

ESTUDIS BIOQUÍMICS I MOLECULARS EN PACIENTS AMB DEFICIÈNCIES MITOCONDRIALS I DE COENZIM Q10

Núria Buján Murlà

Per citar o enllaçar aquest document:

Para citar o enlazar este documento:

Use this url to cite or link to this publication:

<http://hdl.handle.net/10803/398580>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

TESI DOCTORAL

ESTUDIS BIOQUÍMICS I
MOLECULARS EN PACIENTS
AMB DEFICIÈNCIES MITO-
CONDRIALS I DE COENZIM
Q10

NÚRIA BUJÁN MURLÀ.2015

TESI DOCTORAL

**ESTUDIS BIOQUÍMICS I MOLECULARS EN PACIENTS AMB
DEFICIÈNCIES MITOCONDRIALS I DE COENZIM Q₁₀**

Núria Buján Murlà

2015

PROGRAMA DE DOCTORAT EN CIÈNCIES EXPERIMENTALS I
SOSTENIBILITAT

Dirigida per: Dra. Paz Briones Dr. Rafael Artuch

Tutora: Dra. Rosa Peracaula

Doctorand: Núria Buján Murlà

Memòria presentada per optar al títol de Doctora per la Universitat de Girona

La vida és com anar amb bicicleta.
Per mantenir l' equilibri, s' ha de seguir pedalant.

A. Einstein

◆ AGRAÏMENTS

“Es demanen estudiants de biologia o bioquímica per a realitzar pràctiques el darrer semestre del curs a l’Institut de Bioquímica Clínica; es donarà preferència a les persones que estiguin en el seu últim curs de carrera”

Tot va començar aquí, amb la Dr. Giròs (la Marisa) com a tutora de les pràctiques. Va ser ella qui va confiar en mi des d’un bon principi i la que em va aconsellar, amb tot el seu bon cor, que presentés el curriculum a la Dra. Birones (la Paz, veïna de despatx de la Marisa) per a cobrir una beca de tres anys que els havien concedit feia poc. A partir d’aquest moment, va començar una etapa de la meua vida de la qual em queden molt bons records i molt bones amistats, sense oblidar que ha estat l’etapa professional més important (i més interessant) fins al dia d’avui. Per tot això, gràcies Marisa i gràcies Paz!

Gràcies **Paz**, per ensenyar-me tantes i tantes coses. No només en ciència, sinó també de la vida (“Quien de verde se viste, guapa se cree”, per exemple) i per ensenyar-me que no sempre 2+2 sumen 4 i que ens hem de creure que “somos las mejores”. Tu si que ets la millor (per això ets jefa)!

Gràcies **Rafa** (Dr. Artuch pels amics), que des de l’Hospital Sant Joan de Déu m’has ensenyat a obrir la ment i a trobar sempre el costat positiu de les coses. Sense deixar d’esmentar el teu bon humor, que sempre és benvingut!

Gràcies també a l’**Antonia Ribes**, per donar-me la oportunitat de formar part de l’equip de l’IBC.

No m’oblido de la **Sònia**, gràcies per tot el que em vas ensenyar i per la paciència que vas tenir!!! Tú més que ningú saps com de “desagraïts” poden ser els complexes de la cadena...

Gràcies **Laura** (Dra. Laura Gort) per ser com ets i aportar sempre una bocanada d’aire fresc a totes les coses, disposada a ajudar i a aconsellar.

Judith García i **Àngela**, sense vosaltres una part d’aquets treball no s’hauria pogut fer!! No fa falta dir res més.

Judit M., Aida, Leslie, Frede, Natàlia i **Aleix**... Hi ha tantes històries per explicar, tant de dins de l’IBC com de fóra, que és inevitable deixar de somriure!! Gran equip i grans persones! És impossible dedicar-vos només unes quantes paraules... No podria haver tingut uns companys

millors. Gran equip d'amigues el que hem format amb l'**Aida**, la **Leslie**, la **Judit M.** i la **Natàlia**. Sou la millor recompensa d'aquesta tesi!

Judit Macias, has estat la meua mestre, no només en el camp de la ciència, sinò també en el de la cultura!! Ets genial! Espero poder seguir compartint part del nostre temps, com fins ara ho hem estat fent!

Gràcies a tota la gent que forma part, o que ha format part, de l'IBC!!! No em voldria deixar a ningú..

A tota la gent de L'Hospital Sant Joan de Déu, especialment a la **Raquel** i la **Mar**, moltes gràcies per tractar-me sempre tant bé. És una sort comptar amb gent com vosaltres.

Gràcies a tot l'"**Equip Catenari**" per la bona feina feta, pel companyarisme i pel gran treball en equip!! Un clar exemple de "voler és poder".

I, evidentment, gràcies als meu pares, **M^aÀngels** i **Lluís**, i a en **Jordi** per la paciència que heu tingut fins al dia d'avui, per animar-me i ajudar-me a seguir endavant quan ho he volgut engegar tot a rodar. Sort de vosaltres!!!

Aquesta tesi posa punt i final a una etapa que m'ha aportat coses de molts colors diferents però que, sens dubte, m'ha format professionalment i m'ha marcat com a persona.

"Camins, que ara s'esvaeixen.

Camins, que hem de fer sols.

Camins, vora les estrelles.

Camins, que ara no hi son."

◆ LLISTA DE PUBLICACIONS DERIVADES DE LA TESI

Les publicacions derivades d'aquest treball de tesi estan llistades a continuació.

- **Analysis of coenzyme Q(10) in lymphocytes by HPLC-MS/MS.**

Arias, A., García-Villoria, J., Rojo, A., **Buján, N.**, Briones, P., i Ribes, A. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* (2012); 908, 23–6.

- **Protein expression profiles in patients carrying NFU1 mutations. Contribution to the pathophysiology of the disease.**

Ferrer-Cortès, X., Font, A., **Bujan, N.**, Navarro-Sastre, A., Matalonga, L., Arranz, J. A., Riudor, E., Del Toro, M., Garcia-Cazorla, A., Campistol, J., Briones, P., Ribes, A. i Tort, F. *Journal of Inherited Metabolic Disease* (2013); 36(5), 841–7.

- **Coenzyme Q₁₀ deficiency in mitochondrial DNA depletion syndromes.**

Montero R, Grazina M, López-Gallardo E, Montoya J, Briones P, Navarro-Sastre A, Land JM, Hargreaves IP, Artuch R; Coenzyme Q₁₀ Deficiency Study Group (**Buján, N.**, entre d'altres). *Mitochondrion* (2013 Jul);13(4):337-41.

- **Characterization of CoQ₁₀ biosynthesis in fibroblasts of patients with primary and secondary CoQ₁₀ deficiency.**

Buján, N., Arias, A., Montero, R., García-Villoria, J., Lissens, W., Seneca, S., Espinós, C., Navas, P., Der Meirleir, L., Artuch, R. Briones, P., i Ribes, A. *Journal of Inherited Metabolic Disease* (2014); 37(1), 53–62.

- **Mutations in the lipoyltransferase LIPT1 gene cause a fatal disease associated with a specific lipoylation defect of the 2-ketoacid dehydrogenase complexes.**

Tort, F., Ferrer-Cortès, X., Thió, M., Navarro-Sastre, A., Matalonga, L., Quintana, E., **Bujan, N.**, Arias, A., García-Villoria, J., Acquaviva, C., Vianey-Saban, C., Artuch, R., García-Cazorla, A., Briones, P., i Ribes, A. *Human Molecular Genetics* (2014); 23(7), 1907–15.

Darrerament s'han desenvolupat altres treballs que encara están pendets de ser publicats. Aquests treballs s'han enviat als editors corresponents:

- **Spanish network for the standardization of clinical diagnosis of human mitochondrial respiratory chain defects.**

Bujan, Nuria; Morén, Constanza; Blázquez, Alberto; Carnicer, Clara; Cascajo, M.Victoria; Bretón, Begoña; López-Gallardo, Ester; Gort, Laura; Martinez, Ramiro; Martin, M. Ángel; Cardellach, Francesc; Bornstein, Belen; Briones, Paz; Delmiro, Aitor; Garcia-Arumí, Elena; Rodriguez-Aguilera, J.Carlos; Garrabou, Glòria.

Article enviat a la revista Nature Protocols.

- **Molecular and genetic bases for a particular biochemical phenotype in patients carrying NFU1 mutations.**

Xènia Ferrer-Cortès, J Narbona, **Núria Bujan**, Leslie Matalonga, Mireia Del Toro, José Antonio Arranz, Encarnació Riudor, Angels Garcia-Cazorla, Mar O'Callaghan, Mercé Pineda, Cristina Jou, Raquel Montero, CL Alston , Paz Briones, Antonia Ribes, Frederic Tort.

Article sota revisió a la revista European Journal of Human Genetics.

◆ ABREVIATURES

3-MGA	Àcid 3-metilglutacònic
ADN	Àcid desoxiribonucleic
ADNn	ADN nuclear
ADNmt	ADN mitocondrial
ADP	Adenosinadifosfat
ARN	Àcid ribonucleic
ARNr	ARN ribosòmic
ARNt	ARN de transferència
APS	Persulfat amoni
ATP	Adenosinatrifosfat
BCA	Àcid bicinconínic
BCKDH	Deshidrogenasa dels α -ceto àcids ramificats
BN	Blue Native
BN-PAGE	Blue Native Polyacrilamida Gel Electrophoresis
BN-WB	Blue Native-Western Blot
BSA	Albúmina sèrica bovina
CI	Complex I; NADH ubiquinona oxido-reductasa
CII	Complex II; succinat ubiquinona oxido-reductasa
CIII	Complex III; ubiquinol-citocrom C oxido-reductasa
CIV	Complex IV; citocrom C oxidasa; COX
CV	Complex V; ATPasa

CHX	Cicloheximida
CIBERER	Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras
CK	Creatina quinasa
CRM	Cadena respiratòria mitocondrial
CRICM	Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moëlle
CS	Citrat sintasa
CoQ	Coenzim Q
COX	Citocrom C oxidasa
CV	Coefficient de variació
DAB	3,3'-Diamnbenzidina
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitro-benzoic acid)
ECM	Errors congènits del metabolisme
EDTA	Àcid etilendiaminoteraacètic
ETF	Flavoproteïna transferidora d'electrons
ETFA	Subunitat α de la flavoproteïna transferidora d'electrons
ETFB	Subunitat β de la flavoproteïna transferidora d'electrons
ETFDH	Deshidrogenasa de la flavoproteïna transferidora d'electrons
ETF-QO	Flavoproteïna transferidora d'electrons ubiquinona oxidoreductasa
FAD/FADH ₂	Dinucleòtid de flavina i adenina
FBS	Fetal Bovine Serum
Fe-S	Ferro-Sofre

FPP	Farnesil pirofosfat
GAM	Goat anti Mouse
GCS	Complex glicina descarboxilasa
GPP	Geranil pirofosfat
HCl	Àcid clorhídric
HCL	Hospital Clínic de Barcelona
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaril-coenzima A
HPLC	High performance liquid chromatography
HPLC-MS/MS	High performance liquid chromatography-espectrometria de massa en tàndem
HSJD	Hospital Sant Joan de Déu
HVd'H	Hospital Vall d'Hebron de Barcelona
H120	Hospital 12 de Octubre de Madrid
IBC	Institut de Bioquímica Clínica; Secció d'Errors Congènits del Metabolisme (Hospital Clínic de Barcelona)
IPP	Isopentenil pirofosfat
KCN	Ferrocínur de potassi
KGDH	α -cetoglutarat deshidrogenasa
LIAS	Sintetasa d'àcid lipoic
LOD	Límit de detecció
LLOQ	Límit de quantificació
MADD	Deficiència múltiple d'acil-CoA deshidrogenasa
MELAS	Mitochondrial Encephalomyopathy Lactic Acidosis Stroke-like episodes

Meva	Mevalonolactona
² H ₃ -Meva	Mevalonat deuterat
MP	Múscul de porc
MRM	Monitorització de reacció múltiple
MTT	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide
NAD/NADH	Nicotinamida adenina dinucleòtid
NBCS	Newborn Calf Serum
NBT	Nitrotetrazolium Blue Chloride
NMD	Nonsense Mediated Decay
NPC	Nieman-Pick tipus C
OSCP	Proteïna proporcionadora de sensibilitat a la oligomicina
OXPHOS	Sistema de fosforilació oxidativa mitocondrial
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDH	Piruvat deshidrogenasa
¹³ C ₆ -PHB	Àcid para-hidroxi-benzoic marcat amb ¹³ C
PHB	Àcid para-hidroxi-benzoic
PMS	Metasulfat de fenacina
PTP	Porus de permeabilitat transitòria
ROS	Espècies reactives de l'oxígen
RT	Temperatura ambient
TEMED	N,N,N,N'-Tetrametil-etilendiamina
SD	Desviació estàndard

SDS	Sodium dodecyl sulfate; lauril sulfat sòdic
SDH	Succinat deshidrogenasa
SNC	Sistema nerviós central
UAM	Univesidad Autónoma de Madrid
UCPs	Proteïnes desacobladores
UCS	Unitats de Citrat Sintasa
UPO	Universidad Pablo de Olavide de Sevilla
UZ	Universidad de Zaragoza
VLCADD	Deficiència de la acil-CoA deshidrogenasa de cadena molt llarga
WB	Western Blot

