

**Consecuencias moleculares y
fisiopatológicas de la deficiencia en
Coenzima Q. Evaluación de estrategias
terapéuticas alternativas al suplemento
exógeno de ubiquinona.**



Grupo de Investigación CTS-101
Comunicación Intercelular
Instituto de Biotecnología
Centro de Investigación Biomédica
PTS Granada
Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Programa de doctorado de Biomedicina

Marta Luna Sánchez

2015

Editor: Unviersidad de Granada. Tesis Doctorales

Autora: Marta Luna Sánchez

ISBN: 978-84-9125-487-4

URI: <http://hdl.handle.net/10481/42251>

Certificaciones

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

CERTIFICA QUE D^a. **Marta Luna Sánchez**, Licenciada en Farmacia, ha realizado bajo su dirección y en el Departamento de Fisiología e Instituto de Biotecnología de la Universidad de Granada, el trabajo titulado: **“Consecuencias moleculares y fisiopatológicas de la deficiencia en Coenzima Q. Evaluación de estrategias terapéuticas alternativas al suplemento exógeno de ubiquinona”** reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 23 Noviembre de 2015

Vº Bº Director

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and a horizontal line, representing Luis Carlos López García.

Luis Carlos López García

La interesada

A handwritten signature in blue ink, featuring a stylized 'M' and 'L' followed by a horizontal line, representing Marta Luna Sánchez.

Marta Luna Sánchez

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

CERTIFICA QUE D^a. **Marta Luna Sánchez**, Licenciada en Farmacia, ha realizado bajo su dirección y en el Departamento de Fisiología e Instituto de Biotecnología de la Universidad de Granada, el trabajo titulado: **“Consecuencias moleculares y fisiopatológicas de la deficiencia en Coenzima Q. Evaluación de estrategias terapéuticas alternativas al suplemento exógeno de ubiquinona”** reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 23 Noviembre de 2015

Vº Bº Director

La interesada

Handwritten signature in black ink, appearing to read "D. AWW" with a horizontal line underneath.Handwritten signature in blue ink, appearing to read "Marta Luna Sánchez" with a horizontal line underneath.

Darío Acuña Castroviejo

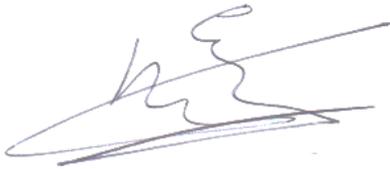
Marta Luna Sánchez

Dña. GERMAINE ESCAMES ROSAS, Profesora titular de fisiología de la Universidad de Granada,

CERTIFICA QUE D^a. **Marta Luna Sánchez**, Licenciada en Farmacia, ha realizado bajo su dirección y en el Departamento de Fisiología e Instituto de Biotecnología de la Universidad de Granada, el trabajo titulado: **“Consecuencias moleculares y fisiopatológicas de la deficiencia en Coenzima Q. Evaluación de estrategias terapéuticas alternativas al suplemento exógeno de ubiquinona”** reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 23 Noviembre de 2015

Vº Bº Director



Germaine Escames Rosa

La interesada



Marta Luna Sánchez

A mi familia

Contratos & Proyectos

A. Contratos predoctorales:

- **Tipo de contrato:** Contratada predoctoral adscrita a Proyecto de Investigación de Excelencia de la Junta de Andalucía (P10-CTS-6133). A tiempo completo desde 1/2/2012 al 31/1/2016.
- **Organismo:** Universidad de Granada
- **Centro:** Centro de Investigación Biomédica y Facultad de Medicina
- **Departamento:** Fisiología

B. Proyectos de investigación:

- **Título del proyecto:** Mouse model of CoQ deficiency: pathogenesis and treatment
Referencia: 2009/IRG/246691
Entidad de realización: Universidad de Granada
Investigador principal: Luis Carlos López García
Investigador/es participante/s: Laura García Corzo; Marta Luna Sánchez; Darío Acuña Castroviejo
Entidad/es financiadora/s: Marie Curie International Reintegration Grant, FP7
Financiación: 100.000,00 €
Fecha de inicio: 01/2009 **Fecha fin:** 31/10/2013
- **Título del proyecto:** Consecuencias moleculares y fisiopatológicas de la deficiencia en Coenzima Q: evaluación de estrategias terapéuticas alternativas al suplemento exógeno de ubiquinona
Referencia: P10-CTS-6133
Entidad de realización: Universidad de Granada
Investigador principal: Luis Carlos López García
Investigador/es participante/s: Marta Luna Sánchez; Carmen Jessica Vengas Maldonado; Francisco Ortiz García
Entidad/es financiadora/s: Proyecto de excelencia, Junta de Andalucía
Financiación: 234.247,00 €
Fecha de inicio: 15/03/2011 **Fecha fin:** 30/04/2016
- **Título del proyecto:** Fisiopatología y tratamiento de la deficiencia en Coenzima Q
Referencia: 20F12/1
Entidad de realización: Universidad de Granada
Investigador principal: Luis Carlos López García

Investigador/es participante/s: Marta Luna Sánchez; Laura García-Corzo

Entidad/es financiadora/s: CEIBioTic Granada

Financiación: 20.000,00 €

Fecha de inicio: 01/05/2012

Fecha fin: 31/12/2012

- **Título del proyecto:** Estudio preclínico para el tratamiento de la encefalopatía mitocondrial asociada a la deficiencia en Coenzima Q
Referencia: SAF2013- 47761-R
Entidad de realización: Universidad de Granada
Investigador principal: Luis Carlos López García
Investigador/es participante/s: Marta Luna Sánchez; Agustín Hidalgo Gutiérrez
Entidad/es financiadora/s: Ministerio de Economía y Competitividad, Gobierno de España
Financiación: 102.850,00 €
Fecha de inicio: 01/01/2014 **Fecha fin:** 30/06/2016
- **Título del proyecto:** Targeting Nutrient-Sensing Signaling Pathways for the Treatment of Mitochondrial Diseases
Referencia: TSR-2014-1
Entidad de realización: Universidad de Granada
Investigador principal: Luis Carlos López García
Investigador/es participante/s: Marta Luna Sánchez; Eliana Barriocanal Casado
Entidad/es financiadora/s: Fundación “Todos somos raros, todos somos únicos”
Financiación: 97.000,00 €
Fecha de inicio: 24/03/2015 **Fecha fin:** 24/03/2017

C. Otras becas y ayudas disfrutadas:

- **Tipo de ayuda:** Becas para estancias de investigación internacionales.
Convocatoria: Programa de Movilidad Internacional de Estudiantes de Posgrado de la Universidad de Granada y CEIBiotic Granada
Entidad de realización: University College of London, Reino Unido
Duración: 5 semanas
Entidad/es financiadora/s: Universidad de Granada y CEIBiotic Granada

- **Tipo de ayuda:** Becas para estancias de investigación internacionales.
Convocatoria: Programa de Movilidad Internacional de Estudiantes de Posgrado de la Universidad de Granada y CEIBiotic Granada
Entidad de realización: University of Hannover, Alemania
Duración: 9 semanas
Entidad/es financiadora/s: Universidad de Granada y CEIBiotic Granada
- **Tipo de ayuda:** Asistencia a congresos
Convocatoria: Programa de participación en congresos del Plan Propio de investigación de la Universidad de Granada
Lugar de celebración: Tampere, Finlandia
Congreso: Euromit 2014. 9th international meeting on mitochondrial pathology
Entidad/es financiadora/s: Universidad de Granada y CEIBiotic Granada
- **Tipo de ayuda:** Asistencia a congresos
Convocatoria: ayudas para asistencia a congresos de la “Federation of European Biochemical Societies (FEBS)”
Lugar de celebración: Cambridge, Reino Unido
Congreso: MIPsummer 2012: 5th MIP summer school. FEBS Workshop
Entidad/es financiadora/s: The Federation of European Biochemical Societies (FEBS)

Publicaciones & Comunicaciones

Publicaciones científicas relacionadas con esta tesis:

- Luna-Sánchez M; Díaz-Casado E; Barca E; Tejada MÁ; Montilla-García Á; Cobos EJ; Escames G; Acuña-Castroviejo D; Quinzii CM; López LC. **The clinical heterogeneity of coenzyme Q10 deficiency results from genotypic differences in the Coq9 gene.** EMBO Mol Med. 2015; 7(5):670-87. IF: 8.665; 9/123 (Q1), Medicine, Research & Experimental.
- Lohman DC; Forouhar F; Beebe ET; Stefely MS; Minogue CE; Ulbrich A; Stefely JA; Sukumar S; Luna-Sánchez M; Jochem A; Lew S; Seetharaman J; Xiao R; Wang H; Westphall MS; Wrobel RL; Everett JK; Mitchell JC; López LC; Coon JJ; Tong L; Pagliarini DJ. **Mitochondrial COQ9 is a lipid-binding protein that associates with COQ7 to enable coenzyme Q biosynthesis.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2014; 111(44):E4697-705. IF: 9.737; 4/56 (Q1), Multidisciplinary Sciences.
- López LC; Luna-Sánchez M; García-Corzo L; Quinzii CM; Hirano M. **Pathomechanisms in coenzyme q10-deficient human fibroblasts.** Mol Syndromol. 2014; 5(3-4):163-9.
- García-Corzo L; Luna-Sánchez M; Doerrier C; Ortiz F; Escames G; Acuña-Castroviejo D; López LC. **Ubiquinol-10 ameliorates mitochondrial encephalopathy associated to CoQ deficiency.** Biochim Biophys Acta. 2014; 1842(7): 893-901. IF: 4.882; 54/291 (Q1), Biochemistry & Molecular Biology.
- López LC; Venegas C; Cabrera-Vique C; García-Corzo L; Luna-Sánchez M; Acuña-Castroviejo D; Escames G. **Argan oil-contained antioxidants for human mitochondria.** Nat Prod Commun 2013; 8 (1): 47-50. IF: 0.924; 76/123 (Q3), Food Science & Technology.
- García-Corzo L; Luna-Sánchez 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. IF: 6.677; 16/165 (Q1), Genetics & Heredity.

- Luna-Sánchez M; López LC. **Antioxidant Potential of Coenzyme Q₁₀.** In: Coenzyme Q10, from Fact to Fiction. Nova Biomedical, New York, 2015. ISBN: 978-1-63482-841-3.

Otras publicaciones:

- Doerrier C; García JA; Volt H; Díaz-Casado ME; Lima-Cabello E; Ortiz F; Luna-Sánchez M; Escames G; López LC; Acuña-Castroviejo D. **Identification of mitochondrial deficits and melatonin targets in liver of septic mice by high-resolution respirometry.** Life Sciences. 2015; 121:158-65. IF: 2.255; 53/123 (Q1), Medicine, Research & Experimental.
- Escames G; Díaz-Casado ME; Doerrier C; Luna-Sánchez M; López LC; Acuña-Castroviejo D. **Early gender differences in the redox status of the brain mitochondria with age: effects of melatonin therapy.** Horm Mol Biol Clin Investig. 2013; 16(2):91-100.
- Ortiz F; Acuña-Castroviejo D; Doerrier C; Dayoub JC; Lopez LC; Venegas C; Garcia JA; López A; Volt H; Luna-Sánchez M; Escames G. **Melatonin blunts the mitochondrion/NLRP3 connection and protects against radiation-induced oral mucositis development.** Journal of Pineal Research 2015; 58(1): 34-49. IF: 9.600; 4/128 (Q1), Endocrinology & Metabolism
- Ortiz F; García JA; Acuña-Castroviejo D; Doerrier C; López A; Venegas C; Volt H; Luna-Sánchez M; López LC; Escames G. **The beneficial effects of melatonin against heart mitochondrial impairment during sepsis: inhibition of iNOS and preservation of nNOS.** Journal of Pineal Research 2014; 56(1): 71-81. IF: 9.600; 4/128 (Q1), Endocrinology & Metabolism.

Comunicaciones orales en congresos relacionados con esta Tesis Doctoral:

- Luna-Sánchez M; Lima-Cabello E; Tejada MA; Cobos EJ; Acuña-Castroviejo D; Escames G; López LC. **Unraveling the causes of the clinical heterogeneity of coenzyme q10 deficiency using two genetically modified mouse models.** Federation of Spanish Physiological Societies (SECF). 2014
- Luna-Sánchez M; García-Corzo L; Doerrier C; López A; Bullejos-Peregrín J; Escames G; Acuña-Castroviejo D; López LC. **CoQ deficiency: molecular and pathophysiological consequences (II).** Federation of European Physiological Societies (FEPS). 2012
- Luna-Sánchez M; García-Corzo L; Doerrier C; López A; Bullejos-Peregrín J; Escames G; Acuña-Castroviejo D; López LC. **CoQ deficiency: molecular and pathophysiological consequences (I).** MIPsummer 2012: 5th MIP summer school. FEBS Workshop.
- Luna-Sánchez M; Díaz-Casado E; Barca E; Hidalgo-Gutiérrez A; Barriocanal-Casado E; Quinzii CM; López LC. **Understanding the causes of the clinical heterogeneity of Coenzyme Q10 deficiency due to different molecular defects in *Cdq9* gene.** 11th MiP conference on Mitochondrial Physiology.

Posters en congresos relacionados con esta Tesis Doctoral:

- Luna-Sánchez M; García-Corzo L; Doerrier C; López A; Bullejos-Peregrín J; Escames G; Acuña-Castroviejo D; López LC. **CoQ deficiency: molecular and pathophysiological consequences (II).** 7th Conference of the International Coenzyme Q10 Association.
- Luna-Sánchez M; Lima-Cabello E; Tejada MA; Cobos EJ; Escames G; Acuña-Castroviejo D; López LC. **Understanding the molecular basis of the clinical heterogeneity of Coenzyme Q10 deficiency.** Euromit 2014. 9th international meeting on mitochondrial pathology.

Abreviaturas

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

2,4 dHB: Ácido 2,4-dihidroxibenzoico

4-HB: 4-hidroxibenzoato

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico copia

ADP: Adenosina difosfato

ATP: Adenosina trifosfato

BNGE: Blue native gel electroforesis

BSA: Albúmina de suero bovino

CABC1: Chaperona del complejo bc₁

CoQ: Coenzima Q

CoQH₂: Ubiquinol

COX: Citocromo oxidasa

CRM: Cadena respiratoria mitocondrial

DMQ: Demetoxiubiquinona

ETF-DH: Flavoproteína deshidrogenasa de transferencia de electrones

FAD: Flavin adenín nucleótido

GFAP: Proteína ácida fibrilar glial

GS-/ GSH: Glutathion

GSS-: Persulfuro de glutatión

H₂S: Sulfuro de hidrógeno

H&E: Hematoxilina-eosina

HAB: 3-hexaprenil 4-aminobenzoato

HHB: 3-hexaprenil 4-hidroxibenzoato

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

HPLC-EQ: Cromatografía líquida de alta resolución con detector electroquímico

KCN: Cianuro potásico

KO: Knock-out

LFB: Luxol fast blue

LC-MS/MS: espectrometría de masas

MEFs: fibroblastos embrionarios de ratón

MELAS: Encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y accidente cerebrovascular

NADH: Dinucleótido de nicotinamida adenina

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido

NMD: Degradación del ARN mensajero mediada por mutaciones terminadoras

pABA: Ácido para-aminobenzoico

PAS: Ácido Periódico de Schiff

PDSS1: Prenildifosfato sintasa - subunidad 1

PDSS2: Prenildifosfato sintasa - subunidad 2

PTPm: Poro de transición de la permeabilidad mitocondrial

PVDF: Polifluoruro de vinilideno

RHOD: rodanasa

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RRF: fibras rojas rasgadas

SC: Supercomplejo

SDH: Succinato deshidrogenasa

SDO: Persulfuro dioxigenasa

SO: Sulfito oxidasa

SO₃⁻²: Sulfito

SO₄⁻²: Sulfato

SQR: Sulfuro:quinona oxidoreductasa

SSO₃⁻²: Tiosulfato

TGM: tricrómica de Gomori modificada

ST: Tiosulfato sulfotransferasa

UCP: Proteína desacoplante

*“La ciencia es la búsqueda de la verdad,
que es el esfuerzo por entender el mundo:
implica el rechazo de prejuicios, de dogmas, de la revelación,
pero no el rechazo de la moral”*

Linus Pauling

*“La ciencia no es una escalera que progresa de menos a más,
sino un árbol que se ramifica constantemente”*

Adaptado de la Teoría de la Evolución de Darwin

Resumen

Resumen

La coenzima Q (CoQ) es un lípido natural endógeno sintetizado en la mitocondria. Su biosíntesis, 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. A continuación, COQ2 cataliza la unión del anillo hidroxibenzoico a la cola isoprenoide y a partir de este punto, otras 5 enzimas, nombradas de COQ3 a COQ7, llevan a cabo una serie de reacciones de metilación, carboxilación e hidroxilación del anillo aromático, en un orden especulativo, para originar finalmente las moléculas de CoQ. Algunas proteínas, como, COQ9, ADCK3, ADCK4 y PTC7, parecen tener una función regulatoria en la biosíntesis de CoQ. Los estudios en levaduras muestran que estas enzimas parecen actuar de forma conjunta asociándose en un complejo multiproteico de biosíntesis de CoQ. Esta organización, permitiría, entre otras cosas, incrementar la eficiencia catalítica. Sin embargo, en mamíferos, no se ha demostrado la existencia de este complejo multiproteico de biosíntesis de CoQ.

Una vez que las moléculas de CoQ son sintetizadas, se localizan en la membrana interna mitocondrial, donde ejercen su función central en la cadena respiratoria mitocondrial, transportando electrones desde el complejo respiratorio I y II al III. Además de esta función principal, la CoQ también participa en otras funciones celulares, donde cabe destacar su papel en el metabolismo mitocondrial del sulfuro de hidrógeno (H_2S) como cofactor de la reacción catalizada por la Sulfuro:Quinona Oxidoreductasa (SQR).

Resumen

La deficiencia primaria en CoQ, es un síndrome autosómico recesivo causada por mutaciones en genes involucrados directamente en su biosíntesis. Esta enfermedad, 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; 3) ataxia cerebelosa con atrofia del cerebelo; 4) miopatía aislada; y 5) síndrome nefrótico resistente a esteroides. Las causas de esta variabilidad clínica se desconocen y resulta difícil explicar por qué mutaciones en un mismo gen pueden manifestarse clínicamente en diferentes fenotipos; por ejemplo, mutaciones en *COQ2* y *COQ6* se han asociado indistintamente con nefropatía o con la variante multisistémica infantil.

El tratamiento de la deficiencia primaria en CoQ consiste en el suplemento exógeno con ubiquinona-10. No obstante, la respuesta al tratamiento es muy variable entre pacientes, siendo en ciertos casos inefectiva, especialmente en aquellos pacientes con síntomas neurológicos (encefalopatía, ataxia cerebelosa o desorden multisistémico). El motivo por el que el tratamiento fracasa podría deberse a la baja absorción y biodisponibilidad de la CoQ₁₀ cuando se administra exógenamente vía oral. Estudios recientes en levaduras muestran que es posible saltar el defecto enzimático mediante la administración de análogos del 4-HB (como el ácido 2,4-dihidroxibenzoico (2,4-diHB), el ácido 3,4-dihidroxibenzoico (3,4-diHB), y el ácido vanílico (VA)) que serviría como precursores de la CoQ y producirían un efecto “bypass” en virtud del cual se conseguirían aumentar los niveles endógenos de CoQ.

Así, para una mejor comprensión de los mecanismos moleculares asociados a la disparidad genotípica-fenotípica de la deficiencia primaria en CoQ, en el presente estudio, comparamos desde un punto de vista

Resumen

bioquímico, molecular, genético, histopatológico y fenotípico, dos modelos de ratón deficientes en CoQ con dos mutaciones diferentes en el mismo gen, *Coq9* (*Coq9^{Q95X}* and *Coq9^{R239X}*). Además, se estudia si la deficiencia primaria en CoQ podría afectar al metabolismo mitocondrial del H₂S y si esta alteración podría estar involucrada en las consecuencias fisiopatológicas de la enfermedad.

Los resultados de esta tesis muestran que la existencia de dos codones prematuros de parada diferentes en la proteína COQ9 afecta de forma diferente a los niveles de otras proteínas COQ, lo que sugiere que la presencia de una proteína truncada COQ9 en el modelo de ratón *Coq9^{R239X}* produce un efecto dominante negativo sobre el complejo multiproteico de biosíntesis de CoQ. Como consecuencia, el ratón *Coq9^{R239X}* presenta una reducción global de las proteínas COQ, lo que causa una deficiencia severa de los niveles de CoQ y un fenotipo clínico severo. No obstante, en el modelo de ratón *Coq9^{Q95X}* descrito en este estudio, la ausencia de la proteína COQ9 provoca sólo una disminución de las proteínas COQ7 y COQ5 que hace que la deficiencia en CoQ en este caso sea moderada, manifestándose con un fenotipo de miopatía mitocondrial leve más evidente en hembras. Por tanto, la estabilidad de este complejo multiproteico es un factor clave para la regulación de la biosíntesis de CoQ, lo cual determinará el grado de deficiencia de la misma y en consecuencia, el desarrollo de un fenotipo clínico en concreto.

Nuestros resultados muestran además, que la deficiencia primaria en CoQ da lugar a una disminución de los niveles y la actividad de la SQR, lo que provoca una alteración en la ruta de oxidación mitocondrial del H₂S.

Resumen

Finalmente, como prueba de concepto, también estudiamos si la estabilidad del complejo multiproteico podría afectar la eficacia de una posible terapia bypass. Con este propósito, tratamos a los ratones deficientes en CoQ con una formulación oral hidrosoluble de 2,4-ácido dihidroxibenzoico (2,4-diHB), el cual había sido previamente probado como tratamiento bypass en levaduras (*S.cerevisiae*) mutantes $\Delta coq7$. Tras un mes de tratamiento, el ratón $Coq9^{R239X}$ respondió favorablemente al tratamiento con 2,4-diHB, el cual incrementó los niveles de CoQ, mientras que, el ratón $Coq9^{Q95X}$ no respondió al tratamiento con 2,4-diHB. El hecho de que ambos modelos de ratón respondieran de forma diferente al tratamiento con 2,4-diHB sugiere que el ratón $Coq9^{Q95X}$ presenta un complejo multiproteico estable, el cual es capaz de regular la biosíntesis de CoQ y proporcionar mecanismos de inhibición competitiva y/o por sustratos.

Summary

Summary

Coenzyme Q (CoQ) is a natural lipid endogenously synthesized in mitochondria. Its biosynthesis starts with the formation of a 4-hydroxybenzoate (4-HB) head group and a lipophilic polyisoprenoid tail. While the quinone ring is derived from tyrosine or phenylalanine, the isoprenoid side chain is produced by addition of isopentenyl diphosphate molecules to farnesyl diphosphate or geranylgeranyl diphosphate in multiple steps catalyzed by polyprenyl diphosphate synthase. Another enzyme, encoded by COQ2, mediates the conjugation of the benzoquinone ring to the side chain; while five others, encoded by COQ3 to COQ7, reside in the mitochondrial inner membrane and modify the quinone ring of CoQ. Other proteins are thought to have regulatory functions in the CoQ biosynthetic pathway, such as, COQ9, ADCK3, ADCK4 and PTC7. Moreover, studies in yeasts have demonstrated that the enzymes required for CoQ biosynthesis are organized in a multiprotein complex. This organization would allow channelling of labile/reactive intermediates, enhance catalytic efficiency, and provide a mechanism for coordinative regulation of components. However, there are no proofs of the existence of a multiprotein complex for CoQ biosynthesis in mammals.

Once CoQ molecules are synthesized, they play a central role in the mitochondrial respiratory chain, where it functions as an electron carrier from complex I and II to complex III. Besides this main function, CoQ also participates in the mitochondrial H₂S metabolism as an electron acceptor in the reaction catalyzed by the Sulfide: Quinone Oxidoreductase (SQR).

Mutations in CoQ biosynthetic genes produce primary CoQ₁₀ deficiency, a mitochondrial syndrome with five major clinical presentations: 1) encephalomyopathy with brain involvement and recurrent myoglobinuria; 2) infantile multisystem disorder; 3) ataxic syndrome with cerebellar atrophy;

Summary

4) isolated myopathy; and 5) steroid-resistant nephrotic syndrome. The causes of this clinical variability are unknown and it is difficult to explain why mutations in the same gene may cause different phenotypes, e.g., mutations in *COQ2* and *COQ6* have been associated with isolated nephropathy or multisystemic disease.

Patients with CoQ₁₀ deficiency show variable responses to oral ubiquinone-10 supplementation, with the highest percentage of unsuccessful results in patients with neurological symptoms (encephalopathy, cerebellar ataxia or multisystemic disease). This failure in the ubiquinone-10 treatment may be due to its poor absorption and bioavailability. As an alternative treatment, studies in yeast have revealed that analogs of 4-HB (2,4-dihydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid (3,4- diHB), and vanillic acid (VA)) can serve as precursors of CoQ and can bypass deficient biosynthetic steps. In particular, addition of VA or 3,4-diHB to the growth medium restores Q₆ biosynthesis in $\Delta coq6$ cells deficient for the C5-hydroxylation reaction.

To better understand the molecular mechanisms underlying the genotype-phenotype correlation in CoQ deficiency, here we compare two CoQ-deficient mouse models with a different genetic modification in *Coq9* gene (*Coq9^{Q95X}* and *Coq9^{R239X}*). The comparison was done by biochemical, molecular, genetics, histopathological and phenotypic analyses. We also studied whether CoQ deficiency could affect mitochondrial H₂S metabolism and if this alteration could be involved in the pathophysiologic consequences of the disease.

The results of this thesis show that two different premature terminations in the COQ9 protein distinctively affect the levels of other COQ proteins, suggesting that the truncated version of the COQ9 protein produced

Summary

in the *Coq9*^{R239X} mouse model induces a dominant-negative effect on the multiprotein complex for CoQ biosynthesis. As a consequence, the *Coq9*^{R239X} mouse model has a global reduction in the COQ proteins, which causes severe CoQ deficiency and clinical phenotype. In contrast, in the *Coq9*^{Q95X} mouse model, the lack of COQ9 protein results in decreased levels of only COQ7 and COQ5 proteins, which leads to moderate CoQ deficiency and a mild mitochondrial myopathy, especially evident in females. Therefore, the stability of this multiprotein complex is a key factor in the CoQ biosynthesis rate and, consequently, in the degree of the severity of CoQ deficiency and in the development of a particular clinical phenotype.

Our results also demonstrate that CoQ deficiency causes a reduction in SQR levels and activity leading to an alteration of mitochondrial H₂S oxidation pathway.

Finally, as a proof of concept, we also evaluated whether the stability of the CoQ multiprotein complex would affect a possible bypass therapy. For that purpose, we treated mutant *Coq9* mice with oral 2,4-dihydroxybenzoic acid (2,4-diHB), which has been previously tested as a bypass therapy for Δ *coq7* *Saccharomyces cerevisiae* strains. After one month of treatment, *Coq9*^{R239X} mice responded to 2, 4-diHB increasing CoQ levels while *Coq9*^{Q95X} mice did not respond to 2,4-diHB. These differences in the treatment response of both mutant mice to the treatment with 2,4-diHB suggest that *Coq9*^{Q95X} mice have a stable CoQ multiprotein complex that is able to regulate CoQ biosynthesis and provide mechanisms of competitive and/or substrate, in contrast to *Coq9*^{R239X} mice.

Índice

Introducción	1
1. ESTRUCTURA Y BIOSÍNTESIS DE LA COENZIMA Q.	3
1.1 PROTEÍNAS QUE INTERVIEN EN LA RUTA BIOSINTÉTICA DE LA CoQ.	4
1.1.1 Coq1p.	4
1.1.2 Coq2p.	5
1.1.3 Coq3p.	6
1.1.4 Coq4p.	7
1.1.5 Coq5p.	8
1.1.6 Coq6p.	10
1.1.7 Coq7p.	10
1.1.8 Coq8p (Adck3).	11
1.1.9 Coq9p.	12
1.1.10 Coq10p.	13
1.1.11 Coq11p.	14
1.1.12 Adck4.	14
1.1.13 Pct7p.	14
1.2. COMPLEJO MULTIPROTEICO DE BIOSÍNTESIS DE COENZIMA Q: EVIDENCIAS EXPERIMENTALES EN LEVADURAS.	15
2. FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LA CoQ.	16
2.1 BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL.	16
2.2 FUNCIÓN EN EL METABOLISMO MITOCONDRIAL DEL SULFURO DE HIDRÓGENO.	18
2.3 FUNCIÓN ANTIOXIDANTE.	19
2.4 OTRAS FUNCIONES CELULARES.	20
3. DEFICIENCIA EN CoQ.	22
3.1 DEFICIENCIA PRIMARIA EN CoQ: CAUSAS GENÉTICAS Y PRESENTACIONES CLÍNICAS.	22
3.2 DEFICIENCIA SECUNDARIA EN CoQ.	24

4. MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS ASOCIADOS A LA DEFICIENCIA EN CoQ.	25
4.1 ESTUDIOS IN VITRO.	25
4.2 ESTUDIOS IN VIVO.	27
4.2.1 MODELOS INVERTEBRADOS.	27
4.2.2 MODELOS MURINOS.	29
5. TRATAMIENTO DE LA DEFICIENCIA EN CoQ.	32
5.1 CASOS CLÍNICOS.	32
5.2 TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES.	35
5.2.1 ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> .	35
5.2.2 ESTUDIOS <i>IN VIVO</i> .	35
Hipótesis y objetivos	39
Material y métodos	43
1. GENERACIÓN DE LOS DOS MODELOS DE RATÓN MUTANTES PARA EL GEN <i>Coq9</i>.	45
2. AISLAMIENTO DE FIBROBLASTOS EMBRIOBARIOS DE RATÓN, CULTIVO CELULAR Y TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO.	47
3. AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LA REGIÓN CORRESPONDIENTE A LOS EXONES 6 Y 7 DEL GEN <i>NNT</i>.	49
4. ANÁLISIS PROTEÓMICO DE MITOCONDRIAS DE RIÑÓN MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN (LC-MS/MS).	49
5. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE <i>CoQ9</i> Y <i>CoQ10</i>.	51

5.1	EXTRACCIÓN DE LAS QUINONAS CONTENIDA EN TEJIDOS.	51
5.2	EXTRACCIÓN DE LAS QUINONAS EN MITOCONDRIAS AISLADAS, MEFS Y FIBROBLASTOS DE PACIENTES.	52
5.3	CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES QUINÓNICOS.	52
6.	<i>ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.</i>	53
7.	<i>PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS Y ANÁLISIS POR WESTERN BLOT DE LOS TEJIDOS DE RATÓN.</i>	54
8.	<i>PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS Y ANÁLISIS POR WESTERN BLOT DE LOS FIBROBLASTOS DE PACIENTES.</i>	55
9.	<i>ACTIVIDAD DE LOS COMPLEJOS RESPIRATORIO DEPENDIENTES DE CoQ.</i>	56
10.	<i>EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE LOS SUPERCOMPLEJOS POR BLUE NATIVE GEL ELECTROFORESIS (BNGE).</i>	57
10.1	<i>AISLAMIENTO DE FRACCIÓN MITOCONDRIAL DE TEJIDOS DE RATÓN PARA BNGE.</i>	57
10.2	<i>PREPARACIÓN DEL GEL DE “BLUE NATIVE” DE PRIMERA DIMENSIÓN (1D).</i>	58
10.3	<i>PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA BLUE NATIVE GEL ELECTROFORESIS.</i>	59
10.4	<i>ELECTROFORESIS NO-DESNATURALIZANTE.</i>	59
10.5	<i>TRANSFERENCIA E INMUNODETECCIÓN.</i>	60
11.	<i>MEDIDA DE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL.</i>	60
12.	<i>HISTOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA.</i>	62
13.	<i>MEDIDA DE LOS METABOLITOS EN ORINA.</i>	64
14.	<i>MEDIDA DE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA.</i>	64
15.	<i>TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS CON 2,4-diHB y CoQ₁₀.</i>	66

16. ANÁLISIS DE METABOLITOS INTERMEDIARIOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTRÓMETRO DE MASAS (MS/MS). _____ 66

17. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS PARTICIPANTES EN LA RUTA MITOCONDRIAL DE OXIDACIÓN DEL SULFURO DE HIDRÓGENO. _____ 67

17.1 MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE LA SULFURO QUINONA OXIDO-REDUCTASA (SQRD). _____ 67

17.2 MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE LA RODANASA (RHOD). _____ 68

18. DETERMINACIÓN DE LOS METABOLITOS TIÓLICOS INVOLUCRADOS LA RUTA MITOCONDRIAL DE OXIDACIÓN DEL SULFURO DE HIDRÓGENO. _____ 69

18.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA. _____ 69

18.2 CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES TIÓLICOS. _____ 69

19. DETECCIÓN DEL SULFURO DE HIDRÓGENO (H₂S) MEDIANTE EL USO DE TIRAS DE ACETATO DE PLOMO. _____ 70

20. ACTIVIDAD DE LA CITOCROMO C OXIDASA (COX). _____ 70

21. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS. _____ 71

22. ANÁLISIS ESTADÍSTICO. _____ 71

Resultados _____ 73

1. LA AUSENCIA DE LA PROTEÍNA COQ9 PRODUCE UNA DEFICIENCIA MODERADA EN CoQ. _____ 75

2. DOS MUTACIONES DIFERENTES EN EL GEN Coq9 AFECTA DE FORMA DIFERENTE LA EXPRESIÓN DE GENES QUE

<i>INTERVIENEN EN LA BIOSÍNTESIS DE CoQ Y EN LOS NIVELES DE LAS PROTEÍNAS QUE ESTOS CODIFICAN.</i>	81
<i>3. LA DEFICIENCIA MODERADA EN CoQ EN EL MODELO DE RATÓN Coq9^{Q95X} PRODUCE UN DEFECTO EN LA FUNCIÓN BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL.</i>	88
<i>4. EVALUACIÓN HISTOLÓGICA E HISTOQUÍMICA DEL RATÓN Coq9^{Q95X}.</i>	94
<i>5. LAS HEMBRAS CoQ9Q95X DESARROLLAN UN FENOTIPO MIOPÁTICO LEVE CON INTOLERANCIA AL EJERCICIO.</i>	101
<i>6. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE 2,4-ÁCIDO DIHIDROXIBENZOICO (2,4-diHB).</i>	103
<i>7. RELACIÓN ENTRE LA DEFICIENCIA PRIMARIA EN COENZIMA Q Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL DEL SULFURO DE HIDRÓGENO: PAPEL DE LA SULFURO QUINONA OXIDO-REDUCTASA (SQR).</i>	106
<i>7.1 DETERMINACIÓN DEL ESTADO FUNCIONAL DE ALGUNAS DE LAS ENZIMAS PARTICIPANTES EN LA RUTA MITOCONDRIAL DE OXIDACIÓN DEL SULFURO DE HIDRÓGENO.</i>	106
<i>7.2 ESTUDIO DE LOS NIVELES DE LOS DIFERENTES TIOLES INVOLUCRADOS LA RUTA MITOCONDRIAL DE OXIDACIÓN DEL SULFURO DE HIDRÓGENO.</i>	110
<i>7.3 EFECTO DE LA ACUMULACIÓN DE SULFURO DE HIDRÓGENO SOBRE LA CITOCROMO C OXIDASA (COX).</i>	112
<i>7.4 EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE SQR EN FIBROBLASTOS DE PACIENTES CON DEFICIENCIA PRIMARIA EN CoQ.</i>	112
<i>Discusión</i>	117

1. IMPORTANCIA DEL COMPLEJO MULTIPROTEICO EN LA BIOSÍNTESIS DE CoQ: RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE CoQ Y FENOTIPO CLÍNICO.	118
2. PAPEL DE LA SULFURO QUINONA OXIDO-REDUCTASA (SQR) Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL DEL SULFURO EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA DEFICIENCIA EN CoQ.	126
3. EFECTO “BYPASS” EN LA RUTA BIOSINTÉTICA DE CoQ COMO ALTERNATIVA TERAPEÚTICA PARA LAS DEFIECIENCIAS PRIMARIAS EN CoQ.	134
Conclusiones	137
Conclusion	141
Bibliografía	145
Anexos	173
Apéndice	176

Introducción

Introducción

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 I2**).

Una vez sintetizada la cadena poliisoprenoide, ésta se condensada con el 4-HB mediante una reacción 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 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.

1.1 PROTEÍNAS QUE INTERVIEN EN LA RUTA BIOSINTÉTICA DE LA CoQ.

1.1.1 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

Introducción

subunidades, PDSS1 y PDSS2 (Saiki et al., 2005; Saiki et al., 2003), mientras que en *S. cerevisiae* o *Arabidopsis thaliana* es un homo-dímero u homotetrámero (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 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).

1.1.2 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

Introducción

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.

En *S.cerevisiae*, Coq2p puede usar como precursor para la biosíntesis de CoQ el ácido para amino benzoico (pABA) en vez del 4-HB (Marbois et al., 2010).

1.1.3 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 posición 5 y 6 del anillo de benzoquinona tras la hidroxilación llevada a cabo por Coq6p y Coq7p (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

Introducción

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).

La pérdida de la actividad metiltransferasa en los homocigotos mutantes en *coq3* de *C. elegans* provoca un retraso en el desarrollo y esterilidad, que hace que estos mutantes sean embriónicamente letales en la siguiente generación (Hihi et al., 2002).

1.1.4 Coq4p.

Proteína codificada por el gen *COQ4* y que se localiza en la matriz pegada a la membrana mitocondrial interna (Belogradov et al., 2001). Aunque su función a día de hoy es desconocida, se ha 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 I2)**). 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

Introducción

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).

1.1.5 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 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.

Introducción

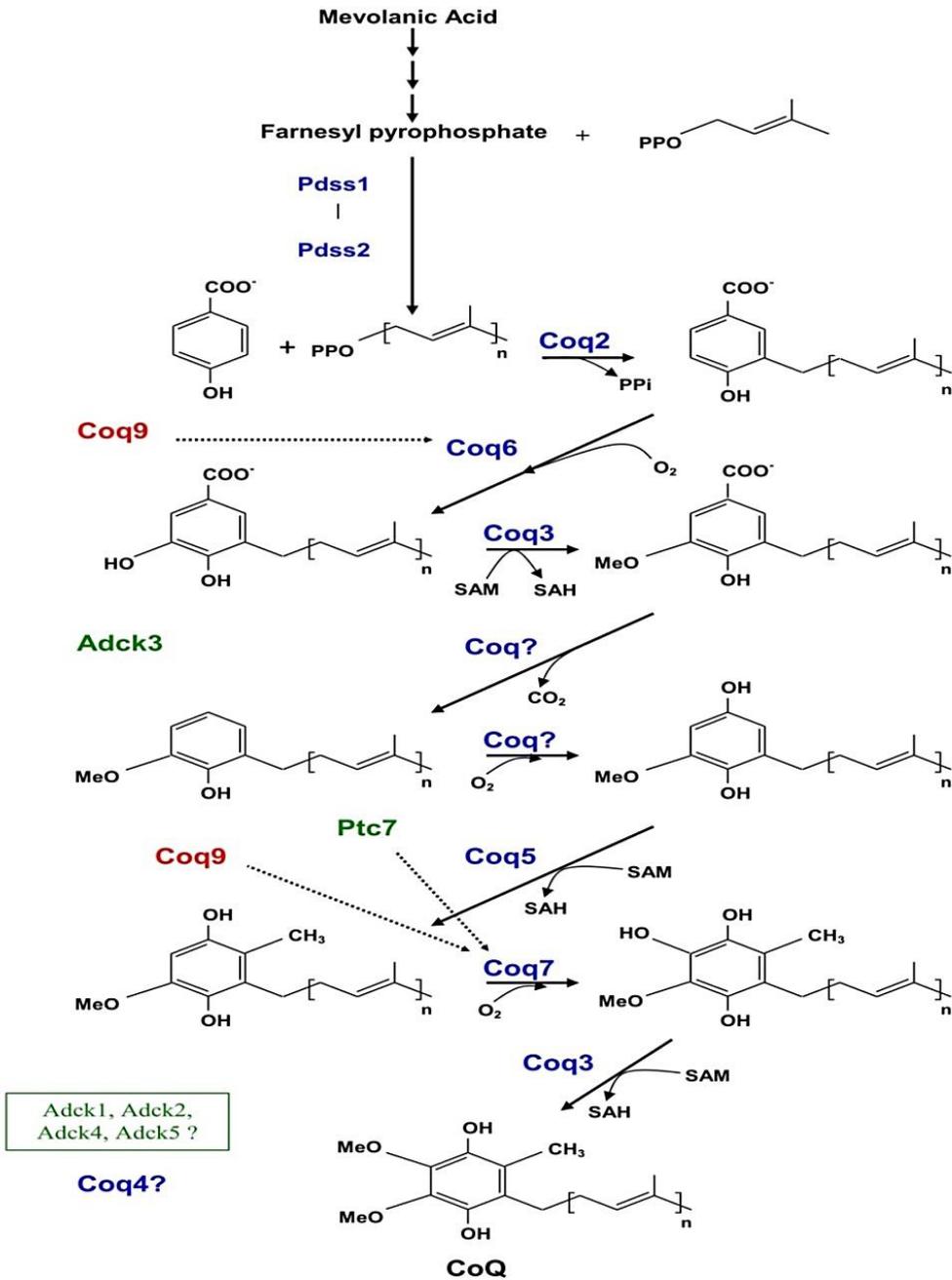


Figura I2. Ruta de biosíntesis de la CoQ

Introducción

1.1.6 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).

En *S. cerevisiae* la Coq6 está involucrada 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). Recientemente se ha descubierto también que la Coq6p es la responsable de la reacción de desaminación en la posición C4 cuando la biosíntesis de CoQ se realiza utilizando como precursor el pABA y no el 4-HB (Ozeir et al., 2015).

1.1.7 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

Introducción

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 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 fosfomimético dio lugar a una disminución de los niveles del lípido (Martin-Montalvo et al., 2011). Además, 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).

En un estudio reciente, se muestra como Coq7p además de localizarse en la mitocondria también se localiza a nivel nuclear donde juega un papel fundamental en la regulación de la respuesta mitocondrial al estrés oxidativo y control de la longevidad (Monaghan et al., 2015).

1.1.8 Coq8p (Adck3).

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

Introducción

ello, se propuso que podría funcionar como una chaperona para el citocromo b y, por lo 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 *COQ8* 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). Recientemente, se ha conseguido cristalizar y detallar la estructura de la proteína ADCK3 humana (Stefely et al., 2015). 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 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 (Tauche et al., 2008).

1.1.9 Coq9p.

Proteína codificada por el gen *COQ9* identificado y caracterizado por Johnson y cols. (Johnson et al., 2005) como necesaria en la biosíntesis de

Introducción

CoQ. Sin embargo, la función de la proteína Coq9p aún está por esclarecer 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 y forma también parte del complejo multiproteico de biosíntesis de CoQ (Hsieh et al., 2007).

Además, en *S. cerevisiae* Coq9p es necesaria para función hidroxilasa de Coq6p y Coq7p y participa en la desaminación del intermediario de CoQ sintetizado a partir del pABA (He et al., 2015).

En mamíferos, nuestro grupo ha demostrado que COQ9 es necesaria para la estabilidad y actividad funcional de COQ7, dado que ratones mutantes en *Coq9* presentan una reducción severa de COQ7 y acumulación de demetoxiubiquinona (Garcia-Corzo et al., 2013). Estudios cristalográficos posteriores han confirmado que COQ9 está asociada a COQ7 y que su estructura muestra un sitio de unión a lípidos similar a los reguladores transcripcionales de la familia TetR en bacterias (Lohman et al., 2014).

1.1.10 Coq10p.

Aunque Coq10p no está implicada directamente en la biosíntesis de CoQ, va a intervenir en su correcto funcionamiento ya que va a estar asociada a la misma dejando en evidencia el modelo actual en donde se concibe la CoQ como una molécula lipídica independiente ((Barros et al.,

Introducción

2005; Cui and Kawamukai, 2009). En *S.cerevisae* Coq10p es fundamental para el correcto funcionamiento de la cadena de transporte electrónico puesto que participa en la transferencia de la CoQ de un lado a otro dentro de la membrana mitocondrial (Busso et al., 2010).

1.1.11 Coq11p.

Recientemente, Coq11p, codificada por el gen COQ11, ha sido identificada como una proteína que también forma parte del complejo multiproteico de biosíntesis de CoQ en *S.cerevisae*. Coq11p, no sería esencial en la biosíntesis de CoQ pero su delección provoca una disminución de los niveles de CoQ (Allan et al., 2015).

1.1.12 Adck4.

Adck4 es una kinasa atípica cuya estructura es muy similar a la de Adck3. Participa en la regulación de la biosíntesis de CoQ, de forma diferente a Adck3, aunque su función específica se desconoce (Ashraf et al., 2013).

1.1.13 Pct7p.

Estudios en levaduras muestran que Pct7p es una fosfatasa mitocondrial que participa en la regulación del metabolismo energético y la respuesta antioxidante promoviendo la biosíntesis de la CoQ mediante la desfosforilación de la proteína Coq7p (Martin-Montalvo et al., 2013).

1.2 COMPLEJO MULTIPROTEICO DE BIOSÍNTESIS DE COENZIMA Q: EVIDENCIAS EXPERIMENTALES EN LEVADURAS.

De acuerdo a los resultados en levaduras y bacterias, las enzimas requeridas para la biosíntesis de CoQ se organizan en un complejo multiproteico. Esta organización permitiría la canalización de metabolitos intermediarios, aumentaría la eficiencia catalítica y proporcionaría mecanismos para la regulación coordinada de sus componentes. En este complejo multiproteico, Coq2p estaría anclada en la membrana interna mitocondrial, actuando por separado y las otras enzimas se distribuirían periféricamente en la cara interna de dicha membrana (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.). La mayoría de estas proteínas comparten una secuencia consenso de importación a la mitocondria para alcanzar su localización en la membrana mitocondrial interna (Hartl et al., 1989; Neupert, 1997).

Coq4p tiene un papel central en este complejo multiproteico y se asocia a Coq3p, Coq5p, Coq6p, y Coq7p. Por otro lado, Coq9p se asociaría levemente a dicho complejo. Coq8p es una kinasa que participa en la formación del complejo multiproteico fosforilando directa o indirectamente a Coq3p, Coq5p y Coq7p (Marbois et al., 2009).

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).

Introducción

A pesar de los datos en levaduras, no existen evidencias aún de la existencia de este complejo multiproteico para síntesis de CoQ en mamíferos.

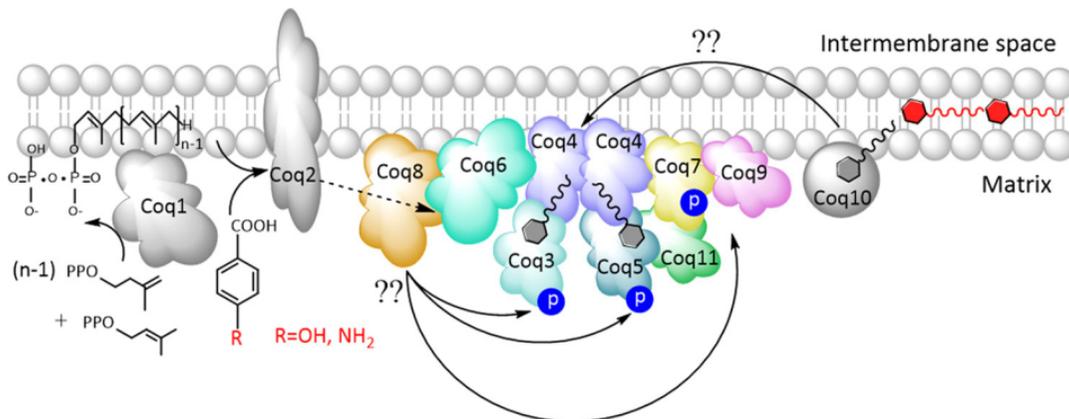


Figura I3. Imagen hipotética del complejo multiproteico de biosíntesis de CoQ. (Allan et al., 2015)

2. FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LA CoQ.

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

2.1 BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL.

La CoQ es un componente esencial de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM). 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 I4**). 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

Introducción

(Acin-Perez et al., 2008). De hecho, una deficiencia severa de CoQ en cerebro induce un aumento del complejo III libre en paralelo a un descenso del complejo III que forma parte de los supercomplejos (García-Corzo et al., 2013). La participación de la CoQ permite, por tanto, 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.

A través de la CoQ, la CRM recibe electrones por la actividad de otras enzimas, tales como: la dihidroorotato deshidrogenasa (EC 1.3.98.1) que participa en la ruta de síntesis *de novo* de pirimidinas; la flavoproteína ubiquinona oxidoreductasa (EC 1.5.5.1) que participa en la β -oxidación de ácidos grasos; y la glicerol fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.99.5), que transporta equivalentes de reducción desde el citoplasma; la colina deshidrogenasa (EC 1.1.99.1) que participa en el metabolismo de la glicina; y la prolina deshidrogenasa (EC 1.5.99.8) que participa en el metabolismo de la prolina y arginina (García-Corzo et al., 2013).

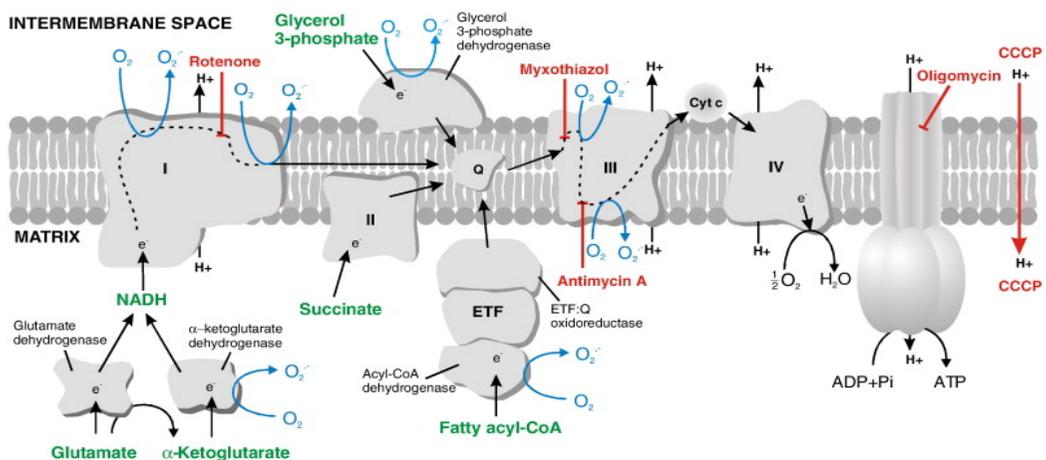


Figura I4. Participación de la CoQ en la CRM (Tahara et al., 2009)

Introducción

2.2 FUNCIÓN EN EL METABOLISMO MITOCONDRIAL DEL SULFURO DE HIDRÓGENO.

La CoQ juega un papel fundamental en el metabolismo mitocondrial del sulfuro de hidrógeno ya que va a funcionar como aceptor de electrones en la reacción catalizada por la sulfuro:quinona oxidoreductasa (SQR). Esta enzima, cataliza el primer paso en la ruta de oxidación del sulfuro de hidrógeno en la mitocondria utilizando la CoQ como cofactor indispensable para que se produzca la reacción enzimática (Jackson et al., 2012).

