliosis in the brain of Coq9^{X/X} mice that consequently die between 3 and 6 months of age. These results suggest that the instability of mitochondrial complex I in the brain, as a primary event, triggers the development of mitochondrial encephalomyopathy associated with CoQ deficiency.

INTRODUCTION

Coenzyme Q (CoQ) biosynthesis is a complex process that is present in all mammalian tissues (1). In humans at least 11 genes codify proteins required for the biosynthesis of CoQ and have homologs in bacteria, yeast, nematodes and mice (1). One of these genes, *coq9*, was identified and characterized as a new gene that, when mutated in yeasts, results in a CoQ-deficient phenotype (2). However, the function of Coq9 protein in CoQ biosynthesis is not yet known.

Once CoQ molecules are synthesized, they localize in all tissue's membranes, thereby indicating their involvement in multiple cellular functions. Basically, all these functions are based on their redox properties. In mitochondrial inner membrane, CoQ plays a central role in the function of the mitochondrial electron transport chain (mtETC) because it is

required for the transfer of electrons between complexes I and III. CoQ and its oxidation by the mtETC is also required for the function of several enzymes that link the mtETC to the function of the TCA cycle by succinate dehydrogenase (EC 1.3.5.1), to β -oxidation by the electron-transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase (EC 1.5.5.1), to the shuttling of reduction equivalents from the cytoplasm by the glycerol-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.99.5), to the synthesis of pyrimidines by the dihydroorotate dehydrogenase (EC 1.3.3.1), to the metabolism of glycine by the choline dehydrogenase (EC 1.1.99.1), to the arginine and proline metabolism by the proline dehydrogenase (EC 1.5.99.8) and to the seleno-amino acid metabolism and sulfur assimilation by the sulfide CoQ reductase (EC 1.8.99.1).

Thus, CoQ is a critical molecule in the production of ATP by the mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS)

*To whom correspondence should be addressed at: Centro de Investigación Biomédica, lab 139, Universidad de Granada; Avenida del Conocimiento s/n, Armilla 18100, Granada, Spain. Tel: +34 958241000; Fax: +34 958819132; Email: luisca@ugr.es

system, which is apparently structured in mitochondrial super-complexes (SC) that can be detected by blue native PAGE (3–5). In addition to the bioenergetics involvement, it is well known that CoQ is an important antioxidant and it participates in the redox regulation of the mitochondrial permeability transition pore and the uncoupling proteins (6).

Because of the fundamental functions of CoQ, the deficit in this vital molecule causes mitochondrial disorders with heterogeneous clinical presentations grouped in five major phenotypes: (i) an encephalomyopathy with brain involvement and recurrent myoglobinuria, (ii) an infantile multisystem disorder with encephalopathy usually associated with nephropathy and variable involvement of other organs, (iii) ataxic syndrome with cerebellar atrophy, (iv) an isolated myopathy and (v) a steroid-resistant nephrotic syndrome. Primary CoQ₁₀ deficiency is transmitted as an autosomal recessive trait and may be caused by mutations in any of the known or in additional unknown genes required for its biosynthesis. To date, mutations in *PDSS1*, *PDSS2*, *COQ2*, *COQ4*, *COQ6*, *COQ9* and *ADCK3* have been identified (7). *In vitro* studies from these patients' skin fibroblasts have indicated that the decrease in mitochondrial ATP production, the increase in oxidative stress and the differences in the induction of mitophagy and apoptosis may be critical factors in the development of the disease (8–12). Nevertheless, little is known about the cellular and tissue differences in these parameters following the deficiency in CoQ levels.

To explore the molecular and pathophysiologic consequences of CoQ deficiency and the tissue-specific differences, we have generated *Coq9* knockin mouse model that develops predominant encephalomyopathy at 3 months of age. The function of the *Coq9* protein in the CoQ biosynthetic pathway has also been examined.

RESULTS

Dysfunctional *Coq9* protein, which regulates *Coq7*, produces widespread CoQ deficiency

The *COQ9* gene was identified and characterized as a gene that is required for CoQ biosynthesis pathway in *Saccharomyces cerevisiae* (2,13). Later on, Duncan *et al.* (14) reported a patient with CoQ₁₀ deficiency because of two point mutations in the *COQ9* gene. In spite of these findings, the specific role of the *Coq9* protein in the CoQ biosynthesis pathway is unclear. To study the function of *Coq9* in mammals, we have generated a *Coq9* mutant mouse using homologous recombination to introduce into mouse embryonic stem (ES) cells an R239X (c.715 C>T and c.717 T>A) mutation (see 'Materials and Methods' and Supplementary Material, Figs S1A–S1C) that is homologous to the human R244X *Coq9* mutation (14). Mating of heterozygous mice (*Coq9*^{+X}) produced the expected mendelian distribution of wild-type (*Coq9*^{+/+}), heterozygous mice (*Coq9*^{+X}) and homozygous knockin (*Coq9*^{XX}) mice.

Murine *Coq9* gene (GenBank Accession NP_080728) comprises 9 exons on chromosome 8 and is predicted to encode a 313 amino acid protein (UniProtKB/Swiss-Prot Q8K1Z0). The *Coq9*^{XX} mice are predicted to produce a truncated protein lacking the C-terminal 75 amino acid residues. To confirm the presence of the truncated *Coq9* protein in *Coq9*^{XX} mice,

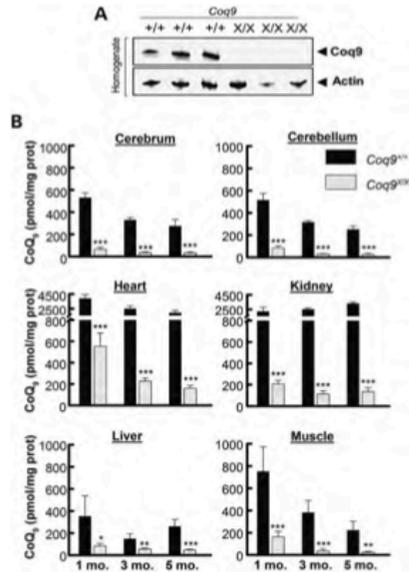


Figure 1. Mutations in the murine *Coq9* gene generate a dysfunctional *Coq9* protein and a widespread CoQ deficiency. (A) Representative western blot analysis of *Coq9* protein in heart homogenate from *Coq9*^{+/+} and *Coq9*^{XX} mice. (B) CoQ₉ levels in tissue homogenates from *Coq9*^{+/+} (*N* = 10) and *Coq9*^{XX} (*N* = 10) mice at 1, 3 and 5 months. Data are expressed as mean ± SD. **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.005 versus *Coq9*^{+/+}.

we first performed an immunoblotting analysis using an anti-*Coq9* antibody against the C-terminal region of the protein. As predicted, we detected a ~21 kDa protein in *Coq9*^{+/+} mice, but not in *Coq9*^{XX} mice (Fig. 1A). Unfortunately, an anti-*Coq9* antibody against N-terminal region of the protein was not available for this study, so we could not demonstrate the presence of a stable truncated protein in *Coq9*^{XX} mice. Anyway, if *Coq9* is involved in CoQ biosynthesis, a dysfunctional *Coq9* protein must produce a severe CoQ deficiency. As expected, *Coq9*^{XX} mice showed a significant decrease in both CoQ₉ (the major form of ubiquinone in rodents) and CoQ₁₀ when compared with the age-mated *Coq9*^{+/+} mice in all examined tissues (cerebrum, cerebellum, heart, kidney, hind legs skeletal muscle and liver) (Fig. 1B and Supplementary Material, Fig. S2). The percentage of decrease in both CoQ₉ and CoQ₁₀ levels were slightly higher in kidney, heart, cerebrum and cerebellum, followed by muscle and liver (Supplementary Material, Table S1). Hence, our results confirmed that *Coq9* protein is involved in the general pathway of CoQ biosynthesis.

An intriguing observation was that the HPLC chromatographs used to quantify the CoQ levels showed an abnormal

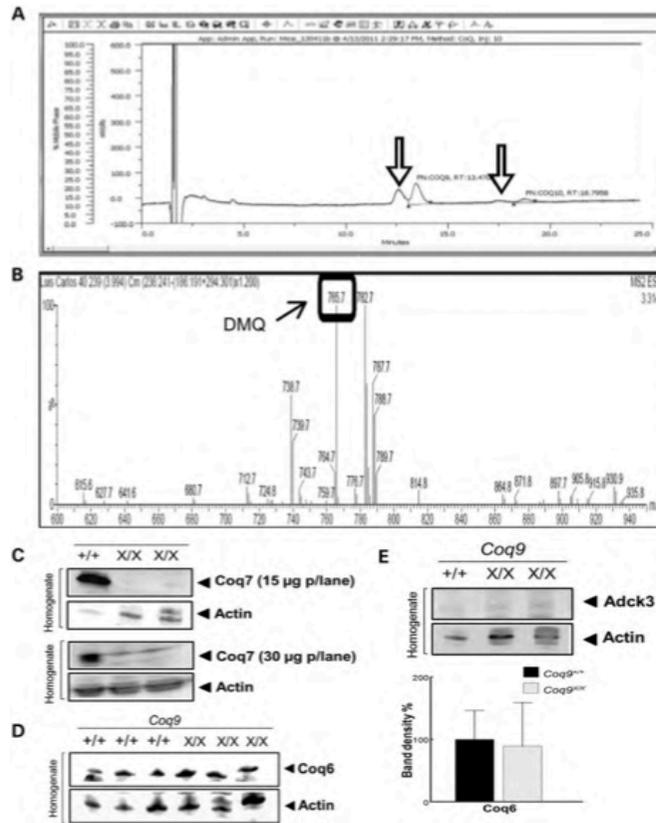


Figure 2. The role of Coq9 protein in the CoQ biosynthetic pathway. (A) HPLC chromatogram in the cerebrum of *Coq9^{X/X}* mice showing two abnormal peaks at the retention times of 12.5 and 17.6 min. (B) Mass spectrometric analysis of the peak with a retention time of 12.5 min indicates that its molecular ion [M + H]⁺ corresponds to 765.7 [M + H]⁺. The monoisotopic mass of the precursor ion corresponds to C₃₃H₄₉O₃ = 764.6. This result is consistent with the identification of the abnormal peak as DMQ₉. (C) Protein levels of Coq7 in heart homogenate from *Coq9^{+/+}* (N = 6) and *Coq9^{X/X}* (N = 6) mice. The Coq7 protein was almost undetectable in *Coq9^{X/X}* mice when 15 μg of proteins were loaded into the gel. However, low levels of Coq7 protein were detected when 30 μg of proteins were loaded in to the gel. (D) Protein levels of Coq6 in heart homogenate from *Coq9^{+/+}* (N = 6) and *Coq9^{X/X}* (N = 6) mice. The results were quantified by densitometry (right panel), and data are expressed as mean ± SD. (E) Protein levels of Adck3 in heart homogenate from *Coq9^{+/+}* and *Coq9^{X/X}* mice.