◆ ÍNDEX DE FIGURES

Figura 1	Representació esquemàtica del metabolisme energètic cel·lular, incloent les vies mitocondrials del Cicle de Krebs y la fosforilació oxidativa (sistema OXPHOS).	Pàg. 10
Figura 2	Esquema del sistema OXPHOS mitocondrial (complexes I-V).	Pàg. 11
Figura 3	Via de síntesi del CoQ ₁₀ .	Pàg. 23
Figura 4	Esquema del complex multienzimàtic de les proteïnes COQ ancorat a la membrana mitocondrial interna.	Pàg. 25
Figura 5	Esquema del procés de síntesi de CoQ ₁₀ fins a la seva ubicació final a la cadena respiratòria mitocondrial.	Pàg. 25
Figura 6	Esquema de la Cambra de Neubauer. Mostra les cèl·lules que s'han de tenir en compte pel recompte (cèl·lules de color blanc) i les que no (cèl·lules de color vermell).	Pàg. 52
Figura 7	Esquema de la MiniProtean multi-casting chamber. La solució d'acrilamida al 15% és abocada al compartiment reservori (<i>reservoir chamber</i>) i la solució d'acrilamida al 4%, al compartiment de barreja (<i>mixing chamber</i>).	Pàg. 86
Figura 8	Patró de bandes dels complexos I-V obtingut per tinció amb solució de Blau de Coomassie.	Pàg. 90
Figura 9	Imatges dels resultats de l'estudi de BN-activitat en gel del complex I realitzat a partir de fibroblasts cultivats (A) i teixit muscular (B) del pacient 1 (P1), pacient 2 (P2) i pacient 3 (P3).	Pàg. 136
Figura 10	Imatge dels resultats de BN-WB amb anticossos específics pels complexos I-IV obtinguts a partir d'homogenat de teixit muscular dels pacients 4 (P4) i 5 (P5).	Pàg. 137
Figura 11	Estudi de BN-activitat en gel dels complexos I, II IV i V del pacient 4 (P4) a partir de teixit muscular.	Pàg. 138
Figura 12	Resultats dels estudis de BN-activitats en gel (A) i BN-WB (B) en teixit muscular del pacient 7 (P7).	Pàg. 140
Figura 13	Resultats de BN-activitat en gel (A) i BN-WB (B) obtinguts a partir de fibroblasts cultivats del pacient 9 (P9).	Pàg. 142

Figura 14	Resultats de BN-WB de l'estudi a partir de fibroblasts cultivats del pacient 10 (P10), pacient 11 (P11), pacient 12 (P12) i pacient 13 (P13).	Pàg. 144
Figura 15	SDS-PAGE a partir d'homogenat de fibroblasts cultivats del pacient 10 (P10), pacient 11 (P11) i pacient 12 (P12) i WB amb anticossos específics per la proteïna de Rieske i BCS1L.	Pàg. 144
Figura 16	Resultats de l'estudi per BN-WB a partir de fibroblasts cultivats del pacient 11 (P11).	Pàg. 145
Figura 17	Resultats de l'estudi de BN-activitats en gel en teixit muscular del pacient 17 (P17) i pacient 18 (P18).	Pàg. 146
Figura 18	Resultats de l'estudi de BN-WB en teixit muscular del pacient 17 (P17) i pacient 18 (P18).	Pàg. 146
Figura 19	BN-activitat en gel del complex V en teixit muscular (A) dels pacient 19 i 20, i fibroblasts cultivat (B) del pacient 20 (P20) i el pacient 29 (P29).	Pàg. 148
Figura 20	BN-activitats en gel en fibroblasts cultivats (A) i BN-WB a partir de teixit muscular (B) del pacient 22 (P22).	Pàg. 150
Figura 21	Resultats de l'estudi de BN-activitats en gel (A) i BN-WB (B) en teixit cardíac de la pacient 21 (P21).	Pàg. 150
Figura 22	Resultats de BN-activitats en gel en teixit muscular (A) i fibroblasts (B) del pacient 23. BN-WB en fibroblasts (C) del pacient 23 (P23).	Pàg. 152
Figura 23	Esquema de la via de biosíntesi del CoQ ₁₀ .	Pàg. 156
Figura 24	Quantificació, mitjançant HPLC-MS/MS, de la síntesi CoQ ₁₀ a partir de PHB- ¹³ C ₆ (¹³ C ₆ -CoQ ₁₀) i a partir de Meva- ² H ₃ (² H ₃ -CoQ ₁₀). També es mostren el pics de CoQ ₁₀ sintetitzat endògenament (CoQ ₁₀) i el pic de CoQ ₉ , utilitzat com a estàndard intern.	Pàg. 158
Figura 25	Biosíntesi de CoQ ₁₀ utilitzant PHB- ¹³ C ₆ i Meva- ² H ₃ com a substrats de la via a diferents concentracions i temps d'incubació. (A) Biosíntesi de ¹³ C ₆ -CoQ ₁₀ a partir de PHB- ¹³ C ₆ a concentracions de 1,65 mM i 3,3 mM. (B) Biosíntesi de ² H ₃ -CoQ ₁₀ a partir de Meva- ² H ₃ a concentracions de 14 a 56 μM, i fins a 280 μM i 72 h d'incubació (C).	Pàg. 159

- Figura 26** (A) Efecte de l'addició d' α -ciclodextrina al medi de reacció amb PHB- $^{13}\text{C}_6$ sobre la síntesi de. (B) Efecte sobre la síntesi de $^{13}\text{C}_6$ -CoQ $_{10}$ quan es complementa el medi de reacció que conté PHB- $^{13}\text{C}_6$ amb mevalonat no marcat. (C) Efecte sobre la síntesi de $^2\text{H}_3$ -CoQ $_{10}$ al complementar el medi de reacció que conté Meva- $^2\text{H}_3$ amb PHB no marcat. Pàg. 161
- Figura 27** Quantificació per HPLC-MS/MS d'intermediaris de la via de síntesi de CoQ $_{10}$; IS (estàndard intern). (A) Anàlisi de solucions estàndard de isopentenil-PP (IPP), geranil-PP (GPP) i farnesil-PP (FPP). (B) Anàlisi d'intermediaris acumulats en fibroblasts cultivats del pacient 1. (C) No s'observen intermediaris acumulats en fibroblasts cultivats del pacient control. Pàg. 174
- Figura 28** Protocol d'estudi dels pacients amb sospita de defecte en el sistema OXPHOS i defectes de CoQ $_{10}$. Pàg. 176

ÍNDIX DE TAULES

Taula 1	Resultats d'activitat dels enzims de cadena respiratòria mitocondrial obtinguts a partir del pool d'homogenat de múscul de rata (Pool rata). A) Resultats obtinguts al nostre centre (IBC). B) Resultats globals de tots els centres participants (HVD'H, HCL, UAM, H12O i IBC).	Pág. 114
Taula 2	Resultats d'activitat obtingudes al nostre centre de diagnòstic (IBC) per les mostres d'homogenat de teixit muscular humà (CH1-CH8, CH10, CH12, CH15 i CH16) i de rata (Pool rata).	Pág. 116
Taula 3	Resultats d'activitat obtinguts al nostre centre de diagnòstic per les mostres CH11 i CH13.	Pág. 117
Taula 4	Resultats obtinguts per les mostres d'homogats i teixit muscular estudiats en etapes anteriors aplicant les millores metodològiques.	Pág. 119
Taula 5	Taula resum de les dificultats metodològiques que varen sorgir al llarg de l'etapa III.	Pág. 120
Taula 6	Variació interserie. Els resultats corresponen a l'estudi d'un mateix homogenat muscular de porc en 8 tests independents.	Pág. 122
Taula 7	Variació intraserie. Els resultats de cada activitat corresponen a la mitjana aritmètica i la SD de tres rèpliques. Aquest procés es va repetir en 2 dies independents.	Pág. 122
Taula 8	Variació intraserie. Els resultats corresponen a les activitats obtingudes en tres trossos diferents d'una mateixa biòpsia muscular de porc.	Pág. 123
Taula 9	Rang de valors control establerts al nostre centre de diagnòstic (IBC).	Pág. 124
Taula 10	Resultats d'activitats dels enzims de cadena respiratòria mitocondrial obtinguts en fibroblasts.	Pág. 126
Taula 11	Rang de valors control de les activitats enzimàtiques en fibroblasts.	Pág. 127
Taula 12	Comparativa entre la metodologia francesa i la definida per la xarxa de laboratoris espanyols.	Pág. 128

Taula 13	Rang de valors control per a múscul esquelètic de cinc dels set centres espanyols participants. IBC: Secció d'Errors Congènits del Metabolisme (Hospital Clínic de Barcelona); HCL: Hospital Clínic de Barcelona; H12O: Hospital 12 de Octubre de Madrid; HVd'H: Hospital Vall d'Hebrón; UPO: Universidad Pablo de Olavide de Sevilla.	Pág. 130
Taula 14	Taula de pacients estudiats mitjançant la tècnica del Blue Native.	Pág. 133
Taula 15	Efecte sobre la viabilitat cel·lular al afegir substrats marcats ($^{13}\text{C}_6$ -PHB i Meva- $^2\text{H}_3$) al medi de cultiu.	Pág. 162
Taula 16	Resum dels resultats obtinguts en els pacients estudiats per validar el nostre mètode. Els resultats alterats estan destacats en negreta. Cada valor individual correspon a la mitjana de, almenys, un duplicat.	Pág. 164
Taula 17	Biosíntesi de CoQ ₁₀ en pacients afectes de Niemann-Pick tipus C. Els resultats alterats estan destacats en negreta. Cada valor individual correspon a la mitjana de, almenys, un duplicat.	Pág. 167
Taula 18	Screening mutacional de gens relacionats amb la via de síntesi de CoQ ₁₀ en pacients amb nivells deficients de CoQ ₁₀ .	Pág. 169
Taula 19	Biosíntesi de CoQ ₁₀ en pacients amb deficiència de CoQ ₁₀ en múscul i/o fibroblasts. Grup 1: pacients amb una sola mutació en un dels gens COQ. Grup 2: pacients amb bona resposta clínica al tractament amb CoQ ₁₀ . Grup 3: pacients amb clara deficiència de CoQ ₁₀ en fibroblasts, sense estudi mutacional ni resposta a tractament documentada. La biosíntesi de CoQ ₁₀ s'ha evaluat quantificant el corresponent CoQ ₁₀ marcat (nmol/UCS). Els resultats alterats estan destacats en negreta. Cada valor individual correspon a la mitjana de, almenys, un duplicat	Pág. 172

◆ ÍNDEX GENERAL

RESUM.....	1
RESUMEN.....	3
SUMMARY.....	5
1. INTRODUCCIÓ.....	9
1.1 EL MITOCONDRI I LES MALALTIES MITOCONDRIALS.....	9
1.1.1 El mitocondri: estructura i funció.....	9
1.1.2 La cadena respiratòria mitocondrial.....	11
1.1.3 Genètica mitocondrial.....	15
1.1.4 Desordres mitocondrials.....	17
1.2 EL COQ ₁₀	21
1.2.1 Funcions del CoQ ₁₀	21
1.2.2 Via de síntesis i gens implicats.....	22
1.2.3 Deficiències de CoQ.....	26
1.3 DIAGNÒSTIC BIOQUÍMIC DE LES ALTERACIONS DEL SISTEMA OXPHOS I ELS DEFECTES DE COQ ₁₀	32
2. OBJECTIUS.....	37
3. MATERIAL I MÈTODES.....	41
3.1 OBTENCIÓ I CULTIU DE FIBROBLASTS.....	42
3.2 DETERMINACIÓ DE PROTEÏNES PEL MÈTODE DE LOWRY.....	44
3.3 DETERMINACIÓ DE PROTEÏNES PEL MÈTODE DE BCA.....	46
3.4 ACTIVITAT CITRAT SINTASA EN FIBROBLASTS (MÈTODE DE SRERE).....	48
3.5 TEST DE VIABILITAT CEL·LULAR.....	51
3.6 BIOSÍNTESI DE COQ ₁₀ EN FIBROBLASTS.....	54
3.7 ESTUDI DE LA CADENA RESPIRATÒRIA MITOCONDRIAL EN BIÒPSIES DE MÚSCUL I FIBROBLASTS.....	58
3.7.1 Preparació de l'extracte de teixit.....	58
3.7.2 Activitat del complex I (NADH ubiquinona oxido-reductasa).....	60
3.7.3 Activitat del complex II (Succinat ubiquinona oxido-reductasa).....	64
3.7.4 Activitat del complex III (Ubiquinol-citocrom C oxido-reductasa).....	67
3.7.5 Activitat del complex IV (Citocrom C oxidasa).....	71
3.7.6 Activitat combinada dels complexos I+III (NADH citocrom C oxido-reductasa).....	74
3.7.7 Activitat combinada dels complexos II+III (Succinat citocrom C oxido-reductasa)....	77
3.7.8 Activitat Citrat Sintasa.....	80
3.8 BLUE NATIVE ELECTROFORESIS EN GELS DE POLIACRILAMIDA (BN-PAGE) EN MOSTRES DE MÚSCUL I FIBROBLASTS.....	83
3.8.1 BLUE NATIVE electroforesis.....	83
3.8.2 Tinció del gel amb Blau de Comassie.....	89
3.8.3 Activitats enzimàtiques en gel de Blue Native.....	91
3.8.4 Western-Blot dels complexos de cadena respiratòria mitocondrial a partir d'un gel de Blue Native.....	96
3.9 EXTRACCIÓ D'ADN.....	99
3.10 EXTRACCIÓ DE ARN I OBTENCIÓ DE cADN.....	101