Específicamente, la SQR cataliza la formación de tiosulfato (SSO_3^{-2}), a partir de sulfuro de hidrógeno (H_2S) y sulfito (SO_3^{-2}), usando CoQ como aceptor de electrones. El tiosulfato que se forma reacciona con el glutatión (GS^-) para formar persulfuro de glutatión (GSS^-) en una reacción que es catalizada por la tiosulfato sulfotransferasa (ST). El persulfuro de glutatión es oxidado por la persulfuro dioxigenasa (SDO) produciendo sulfito y glutatión. Este sulfito podrá ser usado nuevamente por la SQR o bien producir sulfato (SO_4^{-2}) con la oxidación simultánea de citocromo c en una reacción catalizada por la sulfito oxidasa (SO). También se ha descrito que la SQR puede catalizar directamente la formación de persulfuro de glutatión (GSS^-) usando como sustrato sulfuro de hidrógeno y glutatión y la CoQ igualmente como aceptor de electrones (**Figura I5**) (Kabil et al., 2014b).

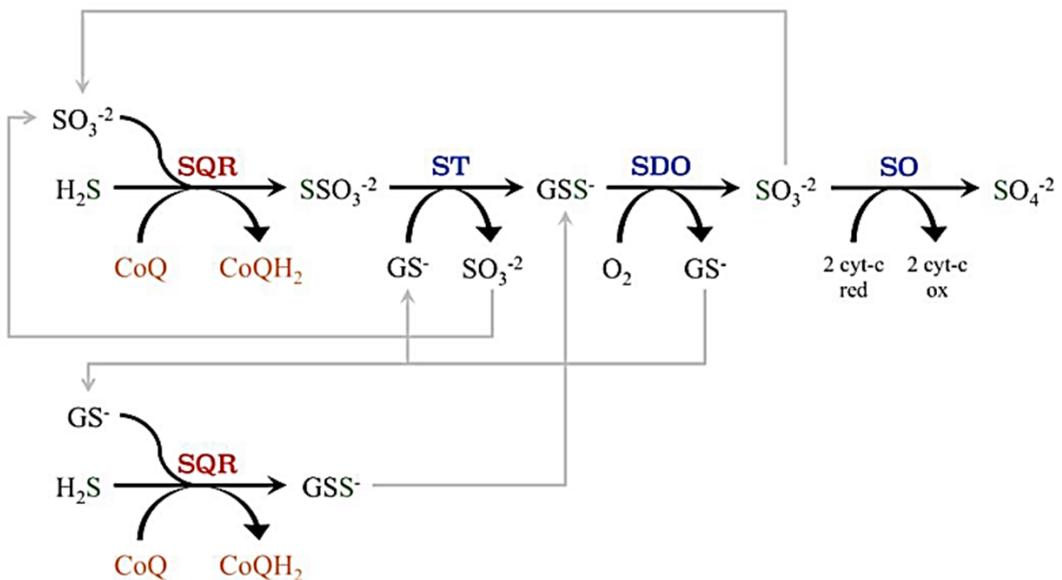


Figura I5. Papel de la CoQ en el metabolismo mitocondrial del H₂S

2.3 FUNCIÓN ANTIOXIDANTE.

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 está claro 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 formación del radical peroxil (LOO[•]) en contraposición a la vitamina E que actúa depurando estos radicales (**Figura I6**).

Otros estudios también muestra como la CoQH₂ puede prevenir de la oxidación a proteínas (Forsmark-Andree et al., 1995; Forsmark-Andree et al.,

Introducción

1996), y a ADN, tanto *in vitro* como *in vivo* (Ernster and Dallner, 1995; Tomasetti et al., 1999).

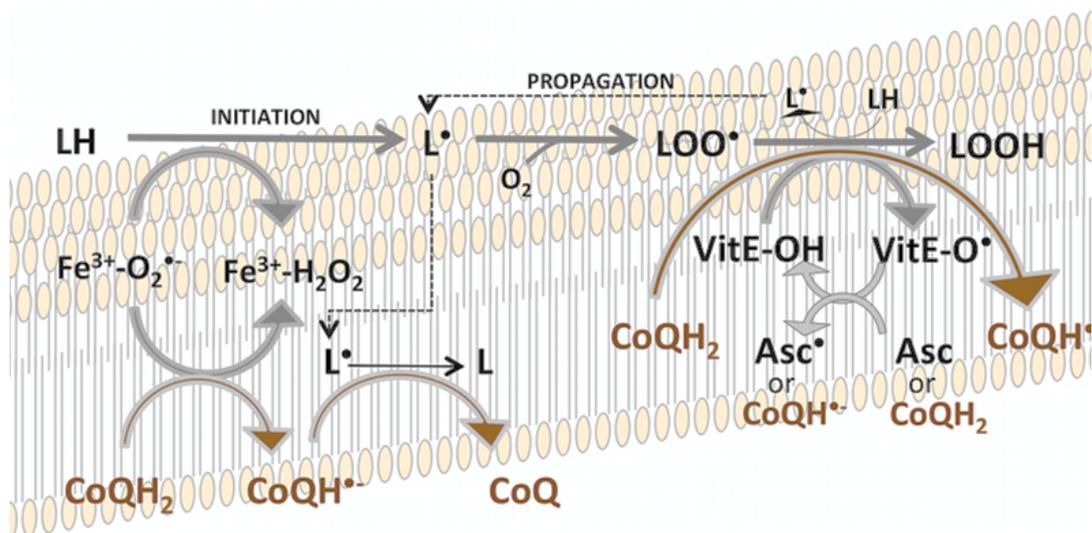


Figura I6. Función antioxidante de la CoQ

2.4 OTRAS FUNCIONES CELULARES.

Algunos estudios apuntaron hace unos años a que la CoQ puede 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 (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

Introducción

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).

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 o estado voltaje-dependiente y sensible al Ca²⁺ 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 CoQ₁₀, 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).

Finalmente, la membrana plasmática de la mayoría de las células contienen NADH oxidasas dependientes de CoQ, la cuales regulan el ratio

Introducción

citoplásmico de NAD^+/NADH , la reducción del ascorbato y el crecimiento y diferenciación celular (Bentinger et al., 2010).

3. 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.

La deficiencia en CoQ fue por primera vez descrita en 1989 (Ogasahara et al., 1989) y desde entonces, se han identificado y publicado más de 150 pacientes deficientes en CoQ con una gran diversidad de fenotipos clínicos.

La identificación de las causas genéticas responsables del déficit en CoQ ha permitido clasificar la deficiencia en CoQ en dos tipos: (i) *deficiencia primaria en CoQ*, causada por mutaciones en genes involucrados directamente en su biosíntesis y (ii) *deficiencia secundaria en CoQ*, causada por mutaciones en genes que no están relacionados con la biosíntesis de ubiquinona o por otros factores fisiopatológicos o farmacológicos (Trevisson et al., 2011).

3.1 DEFICIENCIA PRIMARIA EN CoQ: CAUSAS GENÉTICAS Y PRESENTACIONES CLÍNICAS.

La deficiencia primaria en CoQ está asociada a un trastorno autosómico recesivo y se manifiesta con un cuadro clínico heterogéneo que se pueden agrupar en cinco grandes fenotipos:

Introducción

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 variabilidad clínica de la deficiencia primaria en CoQ afecta tanto a la edad en la que se manifiestan los síntomas (desde el nacimiento hasta la edad adulta) como a la severidad de la enfermedad (desde la muerte hasta manifestaciones tisulares específicas). También la respuesta clínica al tratamiento con CoQ₁₀ es heterogénea (Desbats et al., 2015a).

Hasta la fecha, se han descrito pacientes con defectos moleculares en nueve genes: *PDSS1*, *PDSS2*, *COQ2*, *COQ4*, *COQ6*, *COQ7*, *COQ9*, *ADCK3* y *ADCK4* (detallado en **Tabla II**) (Danhauser et al., 2015; Desbats et al., 2015a; Freyer et al., 2015). No obstante, debido al limitado número de pacientes descritos con esta patología, se desconocen las causas de esta variabilidad clínica y resulta difícil explicar por qué mutaciones en un mismo gen pueden manifestarse clínicamente en diferentes fenotipos; por ejemplo, mutaciones en *COQ2* y *COQ6* se han asociado indistintamente con nefropatía o con la variante multisistémica infantil (Diomedi-Camassei et al., 2007; Heeringa et al., 2011; Jakobs et al., 2013; Quinzii et al., 2006).

Introducción

GEN	Nº DE PACIENTES	SÍNDROME NEFRÓTICO	OTRAS MANIFESTACIONES CLÍNICAS
PDSS1	2	no	Encefalopatía, neuropatía periférica, atrofia óptica, valvulopatía, acidosis láctica
PDSS2	4	sí	Síndrome de Leigh, ataxia, sordera, retinopatía
COQ2	15	sí	Encefalomiopatía, hipertrofia cardíaca, síndrome de MELAS, convulsiones, retinopatía, acidosis láctica, sordera, atrofia multisistémica en edad adulta
COQ4	1	no	Encefalopatía, neuropatía periférica, hipotonía, atrofia muscular, retraso mental, defectos visuales y auditivos
COQ6	11	sí	Sordera, encefalopatía, convulsiones
COQ7	1	no	Síndrome multisistémico,
COQ9	2	no	Encefalomiopatía, tubulopatía renal, hipertrofia cardíaca, acidosis láctica
COQ8 o ADCK3	23	no	Ataxia cerebelosa, encefalopatía, convulsiones, distonía, espasticidad muscular
ADCK4	15	sí	Retraso mental

Tabla I1. Deficiencia primaria en CoQ y fenotipos asociados

3.2 DEFICIENCIA SECUNDARIA EN CoQ.

Mientras que las deficiencias primarias en CoQ son muy raras, las deficiencias secundarias son más comunes. Estos pacientes presentan déficit en CoQ (este diagnóstico generalmente se hace en fibroblastos o biopsias musculares), pero se debe a mutaciones en genes que no están relacionados con la biosíntesis de CoQ o por otros factores fisiopatológicos o farmacológicos.

Introducción

Las mutaciones identificadas hasta el momento son las halladas en el gen de la aprataxina (*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), el gen *BRAF* causando un síndrome cardiofaciocutáneo (Aeby et al., 2007) y el gen *SLC2A1* causando deficiencia en el transportador de glucosa GLUT1 (Yubero et al., 2014).

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

Cabe destacar que no todos los pacientes con estas patologías desarrollan deficiencia secundaria en CoQ, y se desconoce por qué algunos pacientes son más susceptibles que otros a la hora de desarrollarla. Además, las manifestaciones clínicas de estos pacientes dependerán del defecto genético o molecular que las cause, aunque predominan las manifestaciones musculares como hipotonía, debilidad muscular, intolerancia al ejercicio o mioglobinuria y las manifestaciones del sistema nervioso central como la ataxia.

4. MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS ASOCIADOS A LA DEFICIENCIA EN CoQ.

4.1 ESTUDIOS *IN VITRO*.

Introducción

La heterogeneidad fenotípica asociada a la deficiencia en CoQ sugiere la existencia de diferentes mecanismos patogénicos. Así, 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. Debido a la función de la CoQ en la bioenergética mitocondrial así como a su potente capacidad antioxidante, los primeros estudios se centraron en estos dos aspectos de la biología mitocondrial.

En primer lugar, Geromel y colbs. (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, peroxidación lipídica o apoptosis. Algo más tarde, López-Martín y colbs. 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

Introducción

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 (Duberley et al., 2013; Quinzii et al., 2012). Asimismo, Rodríguez-Hernández y cols. (Rodríguez-Hernández 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 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.

4.2 ESTUDIOS *IN VIVO*.

4.2.1 MODELOS INVERTEBRADOS.

Los primeros estudios de la deficiencia en CoQ en modelos invertebrados se llevaron a cabo en el nematodo *Caenorhabditis elegans*. En 1995 se desarrolló el primer mutante en *clk-1* el cual presentaba una reducción severa de los niveles de CoQ₉ y acumulación de demetoxiubiquinona (DMQ). Estos nematodos desarrollaban un fenotipo heterogéneo que incluía disminución de la capacidad contráctil de la faringe, anomalías en la defecación, alteración del movimiento y retraso del desarrollo embrionario y larvario (Wong et al., 1995). Curiosamente, los mutantes *clk-1* adultos, a pesar de tener fertilidad reducida, presentaban una mayor esperanza de vida que sus homólogos wild type (Wong et al., 1995). Los estudios de bioenergética mitocondrial revelaron una disminución de la

Introducción

actividad de los complejos respiratorios mitocondriales CoQ dependientes I-III pero no de la actividad II-III (Kayser et al., 2004), sugiriendo que la actividad CI-III es más susceptible a la deficiencia en CoQ que la CII-III. Además, en 2011, Yang y colbs, sugirieron que la DMQ presente en el nematodo mutante *clk-1* podría ser la causante de la inhibición del complejo respiratorio I, lo que provocaría una disminución del transporte electrónico a través de dicho complejo y disminuiría, por tanto, la capacidad respiratoria del gusano. Esta disminución de la capacidad respiratoria provocaría, a su vez, una menor producción de ROS que podría justificar así la mayor esperanza de vida de estos nematodos mutantes (Yang et al., 2011).

Por otro lado, también se ha desarrollado otros modelos de *C. elegans* deficientes en CoQ con mutaciones en *coq-1*, *coq-3* y *coq-8*. Los mutantes en *coq-1*, son estériles y presentaron alteraciones morfológicas y de desarrollo de los órganos (Gavilan et al., 2005). Los mutantes en *coq-8* también tenían la fertilidad muy reducida y presentaron anomalías severas a nivel de la hipodermis (Asencio et al., 2009). Los mutantes en *coq-3*, sin embargo, presentaron diferentes fenotipos en función de la delección parcial insertada. Así, los mutantes *coq-3 (qm188)* eran estériles puesto que no desarrollaron los órganos reproductivos (Hihi et al., 2002), mientras que los mutantes *coq-3(ok506)* eran fértiles en la primera generación, aunque posteriormente, en la segunda, pocos mutantes sobrevivieron hasta la edad adulta (Gomez et al., 2012).

Otro modelo utilizado en el estudio de la deficiencia en CoQ ha sido el de la mosca de la fruta o *Drosophila melanogaster*. En 2010, Grant y colbs. demostraron que las células neurales de *Drosophila* mutantes en el gen *qless (cg31005)* (homólogo a *PDSS1* en humanos) presentaban un incremento de estrés oxidativo y, en consecuencia, un incremento de apoptosis dependiente de caspasas (Grant et al., 2010). En este caso, sin

Introducción

embargo, la interpretación de los resultados es dificultosa dado que el estudio no muestra los niveles de CoQ y el grado de deficiencia en la misma en los animales mutantes (Grant et al., 2010). Poco después, en 2011, Liu y cols desarrollaron *Drosophila* mutantes en el gen *sbo* (small boy, cg9613) (Liu et al., 2011). Los mutantes *sbo* homocigotos presentaban una alteración del desarrollo durante el primer estadio larvario, haciendo que éste se detuviese y provocando que las larvas tuvieran un tamaño reducido (de ahí el nombre de “small boy” en inglés). Además, estas larvas tenían los niveles de ATP reducidos a la mitad en comparación con su homólogo wild type. Curiosamente, los mutantes *sbo* heterocigotos, presentaban un desarrollo normal, deficiencia en CoQ, retraso del envejecimiento e incremento de la esperanza de vida (Liu et al., 2011). Por otro lado, Cheng et cols observaron que los mutantes *sbo* eran más susceptibles a las infecciones bacterianas y fúngicas debido a que la mutación provocaba una disminución de numerosos péptidos antimicrobianos, mostrando así la importancia de CoQ en la modulación de la respuesta inmunitaria innata en *D. melanogaster* (Cheng et al., 2011).

4.2.2 MODELOS MURINOS.

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. 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

Introducción

bioquímicos mostraron que la ausencia de COQ7 provocaba, al igual que ocurría en *C.elegans*, 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 embrionaria (Levavasseur et al., 2001), lo que sugería que la DMQ podría poseer cierta funcionalidad en el transporte de electrones. Sin embargo, en levaduras la DMQ no mostró 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. Shirasawa, mostrando que en las células embrionarias de había un incremento significativo de apoptosis y una reducción en el potencial de membrana y en los niveles de ATP (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). Si bien no está claro el motivo por el que los ratones *Pdss2^{kd/kd}*

Introducción

desarrollan un fenotipo renal con ausencia de otros fenotipos, parece que un aumento de estrés oxidativo en el riñón podría contribuir a dicha manifestación (Quinzii et al., 2013). Cabe mencionar que también 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).

En 2012, Lapointe y cols., generaron un ratón knock-out para *Coq3*, que, como en el caso de *Coq7*, resultó también ser embrionariamente letal (Lapointe et al., 2012), lo que pone de manifiesto la importancia de estas dos proteínas para el desarrollo embrionario.

Recientemente, generamos y caracterizamos en nuestro laboratorio un modelo de ratón con una mutación homocigota en el gen *Coq9* (R239X, *Coq9*^{R239X}), homóloga a la mutación R244X descrita en un paciente deficiente en CoQ (Duncan et al., 2009). El modelo de ratón *Coq9*^{R239X} presentaba una deficiencia de CoQ generalizada (García-Corzo et al., 2013) y su caracterización demostró que: (i) la presencia de una proteína COQ9 disfuncional y/o el déficit de CoQ en cerebro provocaba un incremento de la cantidad de complejo III libre y descenso de SC dando lugar a una disminución de la respiración mitocondrial y síntesis de ATP, (ii) la disfunción mitocondrial en cerebro produjo un aumento del daño oxidativo y muerte neuronal vía caspasa-independiente y (iii) esta muerte neuronal va acompañada de una astrogliosis reactiva severa y degeneración espongiiforme, especialmente evidente en el tronco del encéfalo, lo que provoca reducción del peso corporal, parálisis de las extremidades entre los

Introducción

3-6 meses de edad y muerte prematura. Por tanto, el ratón $Coq9^{R239X}$ presentó evidencias clínicas, histopatológicas, bioquímicas y moleculares asociadas al desarrollo de una encefalopatía mitocondrial terminal (**Figura I7**) (García-Corzo et al., 2013).

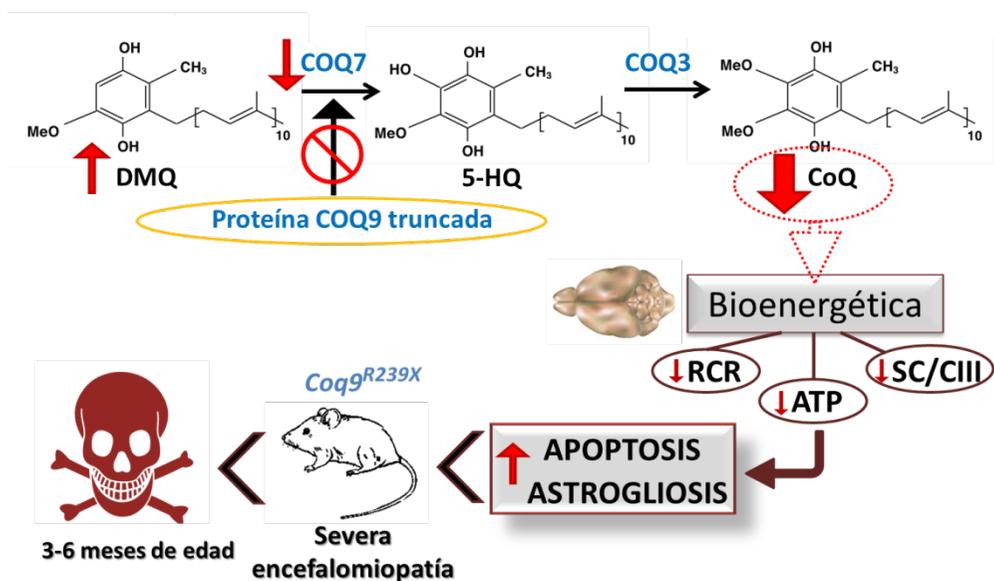


Figura I7. Modelo de ratón $Coq9^{R239X}$. Esquema representativo de las consecuencias bioquímicas y fisiopatológicas en el modelo de ratón $Coq9^{R239X}$.

5. TRATAMIENTO DE LA DEFICIENCIA EN CoQ.

5.1 CASOS CLÍNICOS.

La deficiencia primaria en CoQ es una de las pocas enfermedades mitocondriales que dispone de una terapia con cierto grado de éxito. Sin embargo, en casos de pacientes con síntomas neurológicos o síndrome multisistémico es frecuente el fallecimiento en el primer año de vida, antes de iniciar el tratamiento. Tal es el caso descrito en pacientes con mutaciones en

Introducción

COQ2 (Diomedi-Camassei et al., 2007; Jakobs et al., 2013; Mollet et al., 2007), *COQ4* (Brea-Calvo et al., 2015) o *COQ9* (Danhauser et al., 2015). En caso de diagnóstico, el tratamiento consiste en 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 frenar la progresión de la encefalopatía en un paciente con la variante multisistémica de la enfermedad (Rotig et al., 2000; Salviati et al., 2005). Otros casos con mutaciones en el gen *COQ2* han respondido de forma positiva al suplemento con ubiquinona-10 (Montini et al., 2008). 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* mejoraron solo con la adición de un tratamiento con riboflavina (Gempel et al., 2007). Recientemente, el tratamiento con ubiquinona-10 también ha conseguido frenar la progresión de la enfermedad en un paciente con hipotonía severa causada por mutación en el gen *COQ7* (Freyer et al., 2015). En todos los casos, parece clara la importancia de una administración temprana del tratamiento basado en un diagnóstico rápido.

Por el contrario, el suplemento con ubiquinona-10 parece menos efectivo en pacientes con síntomas neurológicos o afección de múltiples órganos: en algunas formas de ataxia causadas por mutaciones en el gen *ADCK3* la terapia no tiene un efecto apreciable (Mollet et al., 2008) o solo mejora levemente (Lagier-Tourenne et al., 2008); un paciente con síndrome de Leigh y nefropatía debido a mutación en *PDSS2* falleció a los 8 meses de edad a pesar del suplemento con 50 mg CoQ₁₀ al día desde el mes 3 de vida

Introducción

(Lopez et al., 2006); un paciente con epilepsia mioclónica, cardiomiopatía hipertrófica y síndrome nefrótico debido a mutación en *COQ2* falleció a los 5 meses de edad a pesar del suplemento con 30 mg/kg peso/día de CoQ₁₀ desde el cuarto mes de vida (Scalais et al., 2013); 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, 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 (Emmanuele et al., 2012). Otro aspecto importante a tener en cuenta en la ineficiencia de la terapia es la baja absorción y biodisponibilidad de la CoQ₁₀ cuando se administra exógenamente vía oral, lo que limita el aumento de los niveles de CoQ₁₀ en las mitocondrias, donde la molécula es biológicamente activa (Bhagavan and Chopra, 2007). Esta limitación es incluso más importante en el cerebro dado que la ubiquinona-10 exógena debe atravesar la barrera hematoencefálica. 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). Por ello, se han desarrollado diferentes formulaciones más solubles y estables para mantener a la CoQ₁₀ en su estado reducido (CoQH₂ o ubiquinol). En este sentido, en un paciente con encefalomiopatía y retraso mental debido a deficiencia en COQ₁₀ por una mutación en *COQ4*, el ubiquinol-10 a una

dosis de 15 mg/kg/día tuvo el mismo efecto que la ubiquinona-10 usada a una dosis de 30 mg/kg/día, mejorando los síntomas neuromusculares (Salviati et al., 2012). No obstante, las evidencias son aún muy limitadas sobre de la eficacia del tratamiento con ubiquinol en pacientes y existen problemas a la hora de ajustar la dosis equivalente en relación a la administrada con ubiquinona (Desbats et al., 2015b).

Cabe destacar que el tratamiento alternativo con idebenona, un análogo de la CoQ de cadena corta, no es eficaz a la hora de restaurar el déficit energético en pacientes con deficiencia primaria en CoQ (Freyer et al., 2015; Lopez-Martin et al., 2007; Lopez et al., 2010; Rotig et al., 2000).

5.2 TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES.

5.2.1 ESTUDIOS *IN VITRO*.

El tratamiento lógico y racional para la deficiencia en CoQ, como se ha mencionado anteriormente, es el suplemento exógeno de ubiquinona-10. Así, Rodríguez-Hernández y colbs. (Rodriguez-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 (Rodriguez-Hernandez et al., 2009). En esta misma línea, se observó, 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). Estos resultados en

Introducción

fibroblastos de pacientes sugieren 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).

Recientemente, se ha visto que es posible saltar el defecto enzimático mediante la administración de análogos del 4-HB. En este sentido, el suplemento con 0,1 mM del ácido 2,4-dihidroxibenzoico (2,4-dHB) durante una semana logró incrementar los niveles de CoQ₁₀, mejorar las actividades de los complejos respiratorios dependientes de CoQ y restaurar la respiración en los fibroblastos deficientes en CoQ₁₀ de un paciente con mutación en *COQ7* (Freyer et al., 2015).

5.2.2 ESTUDIOS *IN VIVO*.

En *C.elegans*, la administración de una formulación hidrosoluble de CoQ₁₀ (AquaQ₁₀ L10) a mutantes en *clk-1*, logró mejorar la motilidad faríngea del nematodo así como la defecación normal del mismo, pero redujo la esperanza de vida a la misma que sus homólogos wild type (Takahashi et al., 2012). El mismo tratamiento en los nematodos mutantes en *coq-1*, *coq-3* y *coq-8* no tuvo ningún efecto (Gomez et al., 2012).

Por otro lado, en *Drosophila melanogaster* el suplemento oral con CoQ₁₀ en mutantes *qless* fue capaz de restaurar el fenotipo neurológico (Grant et al., 2010). Además, este tratamiento, también logró incrementar la respuesta inmunológica frente a bacterias y hongos en moscas con mutaciones en el gen *sbo* o *coq2* (Cheng et al., 2011).

Introducción

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 de bebida mostró un ligero descenso del contenido de albúmina en la orina así como del grado de nefritis (Saiki et al., 2008), si bien hubo variabilidad en los resultados y los niveles de CoQ₁₀ (y CoQ₉) 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., 2008). 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., 2008). 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). En un estudio reciente, Peng y cols., mostraron que el tratamiento de los mutantes $Pdss2^{kd/kd}$ con rapamicina (un inhibidor de mTORC1) consiguió mejorar la patología renal de una forma similar a la obtenida previamente con el tratamiento con ubiquinona-10, aunque la administración de ambos compuestos conjuntamente no tuvo ningún efecto sinérgico (Falk et al., 2011; Peng et al., 2015).

En los últimos años, nuestro grupo estudió el efecto del tratamiento oral con fórmulas hidrosolubles de ubiquinona-10 y ubiquinol-10 (la forma reducida) en ratones mutantes $Coq9^{R239X}$. El tratamiento se administró en el agua de bebida a una dosis de 240 mg/kg/día durante dos meses. En este estudio se mostró que la fórmula soluble en agua del ubiquinol-10 presentó una mejor absorción por los tejidos que la ubiquinona-10. Esta mejora resultó

Introducción

en un aumento de los niveles de CoQ₁₀ en homogenado de tejidos y en mitocondrias de cerebro en ratones *Coq9^{R239X}*. El ubiquinol-10 fue más efectivo que la ubiquinona-10, ya que redujo la vacuolización, astrogliosis, estrés oxidativo e incrementó el peso corporal en ratones *Coq9^{R239X}*. Sin embargo, es importante destacar que a pesar de que nuestros resultados muestran que el ubiquinol-10 es terapéuticamente más potente que la ubiquinona-10, en ambos casos su valor terapéutico fue limitado, no consiguiendo alcanzar en ningún caso los niveles normales de CoQ y actividad de los complejos respiratorios, lo que se vio reflejado con presencia de vacuolas y astrogliosis. Con ello, se consiguió aumentar la supervivencia, si bien aún el 50 % de los ratones *Coq9^{R239X}* tratados con ubiquinol-10 morían antes de los 6 meses de edad (García-Corzo et al., 2014). Estos datos ponen de manifiesto la necesidad de buscar estrategias alternativas y efectivas para el tratamiento de las deficiencias en CoQ.

Hipótesis & Objetivos

Hipótesis y Objetivos

La CoQ se sintetiza fundamentalmente en las mitocondrias a través de una compleja ruta en la que intervienen al menos 12 proteínas que están organizadas en levaduras en un complejo multiproteico sobre el cual no hay evidencias de su existencia en mamíferos. Una vez sintetizada, la CoQ funciona en las mitocondrias como aceptor y donante de electrones en varias rutas metabólicas, entre ellas, la transferencia de electrones desde los complejos I y II y el complejo III de la CRM y en el metabolismo del sulfuro de hidrógeno a través de la reacción catalizada por la SQR. Estas funciones vitales de la CoQ hacen que la deficiencia en esta molécula desencadene en un síndrome que, sin embargo, se desconoce el motivo por el cual se manifiesta con esa heterogeneidad clínica característica, teniendo en cuenta que el origen de la enfermedad es, en todos los casos el mismo, esto es, un déficit en CoQ. En este sentido, nuestra hipótesis es que la expresión de los genes biosintéticos de la CoQ puedan responder de forma diferente al déficit en CoQ en función del tejido y fondo genético o que dependiendo del defecto molecular específico, las proteínas que conforman el complejo multiproteico puedan tener distinto grado de estabilidad que determine el nivel de deficiencia en CoQ. Asimismo, este grado de deficiencia en CoQ podría afectar de forma diferenciada a las distintas funciones asociadas a la CoQ y de esta manera determinar el fenotipo clínico.

Por otro lado, el tratamiento actual para la deficiencia en CoQ es el suplemento exógeno ubiquinona-10 a altas dosis. Sin embargo, existen pacientes donde este tratamiento fracasa o donde no se muestran beneficios apreciables. Esto se da especialmente en pacientes con síntomas neurológicos, probablemente por la baja biodisponibilidad de ubiquinona-10, que difícilmente atraviese la barrera hematoencefálica. Por ello, en levaduras con defectos en la ruta biosintética de la CoQ se ha demostrado que un aumento de los niveles endógenos de CoQ sería posible a través de un efecto

Hipótesis y Objetivos

“bypass”. Por ejemplo, en levaduras mutantes en *COQ6* se ha demostrado que la proteína COQ2 podría usar como sustrato el 3,4-dihidroxibenzoato o el ácido vanílico para unirle el grupo poliprenoide y, posteriormente, la molécula sufriría las modificaciones hasta producir CoQ sin la necesidad de la actividad de COQ6. Dado que la proteína COQ9 es necesaria para la estabilidad y actividad de la hidroxilasa COQ7, pensamos que la administración de 2,4-diHB, el cual posee el carbono hidroxilado por COQ7, en células y ratones mutantes en *Coq9* podría saltarse parcialmente el defecto en la ruta biosintética de CoQ y así aumentar los niveles endógenos del producto final.

Para evaluar estas hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Caracterizar el modelo de ratón *Coq9^{Q95X}* y compararlo con el modelo *Coq9^{R239X}*. Dicha caracterización comparativa pondrá especial énfasis en las diferencias en expresión de genes *Coq*, así como en las diferencias en niveles de proteínas COQ y de las formas lipídicas CoQ₉ y CoQ₁₀. Además, se realizará un estudio bioenergético, histopatológico y fenotípico de los ratones *Coq9^{Q95X}* para así poder encontrar una relación entre el genotipo y el fenotipo.
2. Evaluar si el metabolismo del sulfuro de hidrógeno está comprometido en la deficiencia en CoQ y si ello contribuye a la fisiopatología de la enfermedad.
3. Evaluar como prueba de concepto si la administración de 2,4-diHB en células y ratones mutantes en *Coq9* produce un efecto “bypass” en virtud del cual se consigan aumentos de los niveles endógenos de CoQ.

Material & Métodos

1. GENERACIÓN DE LOS DOS MODELOS DE RATÓN MUTANTES PARA EL GEN *Coq9*.

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) que ha sido cristalizada (Lohman et al., 2014). Ambas proteínas tienen un 90,9 % de identidad, incluyendo la arginina en la posición 244 en humanos y 239 en ratón y poseen, en ambos casos, la secuencia target de importación a mitocondria.

El modelo de ratón *Coq9*^{Q95X} usado en este estudio fue generado por la institución “Wellcome Trust Sanger Institute” a partir del clon de células madres embrionarias EPD0112_2_A09 obtenidas del Knock Out Mouse Project (KOMP) (www.komp.org).

El primer “knockout cassette” fue insertado en un fondo genético C57BL/6N (proyecto #CSD38115) (**Figura M1A**). El cruce de ratones machos heterocigotos *Coq9*^{Q95X/+} (con fondo genético C57BL/6N) y hembras *Coq9*^{+/+} (con fondo genético C57BL/6J) dio lugar al nacimiento de ratones *Coq9*^{Q95X/+} con fondo genético mezcla de C57BL/6N y C57BL/6J (**Figura M1B**). Posteriormente, el cruce de ratones heterocigotos *Coq9*^{Q95X/+} dio lugar a una distribución mendeliana normal de ratones wild-type *Coq9*^{+/+}, heterocigotos *Coq9*^{Q95X/+} y homocigotos *Coq9*^{Q95X/Q95X} (referido en este trabajo como *Coq9*^{Q95X}) (**Figura M1C**).

Material y métodos

La generación del modelo de ratón *Coq9*^{R239X}, también con fondo genético mezcla de C57BL/6N y C57BL/6J (Figura M1B), así como su caracterización inicial, fue ya descrita con anterioridad por nuestro grupo de investigación (García-Corzo et al., 2013).

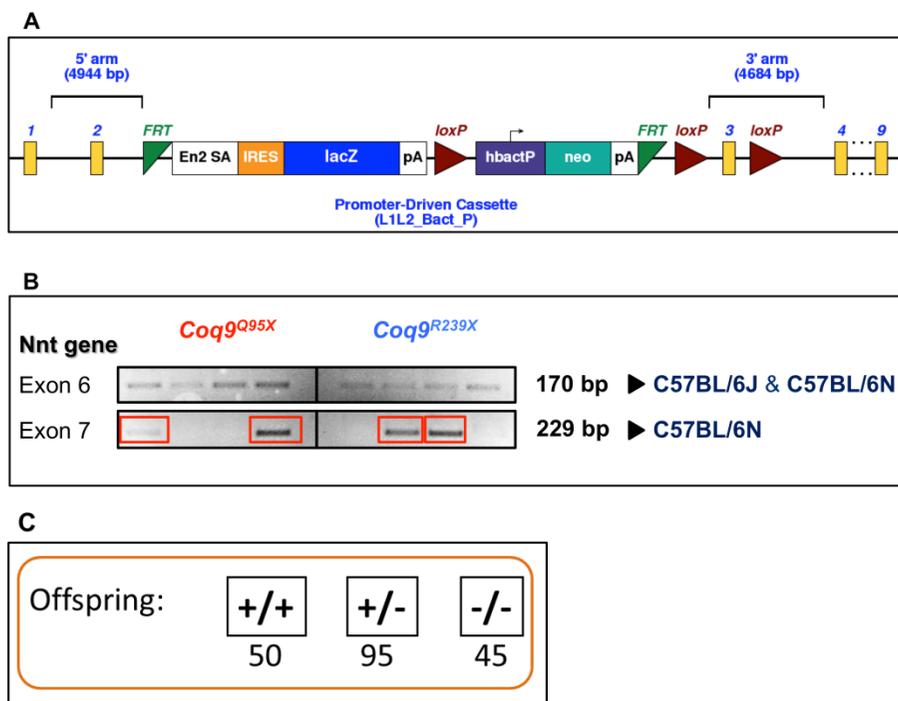


Figura M1. Generación del modelo de ratón *Coq9*^{Q95X}. (A) Esquema ilustrativo de la diana del vector para el gen *Coq9* insertado entre los exones 2 y 3. El vector insertado contiene un cassette con un gen de resistencia unido al promotor β -actina. Esto permite que se pueda hacer diana sobre todos los genes, independientemente del nivel de expresión en las células madres embrionarias de ratón. Después de eliminar la región flox, se predice que el ARN mensajero dará lugar a una proteína truncada que será degradada por el proceso de degradación del ARN mensajero mediado por mutaciones terminadoras (NMD). El ARN mensajero transcrito contendría sólo el exón 1 y 2 y la proteína truncada que daría lugar tendría la siguiente secuencia: MAATAAVSGVLGRLGWRLQLRCLPVARCRPALVPRAFHTAVGFRSSEEQKQPP HSSSQHSETQGPEFSRPPSPWVSPAQQPACLGAMAVS. (B) PCR específica para los exones 6-7 del gen *Nnt*. El gen *Nnt* está en su forma completa en la cepa de ratón C57/BL6N mientras que presenta una deleción en el exón 7 en la cepa de ratón C57/BL6J. Por tanto, los exones 6 y 7 son amplificados en la cepa C57/BL6N mientras que sólo el exón 6 se amplificará en la cepa C57/BL6J. Los resultados muestran que los dos modelos de ratón genéticamente modificados, *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X}, tienen un fondo genético mezcla de C57BL/6N y C57BL/6J. (C) Distribución mendeliana normal del modelo de ratón *Coq9*^{Q95X}.

Material y métodos

Los animales se estabularon en el servicio de experimentación animal del Centro de Investigación Biomédica de la Universidad de Granada, en zona libre de patógenos (SPF) y bajo un ambiente controlado de fotoperiodo (un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad) y temperatura (22°C). El acceso al agua y al pienso fue continuo durante todos los experimentos. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con el protocolo aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Granada (procedimiento CEEA 2009-254 y 2010-275) y en concordancia con el Convenio Europeo para la Protección de Animales Vertebrados utilizados en la Experimentación y con Otros Fines Científicos (CETS # 123) y las normas de experimentación animal en España establecidas en el RD53/2013.

Para los procedimientos experimentales de este estudio se usaron ratones homocigotos wild-type ($Coq9^{+/+}$) y homocigotos mutantes de ambos modelos ($Coq9^{Q95X}$ y $Coq9^{R239X}$).

Los animales fueron aleatoriamente distribuidos en los grupos experimentales. Los datos también se recogieron y procesaron de forma aleatoria.

2. AISLAMIENTO DE FIBROBLASTOS EMBRIOBARIOS DE RATÓN, CULTIVO CELULAR Y TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO.

Los fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) se aislaron de embriones de 14 días extraídos de hembras de ratón $Coq9^{Q95X/+}$ y $Coq9^{R239X/+}$. Las hembras preñadas fueron sacrificadas mediante dislocación cervical y se roció el abdomen con etanol al 70%. Con un bisturí se realizó una incisión ventro-caudal en el abdomen, se extrajo el útero y se lavó en un

Material y métodos

tubo de 50 ml con una solución de etanol al 70%. Seguidamente se realizó un segundo lavado con DPBS y 1% de antibiótico/antimicótico. A continuación, se colocó el útero en una placa de 10 ml con DPBS y 1% de antibiótico/antimicótico y se extrajeron individualmente los embriones. Cada embrión se procesó por separado y se retiró la cabeza y los órganos viscerales. La cabeza se guardó en un eppendorf estéril para su posterior genotipado y el resto del embrión eviscerado se lavó con DPBS y 1% de antibiótico/antimicótico. Posteriormente, en otra placa sin buffer, se troceó el resto del embrión hasta obtener fragmentos de tejido lo más reducidos posible y se añadió 5 ml de Tripsina-EDTA 0,25% para su digestión. El contenido se transfirió a un tubo falcon de 15 ml y se incubó 37°C durante 15 minutos, resuspendiéndose cada 5 minutos. Tras la incubación se añadió 5 ml de medio completo para inactivar la tripsina y se centrifugó a 1100 rpm durante 5 minutos. El pellet obtenido se resuspendió en 1-2 ml de medio completo y se transfirió a una placa de cultivo con 10 ml del mismo medio. Al día siguiente realizó un lavado con DPBS para retirar las células que no se habían adheridos y se cambió el medio por medio fresco.

Los MEFs obtenidos de los ratones *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X}, así como los fibroblastos del paciente deficiente en CoQ con la mutación homóloga *COQ9*^{R244X} y pacientes controles, se cultivaron en un medio completo: DMEM-GlutaMAX rico en glucosa suplementado con 10 % de FCS, 1% de amino ácidos no esenciales MEM y 1% de antibiótico/antimicótico. Los MEFs fueron tratados durante 6 h con 28 µg/ml de cicloheximida (Sigma; a partir de una solución madre acuosa de 5mg/ml) (Rio Frio et al., 2008). Después del tratamiento, las células se recolectaron para su análisis.

3. AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LA REGIÓN CORRESPONDIENTE A LOS EXONES 6 Y 7 DEL GEN NNT.

EL ADN se extrajo de muestras de cola de ratón, y la PCR del gen Nnt se realizó siguiendo la condiciones previamente descritas (Mekada et al., 2009). El gen Nnt está completo en la subcepa C57BL/6N mientras que presenta una delección en los exones 7-11 de la subcepa C57BL/6J. Por tanto, el exón 6 se utilizó para identificar ambas subcepas C57BL/6N y C57BL/6J, mientras que el exón 7 se utilizó para diferenciar la cepa C57BL/6N (**Figura M1B**). Para la amplificación del exón 6 utilizamos los siguientes primers: forward, GGGTTTTTCGATTGCTGTCATT; reverse, AGTCAGCAGCACTCCTCCAT. Para la amplificación del exón 7 utilizamos los siguientes primers: forward, ATTTAGCTGCTGAGGCTGGA; reverse, GACAAAGACCCGAGAAGCAC.

4. ANÁLISIS PROTEÓMICO DE MITOCONDRIAS DE RIÑÓN MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN (LC-MS/MS).

El aislamiento de mitocondrias se realizó siguiendo el protocolo previamente descrito (Fernandez-Vizarra et al., 2002). Los pellets mitocondriales se resuspendieron en 200 µl de 2% SDS, 100mM DTT, y 100mM Tris-HCl, ph 7,4. Las proteínas se cuantificaron por el método de Bradford y se utilizó 50 µg de cada extracto proteico para la digestión con filtros de corte por el método FASP (Filter Aided Sample Preparation). Los extractos digeridos obtenidos de las muestras wild type (*Coq9^{+/+}*) fueron analizados por espectrometría de masas de alta resolución (LC-MS/MS)

Material y métodos

siguiendo un patrón de datos con una lista de inclusión. Todos los péptido de la proteína COQ9 obtenidos tras la digestión y comprendidos entre 500-4,000 fueron incluidos en la lista. Un microgramo del extracto peptídico se diluyó en 20 µl de 5% MeOH: 1% HCOOH para su posterior inyección y análisis por LC-MS/MS. Los espectros obtenidos por LC-MS/MS se analizaron usando el programa SEQUEST (Proteome Discoverer v1.4; ThermoFisher) teniendo en cuenta los siguientes parámetros: tolerancia de la masa del péptido de 10 ppm; tolerancia del fragmento 0,02 Da, uso de tripsina como enzima y margen de tolerancia de hasta tres cortes perdidos, modificación dinámica de oxidación de metionina (+ 16 Da) y modificación fija de carbamidometilación de cisteína (+ 57 Da). La base de datos utilizada para la búsqueda fue *Mus musculus*. Para la identificación de péptidos, el FDR se fijó en 1% utilizando el algoritmo Percolator incluido en el software Proteome Discoverer.

El espectrómetro de masa (MS) utilizado fue el LTQ XL Orbitrap (ThermoFisher) equipado con una fuente nano-ESI. Se inyectó un volumen de 20 µl de cada muestra en el compartimento cromatográfico el cual estaba formado por una precolumna C18 de preconcentración (Agilent Technologies) conectada a una columna C18 de 15 cm de largo y 100 µm de diámetro (Nikkyo Technos Co.). La separación se realizó a un flujo de 0,4 µl/min durante 90 min en un gradiente de acetonitrilo de 3 al 40 % (solvente A: 0.1% ácido fórmico, solvent B: acetonitrilo 0.1% ácido fórmico). El sistema HPLC estaba compuesto por una nanobomba de capilaridad Agilent 1200, una bomba binaria, un microinyector termostatzado y una microválvula de cambio. El Orbitrap LTQ XL se manejó en modo ión positivo con un voltaje de spray de 1.8 kV. El análisis de espectrometría se realizó en modo de datos, obteniendo un espectro completo seguido de 8 MS/MS espectros específicos de las 8 señales con mayor intensidad detectada

Material y métodos

en el MS global. El MS completo (rango 400-1.700) se obtuvo en el Orbitrap a una resolución de 60.000. El espectro MS/MS se realizó en trap iónico lineal. En el análisis de los datos, se caracterizaron 6 péptidos característicos de la proteína COQ9, tras lo cual el método se centró en el análisis de esos 6 péptidos. Las muestras wild-type se usaron en la validación del método.

5. 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).

5.1 EXTRACCIÓN DE LAS QUINONAS CONTENIDA EN TEJIDOS.

La extracción de las quinonas se realizó a partir de 10-40 mg de tejidos. Todas las muestras se homogenizaron en 350 μ l de agua miliQ a 1.100 rpm con un homogeneizador de cristal-teflón (Stuart Scientific). El homogenado obtenido se sonicó (Sonuplus HD-2070) para romper las membranas mitocondriales y de él se separaron las siguientes alícuotas: 10 μ l para determinar la concentración de proteínas (Bradford) y 50 μ l que se transfirieron a un eppendorf con 950 μ l de 1-propanol. La mezcla resultante se agitó durante 2 minutos en “vortex” y se centrifugó a 11.300 g durante 5 minutos. Para la determinación cromatográfica se utilizaron 200 μ l del sobrenadante obtenido y se transfirieron a un vial de HPLC para su inyección (dependiendo del tejido fue necesario realizar una dilución adicional con 1-propanol).

Material y métodos

5.2 EXTRACCIÓN DE LAS QUINONAS EN MITOCONDRIAS AISLADAS, MEFS Y FIBROBLASTOS DE PACIENTES.

De cada fracción mitocondrial o pellet celular, se tomó el volumen necesario para tener 100 µg de mitocondrias o 2×10^7 células, se transfirieron a un eppendorf de 1,5 ml y se resuspendieron en 1 ml de H₂O milliQ.

A continuación, las muestras se transfirieron a un tubo de vidrio con tapón de rosca con 1 ml de SDS 0,1 M. Tras agitar brevemente la mezcla se añadió 1 ml de etanol y 2 ml de hexano, se agitó durante 2 minutos en “vortex” (rompiendo así las membranas mitocondriales) y se centrifugó a 2.000 g durante 5 minutos. La fase superior resultante, que contiene las quinonas y el hexano, se transfirieron 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 añadió 2,5 ml de hexano, se agitó en “vortex” durante 1 minuto y se volvió a centrifugar a 2.000 g durante 5 minutos. La fase superior resultante se transfirió al mismo vial de centelleo con pipetas Pasteur de vidrio sumándose así a la anterior y el extracto de hexano se evaporó con un flujo leve de Nitrógeno en estado gaseoso. Finalmente, se añadió 150 µl de 1-propanol al tubo de centelleo con el residuo lipídico, mezclándose con agitación suave y finalmente se transfirió a un vial de HPLC para su inyección.

5.3 CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES QUINÓNICOS.

Los componentes lipídicos de los extractos se separaron en un sistema HPLC Gilson equipado con una columna Symmetry[®] C18 3.5 µm, 4,6x150

Material y métodos

mm (Waters) en fase reversa y usando una fase móvil (500 ml de metanol, 500 ml de etanol, 15 ml de 2-propanol, 15 ml de ácido acético y 50 mM de acetato sódico) a un flujo de 0.9 ml/min.

Las quinonas se cuantificaron 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).

Las quinonas se identificaron 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 integraron el software del sistema HPLC (TRILUTION®) y se obtuvieron los valores en ng CoQ/ml.

6. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.

El ARN celular se obtuvo a partir del tejido congelado y su integridad se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. El ARN de músculo esquelético y cerebro se extrajo utilizando el kit de RNeasy Fibrous Tissue (para músculo esquelético) y el kit de RNeasy Lipid Tissue Mini (para cerebro) (Qiagen, Hilden, Germany) y se trató con ADNsa libre de ARNsas (Qiagen). El ARN de las muestras de riñón se extrajo con el kit de Total RNA Spin Plus (Real). El ARN total se cuantificó por densitometría óptica a 260/280 nm y se usó para la obtención de cADN mediante el kit de reverso transcripción “High Capacity cDNA Reverse Transcription” (Applied Biosystems). La amplificación se llevó a cabo mediante PCR a tiempo real, usando una curva estándar y mediante sondas Taqman específicas (de Applied Biosystems) para el gen murino *Coq9* (Mm00804236_m1), *Coq7* (Mm00501588_m1), *Coq6* (Mm00553570_m1), *Coq5* (Mm005018239_m1),

Material y métodos

Adck3 (Mm00469737_m1), *Sqrdl* (Mm00502443_m1) y el gen *Hprt* como control endógeno de carga (Mm01545399_m1). Los resultados se normalizaron por el control endógeno (normalizador) y se refirieron frente a los valores en las muestras wild-type (calibrador).

7. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS Y ANÁLISIS POR WESTERN BLOT DE LOS TEJIDOS DE RATÓN.

Los análisis por western blot se realizaron en homogenado de cerebro, riñones y músculo esquelético. Las muestras se homogenizaron en solución de homogenización A (50 mM Tris- HCl, 1% Triton X-100, 1 mM dithiothreitol, pH 7,6, cocktail de inhibidores de proteasas) en un homogeneizador de cristal-teflón a 1.100 rpm. El homogenado se sonicó y centrifugó a 1.000 g durante 5 min a 4°C. El sobrenadante resultante se usó para análisis de western blot. Tras cargar 60 µg de proteínas de cada muestra, se realizó la electroforesis en geles prefabricados Mini-PROTEAN TGX TM del 12 % (Bio-Rad) usando el equipo de electroforesis específico mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad).

Para la detección de la proteína truncada COQ9 en el modelo de ratón *Coq9^{R239X}*, se utilizó 70 µg de mitocondrias que fueron procesadas con tampón de carga XT y el agente reductor XT (Bio-Rad). Posteriormente se realizó la electroforesis en geles Criterion™ XT de 10% (Bio-Rad) usando la solución de electroforesis MOPS y el sistema electroforético de Criterion Cell (Bio-Rad). En todos los experimentos las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF-0.45 µm mediante el sistema mini Trans-Blot SD Transfer Cell (Bio-Rad) o Trans-Blot SD Transfer Cell (Bio-Rad) y se hibridaron con anticuerpos específicos de las proteínas de interés. La interacción proteína-anticuerpo se detectó por quimioluminiscencia

Material y métodos

(Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent) (GE Healthcare, Buckingham-shire, UK). La cuantificación de las bandas se realizó en un escáner Image Station 2000R (Kodak, Spain) y el software usado fue Kodak 1D 3.6. La intensidad de las bandas obtenidas en la detección de las proteínas COQ se normalizó con respecto a VDAC1 y los datos se expresaron en relación al ratón wild type (Garcia-Corzo et al., 2013).

Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes: anti-COQ7 (generosamente cedido por el Dr Hekimi, McGill University, Canada), anti-COQ6 (Santa Cruz Biotechnology, sc-393932), anti-COQ5 (Proteintech, 17453-1-AP), anti-ADCK3 (Abnova, M04A), antiCOQ9 (Santa Cruz, sc-271892), anti-COQ9 (Abcam, ab104189), SQRDL (Proteintech, 17256-1-AP) y anti-VDAC1 (Abcam, ab14734).

8. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS Y ANÁLISIS POR WESTERN BLOT DE LOS FIBROBLASTOS DE PACIENTES.

Las células se recolectaron en una densidad de 1×10^5 y se lavaron dos veces con PBS al 1%. A continuación, se homogenizaron en PBS 1x y se sonicaron durante 10 segundos a 4°C. Se prepararon 30 µg de muestra con buffer de carga Laemmli 4x y 25% DTT, y se mantuvieron a 99°C durante 5 min para la desnaturalización de las proteínas. Posteriormente se realizó la electroforesis SDS-PAGE utilizando geles Mini-PROTEAN® TGX™ 12% y la electrotransferencia de las proteínas usando membranas de PVDF-0.45. La incubación con el anticuerpo primario se realizó a 4°C overnight y se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: COQ7 (Thermo Scientific; PA5-25774), COQ6 (Abcam; ab128652), COQ9 (Thermo Scientific; PA5-24816), COQ5 (Thermo Scientific; PA5-26327), COQ8/ADCK3 (Abnova; H00056997-M04A) y vinculina (Abcam SPM227), como control de carga.

Material y métodos

La interacción proteína-anticuerpo se detectó por quimioluminiscencia (Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent) (GE Healthcare. Buckingham-shire, UK). La cuantificación de las bandas se realizó mediante Image J.

9. ACTIVIDAD DE LOS COMPLEJOS RESPIRATORIO DEPENDIENTES DE CoQ.

La actividad de los complejos respiratorios dependientes de CoQ (CI+III y CII+III) se realizó en partículas submitocondriales. Para su obtención, se tomó el volumen necesario de muestras que contuvieran 100 µg de proteínas y seguidamente se suspendieron y sonicaron en 100 µl de buffer fosfato 0,1 M, pH 7.5.

La medida de la actividad del complejo I+III se basa en la reducción del citocromo C y se midió en presencia del buffer de reacción específico compuesto por: 0,5 mM KCN, 0,2 mM NADH y 0,1 mM citocromo C a 550 nm tal y como se ha descrito previamente (Garcia-Corzo et al., 2013; Kirby et al., 2007).

Para la actividad del complejo II+III se utilizó el buffer de reacción compuesto por 0,5 mM KCN, 0,3 mM de succinato y 0,01mM de rotetona. La medida de la actividad se inició con la adición de 0,1 mM citocromo C a 550 nm (Kirby et al., 2007).

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

10. EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE LOS SUPERCOMPLEJOS POR BLUE NATIVE GEL ELECTROFORESIS (BNGE).

10.1 AISLAMIENTO DE FRACCIÓN MITOCONDRIAL DE TEJIDOS DE RATÓN PARA BNGE.

La BNGE se realizó en fracción mitocondrial de tejidos de ratón. El aislamiento de las mitocondrias se realizó siguiendo el protocolo previamente descrito (Fernandez-Vizarra et al., 2002; Garcia-Corzo et al., 2013). Tras sacrificar a los animales, se extrajeron rápidamente cerebro, riñón y músculo esquelético, se lavaron en solución salina y se homogenizaron en un homogeneizador de cristal-teflón (Stuart Scientific). Todo el proceso de extracción se realizó en hielo para así mantener una temperatura constante de 4°C.

La homogenización de cada tejido se realizó en el tampón de aislamiento correspondiente. El riñón se homogenizó (1:4 p/v) en 320 mM sacarosa, 1 mM EDTA y Tris–10 mM HCl, pH 7.4; el cerebro se homogenizó (1:5 p/v) en el mismo tampón de aislamiento que el riñón al cual se le añadió albúmina libre de ácidos grasos al 0.2% y el músculo esquelético se homogenizó (1:20 p/v) en 120 mM KCl, 20 mM HEPES, 2mM MgCl₂, 1 mM EGTA y 0.5 % BSA libre de ácidos grasos, pH 7.4. Todos los tejidos se homogenizaron a 600 rpm.

Los homogenados obtenidos de cerebro y riñón, se centrifugaron a 1.000 g durante 5 minutos. El sobrenadante obtenido se centrifugó a 14.400 g durante 2 minutos (dos veces) obteniéndose, tras la segunda centrifugación, el pellet mitocondrial. El homogenado resultante de músculo esquelético se

Material y métodos

centrifugó a 600 g durante 10 minutos. El sobrenadante (S1) se reservó en hielo y el pellet se resuspendió en 8 volúmenes de su medio de aislamiento y se centrifugó a 600 g durante 10 minutos. El sobrenadante que se obtuvo (S2) se juntó con el anterior (S1) y el sobrenadante total se centrifugó a 17.000 g durante 10 minutos. El pellet obtenido se resuspendió, de nuevo, en 10 volúmenes del medio de aislamiento de músculo y se centrifugó a 7.000 g durante 10 minutos. El nuevo pellet se resuspendió en 1 volumen de medio que contenía 300 mM sacarosa, 2 mM HEPES y 0.1 mM EGTA y se centrifugó a 3.000 g durante 10 minutos.

Los pellets mitocondriales de los tejidos se resuspendieron en 120 μ l de los correspondientes medios de aislamiento. Una pequeña alícuota de cada muestra se reservó para la determinación de proteínas y el resto se almacenó a -80°C para su posterior uso.

10.2 PREPARACIÓN DEL GEL DE “BLUE NATIVE” DE PRIMERA DIMENSIÓN (1D).

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

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 1**) que permite una mayor resolución a la hora de diferenciar 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.

Material y métodos

10.3 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA BLUE NATIVE GEL ELECTROFORESIS.

En primer lugar, de las alícuotas obtenidas en el primer punto, se tomó el volumen necesario para tener 100 µg de mitocondrias y se centrifugó a 17.000 g durante 3 minutos a 4°C. Los pellets mitocondriales se resuspendieron en 10 µl de un medio específico para mitocondrias (100 mM ácido 6-aminohexanoico, Bis-50 mM Tris-HCl, pH 7,0) obteniéndose así una concentración final de mitocondrias de 10 mg/ml. A continuación las proteínas de membranas se solubilizaron mediante la adición de digitonina (4g/g) e incubaron 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 añadió 3 µl de tampón de carga (5% Serva Blue G-250, 100 mM 6-aminohexanoico), quedando así, las muestras preparadas para cargar en el gel de electroforesis. Se cargaron 100 µg de proteínas por calle.

10.4 ELECTROFORESIS NO-DESNATURALIZANTE.

Tras cargar las muestras, se realizó la electroforesis en el sistema electroforético Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-rad). La electroforesis se inició a 90 V durante 30 min para así facilitar la entrada de las proteínas en el gel concentrador y una vez que las proteínas penetraron en el gel separador, se aumentó el voltaje a 300 V durante 1:15 hora. Durante todo el proceso el amperaje se limitó a 15 mA/gel y se realizó en cámara fría a 4°C.

Para retirar el exceso de azul de Coomassie, 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.

Material y métodos

Tras finalizar la electroforesis, el gel fue utilizado para su transferencia a membrana de PVDF e inmunodetección de las subunidades de los diferentes complejos.

10.5 TRANSFERENCIA E INMUNODETECCIÓN.

Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Immobilon®-P, Milliporte) 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 colocó el gel y la membrana (previamente tratada con metanol durante 1 min) entre dos papeles Whatman humedecidos con tampón de transferencia (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol, pH 8,3).

Una vez finalizada la transferencia se realizó la inmunodetección de la subunidad del complejo III, usando el anticuerpo específico anti-ubiquinol Cytochrome c Reductase Core Protein I (Abcam, ab110252), así como anti-VDAC1 (Abcam, ab14734) como control de carga.

Al igual que para la técnica de Western Blot, las señales se detectaron empleando el sistema “Enzyme Chemiluminescence Plus” (ECL plus) (GE Healthcare) y se cuantificaron las bandas en un escáner Image Station 2000R (Kodak, Spain) a través del software Kodak 1D 3.6.

11. 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 extrajeron en hielo rápidamente los riñones y músculo esquelético. Los

Material y métodos

músculos (tríceps surae y vastus lateralis) se sumergieron 60 s en solución de proteinasa K a una concentración de 1 mg/ml. A continuación, los músculos se homogenizaron (proporción 1:10 p/v) en tampón de aislamiento (250 mM sacarosa, 2 mM EDTA, 10 mM Tris, 0,5% albúmina libre de ácidos grasos, pH 7,4) en un homogeneizador de cristal-teflón a 800 rpm. El homogenado de cada tejido se centrifugó a 1.000 g durante 5 minutos a 4°C (centrífuga Beckman Avanti™ 30, rotor de ángulo fijo F1010) y el sobrenadante resultante se centrifugó a 23.000 g durante 10 min a 4°C. El pellet mitocondrial obtenido de la centrifugación se resuspendió en 100 µl de tampón de aislamiento, y se tomó una alícuota de 10 µl para medir proteínas. El resto, 90 µl, se lavó con 900 µl de tampón de aislamiento y se volvió a centrifugar a 13.000 g durante 3 min a 4°C. De esta centrifugación se obtiene el pellet crudo mitocondrial final que se resuspendió en 90 µl del medio MAS 1x (70 mM sacarosa, 220 mM manitol, 10 mM KH₂PO₄, 5 mM MgCl₂, 2 mM HEPES, 1 mM EGTA y 0,2% (p/v) de albúmina libre de ácidos grasos, pH 7,2). El riñón se homogenizó (proporción 1:10 p/v) en solución A de respiración (250 mM sacarosa, 0,5 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris and 1% albúmina libre de ácidos grasos) en un homogeneizador de cristal-teflón a 800 rpm. El homogenado obtenido se centrifugó a 500 g durante 7 min a 4°C y el sobrenadante resultante se centrifugó a 7.800 g durante 10 min a 4°C. Entonces el pellet obtenido se resuspendió en solución B de respiración (250 mM sacarosa, 0,5 mM Na₂EDTA y 10 mM Tris) y se reservó una alícuota de 5 µl para determinación de proteínas. El resto de muestra se centrifugó a 6.000 g durante 10 min a 4°C. De esta centrifugación se obtuvo un pellet que se resuspendió en solución A de respiración y se centrifugó nuevamente a 6.000 g durante 10 min a 4°C. El pellet final crudo mitocondrial se resuspendió en 95 µl del medio MAS 1x.

Material y métodos

La respiración mitocondrial se midió utilizando el dispositivo XF^o 24 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience) (Rogers et al., 2011). En primer lugar, se diluyeron las mitocondrias en medio MAS 1x frío en el volumen necesario para obtener la concentración requerida por placa (2,5 µg/pocillo para riñón y 1,5 µg/pocillo para músculo) y se distribuyeron 50 µl de la suspensión mitocondrial en cada pocillo (excepto en los pocillos utilizados como blancos para la corrección del ruido de fondo), manteniendo la placa en hielo. A continuación, la placa se centrifugó a 2.000 g d durante 10 min a 4°C. Tras la centrifugación se añadió a cada pocillo 450 µl de medio MAS 1x con sustratos (10 mM succinato, 2 mM malato, 2 mM glutamato y 10 mM piruvato). La respiración mitocondrial se midió de forma secuencial en un estado acoplado con los sustratos presentes (respiración basal o Estado 2), seguido del Estado 3o (respiración fosforilativa en presencia de ADP y sustratos). El Estado 4 (respiración residual) se midió tras la adición de oligomicina cuando todo el ADP se había consumido y la máxima capacidad respiratoria (Estado 3u) se midió tras la adición de FCCP. Las inyecciones se sucedieron de la siguiente forma: inyección A, 50 µl de 40 mM de ADP (4 mM final); inyección B, 55 µl de 30 µg/ml oligomicina (3 µl/ml final); inyección C, 60 µl de 40 µM de FCCP (4 µM final); e inyección D, 65 µl de 40 µM de antimicina A (4 µM final). Todos los datos se expresaron en pmol/min/µg proteína.

12. HISTOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA.

Tras sacrificar los animales, se extrajeron el cerebro, corazón y riñón con mucho cuidado y se fijaron en formalina seguidos de la inclusión en parafina. Las secciones de 4 µm de grosor fueron desparafinizadas mediante xileno y se utilizaron para la tinción de hematoxilina-eosina (H&E),

Material y métodos

tricrómico de Masson (TCM), del ácido periódico de Schiff (PAS) y de Luxol fast blue (LFB) (García-Corzo et al., 2013). El estudio inmunohistoquímico se realizó en las mismas secciones, usando los siguientes anticuerpos primarios: el anticuerpo primario de la proteína ácida fibrilar glial (anti-GFAP) (Millipore, MAB360); el anticuerpo primario frente a oligodendrocitos (anti-oligodendrocitos) (Millipore, MAB1580) y el anticuerpo primario tubulina beta III (anti-tubulina β -III, TUJ1) (Covance, MMS-435P) (García-Corzo et al., 2013). El kit Dako Animal Research para los anticuerpos primarios (Dako Diagnóstico S.A., España) se utilizó para la identificación cuantitativa de los antígenos por microscopía. Las diferentes secciones se examinaron con un microscopio OLYMPUS CX41 a 40-400x. Las imágenes fueron procesadas bajo las mismas condiciones de luz con el software CELL A.

Las muestras de músculo esquelético (tríceps surae) se congelaron en isopentano enfriado previamente con nitrógeno líquido. Las secciones de tejido congelado de músculo esquelético (8 μ m de grosor) se tiñeron para la determinación de la actividad de la citocromo oxidasa (COX) y de la succinato deshidrogenasa (SDH)(Tanji and Bonilla, 2008), observándose dos tipos de fibras:

- *Fibras de tipo I o de contracción lenta*, de metabolismo aeróbico y con mayor contenido en mitocondrias. Estas fibras se tiñen de color marrón o azul oscuro, en función de que se trate de la tinción de COX o SDH respectivamente.
- *Fibras de tipo II o de contracción rápida*, de metabolismo glucolítico y con menor contenido en mitocondrias. Al contrario

Material y métodos

que en el caso anterior, estas fibras se tiñen de color marrón o azul claro, para COX y SDH respectivamente.

Para el estudio de la forma de la fibra y la morfología muscular general, se realizó también una tinción rutinaria de H&E de estas secciones musculares así como la tinción tricrómica de Gomori modificada (TGM) para la detección de fibras rojas rasgadas (RRF). Las RRF son características en las miopatías mitocondriales y aparecerían en caso de que hubiera una proliferación subsarcolémica anormal de mitocondrias en la fibra muscular afectada, las cuales se marcan de rojo intenso (Tanji and Bonilla, 2008).

13. MEDIDA DE LOS METABOLITOS EN ORINA.

Las muestras de orina fueron tomadas durante 24h y analizadas en un analizador bioquímico BS-200 (Mindray Medical España S.L., España) a 37°C. Se realizaron las siguientes pruebas colorimétricas: urea y albúmina (Linear Chemicals S.L. España) (García-Corzo et al., 2013).

14. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA.

La actividad locomotora fue medida en ratones *Coq9*^{+/+} y *Coq9*^{Q95X} de 6 meses de edad con una media de peso similar. La medida de la actividad voluntaria fue realizada en jaulas de policarbonato (20,5 cm de ancho x 36,5 cm de largo x 14 cm de alto) con libre acceso a la rueda de ejercicio de acero inoxidable (23 cm de diámetro y 5 cm de ancho) y con un eje rotatorio (Bioseb, Boulogne, France). Las ruedas estaban conectadas a un ordenador que automáticamente registraba la distancia recorrida por ratón por hora de grabación así como la duración y la velocidad media de cada episodio

Material y métodos

durante toda la duración del experimento. La actividad voluntaria en la rueda de ejercicio fue monitorizada de forma constante durante 48 horas, comenzando con el período de oscuridad (20:00 h) y se hizo la media de los resultados obtenidos tras los dos días. Los animales tuvieron comida y agua disponible *ab libitum* y se entrenaron el día previo del comienzo del experimento (Cobos et al., 2012).

El test “Open Field” consiste en una caja cuadrada de 25 x 25 x 25 cm. Las paredes eran opacas para que los animales no pudieran ver la habitación. Cada ratón se situaba en el centro del cuadrado entre las 8 y 9 PM, iluminado con luz roja y se registraba su movimiento por medio del sistema de grabación SMART® (Panlab S.L., España) durante 30 min después de 30 min de adaptación (Pallud et al., 2011). La distancia recorrida (cm) por cada ratón fue registrada (García-Corzo et al., 2013).

La fuerza muscular se determinó utilizando un medidor de fuerza de agarre monitorizado (Model 47200, Ugo-Basile, Varese, Italy). La prueba en sí misma consiste en lo siguiente: el medidor de fuerza de agarre se pone en posición horizontal y se acerca el animal sujeto de la cola a la barra hasta que este se agarra a ella. Una vez lo ha hecho, el experimentador estira el animal hacia atrás hasta que el animal se desprenda de la barra. La fuerza máxima aplicada a la barra en el instante antes de soltarse queda registrada de forma automática y es expresada en gramos (g). Se hicieron dos medidas por cada ratón con un minuto mínimo de espera entre cada medida.

Para la prueba del alambre “hanging wire test”, escogimos el método de “caídas y alcances” (Raymackers et al., 2003). Para este ejercicio, utilizamos un alambre horizontal de 1,5 mm de ancho y 55 cm de largo, del que colgamos al ratón por las extremidades anteriores durante 180 segundos. Al inicio de la prueba, los animales tenían una puntuación de alcance de 0.

Material y métodos

Cada vez que un ratón se caía se paraba el temporizador y se reiniciaba cuando el animal era de nuevo devuelto al alambre hasta acabar los 180 segundos. Si el animal llegaba al final del alambre, el temporizador se paraba y la puntuación de alcance se incrementaba en 1. Los resultados fueron expresados como la media de la puntuación de alcances.

15. TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS CON 2,4-diHB y CoQ₁₀.

El tratamiento *in vivo* con 2,4-diHB consistió su administración en el agua de bebida a una dosis de 1g/kg/día, cambiándose dos veces por semana. El tratamiento comenzó a la edad de 1 mes y finalizó a la edad de 2 meses con su sacrificio.

Los fibroblastos los pacientes deficientes en CoQ y pacientes controles, se cultivaron en un medio completo: DMEM-GlutaMAX rico en glucosa suplementado con 10 % de FCS, 1% de amino ácidos no esenciales MEM y 1% de antibiótico/antimicótico. El tratamiento con 2,4-diHB se administró a una concentración de 0,5 mM o 2,5 mM de 2,4-diHB. Se trató también un grupo control con vehículo (DMSO) a la misma concentración. Las células se recolectaron tras una semana de tratamiento. El tratamiento con CoQ10 se hizo a una dosis de 5µM durante una semana (Lopez et al., 2010).

16. ANÁLISIS DE METABOLITOS INTERMEDIARIOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTRÓMETRO DE MASAS (MS/MS).

Material y métodos

Los extractos lipídicos se obtuvieron por el mismo procedimiento descrito para la cuantificación de CoQ. Las muestras se analizaron usando un sistema de cromatografía líquida de alta calidad acoplado a un detector de alta definición QTOF SynaptG2 de espectrómetro de masas (MS/MS) (Waters Corporation). La columna analítica de separación usada es una BEH C18, 1.7 μ m, 2.1 x 50 mm (Waters, España).

La fase móvil utilizada consistió en metanol y ácido fórmico al 0,1 % con un flujo constante de 0.5 ml/min. Las temperaturas de secado y nebulización aplicadas fueron de 100 y 300°C respectivamente. El nitrógeno se usó como gas de secado (30 l/h) y como gas de nebulización (600 l/h). El análisis de espectrometría de masas se realizó en modo de barrido de masa, restringiéndose entre 50 y 1200 uma para mejorar la sensibilidad del análisis.

17. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS PARTICIPANTES EN LA RUTA MITOCONDRIAL DE OXIDACIÓN DEL SULFURO DE HIDRÓGENO.

17.1 MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE LA SULFURO QUINONA OXIDO-REDUCTASA (SQRDL).

La actividad de la SQR se midió a temperatura ambiente en mitocondrias aisladas de riñón y músculo esquelético, las cuales se habían extraído previamente en fresco y alicuotadas y almacenadas a -80°C hasta su uso el día del experimento.

Se tomó el volumen necesario de muestras que contuvieran 0,2 mg/ml y 0,4 mg/ml de proteínas para riñón y músculo esquelético respectivamente. La medida de la actividad se basa en la reducción enzimática de la

Material y métodos

decilubiquinona (dUq) y se midió en presencia del buffer de reacción específico compuesto por: 20 mM TRIS-HCL ph 8, 2 mM KCN, 100 μ M de dUq (Sigma). La reacción se inició con la adición de 100 μ M de hidrosulfuro de sodio (NaHS) y se midió la absorción a 275 nm durante 10 minutos en placa de 96 pocillos transparente a UV (Hildebrandt and Grieshaber, 2008).

17.2 MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE LA RODANASA (RHOD).

La actividad de la rodanasa se midió a temperatura ambiente en mitocondrias aisladas de cerebro, riñón y músculo esquelético, extraídas y guardadas como en el caso anterior.

Se tomó el volumen necesario de muestras que contuvieran 0,08 mg/ml, 0,045 mg/ml y 0,15 mg/ml de proteínas para cerebro, riñón y músculo esquelético respectivamente. La actividad de la rodanasa se determinó midiendo la formación de tiocianato (SCN) a partir de cianuro y tiosulfato ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) (Clemedson et al., 1955). Para la medida, se utilizó el buffer compuesto por: 0,1M TRIS-HCL pH 9, 50 mM de tiosulfato y agua bidestilada. La reacción se inició con la adición de 50 mM de cianuro potásico (KCN). La mezcla se incubó durante 0, 5, 10 y 15 minutos en agitación. Tras el período de incubación la reacción se paró mediante la adición de una solución de parada que contenía: formaldehído 37%, nitrato férrico (FeNO_3) (672 mM en ácido nítrico al 14%) y agua bidestilada. Las muestras se centrifugaron a 14.000 rpm durante 10 minutos y se tomó el sobrenadante para la medida de la absorbancia a 460 nm. Se usó el tiocianato como standard para la realización de la curva de calibración.

18. DETERMINACIÓN DE LOS METABOLITOS TIÓLICOS INVOLUCRADOS LA RUTA MITOCONDRIAL DE OXIDACIÓN DEL SULFURO DE HIDRÓGENO.

La determinación de los intermediarios tiólicos: sulfuro de hidrógeno (H₂S), sulfito (SO₃²⁻) y tiosulfato (SSO₃²⁻) fue llevada a cabo mediante HPLC (Hildebrandt and Grieshaber, 2008).

18.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.

La extracción se realizó a partir de 10-20 mg de tejido. Todas las muestras se homogenizaron a 500 rpm con un homogeneizador de cristal-teflón (Stuart Scientific) en el buffer de homogenización específico compuesto por: 46 mM monobromobimano en acetonitrilo y 160 mM HEPES + 16 mM EDTA, pH 8,0. A continuación, las muestras se incubaron durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente y, tras la incubación, se centrifugaron en frío a 14.000 rpm durante 10 minutos. Para la determinación cromatográfica se utilizaron 20 µl del sobrenadante obtenido y se transfirieron a un vial de HPLC para su inyección

18.2 CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES TIÓLICOS.

Los componentes tiólicos se separaron en un sistema HPLC equipado con una columna LiChrospher 60 RP-select, 125-4 (5 µM). La fase móvil que se usó está compuesta por 0,25% ácido acético, pH 4 (fase A) y metanol (fase B) estableciéndose la siguiente programación para formar el gradiente binario (flujo 1ml/min):

Material y métodos

Tiempo (min)	Metanol (%)
0	12
2	12
7	20
20	40
21	60
22	100
30	100
39,1	12
35	12

Los metabolitos se cuantificaron mediante un detector fluorescente ($\lambda_{ex}=380$ nm, $\lambda_{em}=480$ nm) y se identificaron a partir de los tiempos de retención de los estándares individuales y realizando una curva patrón (0 – 500 μ M).

19. DETECCIÓN DEL SULFURO DE HIDRÓGENO (H₂S) MEDIANTE EL USO DE TIRAS DE ACETATO DE PLOMO.

La producción de H₂S se midió a partir de 100 mg de tejido fresco el cual se sumergió en una solución de lisis (Promega) suplementada con 10 mM de cisteína (Cys) y 8 mM de piridoxal-5'-fosfato (PLP). La tira de acetato de plomo se colocó de tal forma que quedara por encima de la fase líquida en un eppendorf cerrado. Las muestras se incubaron durante 5 horas a 37°C hasta ver la coloración negra de la tira por la formación de sulfuro plumboso.

20. ACTIVIDAD DE LA CITOCROMO C OXIDASA (COX).

Material y métodos

La actividad de la COX o complejo IV mitocondrial se midió en partículas submitocondriales de cerebro, riñón y músculo esquelético. Las muestras se incubaron en un medio con 100 mM de fosfato potásico, pH 7. La reacción se inició por la adición de citocromo C reducido previamente con ditionito sódico y se midió la absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro de cubetas (Kirby et al., 2007).

21. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.

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

La medida se llevó a cabo en un espectrofotómetro de placas (Bio-Tek Power-Wavex 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) para poder estimar, por extrapolación la concentración proteica de toda la batería de muestras.

22. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el software científico Gaphpad. Los datos fueron expresados como la media \pm DE (desviación estándar) de 3 a 10 individuos por grupo. Para comparar la media

Material y métodos

entre dos grupos diferentes se realizó un análisis de la t de Student, mientras que para comparar la media de tres grupos diferentes se utilizó una ANOVA de una vía con un test *post hoc* de Tukey, considerando un valor de P menor de 0,05 como estadísticamente significativo.

El efecto del tamaño de muestra fue calculado usando la aplicación disponible online <http://www.biomath.info/power/ttest.htm>. El número de animales en cada grupo fue tomado para poder detectar cambios de aproximadamente un 60% de las medidas de los biomarcadores (asumiendo una significancia $\alpha = 0,05$ y un poder $\beta = 0,8$). La distribución Gaussiana se comprobó mediante el software de Graphpad: <http://graphpad.com/quickcalcs/probability1.cfm>.

Resultados

1. LA AUSENCIA DE LA PROTEÍNA COQ9 PRODUCE UNA DEFICIENCIA MODERADA EN CoQ.

Los ratones *Coq9^{Q95X}* tras su nacimiento tienen un crecimiento y desarrollo normal y son indistinguibles de los ratones wild-type (*Coq9^{+/+}*). Al igual que en el modelo de ratón *Coq9^{R239X}*, los ratones *Coq9^{Q95X}* sufren una pérdida del pelo corporal entre los días 20-22 de vida (**Figura R1 A**), recuperándolo en su totalidad en el siguiente ciclo piloso.

Para demostrar que la proteína COQ9 no se producía en el ratón *Coq9^{Q95X}*, en primer lugar realizamos un estudio de inmunodetección usando dos anticuerpos diferentes de la proteína COQ9: uno que reconoce el epítipo correspondiente a los aminoácidos 165-318 de la región C-terminal de la proteína (sc-271892), y otro frente a los aminoácidos 160-190 localizados en la región más interna de la proteína COQ9 (ab-104189). Con ninguno de los dos anticuerpos se detectó la proteína COQ9 en el ratón *Coq9^{Q95X}* comparado con el ratón wild-type (**Figura R1 B**). Para verificar si la inducción del codón prematuro de parada producía la degradación completa de COQ9, también realizamos un análisis proteómico mediante espectrometría de masas (LC-MS/MS) frente a 6 péptidos previamente identificados de la proteína COQ9, estando uno de ellos (QQPPHSSSQQHSETQGPEFSRPPR) presente en una posible versión truncada de 95 aminoácidos (Pagliarini et al., 2008). Contrario a lo que ocurre en el ratón wild-type, donde la proteína COQ9 fue claramente detectada, no se observó ninguno de sus péptidos en el ratón *Coq9^{Q95X}*, demostrando que la proteína COQ9 estaba ausente en el ratón *Coq9^{Q95X}* (**Figura R1 C**).

Resultados

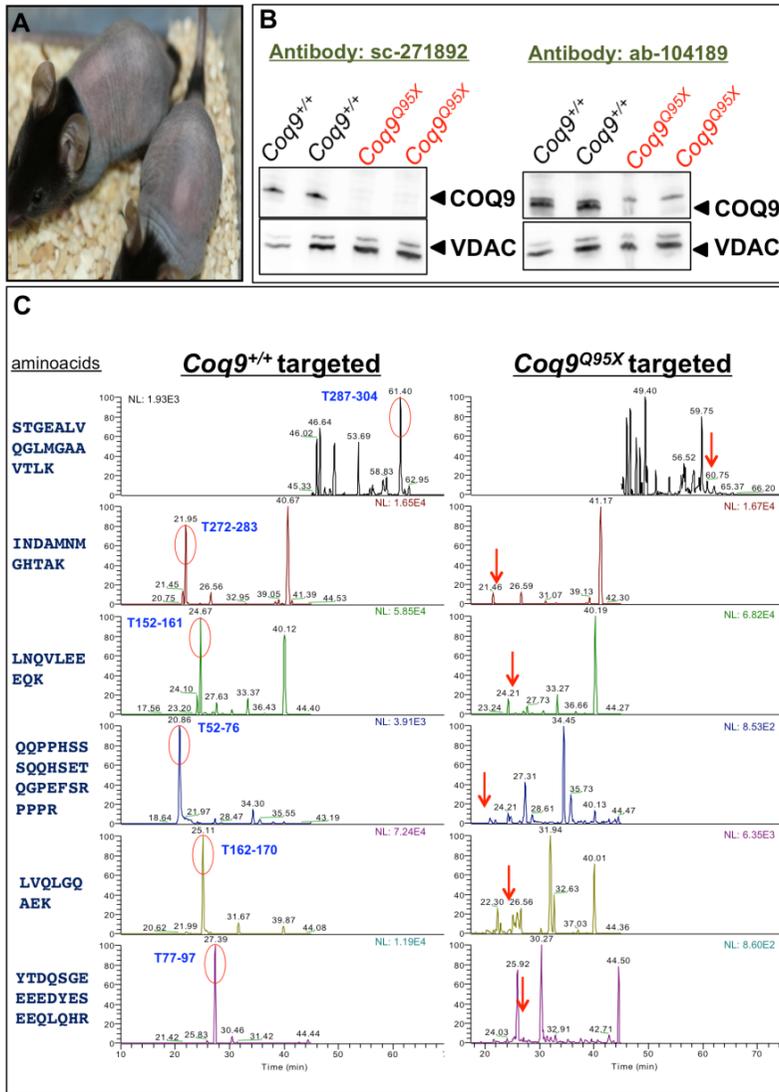


Figura R1. Ratones *Coq9*^{Q95X} a los 21 días de vida y análisis de la proteína COQ9. (A) Fotografía de dos ratones homocigotos *Coq9*^{Q95X} con pérdida de pelo corporal a los 21 días de vida. **(B)** Western-blot representativo de la proteína COQ9 en homogenado de riñones de ratones *Coq9*^{+/+} (n=4) y *Coq9*^{Q95X} (n=4) a los 3 meses de edad. El anticuerpo sc-271892 se usó para el reconocimiento de la región C-terminal de la proteína COQ9 y el anticuerpo (ab-104189) se usó para el reconocimiento de la región más interna de la proteína COQ9. **(C)** Espectrometría de masas de alta resolución LC-MS/MS de mitocondrias de riñones de ratones *Coq9*^{+/+} (n=3) y *Coq9*^{Q95X} (n=3) a los 3 meses de edad. Ninguno de los 6 péptidos de la proteína COQ9 identificados en el ratón *Coq9*^{+/+} fue detectado en el ratón mutante *Coq9*^{Q95X}.

Resultados

No obstante, en el ratón *Coq9*^{R239X} se observó la existencia de una versión truncada de la proteína COQ9 mediante Western blot usando el anticuerpo frente a la región interna de la proteína (**Figura R2**).

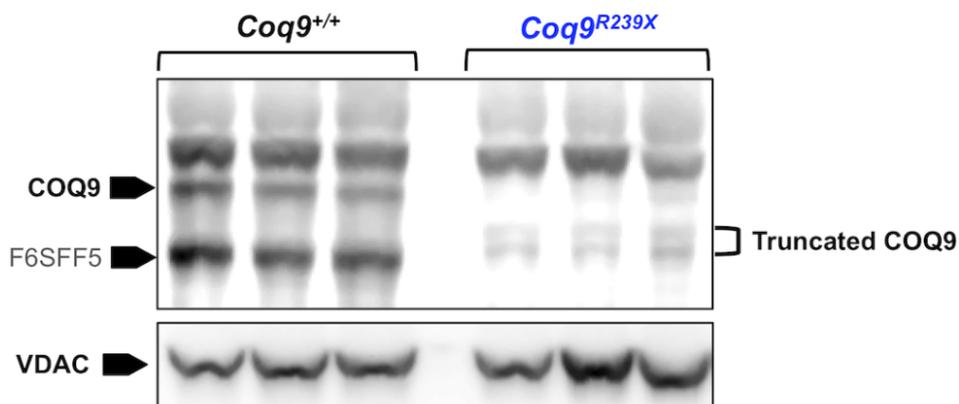


Figura R2. Detección de la proteína COQ9 truncada en el modelo de ratón *Coq9*^{R239X}. Western blot representativo de la proteína COQ9 en mitocondrias de riñones de ratones *Coq9*^{+/+} (n=6) y *Coq9*^{R239X} (n=7). El anticuerpo ab-104189 se usó para el reconocimiento de la región más interna de la proteína COQ9. La forma madura de la proteína COQ9 wild-type tiene un peso molecular de 31.8 kDa mientras que la forma madura de la versión truncada de COQ9 en el ratón *Coq9*^{R239X} se predice que tiene 23.5 kDa. La banda adicional que se observa en el wild-type se corresponde con la isoforma F6SFF5 (UniProt).

La consecuencia de la ausencia de esta proteína COQ9 se vio reflejada en una disminución significativa de los niveles de CoQ₉ (la forma mayoritaria de ubiquinona en roedores) y CoQ₁₀ en todos los tejidos estudiados (cerebro, cerebelo, corazón, riñones, extensor y *tríceps surae*) del ratón *Coq9*^{Q95X} comparados con sus homólogos *Coq9*^{+/+} de la misma edad (**Figura R3 A-F** y **Figura R4 A-F**). Mientras que en cerebro, cerebelo y corazón los niveles de CoQ₉ estaban en torno al 50 % (**Figura R3 A-C**), los riñones y el músculo esquelético tenían sólo el 30 % de los niveles residuales de CoQ₉ en comparación con los ratones wild-type (**Figura R3 D-F**).

Resultados

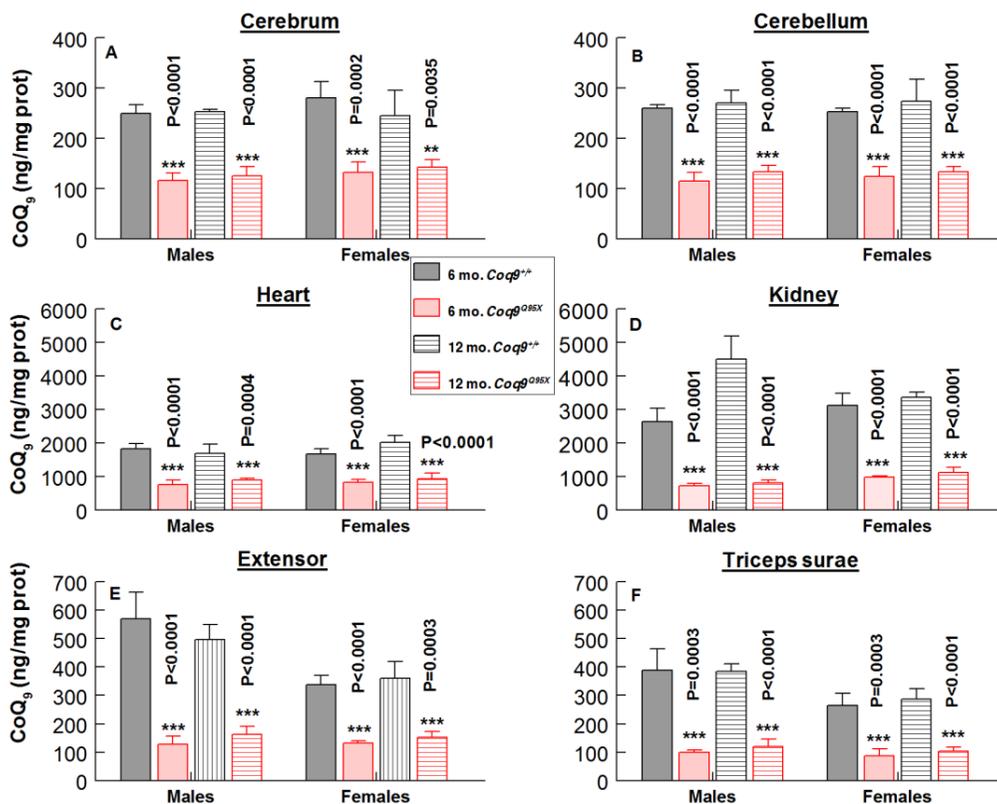


Figura R3. El modelo de ratón *Coq9*^{Q95X} presenta una deficiencia moderada en CoQ. (A-F) Niveles de CoQ₉ en homogenizado de cerebro (A), cerebelo (B), corazón (C), riñones (D), extensor (E) y *triceps surae* (F) de ratones machos y hembras *Coq9*^{+/+} y *Coq9*^{Q95X} a 6 y 12 meses de edad. Los datos están expresados como la media ± DE. El análisis estadístico se hizo entre los ratones *Coq9*^{+/+} de 6 meses de edad versus ratones *Coq9*^{Q95X} de 6 meses de edad y entre los ratones *Coq9*^{+/+} de 12 meses de edad versus ratones *Coq9*^{Q95X} de 12 meses de edad. **P < 0,01; ***P < 0,001. Prueba t de Student (n=8 para cada grupo).

En contra a lo que cabía esperar, los niveles de CoQ₉ en todos los tejidos estudiados eran mayores en el ratón *Coq9*^{Q95X} que en los que previamente se habían obtenido en el ratón *Coq9*^{R239X}, los cuales eran de alrededor del 20 % residual comparado con el control (Figura R5 A-F). El músculo esquelético fue el tejido que presentó los niveles de CoQ₉ más parecidos entre los dos modelos mutantes (Figura R5 F).

Resultados

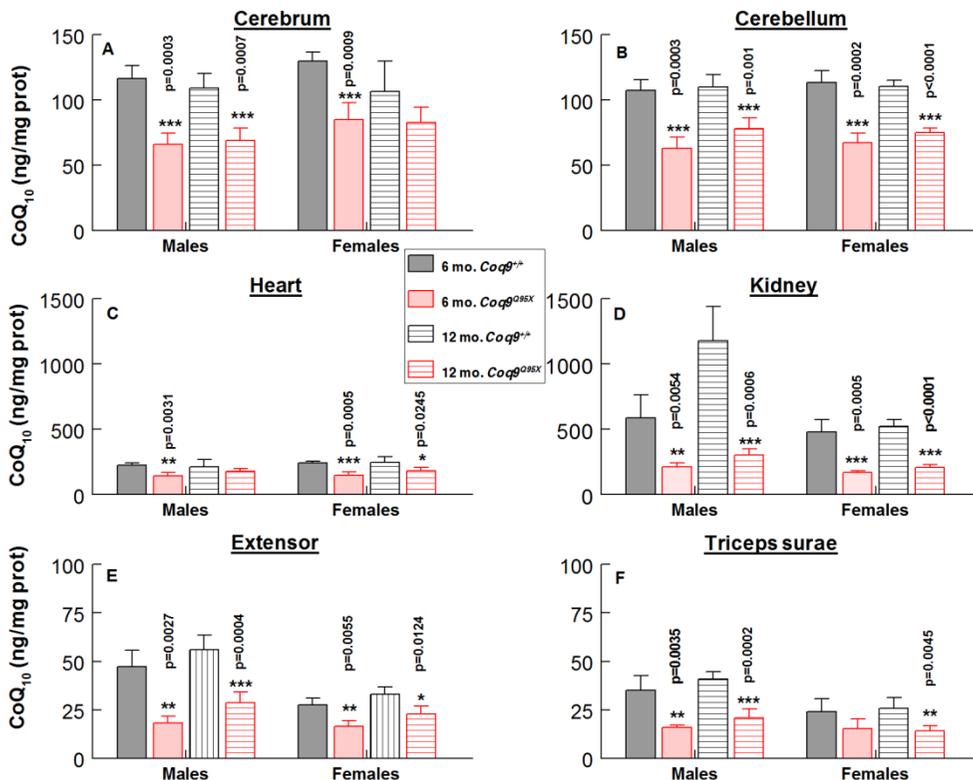


Figura R4. Niveles de CoQ₁₀ en homogenados de ratones *Coq9*^{+/+} y *Coq9*^{Q95X}. (A-F) Niveles de CoQ₁₀ en homogenado de cerebro (A), cerebelo (B), corazón (C), riñones (D), extensor (E) y *triceps surae* (F) de ratones machos y hembras *Coq9*^{+/+} y *Coq9*^{Q95X} a 6 y 12 meses de edad. Los datos están expresados como la media ± DE. El análisis estadístico se hizo entre los ratones *Coq9*^{+/+} de 6 meses de edad versus ratones *Coq9*^{Q95X} de 6 meses de edad y entre los ratones *Coq9*^{+/+} de 12 meses de edad versus ratones *Coq9*^{Q95X} de 12 meses de edad. **P < 0,01; ***P < 0,001. Prueba t de Student (n=8 para cada grupo).

Resultados

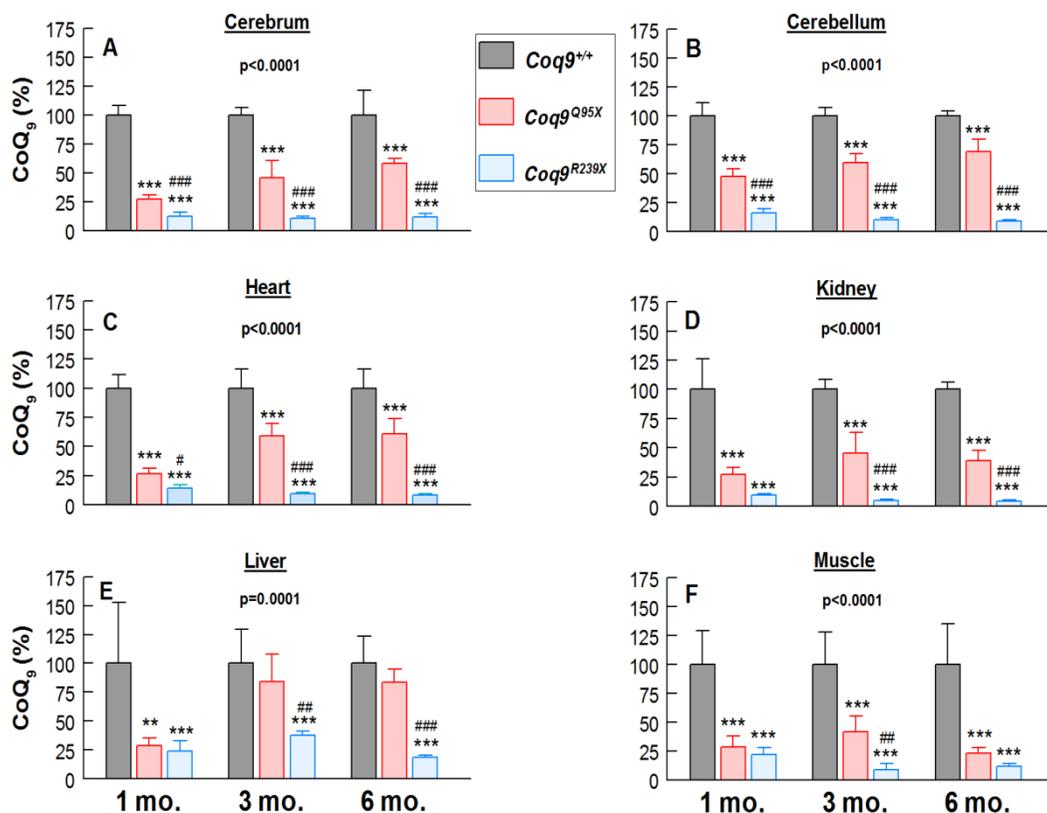


Figura R5. El modelo de ratón *Coq9*^{Q95X} presenta mayores niveles de CoQ que el modelo de ratón *Coq9*^{R239X}. (A-F) Niveles de CoQ₉ en homogenado de cerebro (A), cerebelo (B), corazón (C), riñones (D), hígado (E) y músculo esquelético (F) de ratones *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X} a 1,3 y 5 meses de edad. Los datos están expresados como la media ± DE. **P < 0,01; *P < 0,001. Ratones *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X} versus ratones *Coq9*^{+/+}. #P < 0,05; ##P < 0,01; ###P < 0,001; Ratones *Coq9*^{Q95X} versus *Coq9*^{R239X} (prueba de ANOVA de una vía con un test post hoc de Tukey; n=8 para cada grupo; los números encima de las barras indican los valores de P obtenidos con la prueba de ANOVA).**

2. DOS MUTACIONES DIFERENTES EN EL GEN *Coq9* AFECTA DE FORMA DIFERENTE LA EXPRESIÓN DE GENES QUE INTERVIENEN EN LA BIOSÍNTESIS DE CoQ Y EN LOS NIVELES DE LAS PROTEÍNAS QUE ESTOS CODIFICAN.

Las diferencias encontradas en los niveles de CoQ₉ entre los modelos de ratón *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X} podrían deberse a diferencias en la expresión de genes que intervienen en la biosíntesis de CoQ o, alternativamente a diferencias en la estabilidad del complejo multiproteico de biosíntesis, lo cual se manifestaría con una reducción de los niveles de las proteínas COQs.

En base a esto, determinamos, en primer lugar, los niveles de expresión del ARN mensajero de algunos de los genes que codifican proteínas que intervienen en la biosíntesis de CoQ y que forman parte de este complejo multiproteico de biosíntesis, es decir, *Coq9*, *Coq7*, *Coq6*, *Coq5* y *Adck3*, en cerebro, riñones y músculo esquelético de ratones *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X} de la misma edad.

En cerebro y riñones del ratón *Coq9*^{Q95X}, los niveles de ARN mensajero de *Coq9* fueron prácticamente indetectables en comparación con el ratón *Coq9*^{+/+} ($1 \pm 0,38$ y $1 \pm 0,90\%$, respectivamente) y estaban significativamente disminuidos en el ratón *Coq9*^{R239X} comparados con el control ($18 \pm 0,38$ y $10 \pm 0,21\%$, respectivamente) (**Figura R6 A y F**). Los niveles de ARN mensajero de *Coq7* y *Coq5* medidos en cerebro y riñones de los ratones *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X} fueron similares en los tres modelos (**Figura R6 B, D, G e I**), mientras que *Coq6* estaba significativamente reducido ($72,1 \pm 4,35\%$) sólo en cerebro del ratón *Coq9*^{Q95X} comparado con el control wild type (**Figura R6 D**); los niveles de

Resultados

ARN mensajero de *Adck3* estaban ligeramente incrementados en riñones del ratón *Coq9^{R239X}* en comparación con el ratón *Coq9^{Q95X}* ($116 \pm 7,9$ versus $85,1 \pm 20,6$ %) (**Figura R6 H**). En músculo esquelético, los niveles de ARN mensajero de *Coq9* estaban muy reducidos de forma similar en los ratones *Coq9^{Q95X}* y *Coq9^{R239X}*, ($3 \pm 0,9$ y $0,5 \pm 0,2\%$) comparados con el ratón *Coq9^{+/+}* (**Figura R6 K**). Además, en el ratón *Coq9^{Q95X}*, los niveles de ARN mensajero de *Adck3* y *Coq5* se encontraban también significativamente disminuidos en comparación con el ratón wild-type ($65,3 \pm 11,1\%$ para *Adck3* y $77,6 \pm 8,9\%$ para *Coq5*) (**Figura R6 M y N**). Comparando los dos mutantes, *Coq9^{Q95X}* y *Coq9^{R239X}*, cabe destacar que la expresión de los niveles de ARN mensajero de *Coq9* en cerebro y riñones del ratón *Coq9^{R239X}* fueron significativamente mayores que los medidos en el ratón *Coq9^{Q95X}* ($18,3 \pm 1,6$ versus $1,3 \pm 0,4\%$ en cerebro y $10,6 \pm 2,2$ versus $1,3 \pm 0,9\%$ en riñones) (**Figura R6 A y F**). Por el contrario, en músculo, no se encontraron diferencias en los niveles de ARN mensajero de *Coq9* entre los dos homocigotos mutantes (**Figura R6 K**). Los bajos o casi nulos niveles de ARN mensajero de *Coq9* medidos en ambos modelos de ratón (*Coq9^{Q95X}* y *Coq9^{R239X}*) es consecuencia de un proceso de degradación del ARN mensajero mediado por mutaciones terminadoras (NMD), ya que la incubación de los fibroblastos de los ratones *Coq9^{Q95X}* y *Coq9^{R239X}* con ciclohexamida, un inhibidor del NMD (Rio Frio et al., 2008), dio lugar al incremento de los niveles de ARN mensajero de *Coq9* en *Coq9^{Q95X}* (incremento de $5,5 \pm 1,1$, tratados/no tratados) y *Coq9^{R239X}* (incremento de $1,4 \pm 6,8$, tratados/no tratados) en comparación con el efecto moderado de tratamiento sobre los fibroblastos de *Coq9^{+/+}* (incremento de $1,5 \pm 0,1$, tratados/no tratados) (**Tabla R1**).

Resultados

encontraban significativamente disminuidos en cerebro (19 ± 9 y $41 \pm 13\%$), riñones (9 ± 6 y $50 \pm 9\%$) y músculo esquelético (16 ± 3 y $17 \pm 6\%$) comparados con el control wild-type. Sin embargo, en el ratón *Coq9*^{R239X}, los niveles de COQ7 y COQ5 obtenidos, fueron extremadamente bajos en cerebro ($0,1 \pm 0,1$ y $35 \pm 11\%$), riñones ($0,1 \pm 0,1$ y $38 \pm 14\%$) y músculo esquelético (indetectable, y $17 \pm 6\%$) comparados con el control wild-type (**Figura R7 A y C; Figura R8 A, C, E y G**).