accumulation of two peaks in *Coq9^{X/X}* mice. The retention times of these two additional peaks were 12.5 and 17.6 min, immediately before the CoQ₉ (13.5 min) and CoQ₁₀ (18.8 min) peaks, respectively (Fig. 2A and Supplementary Material, Fig. S3). Interestingly, these extra peaks were also

observed in the skin fibroblasts belonging to the patient with *COQ9* mutations (14). The mass spectral identification of the former lipid with a retention time of 12.5 min exhibited a molecular ion peak of 765.7 [M + H]⁺ (Fig. 2B) and could thus be identified as demethoxyubiquinone 9 (DMQ₉)

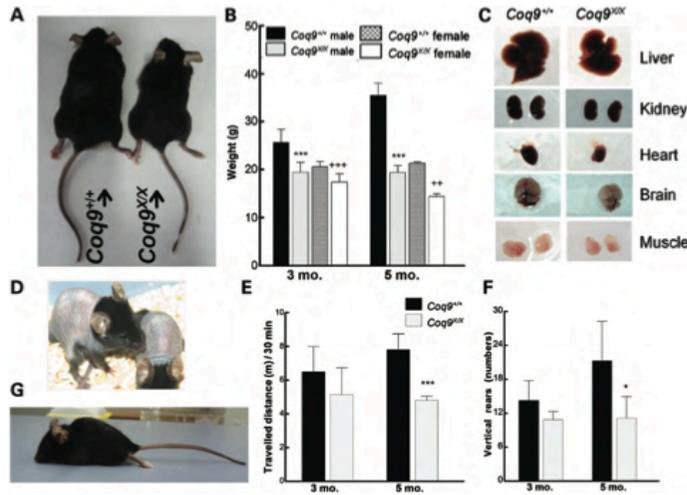


Figure 3. Phenotypic characterization of *Coq9^{KO}* mice. (A) Image of 3 months old *Coq9^{+/+}* and *Coq9^{KO}* mice showing the differences in their sizes. (B) Body weight of males and females *Coq9^{+/+}* ($N = 20$) and *Coq9^{KO}* ($N = 20$) mice at 3 and 5 months old animals. Data are expressed as mean \pm SD. *** $P < 0.005$ versus male *Coq9^{+/+}*; ** $P < 0.01$; **** $P < 0.005$ versus female *Coq9^{+/+}*. (C) Image of the sizes of brain, heart, kidney, liver and muscle of *Coq9^{+/+}* (left panel) and *Coq9^{KO}* mice (right panel) at 3 months of age. (D) Photo of a *Coq9^{KO}* mouse at 20–22nd postnatal day showing the loss of the body hair. (E and F) Open field test of *Coq9^{+/+}* ($N = 16$) and *Coq9^{KO}* ($N = 16$) mice at 3 and 5 months. Traveled distance was measured by intervals of 30 min. (D) Numbers of vertical rears were evaluated by intervals of 5 min during 30 min. (E) Data are expressed as mean \pm SD. * $P < 0.05$; *** $P < 0.005$ versus *Coq9^{+/+}*. (G) Lateral view of *Coq9^{KO}* mouse with severe symptom phenotype represented by a severe paralysis of the legs.

(theoretical mass $[C_{53}H_{80}O_3] = 764.61$) (Fig. 2B). DMQ₉ was accumulated in all tissues of *Coq9^{KO}* mice, and the CoQ₉/DMQ₉ ratio was lower in kidney, heart and skeletal muscle than in cerebrum and cerebellum (Supplementary Material, Fig. S4). DMQ₉ is the substrate for the murine Coq7 protein that catalyzes its hydroxylation to produce 5-hydroxy-ubiquinone (Supplementary Material, Fig. S5). Consequently, homozygous Coq7 knockout mice accumulated DMQ₉ with no production of CoQ₉ (15,16). However, the tissues belonging to *Coq9^{KO}* mice contained both DMQ₉ and CoQ₉. Therefore, our results suggest that Coq9 may regulate Coq7. By virtue of that, we measured the protein levels of the Coq7, revealing that *Coq9^{KO}* mice showed a severe reduction in the Coq7 levels when compared with *Coq9^{+/+}* mice (Fig. 2C). The reduction in the Coq7 levels in the *Coq9^{KO}* mice is very specific because the protein levels of Coq6 and Adck3 did not differ between *Coq9^{+/+}* and *Coq9^{KO}* mice (Fig. 2D and E).

***Coq9^{KO}* mice show clinical signs of predominant encephalomyopathy**

The reduction in CoQ levels in *Coq9^{KO}* mice tissues implies that this mouse model may recapitulate some of the clinical phenotypes associated with human CoQ₁₀ deficiency (7).

As a result, we performed an exhaustive characterization of this mouse model. *Coq9^{KO}* mice were indistinguishable from *Coq9^{+/+}* mice, which corresponds with the recessive transmission of the disease (7). By crossbreeding *Coq9^{+/+}* mice, a normal mendelian distribution was obtained in the offspring. *Coq9^{KO}* mice pups had normal birth weights, sex distribution and early growth. Following the first month of life, *Coq9^{KO}* mice went through a developmental delay evidenced by a reduction in the body and tissues sizes as well as in the body weight (Fig. 3A–C). Curiously, by postnatal day 20–22, the *Coq9^{KO}* mice lost their body hair (Fig. 3D), but it grew back during the next hair-growth cycle. A similar observation was provided by a complex I-deficient mouse model (17,18). Locomotor activity was lower in 3 months old *Coq9^{KO}* mice, with a significant decline at 5 months (Fig. 3E). In a similar way, the numbers of vertical rears were mildly lowered at 3 months and significantly lowered at 5 months (Fig. 3F). No differences in urine albumin, creatinine, glucose and magnesium levels were found between *Coq9^{KO}* and *Coq9^{+/+}* mice (Table S2). Between 3 and 6 months, *Coq9^{KO}* mice developed a rapid and progressive leg paralysis, suggesting an involvement of the central nervous system in the pathology of the disease. In this range of age (3–6 months), *Coq9^{KO}* mice started manifesting moderate

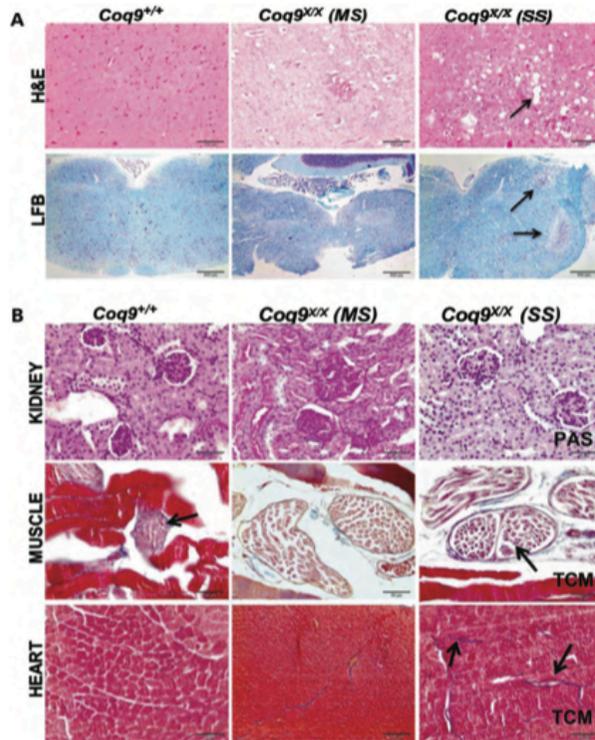


Figure 4. Histologic staining of tissue sections from *Coq9*^{+/+} and *Coq9*^{XX} mice. H&E and LFB stains from *Coq9*^{+/+} and *Coq9*^{XX} mice with MS and SS. A spongiform pathology is observed in *Coq9*^{XX} mice. The pons and the *medulla oblongata* areas show profound demyelination in the *Coq9*^{XX} mice with SS (upper panel, scale bars, 100 μ m; lower panel, scale bars, 500 μ m). (A) PAS stain did not reveal histologic alterations in the kidney of both wild-type and homozygous mice (top panel and scale bar, 50 μ m). The Masson's TCM stain in the muscle showed nerve fibers with severe demyelination in *Coq9*^{XX} mice with SS (middle panel and scale bar, 50 μ m). The heart of *Coq9*^{XX} mice showed an increase in connective tissue between cardiac cells (bottom panel and scale bar, 50 μ m).

symptoms (MS) represented by weight loss and mild walking alterations (Supplementary Material, Movie S1) and it was followed by a progressive development of severe symptoms (SS) manifested by rapid and severe leg paralysis (Fig. 3G and Supplementary Material, Movie S2). These phenotypic changes observed in *Coq9*^{XX} mice were correlated with their early death: *Coq9*^{XX} mice started to die at 3 months, and by 4 months, 50% of them were dead. By month 6, all *Coq9*^{XX} mice were dead. These results suggest that *Coq9*^{XX} mice developed the encephalomyopathic variant associated with CoQ deficiency (7).