3.11 CERCA DE MUTACIONS EN cADN I ADN DE GENS IMPLICATS EN LA VÍA DE SÍNTESI DE CoQ ₁₀	104
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ	109
4.1 IMPLEMENTACIÓ D'UNA NOVA TÈCNICA PER A L'ESTUDI ESPECTROFOTOMÈTRIC DE L'ACTIVITAT DELS ENZIMS QUE FORMEN LA CADENA RESPIRATÒRIA MITOCONDRIAL (CRM)	109
4.1.1 Estudi espectrofotomètric de l'activitat dels enzims de CRM en teixit muscular	109
4.1.2 Estudi espectrofotomètric de l'activitat dels enzims de CRM en fibroblasts cultivats	125
4.1.3 Situació actual	127
4.2 ESTUDI DELS COMPLEXES QUE FORMEN LA CADENA RESPIRATÒRIA MITOCONDRIAL EN PACIENTS AMB SOSPITA DE MALALTIA MITOCONDRIAL MITJANÇANT LA TÈCNICA DEL BLUE NATIVE PAGE	131
4.2.1 Estudis de complex I	136
4.2.2 Estudis de complex II	136
4.2.3 Estudis de complex III	143
4.2.4 Estudi del complex IV	145
4.2.5 Estudis de complex V	147
4.2.6 Consideracions en els estudis enzimàtics mitjançant la tècnica del Blue Native	153
4.3 ESTUDI DE LA VIA DE SÍNTESI DEL COQ ₁₀ EN FIBROBLASTS DE PACIENTS AMB SOSPITA DE DEFICIÈNCIA PRIMÀRIA O SECUNDÀRIA DE COQ ₁₀	155
4.3.1 Posta a punt de la metodologia	157
4.3.2 Validació del mètode	163
4.3.3 Estudi de la via de biosíntesi de CoQ ₁₀ en pacients seleccionats	167
4.3.4 Anàlisi d'intermediaris de la via acumulats	173
4.3.5 Consideracions per l'estudi de la via de biosíntesi de CoQ ₁₀ en fibroblasts	174
4.4 PROTOCOL DIAGNÒSTIC PER A L'ESTUDI DE PACIENTS AMB SOSPITA DE MALALTIA MITOCONDRIAL	175
5. CONCLUSIONS	179
6. BIBLIOGRAFIA	183
ANNEX 1	207
ANNEX 2	221

◆ RESUM

Detectar i diagnosticar les malalties mitocondrials i els defectes de CoQ₁₀ és una tasca difícil, donada la gran heterogeneïtat fenotípica i l'elevat nombre de factors genètics implicats. El diagnòstic inclou estudis metabòlics, bioquímics i morfològics complets, entre els quals hi ha l'estudi de l'activitat enzimàtica dels complexos que formen la cadena respiratòria mitocondrial (CRM) i la quantificació del CoQ₁₀ en teixits energètics, com per exemple el teixit muscular, i/o en fibroblasts cultivats. Al llarg d'aquesta tesi s'ha treballat en el desenvolupament de mètodes d'estudi que permetin millorar el rendiment diagnòstic en aquests pacients.

Per una banda, s'ha actualitzat la metodologia d'estudi de les activitats enzimàtiques dels complexos que formen la CRM, tant en teixit muscular com en fibroblasts, millorant notablement la qualitat analítica, sobretot en la determinació de les activitats enzimàtiques del complex I, el complex III i el complex IV aïllats. A més, aquesta millora metodològica s'ha implementat homogèniament en 7 centres de diagnòstic espanyols, permetent la creació d'una xarxa espanyola per a l'estudi d'aquests enzims amb l'objectiu comú de compartir experiència i facilitar el treball en equip per a uns diagnòstics acurats.

La electroforesis en Blue Native-gel permet l'estudi de l'activitat ATPasa del complex V, tant en teixit muscular com en fibroblasts, i l'activitat del complex I en fibroblasts, activitats que no es poden determinar mitjançant les tècniques espectrofotomètriques habituals. Per aquesta raó, s'ha establert aquesta tècnica com a tècnica complementària dels estudis espectrofotomètrics dels enzims de CRM, millorant significativament el rendiment diagnòstic en els pacients estudiats i el coneixement dels mecanismes de malaltia.

És important detectar les deficiències primàries de CoQ₁₀, ja que el tractament amb CoQ₁₀ oral millora considerablement la clínica dels pacients, essent més efectiva com més aviat s'implementa. Per aquest motiu, s'ha desenvolupat una tècnica d'estudi de la via de biosíntesi endògena de CoQ₁₀ en cèl·lules cultivades mitjançant isòtops no radioactius que permet discriminar entre deficiències primàries i deficiències secundàries de CoQ₁₀. Aquests estudis també permetrien detectar possibles intermediaris acumulats en casos de deficiències primàries clares, ajudant en la cerca de la possible causa genètica.

Les metodologies implementades per a l'estudi dels complexos que formen la CRM i l'estudi de la via de biosíntesi endògena de CoQ₁₀ han millorat significativament la qualitat analítica i el diagnòstic en pacients amb sospita de malaltia mitocondrial i/o deficiència de CoQ₁₀.

◆ **RESUMEN**

Detectar y diagnosticar las enfermedades mitocondriales y los defectos de CoQ₁₀ no es una tarea fácil, dada la gran heterogeneidad fenotípica y el elevado número de factores genéticos implicados. El diagnóstico implica estudios metabólicos, bioquímicos y morfológicos completos, entre los que se encuentra el estudio de la actividad enzimática de los complejos que forman la cadena respiratoria mitocondrial (CRM) y la cuantificación del CoQ₁₀ en tejidos energéticos, como por ejemplo el tejido muscular, y/o en fibroblastos cultivados. A lo largo de esta tesis se ha trabajado en el desarrollo de métodos de estudio que permitan mejorar el rendimiento diagnóstico en estos pacientes.

Por un lado, se ha actualizado la metodología de estudio de las actividades enzimáticas de los complejos que forman la CRM, tanto en tejido muscular como en fibroblastos, mejorando notablemente la calidad analítica, sobre todo en la determinación de las actividades enzimáticas del complejo I, el complejo III y el complejo IV aislados. Además, ésta mejora metodológica se ha implementado homogéneamente en 7 centros de diagnóstico españoles, permitiendo la creación de una red española para el estudio de estas enzimas con el objetivo común de comparar resultados y facilitar el trabajo en equipo para la obtención de diagnósticos más precisos.

La electroforesis en Blue Native-gel es una metodología complementaria que permite el estudio de la actividad ATPasa del complejo V, tanto en tejido muscular como en fibroblastos, y la actividad del complejo I en fibroblastos, actividades que no se pueden determinar mediante las técnicas espectrofotométricas habituales. Por esta razón, se ha establecido la mencionada técnica como test adicional en los estudios espectrofotométricos de las enzimas de la CRM, mejorando significativamente el rendimiento diagnóstico en los pacientes estudiados y el conocimiento de los mecanismos causantes de la enfermedad.

Es importante detectar las deficiencias primarias de CoQ₁₀, ya que el tratamiento basado en suplementación oral con CoQ₁₀ mejora considerablemente la clínica de los pacientes, siendo más efectiva cuando más precozmente se implementa. Por este motivo, se ha desarrollado una técnica de estudio de la vía de biosíntesis endógena del CoQ₁₀ a partir de células cultivadas mediante isótopos no radioactivos, que permite discriminar entre deficiencias primarias y deficiencias secundarias de CoQ₁₀. Éstos estudios también permitirían detectar posibles intermediarios acumulados en casos de deficiencias primarias claras, contribuyendo en la investigación de la posible causa genética.

Las metodologías implementadas para el estudio de los complejos que forman la CRM y el estudio de la vía de biosíntesis endógena de CoQ₁₀ han mejorado significativamente la calidad analítica y el diagnóstico en pacientes con sospecha de enfermedad mitocondrial y/o deficiencia de CoQ₁₀.

◆ **SUMMARY**

Mitochondrial diseases and CoQ₁₀ deficiencies constitute a remarkable diagnostic challenge due to the wide variety of clinical symptoms and the number of genetic factors involved in these diseases. The diagnose implies metabolic, biochemical and morphological studies of the mitochondrial respiratory chain (MRC) and the quantification of the amount of CoQ₁₀ in energetic tissues, such as muscle and/or in cultured fibroblasts. Throughout this thesis we have worked on the development of methods to improve these studies in order to get a better diagnostic efficiency in these patients.

The methodology to determine the enzymatic activities of the MRC have been updated, for both muscle tissue and cultured fibroblasts, notably improving the quality of the analysis, especially for the enzymatic activities of isolated complex I, complex III and complex IV alones. These methodological improvements have been established in seven Spanish diagnostic centers allowing the creation of a Spanish network for the study of the mitochondrial respiratory chain complexes in order to share experience, compare results and provide a better diagnosis to the patients.

Blue Native electrophoresis gel is a complementary methodology that allows the study of complex V ATPase activity, in muscular tissue as well as in cultured fibroblasts, and of complex I enzymatic activity in cultured fibroblasts, which are not possible to be studied using standard spectrophotometric methods. For this reason, this technique has been established as an additional assay in the study of the MRC enzymatic activity, significantly improving the diagnostic efficiency in patients and providing a better understanding of the mechanism of the disease.

It is important to detect primary CoQ₁₀ deficiencies since a treatment based on oral supplementation with CoQ₁₀ significantly improves the clinical diagnose, being more effective when it's early implemented. For that reason, we have developed a technique for the study of the endogenous CoQ₁₀ biosynthesis in cultured fibroblasts with stable isotopes that discriminates primary from secondary CoQ₁₀ deficiencies. This study could also detect accumulated intermediates in cases of primary deficiencies that would help to find the genetic cause of the disease.

The implemented methodologies to study the mitochondrial respiratory chain complexes and the CoQ₁₀ endogenous biosynthetic pathway have improved the quality of the analysis tests and the diagnostic efficiency in patients suspected of mitochondrial disease or CoQ₁₀ deficiency.



INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ

1.1 El mitocondri i les malalties mitocondrials

1.1.1 El mitocondri: estructura i funció

Els mitocondris són orgànuls cel·lulars la principal funció dels quals és generar l'energia necessària requerida per les cèl·lules. La seva estructura i la seva funció estan íntimament relacionades. Cada mitocondri està delimitat per dues membranes especialitzades: la membrana mitocondrial interna i la membrana mitocondrial externa. Aquestes membranes defineixen la matriu mitocondrial i l'espai intermembrana. La membrana mitocondrial interna encabeix els enzims del sistema de fosforilació oxidativa (sistema OXPHOS), com són els enzims que formen la cadena respiratòria, i crea un barrera específica per el transport difusiu de ions, un factor crucial per a la generació del gradient de protons (H^+) necessari per a la producció d'ATP. Aquesta membrana embolcalla la matriu mitocondrial, que conté un nombre variable de còpies del l'ADN propi del mitocondri (ADNmt) i els enzims del cicle de l'àcid tricarboxílic i la β -oxidació mitocondrial, involucrats en el metabolisme dels carbohidrats i els àcids grassos, respectivament (*Cwerman-Thibault 2011*).

La membrana mitocondrial externa, que és més permeable, conté moltes còpies d'una proteïna anomenada porina, que forma canals aquosos a través de la bicapa lipídica. Així, aquesta membrana permet el pas, a l'espai intermembrana, de petites proteïnes i molècules de menys de 5000 daltons, fent que sigui químicament equivalent al citosol (*Alberts 2003*). Per altra banda, la membrana mitocondrial interna està altament especialitzada i conté una elevada proporció de cardiolipina, un fosfolípid que fa que sigui especialment impermeable a la majoria de molècules petites i ions, inclòs els protons (H^+); les úniques espècies que creuen la membrana interna són aquelles per les quals existeixen transportadors específics, com ara molècules que són metabolitzades o necessàries pels enzims mitocondrials presents a la matriu mitocondrial. Generalment, la membrana mitocondrial interna sol estar replegada cap a la matriu formant les anomenades crestes mitocondrials. Aquestes invaginacions augmenten l'àrea de la membrana interna, i el seu nombre pot variar en funció del tipus cel·lular (*Alberts 2003*).

Per generar energia, els mitocondris poden metabolitzar tant el piruvat, procedent de la glucosa i altres sucres, com els àcids grassos, procedents de les grasses. Ambdues molècules són transportades a través de la membrana mitocondrial interna i transformades a acetil-CoA per la piruvat deshidrogenasa o per la β -oxidació. Els grups acetil de l'acetil-CoA són oxidats a la matriu a través del cicle de Krebs, que converteix els àtoms de carboni en CO_2 i genera electrons que són transportats a través del NADH i el FADH_2 a la membrana mitocondrial interna, on entren a la cadena de transport electrònic per tal de produir energia en forma d'ATP i regenerar el NAD^+ i el FAD necessaris per continuar el metabolisme oxidatiu (Figura 1).