	Coq9 mRNA (CH-treated/untreated)
<i>Coq9</i> ^{+/+}	1.54 ± 0.12
<i>Coq9</i> ^{Q95X}	$5.47 \pm 1.14^*$
<i>Coq9</i> ^{R239X}	$21.44 \pm 6.8^{**,\#\#}$

Tabla R1. La administración de ciclohexamida (CH) inhibe el NMD en MEFs de ratones *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X}. Los resultados están expresados como el aumento proporcional de los niveles del ARN mensajero de *Coq9* tras la administración de CH. Todos los valores está representados como la media \pm DE de cinco experimentos en triplicado por grupo experimental. Prueba de ANOVA de una vía con un test post hoc de Tukey. *P < 0,05; **P < 0,01; Ratones *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X} versus ratones *Coq9*^{+/+}. $\#\#$ P < 0,01; Ratones *Coq9*^{Q95X} versus *Coq9*^{R239X}. Prueba de ANOVA de una vía para comparar los 3 grupos experimentales. P = 0,0022.

En cerebro y músculo esquelético, los niveles de la proteína ADCK3 no estaban alterados en el modelo de ratón *Coq9*^{Q95X} y sí estaban significativamente disminuidos en el ratón *Coq9*^{R239X} en comparación con el ratón *Coq9*^{+/+} (55 ± 19 y $51 \pm 3\%$) (**Figura R7 B y Figura R8 F**). Por el contrario, en riñones, los niveles de ADCK3 y COQ6 se encontraban significativamente incrementados en el ratón *Coq9*^{Q95X} (162 ± 18 y $179 \pm 20\%$) comparados con el control wild-type y reducidos en el ratón *Coq9*^{R239X} al compararlos con el ratón *Coq9*^{Q95X} ($43 \pm 17\%$ para ADCK3 y $31 \pm 9\%$ para COQ6) (**Figura R8 B y D**). Además, el músculo esquelético del modelo

Resultados

de ratón *Coq9*^{Q95X} también mostró una reducción significativa de los niveles de COQ6 en comparación con el ratón *Coq9*^{+/+} (45 ± 5%) (**Figura R8 H**).

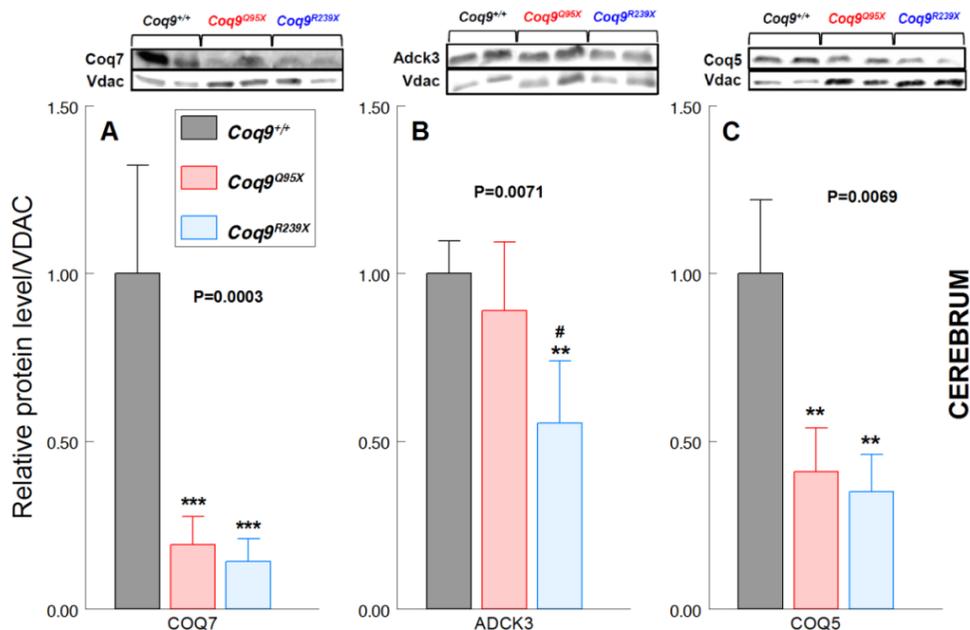


Figura R7. Niveles de las proteínas que intervienen en la biosíntesis de CoQ en cerebro.(A-C) Western blot representativo y cuantificación por densitometría de las bandas de Western blot de las proteínas COQ7 (A), ADCK3 (B) y COQ5 (C) y VDAC1 como control de carga en cerebro de ratones *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X} a 3 meses de edad. **P < 0,01; ***P < 0,001; Ratones *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X} versus ratones *Coq9*^{+/+}. #P < 0,05; Ratones *Coq9*^{Q95X} versus *Coq9*^{R239X}. Todos los valores está representados como la media ± DE. Prueba de ANOVA de una vía con un test post hoc de Tukey. Los números encima de las barras indican los valores de P obtenidos con la prueba de ANOVA (n=4 para *Coq9*^{+/+}); (n=5 para *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X}). P = p-valor.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el modelo de ratón *Coq9*^{R239X}, los fibroblastos del paciente deficiente en CoQ con la mutación homóloga a R239X (COQ9^{R244X}) mostraron también una reducción significativa en los niveles de las proteínas COQ9, COQ7, ADCK3 y COQ5 (**Figura R9 A-D**).

Resultados

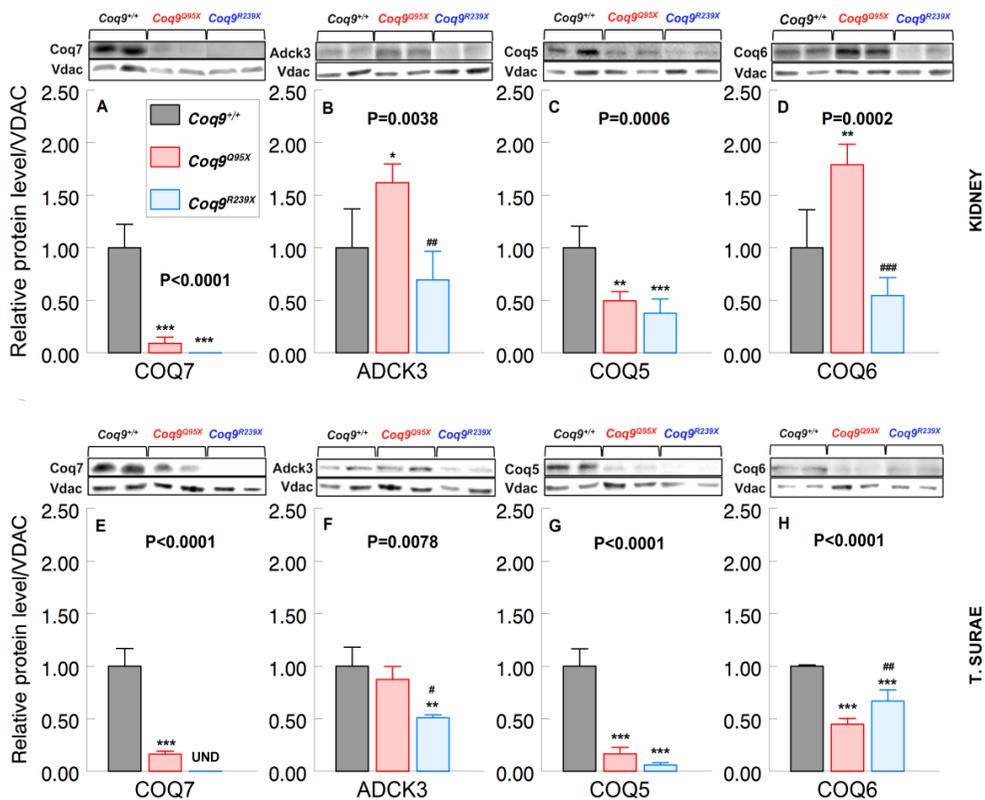


Figura R8. Niveles de las proteínas que intervienen en la biosíntesis de CoQ. (A-D) Western blot representativo y cuantificación por densitometría de las bandas de Western blot de las proteínas COQ7 (A), ADCK3 (B), COQ5 (C) y COQ6 (D), y VDAC1 como control de carga en riñones de ratones *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X} a 3 meses de edad. *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; Ratones *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X} versus ratones *Coq9*^{+/+}. ##P < 0,01; ###P < 0,001; Ratones *Coq9*^{Q95X} versus *Coq9*^{R239X}. (E-H) Western blot representativo y cuantificación por densitometría de las bandas de Western blot de las proteínas COQ7 (A), ADCK3 (B), COQ5 (C) y COQ6 (D), y VDAC1 como control de carga en músculo esquelético de ratones *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X} a 3 meses de edad. **P < 0,01; ***P < 0,001; Ratones *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X} versus ratones *Coq9*^{+/+}. #P < 0,05; ###P < 0,01; Ratones *Coq9*^{Q95X} versus *Coq9*^{R239X}. Todos los valores está representados como la media ± DE. Prueba de ANOVA de una vía con un test post hoc de Tukey. Los números encima de las barras indican los valores de P obtenidos con la prueba de ANOVA (n=4 para *Coq9*^{+/+}); (n=5 para *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X}).

Resultados

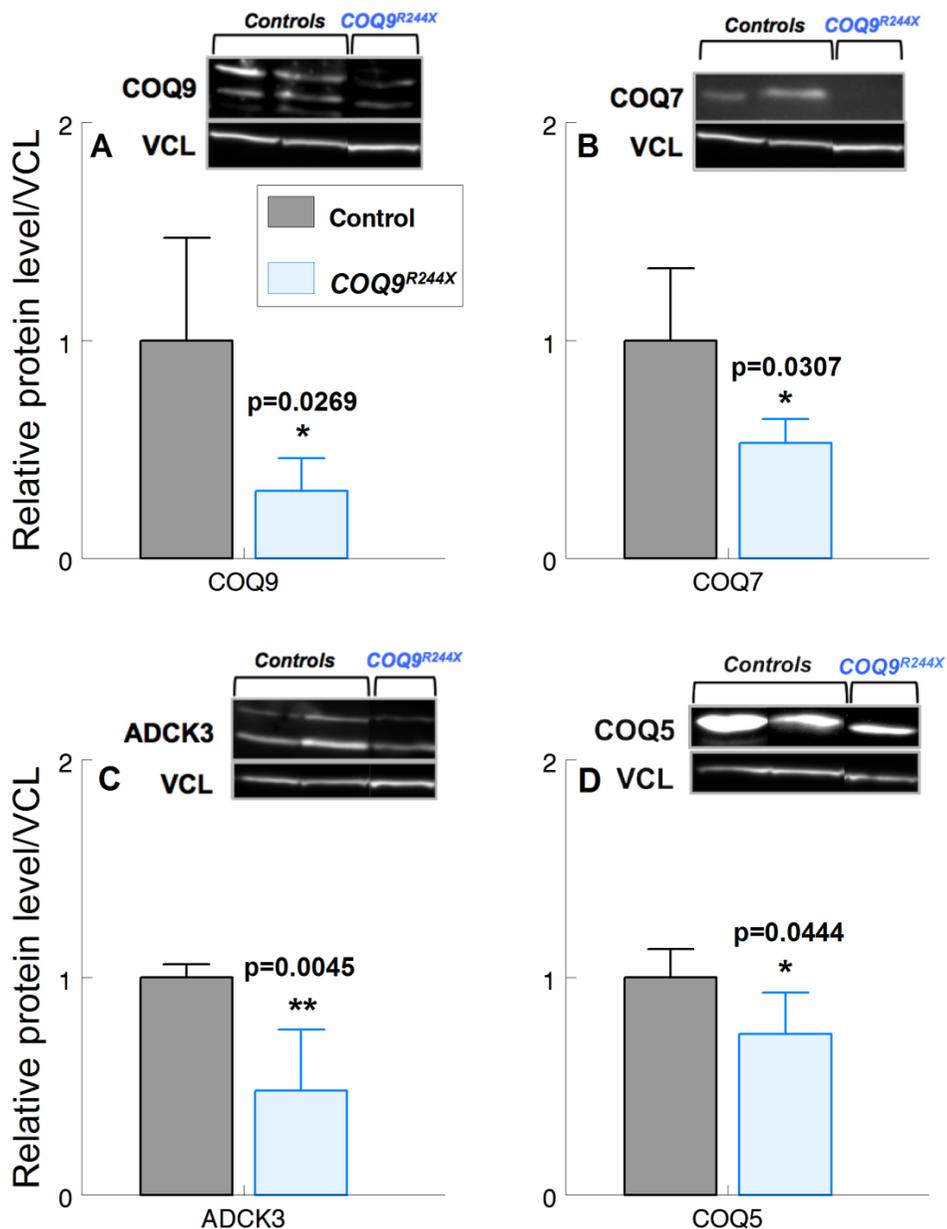


Figura R9. Reducción de los niveles de las proteínas que intervienen en la biosíntesis de CoQ en fibroblastos del paciente deficiente en CoQ *COQ9^{R244X}* (A-C) Western blot representativo y cuantificación por densitometría de las bandas de Western blot de las proteínas COQ9 (A), COQ7 (B), ADCK3 (C) y COQ5 (D) y Vinculina como control de carga en fibroblastos del paciente *COQ9^{R244X}*. *P < 0,05; **P < 0,01; Controles (n=3) versus fibroblastos del paciente *COQ9^{R244X}* (n=1). Prueba *t* de Student. *P* = p-valor.

Resultados

3. LA DEFICIENCIA MODERADA EN CoQ EN EL MODELO DE RATÓN *Coq9^{Q95X}* PRODUCE UN DEFECTO EN LA FUNCIÓN BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL.

Para saber si existía una correlación directa entre la deficiencia de CoQ en los diferentes tejidos y el defecto bioenergético, evaluamos los niveles de CoQ así como la función respiratoria mitocondrial en mitocondrias aisladas de cerebro, riñones y músculo esquelético de los ratones *Coq9^{Q95X}* y *Coq9^{+/+}* de 6 meses de edad. Los niveles mitocondriales de CoQ estaban significativamente disminuidos en cerebro, riñones y músculo esquelético del ratón *Coq9^{Q95X}* comparado con el ratón *Coq9^{+/+}* (**Figura R10 A-C**). Esta reducción de los niveles de CoQ a nivel mitocondrial se correspondía proporcionalmente con la obtenida previamente en los homogenados tisulares.

La actividad de los complejos respiratorios dependientes de CoQ, I+III, estaba significativamente reducida en riñones y músculo esquelético de hembras *Coq9^{Q95X}*, mientras que no se observaron diferencias en los mutantes machos en comparación con sus respectivos controles wild-type (**Figura R10 D-F**). Contrario a esto, la actividad de los complejos respiratorios dependientes de CoQ II+III, no estaba afectada ni en hembras ni en machos *Coq9^{Q95X}* y ambos presentaban valores similares a los del ratón control (**Figura R10 G-I**). Estos resultados estarían relacionados con los niveles de CoQ ya que la reducción de la actividad de los complejos respiratorios I+III y II+III es más pronunciada en el modelo de ratón *Coq9^{R239X}*, cuya deficiencia en CoQ es más severa (García-Corzo et al., 2013).

El análisis de electroforesis en geles nativos (BNGE) e inmunodetección con el anticuerpo anti-core I (subunidad del complejo III)

Resultados

mostró que la relación existente entre la cantidad de complejo III libre respecto al que forma SC era similar en cerebro, riñones y músculo esquelético de los ratones *Coq9^{Q95X}* y *Coq9^{+/+}* (Figura R10 J-L). Estos resultados difieren de los obtenidos con anterioridad en el modelo de ratón *Coq9^{R239X}*, en donde se detectó un incremento de la cantidad de complejo III libre en cerebro (Garcia-Corzo et al., 2013).

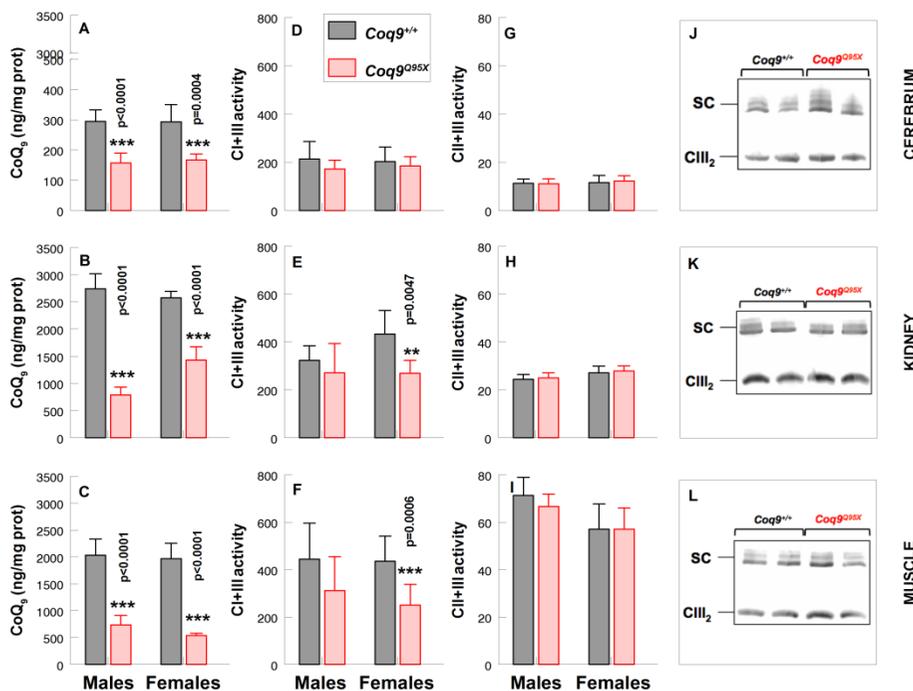


Figura R10. La deficiencia moderada en CoQ en el modelo de ratón *Coq9^{Q95X}* provoca un defecto en la función bioenergética mitocondrial. (A-C) Niveles mitocondriales de CoQ₉ en cerebro (A), riñones (B) y músculo esquelético (C) de ratones machos y hembras *Coq9^{+/+}* y *Coq9^{Q95X}*. n=8 para cada grupo. (D-F) Actividad mitocondrial de los complejos I+III en cerebro (D), riñones (E) y músculo esquelético (F) de ratones machos y hembras *Coq9^{+/+}* y *Coq9^{Q95X}*. n=6 para cada grupo. (G-I) Actividad mitocondrial de los complejos II+III en cerebro (G), riñones (H) y músculo esquelético (I) de ratones machos y hembras *Coq9^{+/+}* y *Coq9^{Q95X}*. n=6 para cada grupo. (J-L) “Blue-native” gel electrophoresis (BNGE) e inmunodetección del CIII asociado a supercomplejo (SC) mitocondrial en ratones *Coq9^{+/+}* (n=3) y *Coq9^{Q95X}* (n=4) de 3 meses de edad. Los datos (A-I) están expresados como la media ± DE. El análisis estadístico se hizo entre los ratones machos *Coq9^{+/+}* versus ratones machos *Coq9^{Q95X}* y entre los ratones hembras *Coq9^{+/+}* versus ratones hembras *Coq9^{Q95X}*. **P < 0,01; ***P < 0,001. Prueba *t* de Student. CI+CIII, NADH-citocromo c reductasa; complejo II+III, SDH-citocromo c reductasa.

Resultados

El defecto bioenergético en riñones y músculo esquelético en el ratón *Coq9^{Q95X}* se confirmó también con la medida del consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas usando XF^c24 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience). En riñones, la respiración mitocondrial (Estado 3o, en presencia de ADP y sustratos) estaba significativamente reducida en hembras *Coq9^{Q95X}* ($82 \pm 6\%$), y en hembras y machos *Coq9^{R239X}* (56 ± 13 y $57 \pm 1\%$, respectivamente) en comparación con los controles wild type (**Figura R11 A y B y Figura R12 A**). En músculo esquelético, el estado 3o estaba significativamente reducido en hembras y machos de ratones *Coq9^{Q95X}* ($62 \pm 7\%$ en machos y $73 \pm 6\%$ en hembras) y de ratones *Coq9^{R239X}* ($58 \pm 10\%$ en machos y $44 \pm 4\%$ en hembras) (**Figura R11 C y D y Figura R12 B**). En ambos modelos mutantes, *Coq9^{Q95X}* y *Coq9^{R239X}*, la disminución de la respiración estimulada por ADP (Estado 3) fue mayor en músculo esquelético que en riñones (**Figura R11 A y C**). Resultados similares fueron obtenidos también en otros estados respiratorios, como por ejemplo, respiración basal (Estado 2), respiración residual (Estado 4, tras la adición de oligomicina) y máxima capacidad respiratoria (Estado 3u, después de la adición de FCCP) (**Figura R13 A-F y R12 A-B y Figura R11 B y D**).

Resultados

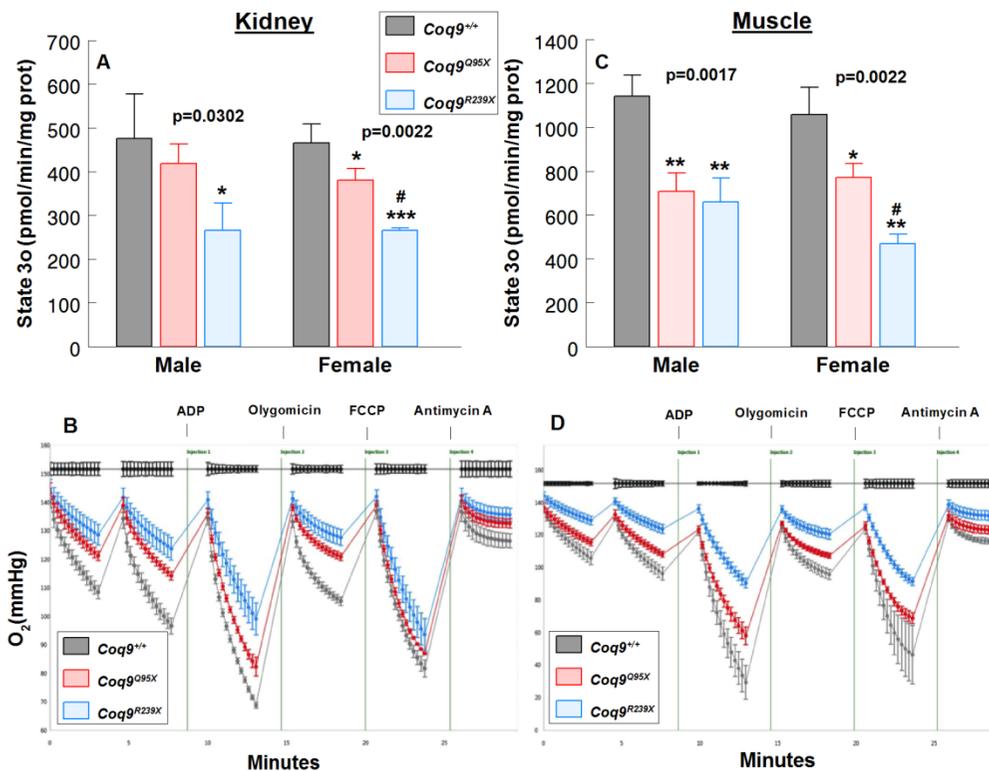
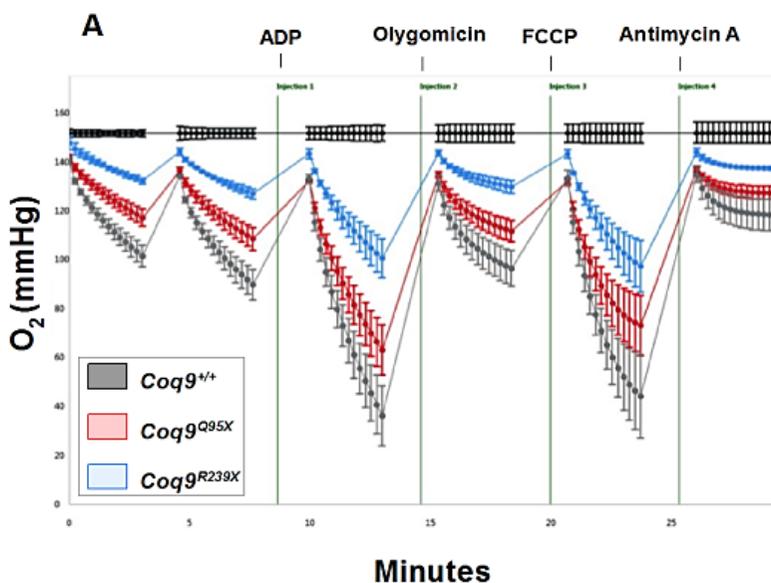


Figura R11. Respiración mitocondrial de los ratones $Coq9^{+/+}$, $Coq9^{Q95X}$ y $Coq9^{R239X}$. (A-D) Medida de la respiración mitocondrial (se representa el estado 3o, en presencia de ADP y sustratos) en riñones (A) y músculo esquelético (C) de machos y hembras $Coq9^{+/+}$, $Coq9^{Q95X}$ y $Coq9^{R239X}$ a 3 meses de edad. Gráfico representativo del consumo de oxígeno en riñones (B) y músculo esquelético (D) de hembras $Coq9^{+/+}$, $Coq9^{Q95X}$ y $Coq9^{R239X}$. Todos los valores está representados como la media \pm DE. (A, C) *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; Ratones $Coq9^{Q95X}$ y $Coq9^{R239X}$ versus ratones $Coq9^{+/+}$. #P < 0,05; Ratones $Coq9^{Q95X}$ versus $Coq9^{R239X}$.

Prueba de ANOVA de una vía con un test post hoc de Tukey. Los números encima de las barras indican los valores de P obtenidos con la prueba de ANOVA (n=3 para cada grupo).

Resultados

Kidney



Muscle

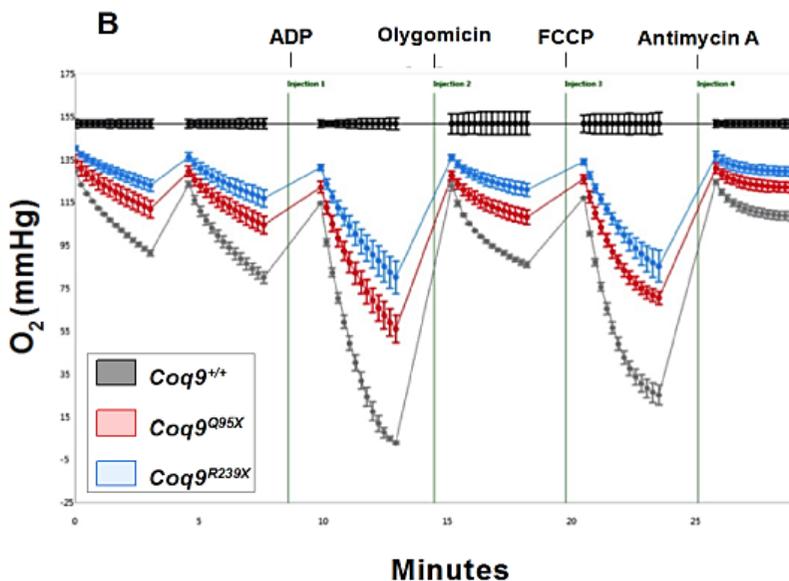


Figura R12. Consumo de oxígeno (O₂) en mitocondrias aisladas de los ratones machos *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X}. (A-B) Gráfico representativo del consumo de oxígeno en riñones (A) y músculo esquelético (B) de machos *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X}.

Resultados

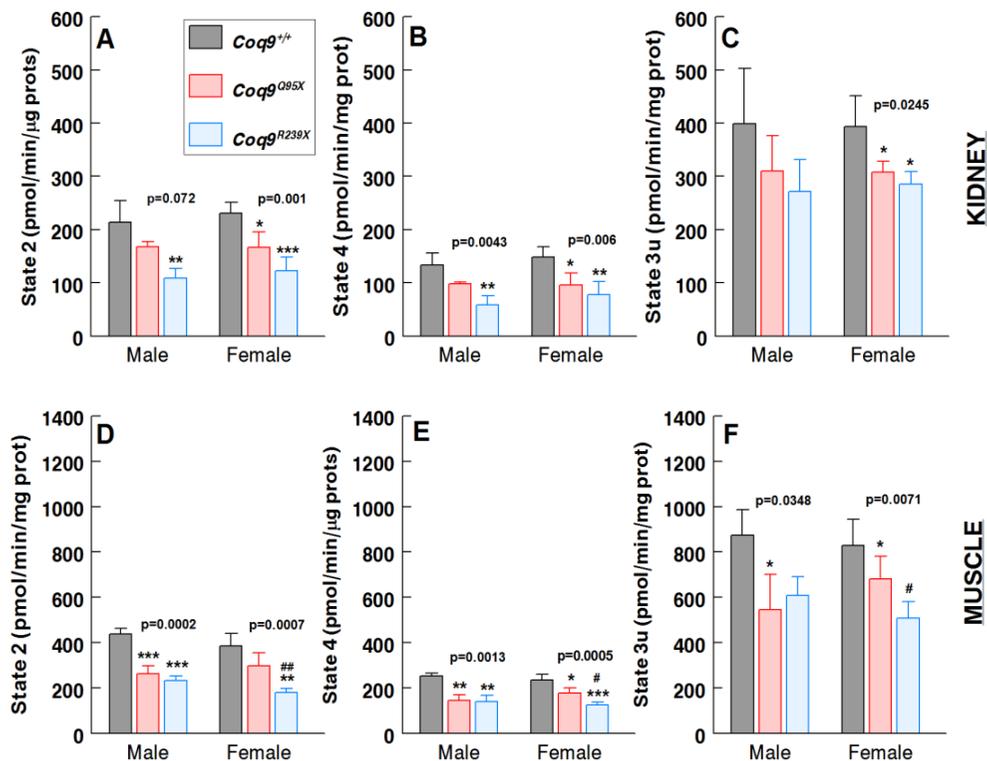


Figura R13. Otros estados respiratorios mitocondriales de los ratones *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X} (A-C) Respiración mitocondrial basal (Estado 2) (A), respiración residual (Estado 4 tras la adición de oligomicina) (B) y máxima capacidad respiratoria (Estado 3u, después de la adición de FCCP) (C) de riñones de machos y hembras *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X} a 3 meses de edad. (D-F) Respiración mitocondrial basal (Estado 2) (D), respiración residual (Estado 4 tras la adición de oligomicina) (E) y máxima capacidad respiratoria (Estado 3u, después de la adición de FCCP) (F) de músculo esquelético de machos y hembras *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X} a 3 meses de edad. Todos los valores está representados como la media ± DE. (A, C) *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; Ratones *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X} versus ratones *Coq9*^{+/+}. #P < 0,05; ##P < 0,01; Ratones *Coq9*^{Q95X} versus *Coq9*^{R239X}. Prueba de ANOVA de una vía con un test post hoc de Tukey. Los números encima de las barras indican los valores de P obtenidos con la prueba de ANOVA (n=3 para cada grupo).

Resultados

4. EVALUACIÓN HISTOLÓGICA E HISTOQUÍMICA DEL RATÓN *Coq9^{Q95X}*.

Para evaluar si la deficiencia moderada en CoQ así como el defecto bioenergético mitocondrial podrían provocar cambios estructurales a nivel tisular, realizamos un estudio histopatológico e histoquímico de diferentes secciones de cerebro, riñones y músculo esquelético a diferentes edades del ratón *Coq9^{Q95X}* y los comparamos con su control homólogo *Coq9^{+/+}* de igual sexo y edad.

La tinción de hematoxilina-eosina (H&E) y Luxol fast blue (LFB) de cerebro, no mostró ninguna anormalidad morfológica a 3 meses de edad (**Figura R14 A-D**). Asimismo, la tinción del ácido periódico de Schiff (PAS) tampoco reveló ninguna acumulación de glucógeno y/o glucolípidos en los riñones a 3, 6 y 18 meses de edad (**Figura R14 E y F y R15 A-H**). Estos resultados junto con los valores normales de albúmina y urea obtenidos en orina (**Tabla R2**), sugieren que el ratón *Coq9^{Q95X}* no desarrolla síndrome nefrótico asociado a la deficiencia en CoQ.

El estudio del músculo *triceps surae*, mostró fibras musculares redondeadas con centralización del núcleo en sólo una muestra de una hembra *Coq9^{Q95X}* (una de las seis analizadas) (**Figura R14 G-J**). Para verificar si esto se trataba de un hecho aislado o era un signo de una patología muscular, realizamos un análisis histoquímico del *triceps surae* en ratones wild-type y mutantes homocigotos a 3, 6, 12 y 18 meses de edad. En los ratones *Coq9^{Q95X}* más jóvenes (3-12 meses de edad), no se encontraron diferencias en la actividad de la citocromo oxidasa (COX) y de la succinato deshidrogenasa (SDH) en comparación con los ratones *Coq9^{+/+}* de igual edad (**Figura R16 A, B, E y F, y Figura R17 A- H**). No obstante, a los 18 meses

Resultados

de edad, las hembras *Coq9*^{Q95X} mostraron un incremento del número de fibras COX y SDH negativas (**Figura R16 C, D, G y H**), lo que sugiere una transformación en el tipo de fibra muscular, dándose un cambio de fibras tipo I (de contracción lenta) a fibras tipo II (de contracción rápida). Con la tinción tricrómica de Gomori modificada no se observó signos de proliferación mitocondrial ni fibras rojas rasgadas (RRF) (**Figura R16 I-L y Figura R17 I-L**). Tampoco se detectó cambios en la estructura y morfología en general mediante la tinción rutinaria de H&E (**Figura R16 M-P y Figura R17 M-P**).

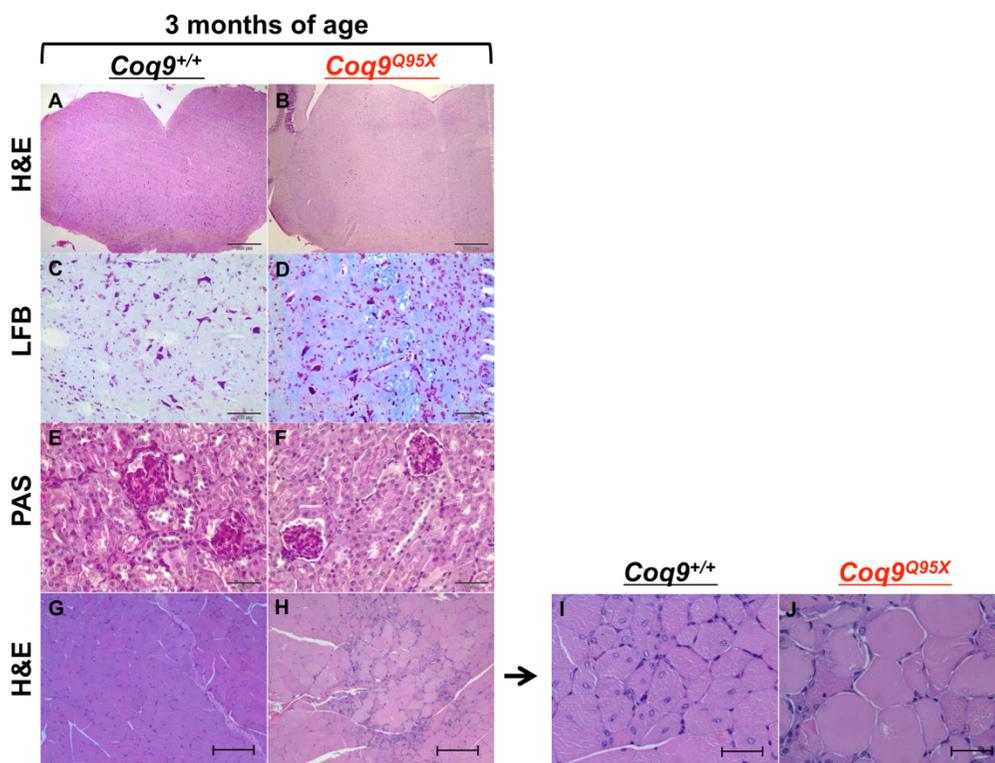


Figura R14. Tinción histológica de cerebro, riñones y músculo esquelético de los ratones *Coq9*^{+/+} y *Coq9*^{Q95X} a 3 meses de edad. (A-D) Tinción de H&E (A-B) and LFB (C-D) de cerebro en donde no hay diferencias entre los ratones *Coq9*^{+/+} y *Coq9*^{Q95X} (n=3 para cada grupo). Barra de escala: 100 μ m. **(E-F)** La tinción de PAS en riñones no revela alteraciones histológicas entre los ratones *Coq9*^{+/+} y *Coq9*^{Q95X} (n=3 para cada grupo). Barra de escala: 50 μ m. **(G-J)** Tinción de H&E de músculo esquelético. Sólo una hembra de ratón *Coq9*^{Q95X} (n=6) mostró fibras musculares redondeadas con centralización del núcleo **(H-J)**. Barra de escala: 200 μ m **(G-H)** y 50 μ m **(I-J)**. H&E, Hematoxilina-eosina; LFB, Luxol fast blue; PAS, Periódico de Schiff.

Resultados

El estudio inmunohistoquímico con el anticuerpo primario de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) no mostró cambios en la distribución y número de astrocitos en el diencéfalo (**Figura R18 A, B, E y F**) y puente (**Figura R18 I, J, M y N**) de los ratones *Coq9^{Q95X}* de 12 meses de edad. A los 18 meses de edad, se produjo un incremento generalizado de la proliferación astrocítica sin que se apreciara diferencias entre los controles wild-type y los ratones mutantes (**Figura R18 C, D, G, H, K, L, O y P**). Finalmente, el análisis histológico del corazón a los 12 y 18 meses de edad no reveló ninguna anomalía anatomopatológica (**Figura R19 I-P**).

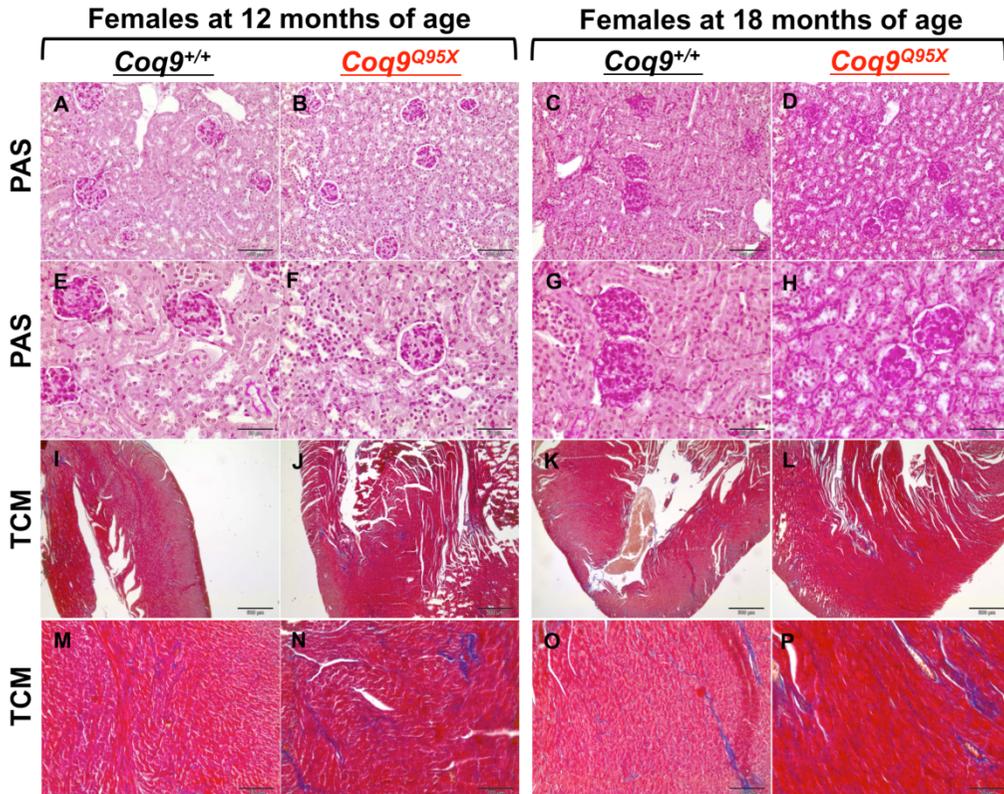


Figura R15. Evaluación histológica de riñones y corazón de los ratones *Coq9^{+/+}* y *Coq9^{Q95X}* a 12 y 18 meses de edad. (A-H) Tinción PAS en riñones de ratones *Coq9^{+/+}* y *Coq9^{Q95X}* a 12 y 18 meses de edad. (I-P) Tinción TCM en corazón de ratones *Coq9^{+/+}* y *Coq9^{Q95X}* a 12 y 18 meses de edad.

n = 3 para cada grupo. PAS, Periódico de Schiff; TCM, tinción tricrómica de Masson.

Resultados

Age	Mice Genotype	Urea	Creatinine	Albumin
3 mo.	<i>Coq9</i> ^{+/+}	3,8 ± 2,5	49,2 ± 14,4	0,08 ± 0,05
	<i>Coq9</i> ^{Q95X}	3,6 ± 0,3	35,8 ± 14,5	0,08 ± 0,04

Tabla R2. Niveles de metabolitos (mg/dl) en la orina. Los datos son expresados como la media ±DE.

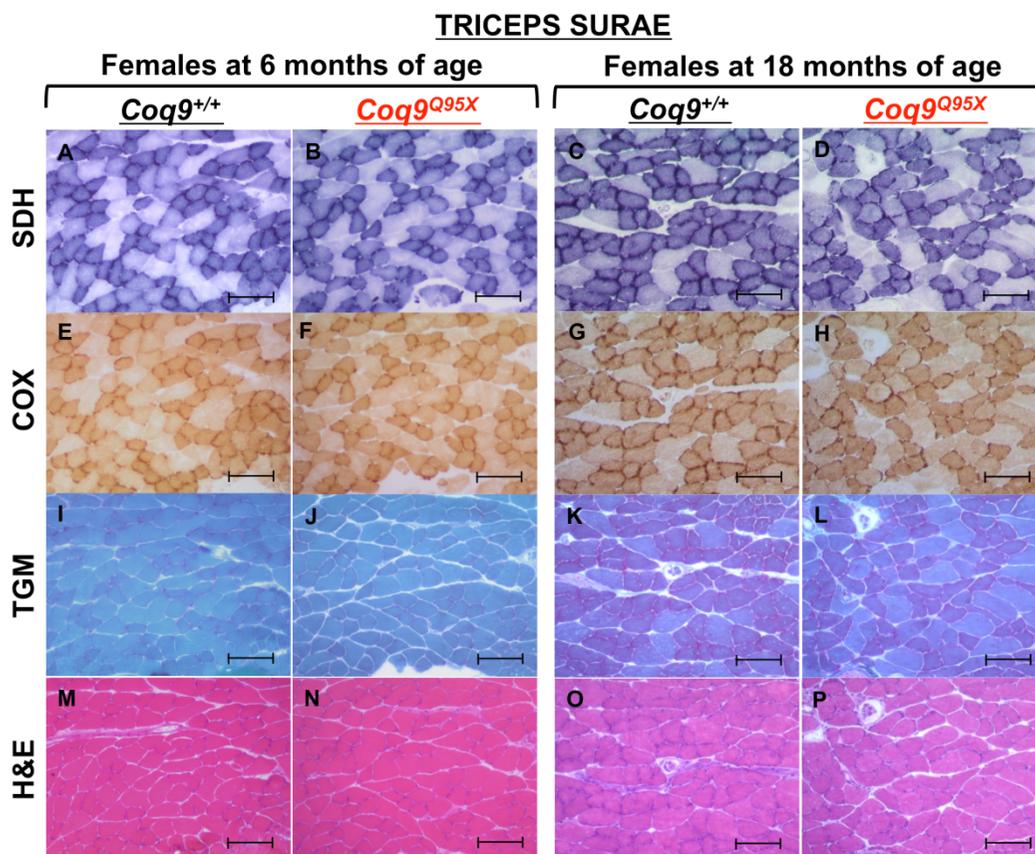


Figura R16. Histopatología de músculo esquelético de ratones hembras *Coq9*^{+/+} y *Coq9*^{Q95X} a 6 y 18 meses de edad. (A-H) Histoquímica del complejo II (SDH) y complejo IV (COX) mitocondrial en *triceps surae*, en donde se observa una disminución de las fibras SDH y COX positivas en hembras *Coq9*^{Q95X} de 18 meses de edad (D, H) en comparación con sus homólogos hembras *Coq9*^{+/+} de la misma edad (C-G). A los 6 meses de edad, no se observan diferencias en la actividad SDH y COX entre hembras *Coq9*^{+/+} y *Coq9*^{Q95X} (A-B, E-F). (I-L) Tinción tricrómica de Gomori modificada (TGM) en *triceps surae* en donde no se observan diferencias entre ratones hembras *Coq9*^{+/+} y *Coq9*^{Q95X} ni a los 6 y ni a los 18 meses de edad. (M-P) Tinción de hematoxilina-eosina (H&E) en *triceps surae* en donde no hay evidencias de ninguna anomalía anatomopatológica.

Barra de escala: 100 µm. n = 3 para cada grupo. Complejo IV, citocromo c oxidasa (COX); complejo II, succinato dehidrogenasa (SDH).

Resultados

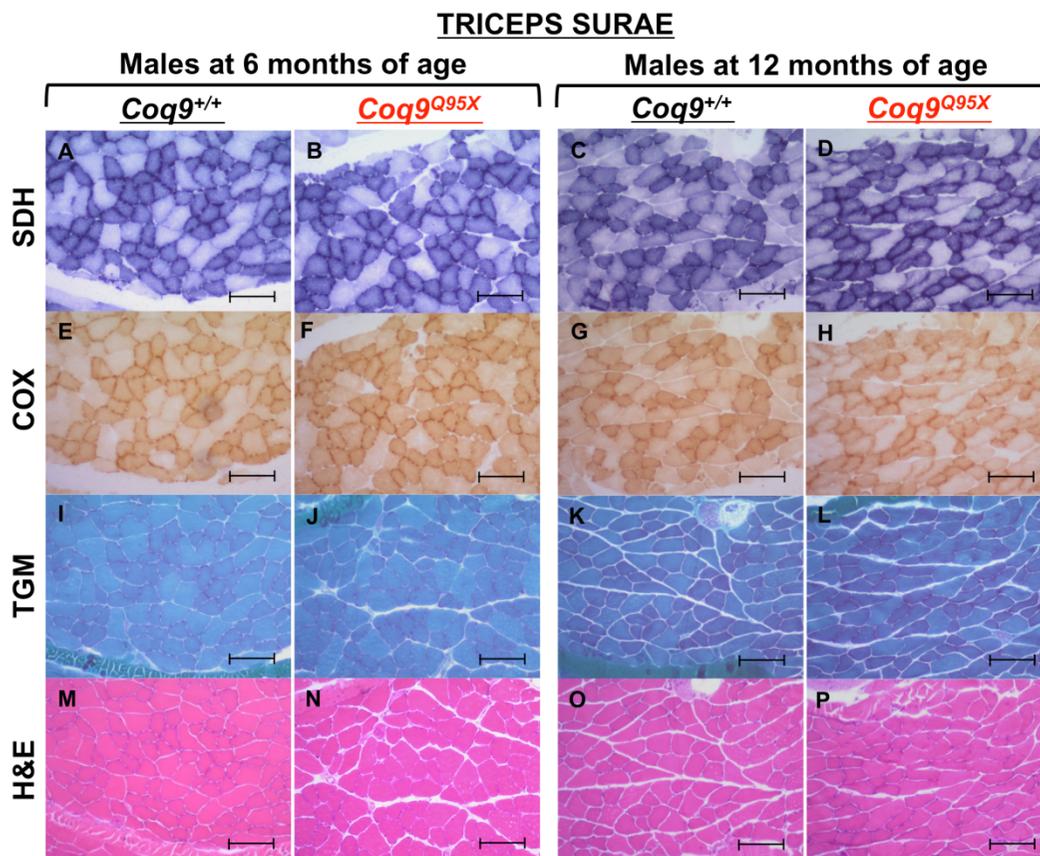


Figura R17. Histopatología de músculo esquelético de ratones machos *Coq9^{+/+}* y *Coq9^{Q95X}* a 6 y 12 meses de edad. (A-H) Histoquímica del complejo II (SDH) y complejo IV (COX) mitocondrial en *triceps surae*, en donde se muestra que la actividad SDH (A-D) y COX (E-H) es normal en ratones machos *Coq9^{+/+}* y *Coq9^{Q95X}* a 6 y 12 meses de edad. (I-L) Tinción tricrómica de Gomori modificada (TGM) en *triceps surae* en donde no se observan diferencias entre ratones machos *Coq9^{+/+}* y *Coq9^{Q95X}* ni a los 6 y ni a los 12 meses de edad. (M-P) Tinción de hematoxilina-eosina (H&E) en *triceps surae* en donde no hay signos de ninguna alteración estructural. Barra de escala: 100 μ m. n = 3 para cada grupo. Complejo IV, citocromo c oxidasa (COX); complejo II, succinato dehidrogenasa (SDH).

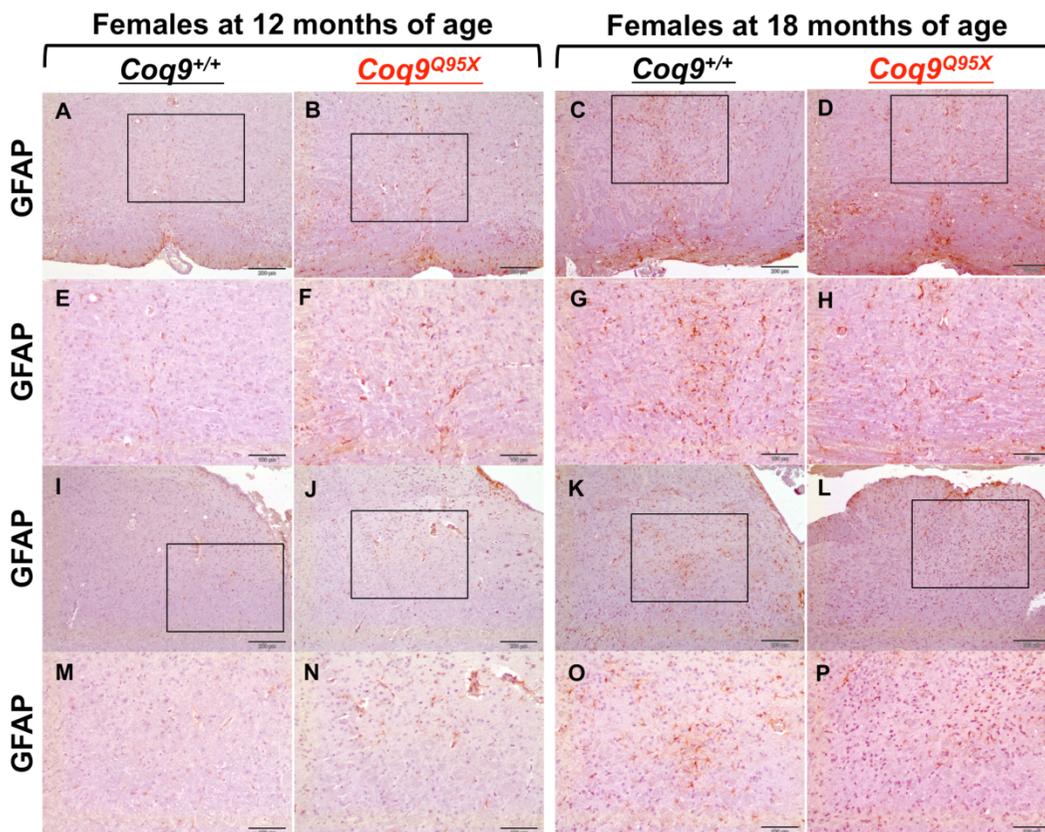


Figura R18. Inmunohistoquímica de diencefalo y tronco encefálico de ratones $Coq9^{+/+}$ y $Coq9^{Q95X}$ a 12 y 18 meses de edad. (A-P) Tinción con el anticuerpo primario de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) de diencefalo (A-H) y tronco encefálico (I-P) de ratones $Coq9^{+/+}$ y $Coq9^{Q95X}$ a 12 y 18 meses de edad. A los 18 meses de edad, se observa incremento generalizado de la proliferación astrocítica tanto en ratones $Coq9^{+/+}$ como $Coq9^{Q95X}$ (n=3 para cada grupo).