To determine whether the phenotype observed in *Coq9*^{XX} mice was the result of anatomopathologic changes, we performed a histopathologic analysis of different tissue sections. Hematoxylin and eosin (H&E) stain of the brain showed an intense vacuolization in the white matter and *medulla oblongata* from *Coq9*^{XX} mice, which was more evident in mice with SS. In addition, we observed dead neurons manifested by pyknotic nuclei that were displaced at the edge of the neuronal bodies (Fig. 4A). These observations indicated that *Coq9*^{XX} mice developed spongiform degeneration and neuronal death. Additionally, Luxol fast blue (LFB) stain revealed

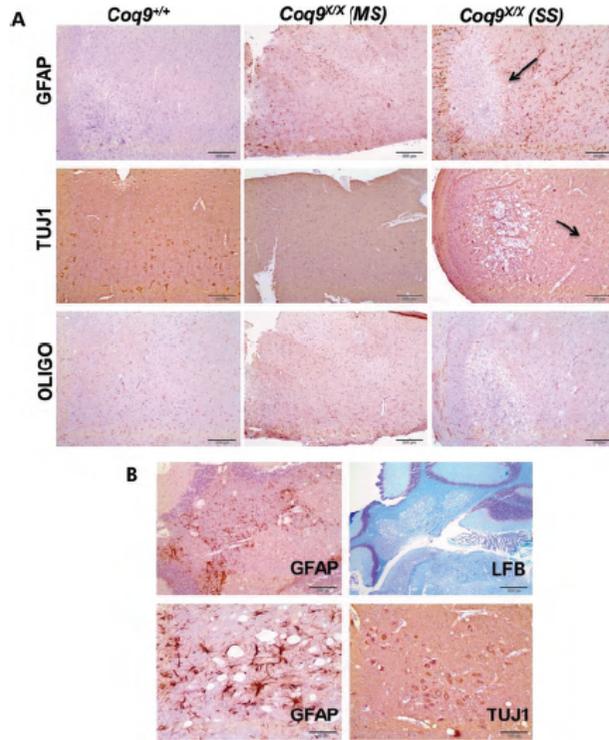


Figure 5. Histologic and immunohistochemical staining of brain sections from *Coq9*^{+/+} and *Coq9*^{SS} mice. (A) Anti-GFAP antibody staining of brain sections from *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{MS} (MS) and *Coq9*^{SS} (SS) mice. *Coq9*^{SS} show abnormal and striking gliotic changes evident as large numbers of GFAP immunoreactive astrocytes with large cell bodies. A clearance area in the pons is indicated with an arrow. Anti-Tubulin β -III (TUJ1) antibody staining shows a loss of neuron's dendrites in SS *Coq9*^{SS} mice. See also Supplementary Material, Figure S4A and S4B. Anti-Oligodendrocytes antibody staining did not reveal any differences between *Coq9*^{+/+} and *Coq9*^{SS} mice (scale bars, 200 μ m). (B) Anti-GFAP antibody staining and LFB staining of cerebellum of *Coq9*^{SS} mice (scale bar, 200 μ m). (B) Anti-GFAP antibody staining of pons shows a reactive astrogliosis with scars formation in *Coq9*^{SS} mice with severe symptom (scale bar, 20 μ m).

a profound demyelination and an increase in glial cells in the pons and the *medulla oblongata* of *Coq9*^{SS} mice. Likewise, it is possible to distinguish a decrease in the Nissl bodies of the neurons. These changes were more evident in mice with SS (Fig. 4A). SS Masson's trichrome (TCM) stain in the hind legs skeletal muscle (*vastus lateralis*) showed nerve fibers with severe demyelination in *Coq9*^{SS} mice (Fig. 4B). The heart showed signs of fibrosis, represented by an increase in connective tissue between cardiac cells (Fig. 4B). Finally, the Periodic acid-Schiff (PAS) stain did not reveal histologic

alterations in the kidney of both wild-type and homozygous mice (Fig. 4B). In the brain, the immunohistochemistry with primary anti-glial fibrillary acid protein (GFAP) antibody revealed numerous astrocytes with enlarged cell bodies in *Coq9*^{SS} mice, particularly in the pons and cerebellum (Fig. 5A and B) and also in the encephalon. The astrocytes proliferation was more pronounced in mice with SS (Fig. 5A and B), where zones with scars formation were observed (Fig. 5B). Immunohistochemistry with primary tubulin beta III (TUJ1) antibody revealed loss of neuron's dendrites in

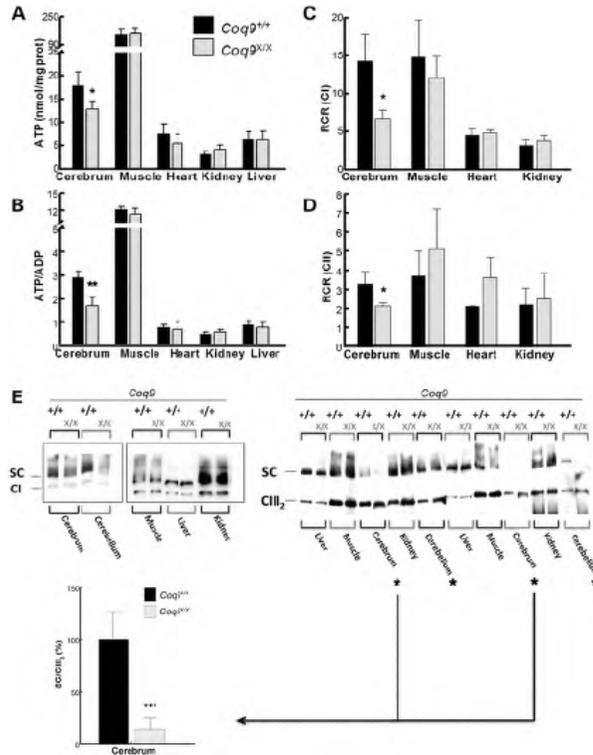


Figure 6. *Coq9^{VX}* mice show profound bioenergetics defect in brain. (A and B) Tissue ATP levels (A) and ATP/ADP ratio (B) from 3 months old *Coq9^{+/+}* (*N* = 7) and *Coq9^{VX}* (*N* = 7) mice. Data are expressed as mean \pm SD. **P* < 0.05; ***P* < 0.01 versus *Coq9^{+/+}*. (C and D) Measurements of mitochondrial respiration represented by the RCR using glutamate/malate as substrates for complex I (C) or succinate as substrate for complex II (D). *N* = 5 in each experimental group. Data are expressed as mean \pm SD. **P* < 0.05 versus *Coq9^{+/+}*. (E) BNIE followed by immunoblotting analysis of mitochondrial SC from 3 months old *Coq9^{+/+}* (*N* = 7) and *Coq9^{VX}* (*N* = 7) mice. Antibodies against NDUFA9 (left panel) and Core I (right panel) were used to detect complexes I and III, respectively. Red asterisk indicate differences between *Coq9^{+/+}* and *Coq9^{VX}* mice. Densitometry analysis of SC and free complex III detected with the anti-core I antibody (bottom panel). Data are represented as SC/III ratio. The results are expressed as mean \pm SD. ****P* < 0.005 versus *Coq9^{+/+}*.

Coq9^{VX} mice, more evident in mice with SS (Fig. 5A and B). On the contrary, immunohistochemistry with primary anti-oligodendrocytes antibody did not show any difference between *Coq9^{+/+}* and *Coq9^{VX}* mice (Fig. 5A), except for the damaged area in the pons that was not stained with any of the techniques used. Therefore, the histopathologic results in *Coq9^{VX}* mice showed signs of predominant encephalomyopathy with astrogliosis and neuronal death.

Defect in the mitochondrial bioenergetics correlates with the encephalomyopathic phenotype of *Coq9^{VX}* mice

Despite a general reduction in CoQ levels in all tissues, the more impaired organ by large in *Coq9^{VX}* mice is the brain. Interestingly, an analysis of the steady state level of ATP in different tissues revealed a significant decrease only in the brain (Fig. 6A). This decrease is not due to an overall decrease

in the adenine nucleotide pool but to a decrease in the ATP/ADP ratio (Fig. 6B), suggesting that the rate of ATP synthesis may be significantly impaired in the brain. Because CoQ is a key component of mitochondrial respiratory chain, the ATP depletion in the brain may reflect impairment in mitochondrial bioenergetics. The ADP-stimulated respiration (state 3) was reduced in cerebrum of *Coq9^{VX}* mice using substrates for both mitochondrial complex I (glutamate plus malate) (Supplementary Material, Table S3A) and complex II (succinate) (Supplementary Material, Table S3B). However, state 4 was increased using the substrates for mitochondrial complex I (Supplementary Material, Table S3A) while it was decreased using the substrate for mitochondrial complex II (Supplementary Material, Table S3B). These results suggest that respiration through complex I is partially uncoupled in cerebrum of *Coq9^{VX}* mice. As a consequence, the respiratory control ratios (RCRs) were significantly decreased in cerebrum of *Coq9^{VX}* mice (Fig. 6C and D), but the decrease in the RCR by glutamate plus malate was higher (64%) than the decrease in RCR by succinate (36%). This strongly suggests that in the brain of *Coq9^{VX}* mice, the complex I-dependent respiration is substantially more impaired than the complex II-dependent respiration. Mitochondria from skeletal muscle and heart of *Coq9^{VX}* mice showed a global reduction in oxygen consumption (Supplementary Material, Tables S3A and S3B), but no changes in the RCR (Fig. 6C and D). Kidneys of *Coq9^{VX}* mice did not show differences in mitochondrial respiration through complex I (Supplementary Material, Table S3A), whereas states 3 and 4 through complex II were slightly decreased (Supplementary Material, Table S3B). The RCR were not different in the kidneys from *Coq9^{+/+}* and *Coq9^{VX}* mice (Fig. 6C and D). The bioenergetics defect in the cerebrum of *Coq9^{VX}* mice was confirmed by the measurement of the CI + III activity (Supplementary Material, Fig. S6). Moreover, the addition of decylubiquinone partially restored the CI + III activity in the cerebrum of *Coq9^{VX}* mice (Supplementary Material, Fig. S6).