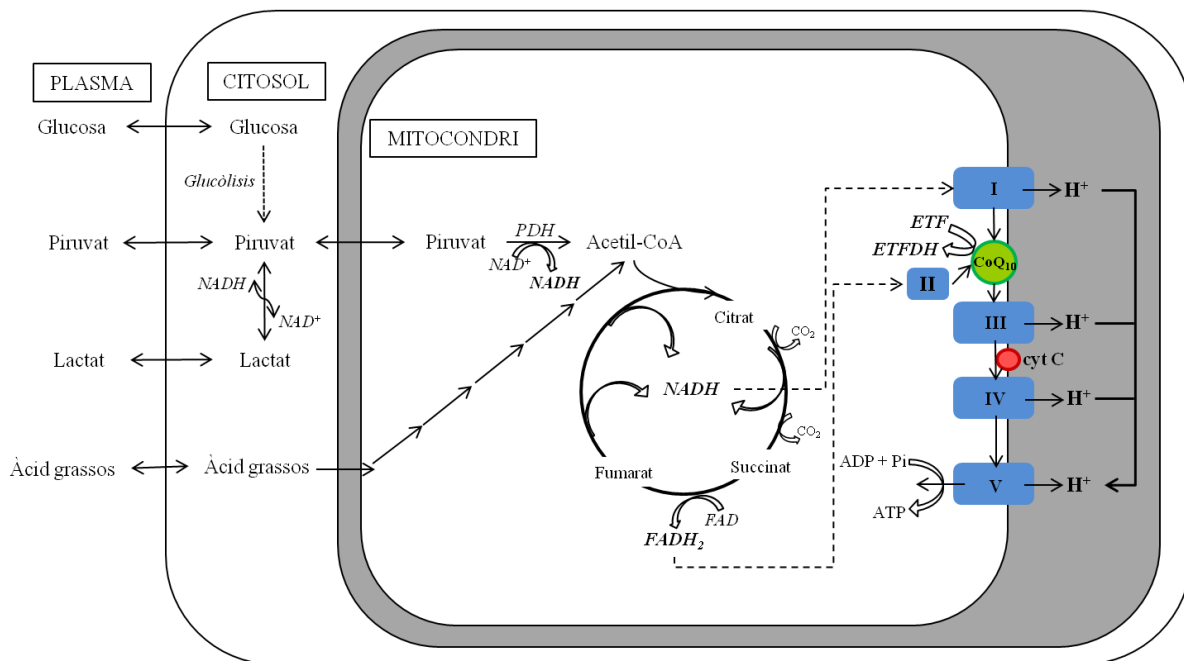


Figura 1. Representació esquemàtica del metabolisme energètic cel·lular, incloent les vies mitocondrials del Cicle de Krebs y la fosforilació oxidativa (sistema OXPHOS). Modificada de Debray 2008.

A part de produir energia, el sistema OXPHOS mitocondrial també genera radicals lliures derivats de l'oxigen (ROS). Sota condicions fisiològiques la producció de ROS està altament regulada, però quan el sistema OXPHOS presenta alteracions funcionals, s'incrementa la producció de radicals O_2^- , comportant danys a les proteïnes cel·lulars, lípids i àcids nucleics, provocant, finalment, una degeneració cel·lular (Cwerman-Thibault 2011).

1.1.2 La cadena respiratòria mitocondrial

La funció principal del mitocondri és la síntesis d'ATP, que es dona mitjançant el sistema OXPHOS.

El sistema OXPHOS està localitzat a la membrana mitocondrial interna i està format per cinc complexos enzimàtics multiproteics (Figura 2): NADH-deshidrogenasa (NADH-ubiquinona oxidoreductasa o complex I; EC 1.6.5.3), succinat deshidrogenasa (succinat-ubiquinona oxidoreductasa o complex II; EC 1.3.5.1), ubiquinol-citocrom c oxidoreductasa (complex citocrom *bcl* o complex III; EC 1.10.2.2), citocrom c oxidasa (complex IV; EC 1.9.3.1) i ATP sintasa (complex V; EC 3.6.3.14).

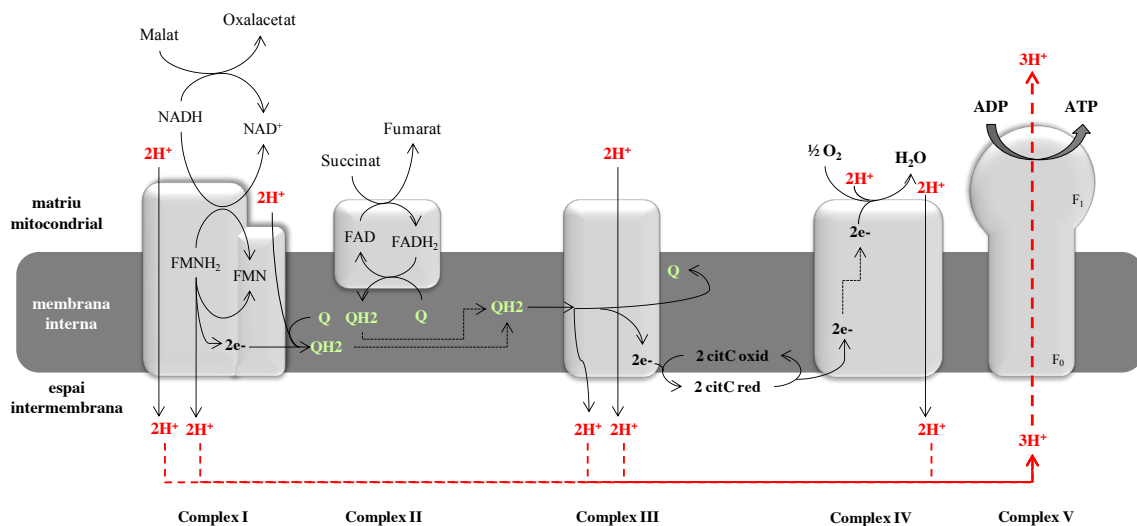


Figura 2. Esquema del sistema OXPHOS mitocondrial (complexes I-V). FMNH₂/FMN: mononucleòtid de flavina; Q/QH₂: coenzim Q₁₀; citC oxid: citocrom C oxidat; citC red: citocrom c reduït. Imatge creada a partir de *Salway 2004*.

Els substrats subministren equivalents reductors a la cadena respiratòria en diferents punts. Els electrons passen al llarg dels complexos enzimàtics que formen la cadena respiratòria i provoquen que els protons (H⁺) siguin bombejats a través de la membrana mitocondrial interna, generant un gradient que s'utilitzarà per a la síntesi d'ATP mitjançant la ATP sintasa (*Janssen 2004*). Es requereix de l'acció coordinada dels complexos de la cadena respiratòria i de complexos accessoris que subministren o accepten electrons, com ara el coenzim Q i l'enzim flavoproteïna-ubiquinona oxidoreductasa (ETF-QO) (*Cwerman-Thibault 2011*).

En la reacció global catalitzada per la cadena respiratòria mitocondrial es transporten electrons des del NADH, el succinat o altres donadors electrònics primaris mitjançant flavoproteïnes, ubiquinona, proteïnes ferro-sulfurades i citocroms fins a l'oxigen. Cada complex de la cadena té major afinitat pels electrons que el seu predecessor, de manera que els electrons passen seqüencialment d'un complex a un altre fins que finalment són transferits a l'oxigen, el qual té una afinitat pels electrons major que la de qualsevol altre complex de la cadena (*Nelson 2005*). L'energia alliberada és utilitzada per la membrana interna per impulsar la transformació de ADP+Pi a ATP (*Alberts 2003*).

► Complexes de la CRM

Tal i com s'ha esmentat anteriorment, la cadena respiratòria mitocondrial està formada per 5 complexos multienzimàtics:

- Complex I, NADH:ubiquinona oxidoreductasa o NADH deshidrogenasa: aquest conjunt multiproteic catalitza la transferència d'electrons del NADH cap a la ubiquinona, i hi acobla la sortida de protons cap a l'espai intermembrana. És el complex enzimàtic més gran de la CRM, està format per 45 subunitats estructurals, set de les quals estan codificades per l'ADNmt. La part hidrofòbica del complex manté el complex unit a la membrana mitocondrial interna, mentre que a la part exposada a la matriu s'hi localitzen les flavoproteïnes i les proteïnes del ferro-sofre (Fe-S) (*Galante 1979*). Els electrons passen a través de les flavoproteïnes i dels *clusters* de Fe-S, i l'energia alliberada facilita el transport de protons a través de la fracció hidrofòbica del complex.
- Complex II o succinat deshidrogenasa: consisteix en 4 subunitats (A-D) exclusivament codificades per gens nuclears. Aquest complex participa en la cadena respiratòria mitocondrial i en el Cicle de Krebs. Catalitza la oxidació del succinat a fumarat i transfereix els electrons des del FAD cap al pool d'ubiquinona de la cadena respiratòria. Aquesta transferència no genera energia suficient per a bombejar protons. Les subunitats A i B formen la succinat deshidrogenasa (SDH), mentre que les subunitats C i D ancoren l'enzim a la membrana. El complex conté 3 unitats de Fe-S (*Rustin 2002*).

- Complex III, complex citocrom bc_1 o ubiquinona:citocrom c oxidoreductasa: catalitza la transferència d'electrons des de l'ubiquinol cap al citocrom c, bombejant protons a través de la membrana mitocondrial interna cap a l'espai intermembrana. Està format per 11 subunitats, de les quals totes excepte una (citocrom b) vénen codificades per gens nuclears (Moslemi 2007). El nucli funcional consta de tres subunitats: el citocrom b amb dos grups hemo (b_H i b_L), la proteïna ferro-sulfurada de Rieske amb dos centres Fe-S i el citocrom c_1 amb un grup hemo (Alberts 2003).
- Complex IV o citocrom oxidasa (COX): és l'enzim terminal de la cadena respiratòria. Catalitza la transferència d'electrons des del citocrom c reduït cap a l'oxigen, donant lloc a la formació de molècules d'aigua. Aquesta transferència va acoblada al bombeig de protons cap l'espai intermembrana. Està format per 13 subunitats estructurals, tres de les quals, les que formen el centre catalític de l'enzim, vénen codificades per gens mitocondrials (Moslemi 2007).
- Complex V o ATP sintasa: acobla el flux de protons des de l'espai intermembrana cap a la matriu mitocondrial amb la conversió de ADP i P_i cap a ATP. La ATP sintasa està formada per dues entitats proteiques ben definides: la unitat F_1 , que s'interna cap a la matriu mitocondrial, i la unitat F_0 , que està integrada a la membrana mitocondrial interna. La unitat F_1 consta de les següents subunitats: tres còpies de les subunitats α i β , i un còpia de les subunitats γ , δ i ϵ . La unitat F_0 consta d'un anell de subunitats c i les subunitats a , b , d , F_6 , la proteïna proporcionadora de sensibilitat a la oligomicina (OSCP) i subunitats accessòries com ara les subunitats e , f , g i $A6L$. Totes venen codificades per gens nuclears, exceptuant la a i la $A6L$ de la unitat F_0 , que vénen codificades per gens mitocondrials (ATP6 i ATP8, respectivament) (Elston 1998; Kinoshita 2004).

► ***Organització dels complexos en respirasomes i supercomplexes***

La idea sobre la organització general dels complexos que formen el sistema de fosforilació oxidativa ha anat canviant al llarg del temps. Existeixen dos models (*Dudkina 2010*):

- *Model d'estat fluid*: postula que els complexos de cadena respiratòria poden difondre lliurement per la membrana i que la transferència d'electrons es basa en col·lisions atzaroses dels complexos sols.
- *Model d'estat sòlid*: proposa interaccions estables entre els complexos que formen el sistema OXPHOS formant entitats anomenades supercomplexes. Aquest model actualment està suportat per un gran nombre de resultats experimentals. Mitjançant la electroforesis per Blue Native s'ha corroborat aquesta estructura en supercomplexes i s'ha vist que formen unitats actives (*Schägger 2000; Eubel 2003; Eubel 2004*). Alguns experiments de control de flux també han determinat que la cadena respiratòria actua com a una sola unitat funcional (*Boumans 1998; Bianchi 2004*).

En alguns organismes s'han trobat els complexos I, III i IV associats en forma de supercomplex, el qual s'ha anomenat respirasoma donada la seva capacitat de dur a terme la respiració en presència d'ubiquinona i citocrom c (*Dudkina 2009*). A més, s'ha vist que mutacions puntuals en gens que codifiquen per a alguna de les subunitats d'un dels complexos OXPHOS, poden afectar l'estabilitat d'algun altre complex (*Acín-Pérez 2004*).

El complex II no forma part de cap supercomplex i això es creu que pot ser degut a la seva implicació amb el cicle de Krebs, tot i que en algun estudi de Blue Native s'han pogut detectar supercomplexes amb presència de complex II.

Es creu que els supercomplexes poden conviure a la membrana juntament amb complexos individuals del sistema OXPHOS. Aquesta organització específica en supercomplexes es creu que té raons funcionals. S'ha proposat que els supercomplexes acceleren el flux d'electrons entre els complexos, reduint les distàncies de difusió dels transportadors d'electrons, ubiquinona i citocrom c, o canalitzant els substrats dels complexos. A part de les raons funcionals, la formació d'aquests supercomplexes és necessària per a l'assemblatge i estabilitat dels seus components individuals. Per

exemple, s'ha vist que el complex I és necessari per al bon assemblatge del complex III i que el complex IV es requereix per a l'assemblatge del complex I (*Ugalde 2004; Blakely 2005; Diaz 2006*).

La disposició dels complexos del sistema OXPHOS influenciaria en la organització de les crestes mitocondrials i en la morfologia d'aquestes membranes. Concretament, s'ha vist que la organització de la ATP sintasa en forma de dímers i oligòmers determina la morfologia de les crestes mitocondrials. Aquesta morfologia permetria concentrar el gradient de protons en una zona concreta, optimitzant la producció d'ATP. De la mateixa manera, els respirasomes i els complexos de la cadena respiratòria en la seva forma individual es localitzarien a les zones menys corbades de les crestes (*Strauss 2008*).

1.1.3 Genètica mitocondrial

El mitocondri és un orgànul format per unes 1500 proteïnes (*Calvo 2006; Fang 2009*) els gens codificants de les quals es troben tant al genoma nuclear (ADNn), amb herència mendeliana, com al genoma mitocondrial (ADNmt), d'herència materna. Es requereix una molt bona coordinació entre el nucli i el mitocondri per tal d'assegurar el bon funcionament d'aquest.