Resultados

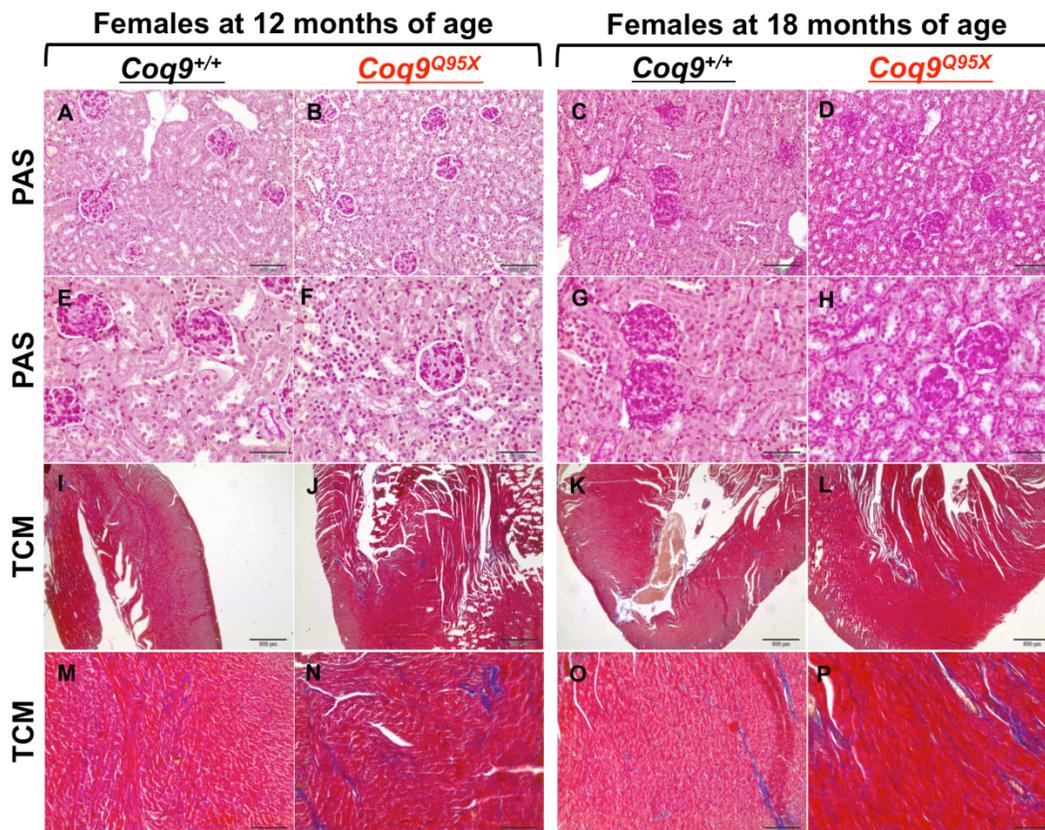


Figura R19. Evaluación histológica de riñones y corazón de los ratones *Coq9*^{+/+} y *Coq9*^{Q95X} a 12 y 18 meses de edad. (A-H) Tinción PAS en riñones de ratones *Coq9*^{+/+} y *Coq9*^{Q95X} a 12 y 18 meses de edad. (I-P) Tinción TCM en corazón de ratones *Coq9*^{+/+} y *Coq9*^{Q95X} a 12 y 18 meses de edad. n = 3 para cada grupo. PAS, Periódico de Schiff; TCM, tinción tricrómica de Masson.

5. LAS HEMBRAS *Coq9^{Q95X}* DESARROLLAN UN FENOTIPO MIOPÁTICO LEVE CON INTOLERANCIA AL EJERCICIO.

Dado que el músculo esquelético era el tejido que presentaba mayores evidencias patológicas en los ratones *Coq9^{Q95X}* homocigotos, decidimos evaluar la actividad locomotora y la fuerza muscular a los 6 meses de edad.

En comparación con los controles del mismo sexo wild-type, las hembras *Coq9^{Q95X}* mostraron una reducción significativa en la velocidad media y actividad voluntaria realizada en la rueda de ejercicio, mientras que no se observaron diferencias entre los machos controles y mutantes (**Figura R20 A-C**). Este descenso en la actividad voluntaria obtenido en la rueda se corroboró también con el test “Open Field” en donde la distancia recorrida por las hembras *Coq9^{Q95X}* fue también menor (**Figura R20 E**). Del mismo modo, en la prueba del alambre “hanging wire test”, el número de alcances obtenidos por las hembras mutantes homocigotas fue inferior al obtenido por sus homólogos wild-type (**Figura R20 D**). No obstante, la fuerza muscular de las extremidades anteriores no estaba afectada (**Figura R20 F**). En cuanto a la supervivencia, no se obtuvieron diferencias entre los ratones *Coq9^{Q95X}* y *Coq9^{+/+}*, siendo similar en ambos sexos.

Resultados

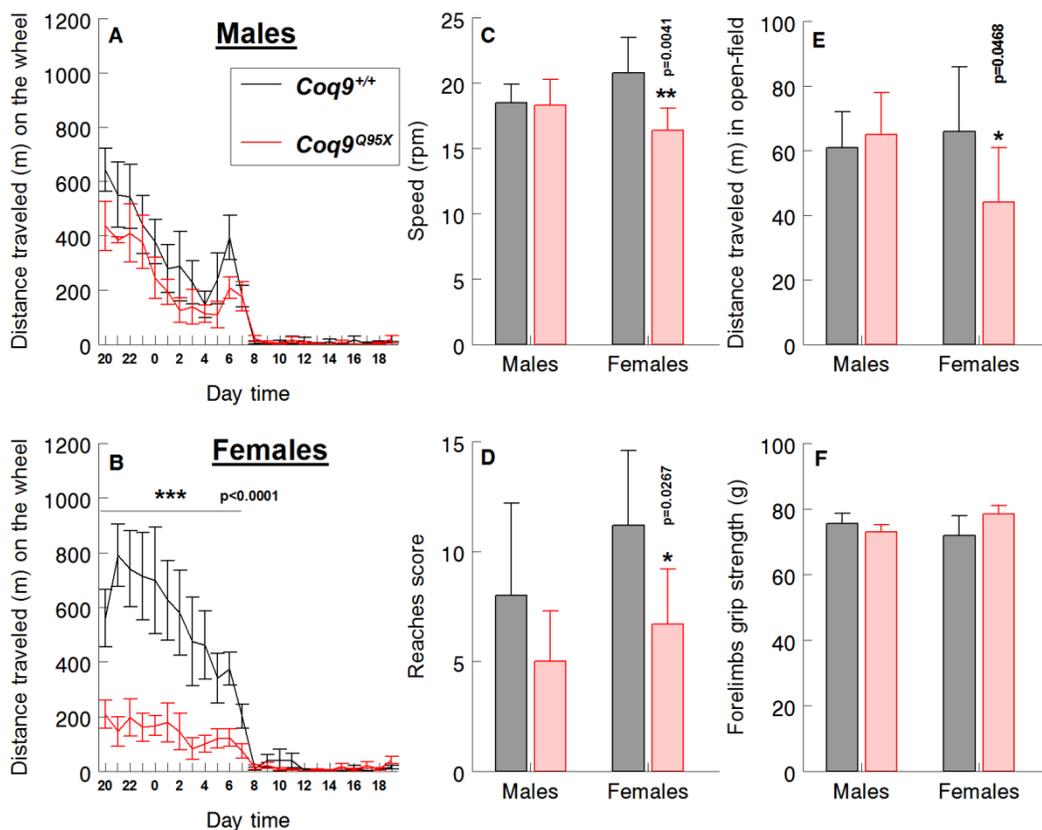


Figura R20. Las hembras *Coq9*^{Q95X} desarrollan una miopatía moderada con intolerancia al ejercicio. (A-C) Prueba de actividad voluntaria en la rueda de ejercicio. La distancia recorrida en la rueda de ejercicio así como la velocidad media durante el uso de la misma estaba disminuida en hembras *Coq9*^{Q95X} de 6 meses de edad (B, C). (D) Prueba del alambre “hanging wire test”. El número de alcances obtenidos por las hembras *Coq9*^{Q95X} fue inferior al obtenido por sus homólogos wild-type. (E) Test “Open field”. La distancia media recorrida fue menor en hembras *Coq9*^{Q95X} de 6 meses de edad. (F) Test de fuerza de agarre. La fuerza muscular de las extremidades anteriores de las hembras *Coq9*^{Q95X} de 6 meses de edad no estaba afectada.

Todos los valores está representados como la media ± DE. El análisis estadístico se hizo entre los ratones machos *Coq9*^{+/+} versus ratones machos *Coq9*^{Q95X} y entre los ratones hembras *Coq9*^{+/+} versus ratones hembras *Coq9*^{Q95X}. *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001. Prueba *t* de Student (n=8 para cada grupo).

6. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE 2,4-ÁCIDO DIHIDROXIBENZOICO (2,4-diHB).

Como prueba de concepto, también estudiamos si la estabilidad del complejo multiproteico podría afectar la eficacia de una posible terapia “bypass”. Con este propósito, tratamos a los ratones *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X} con una formulación oral hidrosoluble de 2,4-ácido dihidroxibenzoico (2,4-diHB), el cual había sido previamente probado como tratamiento bypass en levaduras (*S.cerevisae*) mutantes $\Delta coq7$ (Doimo et al., 2014; Xie et al., 2012). Tras un mes de tratamiento, los ratones *Coq9*^{+/+} y *Coq9*^{Q95X} mostraron una reducción en los niveles de CoQ₉ comparados con sus respectivos controles no tratados (**Figura R21 A y B y Figura R22 A-D**). Por el contrario, en los ratones *Coq9*^{R239X} tratados con 2,4-diHB, hubo un incremento significativo de los niveles de CoQ₉ (184±9.3%) en comparación con los ratones *Coq9*^{R239X} no tratados (**Figura R21 A y B y Figura R22 E y F**). Además, este incremento en los niveles de CoQ₉ en los ratones *Coq9*^{R239X} también se observó en los fibroblastos del paciente deficiente en CoQ con la mutación homóloga *COQ9*^{R244X} tratado con 2,4-diHB (175,8 ± 5,6%); mientras que, por el contrario, la biosíntesis de CoQ₁₀ fue inhibida en los fibroblastos control tratados con 2,4-diHB (**Figura R21 C y D y Figura R22 G y H**).

Curiosamente, en los cromatogramas de HPLC usados para cuantificar los niveles de CoQ, se observó la presencia de un pico anormal en los ratones *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X} tratados con 2,4-diHB. El tiempo de retención de este pico adicional era de 7,5 minutos. La identificación del lípido mediante espectrometría de masas mostró un pico de ión molecular de 767,634 [M + H]⁺ y 789,616 [M + Na]⁺ (**Figura R22 I**) y pudo por tanto ser

Resultados

identificado como Demetoxiubiquinona 9 en su forma reducida (DMQ₉H₂) (masa teórica [C₅₃H₈₂O₃]= 767.63422 [M + H]⁺ y 789.61616 [M + Na]⁺).

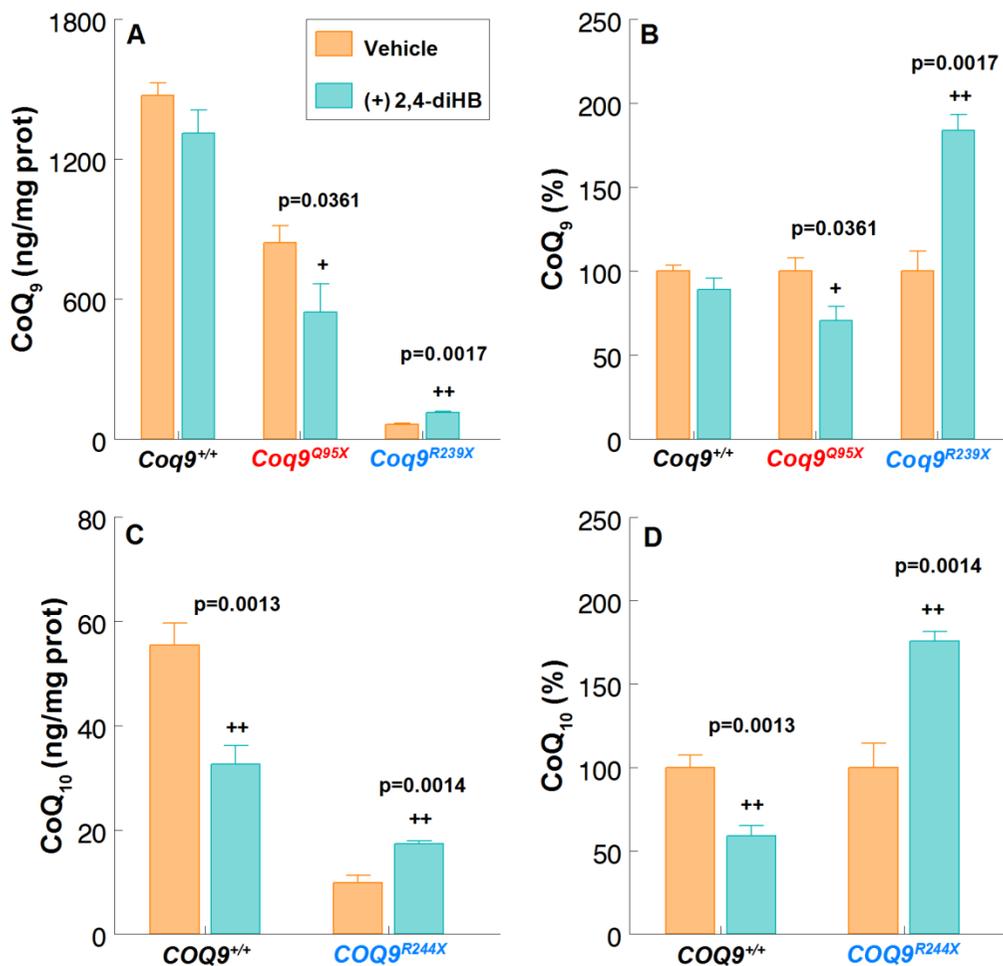


Figura R21. Efectos de la administración oral del ácido 2,4-dihidroxi benzoico (2,4-diHB) en ratones *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X} y fibroblastos del paciente *COQ9*^{R244X}. (A-B) Niveles de CoQ₉ en riñones de ratones *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X} tratados con 2,4-diHB (+2,4-diHB) comparados con sus respectivos controles no tratados (vehículo). El análisis estadístico se hizo entre los ratones +2,4-diHB *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X} versus vehículo *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X}, respectivamente (n=3 para cada grupo). (C-D) Niveles de CoQ₁₀ en fibroblastos del paciente *COQ9*^{R244X} tratados con 2,4-diHB (+2,4-diHB) comparados con sus respectivos controles no tratados (vehículo). El análisis estadístico se hizo entre +2,4-diHB *COQ9*^{R244X} versus vehículo *COQ9*^{R244X} (n=4 para cada grupo).

Resultados

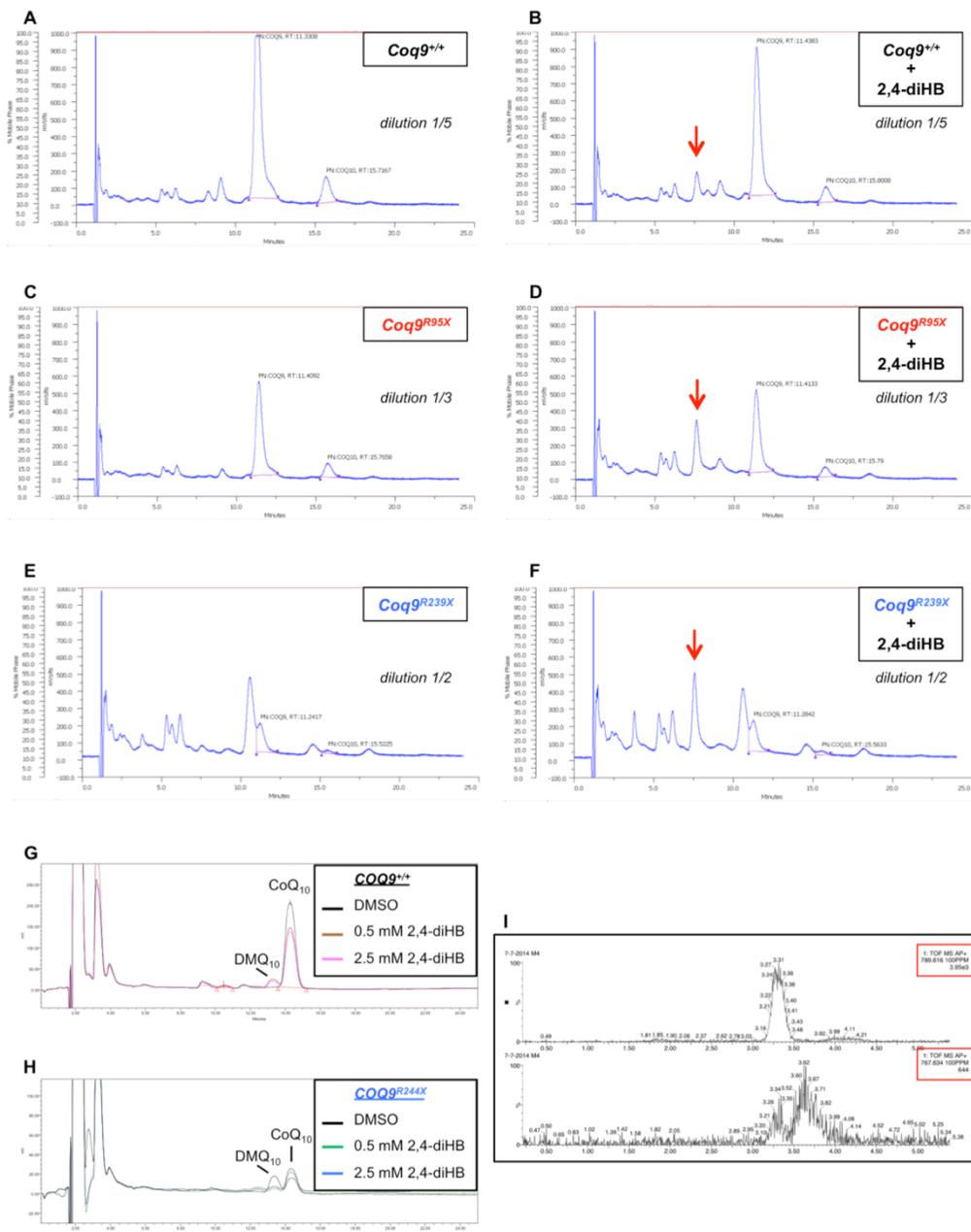


Figura R22. Identificación del pico anormal en ratones *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X} tratados con 2,4-diHB. (A-F) Cromatogramas de HPLC de ratones *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X} tratados con 2,4-diHB (+2,4-diHB) y no tratados (vehículo) en donde se detecta un pico adicional con tiempo de retención de 7.5 minutos en los ratones *Coq9*^{+/+}+2,4-diHB (B, D, F). **(G-H)** Cromatogramas de HPLC de fibroblastos del paciente *COQ9*^{R244X} tratados con 2,4-diHB (+2,4-diHB) y no tratados (vehículo). **(I)** Identificación del pico adicional mediante espectrometría de masas en donde se muestra que el ión molecular $[M + H]^+$ se corresponde con 767,634 $[M + H]^+$ y 789,616 $[M + Na]^+$.

Resultados

7. RELACIÓN ENTRE LA DEFICIENCIA PRIMARIA EN COENZIMA Q Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL DEL SULFURO DE HIDRÓGENO: PAPEL DE LA SULFURO QUINONA OXIDO-REDUCTASA (SQR).

7.1 DETERMINACIÓN DEL ESTADO FUNCIONAL DE ALGUNAS DE LAS ENZIMAS PARTICIPANTES EN LA RUTA MITOCONDRIAL DE OXIDACIÓN DEL SULFURO DE HIDRÓGENO.

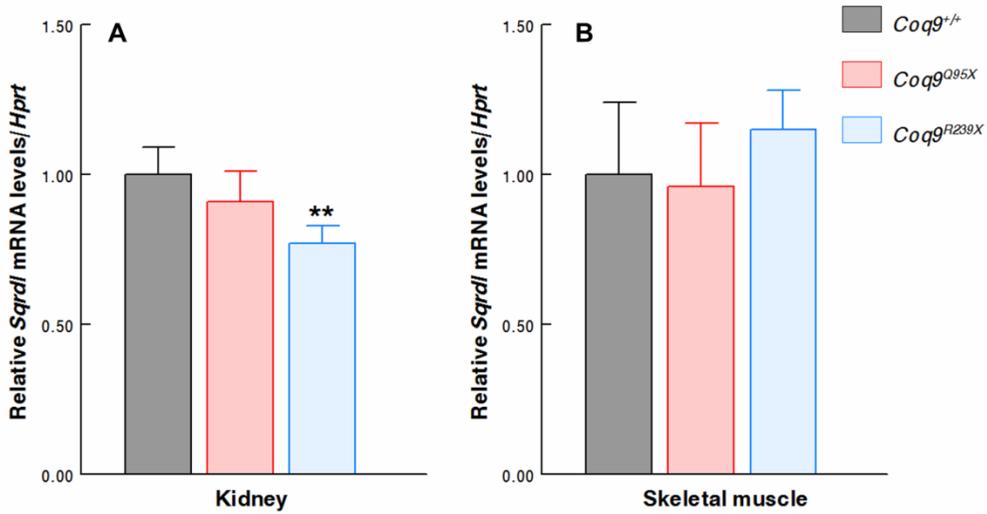
La enzima que cataliza el primer paso en la ruta de oxidación del sulfuro en la mitocondria es la SQR, la cual necesita la CoQ como aceptor de electrones indispensable para la reacción enzimática (Jackson et al., 2012). Así, para evaluar si la deficiencia primaria en CoQ afectaba al metabolismo del sulfuro de hidrógeno estudiamos, en un primer lugar, los niveles ARN mensajero y proteína SQR, así como la actividad de la misma en riñones y músculo esquelético de ratones *Coq9^{+/+}*, *Coq9^{Q95X}* y *Coq9^{R239X}* de la misma edad.

Los niveles de expresión del ARN mensajero de *Sqrdl* en riñón no mostraban variación en el modelo de ratón *Coq9^{Q95X}* en comparación con el ratón *Coq9^{+/+}* y se encontraban significativamente disminuidos en el ratón *Coq9^{R239X}* comparados con el ratón wild type *Coq9^{+/+}* ($77 \pm 6\%$) (**Figura R23 A**). En músculo esquelético, por el contrario, no se encontraron diferencias significativas entre los dos mutantes y el control (**Figura R23 B**).

Por otro lado, en riñón, los niveles de la proteína SQRDL no estaban alterados en el ratón *Coq9^{Q95X}* y sí estaban significativamente reducidos en el ratón *Coq9^{R239X}* en comparación con el ratón *Coq9^{+/+}* ($21 \pm 6\%$) (**Figura R24**

Resultados

A). Curiosamente, en músculo esquelético, los niveles de SQRDL obtenidos fueron significativamente menores en los dos homocigotos, *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X}, comparados con el control wild-type (39 ± 15 y $57 \pm 12\%$



respectivamente) (Figura R24 B).

Figura R23. Niveles de expresión de la *Sqrld*. (A-B) Niveles de expresión del ARN mensajero de *Sqrld* en riñón (A) y músculo esquelético (B) de ratones *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X} a 3 meses de edad. **P < 0,01. Ratones *Coq9*^{R239X} versus ratones *Coq9*^{+/+}. Todos los valores está representados como la media \pm DE. Prueba de ANOVA de una vía con un test post hoc de Tukey (n=5 para cada grupo).

En cuanto a la actividad de la SQRDL, el modelo de ratón *Coq9*^{Q95X} presentó una actividad significativamente menor en riñón comparado con su homólogo wild-type (dos veces menor) y fue prácticamente indetectable en el ratón *Coq9*^{R239X} (Figura R25 A). Algo similar ocurrió en músculo esquelético, en donde la actividad de la SQRDL en los dos modelos mutantes fue indetectable (Figura R25 B).

Resultados

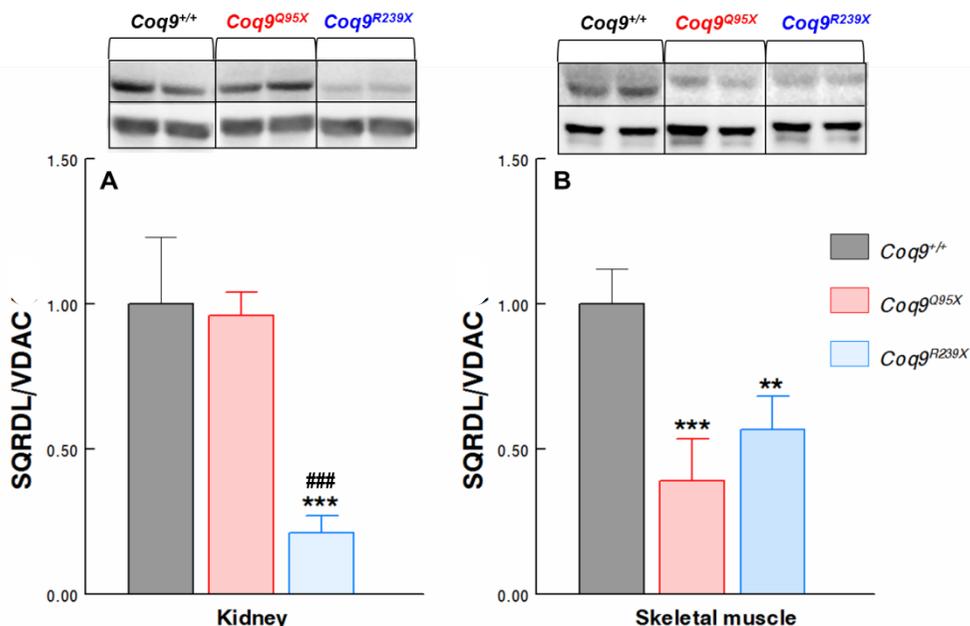


Figura R24. Niveles de la proteína SQRDL. (A-B) Western blot representativo y cuantificación por densitometría de las bandas de Western blot de la proteína SQRDL y VDAC1 como control de carga en riñones(A) y músculo esquelético (B) de ratones *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X} a 3 meses de edad. **P < 0,01; ***P < 0,001; Ratones *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X} versus ratones *Coq9*^{+/+}. ###P < 0,001 Ratones *Coq9*^{Q95X} versus *Coq9*^{R239X}. Todos los valores están representados como la media ± DE. Prueba de ANOVA de una vía con un test post hoc de Tukey. (n=4 para *Coq9*^{+/+}); (n=5 para *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X}).

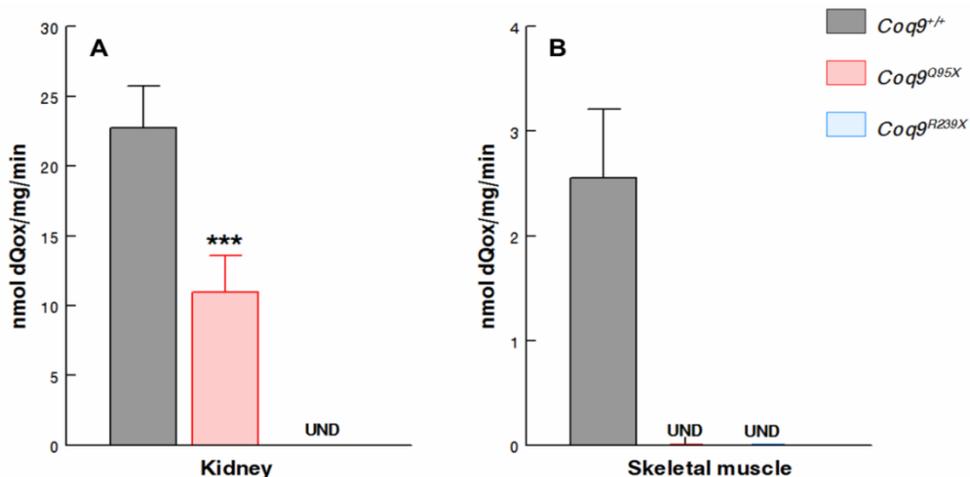


Figura R25. La actividad enzimática de la SQRDL está disminuida en los ratones *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X}. (A-B) Actividad de la SQRDL en riñones (A) y músculo esquelético (B) de ratones *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X} a 3 meses de edad. ***P < 0,001; Ratones *Coq9*^{Q95X} versus ratones *Coq9*^{+/+}. Todos los valores están representados como la media ± DE. Prueba de ANOVA de una vía con un test post hoc de Tukey (n=5). UND=undetectable.

Resultados

Debido a que la actividad enzimática CoQ-dependiente de la SQRDL estaba muy disminuida en los dos modelos CoQ-deficientes, se estudió también la actividad catalítica de la tiosulfato sulfotransferasa (ST) o rodanasa (Rhod), la cual cataliza la formación de persulfuro de glutatión (GSS⁻) a partir del tiosulfato (SSO₃⁻²), producto de la reacción catalizada por la SQRDL (Kabil et al., 2014a; Libiad et al., 2015).

En cerebro y riñón, la actividad de la rodanasa medida en el modelo de ratón *Coq9*^{Q95X} fue similar a la del ratón control y se encontraba significativamente incrementada en el modelo de ratón *Coq9*^{R239X} (Figura R26 A y B). En músculo esquelético, sin embargo, no había diferencias significativas entre la actividad de los ratones *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X} (Figura R26 C).

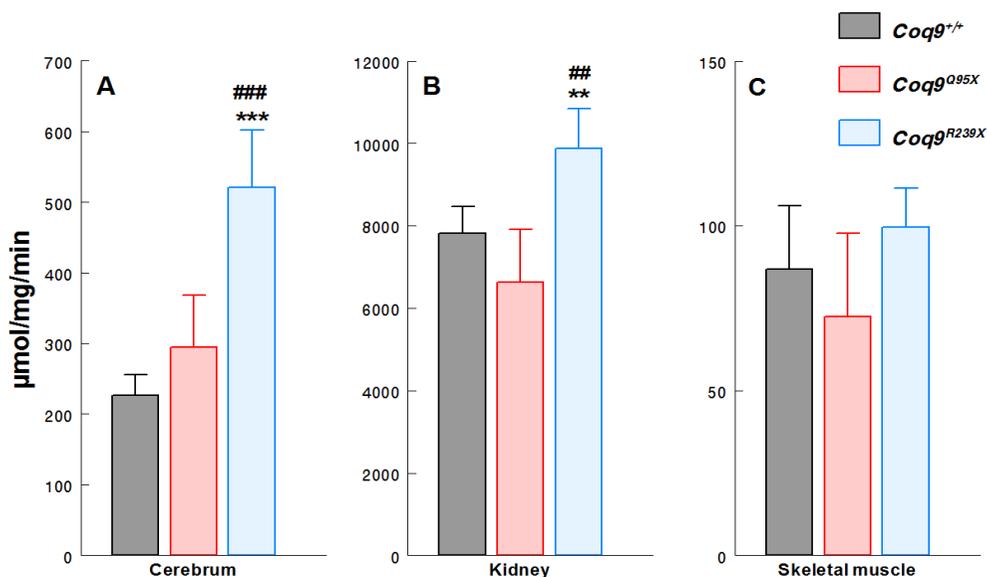


Figura R26. Actividad enzimática de la rodanasa (Rhod) de ratones *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X}. (A-C) Actividad de la Rhod en cerebro (A), riñones (B) y músculo esquelético (C) de ratones *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X} a 3 meses de edad. Todos los valores están representados como la media \pm DE. **P < 0,01; ***P < 0,001; Ratones *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X} versus ratones *Coq9*^{+/+}. ##P < 0,01; ###P < 0,001 Ratones *Coq9*^{Q95X} versus *Coq9*^{R239X}. (n=5 para cada grupo). Prueba de ANOVA de una vía con un test post hoc de Tukey.

Resultados

7.2 ESTUDIO DE LOS NIVELES DE LOS DIFERENTES TIPOLES INVOLUCRADOS LA RUTA MITOCONDRIAL DE OXIDACIÓN DEL SULFURO DE HIDRÓGENO.

Puesto que los dos modelos de ratón, *Coq9^{Q95X}* y *Coq9^{R239X}*, presentaban una disminución de los niveles y de la actividad de la SQRDL, evaluamos, a continuación, las consecuencias metabólicas producidas por esta alteración en la ruta de oxidación de sulfuro. Concretamente, medimos la acumulación de metabolitos tiólicos en cerebro y riñones de ratones *Coq9^{+/+}*, *Coq9^{Q95X}* y *Coq9^{R239X}* de 3 meses edad.

En cerebro, no se encontró variación en los niveles de sulfuro de hidrógeno entre los grupos experimentales (**Figura R27 A**). Por otro lado, en riñón, sólo el modelo de ratón *Coq9^{R239X}* presentó un incremento significativo de los niveles del mismo (**Figura R27 A**). Este dato se corroboró también de forma cualitativa mediante el uso de tiras de acetato de plomo (PbAc) (**Figura R27 B**), en donde la acumulación de sulfuro de hidrógeno en el ratón *Coq9^{R239X}* apareció como un precipitado negro correspondiente a la formación de sulfuro plumboso (**Figura R27 B e**).

En cuanto a los otros intermediarios tiólicos, los niveles de sulfito y tiosulfato no se pudieron detectar, estando por tanto los niveles por debajo del límite de detección de la técnica, esto es, 5 µM.

Resultados

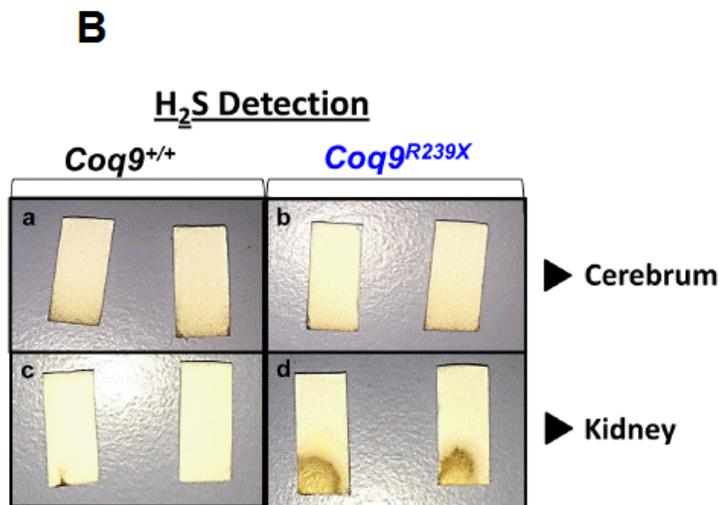
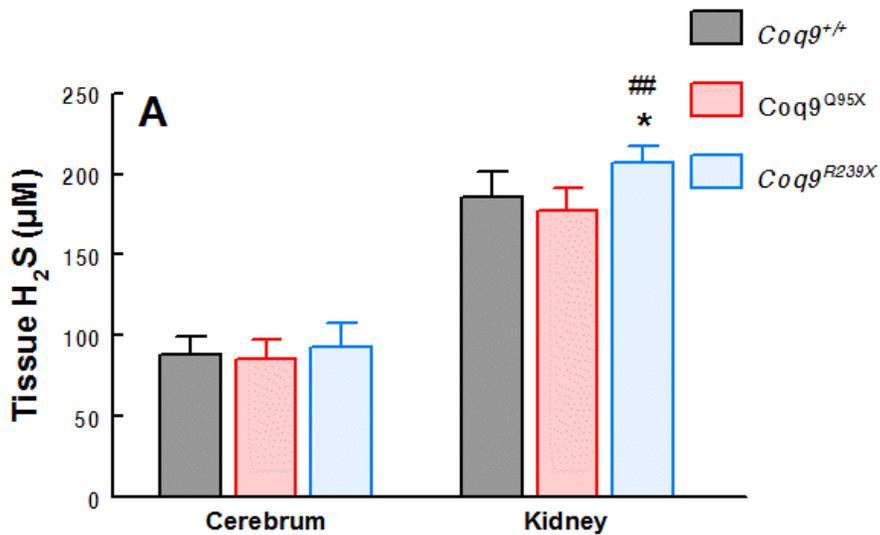


Figura R27. Niveles de H₂S. (A) Niveles de H₂S obtenidos por HPLC en cerebro y riñón de ratones *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X}. Todos los valores están representados como la media ± DE. (A) *P < 0,05; ratones *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X} versus ratones *Coq9*^{+/+}. #P < 0,05; ratones *Coq9*^{Q95X} versus *Coq9*^{R239X}. Prueba de ANOVA de una vía con un test post hoc de Tukey. (n=6 para cada grupo). (B) Producción de H₂S en cerebro (a-b) y riñón (c-d) de ratones *Coq9*^{+/+} y *Coq9*^{R239X}. El H₂S aparece como un precipitado negrozuzco (d) debido a la formación de sulfuro de plomo.

Resultados

7.3 EFECTO DE LA ACUMULACIÓN DE SULFURO DE HIDRÓGENO SOBRE LA CITOCROMO C OXIDASA (COX).

El sulfuro de hidrógeno, en concentraciones suprafisiológicas, es un potente inhibidor de la (COX) o complejo IV mitocondrial (CIV) (Tiranti et al., 2009). Si la deficiencia en CoQ provoca una reducción de la actividad de la SQR y, como consecuencia de ello, se acumula sulfuro de hidrógeno, esto podría inducir a su vez deficiencia en complejo IV mitocondrial. Por ello, evaluamos la actividad de la COX en mitocondrias de cerebro, riñón y músculo esquelético de ratones *Coq9^{+/+}*, *Coq9^{Q95X}* y *Coq9^{R239X}* de 3 meses edad. Los resultados, sin embargo, no mostraron diferencias en la actividad de la COX entre los homocigotos mutantes y su respectivo control en ninguno de los tejidos estudiados (**Figura R28 A-C**). Comparando ambos mutantes, la actividad de la COX en el modelo de ratón *Coq9^{R239X}* estaba significativamente incrementada en músculo esquelético (**Figura R28 C**).

7.4 EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE SQR EN FIBROBLASTOS DE PACIENTES CON DEFICIENCIA PRIMARIA EN CoQ.

De acuerdo con los resultados obtenidos en los modelos de ratón *Coq9^{Q95X}* y *Coq9^{R239X}*, en donde la actividad de la SQRDL estaba muy comprometida, decidimos estudiar si esta alteración estaba presente también en fibroblastos de pacientes con deficiencia primaria en CoQ causada por diferentes mutaciones, concretamente causada por mutaciones en: PDSS2, COQ2, COQ4 y COQ9. Además, para cerciorarnos de que la disminución de los niveles de la SQR se debía a la deficiencia en CoQ, tratamos dichas muestras con 5µM de CoQ, durante una semana (Lopez et al., 2010), a fin de

Resultados

estudiar si el tratamiento era capaz de restaurar los niveles de SQR, lo cual demostraría la relación directa entre déficit de CoQ y alteración de la SQR.

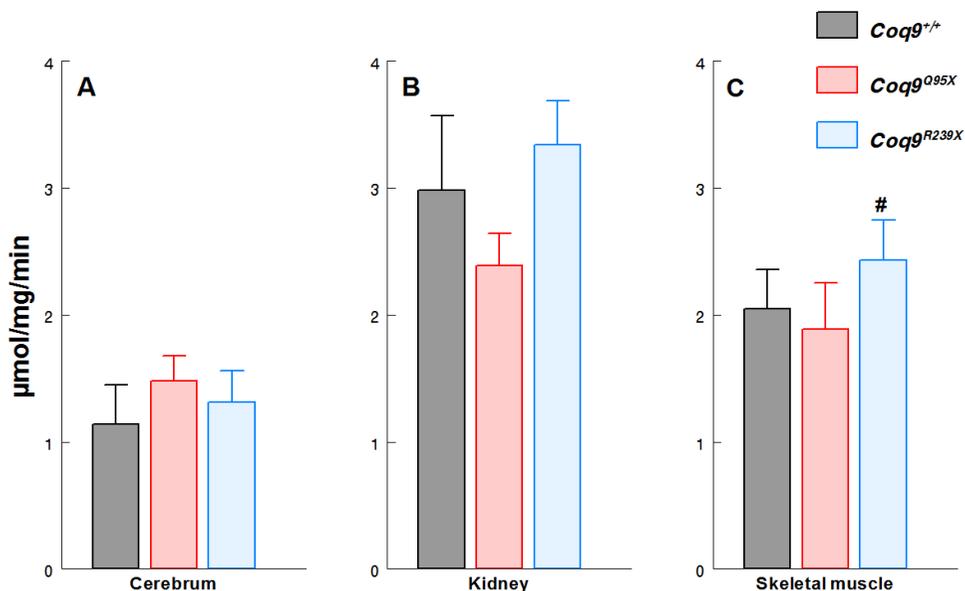


Figura R28. Actividad enzimática de la COX. (A-C) Actividad de la COX en cerebro (A), riñones (B) y músculo esquelético (C) de ratones *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{Q95X} y *Coq9*^{R239X} a 3 meses de edad. Todos los valores están representados como la media \pm DE. [#]P < 0,05; Ratones *Coq9*^{Q95X} versus *Coq9*^{R239X}. (n=5 para cada grupo). Prueba de ANOVA de una vía con un test post hoc de Tukey.

En primer lugar, medimos los niveles de CoQ₁₀ en las diferentes muestras, corroborando así que todas las muestras de los fibroblastos de pacientes con mutaciones presentaban una deficiencia severa en CoQ (**Figura R29**).

En segundo lugar, determinamos los niveles de la SQR en muestras de fibroblastos de pacientes cultivados en condiciones normales y en muestras de fibroblastos de pacientes cultivados en las mismas condiciones pero suplementados con 5 μM de CoQ durante una semana. En comparación con el control, los niveles de la SQR estaban disminuidos en todas las muestras de

Resultados

los pacientes con deficiencia primaria en CoQ y el tratamiento con CoQ logró revertir, en parte, dicho niveles (**Figura R30**).

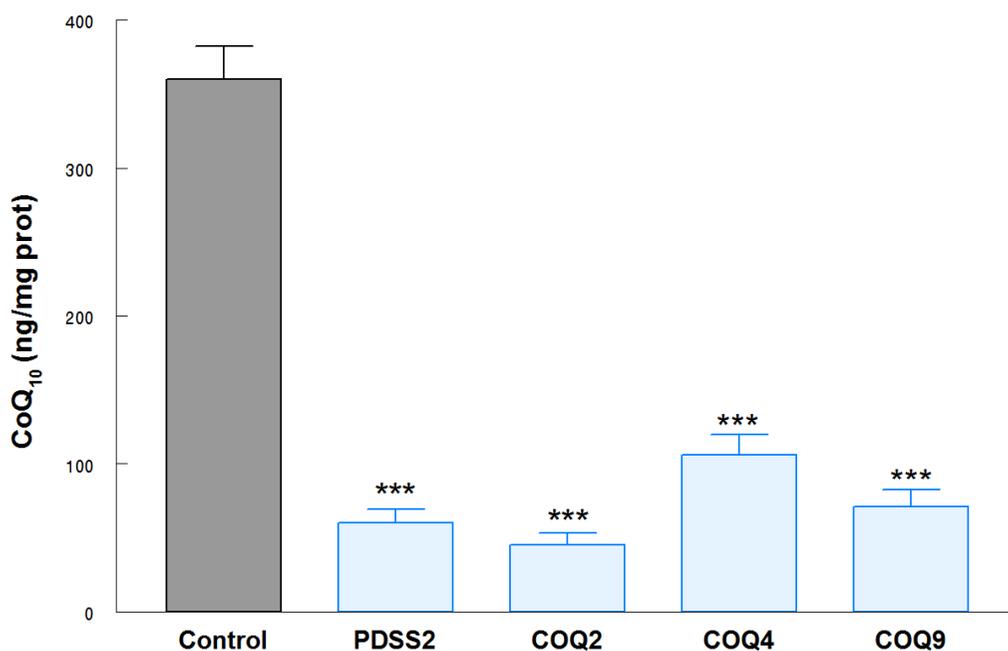


Figura R29. Niveles de CoQ₁₀ en fibroblastos de pacientes con mutaciones en PDSS2, COQ2, COQ4 y COQ9. Todos los valores están representados como la media \pm DE, n=3. *** P < 0,001; PDSS2, COQ2, COQ4 y COQ9 versus control.

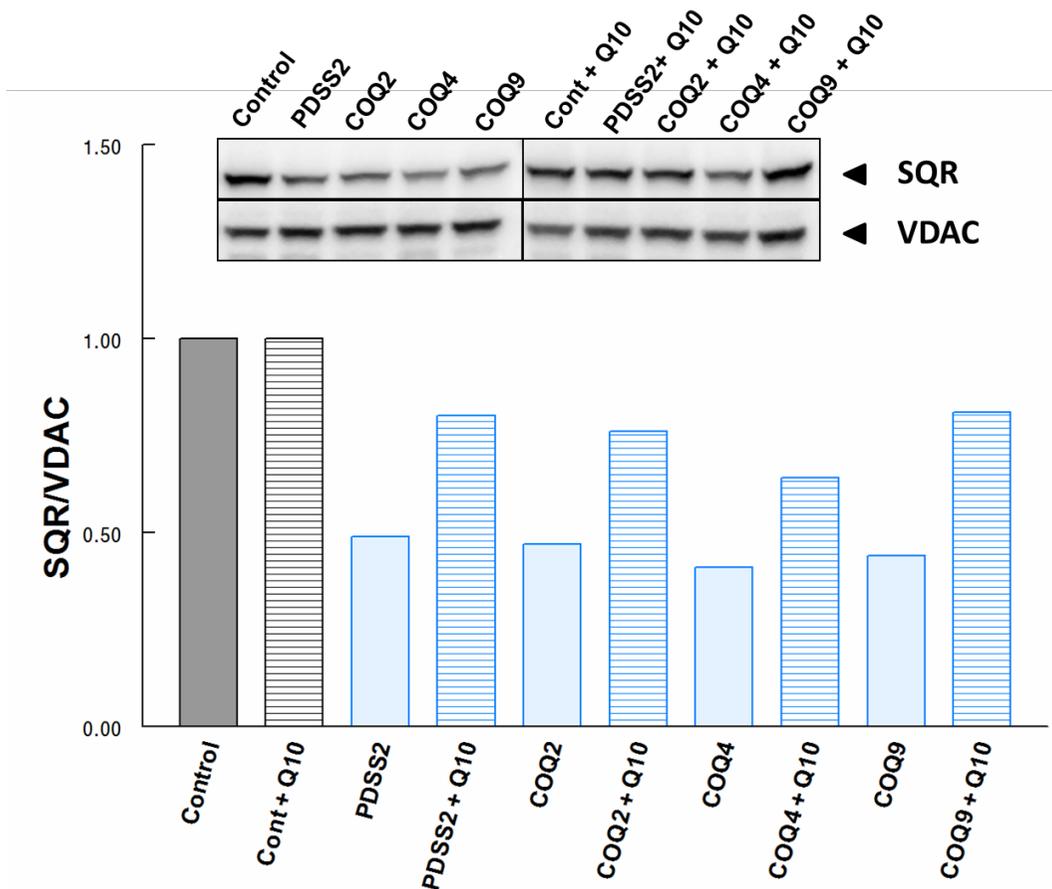


Figura R30. Efectos de la suplementación con CoQ₁₀ sobre los niveles de la proteína SQR en fibroblastos de pacientes. Western blot representativo y cuantificación por densitometría de las bandas de Western blot de la proteína SQR y VDAC1 como control de carga en fibroblastos de pacientes con deficiencia primaria en CoQ debida a mutaciones en *PDSS2*, *COQ2*, *COQ4* y *COQ9* cultivados en condiciones normales y tratados con 5 μ M de CoQ₁₀ durante una semana (+ Q10). (n=1)

Discusión

1. IMPORTANCIA DEL COMPLEJO MULTIPROTEICO EN LA BIOSÍNTESIS DE CoQ: RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE CoQ Y FENOTIPO CLÍNICO.

La deficiencia primaria en CoQ es una enfermedad autosómica recesiva que presenta una gran variabilidad en la edad de desarrollo y en las manifestaciones clínicas. Si bien el entendimiento de las causas de esta heterogeneidad es aún limitado (Desbats et al., 2015a). Estudios *in vitro* e *in vivo* han sugerido que dependiendo de los niveles de CoQ₁₀ en cada tejido o célula, se producirían distintos grados de déficit bioenergético y/o estrés oxidativo acompañado de muerte celular, lo que influiría en cómo se manifiesta la enfermedad (Duberley et al., 2013; Quinzii et al., 2013; Quinzii et al., 2010; Quinzii et al., 2008; Rodriguez-Hernandez et al., 2009). En el presente estudio, introducimos un nuevo factor que puede determinar las manifestaciones clínicas asociadas a la deficiencia en CoQ al demostrar que la existencia de dos codones de parada prematuros diferentes en la proteína COQ9 afecta de forma distinta a los niveles de otras proteínas COQ, lo que sugiere que la presencia de versiones truncadas de la proteína COQ9 induciría un efecto dominante negativo sobre el complejo multiproteico de biosíntesis de CoQ. De esta forma, el ratón *Coq9^{R239X}* presenta una versión truncada de la proteína COQ9 acompañado de una reducción global de las proteínas COQ evaluadas, lo que causa una deficiencia severa de los niveles de CoQ y un fenotipo clínico encefalopático con muerte prematura. En el modelo de ratón *Coq9^{Q95X}*, sin embargo, no se detecta ninguna forma de proteína COQ9, lo que provoca sólo una disminución de las proteínas COQ7 y COQ5 que hace que la deficiencia en CoQ en este caso sea moderada, manifestándose clínicamente como una miopatía mitocondrial leve, más evidente en hembras (**Figura D1**). Por tanto, la estabilidad de este complejo

Discusión

multiproteico para síntesis de CoQ es un factor clave para determinar el grado de deficiencia en CoQ y, en consecuencia, el desarrollo de un fenotipo clínico concreto.