Mitochondrial respiratory complexes could assemble into efficient supramolecular associations or SC that behave as functional and physiologic entities (4,5). Interestingly, recent studies have revealed the presence of CoQ in some SC variants (4). The analysis by blue native gel electrophoresis (BNGE) and the subsequent immunoblotting with an anti-NDUF A9 (complex I subunit) antibody showed that the overall amount of complex I substantially forming SC did not change in the mitochondria from different tissues of 3 months old *Coq9^{VX}* mice when compared with *Coq9^{+/+}* mice (Fig. 6E). However, in cerebrum and cerebellum, complex I was decreased (Fig. 6E). In addition, in the immunodetection of complex III (anti-core I antibody), we observed significant differences in cerebrum and cerebellum of *Coq9^{VX}* mice when compared with *Coq9^{+/+}* mice, whereas no changes in any other tissues were appreciated (Fig. 6E). Explicitly, cerebrum and cerebellum from *Coq9^{VX}* mice exhibited higher levels of free complex III than its form bound to the SC (Fig. 6E). This is in agreement with the reduction in complex I that would release complex III by the decrease in the amount of SC containing I/III. Therefore, the brain of *Coq9^{VX}* mice showed a direct correlation between the deficit in CoQ, complex I reduction, mitochondrial respiration and ATP synthesis.

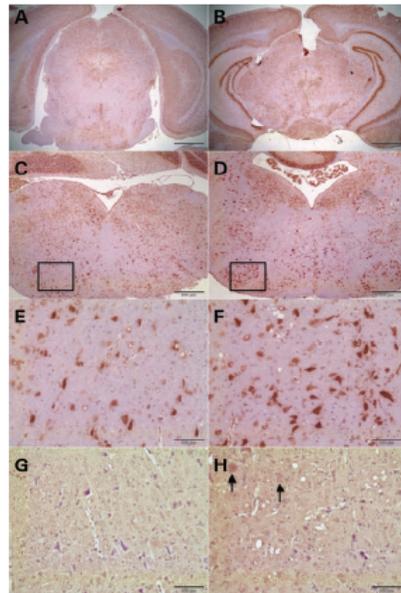


Figure 7. Oxidative damage in the brain of *Coq9^{VX}* mice. (A–F) Immunohistochemical stain against 8-OHdG in the brain of *Coq9^{+/+}* (A, C and E) and *Coq9^{VX}* (B, D and F) mice at 3 months of age (scale bars: A and B, 1 mm; C and D, 500 μ m; and E and F, 100 μ m). (G and H) Immunohistochemical stain against 4-HNE in the brain of *Coq9^{+/+}* (G) and *Coq9^{VX}* (H) mice at 3 months of age (scale bars, 100 μ m).

Oxidative damage in the brain of *Coq9^{VX}* mice

Deficiencies in mitochondrial respiratory chain components are, in some cases, associated with an increase in the production of reactive oxygen species (ROS) with the subsequent oxidative damage to biomolecules. Specifically, CoQ-deficient cells have shown increased oxidative stress when the residual CoQ levels were between 30 and 45% in human skin fibroblasts (10–12) or 46 and 76% in a human neuronal cell line (19). To investigate whether the oxidative stress participates in the brain pathology of *Coq9^{VX}* mice, we performed an immunohistochemistry analysis of brain sections using antibodies against 8-hydroxyguanosine (8-OHdG), a marker of nucleic acid oxidation, and 4-hydroxynonenal (4-HNE), a marker of lipid peroxidation. *Coq9^{VX}* mice showed an increased number of positive cells for 8-OHdG (Fig. 7A and B) and increased intensity in the staining, which is especially evident in the pons (Fig. 7C–F). The immunostaining against 4-HNE did not show profound differences between

Coq9^{+/+} and *Coq9^{XX}* mice. However, some neurons in the encephalon of *Coq9^{XX}* mice showed an increase in 4-HNE stains (Fig. 7G and H).

The energy deficit in neurons triggers caspase-independent apoptosis

Defects in the mitochondrial function are the more plausible explanation for the impossibility of brain tissue to maintain normal levels of ATP. This energetic failure may cause neuronal death and be the primary cause of the histopathologic features on *Coq9^{XX}* mice. In fact, the histologic study of the brain showed the presence of dead neurons in the *Coq9^{XX}* mice with SS. To verify how neuronal death occurred, we performed the TUNEL assay in different brain sections. Brain images of *Coq9^{XX}* mice with MS did not reveal the presence of apoptotic neurons (Fig. 8A). However, brain images from *Coq9^{XX}* mice with SS revealed the presence of apoptotic cells in the pons and in the encephalon (Fig. 8A). Following that, we investigated the mechanisms by which apoptosis was developed. First, we detect low levels of caspase 3 and p53 in mutant mice, as well as overexpression of the antiapoptotic protein bcl2 (Fig. 8B), implying that a caspase-dependent cell death pathway was not activated. Intrigued by our finding that pointed to an apoptotic process in the cerebrum of the *Coq9^{XX}* mice, we measured the expression of the apoptosis induction factor (AIF) in this tissue to check whether a caspase-independent cell death pathway was activated. Interestingly, we found a significant translocation of AIF from the mitochondria to the nucleus suggesting that the apoptotic process triggered was in fact a caspase-independent pathway (Fig. 8C).

DISCUSSION

Following the first reports of human CoQ₁₀ deficiency, there has been an increased interest in discovering the different steps and regulation aspects of CoQ biosynthetic pathway, as well as the pathomechanisms associated with CoQ₁₀ deficiency. In the current study, the generation and characterization of *Coq9^{XX}* mice favor some important conclusions regarding these inquiries: (i) Coq9 protein specifically regulates Coq7 protein in the CoQ biosynthetic pathway, (ii) the presence of a dysfunctional Coq9 protein and/or the deficit in CoQ in the brain causes loss of complex I and an increase in free complex III, leading to a decrease in mitochondrial respiration and ATP synthesis, (iii) mitochondrial dysfunction in the brain induces a caspase-independent apoptotic cell death and (iv) the encephalomyopathic form of CoQ deficiency is progressive and takes place with neuronal death, severe reactive astrogliosis and spongiform degeneration.

CoQ biosynthesis is a complex process that is known in part, thanks to research in bacteria and yeast. One of the proteins involved in this biosynthetic pathway is Coq9, but its specific function is unknown. The involvement of Coq9 in CoQ biosynthesis was initially discovered in yeasts because *coq9* mutant yeasts did not produce CoQ₆ (2). Interestingly, *coq9* point mutant yeasts harboring *adck3* (*coq8/abc1*) on a multicopy plasmid have partial CoQ₆ biosynthesis and

accumulation of DMQ₆ (2,20). *Coq9^{XX}* mice have constitutive levels of Adck3, and they show, similar to *coq9* point mutant yeasts harboring *adck3* on a multicopy plasmid (2,20), reduced CoQ₉ levels and accumulation of DMQ₉. Because DMQ₉ is the substrate for the reaction catalyzed by Coq7, we hypothesized that Coq7 may require Coq9 for its normal function. The reduced levels of Coq7 together with the normal levels of Coq6 and Adck3, other enzymes in the CoQ biosynthesis, confirmed this premise. Coq9 protein has no homology with proteins of known function, but the prediction indicates that it works as a cation/ion/metal-binding protein (Kihara Bioinformatics Laboratory, IN, USA). Because Coq7 possess a di-iron center (21), we may speculate that Coq9 is necessary for the proper conformation of this di-iron center in the Coq7 protein. The co-localization of Coq7 and Coq9 in rat molecular podocytes would reinforce this idea (22).

Once CoQ molecules are synthesized, they play a central role in the OXPHOS system transferring electrons from complexes I and II to complex III (3,23). The OXPHOS system is organized into efficient supramolecular associations or SC. Interestingly, Acín-Pérez and *et al.* (24) demonstrated that complex I, almost in its totality, is forming physical association with complex III *in vivo* to the point that the ablation of complex III destabilizes complex I and promotes its degradation. It is also described that the depletion of complex I does not destabilize complex III, but modifies its distribution between free and supercomplex-associated complex III (24). *Coq9^{XX}* mice showed reduction in complex I with a parallel increase in free complex III only in the brain. This reduction in the complex I amount correlates with the partial restoration of the CI + III activity after the addition of decylubiquinone. In other CoQ-deficient tissues with stable mitochondrial I/III ratios, no differences in mitochondria coupled respiration and ATP levels were found between *Coq9^{+/+}* and *Coq9^{XX}* mice. Therefore, our study suggests that the destabilization of the mitochondrial complex I is a critical event triggered by the CoQ deficiency that reduces mitochondrial ATP synthesis. It is unclear why this tissue has a specific defect, but the differences (~40%) in the protein composition of mitochondria from different mouse tissues suggest that there are differences in the mitochondria organization and function depending on the tissue (25). One possibility is a tissue-specific role of Coq7, which is reduced in the *Coq9^{XX}* mice, in the distribution of CoQ through the outer and inner mitochondrial membranes, as it has been recently suggested (26). Therefore, further investigations will be needed to clarify whether the loss of complex I in brain is a molecular-specific or CoQ levels-specific phenomenon.

The accumulation of DMQ₉ in *Coq9^{XX}* mice tissues does not seem to be a critical factor for the cerebrum-specific bioenergetics impairment because cerebrum and cerebellum showed higher CoQ₉/DMQ₉ ratios than other tissues. DMQ is not functional in the mitochondrial respiratory chain, (27) and mice with accumulation of DMQ₉ and no production of CoQ are embryonically lethal (15,16). Moreover, the accumulation of DMQ does not seem to produce detrimental effects in the mitochondrial respiratory chain because Coq9 and Coq7 mutant yeasts are not functionally distinguishable from other ubiquinone-deficient mutant yeasts (1,28).