L'ADNmt humà és una molècula de doble cadena circular de 16,6 kb que codifica per 13 proteïnes implicades en la cadena respiratòria mitocondrial (*Anderson 1981*): 7 subunitats del complex I, el citocrom b del complex III, 3 subunitats del complex IV i 2 subunitats del complex V. La resta de subunitats estructurals del sistema OXPHOS, aproximadament unes 85, vénen codificades per l'ADNn. L'ADN mitocondrial té un codi genètic propi, i per això també codifica per dos ARN ribosòmics (ARNr) i 22 ARN de transferència (ARNt) necessaris per a la síntesis de les proteïnes mitocondrials. La replicació de l'ADNmt requereix de determinats gens codificats per l'ADN nuclear, com ara la ADN polimerasa gamma (POLG) o la deoxiguanosin quinasa (DGUOK). L'ADNmt és totalment codificant, sense introns, i és més vulnerable a mutacions que l'ADNn degut, segurament, a la falta d'histones i a la contínua exposició a molècules

reactives de l'oxigen procedents del metabolisme de la cadena respiratòria mitocondrial (Moslemi 2007).

Múltiples proteïnes codificades per l'ADNn estan implicades en processos com ara l'acoblament dels complexos multienzimàtics, el manteniment de l'ADNmt i la dinàmica mitocondrial. Aquestes proteïnes es sintetitzen al citoplasma per ser posteriorment translocades a l'interior del mitocondri.

Hi ha tres punts de la genètica mitocondrial a tenir en compte (DiMauro 2005):

- *Herència materna*

Durant la fertilització, tot l'ADNmt prové de l'òvul. Per tant, la transmissió de l'ADNmt no segueix el patró d'herència mendeliana. Una mare portadora d'una mutació a l'ADNmt, la transmetrà als seus fills independentment del sexe, però només les filles ho transmetran a la seva descendència. Altres mutacions es produeixen de manera espontània, com és el cas de les delecions causants del Síndrome de Kearns-Sayre (OMIM#530000).

- *Heteroplàsmia i efecte llindar*

Cada cèl·lula conté centenars o milers de còpies de ADNmt que es distribueixen aleatòriament entre les cèl·lules filles. En els teixits normals, la majoria de les molècules de ADNmt són idèntiques (homoplàsmia). Dins de la cèl·lula o el teixit, les possibles mutacions deletèries sovint afecten algunes molècules de ADNmt, però no totes (heteroplàsmia); l'expressió clínica de la mutació ve determinada per la proporció entre molècules mutants i normals. Això implica que, quan el percentatge de ADNmt mutat supera un determinat llindar, la producció d'energia per part del mitocondri disminueix, essent insuficient per a un funcionament normal del teixit de tal manera que s'inicia una disfunció del metabolisme energètic cel·lular i apareixen els símptomes (Wallace 2009).

- *Segregació mitòtica*

En la divisió cel·lular, els mitocondris es reparteixen de manera aleatòria, de manera que la proporció de ADNmt mutant a les cèl·lules filles pot canviar, alterant el fenotip. Aquest fenomen, anomenat segregació mitòtica, explica com certs pacients amb desordres relacionats amb l'ADNmt poden canviar el fenotip clínic a

mesura que es fan grans. Aquest fet també explicaria les diferències de fenotip entre germans portadors d'una mateixa alteració.

1.1.4 Desordres mitocondrials

Les malalties mitocondrials engloben una àmplia varietat de fenotips clínics, sovint involucrant teixits amb elevat requeriment energètic, com ara el cervell, la retina, el cor, el múscul, el fetge i el sistema endocrí. El mitocondri juga un paper important en la producció d'energia, la biologia de les espècies reactives de l'oxigen (sistema ROS), l'apoptosi i una selecció de vies metabòliques (*Cwerman-Thibault 2011*).

► *Alteracions de l'ADNmt*

▪ *Mutacions*

S'han identificat més de 200 mutacions patogèniques a l'ADNmt que estan associades a un ampli espectre de fenotips clínics, que inclouen miopatia i intolerància a l'exercici, encefalomiopatia, ceguera, sordera, cardiomiopatia, Alzheimer i Parkinson, i càncer (*Wallace 2009; Lin 2009*). Tot i això, només un 15-20% dels pacients amb malaltia mitocondrial són a causa de mutacions al genoma mitocondrial; la resta, es creu que vénen causades per mutacions en gens nuclears (*Kirby 2008*). Aquests canvis afecten a gens implicats en el manteniment i l'expressió del genoma mitocondrial, en l'estructuració i assemblatge dels complexos enzimàtics de la fosforilació oxidativa, la biosíntesi de cofactors, així com també amb el grup hemo i els *clusters* de ferro-sofre (Fe-S) (*Koene 2009*).

▪ *Depleció mitocondrial*

La depleció de l'ADNmt es caracteritza per una reducció del nombre de còpies de l'ADNmt en els teixits i òrgans afectats. Es requereix d'una quantitat adequada de ADNmt per a la producció d'algunes de les subunitats que formen els complexos de la cadena respiratòria mitocondrial i, per tant, per a la producció d'energia. La depleció mitocondrial està associada a defectes en el manteniment del genoma mitocondrial causats per mutacions en gens nuclears involucrats en el manteniment del *pool* mitocondrial de nucleòtids (com ara *TK2*, *DGUOK*, *SUCLA2*, *SUCLG1*, *RRM2B* i *TYMP*) o directament en gens associats amb la replicació del ADNmt (*POLG*). És un

grup fenotípicament heterogeni que pot afectar a un òrgan específic o a un conjunt d'òrgans, incloent múscul, fetge, cervell i ronyons (*Hirano 2001*). Cal sospitar d'una depleció mitocondrial especialment quan els estudis bioquímics mostren deficiències múltiples dels enzims de cadena respiratòria, a excepció de l'activitat del complex II, que és manté completament normal ja que les subunitats que el formen vénen codificades únicament per gens nuclears.

► Defectes del sistema OXPHOS

Generalment, quan es parla de malaltia mitocondrial es fa referència a desordres en el sistema OXPHOS, excloent les alteracions d'altres vies metabòliques localitzades al mitocondri com ara les del metabolisme del piruvat, el Cicle de Krebs o la oxidació d'àcids grassos. Recentment, però, les deficiències primàries de CoQ₁₀ s'han inclòs dins el grup de desordres mitocondrials donada la seva funció central com a portador d'electrons des dels complexos I i II cap al complex III (*DiMauro 2007*).

Els defectes de la cadena respiratòria mitocondrial (CRM) poden causar més de 100 desordres diferents, manifestant-se a qualsevol edat i amb simptomatologia d'afectació diversa. A més, com que la base genètica d'aquests desordres pot ser tant mitocondrial com nuclear, el patró d'herència pot ser matern, esporàdic, autosòmic dominant o recessiu, o bé lligat al cromosoma X (*Suomalainen 2011*).

Els desordres del sistema OXPHOS mitocondrial probablement constitueixen el grup més comú de desordres neurometabòlics amb base genètica (*Darin 2001*), amb una incidència estimada de 1:5000. Els trets clínics d'aquests desordres sovint són característics, però no són específics. Els òrgans més afectats són els que tenen una major demanda d'energia, com ara els múscul esquelètic i el sistema nerviós central, però tots els òrgans i teixits es poden veure afectats (*Moslemi 2007*).

A part de mutacions en gens que codifiquen directament per subunitats que formen els complexos, els defectes del sistema OXPHOS poden venir donats per mutacions patològiques en gens no directament implicats, com ara proteïnes involucrades en la translocació proteica mitocondrial, en el manteniment de l'ADNmt i proteïnes de fusió i divisió mitocondrial, entre d'altres (*Moslemi 2007*). Aquest ampli ventall dificulta la cerca de la causa molecular de les deficiències del sistema OXPHOS.

▪ *Defectes de complex I*

Les deficiències aïllades de complex I són el defecte bioquímic més habitual de les malalties mitocondrials, explicant 1/3 dels desordres del sistema OXPHOS. Aquests defectes són clínicament heterogenis i la majoria d'individus afectats mostren símptomes durant el primer any de vida, amb una ràpida progressió de la malaltia (*Fassone 2012*). Les presentacions clíniques més característiques són l'acidosis làctica neonatal fatal, el Síndrome de MELAS (encefalomiopatia, acidosis làctica i episodis d'isquèmia; OMIM#540000) i l'anomenat Síndrome de Leigh (OMIM#256000), que es caracteritza, generalment, per regressió psicomotora, disfunció cerebral, atàxia, distonia i atròfia òptica. Les deficiències primàries de complex I poden venir causades tant per mutacions en l'ADN mitocondrial com en subunitats estructurals o factors d'assemblatge codificats per gens nuclears. Es creu que en el 90-95% dels casos, vénen donades, per mutacions en gens nuclears. Tot i això, en el 60% dels casos diagnosticats no s'arriba a determinar la causa genètica (*Triepels 2001*). Donada la complexitat estructural i funcional d'aquest complex, no es pot descartar que defectes en la seva activitat siguin secundaris a altres processos metabòlics no relacionats directament amb el mitocondri.

▪ *Defectes de complex II*

Els defectes aïllats de complex II són molt poc freqüents. Des de les primeres descripcions d'aquesta deficiència s'han reportat pocs pacients, amb Síndrome de Leigh (OMIM#256000) o cardiomiopatia, amb mutacions a la subunitat SDHA (*Burgeois 1992; Bourgeron 1995*). Per a la resta de gens nuclears que codifiquen per subunitats d'aquest complex (*SDHB, SDHC i SDHD*), s'han descrit recentment alguns pacients amb mutacions en *SDHB* (*Alston 2012*) i *SDHD* (*Jackson 2014*). També s'ha identificat un cas de leucoencefalopatia infantil associat a defecte de complex II causat per mutacions al factor d'assemblatge SDHAF1 (*Ghezzi 2009*).

A més a més, s'ha vist que mutacions en las subunitats B, C y D son responsables d'una part dels paragangliomes autosòmics dominants, i de formes no familiars, inclosos els feocromocitomes.

▪ *Defectes de complex III*

Aquests defectes son relativament rars, amb gran heterogeneïtat clínica i genètica. La major part de deficiències reportades vénen causades per mutacions patogèniques a

UQCRB, l'únic gen mitocondrial associat a aquest complex i que codifica pel citocrom b, i *BCSIL*, una factor que ajuda a l'acoblament de la proteïna de Rieske dins el context d'assemblatge del complex III. Recentment s'han pogut identificar pacients amb mutacions en gens nuclears que codifiquen per dues de les 10 proteïnes implicades en aquest complex: *UQCRQ* (subunitat VII) (Barel 2008) i *UQCRC2* (*core protein II*) (Miyake 2013).

També s'han descrit defectes de complex III associats a mutacions en factors d'assemblatge: *TTC19* (Ghezzi 2011), *UQCC2* (Factor 2) (Tucker 2013) i *UQCC3* (factor3) (Wanschers 2014).

- *Defectes de complex IV*

S'han descrit deficiències de complex IV causades tant per mutacions en gens nuclears com en mitocondrials. Els gens nuclears *COX10*, *SURF1* i *SCO2*, que participen en la maduració i l'assemblatge del complex IV, estan associats a deficiències aïllades d'aquest complex. A més, s'han associat fenotips clínics concrets per a aquests gens: mutacions en *SURF1* van associades a Síndrome de Leigh, mentre que mutacions en *SCO2* i *COX10*, es relacionen amb quadres d'encefalomiopatia i leucodistrofia amb tubulopatia, respectivament.

- *Defectes de complex V*

En els defectes de complex V hi poden estar implicats gens de codificació mitocondrial, com ara *ATP6* i *ATP8*, com gens nuclears, com *ATP12*, *TMEM70* i *ATP5E*. Els primers defectes de complex V descrits eren deguts a mutacions al gen *ATP6*, que codifica per la subunitat *a* de la ATP sintasa, i fins el dia d'avui, és la principal font de mutacions. *ATP12* i *TMEM70* estan involucrats en l'assemblatge i la biogènesi del complex V, mentre que *ATP5E* codifica per la subunitat ϵ del complex V.

A vegades també s'observen defectes combinats que involucren més d'un complex del sistema OXPHOS, com ara, els defectes de complex I + III i complex II+III. Sovint, quan s'observa aquest perfil bioquímic, es tracta de defectes de coenzim Q₁₀, una molècula lipofílica que transporta electrons des del complex I i II al complex III.

1.2 El CoQ₁₀

El coenzim Q (CoQ) va ser aïllat i caracteritzat per *Festenstein i col.* el 1955 i varen ser *Crane i col.* els que, al 1957, van establir que aquest compost formava part de la cadena respiratòria mitocondrial. Més tard, al 1958, *Wolf i col.* varen descriure que el CoQ era un lípid inusual, format per un anell de benzoquinona unit a una cadena llarga de isoprenoides, que es situava en llocs específics de les membranes biològiques (*Turunen 2004*).

El CoQ està present en tots els teixits i membranes cel·lulars, però en quantitats diferents. S'ha vist que on es troba en major proporció és a la membrana interna i externa del mitocondri, als lisosomes i a les vesícules de Golgi. En humans la forma majoritària és el CoQ₁₀ tot i que també es poden trobar petites quantitats (2-7%) de CoQ₉ en tots els teixits (*Turunen 2004*) procedent de la dieta o de la síntesis per part de microorganismes intestinals (*Rahman 2012*). El CoQ₁₀ és una molècula de síntesis endògena i només un percentatge petit (2-4%) s'incorpora a la circulació a través de la dieta.