Las enfermedades genéticas causadas por una mutación sin sentido, o por una delección o inserción de uno o varios nucleótidos, pueden generar un codón de parada prematuro que generalmente conllevan a la degradación del ARN mensajero mediada por mutaciones terminadoras (NMD). Este proceso es considerado un mecanismo de supervivencia de la célula cuyo objetivo sería el de reducir y/o degradar la cantidad de ARN mensajero no funcional que daría lugar a la formación de una proteína truncada con un efecto dominante-negativo o con una actividad deletérea debido a una ganancia de función (Brogna and Wen, 2009). En los dos modelos de ratón, *Coq9^{Q95X}* y *Coq9^{R239X}*, la mutación insertada en el gen *Coq9* da lugar a un codón de parada prematuro, por lo que cabría esperar la degradación del ARN mensajero mediante este proceso de NMD. De acuerdo a esto, los niveles de ARN mensajero de *Coq9* son indetectables en cerebro, riñón y músculo del ratón *Coq9^{Q95X}*. Sin embargo, en cerebro y riñón del ratón *Coq9^{R239X}* sí se detectan niveles de mRNA de *Coq9*, siendo los mismos alrededor del 15% residual con respecto al valor control. Como en otras enfermedades genéticas (Holbrook et al., 2004; Rio Frio et al., 2008), esta reducción de los niveles de ARN mensajero de *Coq9* se deben al proceso NMD ya que el tratamiento de fibroblastos embrionarios de ratones *Coq9^{Q95X}* y *Coq9^{R239X}* con ciclohexamida, un inhibidor del NMD, dio lugar al incremento de los niveles de ARN mensajero de *Coq9*. Por tanto, las diferencias de los niveles de ARN mensajero de *Coq9* entre los dos modelos de ratón se deben a disimilitudes en la eficiencia del proceso de NMD para degradar el ARN mensajero de *Coq9* como resultado de los diferentes codones de parada prematuros producto de las mutaciones sin sentido insertadas (Gong et al., 2014; Inoue et

Discusión

al., 2004). Por tanto, en el modelo *Coq9^{Q95X}*, donde el condón de parada prematuro es más temprano en la secuencia, el mecanismo de NMD es más eficiente. No obstante, en músculo se observa una tendencia diferente puesto que los niveles de ARN mensajero de *Coq9* son prácticamente indetectables tanto en el ratón *Coq9^{Q95X}* como en el ratón *Coq9^{R239X}*, lo que sugiere que en función del tejido, existe distinta eficacia en el proceso de degradación del ARN mensajero. La existencia de esta especificidad tisular en el mecanismo de NMD ha sido previamente descrita en otras enfermedades, como por ejemplo, la osteogénesis imperfecta de tipo I debida a un codón de parada prematuro por mutaciones en el gen *COL1A1* (Bateman et al., 2003; Zetoune et al., 2008). Estas diferencias en la eficiencia del NMD según el tejido, se deben a distinta expresión de los componentes que participan en el proceso de NMD (Zetoune et al., 2008) y contribuye a cómo la enfermedad se manifiesta a nivel tisular (Khajavi et al., 2006).

En el modelo de ratón *Coq9^{R239X}*, la ineficiencia parcial en el mecanismo de NMD en cerebro y riñón hace que los niveles residuales de ARN mensajero de *Coq9* den lugar a la formación de una proteína COQ9 aberrante a la cual le faltan los 75 aminoácidos C-terminales de la proteína COQ9 madura. Esta versión truncada de la proteína COQ9 produce un efecto dominante-negativo o un efecto deletéreo por ganancia de función, tal y como se ha descrito en otras enfermedades mitocondriales (Torres-Torronteras et al., 2011; Tyynismaa et al., 2009). Este efecto deletéreo por ganancia de función de la proteína COQ9 truncada afecta a la estabilidad del complejo multiproteico de biosíntesis de CoQ y por ello el ratón *Coq9^{R239X}* presenta una reducción generalizada de los niveles de proteínas COQ, comparado con el ratón *Coq9^{Q95X}*. Así, en el modelo de ratón *Coq9^{R239X}*, la presencia de la proteína COQ9 truncada tendría dos consecuencias: (i) una reducción severa y moderada de los niveles de COQ7 y COQ5,

Discusión

respectivamente, y (ii) desestabilización del complejo multiproteico, disminuyendo, en consecuencia, los niveles de otras proteínas COQ. Esta disminución de los niveles de las proteínas COQ se observó por western-blot (Luna-Sanchez et al., 2015) y por espectrometría de masas (LC-MS/MS) en el ratón *Coq9^{R239X}* (Lohman et al., 2014), así como en fibroblastos del paciente deficiente en CoQ con la mutación homóloga de COQ9 (*COQ9^{R244X}*) (Duncan et al., 2009; Luna-Sanchez et al., 2015). Por el contrario, en el modelo de ratón *Coq9^{Q95X}*, la ausencia de la proteína COQ9 sólo afectaría a los niveles de COQ7 y COQ5 y no a la integridad del complejo multiproteico. Aunque se desconoce la razón por la que los niveles de la proteína COQ5 están disminuidos, la reducción de los niveles de COQ7 se explica debido a la interacción física existente entre COQ9 y COQ7, indispensable para que COQ7 pueda ejercer su acción catalítica sobre la demetoxiubiquinona (Danhauser et al., 2015; Garcia-Corzo et al., 2013; Lohman et al., 2014). Además, el hecho de que ambos modelos de ratón respondan de forma diferente al tratamiento con 2,4-diHB sugiere que el ratón *Coq9^{Q95X}* presenta un complejo multiproteico estable, el cual es capaz de regular la biosíntesis de CoQ y proporcionar mecanismos de inhibición competitiva y/o por sustratos (Quinzii et al., 2012; Tran et al., 2006), a diferencia de lo que ocurre en el ratón *Coq9^{R239X}*. Estas diferencias observadas en los niveles de las proteínas COQ entre el ratón *Coq9^{Q95X}* y *Coq9^{R239X}* se sustentan también gracias a los estudios en levaduras, en donde el fenotipo de levaduras con mutaciones puntuales en genes COQ es completamente distinto al de sus respectivos mutantes en donde se ha delecionado por completo dicho gen (Baba et al., 2004; Belogrudov et al., 2001; Tran et al., 2006). Por otro lado, en el modelo de ratón *Coq9^{Q95X}*, se observan dos diferencias en los niveles de las proteínas COQ en función del tejido: (i) los niveles de las proteínas ADCK3 y COQ6 están incrementados

Discusión

sólo en riñón y (ii) los niveles de la proteína COQ6 están disminuidos sólo en músculo. Estas diferencias podrían deberse a una especificidad tisular en la regulación de la biosíntesis de CoQ así como en la formación del complejo multiproteico.

En conjunto, la desestabilización del complejo multiproteico explicaría la reducción severa de los niveles de CoQ que presenta el ratón *Coq9^{R239X}* en comparación con la deficiencia moderada del ratón *Coq9^{Q95X}*. La repercusión bioenergética de esta deficiencia moderada de los niveles de CoQ se ve reflejada en una disminución de la actividad de los complejos respiratorios dependientes de CoQ, I+III, así como de la respiración mitocondrial en riñones y músculos de las hembras *Coq9^{Q95X}*. Este descenso en la bioenergética mitocondrial no es consecuencia de una alteración en la relación existente entre la cantidad de complejo III libre respecto al que forma SC y sería atribuible a los bajos niveles residuales de CoQ en estos tejidos (30 % de los valores normales). Dicha disminución de la actividad del complejo I+III independiente de la formación y/o estabilidad del SC I+III se corroboran en un estudio reciente de nuestro grupo en donde el tratamiento con ubiquinol-10 en los ratones *Coq9^{R239X}* incrementó la actividad del complejo I+III sin alterar el ratio SC/CIII libre (García-Corzo et al., 2014).

A pesar de que el músculo esquelético y riñón de los ratones *Coq9^{Q95X}* presentan los niveles más bajos de CoQ y, en consecuencia, el mayor defecto bioenergético, ni la función, ni la morfología renal, presentaban ninguna alteración apreciable. Este resultado se corresponde con el obtenido previamente en la caracterización del ratón *Coq9^{R239X}*, el cual tampoco manifestaba patología renal (García-Corzo et al., 2013). No obstante, no está claro el motivo por el cual los ratones *Pdss2^{kd/kd}* desarrollan síndrome nefrótico y los mutantes *Coq9* no (Peng et al., 2008; Quinzii et al.,

Discusión

2013). Por el contrario, la evaluación histoquímica del músculo esquelético mostró un incremento del número de fibras COX y SDH negativas en hembras *Coq9^{Q95X}* a los 18 meses de edad, lo que sugiere el desarrollo de una miopatía mitocondrial leve de aparición tardía. La disminución en músculo de la actividad energética mitocondrial podría inducir una transformación en el tipo de fibra muscular dándose un cambio de fibras tipo I (de contracción lenta) a fibras tipo II (de contracción rápida). Estos cambios en la distribución del tipo de fibra fueron ya descritos por primera vez en un modelo murino experimental con una miopatía mitocondrial como un mecanismo compensador para hacer frente a la deficiencia enzimática y mantener la fuerza muscular incrementando la síntesis de ATP vía glucolítica a expensas de un mayor coste energético (Venhoff et al., 2012). Resultados similares a los nuestros fueron obtenidos en el estudio realizado por Sommerville y col. (Sommerville et al., 2013) en donde encontraron un incremento en la proporción de fibras tipo IIC en biopsias musculares morfológicamente normales de 18 pacientes con deficiencia en CoQ₁₀. Además, los músculos con un metabolismo más oxidativo y por tanto mayor contenido en fibras de contracción lenta, tienen también mayores niveles de CoQ que los músculos con un metabolismo más glicolítico y mayor cantidad de fibras de contracción rápida (Nierobisz et al., 2010), lo cual sugiere que las fibras musculares tipo I son más susceptibles a la deficiencia de CoQ.

Los datos obtenidos en la evaluación de la actividad locomotora también muestran diferencias de género que se correlacionan con los obtenidos en los estudios de bioenergética mitocondrial e histológicos. Así, las hembras *Coq9^{Q95X}*, y no los machos, presentan intolerancia al ejercicio. Esta mayor sensibilidad de las hembras de ratón a una miopatía mitocondrial fue también descrita en un modelo de ratón knockout específico de músculo para *Cox10* (Diaz et al., 2005) y puede estar relacionado con el efecto de la

Discusión

testosterona sobre la masa muscular (Schulte-Hostedde AI, 2003). Esto concordaría con la disminución de la actividad voluntaria observada en ratones machos *knockout* para el receptor androgénico (Rana et al., 2011).

Además, también se ha sugerido que la mayor predisposición de las mujeres a sufrir miopatía mitocondrial como efecto secundario asociado al consumo de estatinas podría deberse a que las mujeres tengan unos niveles de CoQ más bajos que los hombres (Bhardwaj et al., 2013). En este sentido, nuestros resultados muestran también que los niveles de CoQ en músculo son menores en hembras que en machos, reforzando la idea de una mayor susceptibilidad de las hembras a la deficiencia de CoQ.

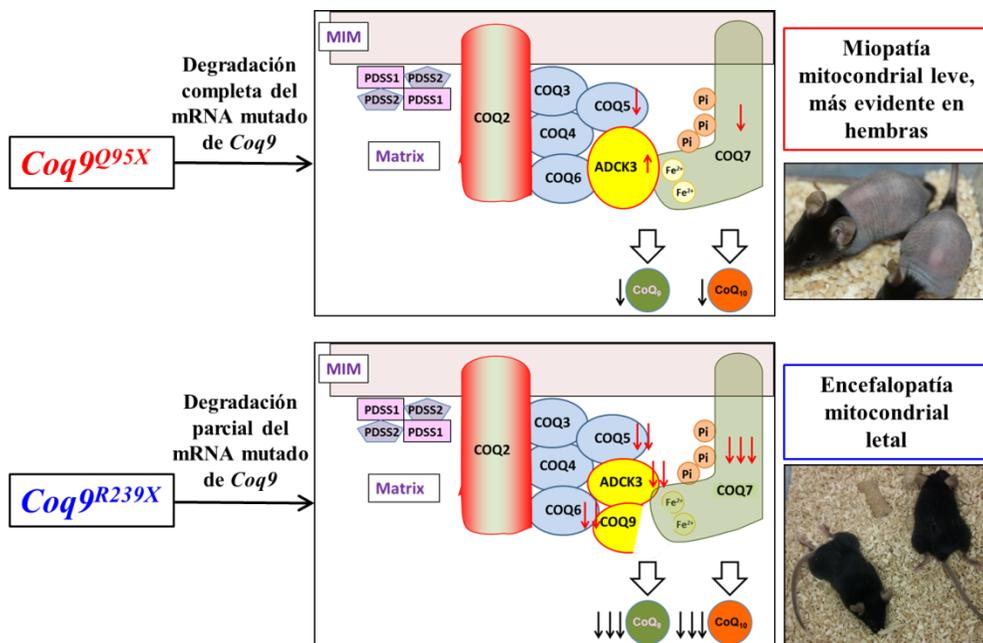


Figura D1. La eficiencia del mecanismo NMD y la formación de una proteína COQ9 truncada determina la estabilidad del complejo multiproteico de biosíntesis de CoQ y, en consecuencia, el grado de deficiencia en CoQ y la severidad del fenotipo clínico.

Discusión

2. PAPEL DE LA SULFURO QUINONA OXIDO-REDUCTASA (SQR) Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL DEL SULFURO EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA DEFICIENCIA EN CoQ.

Como se ha descrito, una de las funciones de la CoQ es la de actuar como aceptor de electrones en la reacción catalizada por la sulfuro:quinona oxidoreductasa (SQR), formando tiosulfato a partir de sulfuro de hidrógeno y sulfito. Dicha reacción es el primer paso en la oxidación mitocondrial del sulfuro de hidrógeno (Jackson et al., 2012). En este estudio demostramos que la deficiencia primaria en CoQ da lugar a una disminución de los niveles y la actividad de la SQR, lo que provoca una alteración del metabolismo mitocondrial del H₂S (**Figura D2**). La disminución de los niveles de SQR estaría relacionada con los niveles residuales de CoQ, siendo menor cuanto mayor fuera el déficit en CoQ. Asimismo, el suplemento exógeno con CoQ₁₀ lograría restaurar los niveles de SQR, poniendo en evidencia la importancia de la CoQ en la ruta mitocondrial de oxidación del H₂S. La reducción en los niveles y actividad de SQR podría ser un mecanismo patológico importante en la fisiopatología de las deficiencias primarias y secundarias en CoQ. De hecho, defectos moleculares en esta ruta mitocondrial de oxidación del H₂S se han asociados a enfermedades que afectan principalmente al sistema nervioso central. Concretamente, mutaciones en los genes que codifican la SDO y SO causan distintas encefalopatías (Grings et al., 2014; Tiranti et al., 2009). Asimismo, la deficiencia secundaria en CoQ como consecuencia del tratamiento con estatinas reduce la oxidación mitocondrial del sulfuro de hidrógeno en hígado de rata, un hecho que podría influir en los efectos secundarios asociados al tratamiento con estos hipocolesterolemiantes (Wojcicka et al., 2011).

Discusión

El modelo de ratón *Coq9^{Q95X}*, presenta una reducción de los niveles de SQR sólo en músculo esquelético, donde los niveles de CoQ son más bajos que en otros tejidos (Luna-Sanchez et al., 2015). Por el contrario, en el modelo de ratón *Coq9^{R239X}*, tanto el músculo esquelético como el riñón, ambos con deficiencia severa en CoQ (Garcia-Corzo et al., 2013; Luna-Sanchez et al., 2015), presentan niveles reducidos de dicha enzima. Esta disminución de los niveles de SQR en riñones del ratón *Coq9^{R239X}* se observó tanto por western-blot como por espectrometría de masas (LC-MS/MS) (Lohman et al., 2014). La reducción de los niveles de SQR en músculo esquelético en los modelos de ratón *Coq9^{Q95X}* y *Coq9^{R239X}* estaría justificada por el hecho de que los niveles de ARN mensajero de *Coq9* en este tejido se reducen de manera similar en ambos modelos y, en consecuencia, el músculo esquelético es el tejido en donde los niveles de CoQ son más parecidos entre los dos modelos mutantes (un 25% de CoQ residual, aproximadamente) (Luna-Sanchez et al., 2015). Por tanto, la reducción de los niveles de SQR estaría relacionada con el grado de deficiencia en CoQ, lo cual justificaría lo que ocurre en el riñón, en donde la SQR sólo disminuye en el modelo de ratón *Coq9^{R239X}*, cuyo déficit en CoQ es más severo (Luna-Sanchez et al., 2015). Esta relación entre deficiencia en CoQ y SQR se ha observado previamente en levaduras mutantes deficientes de CoQ (Zhang et al., 2008). En este sentido, la actividad de la SQR va a depender no sólo de los niveles de SQR sino también de los niveles de CoQ por su función de aceptor de electrones en la actividad catalítica de la enzima. Por ello, en riñón, la actividad de la SQR en el modelo de ratón *Coq9^{Q95X}*, con niveles de SQR normales pero con deficiencia moderada en CoQ, aunque está muy reducida, es mayor que la obtenida en el modelo de ratón *Coq9^{R239X}*, con reducción severa de los niveles de SQR y CoQ y en donde la actividad de la SQR fue prácticamente indetectable. Por otro lado, en ambos modelos, el músculo

Discusión

esquelético presenta una reducción drástica de la actividad de la SQR ya que los niveles de SQR y CoQ se encuentran muy disminuidos.

En respuesta al déficit en SQR, se aprecia un aumento de la actividad de la tiosulfato sulfotransferasa o rodanasa. En cerebro, donde existe controversia en cuanto al papel de la SQR en el metabolismo del sulfuro de hidrógeno (Ackermann et al., 2011; Linden et al., 2012), el incremento de la actividad de la rodanasa podría deberse al posible papel que juega dicha enzima en el metabolismo del glutatión (GSH). En bacterias mutantes donde se ha deleciónado el gen de la rodanasa (*Azotobacter vinelandii* MV474), la ausencia de esta enzima produce un incremento de estrés oxidativo y disminución de los niveles de GSH. En este modelo, la rodanasa catalizaría la formación de glutatión oxidado (GSSG) a partir de un radical intermediario (GS[·]) y por acción de la glutatión reductasa se formaría el GSH (Remelli et al., 2012). Estudios preliminares llevados a cabo en nuestro laboratorio, muestran que en cerebro, los niveles de glutatión reductasa y glutatión peroxidasa (Gpx4) están disminuidos en el ratón *Coq9^{R239X}* y que además existe una reducción significativa de los niveles de GSH (resultados no mostrados). La disminución de GSH se ha mostrado también en un modelo de restricción dietética de aminoácidos de sulfuro (cisteína y metionina) como consecuencia del aumento de sulfuro de hidrógeno, lo que desencadena en un aumento de la actividad mTOR (Hine et al., 2015). Curiosamente, un aumento de la actividad mTOR se da también en el modelo de ratón con deficiencia en CoQ y síndrome nefrótico debido a mutación en *Pdss2* (Peng et al., 2015). En cualquier caso, el déficit de glutatión produciría una disminución de la capacidad antioxidante de la célula y podría contribuir al daño oxidativo observado en cerebro del ratón *Coq9^{R239X}* (García-Corzo et al., 2013). Por otro lado, la disminución de los niveles de glutatión, incrementaría los efectos citotóxicos del sulfito (Niknahad and O'Brien,

Discusión

2008), Se ha visto que en cerebro de rata, el sulfito, y no el tiosulfato, provoca disfunción mitocondrial favoreciendo la formación de especies reactivas de oxígeno, incremento de la lipoperoxidación y desequilibrio de las defensas antioxidantes (Grings et al., 2013; Parmeggiani et al., 2015). La rodanasa presenta una mayor afinidad catalítica por el sulfito que por el tiosulfato (Libiad et al., 2014), por lo que un incremento de su actividad podría favorecer la formación de tiosulfato y glutatión a partir de sulfito y persulfuro de glutatión en respuesta a los bajos niveles de glutatión en cerebro del ratón *Coq9^{R239X}*. El hecho de que la administración de N-acetilcisteína, un precursor del glutatión, ayude a mejorar a pacientes con encefalopatía etilmalónica por mutaciones en *ETEH1*, pone de manifiesto la importancia de este compuesto en la oxidación mitocondrial del sulfuro a nivel cerebral (Viscomi et al., 2010). Además, la administración *in vitro* de GSH en mitocondrias de cerebro de rata también logró restaurar el déficit energético y el balance redox debido a la administración exógena de tiosulfato y sulfito, dos intermediarios tiólicos que se acumulan en la encefalopatía etilmalónica y la deficiencia de sulfito oxidasa, respectivamente, corroborando el efecto protector del GSH a la hora de neutralizar los efectos nocivos derivados de la acumulación de metabolitos por alteraciones en la ruta mitocondrial del sulfuro (Grings et al., 2013). Todo esto ayudaría a explicar el incremento de la actividad de la rodanasa en cerebro como un mecanismo compensador a expensas del mantenimiento de la homeostasis del glutatión. En riñón, el incremento de la actividad de la rodanasa en el modelo de ratón *Coq9^{R239X}* estaría directamente relacionado con la actividad de la SQR y serviría para contrarrestar la actividad prácticamente nula de la SQR en este tejido. En tejidos como el riñón, en donde los niveles de cisteína son más elevados, la producción de sulfito procedente del catabolismo de la cisteína es elevada (Vitvitsky et al., 2004;

Discusión

Vitvitsky et al., 2013). En condiciones normales, la SQR utilizaría este sulfito junto con el sulfuro de hidrógeno para dar lugar a tiosulfato. No obstante, como la actividad de la SQR está muy disminuida, se produciría un incremento de los niveles de sulfito y sulfuro de hidrógeno. Como se ha mencionado anteriormente, la rodanasa, va a ser más eficiente a la hora de producir tiosulfato que a la hora de utilizarlo como donador de iones de sulfuro (Libiad et al., 2014). Por consiguiente, si existe un aumento de los niveles de sulfito debido al déficit en SQR, la rodanasa aumentaría su actividad para utilizar este exceso de sulfito y transformarlo en tiosulfato. Este tiosulfato a su vez puede volver a ser utilizado por la propia rodanasa para dar lugar a persulfuro de glutation que sería utilizado por la persulfuro dioxigenasa produciendo de nuevo sulfito y finalmente sería transformado por la sulfito oxidasa en sulfato que sería excretado por la orina. Por último, en músculo esquelético, el hecho de que la actividad de la rodanasa no esté alterada en ninguno de los dos ratones mutantes, podría deberse a mecanismos tejidos dependientes. Por ejemplo, el colon es el tejido que presenta mayores niveles y actividad de esta enzima, seguidos de hígado y riñón (Aminlari and Gilanpour, 1991; Du et al., 2013; Furne et al., 2001; Veeranki and Tyagi, 2015). Esto concuerda con los resultados mostrados, en donde se observa, que el músculo esquelético es el tejido en donde la actividad de la rodanasa es menor.

En patologías en donde hay una alteración en la ruta mitocondrial de oxidación de sulfuro, se produce la acumulación de intermediarios tiólicos que serían los responsables de las consecuencias moleculares y fisiopatológicas que tienen lugar en estas alteraciones. Concretamente, en la encefalopatía etilmalónica se acumula sulfuro de hidrógeno y tiosulfato (Tiranti et al., 2009) mientras que en la deficiencia de sulfito oxidasa, se acumula sulfito y tiosulfato (Grings et al., 2013). En este estudio, los dos

Discusión

modelos de ratón, $Coq9^{Q95X}$ y $Coq9^{R239X}$, presentan la actividad de la SQR muy disminuida a nivel renal. Como esta enzima es la encargada de catalizar el primer paso del catabolismo mitocondrial del sulfuro de hidrógeno (Hildebrandt and Grieshaber, 2008), cabría esperar, como consecuencia, un incremento de los niveles de sulfuro de hidrógeno y sulfito en riñón en ambos mutantes. No obstante, observamos que sólo el ratón $Coq9^{R239X}$ presenta acumulación de sulfuro de hidrógeno. Esto podría deberse a que la actividad de la SQR en riñón del ratón $Coq9^{R239X}$ es mucho menor en que el ratón $Coq9^{Q95X}$. Así, la actividad residual en el mutante $Coq9^{Q95X}$ podría ser suficiente para poder metabolizar el sulfuro de hidrógeno y el sulfito evitando que éstos se acumulen. Por el contrario, en el ratón $Coq9^{R239X}$, la ausencia de actividad de la SQR provocaría un aumento de las concentraciones de sulfuro de hidrógeno pero no de sulfito. El hecho de que el sulfito no alcance niveles detectables con la técnica utilizada, estaría relacionado, como anteriormente se ha explicado, con el incremento de la actividad de la rodanasa. En cerebro, en cambio, no hay acumulación de ningún intermediario tiólico, puesto que en este tejido, la oxidación mitocondrial del sulfuro de hidrógeno no sólo depende de la actividad de la SQR (Linden et al., 2012).

En la encefalopatía etilmalónica, la acumulación de sulfuro de hidrógeno produce una inhibición de la actividad de la citocromo c oxidasa (COX), provocando un déficit bioenergético (Tiranti et al., 2009). Sin embargo, en riñón del modelo de ratón $Coq9^{R239X}$, donde los niveles de sulfuro de hidrógeno están significativamente aumentados, la actividad de la COX no se ve alterada, lo cual se podría explicar por dos motivos: i) a pesar de que los niveles de sulfuro de hidrógeno a nivel renal están elevados en el ratón $Coq9^{R239X}$, no son tan elevados como en el caso del ratón mutante *ETEHI*, por lo que quizá no sean suficientes para provocar la inhibición del complejo IV mitocondrial (Modis et al., 2014; Tiranti et al., 2009) ii) en el

Discusión

modelo de ratón *ETEHI*, se acumula, además de sulfuro de hidrógeno, tiosulfato, por lo que la deficiencia del complejo IV mitocondrial podría ser consecuencia del efecto conjunto de estos dos metabolitos (Tiranti et al., 2009). Por otro lado, se ha descrito que el sulfuro de hidrógeno es un importante agente vasodilatador que influye en la presión arterial y en la relajación de la musculatura visceral; asimismo, parece que el sulfuro de hidrógeno estimula la respuesta de determinados circuitos nerviosos (Kabil et al., 2014b). Por tanto, queda por esclarecer si un aumento de sulfuro de hidrógeno en la deficiencia en CoQ produce alternaciones en estas funciones fisiológicas.

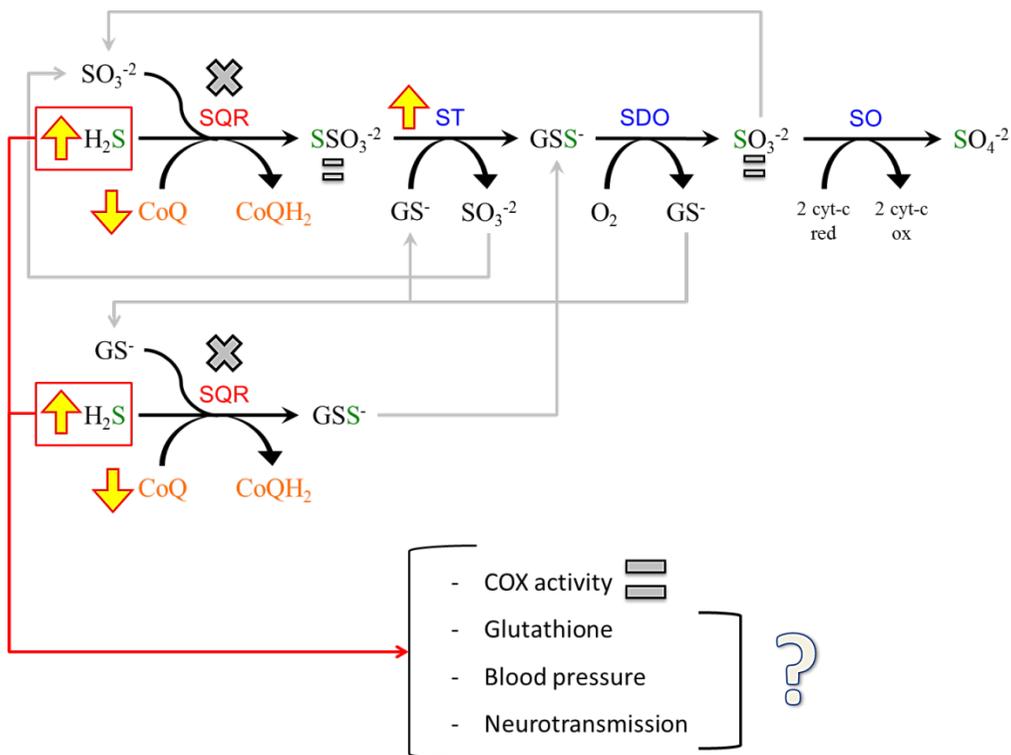


Figura D2. Esquema representativo del papel de la SQR en la fisiopatología de la deficiencia en CoQ

Discusión

Finalmente, este estudio muestra por primera vez, que los fibroblastos de pacientes con deficiencia primaria en CoQ debido a diferentes mutaciones, también presentan una reducción significativa de los niveles de SQR y que dichos niveles se pueden recuperar parcialmente con el tratamiento con CoQ₁₀. Con ello, se pone de manifiesto que: i) la deficiencia primaria en CoQ produce un déficit en SQR independientemente del defecto molecular; ii) que la alteración del metabolismo del sulfuro de hidrógeno puede ser uno de los factores que influyan en la fisiopatología de la deficiencia en CoQ₁₀ en humanos lo que abriría la puerta a posibles intervenciones terapéuticas en paralelo al suplemento exógeno de CoQ₁₀.

Discusión

3. EFECTO “BYPASS” EN LA RUTA BIOSINTÉTICA DE CoQ COMO ALTERNATIVA TERAPEÚTICA PARA LAS DEFICIENCIAS PRIMARIAS EN CoQ.

En los casos de diagnóstico de deficiencia en CoQ₁₀, el tratamiento de elección inmediato es el suplemento exógeno con ubiquinona-10 (forma oxidada de la CoQ₁₀). Sin embargo, debido a su alto carácter lipofílico, la ubiquinona-10 tiene muy baja absorción y biodisponibilidad, lo que limita en exceso su potencial terapéutico, incluso usando dosis altas (Emmanuele et al., 2012). Esta limitación es aún más importante en los casos de síntomas neurológicos, dado que la ubiquinona-10 exógena tendrá un obstáculo adicional, esto es, atravesar la barrera hematoencefálica. Por este motivo se piensa que el suplemento exógeno de ubiquinona-10 a dosis altas mejora la clínica asociada a casos de miopatía o síndrome nefrótico con diagnóstico temprano (Emmanuele et al., 2012), mientras que los síntomas neurológicos en casos de encefalopatía, ataxia cerebelosa o enfermedad multisistémica muestran una respuesta variable a este suplemento exógeno de ubiquinona-10 a dosis altas, habiendo casos donde no se aprecia una mejora sintomatológica (Emmanuele et al., 2012). Por ello, en los últimos años se han intentado diferentes opciones experimentales para la mejora del tratamiento, entre ellas: 1) administración de ubiquinol-10 (forma reducida de la CoQ₁₀) que aumenta la biodisponibilidad de la CoQ₁₀ y parece tener mejores resultados terapéuticos que la ubiquinona-10, si bien, aunque la supervivencia mejora, todavía el 50 % de los ratones *Coq9^{R239X}* tratados con ubiquinol-10 mueren antes de los 6 meses de edad, tal y como hemos demostrado recientemente (García-Corzo et al., 2014; Salviati et al., 2012); 2) Desvío de la ruta metabólica (bypass therapy) usando una molécula que contiene la modificación que realiza la proteína disfuncional, lo que se ha realizado con

Discusión

relativo éxito en levaduras mutantes para *COQ6* con la administración de 3,4-dihidroxibenzoato (Doimo et al., 2014; Ozeir et al., 2011). Esta opción “bypass” no se había evaluado, sin embargo, en modelos mamíferos. Dado que nuestros estudios han demostrado que los defectos en *COQ9* inducen una reducción en la enzima *COQ7* y acumulación de demetoxiubiquinona (sustrato de *COQ7*), un tratamiento con 2,4-dihidroxibenzoato (2,4-diHB), cuyo anillo benzoico ya posee la hidroxilación en el C2, que es la hidroxilación que cataliza *COQ7*, podría aumentar los niveles de CoQ. Por ello y como prueba de concepto, tratamos, en primer, fibroblastos del paciente (*COQ9^{R244X}*) con 2,4-diHB, tras lo que observamos un aumento significativo de los niveles de CoQ. Seguidamente, tratamos durante un mes ratones *Coq9^{R239X}* con 2,4-diHB, observando igualmente un aumento proporcional de los niveles de CoQ en riñón (**Figura D3**). Si bien este aumento dobló los niveles de CoQ con respecto al ratón *Coq9^{R239X}* sin tratar, no se consiguió en ningún caso a superar el 20% de los niveles de CoQ control. Esta limitación en el aumento de los niveles de CoQ puede deberse a la necesidad de incrementar los niveles de la proteína ADCK3, tal y como se ha demostrado en levaduras (Xie et al., 2012). En cualquier caso, el siguiente paso sería hacer una evaluación terapéutica del tratamiento con 2,4-diHB a largo plazo, observando especialmente los cambios bioquímicos y morfológicos que se puedan producir en el cerebro. En este sentido, un estudio reciente ha mostrado un aumento de la supervivencia en ratones knockout condicionales para *Coq7* tratados con 2,4-diHB (Wang et al., 2015). No obstante, dicho estudio presenta una limitación importante puesto que no deja claro el fenotipo clínico del modelo de ratón ni muestra datos en cerebro. Por tanto, el tratamiento crónico con 2,4-diHB en el modelo *Coq9^{R239X}* nos ayudará a determinar si una terapia “bypass” puede ser efectiva para el tratamiento de la encefalopatía mitocondrial asociada a la

Conclusiones

Conclusiones

Del presente estudio podemos concluir:

1. Las diferencias que hay en los niveles de CoQ entre el modelo de ratón *Coq9^{R239X}* y *Coq9^{Q95X}* se correlacionan con las diferencias existentes entre ambos modelos en los niveles de proteínas que intervienen en su biosíntesis, sugiriendo que la presencia de una proteína COQ9 truncada debido a una eficiencia parcial del proceso NMD puede producir la desestabilización del complejo multiproteico.
2. Como consecuencia, el ratón *Coq9^{Q95X}* presenta una miopatía moderada, más acusada en hembras, en comparación con la severa encefalopatía que desarrolla el ratón *Coq9^{R239X}*.
3. La deficiencia primaria en CoQ da lugar a una disminución de los niveles y la actividad de la SQR, lo que provoca una alteración del metabolismo mitocondrial del H₂S.
4. La alteración del metabolismo del H₂S puede ser uno de los factores que influyan en la fisiopatología de la deficiencia en CoQ₁₀ en humanos lo que abriría la puerta a posibles intervenciones terapéuticas en paralelo al suplemento exógeno de CoQ₁₀.
5. Para aumentar los niveles endógenos de CoQ es posible realizar un efecto “bypass” también en los casos de defectos en proteínas reguladoras como COQ9. Sin embargo, la eficacia de la terapia “bypass” con análogos de la ruta biosintética de la CoQ, puede diferir en función de la estabilidad del complejo multiproteico.

Conclusiones

6. Los resultados en el modelo $Coq^{Q^{95X}}$ sugiere que un incremento de los niveles de CoQ por encima del 50 % serían suficientes para evitar un fenotipo clínico severo.

Conclusions

Conclusions

1. Differences in CoQ levels between *Coq9^{R239X}* y *Coq9^{Q95X}* mice correlates with the differences of COQ proteins levels found in both mutant models, suggesting that the presence of a COQ9 truncated protein in the *Coq9^{R239X}* mouse model because of an incomplete nonsense-mediated mRNA decay (NMD) may produce the destabilization of the CoQ biosynthetic multiprotein complex.
2. As a consequence, *Coq9^{Q95X}* mice showed a mild myopathy, more evident in females, compared to the severe encephalopathy of *Coq9^{R239X}* mice.
3. CoQ deficiency causes a reduction in SQR levels and activity leading to an alteration of mitochondrial H₂S oxidation pathway.
4. The alterations on mitochondrial H₂S metabolism could be involved in the pathophysiologic consequences of human CoQ₁₀ deficiency and may have a potential impact for developing and testing new therapeutic strategies alternatives to the oral supplementation of ubiquinone-10.
5. The efficacy of the bypass therapy to stimulate endogenous CoQ biosynthesis for primary CoQ deficiency caused by molecular defects in proteins of the biosynthetic multicomplex may differ according to the stability of the CoQ multiprotein complex.
6. The result in *Coq9^{Q95X}* mice suggest that increasing CoQ levels above of 50% of its normal levels may be enough to avoid a severe clinical phenotype.

Bibliografía

Bibliografía

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.

Ackermann, M., Kubitza, M., Maier, K., Brawanski, A., Hauska, G., and Pina, A.L. (2011). The vertebrate homolog of sulfide-quinone reductase is expressed in mitochondria of neuronal tissues. *Neuroscience* 199, 1-12.

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.

Allan, C.M., Awad, A.M., Johnson, J.S., Shirasaki, D.I., Wang, C., Blaby-Haas, C.E., Merchant, S.S., Loo, J.A., and Clarke, C.F. (2015). Identification of Coq11, a new coenzyme Q biosynthetic protein in the CoQ-synthome in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 290, 7517-7534.

Aminlari, M., and Gilanpour, H. (1991). Comparative studies on the distribution of rhodanese in different tissues of domestic animals. *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry* 99, 673-677.

Asencio, C., Navas, P., Cabello, J., Schnabel, R., Cypser, J.R., Johnson, T.E., and Rodriguez-Aguilera, J.C. (2009). Coenzyme Q supports distinct developmental processes in *Caenorhabditis elegans*. *Mechanisms of ageing and development* 130, 145-153.

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.

Bibliografía

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.

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.

Bateman, J.F., Freddi, S., Natrass, G., and Savarirayan, R. (2003). Tissue-specific RNA surveillance? Nonsense-mediated mRNA decay causes collagen X haploinsufficiency in Schmid metaphyseal chondrodysplasia cartilage. *Human molecular genetics* 12, 217-225.

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

Bibliografia

Berthold, D.A., and Stenmark, P. (2003). Membrane-bound diiron carboxylate proteins. *Annual review of plant biology* 54, 497-517.

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.

Bhardwaj, S., Selvarajah, S., and Schneider, E.B. (2013). Muscular effects of statins in the elderly female: a review. *Clinical interventions in aging* 8, 47-59.

Brasseur, G., Tron, G., Dujardin, G., Slonimski, P.P., and Brivet-Chevillotte, P. (1997). The nuclear ABC1 gene is essential for the correct conformation and functioning of the cytochrome bcl complex and the neighbouring complexes II and IV in the mitochondrial respiratory chain. *European journal of biochemistry / FEBS* 246, 103-111.

Brea-Calvo, G., Haack, T.B., Karall, D., Ohtake, A., Invernizzi, F., Carrozzo, R., Kremer, L., Dusi, S., Fauth, C., Scholl-Burgi, S., et al. (2015). COQ4 mutations cause a broad spectrum of mitochondrial disorders associated with CoQ10 deficiency. *American journal of human genetics* 96, 309-317.

Brogna, S., and Wen, J. (2009). Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms. *Nature structural & molecular biology* 16, 107-113.

Busso, C., Tahara, E.B., Ogusucu, R., Augusto, O., Ferreira-Junior, J.R., Tzagoloff, A., Kowaltowski, A.J., and Barros, M.H. (2010). *Saccharomyces cerevisiae* coq10 null mutants are responsive to antimycin A. *The FEBS journal* 277, 4530-4538.

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.

Bibliografía

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.

Clemenson, C.J., Hultman, H.I., and Sorbo, B. (1955). A combination of rhodanese and ethanethiosulfonate as an antidote in experimental cyanide poisoning. *Acta physiologica Scandinavica* 35, 31-35.

Cobos, E.J., Ghasemlou, N., Araldi, D., Segal, D., Duong, K., and Woolf, C.J. (2012). Inflammation-induced decrease in voluntary wheel running in mice: a nonreflexive test for evaluating inflammatory pain and analgesia. *Pain* 153, 876-884.

Cui, T.Z., and Kawamukai, M. (2009). Coq10, a mitochondrial coenzyme Q binding protein, is required for proper respiration in *Schizosaccharomyces pombe*. *The FEBS journal* 276, 748-759.

Cheng, W., Song, C., Anjum, K.M., Chen, M., Li, D., Zhou, H., Wang, W., and Chen, J. (2011). Coenzyme Q plays opposing roles on bacteria/fungi and viruses in *Drosophila* innate immunity. *International journal of immunogenetics* 38, 331-337.

Danhauser, K., Herebian, D., Haack, T.B., Rodenburg, R.J., Strom, T.M., Meitinger, T., Klee, D., Mayatepek, E., Prokisch, H., and Distelmaier, F. (2015). Fatal neonatal encephalopathy and lactic acidosis caused by a homozygous loss-of-function variant in COQ9. *European journal of human genetics : EJHG*.

Desbats, M.A., Lunardi, G., Doimo, M., Trevisson, E., and Salviati, L. (2015a). Genetic bases and clinical manifestations of coenzyme Q10 (CoQ 10) deficiency. *Journal of inherited metabolic disease* 38, 145-156.

Desbats, M.A., Vetro, A., Limongelli, I., Lunardi, G., Casarin, A., Doimo, M., Spinazzi, M., Angelini, C., Cenacchi, G., Burlina, A., et al. (2015b). Primary coenzyme Q10 deficiency presenting as fatal neonatal multiorgan failure. *European journal of human genetics : EJHG* 23, 1254-1258.

Di Giovanni, S., Mirabella, M., Spinazzola, A., Crociani, P., Silvestri, G., Broccolini, A., Tonali, P., Di Mauro, S., and Servidei, S. (2001). Coenzyme

Bibliografia

Q10 reverses pathological phenotype and reduces apoptosis in familial CoQ10 deficiency. *Neurology* 57, 515-518.

Diaz, F., Thomas, C.K., Garcia, S., Hernandez, D., and Moraes, C.T. (2005). Mice lacking COX10 in skeletal muscle recapitulate the phenotype of progressive mitochondrial myopathies associated with cytochrome c oxidase deficiency. *Human molecular genetics* 14, 2737-2748.

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. *J Am Soc Nephrol* 18, 2773-2780.

Doimo, M., Trevisson, E., Airik, R., Bergdoll, M., Santos-Ocana, C., Hildebrandt, F., Navas, P., Pierrel, F., and Salviati, L. (2014). Effect of vanillic acid on COQ6 mutants identified in patients with coenzyme Q10 deficiency. *Biochimica et biophysica acta* 1842, 1-6.

Du, J.T., Li, W., Yang, J.Y., Tang, C.S., Li, Q., and Jin, H.F. (2013). Hydrogen sulfide is endogenously generated in rat skeletal muscle and exerts a protective effect against oxidative stress. *Chinese medical journal* 126, 930-936.

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.

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-

Bibliografía

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.

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 Pds2 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-Vizarra, E., Lopez-Perez, M.J., and Enriquez, J.A. (2002). Isolation of biogenetically competent mitochondria from mammalian tissues and cultured cells. *Methods* 26, 292-297.

Bibliografía

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.

Freyer, C., Stranneheim, H., Naess, K., Mourier, A., Felser, A., Maffezzini, C., Lesko, N., Bruhn, H., Engvall, M., Wibom, R., et al. (2015). Rescue of primary ubiquinone deficiency due to a novel COQ7 defect using 2,4-dihydroxybenzoic acid. *Journal of medical genetics* 52, 779-783.

Furne, J., Springfield, J., Koenig, T., DeMaster, E., and Levitt, M.D. (2001). Oxidation of hydrogen sulfide and methanethiol to thiosulfate by rat tissues: a specialized function of the colonic mucosa. *Biochemical pharmacology* 62, 255-259.

Garcia-Corzo, L., Luna-Sanchez, M., Doerrier, C., Garcia, J.A., Guaras, A., Acin-Perez, R., Bullejos-Peregrin, J., Lopez, A., Escames, G., Enriquez, J.A., et al. (2013). Dysfunctional Coq9 protein causes predominant encephalomyopathy associated with CoQ deficiency. *Human molecular genetics* 22, 1233-1248.

Garcia-Corzo, L., Luna-Sanchez, M., Doerrier, C., Ortiz, F., Escames, G., Acuna-Castroviejo, D., and Lopez, L.C. (2014). Ubiquinol-10 ameliorates mitochondrial encephalopathy associated with CoQ deficiency. *Biochimica et biophysica acta* 1842, 893-901.

Bibliografía

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.

Gavilan, A., Asencio, C., Cabello, J., Rodriguez-Aguilera, J.C., Schnabel, R., and Navas, P. (2005). *C. elegans* knockouts in ubiquinone biosynthesis genes result in different phenotypes during larval development. *BioFactors* *25*, 21-29.

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 (ETFHD) gene. *Brain : a journal of neurology* *130*, 2037-2044.

Geromel, V., Kadhom, 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.

Gomez, F., Saiki, R., Chin, R., Srinivasan, C., and Clarke, C.F. (2012). Restoring de novo coenzyme Q biosynthesis in *Caenorhabditis elegans* coq-3 mutants yields profound rescue compared to exogenous coenzyme Q supplementation. *Gene* *506*, 106-116.

Gong, Q., Stump, M.R., and Zhou, Z. (2014). Position of premature termination codons determines susceptibility of hERG mutations to nonsense-mediated mRNA decay in long QT syndrome. *Gene* *539*, 190-197.

Bibliografia

Grant, J., Saldanha, J.W., and Gould, A.P. (2010). A *Drosophila* model for primary coenzyme Q deficiency and dietary rescue in the developing nervous system. *Disease models & mechanisms* 3, 799-806.

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

Grings, M., Moura, A.P., Amaral, A.U., Parmeggiani, B., Gasparotto, J., Moreira, J.C., Gelain, D.P., Wyse, A.T., Wajner, M., and Leipnitz, G. (2014). Sulfite disrupts brain mitochondrial energy homeostasis and induces mitochondrial permeability transition pore opening via thiol group modification. *Biochimica et biophysica acta* 1842, 1413-1422.

Grings, M., Moura, A.P., Parmeggiani, B., Marcowich, G.F., Amaral, A.U., de Souza Wyse, A.T., Wajner, M., and Leipnitz, G. (2013). Disturbance of brain energy and redox homeostasis provoked by sulfite and thiosulfate: potential pathomechanisms involved in the neuropathology of sulfite oxidase deficiency. *Gene* 531, 191-198.

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.

He, C.H., Black, D.S., Nguyen, T.P., Wang, C., Srinivasan, C., and Clarke, C.F. (2015). Yeast Coq9 controls deamination of coenzyme Q intermediates that derive from para-aminobenzoic acid. *Biochimica et biophysica acta* 1851, 1227-1239.

Bibliografía

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.

Hihl, A.K., Gao, Y., and Hekimi, S. (2002). Ubiquinone is necessary for *Caenorhabditis elegans* development at mitochondrial and non-mitochondrial sites. *The Journal of biological chemistry* 277, 2202-2206.

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

Hine, C., Harputlugil, E., Zhang, Y., Ruckenstuhl, C., Lee, B.C., Brace, L., Longchamp, A., Trevino-Villarreal, J.H., Mejia, P., Ozaki, C.K., et al. (2015). Endogenous hydrogen sulfide production is essential for dietary restriction benefits. *Cell* 160, 132-144.

Holbrook, J.A., Neu-Yilik, G., Hentze, M.W., and Kulozik, A.E. (2004). Nonsense-mediated decay approaches the clinic. *Nature genetics* 36, 801-808.

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.

Inoue, K., Ikegami, H., Fujisawa, T., Noso, S., Nojima, K., Babaya, N., Itoi-Babaya, M., Makimo, S., and Ogihara, T. (2004). Allelic variation in class I K gene as candidate for a second component of MHC-linked susceptibility to type 1 diabetes in non-obese diabetic mice. *Diabetologia* 47, 739-747.

Bibliografia

Jaburek, M., and Garland, 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.

Jackson, M.R., Melideo, S.L., and Jorns, M.S. (2012). Human sulfide:quinone oxidoreductase catalyzes the first step in hydrogen sulfide metabolism and produces a sulfane sulfur metabolite. *Biochemistry* 51, 6804-6815.

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.

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.

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.

Kabil, O., Motl, N., and Banerjee, R. (2014a). H₂S and its role in redox signaling. *Biochimica et biophysica acta* 1844, 1355-1366.

Kabil, O., Vitvitsky, V., and Banerjee, R. (2014b). Sulfur as a signaling nutrient through hydrogen sulfide. *Annual review of nutrition* 34, 171-205.

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.

Bibliografía

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.

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

Kayser, E.B., Morgan, P.G., and Sedensky, M.M. (2004). Mitochondrial complex I function affects halothane sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. *Anesthesiology* 101, 365-372.

Khajavi, M., Inoue, K., and Lupski, J.R. (2006). Nonsense-mediated mRNA decay modulates clinical outcome of genetic disease. *European journal of human genetics* : EJHG 14, 1074-1081.

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.

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.

Lapointe, J., Wang, Y., Bigras, E., and Hekimi, S. (2012). The submitochondrial distribution of ubiquinone affects respiration in long-lived *Melk1*^{+/-} 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.

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.

Bibliografia

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.

Libiad, M., Sriraman, A., and Banerjee, R. (2015). Polymorphic Variants of Human Rhodanese Exhibit Differences in Thermal Stability and Sulfur Transfer Kinetics. *The Journal of biological chemistry* *290*, 23579-23588.

Libiad, M., Yadav, P.K., Vitvitsky, V., Martinov, M., and Banerjee, R. (2014). Organization of the human mitochondrial hydrogen sulfide oxidation pathway. *The Journal of biological chemistry* *289*, 30901-30910.

Linden, D.R., Furne, J., Stoltz, G.J., Abdel-Rehim, M.S., Levitt, M.D., and Szurszewski, J.H. (2012). Sulphide quinone reductase contributes to hydrogen sulphide metabolism in murine peripheral tissues but not in the CNS. *British journal of pharmacology* *165*, 2178-2190.

Liu, J., Wu, Q., He, D., Ma, T., Du, L., Dui, W., Guo, X., and Jiao, R. (2011). *Drosophila* sbo regulates lifespan through its function in the synthesis of coenzyme Q in vivo. *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao* *38*, 225-234.

Lohman, D.C., Forouhar, F., Beebe, E.T., Stefely, M.S., Minogue, C.E., Ulbrich, A., Stefely, J.A., Sukumar, S., Luna-Sanchez, M., Jochem, A., et al. (2014). Mitochondrial COQ9 is a lipid-binding protein that associates with COQ7 to enable coenzyme Q biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *111*, E4697-4705.

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.

Bibliografía

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.

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*.

Luna-Sanchez, M., Diaz-Casado, E., Barca, E., Tejada, M.A., Montilla-Garcia, A., Cobos, E.J., Escames, G., Acuna-Castroviejo, D., Quinzii, C.M., and Lopez, L.C. (2015). The clinical heterogeneity of coenzyme Q10 deficiency results from genotypic differences in the *Coq9* gene. *EMBO molecular medicine* 7, 670-687.

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., Gin, P., Gulmezian, M., and Clarke, C.F. (2009). The yeast *Coq4* polypeptide organizes a mitochondrial protein complex essential for coenzyme Q biosynthesis. *Biochimica et biophysica acta* 1791, 69-75.