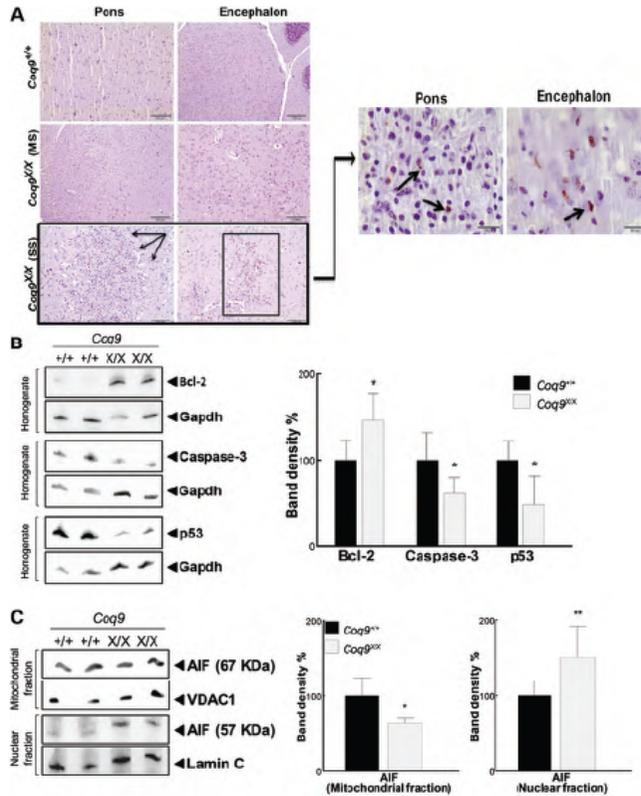


Figure 8. Apoptotic markers in the brain of *Coq9*^{+/+} and *Coq9*^{X/X} mice. (A) Pons and encephalon from *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{X/X} (MS) and *Coq9*^{X/X} (SS) mice stained by the TUNEL assay. Apoptotic bodies were detected in both areas from *Coq9*^{X/X} (SS) mice (scale bars, 100 μ m). (B) Analysis of the caspase-dependent mitochondrial apoptotic pathway in cerebrium of *Coq9*^{+/+} (*N* = 7) and *Coq9*^{X/X} (*N* = 7) mice. The results were quantified by densitometry (right panels), and data are expressed as mean \pm SD. **P* < 0.05 versus *Coq9*^{+/+}. (C) Analysis of the caspase-independent mitochondrial apoptotic pathway in cerebrium of *Coq9*^{+/+} (*N* = 7) and *Coq9*^{X/X} (*N* = 7) mice. The results were quantified by densitometry (bottom panel), and data are expressed as mean \pm SD. **P* < 0.05; ***P* < 0.01 versus *Coq9*^{+/+}.

The consequence of energy depletion in the brain is an increase in apoptotic neuronal death triggered by translocation of AIF from mitochondria to the nucleus, a route of cell death pathway mitochondrial dependent, but caspase independent. The AIF-dependent pathway seems to be particularly important in the induction of apoptosis in neurons (29–31). Similar to our results, the cell death induced as a consequence of the lack of mitochondrial glutathione peroxidase 4 (GPx4)

was mediated through the AIF translocation to the nucleus (31). Moreover, caspase 3 was not activated in the *GPx4*^{-/-} cells, and the overexpression of Bcl2 did not prevent the apoptosis cell death (31). Similar outcomes were found in the brain of *Coq9*^{X/X} mice. Another question, however, is whether the energy depletion is the only cause of the caspase-independent cell death. In this regard, the cell death in CoQ10-deficient fibroblasts has been associated with a combination of

increased oxidative stress and a decreased ATP synthesis (11,32). Takahashi and *et al.* (33) suggested that the increase in apoptosis in the embryos of *Coq7* knockout mice was caused by the bioenergetics failure. Other important issue is that the mechanisms to induce apoptosis may be different depending on the cell type or tissue. In cortical neurons, for example, it has been suggested that both energy failure and oxidative stress would contribute to the caspase-independent neuronal death (34). This circumstance may be also plausible in the brain of *Coq9^{XX}* mice, where an overall increase in 8-OHdG and accumulation of 4-HNE in some neurons were observed. The increased oxidative damage detected in the brain of *Coq9^{XX}* mice and in the kidney of *Pdss2* mutant mice suggests that oxidative stress is involved in the pathology of CoQ deficiency *in vivo* (35,36). Future studies with an exhaustive evaluation of the ROS generation, oxidative damage and antioxidant defenses in *Coq9^{XX}* mice tissues, as well as the effects of antioxidant therapies, will provide the detailed mechanisms of the induction of the caspase-independent neuronal death.

Finally, the histopathologic evaluation of *Coq9^{XX}* mice showed loss of neuronal dendrites and neuronal death, demyelination in the white matter and the ponds of the brain, as well as in the nerve fibers of the hind leg skeletal muscle, and signs of fibrosis in the heart. The neuronal death also induced reactive astrogliosis, a process that can exert beneficial effects in the initial phase, supporting neuronal survival; however, when the response progresses over time, the reactive astrogliosis may be detrimental (37). This last phase of reactive astrogliosis can be identified by a typical scar formation that is clearly apparent in the brain of *Coq9^{XX}* mice with SS.

The causes of the clinical heterogeneity associated with human CoQ10 deficiency are poorly understood. The main progress in this area has been developed in cellular models because of the lack of suitable animal models with the different clinical phenotypes. The *Coq9^{XX}* mice described here is the first animal model showing biochemical, molecular, histologic and behavioral signs resembling human mitochondrial encephalomyopathy associated with CoQ deficiency. The tissue-specific pathomechanisms described in *Coq9^{XX}* mice unlock new possibilities for the mitochondrial organization and function. Given that some of these mechanisms are common to other mitochondrial encephalomyopathies as well as neurodegenerative and neuromuscular disorders, this *Coq9^{XX}* mouse model will be very useful not only for developing and testing therapies for CoQ deficiency but also for other illnesses related to mitochondria.

MATERIALS AND METHODS

Generation of knockin Coq9 mouse

A positively identified C57BL/6 BAC clone, RP23-128L6, was used to isolate the *Coq9* genomic sequence for vector construction. A 7.72 kb fragment spanning from the upstream of exon 4 to downstream of exon 9 was first subcloned into a backbone vector derived from vector plasmid pSP72 (Promega) using the recombinering technology. The mutation CGT > TGA (R239X) within exon 7 was generated by three-step PCR mutagenesis. Four mutagenesis primers [PT1, PT2,

PT3 and PT4 (*BsiWI*)] were designed to amplify a fragment with the size of 1165 bp, which incorporates the mutation at the desired location (Supplementary Material, Fig. S1A). The PCR fragment containing the mutation was then used to replace the wild-type sequence using an endogenous *EcoRV* site and an engineered *BsiWI* site. The neomycin drug selection cassette flanked by both LoxP and flippase recognition target (FRT) sites is inserted 205 bp downstream of exon 7. The final targeting vector is composed of a long homology arm extending ~5.2 kb 5' to the point mutation in exon 7, a short homology arm extending 2.17 kb 3' to the neomycin cassette, the engineered mutation Arg > stop and the neomycin selection cassette flanked by LoxP and FRT sites (Supplementary Material, Fig. S1B). The total size of the targeting construct (including the backbone vector) is 11.82 kb. It contains both ampicillin- and kanamycin-resistant genes for bacteria transformation. The targeting vector was confirmed by restriction analysis and sequencing after each modification. The vector was linearized by *NotI* restriction enzyme digestion and then transfected into IC1 C57BL/6 ES cells by electroporation to generate targeted ES cell lines (inGenious Targeting Laboratory, NY, USA).

After selection with G418 antibiotic, approximately 200 resistant clones were isolated and screened by PCR using *Coq9* primers outside of the targeting sequence with neomycin-resistant gene primers. Homologous recombinants were confirmed by Southern blot analyses using probes recognizing *Coq9* genomic sequences outside of the targeting vector (Supplementary Material, Fig. S1C) (primers A1, LAN1, COOK3 and UNI). Presence of the c.715 C>T and c.717 T>A mutations were confirmed by sequencing (primer COOK4). Cells from two to four ES clones harboring the homologous recombinants were submitted for injection into C57BL/6J blastocysts and generation of chimeric mutant mice. The germline transmission of the mutation was confirmed by PCR, Southern blot (Supplementary Material, Fig. S1D) (primers PT1, F7, A1 and F3) and sequencing (primer COOK4). Heterozygous mice were subsequently bred with FLPe mice (38) on a C57BL/6 background to remove the Neo cassette. The deletion of the Neo cassette was confirmed by PCR using the Neo Del1 and Neo Del2a primers. The FLPe transgene was eventually eliminated from the pedigree by further breeding. For all experiments, heterozygous mice for the knockin allele were crossbred to obtain wild-type controls (*Coq9^{+/+}* = *Coq9^{+/+}*), heterozygous knockin (*Coq9^{+/R239X}* = *Coq9^{+/Δ}*) or homozygous knockin (*Coq9^{R239X/R239X}* = *Coq9^{XX}*) mice. Mice were housed in the Animal Facility of the University of Granada under an SPF zone with lights on at 7:00 am and off at 7:00 pm. Mice had unlimited access to water and rodent chow. Institutional Animal Care and Use Committees approved all experiments.

Quantification of CoQ₉ and CoQ₁₀ levels in mice tissues

CoQ₉ and CoQ₁₀ from mice tissues were extracted by mixing tissue extracts with 1-propanol. After 2 min vortex, the solution was centrifuged at 11 300 g for 5 min. The resultant supernatant was injected in a HPLC system (Gilson, WI, USA), and the lipid components were separated by a reverse phase symmetry C18 3.5 μm, 4.6 × 150 mm column (Waters, Spain), using a mobile phase consisting of methanol,

ethanol, 2-propanol, acetic acid (500:500:15:15) and 50 mM sodium acetate at a flow rate of 0.9 ml/min. The electrochemical detector consisted of an ESA Coulochem III with the following setting: guard cell (upstream of the injector) at +900 mV, conditioning cell at -600 mV (downstream of the column) and followed by the analytical cell at +350 mV (32). CoQ₉ and CoQ₁₀ concentrations were estimated by comparison of the peak areas with those of standard solutions of known concentrations. The results were expressed in pmol CoQ/mg protein.