1.2.1 Funcions del CoQ₁₀

La funció principal del CoQ₁₀ és transportar els electrons des dels complexos I i II fins al complex III de la CRM. Però a més de la seva funció central a la CRM, el CoQ està involucrat en molts altres processos del metabolisme cel·lular (*Turunen 2004*):

- *Sistema redox de la membrana plasmàtica i lisosomes:* La membrana plasmàtica de les cèl·lules eucariotes conté una NADH oxidasa (NOX) CoQ-dependent involucrada en la transferència d'electrons a través de membrana i que regula el ratio citosòlic NAD⁺/NADH. La participació del CoQ en el transport d'electrons de la membrana plasmàtica va ser demostrat pel fet que l'activitat NOX era inhibida quan s'extreia el CoQ i reconstituïda al reintroduir-lo. S'ha proposat que NOX està relacionada amb el control del creixement cel·lular i la diferenciació, així com també en el manteniment de l'ascorbat extracel·lular en la seva forma reduïda (*Turunen 2004; Bentinger 2010*).

- *Antioxidant*: El mitocondri és el compartiment cel·lular que produeix més quantitat d'espècies reactives d'oxigen (ROS) i H_2O_2 de la cèl·lula. La forma reduïda de CoQ ($CoQH_2$) és un potent antioxidant no enzimàtic que actua protegint l'ADN i les membranes cel·lulars dels radicals produïts per l'estrès oxidatiu, evitant així la formació de radicals lípid-peroxil i la oxidació de proteïnes de membrana. El $CoQH_2$ es regenera principalment a la cadena respiratòria mitocondrial però la cèl·lula també conté d'altres sistemes efectius de reducció en l'espai intracel·lular.
- *Proteïnes desacopladores (UCPs)*: Les UCPs es troben a la membrana mitocondrial interna i poden translocar H^+ des de l'exterior cap a l'interior del mitocondri. La funció principal no és generar energia, sinó produir calor. El CoQ és un cofactor necessari per al funcionament de les UCPs i en la seva forma oxidada pot extreure H^+ dels àcids grassos i cedir-los al grup acceptor de H^+ de les UCPs.
- *Porus de permeabilitat transitòria (PTP)*: La membrana mitocondrial interna té baixa permeabilitat a ions i soluts per tal de preservar l'energia, en forma de gradient de protons, i el pH. Per tal de facilitar el transport trans-membrana, la membrana mitocondrial interna conté transportadors de macromolècules i canals de ions. La permeabilització de la membrana es dona per la obertura d'uns complexes, anomenats PTP, situats a la membrana mitocondrial interna, que es comporten com un canal dependent de voltatge, afavorint una conformació tancada a alts potencials de membrana i una conformació oberta a baixos potencials. S'ha vist que el CoQ_{10} regula els PTP, prevenint-ne la seva obertura.

1.2.2 Via de síntesis i gens implicats

El CoQ_{10} es sintetitza endògenament a totes les cèl·lules eucariotes. La via de síntesis s'ha estudiat extensament en bacteris i llevats, però no tant en mamífers, i s'ha vist que tots els gens *COQ* (*COQ1-10*) tenen un senyal de localització mitocondrial (Turunen 2004).

El CoQ_{10} està format per un anell de benzoquinona i una cua poli-isoprenoide. La síntesis de la cua poli-isoprenoide, que té lloc al citoplasma, es dona a partir de la via del mevalonat, mentre que l'anell de quinona es sintetitza al mitocondri i deriva dels aminoàcids tirosina o fenilalanina (Trevisson 2011) (Figura 3).

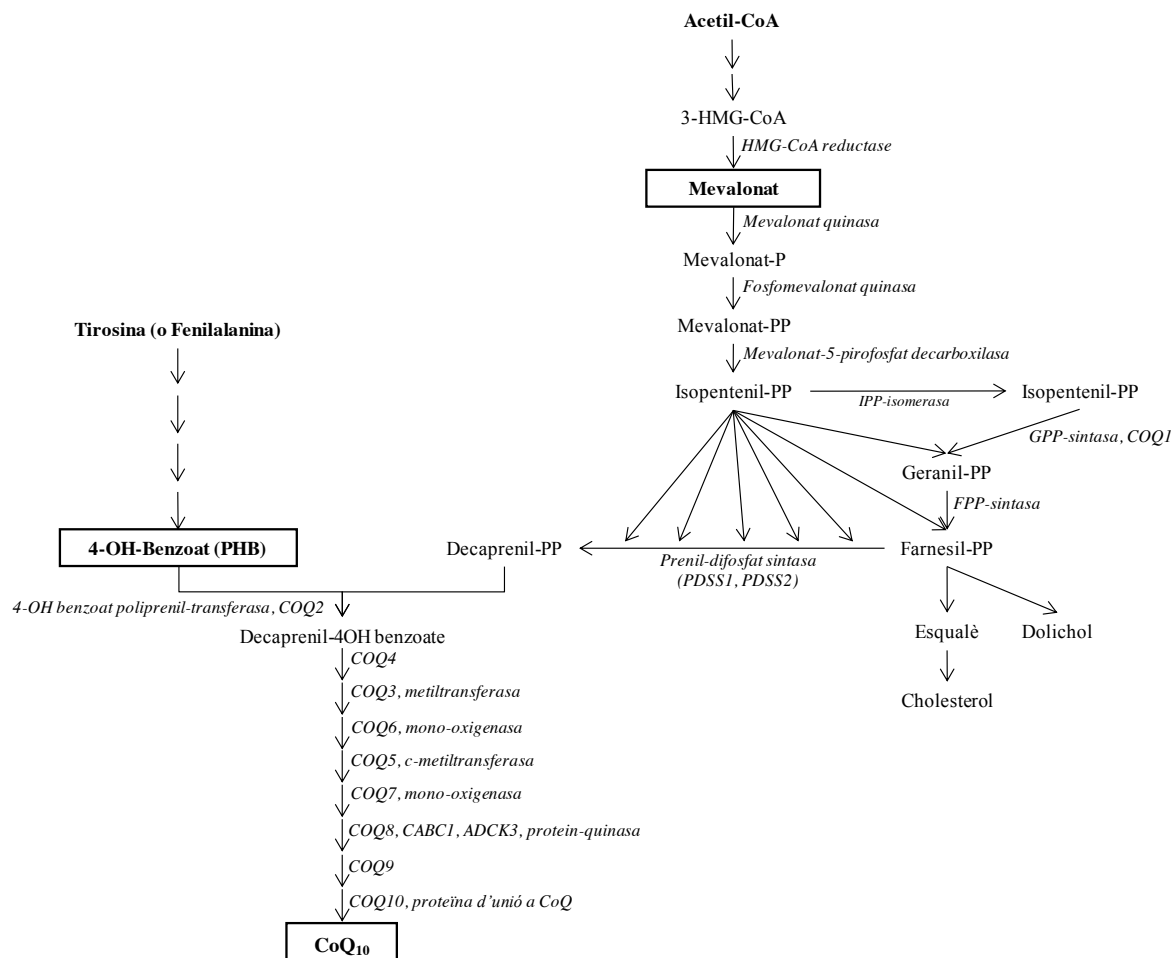


Figura 3. Via de síntesi del CoQ₁₀. Modificada de *Dallner (2000)*.

La via del mevalonat comprèn les reaccions des de l'acetil-coenzima A (acetil-CoA) fins al farnesil pirofosfat (FPP), el substrat per a la biosíntesi de CoQ, colesterol i dolicol (Figura 3). Aquests lípids que es formen a partir de la via del mevalonat són sintetitzats en quantitats molt diferents cosa que implica, a més d'un punt central de regulació, una regulació terminal; es creu que els enzims reguladors són segurament els que utilitzen FPP com a substrat. Això fa que la via del mevalonat sigui molt complexa. La part inicial de la via comprèn la condensació de tres acetil-CoA a 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) a través de l'acció de 2 enzims, l'acetoacetil-CoA tiolasa i la HMG-CoA sintasa. Després actua la HMG-CoA reductasa, que converteix HMG-CoA a mevalonat. Aquest enzim es considera el principal punt regulador de la síntesi de colesterol a través d'un mecanisme de *feedback*. El mevalonat és llavors fosforilat en dues etapes per la mevalonat quinasa i la fosfomevalonat

quinasa. Seguidament, la decarboxilació del mevalonat-pirofosfat (mevalonat-PP) dóna lloc a la formació de isopentenil pirofosfat (IPP), el bloc principal per a la biosíntesis poli-isoprenoid del dolicol i de la cua del CoQ. La farnesil pirofosfat sintasa (FPP sintasa) utilitza IPP per formar FPP amb la formació d'un intermediari, el geranil pirofosfat (GPP). La FPP sintasa és un enzim la regulació del qual depèn de la seva localització en el citosol: en microsomes, mitocondris o peroxisomes (*Turunen 2004*).

La tans-preniltransferasa (o prenil-difosfat sintasa) catalitza la condensació del FPP amb varis IPPs per formar una cadena llarga isoprenoide. En eucariotes aquest enzim és un heterodimer format per dues subunitat diferents codificades pels gens *PDSS1* i *PDSS2* (*Trevisson 2011*). La part terminal de la síntesis de CoQ consisteix en la condensació de la cua poliprenil pirofosfat (decaprenil-PP) amb el 4-hidroxibenzoat (4-OH-benzoat, PHB), que s'origina a partir dels aminoàcids tirosina o fenilalanina i que aporta l'estructura d'anell. Aquesta condensació està catalitzada per la poliprenil-4-hidroxibenzoat transferasa, un enzim transmembrana situat a la membrana mitocondrial interna i codificat per *COQ2*. Les reaccions que es donen seguidament (metilacions, hidroxilacions i decarboxilacions) modifiquen l'estructura de l'anell aromàtic (*Turunen 2004*; *Dallner 2000*). Se sap que *COQ3* catalitza dues O-metilacions i *COQ7* és requerit per la hidroxilació de la demetoxi-ubiquinona cap a 2-hidroxiubiquinona. També es coneix que *COQ5* codifica per una metil-transferasa i *COQ6* per a una mono-oxigenasa. Per altre banda, el gen *CABC1* (o *ADCK3* o *COQ8*) codifica per una quinasa que es creu que regula el procés biosintètic, mentre que *COQ4* codifica per una proteïna de funció enzimàtica desconeguda però que es creu que organitza els productes dels gens *COQ* en forma de complex multienzimàtic ancorat a la membrana mitocondrial interna través de les proteïnes *COQ2* i *COQ7*. L'estabilitat d'aquest complex és essencial per a la funcionalitat individual dels enzims, i la ablació de qualsevol dels seus components interromp la síntesis de CoQ₁₀ (Figura 4). Altres gens *COQ* codifiquen per proteïnes requerides per la biosíntesis però encara se'n desconeix la funció (*Trevisson 2011*; *Hsu 2000*; *Tran 2007*).

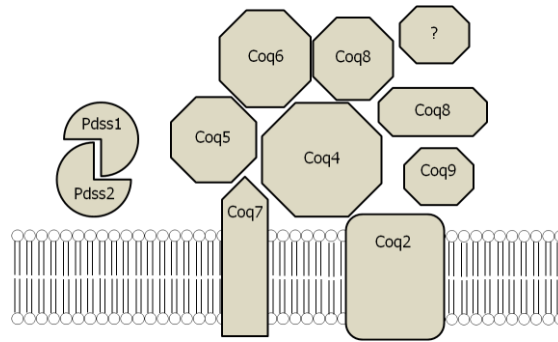


Figura 4. Esquema del complex multienzimàtic de les proteïnes COQ ancorat a la membrana mitocondrial interna (Trevisson 2011).

El tràfic intracel·lular de CoQ₁₀ és també un procés important però que encara no es coneix del tot. En llevats, les soques deletèries pel gen *COQ10* produeixen nivells normals de CoQ₁₀ però aquest no pot ser utilitzat en la respiració. Els homòlegs humans, *COQ10A* i *COQ10B*, codifiquen per una proteïna lipofílica petita que s'uneix al CoQ₁₀ i el transporta des del lloc de síntesis fins a la cadena transportadora d'electrons (Figura 5).