Marbois, B., Xie, L.X., Choi, S., Hirano, K., Hyman, K., and Clarke, C.F. (2010). para-Aminobenzoic acid is a precursor in coenzyme Q6 biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 285, 27827-27838.

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.

Bibliografía

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., Brautigan, 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-Viciana, T., Padilla-Lopez, S., Ballesteros, M., Vazquez-Fonseca, L., Gandolfo, P., Brautigan, 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.

Mekada, K., Abe, K., Murakami, A., Nakamura, S., Nakata, H., Moriwaki, K., Obata, Y., and Yoshiki, A. (2009). Genetic differences among C57BL/6 substrains. *Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science* 58, 141-149.

Modis, K., Bos, E.M., Calzia, E., van Goor, H., Coletta, C., Papapetropoulos, A., Hellmich, M.R., Radermacher, P., Bouillaud, F., and Szabo, C. (2014). Regulation of mitochondrial bioenergetic function by hydrogen sulfide. Part II. Pathophysiological and therapeutic aspects. *British journal of pharmacology* 171, 2123-2146.

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.

Bibliografía

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.

Monaghan, R.M., Barnes, R.G., Fisher, K., Andreou, T., Rooney, N., Poulin, G.B., and Whitmarsh, A.J. (2015). A nuclear role for the respiratory enzyme CLK-1 in regulating mitochondrial stress responses and longevity. *Nature cell biology* 17, 782-792.

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.

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.

Nierobisz, L.S., Hentz, N.G., Felts, J.V., and Mozdziak, P.E. (2010). Fiber phenotype and coenzyme Q(1)(0) content in Turkey skeletal muscles. *Cells, tissues, organs* 192, 382-394.

Niewmierzycka, A., and Clarke, S. (1999). S-Adenosylmethionine-dependent methylation in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of a novel protein

Bibliografía

arginine methyltransferase. *The Journal of biological chemistry* 274, 814-824.

Niknahad, H., and O'Brien, P.J. (2008). Mechanism of sulfite cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. *Chemico-biological interactions* 174, 147-154.

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. *Chem Biol* 18, 1134-1142.

Ozeir, M., Pelosi, L., Ismail, A., Mellot-Draznieks, C., Fontecave, M., and Pierrel, F. (2015). Coq6 Is Responsible for the C4-deamination Reaction in Coenzyme Q Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 290, 24140-24151.

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

Bibliografía

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.

Pagliarini, D.J., Calvo, S.E., Chang, B., Sheth, S.A., Vafai, S.B., Ong, S.E., Walford, G.A., Sugiana, C., Boneh, A., Chen, W.K., et al. (2008). A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell* 134, 112-123.

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.

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.

Parmeggiani, B., Moura, A.P., Grings, M., Bumbel, A.P., de Moura Alvorecem, L., Tauana Pletsch, J., Fernandes, C.G., Wyse, A.T., Wajner, M., and Leipnitz, G. (2015). In vitro evidence that sulfite impairs glutamatergic neurotransmission and inhibits glutathione metabolism-related enzymes in rat cerebral cortex. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 42, 68-75.

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-

Bibliografia

like mitochondrial protein (PLMP) and mitochondrial abnormalities in kd/kd mice. *Kidney Int* 66, 20-28.

Peng, M., Ostrovsky, J., Kwon, Y.J., Polyak, E., Licata, J., Tsukikawa, M., Marty, E., Thomas, J., Felix, C.A., Xiao, R., et al. (2015). Inhibiting cytosolic translation and autophagy improves health in mitochondrial disease. *Human molecular genetics* 24, 4829-4847.

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.

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 J* 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

Bibliografía

chain dysfunction and oxidative stress correlate with severity of primary CoQ10 deficiency. *FASEB J* 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.

Rana, K., Fam, B.C., Clarke, M.V., Pang, T.P., Zajac, J.D., and MacLean, H.E. (2011). Increased adiposity in DNA binding-dependent androgen receptor knockout male mice associated with decreased voluntary activity and not insulin resistance. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 301, E767-778.

Raymackers, J.M., Debaix, H., Colson-Van Schoor, M., De Backer, F., Tajeddine, N., Schwaller, B., Gailly, P., and Gillis, J.M. (2003). Consequence of parvalbumin deficiency in the mdx mouse: histological, biochemical and mechanical phenotype of a new double mutant. *Neuromuscular disorders : NMD* 13, 376-387.

Remelli, W., Guerrieri, N., Klodmann, J., Papenbrock, J., Pagani, S., and Forlani, F. (2012). Involvement of the *Azotobacter vinelandii* rhodanese-like protein Rhda in the glutathione regeneration pathway. *PLoS one* 7, e45193.

Rio Frio, T., Wade, N.M., Ransijn, A., Berson, E.L., Beckmann, J.S., and Rivolta, C. (2008). Premature termination codons in PRPF31 cause retinitis pigmentosa via haploinsufficiency due to nonsense-mediated mRNA decay. *The Journal of clinical investigation* 118, 1519-1531.

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.

Rogers, G.W., Brand, M.D., Petrosyan, S., Ashok, D., Elorza, A.A., Ferrick, D.A., and Murphy, A.N. (2011). High throughput microplate respiratory

Bibliografia

measurements using minimal quantities of isolated mitochondria. *PloS one* 6, e21746.

Rotig, A., Appelkvist, E.L., Geromel, V., Chretien, D., Kadhon, N., Ederly, 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. (2008). 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., 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.

Scalais, E., Chafai, R., Van Coster, R., Bindl, L., Nuttin, C., Panagiotaraki, C., Seneca, S., Lissens, W., Ribes, A., Geers, C., et al. (2013). Early myoclonic epilepsy, hypertrophic cardiomyopathy and subsequently a nephrotic syndrome in a patient with CoQ10 deficiency caused by mutations in para-hydroxybenzoate-polyprenyl transferase (*COQ2*). *European journal of paediatric neurology : EJPN : official journal of the European Paediatric Neurology Society* 17, 625-630.

Bibliografía

Schulte-Hostedde AI, M.J., Hickling GJ (2003). Intraspecific variation in testis size of small mammals: implications for muscle mass. *Canadian Journal of Zoology* 81, 591-595.

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.

Sommerville, R.B., Zaidman, C.M., and Pestronk, A. (2013). Coenzyme Q10 deficiency in children: frequent type 2C muscle fibers with normal morphology. *Muscle & nerve* 48, 722-726.

Stefely, J.A., Reidenbach, A.G., Ulbrich, A., Oruganty, K., Floyd, B.J., Jochem, A., Saunders, J.M., Johnson, I.E., Minogue, C.E., Wrobel, R.L., et al. (2015). Mitochondrial ADCK3 employs an atypical protein kinase-like fold to enable coenzyme Q biosynthesis. *Molecular cell* 57, 83-94.

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.

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., Ogawara, M., Shimizu, T., and Shirasawa, T. (2012). Restoration of the behavioral rates and lifespan in clk-1 mutant nematodes in response to exogenous coenzyme Q(10). *Experimental gerontology* 47, 276-279.

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.

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.

Bibliografia

Tanji, K., and Bonilla, E. (2008). Light microscopic methods to visualize mitochondria on tissue sections. *Methods* 46, 274-280.

Tauche, A., Krause-Buchholz, U., and Rodel, G. (2008). Ubiquinone biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the molecular organization of O-methylase Coq3p depends on Abc1p/Coq8p. *FEMS yeast research* 8, 1263-1275.

Tiranti, V., Viscomi, C., Hildebrandt, T., Di Meo, I., Mineri, R., Tiveron, C., Levitt, M.D., Prella, A., Fagiolari, G., Rimoldi, M., et al. (2009). Loss of ETHE1, a mitochondrial dioxygenase, causes fatal sulfide toxicity in ethylmalonic encephalopathy. *Nature medicine* 15, 200-205.

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.

Torres-Torronteras, J., Rodriguez-Palmero, A., Pinos, T., Accarino, A., Andreu, A.L., Pintos-Morell, G., and Martii, R. (2011). A novel nonstop mutation in TYMP does not induce nonstop mRNA decay in a MNGIE patient with severe neuropathy. *Human mutation* 32, E2061-2068.

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.

Trevisson, E., DiMauro, S., Navas, P., and Salviati, L. (2011). Coenzyme Q deficiency in muscle. *Current opinion in neurology* 24, 449-456.

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

Tyynismaa, H., Ylikallio, E., Patel, M., Molnar, M.J., Haller, R.G., and Suomalainen, A. (2009). A heterozygous truncating mutation in RRM2B

Bibliografía

causes autosomal-dominant progressive external ophthalmoplegia with multiple mtDNA deletions. *American journal of human genetics* 85, 290-295.

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.

Veeranki, S., and Tyagi, S.C. (2015). Role of hydrogen sulfide in skeletal muscle biology and metabolism. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* 46, 66-71.

Venhoff, N., Lebrecht, D., Pfeifer, D., Venhoff, A.C., Bisse, E., Kirschner, J., and Walker, U.A. (2012). Muscle-fiber transdifferentiation in an experimental model of respiratory chain myopathy. *Arthritis research & therapy* 14, R233.

Viscomi, C., Burlina, A.B., Dweikat, I., Savoiaro, M., Lamperti, C., Hildebrandt, T., Tiranti, V., and Zeviani, M. (2010). Combined treatment with oral metronidazole and N-acetylcysteine is effective in ethylmalonic encephalopathy. *Nature medicine* 16, 869-871.

Vitvitsky, V., Dayal, S., Stabler, S., Zhou, Y., Wang, H., Lentz, S.R., and Banerjee, R. (2004). Perturbations in homocysteine-linked redox homeostasis in a murine model for hyperhomocysteinemia. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 287, R39-46.

Vitvitsky, V., Martinov, M., Ataulakhanov, F., Miller, R.A., and Banerjee, R. (2013). Sulfur-based redox alterations in long-lived Snell dwarf mice. *Mechanisms of ageing and development* 134, 321-330.

Bibliografia

Walter, L., Miyoshi, H., Lerverve, 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., Lerverve, 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., Ozer, D., and Hekimi, S. (2015). Mitochondrial function and lifespan of mice with controlled ubiquinone biosynthesis. *Nature communications* 6, 6393.

Wojcicka, G., Jamroz-Wisniewska, A., Atanasova, P., Chaldakov, G.N., Chylinska-Kula, B., and Beltowski, J. (2011). Differential effects of statins on endogenous H₂S formation in perivascular adipose tissue. *Pharmacological research* 63, 68-76.

Wong, A., Boutis, P., and Hekimi, S. (1995). Mutations in the *clk-1* gene of *Caenorhabditis elegans* affect developmental and behavioral timing. *Genetics* 139, 1247-1259.

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.

Yubero, D., O'Callaghan, M., Montero, R., Ormazabal, A., Armstrong, J., Espinos, C., Rodriguez, M.A., Jou, C., Castejon, E., Aracil, M.A., et al. (2014). Association between coenzyme Q10 and glucose transporter (GLUT1) deficiency. *BMC pediatrics* 14, 284.

Bibliografía

Zetoune, A.B., Fontaniere, S., Magnin, D., Anczukow, O., Buisson, M., Zhang, C.X., and Mazoyer, S. (2008). Comparison of nonsense-mediated mRNA decay efficiency in various murine tissues. *BMC genetics* 9, 83.

Zhang, M., Wakitani, S., Hayashi, K., Miki, R., and Kawamukai, M. (2008). High production of sulfide in coenzyme Q deficient fission yeast. *BioFactors* 32, 91-98.

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*.

Anexos

ANEXO 1: COMPOSICIÓN DE LOS GELES NATIVOS DE POLIACRILAMIDA

Composición Gradiente	3% RESOLVING	13% RESOLVING	4% STACKING
AB mix^{*1} 48:1,5	0,305 ml	0,866 ml	0,25 ml
Buffer 3x^{*2}	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 μ l	7 μ l	12,5 μ l
TEMED	4 μ l	3 μ l	3 μ l

^{*1} **AB mix 48:1,5:** 48 g de Acrilamida / 1,5 g de Bis-Acrilamida.

^{*2} **Buffer 3x:** 150 mM Bis-Tris, 1.5 M ácido 6-aminohexanoico, pH 7.

Apéndice

Published online: March 23, 2015

Research Article

EMBO
Molecular Medicine

The clinical heterogeneity of coenzyme Q₁₀ deficiency results from genotypic differences in the *Coq9* gene

Marta Luna-Sánchez^{1,2}, Elena Díaz-Casado^{1,2}, Emanuele Barca³, Miguel Ángel Tejada^{4,5}, Ángeles Montilla-García^{4,5}, Enrique Javier Cobos^{4,5}, Germaine Escames^{1,2}, Dario Acuña-Castroviejo^{1,2}, Catarina M Quinzii³ & Luis Carlos López^{1,2,*}

Abstract

Primary coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀) deficiency is due to mutations in genes involved in CoQ biosynthesis. The disease has been associated with five major phenotypes, but a genotype-phenotype correlation is unclear. Here, we compare two mouse models with a genetic modification in *Coq9* gene (*Coq9^{Q95X}* and *Coq9^{R239X}*), and their responses to 2,4-dihydroxybenzoic acid (2,4-diHB). *Coq9^{R239X}* mice manifest severe widespread CoQ deficiency associated with fatal encephalomyopathy and respond to 2,4-diHB increasing CoQ levels. In contrast, *Coq9^{Q95X}* mice exhibit mild CoQ deficiency manifesting with reduction in CI+III activity and mitochondrial respiration in skeletal muscle, and late-onset mild mitochondrial myopathy, which does not respond to 2,4-diHB. We show that these differences are due to the levels of COQ biosynthetic proteins, suggesting that the presence of a truncated version of COQ9 protein in *Coq9^{R239X}* mice destabilizes the CoQ multiprotein complex. Our study points out the importance of the multiprotein complex for CoQ biosynthesis in mammals, which may provide new insights to understand the genotype-phenotype heterogeneity associated with human CoQ deficiency and may have a potential impact on the treatment of this mitochondrial disorder.

Keywords CoQ multiprotein complex; *Coq9*; mitochondrial myopathy; mouse model; nonsense-mediated mRNA decay

Subject Categories Genetics, Gene Therapy & Genetic Disease; Metabolism
DOI 10.15252/emmm.201404632 | Received 31 October 2014 | Revised 24 February 2015 | Accepted 26 February 2015

Introduction

Coenzyme Q (CoQ) is an essential molecule for mitochondrial ATP synthesis and other metabolic processes (Turunen *et al.*, 2004; Garcia-Corzo *et al.*, 2013). Its endogenous biosynthesis occurs ubiquitously in the mitochondria and starts with the formation of a 4-hydroxybenzoate (4-HB) head group and a lipophilic polyisoprenoid tail. While the quinone ring is derived from tyrosine or phenylalanine, the isoprenoid side chain is produced by addition of isopentenyl diphosphate molecules to farnesyl diphosphate or geranylgeranyl diphosphate in multiple steps catalyzed by polyprenyl diphosphate synthase (PDSS1–PDSS2). Then, 4-para-hydroxybenzoate: polyprenyl transferase, encoded by *Coq2*, mediates the conjugation of the aromatic ring precursor, 4-HB, to the side chain, while five other enzymes, encoded by *Coq3* to *Coq7*, reside in the mitochondrial inner membrane and modify the quinone ring of CoQ (Supplementary Fig S1) (Tran & Clarke, 2007). Other proteins are thought to have regulatory functions in the CoQ biosynthetic pathway: (i) COQ9 is essential for the function of COQ7, an enzyme that catalyzes the hydroxylation of demethoxyubiquinone to produce 5-hydroxyubiquinone (Garcia-Corzo *et al.*, 2013); (ii) ADCK3 and ADCK4 regulate other CoQ biosynthetic proteins by their kinase activities (Tran & Clarke, 2007); and (iii) PTC7 regulates the activity of COQ7 by its phosphatase activity (Martin-Montalvo *et al.*, 2013). Moreover, several studies have shown evidence that, in yeast, the enzymes required for CoQ biosynthesis are organized in a multiprotein complex. This organization would allow channeling of labile/reactive intermediates, enhance catalytic efficiency, and provide a mechanism for coordinative regulation of components (Tran & Clarke, 2007). However, there is no proof of the existence of a multiprotein complex for CoQ biosynthesis in mammals.

Mutations in CoQ biosynthetic genes produce primary CoQ₁₀ deficiency, a mitochondrial syndrome with five major clinical presentations: (i) encephalomyopathy with brain involvement and

1 Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada, Spain
2 Centro de Investigación Biomédica, Instituto de Biotecnología, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Granada, Spain
3 Department of Neurology, Columbia University Medical Center, New York, NY, USA
4 Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada, Spain
5 Centro de Investigación Biomédica, Instituto de Neurociencias, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Granada, Spain
*Corresponding author. Tel: +34 9582 41000, ext 20197; E-mail: luisca@ugr.es

recurrent myoglobinuria; (ii) infantile multisystem disorder with encephalopathy usually associated with nephropathy and variable involvement of other organs; (iii) ataxic syndrome with cerebellar atrophy; (iv) isolated myopathy; and (v) steroid-resistant nephrotic syndrome (Emmanuele et al, 2012). Moreover, mutations in *COQ2* have been recently reported in Japanese patients with multiple system atrophy (Multiple-System Atrophy Research, 2013). The causes of this clinical variability are unknown, and it is difficult to explain why mutations in the same gene may cause different phenotypes, for example, mutations in *COQ2* and *COQ6* have been associated with isolated nephropathy or multisystemic disease (Quinzii et al, 2006; Diomedì-Camassei et al, 2007; Heeringa et al, 2011; Jakobs et al, 2013), due to the limited number of patients described.

To better understand the pathophysiological consequences of primary CoQ₁₀ deficiency, we recently generated a mouse model carrying a homozygous mutation in *Coq9* gene (R239X, *Coq9*^{R239X}). This mutation is homologous to the human R244X mutation (Duncan et al, 2009). *Coq9*^{R239X} mice showed widespread CoQ deficiency (García-Corzo et al, 2013), and their characterization demonstrated that: (i) the presence of a dysfunctional COQ9 protein and/or the deficit in CoQ in the brain causes an increase in free complex III, leading to a decrease in mitochondrial respiration and ATP synthesis, (ii) mitochondrial dysfunction in the brain induces oxidative damage and a caspase-independent apoptotic cell death, and (iii) the encephalomyopathic form of CoQ deficiency is progressive and takes place with neuronal death, severe reactive astrogliosis and spongiform degeneration. Therefore, *Coq9*^{R239X} mice show clinical, histopathological, biochemical and molecular signs of a fatal mitochondrial encephalomyopathy (García-Corzo et al, 2013).

To understand the molecular mechanisms underlying the genotype–phenotype correlation in CoQ deficiency, we have generated and characterized at biochemical, molecular and clinical level a new mouse model with a different genetic defect in the same *Coq9* gene, specifically, a homozygous *Coq9* Q95X mutant (*Coq9*^{Q95X}), to compare with the *Coq9*^{R239X} mouse model.

Results

Lack of the Coq9 protein causes moderate CoQ deficiency

Coq9^{Q95X} mice pups had normal development and were indistinguishable from wild-type mice (*Coq9*^{+/+}). As described in the *Coq9*^{R239X}, by postnatal day 21, *Coq9*^{Q95X} mice had also lost their body hair (Fig 1A), which grew back during the next hair growth cycle.

To prove that wild-type COQ9 protein was not produced in *Coq9*^{Q95X} mice, we first performed an immunoblotting analysis using two different anti-COQ9 antibodies: one against amino acids 165–318, to map the C-terminal region of the protein (sc-271892), and the other against amino acids 160–190, corresponding to a region within internal sequence of the COQ9 protein (ab-104189). No protein was detected in *Coq9*^{Q95X} mice compared to wild-type (Fig 1B). To check whether the premature termination of the COQ9 protein induces the complete loss of the protein, we also performed a proteomic analysis by high-resolution LC-MS/MS against six

identified peptides from the COQ9 protein, one of them being (QQPPHSSSQHSETQGPFSRPPR) present in a possible truncated version of the protein of 95 amino acids (Pagliarini et al, 2008). Although COQ9 was clearly detected in the wild-type samples, none of its peptides were observed in *Coq9*^{Q95X} mice (Fig 1C), demonstrating that the COQ9 protein was completely absent in *Coq9*^{Q95X} mice. In contrast, in *Coq9*^{R239X} mice, a truncated version of COQ9 protein was observed by Western blot using an antibody against the internal sequence of the protein (Supplementary Fig S2).

The consequence of the lack of the COQ9 protein was a significant decrease of both CoQ₉ (the major form of ubiquinone in rodents) and CoQ₁₀ levels in all examined tissues (cerebrum, cerebellum, heart, kidney, extensor and triceps surae) of *Coq9*^{Q95X} mice compared with the age-mated *Coq9*^{+/+} mice (Fig 2A–F and Supplementary Fig S3A–F). While CoQ₉ levels were around 50% in cerebrum, cerebellum and heart (Fig 2A–C), kidney and skeletal muscle had 30% of residual CoQ₉ levels compared with wild-type animals (Fig 2D–F).

An intriguing observation was that in all tissues, CoQ₉ levels in *Coq9*^{Q95X} mice were higher compared with *Coq9*^{R239X} mice, in which residual CoQ₉ levels were around 20% compared to wild-type animals (Fig 3A–F). However, muscle was the tissue with more similar CoQ₉ levels between both models (Fig 3F).

Two distinctive mutations in the Coq9 gene induce different changes in the Coq biosynthetic gene expression and protein level

The differences found in CoQ₉ levels between the *Coq9*^{Q95X} and *Coq9*^{R239X} mice may be due to differences in the expression of the *Coq* genes or, alternatively, to differences in the stability of the CoQ multiprotein complex manifested by different levels of CoQ proteins.

By virtue of that, we first determined mRNA expression levels of some genes encoding proteins that are involved in CoQ biosynthesis and are components of the CoQ multiprotein complex, that is, *Coq9*, *Coq7*, *Coq6*, *Coq5* and *Adck3*, in cerebrum, kidney and muscle from age-matched *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{Q95X} and *Coq9*^{R239X} mice.

In cerebrum and kidney, *Coq9* mRNA levels were nearly undetectable in *Coq9*^{Q95X} compared with *Coq9*^{+/+} mice (1 ± 0.38 and 1 ± 0.90%, respectively) and significantly decreased in *Coq9*^{R239X} compared with *Coq9*^{+/+} mice (18 ± 0.38 and 10 ± 0.21%, respectively) (Fig 4A and F). Similar levels of *Coq7* and *Coq5* mRNA expression were detected in cerebrum and kidney of *Coq9*^{Q95X}, *Coq9*^{R239X} and *Coq9*^{+/+} mice (Fig 4B, D, G and I), while *Coq6* was significantly decreased (72.1 ± 4.35%) only in cerebrum of *Coq9*^{Q95X} compared with *Coq9*^{+/+} mice (Fig 4D); *Adck3* was slightly increased in kidney of *Coq9*^{R239X} compared to *Coq9*^{Q95X} (116 ± 7.9 versus 85.1 ± 20.6%) (Fig 4H). In muscle, *Coq9* mRNA levels were similarly decreased in both *Coq9*^{Q95X} and *Coq9*^{R239X} (3 ± 0.9 and 0.5 ± 0.2%) compared to *Coq9*^{+/+} mice (Fig 4K). Moreover, *Adck3* and *Coq5* mRNA levels were significantly decreased in *Coq9*^{Q95X} mice compared to *Coq9*^{+/+} mice (65.3 ± 11.1% for *Adck3* and 77.6 ± 8.9% for *Coq5*) (Fig 4M and N). Comparing the two mutant mice, it is remarkable that *Coq9* mRNA expression levels in cerebrum and kidney of *Coq9*^{R239X} mice were significantly higher

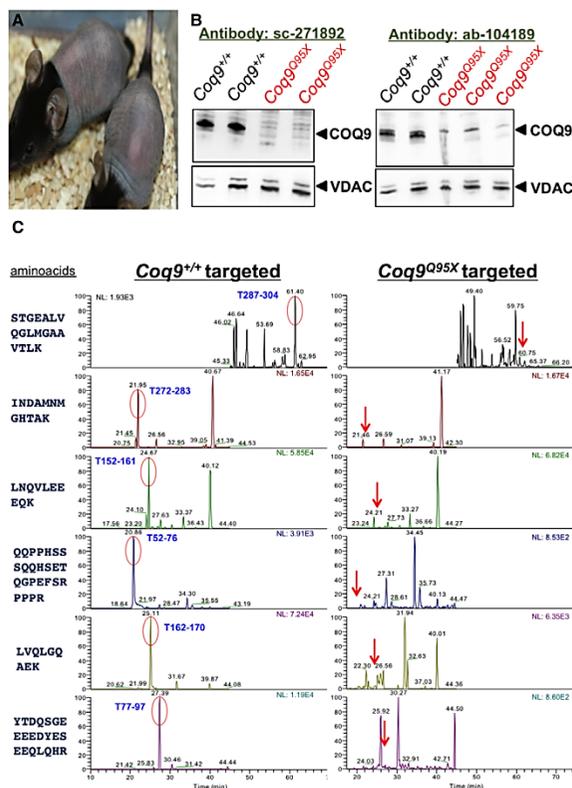


Figure 1. *Coq9*^{Q95X} mice at 21 postnatal days and analysis of COQ9 protein.

A *Coq9*^{Q95X} mice at 21 postnatal days showing the loss of corporal hair.

B Representative Western blot images of COQ9 protein in kidney homogenate from *Coq9*^{+/+} (*n* = 4) and *Coq9*^{Q95X} mice (*n* = 4) at 3 months of age. Antibody sc-271892 was used to map the C-terminal region of the COQ9 protein and antibody ab-104189 was used to map the internal sequence of the COQ9 protein.

C High-resolution LC-MS/MS proteomic analysis of kidney mitochondria from *Coq9*^{+/+} (*n* = 3) and *Coq9*^{Q95X} mice (*n* = 3) at 3 months of age. None of the six peptides of the COQ9 protein identified in *Coq9*^{+/+} mice was detected in *Coq9*^{Q95X} mice.

Source data are available online for this figure.

compared to *Coq9*^{Q95X} (18.3 ± 1.6 versus $1.3 \pm 0.4\%$ in cerebrum and 10.6 ± 2.2 versus $1.3 \pm 0.9\%$ in kidney) (Fig 4A and F). In contrast, in muscle, there were no differences in *Coq9* mRNA levels between the two mutant models (Fig 4K). The degradation of the mutant *Coq9* mRNA in both mouse models (*Coq9*^{Q95X} and *Coq9*^{R239X}) is due to nonsense-mediated mRNA decay (NMD) since

the treatment of mutant MEFs with cyclohexamide, an inhibitor of NMD (Rio Frio *et al*, 2008), increased the levels of *Coq9* mRNA in *Coq9*^{Q95X} (fold increase 5.5 ± 1.1 , treated/untreated) and *Coq9*^{R239X} (fold increase 21.4 ± 6.8 , treated/untreated) compared to the mild effect in *Coq9*^{+/+} (fold increase 1.5 ± 0.1 , treated/untreated) cells (Table 1).

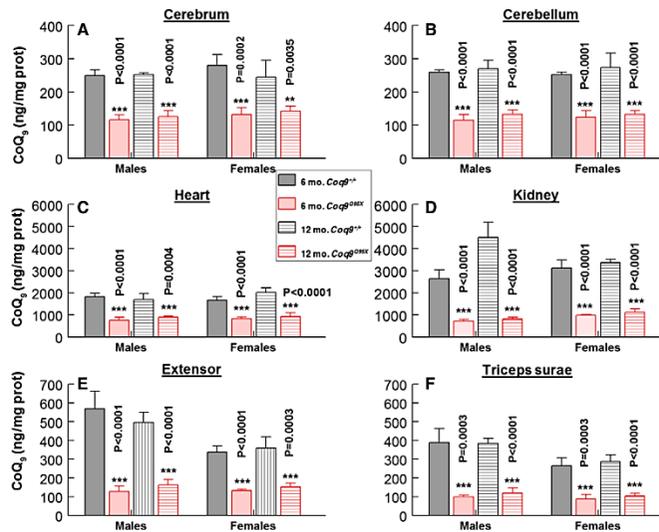


Figure 2. Coq9^{Q255X} mice showed moderate CoQ deficiency.
A-F CoQ₉ levels in tissue homogenates from brain (A), cerebellum (B), heart (C), kidney (D), extensor (E) and triceps surae (F) of male and female *Coq9*^{+/+} and *Coq9*^{Q255X} mice at 6 and 12 months of age. Data are expressed as mean ± SD. Statistical analysis was performed on 6-month-old *Coq9*^{+/+} mice versus 6-month-old *Coq9*^{Q255X} mice and 12-month-old *Coq9*^{+/+} mice versus 12-month-old *Coq9*^{Q255X} mice. **P < 0.01; ***P < 0.001. Student's t-test (n = 8 for each group). Source data are available online for this figure.

Secondly, we measured the levels of the CoQ biosynthetic proteins encoded by these genes. In *Coq9*^{Q255X} mice, steady-state levels of COQ7 and COQ5 were significantly decreased in cerebrium (19 ± 9 and 41 ± 13%), kidney (9 ± 6 and 50 ± 9%) and muscle (16 ± 3 and 17 ± 6%) compared with *Coq9*^{+/+} mice. *Coq9*^{R239X} mice showed extremely reduced levels of COQ5 and COQ7 in cerebrium (0.1 ± 0.1 and 35 ± 11%), kidney (0.1 ± 0.1 and 38 ± 14%), and muscle (undetectable, and 17 ± 6%) compared to *Coq9*^{+/+} mice (Supplementary Fig S4A and C; Fig 5A, C, E and G).

In cerebrium and muscle, ADCK3 levels were unchanged in *Coq9*^{Q255X} mice and decreased in *Coq9*^{R239X} mice compared to *Coq9*^{+/+} mice (55 ± 19 and 51 ± 3%) (Supplementary Fig S4; Fig 5F). In kidney, ADCK3 and COQ6 levels were significantly increased in *Coq9*^{Q255X} mice (162 ± 18 and 179 ± 20%) compared with *Coq9*^{+/+} mice and reduced in *Coq9*^{R239X} mice compared with *Coq9*^{Q255X} mice (43 ± 17% for ADCK3 and 31 ± 9% for COQ6) (Fig 5B and D). Muscle of *Coq9*^{Q255X} mice also showed a significant decrease of COQ6 compared to *Coq9*^{+/+} mice (45 ± 5%) (Fig 5H).

Consistent with the results obtained in *Coq9*^{R239X} mice, human skin fibroblasts carrying the R239X homologue mutation (COQ9^{R244X}) showed a reduction in COQ9, COQ7, ADCK3 and COQ5 protein levels (Supplementary Fig S5A–D).

Moderate CoQ deficiency in *Coq9*^{Q255X} mice leads to impaired mitochondrial bioenergetics function

To assess whether there was a direct correlation between the tissue CoQ deficiency and the bioenergetics defect, we next evaluated CoQ levels and mitochondrial respiratory chain function in isolated mitochondria from cerebrium, kidney and muscle of *Coq9*^{Q255X} and control mice at 6 months of age. Mitochondrial CoQ levels were significantly decreased in cerebrium, kidney and muscle of *Coq9*^{Q255X} compared with *Coq9*^{+/+} mice (Fig 6A–C), and the level of CoQ deficiency correlated with the CoQ levels measured in tissue homogenates.

CoQ-dependent mitochondrial CI+III activity was considerably reduced only in kidney and muscle of female *Coq9*^{Q255X} mice, while there were no differences in mutant males when compared with the wild-type littermates (Fig 6D–F). On the contrary, CoQ-dependent CII+III activities were comparable in mutant and control mice (Fig 6G–I). These results correlate with the levels of CoQ because the decrease in CI+III and CII+III activities were more pronounced in *Coq9*^{R239X} mice (García-Corzo et al. 2013).

The analysis by blue native gel electrophoresis (BNGE) followed by immunoblotting with an anti-core I (complex III

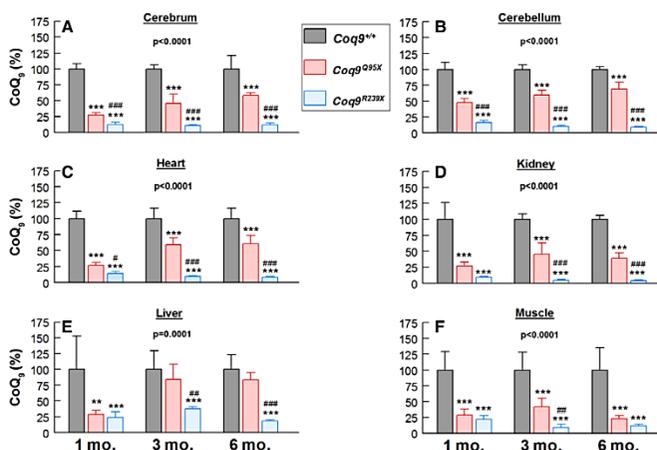


Figure 3. *Coq9*^{Q95X} mice exhibited higher CoQ levels compared with *Coq9*^{R239X} mice.

A–F Residual CoQ₁₀ levels in tissue homogenates from brain (A), cerebellum (B), heart (C), kidney (D), liver (E) and skeletal muscle (F) of *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{Q95X} and *Coq9*^{R239X} mice at 1, 3 and 5 months of age. Data are expressed as mean ± SD. ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, *Coq9*^{Q95X} and *Coq9*^{R239X} mice versus *Coq9*^{+/+} mice. #*P* < 0.05; ##*P* < 0.01, ###*P* < 0.001, *Coq9*^{Q95X} versus *Coq9*^{R239X} mice (one-way ANOVA with a Tukey's post hoc test; *n* = 8 for each group, numbers above columns indicate *P*-values of the one-way ANOVA test).

subunit) antibody showed that the overall amount of complex III substantially forming SC, as well as the free complex III, was similar in cerebral, kidney and muscle mitochondria of *Coq9*^{Q95X} and *Coq9*^{+/+} mice (Fig 6J–L). These results differ from those in *Coq9*^{R239X} mice, where an increase of free complex III was detected in cerebrum and kidney (Garcia-Corzo et al, 2013).

The bioenergetics defect in kidney and muscle of *Coq9*^{Q95X} mice was confirmed by measurement of mitochondrial O₂ consumption using isolated mitochondria in the XF²⁴ Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience). In kidney, the phosphorylating respiration (State 3o, in the presence of ADP and substrates) showed a significant decrease in *Coq9*^{Q95X} females (82 ± 6%), and *Coq9*^{R239X} males and females (56 ± 13 and 57 ± 1%, respectively) compared with wild-type controls (Fig 7A and B and Supplementary Fig S7A). In muscle, State 3o was significantly decreased in *Coq9*^{Q95X} (62 ± 7% in males and 73 ± 6% in females) and *Coq9*^{R239X} mice (58 ± 10% in males and 44 ± 4% in females) (Fig 7C and D and Supplementary Fig S7B). In both mutant models, the percentage of decrease in the ADP-stimulated respiration was higher in muscle than in kidney (Fig 7A and C). Similar data were obtained in other respiratory states, for example, basal respiration (State 2), resting respiration (State 4, after the addition of oligomycin) and maximal uncoupler-stimulated respiration (State 3u, after the addition of FCCP) (Supplementary Figs S6A–F and S7A and B and Fig 7B and D).

Morphological evaluation of *Coq9*^{Q95X} mice

To assess whether the moderate CoQ deficiency and mitochondrial bioenergetics impairment lead to structural changes in *Coq9*^{Q95X} mice tissues, we performed histopathological and histochemical analysis of different sections from cerebrum, kidney and muscle at different ages and compared them with the age- and sex-matched *Coq9*^{+/+} littermates.

Hematoxylin and eosin (H&E) and Luxol fast blue (LFB) stains of cerebrum did not show any structural abnormalities at 3 months of age (Supplementary Fig S8A–D). Likewise, the periodic acid-Schiff (PAS) stain did not reveal histologic alterations in kidney (Supplementary Fig S8E and F). Further evaluation of kidney at 12 and 18 months of age did not show any anatomopathological changes (Supplementary Fig S11A–H). These results, together with the normal biomarkers levels obtained from urine albumin and urea (Supplementary Table S1), suggest that *Coq9*^{Q95X} mice did not manifest evidence of kidney diseases associated with CoQ deficiency.

In *triceps surae* muscle, we observed round-shaped muscle fibers with central nuclei in one *Coq9*^{Q95X} female sample (out of six) (Supplementary Fig S8G–J). To check whether this was an isolated event or it was a sign of muscle pathology, we next performed a histochemical examination of *triceps surae* in controls and homozygous mutant mice at 3, 6, 12 and 18 months of age. In younger *Coq9*^{Q95X} mice (3–12 months old), cytochrome c oxidase (COX) and succinate dehydrogenase (SDH) activity did not differ

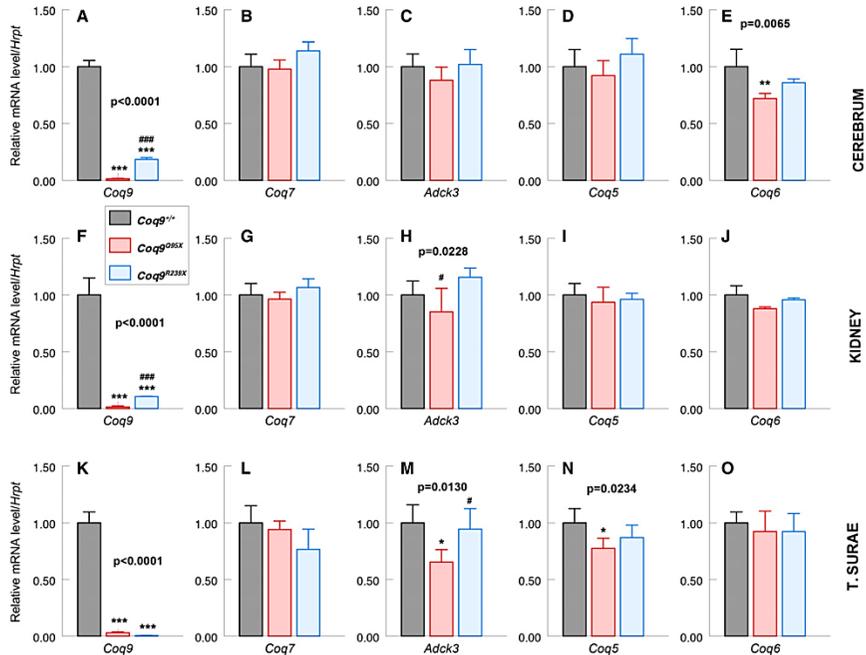


Table 1. Administration of cyclohexamide (CH) inhibits NMD in MEFs from Coq9^{Q95X} and Coq9^{Q239X} mice.

	Coq9 mRNA (CH-treated/untreated)
Coq9 ^{+/+}	1.54 ± 0.12
Coq9 ^{Q95X}	5.47 ± 1.14*
Coq9 ^{Q239X}	21.44 ± 6.8**##

The results are represented as fold increase of Coq9 mRNA levels after cyclohexamide administration. Data are expressed as the mean ± SD of five experiments in triplicates per group. One-way ANOVA with a Tukey *post hoc* test. **P* < 0.05; ***P* < 0.01; Coq9^{Q95X} and Coq9^{Q239X} mice versus Coq9^{+/+} mice. ##*P* < 0.01; Coq9^{Q95X} versus Coq9^{Q239X} mice. One-way ANOVA for comparison between the three experimental groups: *P* = 0.0022.

compared to Coq9^{+/+} littermates (Fig 8A, B, E and F and Supplementary Fig S9A–H). Nevertheless, at 18 months, Coq9^{Q95X} females showed a higher number of COX- and SDH-negative fibers (Fig 8C, D, G and H), suggesting that there was a shift from type I fibers (slow-twitch) to type II fibers (fast-twitch). The Gomori trichrome stain did not show signs of mitochondrial proliferation and scattered ragged red fibers (RRF) (Fig 8I–L and Supplementary Fig S9I–L). No changes in the overall architecture and general morphology were detected by H&E stain (Fig 8M–P and Supplementary Fig S9M–P).

Immunohistochemistry with primary anti-glial fibrillary acid protein (GFAP) antibody did not show significant changes in the distribution and number of astrocytes in diencephalon

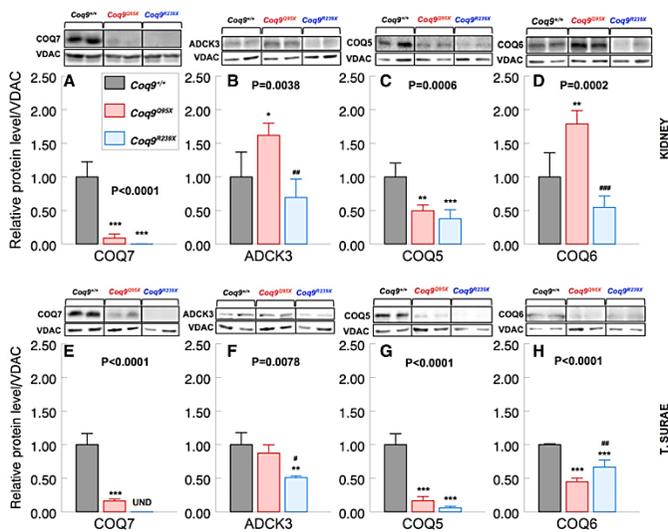


Figure 5. Levels of COQ biosynthetic proteins.

A–D Representative Western blot and quantitation of Western blot bands of COQ7 (A), ADCK3 (B), COQ5 (C) and COQ6 (D), and VDAC1 as a loading control in the kidneys of 3-month-old mice. **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001; *Coq9*^{Q95X} and *Coq9*^{R239X} mice versus *Coq9*^{+/+} mice. ##*P* < 0.01; ###*P* < 0.001; *Coq9*^{Q95X} versus *Coq9*^{R239X} mice. One-way ANOVA with a Tukey's *post hoc* test.

E–H Representative Western blot and quantitation of Western blot bands of COQ7 (E), ADCK3 (F), COQ5 (G) and COQ6 (H), and VDAC1 as a loading control in skeletal muscle of 3-month-old mice. ***P* < 0.01; ****P* < 0.001; *Coq9*^{Q95X} and *Coq9*^{R239X} mice versus *Coq9*^{+/+} mice. #*P* < 0.05; ##*P* < 0.01; *Coq9*^{Q95X} versus *Coq9*^{R239X} mice.

Data information: All values are presented as mean ± SD. One-way ANOVA with a Tukey's *post hoc* test. Numbers above columns indicate *P*-values of the one-way ANOVA test. *Coq9*^{+/+} mice *n* = 4; *Coq9*^{Q95X} and *Coq9*^{R239X} mice *n* = 5. Source data are available online for this figure.

(Supplementary Fig S10A, B, E and F) and pons (Supplementary Fig S10I, J, M and N) of 12-month-old *Coq9*^{Q95X}. At 18 months of age, there was an overall increase of astrocytes proliferation with no differences between mutants and control animals (Supplementary Fig S10C, D, G, H, K, L, O and P). Heart evaluation at 12 and 18 months of age did not show any anatomopathological changes (Supplementary Fig S11–P).

Female *Coq9*^{Q95X} mice develop a mild myopathic phenotype with exercise intolerance

Because the muscle was the most impaired tissue in *Coq9*^{Q95X} homozygous mice, we assessed the locomotor activity and muscle strength at 6 months of age. Compared to sex-matched wild-type controls, *Coq9*^{Q95X} females showed a significant reduction on the average speed during the use of the wheel and spontaneous wheel activity, while there were no differences between mutant and control male animals (Fig 9A–C). The decrease in the distance travelled in the home-cage running wheels was corroborated by the

observation of reduced spontaneous movement in the open-field test (Fig 9E). Likewise, the reaches score obtained in the hanging wire test was lower just in homozygous mutant females (Fig 9D). However, muscle strength of forelimbs was not affected (Fig 9F). The life span of *Coq9*^{Q95X} and *Coq9*^{+/+} mice was similar in both genders.

Effects of oral administration of 2,4-dihydroxybenzoic acid (2,4-diHB)

As a proof of concept, we also evaluated whether the stability of the CoQ multiprotein complex would affect a possible bypass therapy. For that purpose, we treated *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{Q95X} and *Coq9*^{R239X} mice with oral 2,4-dihydroxybenzoic acid (2,4-diHB), which has been previously tested as a bypass therapy for Δ coq7 *Saccharomyces cerevisiae* strains (Xie et al, 2012; Doimo et al, 2014). After 1 month of treatment, *Coq9*^{Q95X} and *Coq9*^{+/+} mice showed a reduction of kidney CoQ₉ levels compared with the non-treated littermate (Fig 10A and B and Supplementary Fig S12A–D). On the contrary,

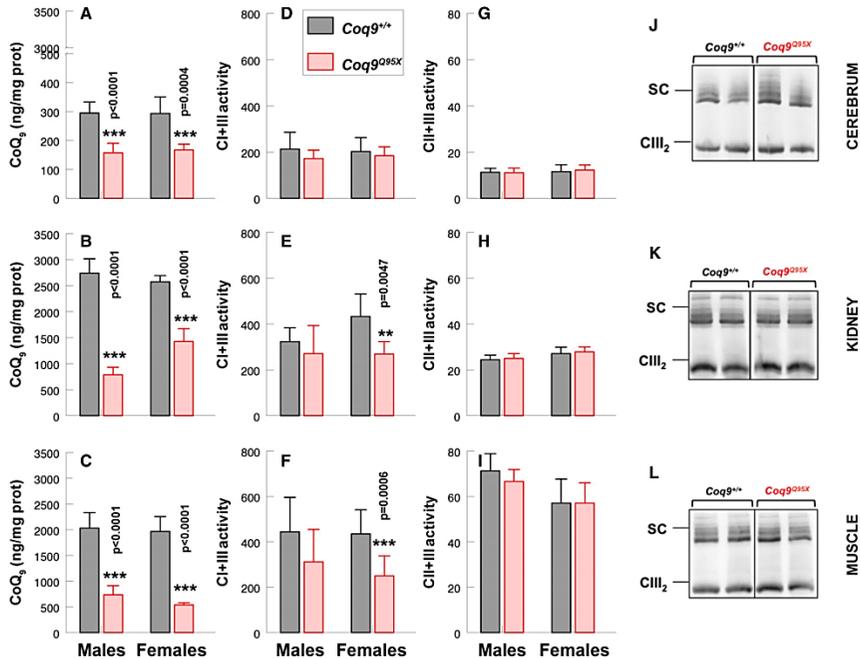


Figure 6. Moderate CoQ deficiency in *Coq9^{Q95X}* mice leads to impaired mitochondrial bioenergetics function.

A–C Mitochondrial CoQ₉ levels from cerebrium (A), kidney (B) and skeletal muscle (C) of *Coq9^{+/+}* and *Coq9^{Q95X}* males and females. *n* = 8 for each group. D–F CI+III activity in cerebrium (D), kidney (E) and skeletal muscle (F) of male and female *Coq9^{+/+}* and *Coq9^{Q95X}* mice. *n* = 6 for each group. G–I CI+III activity in cerebrium (G), kidney (H) and skeletal muscle (I) of male and female *Coq9^{+/+}* and *Coq9^{Q95X}* mice. *n* = 6 for each group. J–L Blue-native gel electrophoresis (BNGE) followed by immunoblotting analysis of mitochondrial supercomplexes from *Coq9^{+/+}* (*n* = 3) and *Coq9^{Q95X}* mice (*n* = 4) at 3 months of age.

Data information: (A–I) Data are expressed as mean ± SD. Statistical analyses were performed on *Coq9^{+/+}* male mice versus *Coq9^{Q95X}* male mice and *Coq9^{+/+}* female mice versus *Coq9^{Q95X}* female mice. ***P* < 0.01; ****P* < 0.001. Student's *t*-test. Complex I+III, NADH-cytochrome *c* reductase; complex II+III, SDH-cytochrome *c* reductase. Source data are available online for this figure.

Coq9^{R239X} mice treated with 2,4-diHB exhibited significantly higher levels of CoQ₉ (184 ± 9.3%) compared with untreated *Coq9^{R239X}* mice (Fig 10A and B and Supplementary Fig S12E and F). Interestingly, this increase in CoQ₉ levels in *Coq9^{R239X}* mice was also observed in the skin fibroblasts from the patient with the homolog *COQ9^{R244X}* molecular defect treated with 2,4-diHB (175.8 ± 5.6%), while in control fibroblasts, CoQ₁₀ biosynthesis was inhibited by 2,4-diHB supplementation (Fig 10C and D and Supplementary Fig S12G and H).

The HPLC chromatographs used to quantify the CoQ levels showed an abnormal peak in *Coq9^{+/+}*, *Coq9^{Q95X}* and *Coq9^{R239X}* mice treated with 2,4-diHB. The retention time of this additional peak

was 7.5 min. The mass spectral identification of this lipid exhibited a molecular ion peak of 767.634 [M + H]⁺ and 789.616 [M + Na]⁺ (Fig 10I) and could thus be identified as the reduced demethoxy-ubiquinone 9 (DMQ₉H₂) (theoretical mass [C₅₃H₈₂O₃] = 767.63422 [M + H]⁺ and 789.61616 [M + Na]⁺).

Discussion

Primary CoQ₁₀ deficiency is an autosomal recessive condition with extremely variable age of onset and clinical manifestations. The reason for the marked diversity in the clinical phenotypes associated

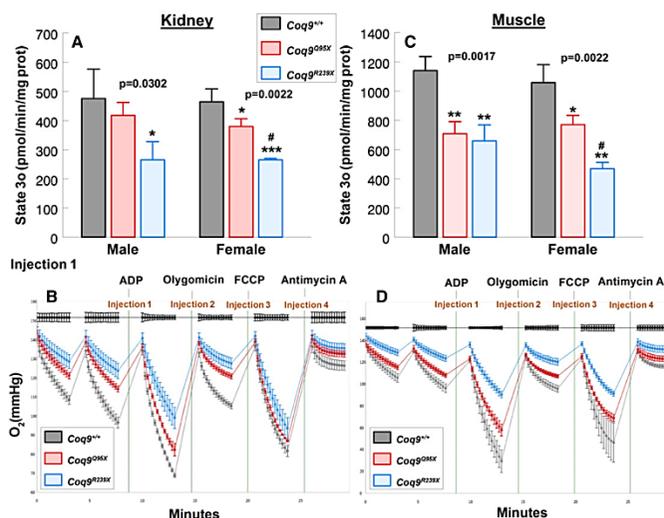


Figure 7. Mitochondrial respiration of *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{Q95X} and *Coq9*^{R239X} mice.

A–D Measurement of phosphorylating respiration (represented as State 3_o, in the presence of ADP and substrates) in kidney (A) and skeletal muscle (C) from male and female *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{Q95X} and *Coq9*^{R239X} mice at 3 months of age. Representative O₂ consumption graphic in kidney (B) and skeletal muscle (D) from female *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{Q95X} and *Coq9*^{R239X} mice.