Ultra carrying out liquid chromatography- mass spectrometer (MS/MS) analysis of intermediate metabolites

Lipids extracts were obtained as described above for the CoQ quantification. Samples were analyzed using an Acquity ultra carrying out liquid chromatography system coupled to a Xevo TQs detector of mass spectrometer (MS/MS) with an electrospray ionization (Waters Corporation). The analytical separation column was a BEH C18, 1.7 μm, 2.1 × 50 mm column (Waters, Spain) (39). The mobile phase consisted of methanol and 5 mM ammonium acetate at the constant flow rate of 0.3 ml/min. Source and desolvation temperatures were set at 150 and 300°C, respectively. Nitrogen was used as both cone gas (150 l/h) and desolvation gas (500 l/h), and argon was used as collision gas (0.14 ml/min). Mass spectrometry analyses were carried out in full scan mode between 600 and 950 *uma* to improve the sensitivity of the analysis.

Evaluation of SC formation by BNGE

BNGE was performed on mitochondrial fraction from mice tissues. Mitochondrial isolation was performed as previously described (40). Tissues were homogenized in a glass-TEFON homogenizer. Liver and kidney were homogenized (1:4, w/v) in the homogenization medium A [0.32M sucrose, 1 mM EDTA and 10 mM Tris-HCl (pH 7.4)]; cerebellum and cerebellum were homogenized (1:5, w/v) in the homogenization medium A plus 0.2% free fatty acids BSA; heart was homogenized (1:10, w/v) in the homogenization medium B [0.075 M sucrose, 0.225 M sorbitol, 1 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA), 0.1% free fatty acids BSA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4)]; and skeletal muscle was homogenized (1:20, w/v) with ultraturax in homogenization medium C (0.12 M KCl, 0.02 M 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA and 5 mg/ml free fatty acids BSA). Liver, kidney, cerebellum, cerebellum and heart homogenates were centrifuged at 1000g for 5 min at 4°C to remove nuclei and debris. Mitochondria were collected from supernatants after centrifuging at 14 400g for 2 min at 4°C. Skeletal muscle homogenate was centrifuged at 600g for 10 min at 4°C. The supernatant (s1) was kept on ice, and the pellet was re-suspended in eight volumes of buffer A and centrifuged at 600g for 10 min at 4°C. The subsequent supernatant (s2) was combined with s1 and centrifuged at 17 000g for 10 min at 4°C. The pellet obtained was re-suspended in 10 volumes of medium A and centrifuged at 7000g for 10 min at 4°C. The pellet was re-suspended in one volume of

medium B (0.3 M sucrose, 2 mM HEPES and 0.1 mM EGTA) and centrifuged at 3000g for 10 min at 4°C.

The mitochondrial pellets from all tissues were suspended in 75 μl (heart and cerebellum), 120 μl (skeletal muscle), 140 μl (cerebellum and kidney) and 800 μl (liver) in the corresponding homogenization buffers. An aliquot of each sample was used for protein determination. The remaining samples were then centrifuged at 17 000g for 3 min at 4°C. Mitochondrial pellets were suspended in an appropriate volume of buffer D [1 M 6-aminohexanoic acid, 50 mM Bis-Tris-HCl (pH 7.0)] to be at 10 mg/ml, and the membrane proteins were solubilized by the addition of digitonin (4 μg/g) and incubated for 5 min in ice. After 30 min of centrifugation at 13 000g, the supernatant was collected, and 3 μl of 5% Brilliant Blue G dye prepared in 1 M 6-aminohexanoic acid was added (4). Mitochondrial proteins (100 μg) were then applied and run on a 3–13% gradient native gel using electrophoresis system mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-rad). Western blot was performed using a mini Trans-Blot Cell onto polyvinylidene difluoride membranes and probed with specific antibodies against complex I, anti-NUDFA9 (Abcam, ab14713) and complex III, anti-ubiquinol-Cytochrome C Reductase Core Protein I (Abcam, ab110252) (4).

Sample preparation and western blot analysis

Western blot analyses were performed in cerebellum and heart homogenates, as well as mitochondrial and nuclei fractions. For the experiments in total homogenate samples, cerebellum and heart were homogenized in homogenization buffer A (50 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100 and 1 mM Dithiothreitol, pH 7.6, protease inhibitor cocktail) at 1100 r.p.m. in a glass-teflon homogenizer. Tissue homogenate was sonicated and centrifuged at 1000g for 5 min at 4°C, and the resultant supernatant was used for western blot analysis. For mitochondria isolation, the cerebellum was homogenized in homogenization buffer B (0.32 M sucrose, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA and 0.2% fatty acid-free BSA, pH 7.4, protease inhibitor cocktail) at 600 r.p.m. in a glass-teflon homogenizer. Cerebellum homogenate was centrifuged at 1000g for 5 min at 4°C. The supernatant was then centrifuged at 17 000g for 2 min at 4°C. The resultant pellet containing the mitochondrial fraction was washed in 1.5 ml of homogenization buffer B under similar conditions. The mitochondrial pellet was re-suspended in 100 μl of homogenization buffer A and stored in aliquots at -80°C. For nuclei isolation, cerebellum was excized, weighed, washed with saline and homogenized in 0.5 ml phosphate inhibitor buffer (10 mM phosphate buffer, 150 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 125 mM NaF, 250 mM β-glycerophosphate, 250 mM *p*-nitrophenyl phosphate and 25 mM NaVO₃, pH 7.5) at 600 r.p.m. with a Stuart Scientific SS2 stirrer with a teflon pestle. The homogenate was centrifuged at 300g for 5 min at 4°C, and the pellet obtained was re-suspended in 0.25 ml of ice-cold hypotonic buffer (20 mM HEPES, pH 7.5, 5 mM NaF, 5 μl of 0.1 M Na₂MoO₄ and 0.1 mM EDTA). After incubation for 15 min at 4°C, 50 μl of 10% IGEPAL was added, and the sample was then centrifuged at 14 000g for 1 min at 4°C. The nuclear pellet was re-suspended in 100 μl of lysis buffer (20 mM HEPES, pH 7.9, 20% glycerol, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 20 mM NaF, 0.5 mM dithiothreitol, 1 μg/ml leupeptin and 0.2 mM phenylmethylsulfonyl

fluoride), followed by incubation at 4°C for 30 min on a shaking platform. After vortex mixing, the resulting suspension was centrifuged at 14 000g for 10 min at 4°C. The supernatant (nuclear fraction) was stored in aliquots at -80°C (41).

Fourteen micrograms of proteins from the sample extracts were electrophoresed in a PhastGel™ Homogeneous 12.5 using a PhastSystem instrument (GE Healthcare Europe GmbH, Spain). The proteins were transferred to an Amersham Hybond™ ECL™ nitrocellulose membrane (GE Healthcare Europe GmbH, Spain) and probed with target antibodies. Protein-antibody interactions were detected with peroxidase-conjugated horse anti-mouse, anti-rabbit or anti-goat IgG antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), using Amersham ECL™ prime western blotting detection reagent (GE Healthcare Europe). Bands quantification were carried out using an Image Station 2000R (Kodak, Spain) and the Kodak ID 3.6 software. Quantitative values of the bands were normalized by GAPDH, actin, β -actin, VDAC1 or Lamin C, and the data were expressed in terms of percent relative to wild-type mice.

The following primary antibodies were used: anti-COQ7 (generously provided by Dr Hekimi, McGill University, Canada), anti-COQ6 (Santa Cruz Biotechnology, sc-107506), anti-COQ9 (Santa Cruz Biotechnology, sc-271892), anti-COQ9 (Abcam, ab104189), anti-NRF-1 (Santa Cruz Biotechnology, sc-33771), anti-PGC-1 α (Santa Cruz Biotechnology, sc-13067), anti-Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology, sc-492), anti-caspase-3 (Santa Cruz Biotechnology, sc-136219), anti-p53 (Santa Cruz Biotechnology, sc-6243) and anti-AIF (Santa Cruz Biotechnology, sc-55519). As loading controls, the following antibodies were used: anti- β -actin (Santa Cruz Biotechnology, sc-47778), anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, sc-25778), anti-Actin (Santa Cruz Biotechnology, sc-1616), anti-VDAC1 (Abcam, ab14734) and anti-Lamin A/C (Santa Cruz Biotechnology, sc6215).

Mitochondrial respiration

To isolate fresh mitochondria, mice were sacrificed, and the organs were extracted rapidly on ice. Muscle and heart were submerged in 1 mg/ml proteinase K solution (for 30 s in heart and 60 s in hind leg skeletal muscle). Then, tissues were homogenized (1:10, w/v) in isolation buffer (250 mM sucrose, 2 mM EDTA, 10 mM Tris and 0.5% free fatty acids albumin, pH 7.4) at 800 r.p.m. at 4°C with a glass-TEFLON homogenizer. The homogenate of each tissue was centrifuged twice at 1000g for 5 min at 4°C, and the supernatant was centrifuged at 23 000g for 10 min at 4°C. Then, the mitochondrial pellets were suspended in 1 ml of isolation buffer and centrifuged at 13 000g for 3 min at 4°C. The final crude mitochondrial pellet was re-suspended in MiRO5 medium [0.5 mM EGTA, 3 mM MgCl₂, 20 mM Taurine, 10 mM KH₂PO₄, 20 mM Hepes, 110 mM D-sucrose, 60 mM lactobionic acid and 0.1% (w/v) free fatty acid albumin, pH7]. Kidney was homogenized (1:10, w/v) in a respiration buffer A (250 mM Sucrose, 0.5 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris and 1% free fatty acid albumin) at 800 r.p.m. in a glass-TEFLON homogenizer. Then, the homogenate was centrifuged at 500g for 7 min at 4°C, and the supernatant was centrifuged at 7800g for 10 min at 4°C. The pellet was then re-suspended in respiration

buffer B (250 mM Sucrose, 0.5 mM Na₂EDTA and 10 mM Tris), and an aliquot was used for protein determination. The remaining sample was then centrifuged at 6000g for 10 min at 4°C. The pellet was re-suspended in buffer A and centrifuged again at 6000g for 10 min at 4°C. The final crude mitochondrial pellet was re-suspended in MiRO5 medium. Cerebrum was homogenized (1:10, w/v) in a respiration buffer C (0.32 M Sucrose, 1 mM EDTA-K⁺ and 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) at 500 r.p.m. at 4°C in a glass-TEFLON homogenizer. The homogenate was centrifuged at 13 000g for 3 min at 4°C. S1 was kept on ice, and the pellet was re-suspended in 5 ml of buffer A and centrifuged at 13 000g for 3 min at 4°C. The subsequent supernatant (s2) was combined with s1 and centrifuged at 21 200g for 10 min at 4°C. Mitochondrial pellet of this step was re-suspended in 0.85 ml of extraction buffer A containing 15% Percoll, poured into ultracentrifuge tubes containing a Percoll gradient formed by 1 ml 40% Percoll and 1 ml 23% Percoll in buffer A and centrifuged at 63 000g for 30 min at 4°C. Pure mitochondria, corresponding to the fraction between 23 and 40% Percoll, were collected and washed twice with 1 ml of buffer A at 10 300g for 10 min at 4°C. Mitochondrial pellets were suspended in MiRO5 medium.