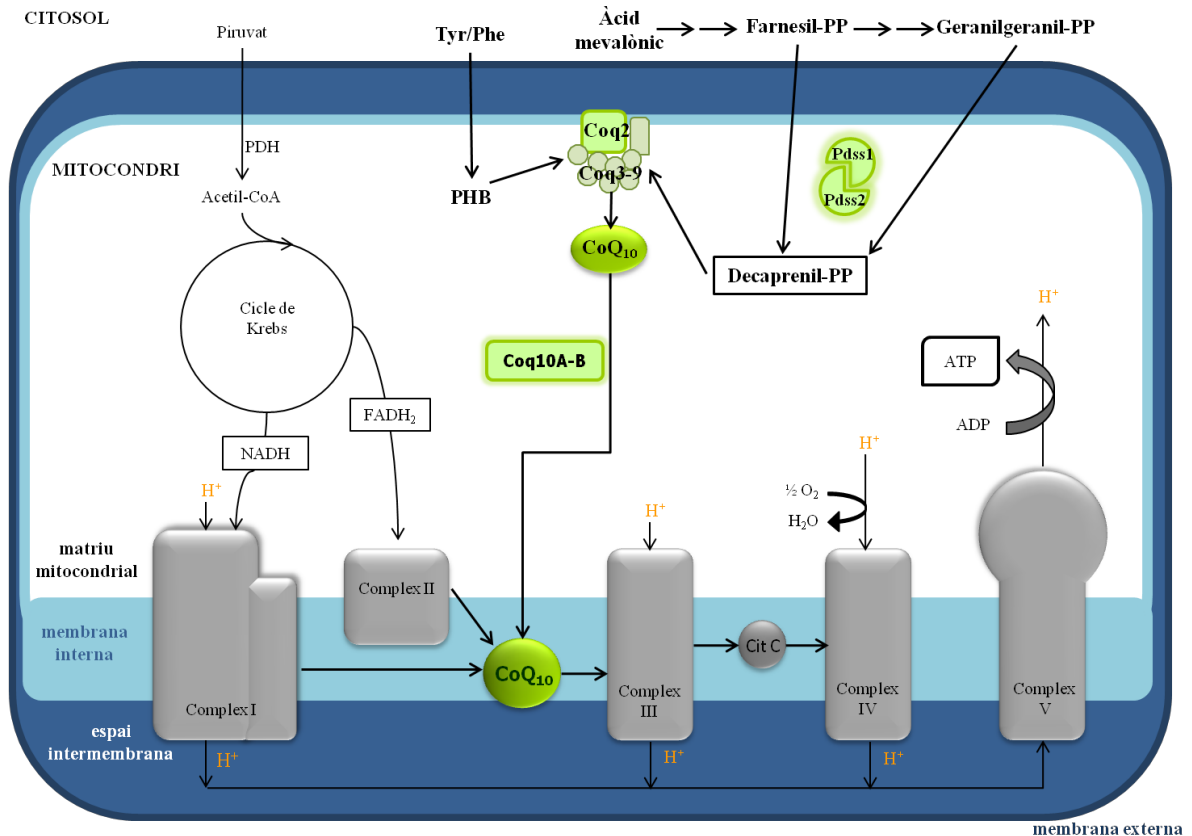


Figura 5. Esquema del procés de síntesi de CoQ₁₀ fins a la seva ubicació final a la cadena respiratòria mitocondrial. Modificada de Quinzii 2007.

► Regulació de la via del mevalonat

L'enzim de regulació principal de la via del mevalonat és la HMG-CoA reductasa, que afecta principalment la síntesi de colesterol.

La esqualè sintasa té una elevada K_m pel seu substrat, el FPP, de manera que una petita disminució en la concentració d'aquest substrat provoca una disminució de la síntesi de colesterol. En canvi, les K_m d'altres enzims que també utilitzen el FPP, com ara les preniltransferases i les farnesil-proteïna transferases, són baixes, de manera que aquests enzims estan saturats encara que hi hagi poca quantitat de substrat. De moment encara no s'han descrit quins metabòlits o intermediaris són els reguladors de la via de síntesi de CoQ, tot i que alguns estudis senyalen hormones, com la hormona del creixement, la tiroxina, la cortisona o l'adrenalina com a possibles reguladors de la via (Turunen 2004).

El CoQ és sintetitzat a totes les cèl·lules i, sota condicions normals, la producció *in situ* a cada teixit és suficient per al requeriment cel·lular, a diferència del colesterol, que es creu que la producció local està considerablement per sota de la quantitat consumida. Les membranes cel·lulars requereixen una quantitat apropiada de CoQ i la seva disminució altera les funcions respiratòria i antioxidant. El límit per a la concentració de CoQ és desconegut i queda per establir a partir de quin grau de disminució hi ha conseqüències (Dallner 2003).

1.2.3 Deficiències de CoQ

Les deficiències de CoQ s'han descrit com a desordres autosòmics recessius i es poden classificar com a primàries, si estan associades a mutacions en gens directament implicats en la via de síntesi de CoQ; o secundàries, amb alteracions en gens no directament implicats en la biosíntesi. Són deficiències difícils de reconèixer a causa de la gran heterogeneïtat de símptomes clínics. La reducció dels nivells de CoQ₁₀ en teixit o cèl·lules va ser bioquímicament identificada per primera vegada el 1989 (Ogashara 1989).

S'han definit fins a 6 formes fenotípiques de deficiència de CoQ₁₀:

1) **Forma encefalomiopàtica.** Descrita per primera vegada per Ogasahara (*Ogashara 1989*). Tal i com el seu nom indica, els símptomes clínics són bàsicament miopatia amb afectació cerebral i retard psicomotor i amb edat d'inici entre <2 i 15 anys.

2) **Forma miopàtica.** Caracteritzada bàsicament per miopàtia amb CK elevades, hiperlactacidèmia i/o hiperlactatoràquia. L'edat d'aparició d'aquesta forma és entre els 3 i 14 anys. Aquests pacients presenten intolerància a l'exercici associada a debilitat muscular proximal sense evidència d'afectació d'altres òrgans. Solen presentar una clara resposta al tractament amb CoQ₁₀. Molts d'aquests pacients són formes secundàries associades a deficiència múltiple d'acil-CoA deshidrogenasa (MADD) (*Gempel 2007*).

3) **Forma infantil multisistèmica.** Va ser descrita per primera vegada per *Rötig i col.* (*Rötig 2000*) en tres germanes. Les principals manifestacions clíniques són encefalopatia, amb afectació d'òrgans i nefropatia (*Rahman 2012*). Dins d'aquest grup cal destacar la presentació de síndrome nefròtic resistent a esteroides, (*Diomedi-Camassei 2007*).

4) **Forma atàxica.** És la forma més freqüent i es caracteritza per atàxia cerebelosa i atrofia del cerebel. Va ser descrita per primera vegada per *Musumeci i col.* l'any 2001. Pot estar associada a altres manifestacions clíniques, com ara neuropatia, retard psicomotor, debilitat muscular i hipogonadisme. S'inicia en etapa infantil (des de 2 mesos fins a 6 anys) i sovint va associat a convulsions (*Musumeci 2001; Lamperti 2003; Gironi 2004; Artuch 2006; Quinzi 2010*). La majoria de casos descrits estan associats a mutacions a la quinasa ADCK3 (CABC1).

5) **Síndrome de Leigh amb atàxia.** És la forma menys freqüent. Inicialment descrita en dues germanes adultes amb encefalopatia i retard mental sever associat a atàxia, sordera, retard de creixement i acidosis làctica (*Van Maldergem 2002; López 2006*).

6) Forma nefropàtica resistent a esteroides. Aquesta forma pot anar lligada, o no, a sordera i va ser descrita per primera vegada per Diomedi-Camassei en dos pacients portadors de mutacions al gen *COQ2* (Diomedi-Camassei 2007).

El solapament dels fenotips de les deficiències de CoQ₁₀ amb d'altres desordres mitocondrials fa que el seu reconeixement clínic sigui un repte. La neuroimatge pot aportar pistes clau per al diagnòstic, ja que la atròfia cerebelar és freqüent en aquestes deficiències, encara que les alteracions cerebelars sovint també apareixen en desordres de la cadena respiratòria mitocondrial i altres errors congènits del metabolisme (ECM).

Per altra banda, les característiques clíniques no són suficients per a un diagnòstic definitiu o per distingir entre deficiències primàries o secundàries, essent necessària una investigació bioquímica i genètica dels pacients amb sospita.

És important diagnosticar aviat aquests pacients ja que el tractament amb CoQ₁₀ oral millora els símptomes clínics i l'evolució de la malaltia millora quan el tractament és precoç.

► **Deficiències primàries de CoQ₁₀**

En humans s'han definit almenys 13 gens (*PDSS1*, *PDSS2*, *COQ2*, *COQ3*, *COQ4*, *COQ5*, *COQ6*, *COQ7*, *ADCK3*, *ADCK4*, *COQ9*, *COQ10a* i *COQ10b*) involucrats en la biosíntesi de CoQ₁₀ (Doimo 2014) i s'han descrit mutacions en 8 d'ells (*COQ2*, *ADCK3*, *ADCK4*, *PDSS1*, *PDSS2*, *COQ6*, *COQ9* i *COQ4*).

El fenotip clínic en aquests pacients pot anar des de desordres multisistèmics neonatals fatals fins a síndromes nefròtics aïllats. Dades preliminars indiquen que la varietat clínica depèn, en part, de l'activitat residual de cada individu, però es creu que l'ambient també jugaria un paper important en la determinació del fenotip d'aquests pacients. El primer defecte genètic es va identificar per mapeig d'homozigositat al gen *COQ2*, que codifica per la poliprenil-4-hidroxibenzoat transferasa, en dos germans, de pares consanguinis, que presentaven nefropatia infantil resistent a esteroides i deficiència de CoQ₁₀ tant en fibroblasts com en múscul (Quinzii 2006).

El 2006 Lopez *i col.* (Lopez 2006) varen descriure el cas d'un nen amb síndrome nefròtica i síndrome de Leigh, pneumònia neonatal i hipotonia, que presentava mutacions

en heterozigosis en el gen *PDSS2*. Aquest gen codifica per una de les dues subunitats de la poliprenil difosfat sintasa, el primer enzim de la via de síntesis de CoQ₁₀. El mateix any, a través d'estudis de mapeig d'homozigositat, es varen descriure 2 germans, de pares consanguinis, amb defecte de CoQ causat per una mutació en homozigosis en el gen *PDSS1* i que es manifestava com a una malaltia multisistèmica amb encefaloneuropatia (*Mollet 2007*). Sorprenentment, la presentació clínica dels pacients amb mutació a *PDSS1* o *PDSS2* és diferent, tot i que les mutacions en ambdós gens tenen com a conseqüència la pèrdua d'activitat de l'enzim trans-prenil transferasa. Curiosament, la nefroencefalopatia és coincident en pacients amb mutacions tant en *COQ2* com *PDSS2* mentre que els pacients amb alteracions a *PDSS1* no desenvolupen nefropatia. Aquestes diferències podrien ser degudes a variacions en els nivells de CoQ₁₀ en els teixits, diferències en la sobreproducció d'espècies reactives d'oxigen o diferent nivell d'expressió dels dos gens en diferents teixits (*Rahman 2012*).

També s'han identificat mutacions al gen *ADCK3* (també anomenat *COQ8* o *CABC1*), que codifica per una quinasa que modula la síntesis de CoQ₁₀, en famílies amb atàxia cerebelar d'aparició juvenil i atròfia cerebelosa. Se n'han descrit un nombre elevat de casos, fent que aquesta sigui la principal causa de deficiència primària de CoQ₁₀ (*Mollet 2008*; *Lagier-Tourenne 2008*; *Gerards 2010*).

L'any 2009, *Duncan i col.* varen descriure l'únic pacient amb una mutació en *COQ9*; aquest pacient presentava acidosis làctica neonatal i problemes multisistèmics (hipertrofia ventricular, tubulopatia renal, cardiopatia) i desordres motors importants associats a una atrofia cerebral i cerebelar (*Dunan 2009*).

Al llarg del 2011, es varen descriure mutacions en *COQ6* en un total d'11 pacients, amb un fenotip similar a l'observat en pacients amb mutacions a *COQ2* i *PDSS2*: tots presentaven síndrome nefròtic d'aparició durant el primer any de vida (*Heeringa 2011*).

L'any 2012, es va descriure el primer pacient amb defecte autosòmic dominant de CoQ₁₀ causat per una única mutació a *COQ4* (*Salviati 2012*). Recentment s'han descrit més casos de defecte de CoQ₁₀ causats per mutacions, en homozigosi o en heterozigosi, a *COQ4* (*Brea-Calvo 2015*).

Queden, però, molts pacients amb deficiència de CoQ₁₀ en els quals no s'ha identificat cap mutació després d'haver analitzat tots els gens associats a la via de síntesis de

CoQ₁₀ que s'han descrit fins ara. Podria ser que quedessin gens de la via per identificar o bé que la mutació o mutacions responsables de la deficiència estiguin en seqüències reguladores de gens que encara no s'han estudiat o bé en gens reguladors encara desconeguts.

► Deficiències secundàries de CoQ₁₀

El 2005, *Quinzii* va identificar mutacions en el gen *APTX*, que codifica per la aprataxina, en una família amb deficiència de CoQ₁₀, ataxia cerebelar i resposta al tractament amb CoQ₁₀ (*Quinzii 2005*). La aprataxina és una proteïna involucrada en la reparació de la doble hèlix d'ADN i mutacions en aquest gen causen atàxia amb apraxia oculomotora de tipus 1 (AOA1). L'estudi de pacients amb AOA1 va demostrar nivells baixos de CoQ₁₀ en múscul i fibroblasts. No obstant això, també hi ha pacients afectes de AOA1 que presenten nivells de CoQ₁₀ normals o elevats. Encara no s'ha pogut establir una correlació clara genotip-fenotip ni el mecanisme pel qual hi ha nivells baixos de CoQ₁₀ en alguns pacients, però s'ha vist clarament que milloren amb el tractament amb CoQ₁₀ (*Le Ber 2007*).

Gempel i col., varen identificar mutacions en el gen *ETFDH*, que codifica per la deshidrogenasa de la flavoproteïna transferidora d'electrons, en pacients que inicialment s'havien diagnosticat com a formes miopàtiques de deficiència de CoQ₁₀ (*Gempel 2007*). Aquests pacients presentaven un perfil d'acilcarnitines suggestiu de MADD (deficiència múltiple de acil-CoA deshidrogenases), juntament amb activitats dels complexos I+III i II+III deficients i nivells de CoQ₁₀ en múscul notablement disminuïts. Els pacients amb deficiències secundàries de CoQ₁₀ degudes a aquest gen milloren molt amb el tractament combinat de CoQ₁₀ i riboflavina. Tot i això, la disminució de CoQ₁₀ en les MADD no és un fet universal, ja que hi ha pacients amb nivells normals.