Data information: All values are presented as mean ± SD. (A, C) **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001; *Coq9*^{Q95X} and *Coq9*^{R239X} mice versus *Coq9*^{+/+} mice. #*P* < 0.05; *Coq9*^{Q95X} versus *Coq9*^{R239X} mice. One-way ANOVA with a Tukey's post hoc test. Numbers above columns indicate *P*-values of the one-way ANOVA test (*n* = 3 for each group).

with mutations in individual genes remains still unclear (Desbats et al., 2014). In this study, we demonstrate that two different premature terminations in the COQ9 protein distinctively affect the levels of other COQ proteins, suggesting that the truncated version of the COQ9 protein produced in the *Coq9*^{R239X} mouse model induces a dominant-negative effect on the multiprotein complex for CoQ biosynthesis. As a consequence, the *Coq9*^{R239X} mouse model has a global reduction in the COQ proteins, which causes severe CoQ deficiency and clinical phenotype. In contrast, in the new *Coq9*^{Q95X} mouse model reported here, the lack of COQ9 protein results in decreased levels of only COQ7 and COQ5 proteins, which leads to moderate CoQ deficiency and a mild mitochondrial myopathy, especially evident in females. Therefore, the stability of this multiprotein complex is a key factor in the CoQ biosynthesis rate and, consequently, in the degree of the severity of CoQ deficiency and in the development of a particular clinical phenotype.

Genetic diseases caused by nonsense or frameshift mutations can generate premature termination codons, which usually trigger nonsense-mediated mRNA decay (NMD). This process is considered to be a surveillance pathway reducing the amount of non-functional

mRNA that would produce truncated proteins with dominant-negative or deleterious gain-of-function activities (Brogna & Wen, 2009). Because premature terminations of COQ9 are induced in both mouse models, *Coq9*^{Q95X} and *Coq9*^{R239X}, it was expected a degradation of *Coq9* mRNA by NMD. Accordingly, *Coq9* mRNA was undetectable in cerebrum, kidney and muscle of *Coq9*^{Q95X} mice. On the contrary, *Coq9* mRNA was detectable in cerebrum and kidney of *Coq9*^{R239X} mice, being the levels around 15% of the control values. As in other genetic diseases (Holbrook et al., 2004; Rio Frio et al., 2008), the low levels of *Coq9* mRNA are due to NMD because the incubation of *Coq9*^{Q95X} and *Coq9*^{R239X} MEFs with the NMD inhibitor cyclohexamide increased the *Coq9* mRNA levels. Therefore, the differences in *Coq9* mRNA levels between the two mouse models may account for differences in the efficiency of the NMD to degrade the *Coq9* mRNA containing two nonsense mutations that cause different premature terminations (Inoue et al., 2004; Gong et al., 2014). A different pattern was, however, observed in muscle, where *Coq9* mRNA levels were almost undetectable in both *Coq9*^{Q95X} and *Coq9*^{R239X} mice, suggesting that there is tissue specificity in the efficiency of NMD. The existence of this tissue specificity of RNA surveillance has been previously reported in other diseases, for example,

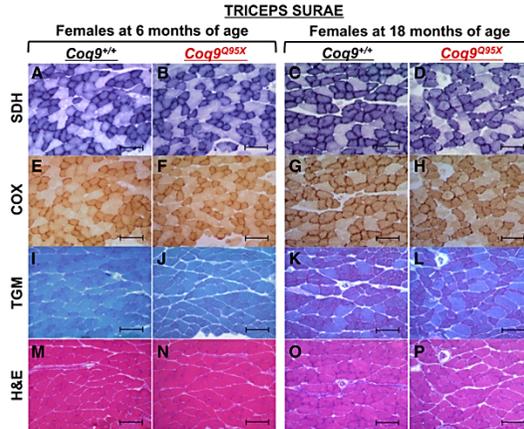


Figure 8. Histopathology of muscle from female *Coq9*^{+/+} and *Coq9*^{Q95X} mice at 6 and 18 months of age.
 A–H Complex II (SDH) and complex IV (COX) histochemistry of *triceps surae* showing a decreased stain in 18-month-old *Coq9*^{Q95X} female mice (D, H) in contrast to normal SDH and COX activity in 6- and 18-month-old *Coq9*^{+/+} (A, C, E, G), as well as 6-month-old *Coq9*^{Q95X} female mice (B, F).
 I–L Gomori trichrome stain (TGM) of *triceps surae* showed no differences between 6- and 18-month-old *Coq9*^{+/+} and *Coq9*^{Q95X} female mice.
 M–P Hematoxylin and eosin (H&E) stains of *triceps surae* did not reveal any structural abnormality.
 Data information: Scale bars: 100 μ m. n = 3 for each group. Complex IV, cytochrome c oxidase (COX); complex II, succinate dehydrogenase (SDH).

osteogenesis imperfecta type I due to premature termination codon mutations *COL1A1* gene (Bateman *et al.* 2003; Zetoune *et al.* 2008). These differences in the efficiency of NMD between tissues are due to variable expression of the NMD factors (Zetoune *et al.* 2008) and contribute to how disease manifests in different tissues (Khajavi *et al.* 2006).

In *Coq9*^{R239X} mice, the residual *Coq9* mRNA observed in cerebrum and kidney from incomplete nonsense-mediated decay is translated into an aberrant COQ9 protein without the C-terminal 75 amino acid residues of the mature COQ9 protein. This truncated COQ9 protein may produce a dominant-negative or gain-of-function effect, as it has been reported in other mitochondrial diseases (Tynysmaa *et al.* 2009; Torres-Torronteras *et al.* 2011). The deleterious gain-of-function effect of the truncated COQ9 protein in *Coq9*^{R239X} mice affects the stability of the CoQ multiprotein complex since the overall levels of COQ proteins were lower in *Coq9*^{R239X} mice than those measured in *Coq9*^{Q95X} mice. Accordingly, we propose that the truncation of the COQ9 protein in the *Coq9*^{R239X} mouse model would have two consequences: (i) severe and moderate reduction of COQ7 and COQ5 levels, respectively, and (ii) destabilization of the multiprotein complex, decreasing therefore the levels of the other COQ proteins. Similar results in the levels of COQ proteins were obtained by LC-MS/MS in *Coq9*^{R239X} mice (Lohman *et al.* 2014), as well as in the skin fibroblasts belonging to the patient with the homologous COQ9 mutation (*COQ9*^{R244X}) (Duncan *et al.* 2009). On the contrary, in the *Coq9*^{Q95X} mouse model, the absence of the COQ9 protein only

affects the levels of COQ7 and COQ5 protein and not the integrity of the multi-subunit complex. While the reason behind the decrease in COQ5 levels is unclear, the decrease in COQ7 levels is justified by the direct physical interaction of COQ9–COQ7, which is needed by COQ9 to expose demethoxyubiquinone, the substrate for the reaction catalyzed by COQ7 (García-Corzo *et al.* 2013; Lohman *et al.* 2014). The different responses of both mutant mice to the treatment with 2,4-diHB also suggest that *Coq9*^{Q95X} mice have a stable CoQ multiprotein complex that is able to regulate CoQ biosynthesis and provide mechanisms of competitive and/or substrate inhibition (Tran & Clarke, 2007; Quinzii *et al.* 2012), in contrast to *Coq9*^{R239X} mice. The differences found in the levels of COQ proteins between *Coq9*^{R239X} and *Coq9*^{Q95X} mice are also supported by the yeasts studies, where phenotypes of certain COQ point mutants dramatically differ from the respective null mutants (Belogradov *et al.* 2001; Baba *et al.* 2004; Tran *et al.* 2006). Moreover, we observed two tissue-specific differences in the COQ protein levels: (i) ADCK3 and COQ6 protein levels were increased only in kidney of *Coq9*^{Q95X} mice, and (ii) COQ6 protein level was decreased in skeletal muscle but not in kidney of *Coq9*^{Q95X} mice. These divergences could reflect a tissue-specific regulatory feature of CoQ biosynthesis and CoQ multiprotein complex formation.

The imbalance of the CoQ biosynthetic multiprotein complex would explain the severe reduction of CoQ levels in *Coq9*^{R239X} mice compared to the moderate CoQ deficiency found in *Coq9*^{Q95X} mice. The bioenergetics repercussion of having an intermediate CoQ

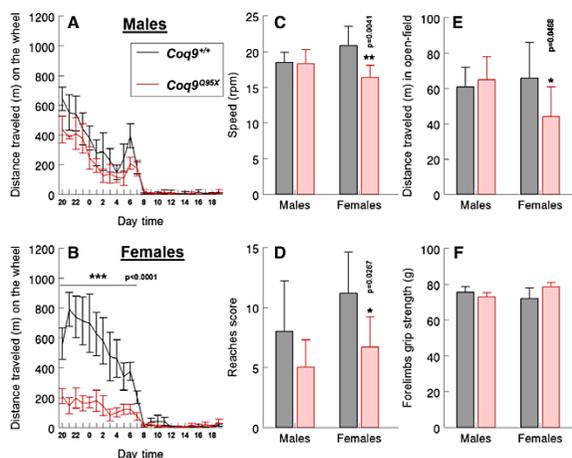


Figure 9. Female *Cog9^{Q95X}* mice develop a mild myopathic phenotype with exercise intolerance.

A–C Voluntary wheel running test. Distance traveled on the wheel and average speed during the use of the wheel were decreased in female *Cog9^{Q95X}* mice at 6 months of age (B, C).

D Hanging wire test. *Cog9^{Q95X}* female mice obtained less reaches score in the ‘fall and reaches’ method.

E Open-field test. *Cog9^{Q95X}* mice showed a reduction in the average distance traveled in *Cog9^{Q95X}* female mice at 6 months of age.

F Grip test: Muscle strength was not affected in *Cog9^{Q95X}* mice at 6 months of age.

Data information: Data are expressed as mean ± SD. Statistical analysis was performed on *Cog9^{+/+}* male mice versus *Cog9^{Q95X}* male mice and *Cog9^{+/+}* females versus *Cog9^{Q95X}* females. **P* < 0.05; ***P* < 0.01 and ****P* < 0.001. Student’s *t*-test. *n* = 8 for each group.

deficiency was a reduction of CoQ-dependent respiratory complex I-III activity and mitochondrial respiration in kidney and muscle from *Cog9^{Q95X}* females. This decrease was not due to the impairment on the distribution between free complex III and supercomplex-associated complex III and may be attributed to the low residual CoQ levels in these tissues (30% of normal). This proportion of the complex I-III activity independent of the supercomplex I-III is supported by our recent study on the effects of ubiquinol-10 supplementation in *Cog9^{R239X}* mice, which showed that ubiquinol-10 treatment increases complex I-III activity without increasing the amount of complex III associated to the supercomplex (García-Corzo et al, 2014).

Although muscle and kidney of *Cog9^{Q95X}* mice had the lowest CoQ content and the most bioenergetics defect, the function and the histologic structure of the kidneys were not affected. This is consistent with the previous study on *Cog9^{R239X}* mice, which do not manifest kidney disease either (García-Corzo et al, 2013). However, it remains unclear why *Pdss2^{del/del}* mice develop nephrotic syndrome and *Cog9* mutant mice do not (Peng et al, 2008; Quinzii et al, 2013). On the contrary, histochemical evaluation of muscle revealed an increased number of COX- and SDH-negative fibers in *Cog9^{Q95X}* females at 18 months of age, suggestive of a late-onset mild myopathy. This reduction in the muscle mitochondrial energetic activity suggests a skeletal muscle fiber-type

transformation from slow fibers (type I) to fast fibers (type II). The changes in fiber-type composition were first reported in an experimental model of respiratory chain myopathy as a compensatory mechanism for the enzymatic deficiency to maintenance muscle strength via increased recruitment of glycolysis for ATP production, at the expense of increased energetic cost (Venhoff et al, 2012). Similar to our results, Somerville et al (2013) found an increased frequency of type IIC fibers in morphologically normal muscle biopsies from 18 patients with CoQ₁₀ deficiency. Moreover, muscles with a slow/oxidative phenotypic profile contain higher levels of CoQ than muscles with a fast/glycolytic phenotypic profile (Nierobisz et al, 2010), suggesting that type I fibers are more susceptible to CoQ deficiency.

Results from the locomotor activity tests also showed a gender difference that is correlated to the bioenergetics and histological findings, that is, *Cog9^{Q95X}* females, and not males, had reduced exercise tolerance. Increased susceptibility of female mice to mitochondrial myopathy was also observed in a muscle-specific knockout mouse model of *COX10* (Diaz et al, 2005) and may account to the effect of testosterone in muscle mass (Schulte-Hostedde et al, 2003). This is consistent with the decreased voluntary activity of androgen receptor knockout male mice (Rana et al, 2011). Additionally, it has been reported that the lower levels of CoQ in females could predispose them to a major susceptibility to

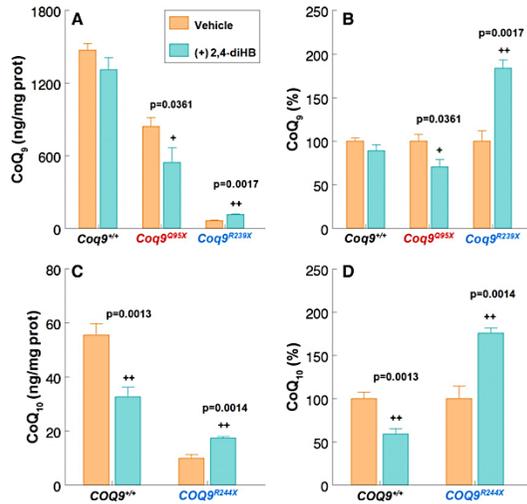


Figure 10. Effects of oral administration of 2,4-dihydroxybenzoic acid (2,4-diHB) in *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{Q95X} and *Coq9*^{R239X} mice and *COQ9*^{R244X} patient fibroblasts. A, B Kidney CoQ₉ levels in *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{Q95X} and *Coq9*^{R239X} mice treated with 2,4-diHB (+2,4-diHB) compared with the non-treated littermate (vehicle). Statistical analysis was performed on +2,4-diHB *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{Q95X} and *Coq9*^{R239X} mice versus vehicle *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{Q95X} and *Coq9*^{R239X} mice, respectively (n = 3 for each group). C, D CoQ₁₀ levels in *COQ9*^{R244X} skin fibroblasts treated with 2,4-DiHB (+2,4-diHB) compared with the non-treated controls (vehicle). Statistical analysis was performed on +2,4-diHB *COQ9*^{R244X} versus vehicle *COQ9*^{R244X} (n = 4 for each group). Data information: Data are expressed as mean ± SD. Student' t-test. *P < 0.05; **P < 0.01.

myopathy associated to statin consumption (Bhardwaj *et al.*, 2013). Our results show lower CoQ levels in muscle tissues of females compared to male mice, supporting the concept of a greater sensitivity of female to CoQ deficiency.

In conclusion, our study provides the first evidence of the existence of a multiprotein complex for CoQ biosynthesis in mammals and its importance in determining the degree of CoQ deficiency and the clinical phenotype. Our study suggests that the presence of a COQ9-truncated protein because of an incomplete NMD induces instability of the CoQ multiprotein complex and contributes in this way to the genetic and tissue-specific pathomechanisms. Furthermore, our work describes the first mouse model of mitochondrial myopathy with exercise intolerance associated to CoQ deficiency, providing new insights to understand the genotype-phenotype disparity associated to CoQ deficiency. Finally, our results may have a potential impact on the treatment of this mitochondrial disorder in two ways: (i) The efficacy of the bypass therapy recently proposed for primary CoQ deficiency caused by molecular defects in proteins of the biosynthetic multicomplex may differ according to the stability of the CoQ multiprotein complex (Xie *et al.*, 2012; Doimo *et al.*, 2014), and (ii) increasing CoQ levels above 50% of its normal levels may be enough to avoid a severe clinical phenotype.

Materials and Methods

Generation of the genetically modified mouse models

The *Coq9*^{Q95X} mouse model used in this study was generated by the Wellcome Trust Sanger Institute from ES cell clone EPD0112_2_A09 obtained from the supported KOMP Repository (www.komp.org). The 'knockout first' cassette was inserted into the C57BL/6N genetic background (project #CSD38115) (Supplementary Fig S13A). Male heterozygous *Coq9*^{Q95X/+} mice (C57BL/6N genetic background) were crossbred with female *Coq9*^{+/-} mice under C57BL/6J genetic background. Heterozygous *Coq9*^{Q95X/+} mice of the offspring were, consequently, a mix of C57BL/6N and C57BL/6J genetic background (Supplementary Fig S13B). Thus, *Coq9*^{Q95X/+} mice were crossbred in order to generate *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{Q95X/+} and *Coq9*^{Q95X/Q95X} (referred in the article as *Coq9*^{Q95X}).

The *Coq9*^{R239X} mouse model was previously generated and characterized under mix of C57BL/6N and C57BL/6J genetic background (Supplementary Fig S13B) (García-Corzo *et al.*, 2013).

Only homozygous wild-type and mutant mice from both models were used in the study.

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

Published online: March 23, 2015

Marta Luna-Sánchez et al Genotype–phenotype correlation in CoQ₁₀ deficiency

EMBO Molecular Medicine

7:00 PM. Mice had unlimited access to water and rodent chow. All experiments were performed according to a protocol approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Granada (procedures CEEA 2009-254 and 2010-275) and were in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (CETS #123) and the Spanish law (R.D. 53/2013). Animals were randomly assigned in experimental groups. Data were randomly collected and processed as well.

Cells culture and pharmacological treatment

Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) from *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{Q95X} and *Coq9*^{R239X} mice, as well as primary mutant and control fibroblasts, were grown in high glucose DMEM-GlutaMAX medium supplemented with 10% FBS, 1% MEM non-essential amino acids and 1% antibiotics/antimycotic. MEFs were treated for 6 h with 28 µg/ml of cycloheximide (Sigma; from a 5 mg/ml stock solution prepared in water) (Rio Frio et al., 2008). After treatment, cells were collected and analyzed.

PCR analyses of regions corresponding to exons 7–11 of *Nnt*

DNA was extracted from the mice tail tips, and PCR of *Nnt* gene was performed as previously described (Mekada et al., 2009). *Nnt* gene is complete in the sub-strain C57/BL6N while presents a deletion in exons 7–11 in the sub-strains C57/BL6J. Therefore, exon 6 was used to identify the sub-strains C57/BL6J and C57/BL6N, and exon 7 was used to identify the sub-strain C57/BL6N. To amplify exon 6, we used the following primers: forward, GGGTTTTTCGATTCTGTCATT; reverse, AGTCAGCAGCACTCCTCCAT. To amplify exon 7, we used the following primers: forward, ATTAGCTGCTGAGGCTGGA; reverse, GACAAAGACCCGAGAAGCAC.

Proteomic analysis of kidney mitochondria by high-resolution LC-MS/MS

Mitochondrial isolation was performed as describe elsewhere (Fernandez-Vizarrá et al., 2002). Mitochondrial pellets were solubilized in 200 µl 2% SDS, 100 mM DTT, and 100 mM Tris-HCl, pH 7.4. Proteins were quantified by Bradford, and 50 µg of each extract was digested by filter-aided sample preparation (FASP) method. The tryptic extracts from the wild-type samples (*Coq9*^{+/+}) were analyzed by high-resolution LC-MS/MS in data-dependent mode with an inclusion list. All the COQ9 peptides obtained from the tryptic digestion, in the range from 500 to 4,000, were included in the list (allowing one missed cleavage). One microgram of peptide extract was diluted with 20 µl of 5% MeOH: 1% HCOOH in order to be injected and analyzed by LC-MS/MS. LC-MS/MS spectra were searched using SEQUEST (Proteome Discoverer v1.4; ThermoFisher) and the following parameters: peptide mass tolerance 10 ppm, fragment tolerance 0.02 Da, enzyme set as trypsin and allowance up to three missed cleavages, dynamic modification of methionine oxidation (+16 Da) and fixed modification of cysteine carbamidomethylation (+57 Da). The database used for searching was *Mus musculus*. Peptide identifications were filtered at 1% FDR using the Percolator algorithm included in the Proteome Discoverer software.

The MS system used was an LTQ XL Orbitrap (ThermoFisher) equipped with a nanoESI ion source. A volume of 20 µl from each sample was loaded into the chromatographic system consisting of a C18 preconcentration cartridge (Agilent Technologies) connected to a 15-cm-long, 100 µm i.d. C18 column (Nikkoy Technos Co.). The separation was done at 0.4 µl/min in a 90-min acetonitrile gradient from 3 to 40% (solvent A: 0.1% formic acid, solvent B: acetonitrile 0.1% formic acid). The HPLC system was composed of an Agilent 1200 capillary nano pump, a binary pump, a thermostated micro injector and a micro switch valve. The LTQ XL Orbitrap was operated in the positive ion mode with a spray voltage of 1.8 kV. The spectrometric analysis was performed in a data-dependent mode, acquiring a full scan followed by eight MS/MS scans of the eight most intense signals detected in the MS scan from the global list. The full MS (range 400–1,700) was acquired in the Orbitrap with a resolution of 60,000. The MS/MS spectra were done in the linear-ion trap. From the data-dependent analysis, six COQ9 peptides of the protein were characterized. After the characterization, a targeted method for the analysis of the six detected peptides was designed. Wild-type samples were used to validate the targeted method.

Quantification of CoQ₉ and CoQ₁₀ levels in mice tissues and mitochondrial fraction

After lipid extraction from homogenized tissues or cultured skin fibroblasts, CoQ₉ and CoQ₁₀ levels were determined via reversed-phase HPLC coupled to electrochemical (EC) detection (Lopez et al., 2010; Garcia-Corzo et al., 2013). The results were expressed in ng CoQ/mg prot.

Gene expression analyses

Total cellular RNA from frozen tissue was extracted and electrophoresed in agarose 1.5% to check RNA integrity. RNA from muscle and cerebrum samples was extracted with RNeasy Fibrous Tissue Midi kit (for muscle) and RNeasy Lipid Tissue Mini kit (for cerebrum) (Qiagen, Hilden, Germany) and treated with RNase-Free DNase (Qiagen). RNA from kidney samples was extracted with Real Total RNA Spin Plus Kit (Real). Total RNA was quantified by optical density at 260/280 nm and was used to generate cDNA with High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Amplification was performed with quantitative real-time PCR, by standard curve method, with specific Taqman probes (from Applied Biosystems) for the targeted gene mouse *Coq9* (Mm00804236_m1), *Coq7* (Mm00501588_m1), *Coq6* (Mm00553570_m1), *Coq5* (Mm005018239_m1), *Adck3* (Mm00469737_m1) and the mouse *Hprt* probe as a standard loading control (Mm01545399_m1).

Sample preparation and Western blot analysis in mice tissues

Western blot analyses were performed in cerebrum, kidney and muscle homogenates. Samples were homogenized in buffer A (50 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100, 1 mM dithiothreitol, pH 7.6, protease inhibitor cocktail) at 1,100 rpm in a glass-TEFON homogenizer. Homogenates were sonicated and centrifuged at 1,000 g for 5 min at 4°C, and the resultant supernatant was used for Western blot analysis. 60 µg of proteins from the sample extracts was electrophoresed in 12% Mini-PROTEAN TGX™ precast gels (Bio-Rad)

using the electrophoresis system mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad). To detect the truncated version of the COQ9 protein in *Coq9^{Δ239X}* mice, 70 μg of proteins from mitochondrial samples extracts was prepared in XT sample buffer + XT-reducing agent (Bio-Rad) and electrophoresed in a 10% Criterion™ XT precast gel (Bio-Rad) using MOPS running buffer and the electrophoresis system Criterion Cell (Bio-Rad). In all experiments, proteins were transferred onto PVDF 0.45-μm membranes using a mini Trans-blot Cell (Bio-rad) or Trans-blot Cell (Bio-Rad) and probed with target antibodies. Protein–antibody interactions were detected with peroxidase-conjugated horse anti-mouse, anti-rabbit or anti-goat IgG antibodies using Amersham ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Band quantification was carried out using an Image Station 2000R (Kodak, Spain) and a Kodak 1D 3.6 software. COQ protein band intensity was normalized to Vdac1, and the data expressed in terms of percent relative to wild-type mice (Garcia-Corzo et al, 2013).

The following primary antibodies were used: anti-COQ7 (generously provided by Dr Hekimi, McGill University, Canada), anti-COQ6 (Santa Cruz Biotechnology, sc-393932), anti-COQ5 (Proteintech™, 17453-1-AP), anti-ADCK3 (Abnova, M04A) anti-COQ9 (Santa Cruz, sc-271892), anti-COQ9 (Abcam, ab104189) and anti-VDAC1 (Abcam, ab14734).

Sample preparation and Western blot analysis in human skin fibroblasts

About 1×10^5 cells were collected, washed twice with $1 \times$ PBS, homogenated in $1 \times$ PBS and sonicated on ice for 10 s. 30 μg of protein was mixed with $4 \times$ LDS sample buffer and 25% DDT. After denaturation at 55°C for 5 min, samples were loaded in 12% SDS-PAGE gel. Proteins were transferred on PDVF membranes and incubated overnight at 4°C with primary antibodies: 1:100 COQ7 rabbit polyclonal antibody (Thermo Scientific; PA5-25774), 1:100 COQ6 rabbit polyclonal antibody (Abcam; ab128652), 1:100 COQ9 rabbit polyclonal antibody (Thermo Scientific; PA5-24816), 1:100 COQ5 rabbit polyclonal antibody (Thermo Scientific; PA5-26327), 1:100 COQ8/ADCK3 mouse monoclonal antibody (Abnova; H00056997-M04A) and 1:1,000 vinculin monoclonal mouse antibody (Abcam SPM227), used as a loading control. Protein–antibody interaction was detected by peroxidase-conjugated mouse antibody, peroxidase-conjugated rabbit antibody or peroxidase-conjugated goat antibody using ECL Prime Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare). Band intensity was assessed by Image J.

CoQ-dependent respiratory chain activities

CoQ-dependent respiratory chain activities (CI + III and CII + III) were measured in submitochondrial particles as described elsewhere (Kirby et al, 2007; Garcia-Corzo et al, 2013). The results were expressed in nmol reduced cyt c/min/mg prot.

Evaluation of supercomplex formation by BNGE

BNGE was performed on the mitochondrial fraction from mice tissues. Mitochondrial isolation was performed as previously described (Fernandez-Vizcarra et al, 2002; Garcia-Corzo et al, 2013). Mitochondrial membrane proteins (100 μg) were applied and run on a 3–13% first-dimension gradient BNGE gel as previously described (Schagger,

2001; Acin-Perez et al, 2008; Garcia-Corzo et al, 2013). After electrophoresis, the complexes were electroblotted onto PVDF filters and sequentially probed with specific antibodies against complex III, anti-biquinol-Cytochrome c Reductase Core Protein I (Abcam, ab110252).

Mitochondrial respiration

To isolate fresh mitochondria, mice were sacrificed and the organs were extracted rapidly on ice. Muscle (*triceps surae* and *vastus lateralis*) was submerged in 1 mg/ml proteinase K solution for 60 s. Then, muscle was homogenized (1: 10, w/v) in isolation buffer (250 mM sucrose, 2 mM EDTA, 10 mM Tris, 0.5% free fatty acids albumin, pH 7.4) at 800 rpm at 4°C with a glass-TEflon homogenizer. The homogenate was centrifuged twice at 1,000 g for 5 min at 4°C, and the supernatant was centrifuged at 23,000 g for 10 min at 4°C. Then, the mitochondrial pellet was resuspended in 100 μl of isolation buffer, and a 10 μl aliquot was used for protein determination. The remaining sample was washed with 900 μl of isolation buffer and centrifuged at 13,000 g for 3 min at 4°C. The final crude mitochondrial pellet was resuspended in 90 μl MAS 1× medium [70 mM sucrose, 220 mM mannitol, 10 mM KH₂PO₄, 5 mM MgCl₂, 2 mM HEPES, 1 mM EGTA and 0.2% (w/v) fatty acid-free BSA, pH 7.2]. Kidney was homogenated (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 rpm in a glass-TEflon homogenizer. Then, homogenate was centrifuged at 500 g for 7 min at 4°C, and the supernatant was centrifuged at 7,800 g for 10 min at 4°C. The pellet was then resuspended in respiration buffer B (250 mM sucrose, 0.5 mM Na₂EDTA and 10 mM Tris), and a 5 μl aliquot was used for protein determination. The remaining sample was then centrifuged at 6,000 g for 10 min at 4°C. The pellet was resuspended in buffer A and centrifuged again at 6,000 g for 10 min at 4°C. The final crude mitochondrial pellet was re-suspended in 95 μl MAS 1× medium.

Mitochondrial respiration was measured by using an XF²⁴ Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience) (Rogers et al, 2011). Mitochondria were first diluted to the needed concentration required for plating in cold $1 \times$ MAS (2.5 μg/well in kidney; 1.5 μg/well in muscle). Next, 50 μl of mitochondrial suspension was delivered to each well (except for background correction wells) while the plate was on ice. The plate was then centrifuged at 2,000 g for 10 min at 4°C. After centrifugation, 450 μl of $1 \times$ MAS + substrate (10 mM succinate, 2 mM malate, 2 mM glutamate and 10 mM pyruvate) was added to each well. Respiration by the mitochondria was sequentially measured in a coupled state with substrate present (basal respiration or State 2), followed by State 3_o (phosphorylating respiration, in the presence of ADP and substrates); State 4 (non-phosphorylating or resting respiration) was measured after the addition of oligomycin when all ADP was consumed, and then maximal uncoupler-stimulated respiration (State 3_u). Injections were as follows: port A, 50 μl of 40 mM ADP (4 mM final); port B, 55 μl of 30 μg/ml oligomycin (3 μg/ml final); port C, 60 μl of 40 μM FCCP (4 μM final); and port D, 65 μl of 40 μM antimycin A (4 μM final). All data were expressed in pmol/min/μg protein.

Histology and immunohistochemistry

Cerebrum, heart and kidney were formalin-fixed and paraffin-embedded. Multiple sections (4 μm) were deparaffinized with

xylene and stained with hematoxylin and eosin (H&E), Masson's trichrome (TCM), periodic acid–Schiff (PAS) and Luxol fast blue (LFB) (García-Corzo *et al.*, 2013). 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) and neuronal class III β -tubulin anti-TUJ1 (Covance, MMS-435P) (García-Corzo *et al.*, 2013). 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 magnifications with an OLYMPUS CX41 microscope, and the images were scanned under equal light conditions with the CELL A computer program.

Muscle samples (*triceps surae*) were snap-frozen in isopentane cooled in liquid nitrogen. Cross sections (8 μ m thick) of frozen muscle were stained for succinate dehydrogenase (SDH) and cytochrome oxidase (COX) activities (Tanjji & Bonilla, 2008). Muscle sections were also stained with hematoxylin–eosin and Gomori Trichrome to assess muscle fiber area and general morphology (Tanjji & Bonilla, 2008).

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 and albumin (Linear Chemicals S.L., Spain) (García-Corzo *et al.*, 2013).

Assessment of the locomotor activity

Locomotor activity was tested in age-matched mice (6 months old) with a similar averaged body weight. Voluntary wheel running was assessed in polycarbonate cages (20.5 cm wide \times 36.5 cm long \times 14 cm high) with free access to stainless steel activity wheels (diameter 23 cm; width 5 cm) with a ball-bearing axle (Biosseb, Boulogne, France). The wheels were connected to a computer that automatically recorded the distance traveled by the mice per hour of recording, as well as the duration and speed of every running bout during the whole recording period. Spontaneous wheel running was monitored continuously during 48 h, starting at the beginning of the dark period (20:00 h), and the results obtained in the 2 days of evaluation were averaged. Animals had food and water available *ad libitum* and were trained to the wheels for 1 day before the data collection period (Cobos *et al.*, 2012).

The open-field test consisted of a square arena in a ground space of 25 \times 25 \times 25 cm. Walls were opaque, so the animals could not see the room. Each mouse was placed in the center of the square arena between 8 and 9 PM under red light exposure and its movement monitored through the video-tracking system SMART[®] (Panlab S.L., Spain) for 30 min after an adaption period of 30 min (Pallud *et al.*, 2011). Distance travelled (cm) of each mouse was quantified (García-Corzo *et al.*, 2013).

Muscle strength was assessed using a computerized grip strength meter (Model 47200, Ugo-Basile, Varese, Italy). The experimenter held the mouse gently by the base of the tail, allowing the animal to grab the metal bar with the forelimbs before being gently pulled until it released its grip. The peak force of each measurement was

automatically recorded by the device and expressed in grams (g). The forelimb grip strength of each mouse was measured in duplicate with at least 1 min between measurements.

For the hanging wire test, we chose the 'falls and reaches' method (Raymackers *et al.*, 2003). Mice were subjected to a 180 s lasting hanging test, during which a 'reaching' score is recorded. At the beginning of the test, each animal was given a reaching score of 0. Animals were suspended by their forelimbs to a 1.5-mm-thick, 55-cm-long metallic wire suspended 45 cm above soft ground, and then, the timer was started.

The timer was stopped anytime the animal fell and restarted when it was placed again on the wire until 180 s. If the animal reached one end of the wire, timer was stopped and 'reaching' score was increased by 1. Results were expressed as the 'average of reaches score'.

Supplementation with 2,4-diHB

The supplementation procedure in mice consisted of administering 2,4-diHB in the drinking water in a dose of 1 g/kg bw/day. The treatment started at 1 month of age, and the mice were sacrificed at 2 months of age. The drinking water was changed twice a week. The supplementation procedure in primary fibroblasts consisted of administering 0.5 mM or 2.5 mM 2,4-diHB. A control group with vehicle (DMSO) at the same dose was also studied. Cells were collected 1 week after the supplementation.

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

Lipid extracts were obtained as described above for the CoQ quantification. Samples were analyzed using an Acquity Ultra-Performance liquid chromatography system coupled to a high definition QTOF SynaptG2 detector of mass spectrometry (MS/MS) (Waters Corporation). The analytical separation column was a BEH C18, 1.7 μ m, 2.1 \times 50 mm column (Waters, Spain). The mobile phase consisted of methanol and 0.1% formic acid at the constant flow rate of 0.5 ml/min. Source and probe temperatures were set at 100 and 500°C, respectively. Nitrogen was used as both cone gas (30 l/h) and desolvation gas (600 l/h). Acquisition range was between 50 and 1,200 *uma*.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using the GraphPad scientific software. Data are expressed as the mean \pm SD of 3–10 experiments per group. A one-way ANOVA with a Tukey's *post hoc* test was used to compare the differences between three experimental groups. Studies with two experimental groups were evaluated using unpaired Student's *t*-test. A *P*-value of 0.05 was considered to be statistically significant.

Effect size was calculated using the application available in <http://www.biomath.info/power/ttest.htm>. Number of animals in each group were calculated in order to detect gross ~60% changes in the biomarkers measurements (based upon $\alpha = 0.05$ and power of $\beta = 0.8$) using the application available in <http://www.biomath.info/power/index.htm>. The Gaussian distribution was checked using GraphPad Software: <http://graphpad.com/quickcalcs/probability1.cfm>.

The paper explained

Problem

The biosynthesis of coenzyme Q10 (CoQ₁₀) occurs in mitochondria and involves at least 11 different proteins that are associated, at least in yeasts, in a multiprotein complex. Primary CoQ₁₀ deficiency is due to mutations in genes involved in CoQ biosynthesis. The disease has been associated with six major phenotypes: (i) encephalomyopathy, (ii) severe infantile multisystemic disease, (iii) nephropathy, (iv) cerebellar ataxia, (v) isolated myopathy, and (vi) multiple system atrophy. Curiously, mutations in the same gene may cause different phenotypes; for example, mutations in *COQ2* and *COQ6* have been indistinctly attributed to nephropathy or multisystemic disease. To try to understand genotype–phenotype disparities, we compare two mouse models with a genetic modification in *Coq9* gene, that is, *Coq9^{Q239X}* and *Coq9^{R239X}*.

Results

Contrary to *Coq9^{R239X}*, which manifests severe widespread CoQ₁₀ deficiency associated with fatal encephalomyopathy, *Coq9^{Q239X}* mice exhibited mild CoQ deficiency manifesting with reduction in CI+III activity and mitochondrial respiration in skeletal muscle, leading to a late-onset mild mitochondrial myopathy with decreased locomotor activity. Moreover, 2,4-dihydroxybenzoic acid (2,4-dHBA) supplementation increased the levels of CoQ₉ only in *Coq9^{R239X}* mice. We show that these differences were due to the levels of COQ biosynthetic proteins, suggesting that the presence of a truncated version of COQ9 protein in *Coq9^{R239X}* mice destabilizes the CoQ multiprotein complex.

Impact

Our study provides the first evidence of the existence of a multiprotein complex for CoQ biosynthesis in mammals and its importance in determining the degree of CoQ deficiency and the clinical phenotype. Our study suggests that the presence of a COQ9-truncated protein because of an incomplete nonsense-mediated mRNA decay (NMD) induces instability of the CoQ multiprotein complex and contributes in this way to the genetic and tissue-specific pathomechanisms. Furthermore, our work describes the first mouse model of mitochondrial myopathy with exercise intolerance associated to CoQ deficiency, providing new insights to understand the genotype–phenotype disparity associated to CoQ deficiency and may have a potential impact on the treatment of this mitochondrial disorder.

Supplementary information for this article is available online: <http://embomolmed.embopress.org>

Acknowledgements

We are grateful to Ana Nieto, PhD (Universidad de Granada), and Manuel Pablo Olmos, PhD (AnaPath, Granada, Spain), for their support in the histopathological evaluation, as well as to Shamima Rahman, MD (University College of London), for providing the human skin fibroblasts with the mutation in the *COQ9* gene. This work was supported by grants from the Marie Curie International Reintegration Grant Programme (COQMITMEL-266691 to LCL) within the Seventh European Community Framework Programme, from Ministerio de Economía y Competitividad, Spain (SAF2009-08315 and SAF2013-47761-R to LCL), from the Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo, Junta de Andalucía (P10-CTS-6133 to LCL), and from the 'CEIBioTic' (20F12/1 to LCL). MLS is a predoctoral fellow from the Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo, Junta de Andalucía. LCL is supported by the 'Ramón y Cajal' National Programme, Ministerio de Economía y Competitividad, Spain (RYC-2011-07643). MAT is supported by a predoctoral grant from the University of Granada. EJC is supported by the

Research Program of the University of Granada. CMQ is supported by NICHD Grants 5K23 HD065871-05 and P01 HD080642-01, and by a MDA grant. The proteomic analysis was performed in the CSIC/UAB Proteomics Facility of IIBB-CSIC that belongs to ProteoRed, PRB2-ISCI, supported by Grant PT13/0001.

Author contributions

ML-S designed the study, carried out experiments and data analysis, and drafted the manuscript; ED-C contributed to biochemical experiments; EB carried out the Western blot experiments in human skin fibroblasts; MAT, AM-G and EJC contributed to the phenotypic evaluation; GE, DA-C and CMQ supervised experiments and edited the manuscript; and LCL designed the study, directed and supervised experimental procedures, and edited the manuscript. The results shown in this article will constitute a section of the ML-S doctoral thesis at the University of Granada.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

For more information

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)
COQ9: S. Cerevisiae, homolog of: COQ9
<http://omim.org/entry/612837#0001>
International mito-patients
<http://www.mitopatients.org/index.html>
The association of mitochondrial disease patients in Spain
<http://www.aegmi.org/publicingles/index.php>
The United Mitochondrial Disease Foundation
<http://www.umdf.org/>

References

- Acin-Perez R, Fernandez-Silva P, Peleato ML, Perez-Martos A, Enriquez JA (2008) Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell* 32: 529–539
- Baba SW, Belogradov GI, Lee JC, Lee PT, Strahan J, Shepherd JN, Clarke CF (2004) Yeast Coq5 C-methyltransferase is required for stability of other polypeptides involved in coenzyme Q biosynthesis. *J Biol Chem* 279: 10052–10059
- Bateman JF, Fredri S, Natrass G, Savarirayan R (2003) Tissue-specific RNA surveillance? Nonsense-mediated mRNA decay causes collagen X haploinsufficiency in Schmid metaphyseal chondrodysplasia cartilage. *Hum Mol Genet* 12: 217–225
- Belogradov GI, Lee PT, Jonassen T, Hsu AY, Gin P, Clarke CF (2001) Yeast COQ4 encodes a mitochondrial protein required for coenzyme Q synthesis. *Arch Biochem Biophys* 392: 48–58
- Bhardwaj S, Selvarajah S, Schneider EB (2013) Muscular effects of statins in the elderly female: a review. *Clin Interv Aging* 8: 47–59
- Brogna S, Wen J (2009) Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms. *Nat Struct Mol Biol* 16: 107–113
- Cobos EJ, Ghasemlou N, Araldi D, Segal D, Duong K, Woolf CJ (2012) Inflammation-induced decrease in voluntary wheel running in mice: a nonreflexive test for evaluating inflammatory pain and analgesia. *Pain* 153: 876–884
- Desbats MA, Lunardi G, Doimo M, Trevisson E, Salvati L (2014) Genetic bases and clinical manifestations of coenzyme Q (CoQ) deficiency. *J Inher Metab Dis* 38: 145–156

Published online: March 23, 2015

Marta Luna-Sánchez et al Genotype–phenotype correlation in CoQ₁₀ deficiency

EMBO Molecular Medicine

- Diaz F, Thomas CK, Garcia S, Hernandez D, Moraes CT (2005) Mice lacking COX10 in skeletal muscle recapitulate the phenotype of progressive mitochondrial myopathies associated with cytochrome c oxidase deficiency. *Hum Mol Genet* 14: 2737–2748
- Diomedì-Camassei F, Di Giandomenico S, Santorelli FM, Caridi G, Piemonte F, Montini G, Chiggeri GM, Murer L, Barisoni L, Pastore A et al (2007) COQ2 nephropathy: a newly described inherited mitochondrialopathy with primary renal involvement. *J Am Soc Nephrol* 18: 2773–2780
- Doimo M, Trevisson E, Airik R, Bergdoll M, Santos-Ocana C, Hildebrandt F, Navas P, Pierrel F, Salviati L (2014) Effect of vanillic acid on COQ6 mutants identified in patients with coenzyme Q deficiency. *Biochim Biophys Acta* 1842: 1–6
- Duncan AJ, Bitner-Glindzicz M, Meunier B, Costello H, Hargreaves IP, Lopez LC, Hirano M, Quinzii CM, Sadowski MI, 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. *Am J Hum Genet* 84: 558–566
- Emmanuele V, Lopez LC, 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
- Fernandez-Vizarra E, Lopez-Perez MJ, Enriquez JA (2002) Isolation of biogenetically competent mitochondria from mammalian tissues and cultured cells. *Methods* 26: 292–297
- García-Corzo L, Luna-Sánchez M, Doerrier C, García JA, Guaras A, Acin-Perez R, Bullejos-Peregrin J, Lopez A, Escames G, Enriquez JA et al (2013) Dysfunctional Coq9 protein causes predominant encephalomyopathy associated with CoQ deficiency. *Hum Mol Genet* 22: 1233–1248
- García-Corzo L, Luna-Sánchez M, Doerrier C, Ortiz F, Escames G, Acuna-Castroviejo D, Lopez LC (2014) Ubiquinol-10 ameliorates mitochondrial encephalopathy associated with CoQ deficiency. *Biochim Biophys Acta* 1842: 893–901
- Gong Q, Stump MR, Zhou Z (2014) Position of premature termination codons determines susceptibility of hERG mutations to nonsense-mediated mRNA decay in long QT syndrome. *Gene* 539: 190–197
- Heeringa SF, Chernin G, Chaki M, Zhou W, Sloan AJ, Ji Z, Xie LX, Salviati L, Hurd TW, Vega-Warner V et al (2011) COQ6 mutations in human patients produce nephrotic syndrome with sensorineural deafness. *J Clin Invest* 121: 2013–2024
- Holbrook JA, Neu-Yilik G, Hentze MW, Kulozik AE (2004) Nonsense-mediated decay approaches the clinic. *Nat Genet* 36: 801–808
- Inoue K, Ikegami H, Fujisawa T, Noso S, Nojima K, Babaya N, Itoi-Babaya M, Makimo S, Oghihara T (2004) Allelic variation in class I K gene as candidate for a second component of MHC-linked susceptibility to type 1 diabetes in non-obese diabetic mice. *Diabetologia* 47: 739–747
- Jakobs BS, van den Heuvel LP, Smeets RJ, de Vries MC, Hien S, Schaible T, Smeitink JA, Wevers RA, Wortmann SB, Rodenburg RJ (2013) A novel mutation in COQ2 leading to fatal infantile multisystem disease. *J Neurol Sci* 326: 24–28
- Khajavi M, Inoue K, Lupski JR (2006) Nonsense-mediated mRNA decay modulates clinical outcome of genetic disease. *Eur J Hum Genet* 14: 1074–1081
- Kirby DM, Thorburn DR, Turnbull DM, Taylor RW (2007) Biochemical assays of respiratory chain complex activity. *Methods Cell Biol* 80: 93–119
- Lohman DC, Forouhar F, Beebe ET, Stefely MS, Minogue CE, Ulbrich A, Stefely JA, Sukumar S, Luna-Sánchez M, Jochem A et al (2014) Mitochondrial COQ9 is a lipid-binding protein that associates with COQ7 to enable coenzyme Q biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: E4697–E4705
- Lopez LC, Quinzii CM, Area E, Naini A, Rahman S, Schuelke M, Salviati L, DiMauro S, 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
- Martin-Montalvo A, Gonzalez-Mariscal I, Pomares-Viciana T, Padilla-Lopez S, Ballesteros M, Vazquez-Fonseca L, Gandolfo P, Brautigam DL, Navas P, Santos-Ocana C (2013) The phosphatase Ptc7 induces coenzyme Q biosynthesis by activating the hydroxylase Coq7 in yeast. *J Biol Chem* 288: 28126–28137
- Mekada K, Abe K, Murakami A, Nakamura S, Nakata H, Moriwaki K, Obata Y, Yoshiaki A (2009) Genetic differences among C57BL/6 substrains. *Exp Anim* 58: 141–149
- Multiple-System Atrophy Research C (2013) Mutations in COQ2 in familial and sporadic multiple-system atrophy. *N Engl J Med* 369: 233–244
- Nierobisz LS, Hentz NG, Felts JV, Mazdziak PE (2010) Fiber phenotype and coenzyme Q(1)(0) content in Turkey skeletal muscles. *Cells Tissues Organs* 192: 382–394
- Pagliarini DJ, Calvo SE, Chang B, Sheth SA, Vafai SB, Ong SE, Walford GA, Sugiana C, Boneh A, Chen WK et al (2008) A mitochondrial protein compendium elucidates complex 1 disease biology. *Cell* 134: 112–123
- Pallud J, Häussler U, Langlois M, Hamelin S, Devaux B, Deransart C, 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
- Peng M, Falk MJ, Haase VH, King R, Polyak E, Selak M, Yudkoff M, Hancock WW, Meade R, Saiki R et al (2008) Primary coenzyme Q deficiency in Pds2 mutant mice causes isolated renal disease. *PLoS Genet* 4: e1000061
- Quinzii C, Naini A, Salviati L, Trevisson E, Navas P, DiMauro S, Hirano M (2006) A mutation in para-hydroxybenzoate-polyprenyl transferase (COQ2) causes primary coenzyme Q10 deficiency. *Am J Hum Genet* 78: 345–349
- Quinzii CM, Tadesse S, Naini A, Hirano M (2012) Effects of inhibiting CoQ10 biosynthesis with 4-nitrobenzoate in human fibroblasts. *PLoS One* 7: e30606
- Quinzii CM, Garone C, Emmanuele V, Tadesse S, Krishna S, Dorado B, Hirano M (2013) Tissue-specific oxidative stress and loss of mitochondria in CoQ-deficient Pds2 mutant mice. *FASEB J* 27: 612–621
- Rana K, Fam BC, Clarke MV, Pang TP, Zajac JD, MacLean HE (2011) Increased adiposity in DNA binding-dependent androgen receptor knockout male mice associated with decreased voluntary activity and not insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301: E767–E778
- Raymackers JM, Debaix H, Colson-Van Schoor M, De Backer F, Tajeddine N, Schwaller B, Gailly P, Gillis JM (2003) Consequence of parvalbumin deficiency in the mdx mouse: histological, biochemical and mechanical phenotype of a new double mutant. *Neuromuscul Disord* 13: 376–387
- Rio Frio T, Wade NM, Ransijn A, Berson EL, Beckmann JS, Rivolta C (2008) Premature termination codons in PRPF31 cause retinitis pigmentosa via haploinsufficiency due to nonsense-mediated mRNA decay. *J Clin Invest* 118: 1519–1531
- Rogers GW, Brand MD, Petrosyan S, Ashok D, Eloora AA, Ferrick DA, Murphy AN (2011) High throughput microplate respiratory measurements using minimal quantities of isolated mitochondria. *PLoS One* 6: e21746
- Schagger H (2001) Blue-native gels to isolate protein complexes from mitochondria. *Methods Cell Biol* 65: 231–244
- Schulte-Hostedde AI, Millar JS, Hickling CJ (2003) Intraspecific variation in testis size of small mammals: implications for muscle mass. *Can J Zool* 81: 591–595

© 2015 The Authors

EMBO Molecular Medicine 17

- Sommerville RB, Zaidman CM, Pestronk A (2013) Coenzyme Q10 deficiency in children: frequent type 2C muscle fibers with normal morphology. *Muscle Nerve* 48: 722–726
- Tanji K, Bonilla E (2008) Light microscopic methods to visualize mitochondria on tissue sections. *Methods* 46: 274–280
- Torres-Torronteras J, Rodríguez-Palmero A, Pinos T, Accarino A, Andreu AL, Pintos-Morell G, Martí R (2011) A novel nonstop mutation in TYMP does not induce nonstop mRNA decay in a MNGIE patient with severe neuropathy. *Hum Mutat* 32: E2061–E2068
- Tran UC, Marbois B, Gin P, Gulmezian M, Jonassen T, Clarke CF (2006) Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* coq7 mutants by mitochondrial targeting of the *Escherichia coli* UbiF polypeptide: two functions of yeast Coq7 polypeptide in coenzyme Q biosynthesis. *J Biol Chem* 281: 16401–16409
- Tran UC, Clarke CF (2007) Endogenous synthesis of coenzyme Q in eukaryotes. *Mitochondrion* 7(Suppl): S62–S71
- Turunen M, Olsson J, Dallner G (2004) Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim Biophys Acta* 1660: 171–199
- Tynnismaa H, Ylikallio E, Patel M, Molnar MJ, Haller RG, Suomalainen A (2009) A heterozygous truncating mutation in RRM2B causes autosomal-dominant progressive external ophthalmoplegia with multiple mtDNA deletions. *Am J Hum Genet* 85: 290–295
- Venhoff N, Lebrecht D, Pfeifer D, Venhoff AC, Bisse E, Kirschner J, Walker UA (2012) Muscle-fiber transdifferentiation in an experimental model of respiratory chain myopathy. *Arthritis Res Ther* 14: R233
- Xie LX, Ozeir M, Tang JY, Chen JY, Kieffer-Jaquinod S, Fontecave M, Clarke CF, Pierrel 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
- Zetoune AB, Fontaniere S, Magnin D, Anczukow O, Buisson M, Zhang CX, Mazoyer S (2008) Comparison of nonsense-mediated mRNA decay efficiency in various murine tissues. *BMC Genet* 9: 83



License: This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.