Mitochondrial respiration was measured by high-resolution respirometry using an OROBOROS Oxygraph-2k instrument at 37°C (42). Respiration in isolated mitochondria (0.09–0.1 mg protein/ml in cerebrum; 0.2–0.6 mg protein/ml in kidney; 0.01–0.03 mg of protein/ml in heart; 0.01–0.03 mg protein/ml in muscle) was measured in 2 ml MiRO5 medium that was previously equilibrated in the chamber with air at 37°C and stirred at 750 r.p.m. until a stable signal at air saturation was obtained. The sequence of measurements of respiratory states was as follows: initial state 2 was measured in the presence of 10 mM glutamate plus 2 mM malate (respiration through complex I) or 10 mM succinate + 2.5 μ M rotenone (respiration through complex II); then, maximal mitochondrial respiration (state 3) was stimulated by adding 0.25 mM ADP, and state 4 was determined after state 3 in brain mitochondria, when all added ADP was consumed. In kidney, heart and skeletal muscle mitochondria, state 4 was measured after the addition of 3 μ g/ml of oligomycin (state 4_o). State 3 and state 4 (or state 4_o) were expressed in pmol O₂/(s \times mg protein). The RCR was calculated as the ratio of state 3 to state 4 (or state 4_o).

Histology and immunohistochemistry

Mice tissues were formalin fixed and paraffin embedded. Multiple sections (4 μ m thickness) were deparaffinized with xylene and stained with H&E, Masson's TCM, PAS and LFB. Immunohistochemistry was carried out in the same sections, using the following primary antibodies: Glial fibrillary acidic protein or anti-GFAP (Millipore, MAB360), anti-oligodendrocytes (Millipore, MAB1580), Neuronal Class III β -tubulin anti-TUJ1 (Covance, MMS-435P), 8-OHdG (QED Bioscience, 12501) and 4-HNE (Alpha Diagnostic, HNE11-S) (42). The TUNEL method was performed in these samples using a commercial kit (ApopTag® Plus Peroxidase *in situ* Apoptosis Detection Kit, Code: S7101, Millipore) (43). Dako Animal Research Kit for mouse primary antibodies

(Dako Diagnóstico S.A., Spain) was used for the qualitative identification of antigens by light microscopy. Sections were examined at 40–400 \times with an OLYMPUS CX41 microscope, and the images were scanned under equal light conditions with the CELL A computer program.

Measurement of adenine nucleotides levels

Adenine nucleotides were separated and quantified by a Gilson HPLC-UV (44). Briefly, mice were sacrificed by cervical dislocation, and the whole animal was immediately frozen in liquid nitrogen. Tissues were quickly dissected on a cold plate, and 50 mg of each piece of tissue was homogenized in 500 μ l of ice-cold 0.5 M perchloric acid, kept on ice for 10 min and then centrifuged at 25 000g for 10 min at 4°C. The pellets were stored at –80°C for protein measurement. The supernatants were neutralized with 50 μ l of 4M K₂CO₃, kept on ice for 5 min and centrifuged at 12 000g for 10 min at 4°C. The resulting supernatants were kept at –80°C until injection into the HPLC. The mobile phase consisted of 100 mM potassium phosphate (pH 7), 1 mM tetrabutylammonium hydrogensulfate and 1.5% acetonitrile. Sample was run isocratically at a flow rate of 1.5 ml/min through a Kromasil® C18 (5 μ m; 4.6 \times 250 mm) reverse-phase column. The retention times for AMP, ADP and ATP were 3.4, 6.9, and 11.8 min, respectively. Standard curves for AMP, ADP and ATP were constructed with 15, 30 and 60 nmol of each nucleotide. Absorbance of the samples was measured with an UV detector at 254 nm wavelength, and the concentration of each nucleotide in the samples was calculated based on the peak area. Adenine nucleotide levels were expressed in nmol/mg protein.

Determination of the metabolite profile in urine

Urine samples were collected for 24 h and analyzed in a BS-200 Clinical Chemistry Analyzer (Mindray Medical España S.L., Spain) at 37°C. The following colorimetric tests were performed: urea, magnesium, creatinine, glucose, calcium, Arsenazo III and albumin, microalbumin (Linear Chemicals S.L., Spain).

Open-field test

To check spontaneous locomotor activity, we used the open-field test. The apparatus consisted of a square arena in a ground space of 25 \times 25 \times 25 cm. Walls were opaque, so the animals cannot see the room. Each mouse was placed in the center of the square arena, and its movement monitored through the video-tracking system SMART® (Panlab S.L., Spain) for 30 min after an adaptation period of 30 min. (45). For each mouse, distance traveled (cm) and vertical rears (numbers) were quantified. Those tests were performed between 8 and 9 p.m. under red light exposure. At the end of each trial, any defecation was removed, and the apparatus was wiped with 70% ethanol.

Statistical analysis

Data are expressed as the mean \pm SD of 520 experiments per group. Two-tailed Student's *t*-test was used to compare the

mean between groups. A *P*-value of 0.05 was considered to be statistically significant.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at *HMG* online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr Hekimi (McGill University, Canada) for providing the anti-Coq7 antibody. We are grateful to Dr Samuel Cantarero (Universidad de Granada), Dr Ana Nieto (Universidad de Granada) and Dr Manuel Pablo Olmos (AnaPath, Granada, Spain) for technical support. The authors appreciate the critical comments from Dr Catarina M. Quinzii (Columbia University).

Conflict of Interest statement. J.A.E. is a senior researcher of the CNIC. M.L.S. is a predoctoral fellow from the Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo, Junta de Andalucía. A.G. is a predoctoral fellow from the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain. A.L. is a postdoctoral fellow from the Universidad de Granada.

FUNDING

This work was partially supported by grants from the Marie Curie International Reintegration Grant Programme (COQMITMEL-266691 to L.C.L.) within the seventh European Community Framework Programme, from Ministerio de Economía y Competitividad, Spain (SAF2009-08315 to L.C.L., SAF2009-08007 to J.A.E. and CSD2007-00020 to J.A.E.), from the Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo, Junta de Andalucía (P10-CTS-6133 to L.C.L.) from the 'CEIBioTie' (20F12/1 to L.C.L.) and 'Incent' Programs of the Universidad de Granada, and from Comunidad Autónoma de Madrid (P2010/BMD-2402 to J.A.E.). The CNIC was supported by the MEC and the Pro-CNIC Foundation. R.A.P. and L.C.L. were supported by the 'Ramón y Cajal' National Programme, Ministerio de Economía y Competitividad, Spain (RYC-2011-07826 and RYC-2011-07643, respectively). J.A.G. and C.D. were supported by the Instituto de Salud Carlos III, Spain.

REFERENCES

1. Tran, U.C. and Clarke, C.F. (2007) Endogenous synthesis of coenzyme Q in eukaryotes. *Mitochondrion*, 7(Suppl), S62–S71.
2. Johnson, A., Gin, P., Marbois, B.N., Hsieh, E.J., Wu, M., Barros, M.H., Clarke, C.F. and Tzagoloff, A. (2005) COQ9, a new gene required for the biosynthesis of coenzyme Q in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 280, 31397–31404.
3. Lemaez, 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–C1239.
4. Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Peleato, M.L., Pérez-Martos, A. and Enriquez, J.A. (2008) Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol. Cell*, 32, 529–539.

5. Schagger, H. (2001) Blue-native gels to isolate protein complexes from mitochondria. *Methods Cell Biol.*, **65**, 231–244.
6. Turunen, M., Olsson, J. and Dallner, G. (2004) Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim. Biophys. Acta*, **1660**, 171–199.
7. Emanuele, V., Lopez, L.C., Berardo, A., Naini, A., Tadesse, S., Wen, B., D'Agostino, E., Solomon, M., DiMauro, S., Quinzii, C. et al. (2012) Heterogeneity of coenzyme Q10 deficiency: patient study and literature review. *Arch. Neurol.*, **69**, 978–983.
8. Rodriguez-Hernandez, A., Cordero, M.D., Salviati, L., Artuch, R., Pineda, M., Briones, P., Izquierdo, L.G., Cotán, D., Navas, P. and Sanchez-Alcaraz, J.A. (2009) Coenzyme Q deficiency triggers mitochondria degradation by mitophagy. *Autophagy*, **5**, 19–32.
9. Lopez-Martin, J.M., Salviati, L., Trevison, E., Montini, G., DiMauro, S., Quinzii, C., Hirano, M., Rodriguez-Hernandez, A., Cordero, M.D., Sanchez-Alcaraz, J.A. et al. (2007) Missense mutation of the COQ2 gene causes defects of biogenesis and de novo pyrimidine synthesis. *Hum. Mol. Genet.*, **16**, 1091–1097.
10. Quinzii, C.M., Lopez, L.C., Von-Molkte, J., Naini, A., Krishna, S., Schuelke, M., Salviati, L., Navas, P., DiMauro, S. and Hirano, M. (2008) Respiratory chain dysfunction and oxidative stress correlate with severity of primary CoQ10 deficiency. *FASEB J.*, **22**, 1874–1885.
11. Quinzii, C.M., Lopez, L.C., Gökerson, R.W., Dorado, B., Coku, J., Naini, A.B., Lagier-Tourenne, C., Schuelke, M., Salviati, L., Carozzo, R. et al. (2010) Reactive oxygen species, oxidative stress, and cell death correlate with level of CoQ10 deficiency. *FASEB J.*, **24**, 3733–3743.
12. Quinzii, C.M., Tadesse, S., Naini, A. and Hirano, M. (2012) Effects of inhibiting CoQ10 biosynthesis with 4-nitrobenzoate in human fibroblasts. *PLoS One*, **7**, e36066.
13. Hsieh, E.J., Gin, P., Gulmezian, M., Tran, U.C., Saiki, R., Marbois, B.N. and Clarke, C.F. (2007) *Saccharomyces cerevisiae* Coq9 polypeptide is a subunit of the mitochondrial coenzyme Q biosynthetic complex. *Arch. Biochem. Biophys.*, **463**, 19–26.
14. Duncan, A.J., Bitner-Grödzicz, M., Meunier, B., Costello, H., Hargreaves, I.P., Lopez, L.C., Hirano, M., Quinzii, C.M., Sadowski, M.L., Handy, J. 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**, 558–566.
15. Nakai, D., Yuasa, S., Takahashi, M., Shimizu, T., Asumi, S., Isono, K., Takao, T., Suzuki, Y., Kuroyanagi, H., Hirokawa, K. et al. (2001) Mouse homologue of coq7/clk-1, longevity gene in *Caenorhabditis elegans*, is essential for coenzyme Q synthesis, maintenance of mitochondrial integrity, and neurogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **289**, 463–471.
16. Levasseur, F., Miyadera, H., Siriox, J., Tremblay, M.L., Kita, K., Shoubridge, E. and Hékimis, S. (2001) Ubiquinone is necessary for mouse embryonic development but is not essential for mitochondrial respiration. *J. Biol. Chem.*, **276**, 46160–46164.
17. Kruse, S.E., Watt, W.C., Marcinek, D.J., Kapur, R.P., Scherckman, K.A. and Palmiter, R.D. (2008) Mice with mitochondrial complex I deficiency develop a fatal encephalomyopathy. *Cell Metab.*, **7**, 312–320.
18. Leong, D.W., Komen, J.C., Hewitt, C.A., Arnaud, E., McKenzie, M., Phipson, B., Bahlo, M., Laskowski, A., Kinkel, S.A., Davey, G.M. et al. (2012) Proteomic and metabolomic analyses of mitochondrial complex I-deficient mouse model generated by spontaneous B2 short interspersed nuclear element (SINE) insertion into NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 4 (Ndufs4) gene. *J. Biol. Chem.*, **287**, 20652–20663.
19. Dublerley, K.E., Abramov, A.Y., Chastani, A., Heales, S.J., Rahman, S. and Hargreaves, I.P. (2012) Human neuronal coenzyme Q(10) deficiency results in global loss of mitochondrial respiratory chain activity, increased mitochondrial oxidative stress and reversal of ATP synthase activity: implications for pathogenesis and treatment. *J. Inher. Metab. Dis.*, doi:10.1007/s10545-012-9511-0.
20. Xie, L.X., Ozeir, M., Tang, J.Y., Chen, J.Y., Kieffer-Jaquinet, S., Fontecave, M., Clarke, C.F. and Pierrat, F. (2012) Over-expression of the Coq8 kinase in *Saccharomyces cerevisiae* coq null mutants allows for accumulation of diagnostic intermediates of the Coenzyme Q6 biosynthetic pathway. *J. Biol. Chem.*, **287**, 23571–23581.
21. Stenmark, P., Grunler, J., Mattsson, J., Sindelar, P.J., Nordlund, P. and Berthold, D.A. (2001) A new member of the family of di-iron carboxylase proteins. Coq7 (clk-1), a membrane-bound hydroxylase involved in ubiquinone biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, **276**, 33297–33300.
22. Heeringa, S.F., Chermi, G., Chaki, M., Zhou, W., Sloan, A.J., Ji, Z., Xie, L.X., Salviati, L., Hurd, T.W., Vega-Warner, V. et al. (2011) COQ6 mutations in human patients produce nephrotic syndrome with sensorineural deafness. *J. Clin. Invest.*, **121**, 2013–2024.
23. Genova, M.L. and Lenz, G. (2011) New developments on the functions of coenzyme Q in mitochondria. *BioFactors*, **37**, 330–354.
24. Acín-Pérez, R., Bayona-Baňaluy, M.P., Fernández-Silva, P., Moreno-Loshuertos, R., Pérez-Martos, A., Brúno, 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.
25. Mootha, V.K., Bunkenborg, J., Olsen, J.V., Hjerrild, M., Wiazniewski, J.R., Stahl, E., Bolouri, M.S., Ray, H.N., Sihag, S., Kamal, M. et al. (2003) Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria. *Cell*, **115**, 629–640.
26. Lapointe, J., Wang, Y., Bigas, E. and Hékimis, S. (2012) The submitochondrial distribution of ubiquinone affects respiration in long-lived Meck1+/- mice. *J. Cell Biol.*, **199**, 215–224.
27. Lenz, G., Daves, G.D. Jr. and Köfalkers, K. (1968) Organic structural specificity and sites of coenzyme Q in succinoxidase and DPNH-oxidase systems. *Arch. Biochem. Biophys.*, **123**, 539–550.
28. Miki, R., Saiki, R., Ozoe, Y. and Kawamukai, M. (2008) Comparison of a coq7 deletion mutant with other respiration-defective mutants in fission yeast. *FEBS J.*, **275**, 5309–5324.
29. Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, M., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M. et al. (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, **397**, 441–446.
30. Cregan, S.P., Forán, A., MacLaurin, J.G., Callaghan, S.M., Ceconi, F., Yu, S.W., Dawson, T.M., Dawson, V.L., Park, D.S., Kroemer, G. et al. (2002) Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *J. Cell Biol.*, **158**, 507–517.
31. Seiler, A., Schneider, M., Forster, H., Roth, S., Wirth, E.K., Culmes, C., Plemla, N., Kremmer, E., Radmark, O., Wurst, W. et al. (2008) Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death. *Cell Metab.*, **8**, 237–248.
32. Lopez, L.C., Quinzii, C.M., Area, E., Naini, A., Rahman, S., Schuelke, M., Salviati, L., DiMauro, S. and Hirano, M. (2010) Treatment of CoQ10 deficient fibroblasts with ubiquinone, CoQ analogs, and vitamin C: time- and compound-dependent effects. *PLoS One*, **5**, e11897.
33. Takahashi, M., Shimizu, T., Morizumi, E. and Shirasawa, T. (2008) Clk-1 deficiency induces apoptosis associated with mitochondrial dysfunction in mouse embryos. *Mech. Ageing Dev.*, **129**, 291–298.
34. Lang-Rollin, I.C., Rideout, H.J., Noticewala, M. and Stefanis, L. (2003) Mechanisms of caspase-independent neuronal death: energy depletion and free radical generation. *J. Neurosci.*, **23**, 11015–11025.
35. Falk, M.J., Polyak, E., Zhang, Z., Peng, M., King, R., Maltzman, J.S., Okwuogo, E., Horyn, O., Nakamaru-Ogino, E., Ostrovsky, J. et al. (2011) Probucol ameliorates renal and metabolic sequelae of primary CoQ deficiency in Pds2 mutant mice. *EMBO Mol. Med.*, **3**, 410–427.
36. Quinzii, C.M., Garone, C., Emanuele, V., Tadesse, S., Krishna, S., Dorado, B. and Hirano, M. (2012) Tissue-specific oxidative stress and loss of mitochondria in CoQ-deficient Pds2 mutant mice. *FASEB J.*, doi:10.1096/fj.12-209361.
37. Sofroniew, M.V. (2009) Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.*, **32**, 638–647.
38. Rodriguez, C.I., Buchholz, F., Galloway, J., Soquera, R., Kasper, J., Aynla, R., Stewart, A.F. and Dymecki, S.M. (2000) High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat. Genet.*, **25**, 139–140.
39. Vestergren, R., Ullah, S., Cousins, I.T. and Berger, U. (2012) A matrix effect-free method for reliable quantification of perfluoroalkyl carboxylic acids and perfluoroalkane sulfonic acids at low parts per trillion levels in dietary samples. *J. Chromatogr. A*, **1237**, 64–71.
40. Fernandez-Vizarrá, E., Lopez-Perez, M.J. and Enriquez, J.A. (2002) Isolation of biogenetically competent mitochondria from mammalian tissues and cultured cells. *Methods*, **26**, 292–297.
41. Zhang, M., Guo, R.X., Mo, L.Q., Liao, X.X., Li, W., Zhi, J.L., Sun, S.N., Wang, Y.L., Cui, Y., Liu, W. et al. (2009) Nuclear factor-kappaB mediates cytoprotection of hydrogen peroxide preconditioning against

Apéndice

1248 *Human Molecular Genetics*, 2013, Vol. 22, No. 6

- apoptosis induced by oxidative stress in PC12 cells. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **36**, 304–311.
42. Lopez, L.C., Akman, H.O., Garcia-Cazorla, A., Dorado, B., Martí, R., Nishino, I., Tadesse, S., Pizzorno, G., Shungu, D., Bonilla, E. *et al.* (2009) Unbalanced deoxynucleotide pools cause mitochondrial DNA instability in thymidine phosphorylase deficient mice. *Hum. Mol. Genet.*, **18**, 714–722.
43. Suzuki, Y., Imada, T., Yamaguchi, I., Yoshitake, H., Sanada, H., Kashiwagi, T. and Takaba, K. (2012) Effects of prolonged water washing of tissue samples fixed in formalin on histological staining. *Biotech. Histochem.*, **87**, 241–248.
44. Manfredi, G., Yang, L., Gajewski, C.D. and Mattiazzi, M. (2002) Measurements of ATP in mammalian cells. *Methods*, **26**, 317–326.
45. Pallud, J., Haussler, U., Langlois, M., Hamelin, S., Devaux, B., Deransart, C. and Depaulis, A. (2011) Dentate gyrus and hilus transection blocks seizure propagation and granule cell dispersion in a mouse model for mesial temporal lobe epilepsy. *Hippocampus*, **21**, 334–343.