També s'ha descrit deficiència secundària de CoQ₁₀ amb presentació multisistèmica infantil en un pacient amb síndrome cardiofaciocutani causat per una mutació al gen *BRAF* (*Aeby 2007*).

Les deficiències de CoQ₁₀ poden ser secundàries a malalties mitocondrials: el 1989, *Zierz i col.* varen descriure un pacient efecte de síndrome de Kearns-Sayre amb reducció de CoQ₁₀ en múscul i plasma (*Zierz 1989*); *Montero i col.* han descrit pacients amb

alteració de la cadena respiratòria mitocondrial o depleció de ADN mitocondrial i nivells baixos de CoQ₁₀ (Montero 2005; Montero 2009; Montero 2013). També s'han descrit deficiències secundàries en pacients afectes de malalties mitocondrials causades per mutacions o delecions en l'ADNmt. Per altra banda, s'ha especulat de l'existència de determinats factors genètics que poden conferir certa susceptibilitat a desenvolupar deficiències secundàries de CoQ₁₀ (Anderson 1981; Wallace 2009; Dudkina 2008).

Recentment s'ha descrit un cas de deficiència secundària de CoQ₁₀ associada a un defecte en el transportador de glucosa GLUT1 (Yubedo 2014).

Tot i això, encara no estan clares les raons que expliquen aquestes deficiències. S'han creat moltes hipòtesis, des de interferències en la biosíntesis de CoQ₁₀, alteracions en el medi de la membrana interna mitocondrial a causa d'alteracions en la composició lipídica i proteica, interferències en la formació del complex multienzimàtic de biosíntesis, o a un augment de la degradació de CoQ₁₀ (Sacconi 2010).

► *Tractament de les deficiències de CoQ₁₀*

La complementació oral amb CoQ₁₀ (10-30 mg/kg/dia en nens i 1200-3000 mg/dia en adults) sembla efectiva en determinats pacients, especialment pel que fa a les manifestacions neurològiques i renals. Menys del 5% del CoQ₁₀ oral arriba al plasma en humans i la barrera hematoencefàlica redueix la captació de CoQ₁₀ per part del sistema nerviós central. Com que la molècula de CoQ és altament lipofílica, el CoQ administrat exògenament s'integra a la membrana plasmàtica o a altres membranes cel·lulars abans d'arribar a la membrana mitocondrial interna (Lopez 2010). A causa de la baixa biodisponibilitat i la baixa captació d'ubiquinona per part del mitocondri, la complementació primerenca amb CoQ₁₀ és crucial per assolir l'èxit en la teràpia i preveure el dany en òrgans com el fetge i el sistema nerviós central. Tot i que sembla que aquest tractament pot bloquejar la progressió de la malaltia, s'ha vist que no pot revertir els danys que ja s'hagin causat.

1.3 Diagnòstic bioquímic de les alteracions del sistema OXPHOS i els defectes de CoQ₁₀

Donada l'àmplia heterogeneïtat clínica i la poca relació genotip-fenotip en els desordres mitocondrials, sol ser necessari un estudi bioquímic complet i avaluar els resultats en el context familiar i fenotípic del pacient.

Les alteracions dels enzims del sistema OXPHOS sovint comporten nivells elevats de lactat en sang, orina i/o líquid cefaloraquídi a causa del menor consum de piruvat per part del mitocondri. També van acompanyades d'una alteració de la relació lactat/piruvat, que es veu augmentada a causa de que la interrupció del flux de la CRM provoca un augment de NADH que estimula la conversió del piruvat a lactat per la lactat deshidrogenasa. A vegades també s'observa un increment d'alanina, com a resultat de la transaminació del piruvat per la alanina aminotransferasa.

Mesurar la capacitat oxidativa del teixit muscular o de cèl·lules en cultiu és una eina molt útil per estudiar la funció mitocondrial i detectar deficiències dels complexos que formen el sistema OXPHOS i/o defectes de CoQ₁₀.

Per a un diagnòstic òptim, primer cal valorar el conjunt del metabolisme energètic en mitocondries intactes, per la qual cosa es necessita teixit fresc (teixit muscular, fibroblasts cultivats o cèl·lules mononuclears). La respiració mitocondrial es pot avaluar mitjançant l'anàlisi del consum d'oxigen (tècniques polarogràfiques) o bé per estudis d'oxidació de substrats energètics marcats amb C¹⁴. La normalitat o el defecte en aquests estudis és un bon indicatiu a l'hora de descartar o diagnosticar una malaltia mitocondrial. No obstant, aquestes proves realitzades a partir de teixit fresc es porten a terme en pocs centres de diagnòstic ja que és difícil aconseguir-los quan el centre no pertany a l'hospital on es fa la biòpsia. Per això, és més freqüent la determinació de l'activitat dels enzims que formen la CRM mitjançant tècniques espectrofotomètriques a partir de fibroblasts cultivats o d'homogenat de teixit muscular congelat enriquit en mitocondris. A partir d'aquest material, també es pot dur a terme la determinació de la concentració de CoQ₁₀. No obstant, arribar a un diagnòstic clar és més difícil a partir d'aquests materials.

Alternativament, o com a complement, es poden realitzar estudis quantitius i qualitius dels complexos del sistema OXPHOS mitjançant la tècnica d'electroforesis en gel de Blue Native seguida de Western Blot o bé per tinció colorimètrica del gel mitjançant l'estudi de les activitats enzimàtiques en gel del complexos. Val a dir que aquesta metodologia no dona informació quantitativa i, per tant, els defectes lleugers seran més difícils de detectar.

S'ha de considerar una possible deficiència de CoQ₁₀ quan els estudis histològics de la biòpsia de múscul revelen la presència de fibres *ragged-red* i deposicions lipídiques importants, però aquest no és un comportament universal. La majoria de pacients amb defecte de CoQ₁₀ presenten anomalies en les activitats de la cadena respiratòria mitocondrial, l'estudi de la qual es fa a través d'anàlisis espectrofotomètriques. Activitats reduïdes dels complexos dependents de quinona (complexos I+III (NADH:citocrom C oxidoreductasa) i II+III (succinat:citocrom c oxidoreductasa)), amb activitats normals dels complexos I, II i III són suggerents de deficiències severes de CoQ, tot i que aquestes activitats poden ser normals en casos de deficiències parcials (*Quinzii 2010*).

En la majoria de pacients amb alteracions mitocondrials, el múscul esquelètic sol estar afectat, ja que és un teixit molt energètic i ric en mitocondris. Per tant, la biòpsia de múscul serà el teixit d'elecció per a dur a terme els estudis enzimàtics del sistema OXPHOS i de quantificació de CoQ₁₀. Tot i això, cal també tenir en compte les biòpsies de pell, ja que permeten obtenir una línia cel·lular de fibroblasts que podrà ser utilitzada per a estudis bioquímics funcionals i genètics complementaris.

Quan l'alteració genètica és a l'ADNmt, es poden observar diferències bioquímiques entre els teixits d'estudi a causa de la heteroplàsmia teixit-específica.

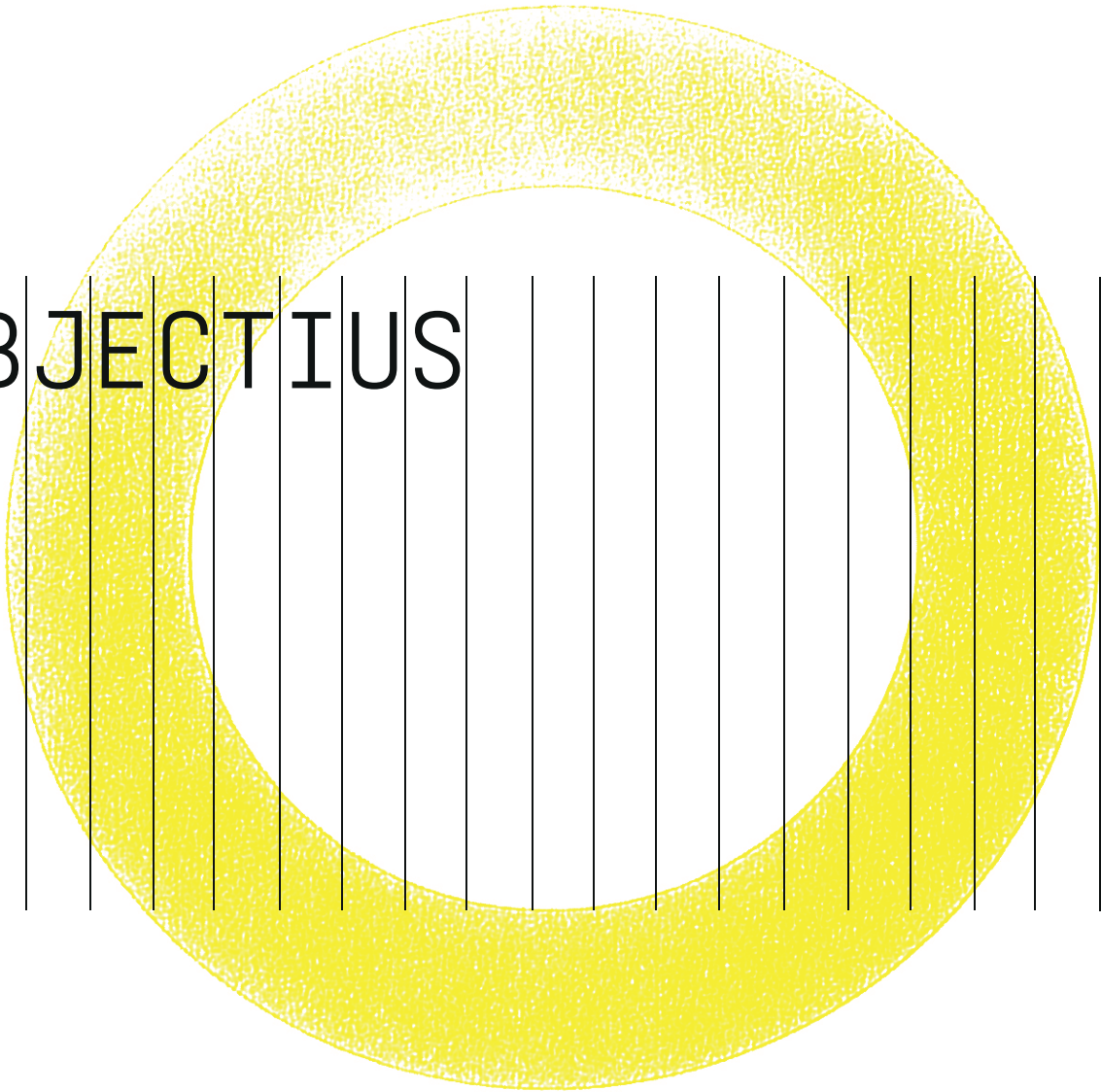
La deficiència de CoQ₁₀ en fibroblasts i en teixit muscular pot ser la confirmació d'una deficiència primària en la síntesis de CoQ en pacients que presenten la forma multisistèmica; no obstant, nivells normals de CoQ en fibroblasts no exclouen la deficiència en múscul. Per tant, el múscul serà el teixit d'elecció per a la quantificació del CoQ₁₀. Donat que la biòpsia de múscul s'obté mitjançant un procés invasiu, s'ha considerat la utilització d'altres teixits, com ara cèl·lules sanguínies mononuclears, línies cel·lulars limfoblastoides (*Arias 2012*), fibroblasts o mioblasts. Per altra banda,

s'han detectat pacients amb defectes de CoQ₁₀ confirmats genèticament però que presentaven nivells normals de CoQ₁₀ en fibroblasts. Per això, és necessari estudiar més d'un teixit per tal de confirmar la deficiència.

Les deficiències primàries de CoQ₁₀ s'han definit, fins al moment, com a desordres autosòmics recessius que presenten una bona resposta al tractament per complementació amb CoQ₁₀. La ràpida aplicació de tractament permet una millor evolució de la malaltia. Tenint en compte això, és molt important establir una metodologia bioquímica que permeti un ràpid diagnòstic d'aquestes deficiències primàries.

Per tant, l'estudi de pacients amb sospita de deficiència en el sistema OXPHOS (CRM i CoQ₁₀) pot ser molt complex, essent necessària la utilització de tècniques molt diverses per tal d'acostar al màxim el diagnòstic definitiu.

OBJECTIUS



2. OBJECTIUS

La Secció d'Errors Congènits del Metabolisme de l'Hospital Clínic de Barcelona i l'Hospital Sant Joan de Déu (Barcelona) són centres de diagnòstic de referència pel que fa a malalties mitocondrials i deficiències de CoQ₁₀, sobretot en pacients pediàtrics. Per això és important disposar de metodologies d'estudi eficients que facilitin la troballa d'un diagnòstic definitiu.

Detectar i diagnosticar les malalties mitocondrials i els defectes de CoQ₁₀ és sovint una tasca complexa donada la gran heterogeneïtat fenotípica, l'escassa relació fenotip-genotip i l'elevat nombre de factors genètics implicats, tant nuclears com mitocondrials.

La metodologia fins aleshores utilitzada per a l'estudi de les activitats dels enzims que formen la CRM presentava certes limitacions, sobretot en els estudis en fibroblasts cultivats, i un baix rendiment diagnòstic. Per altra banda, la quantificació del CoQ₁₀ tant en teixit muscular com en fibroblasts cultivats no permet discriminar entre deficiències primàries i secundàries, i cal tenir en compte que el tractament amb complementació oral de CoQ₁₀ millora considerablement la clínica dels pacients, essent més efectiu quan més aviat s'implementa.

Tenint en compte totes aquestes dificultats, les nostres HIPÒTESIS de treball varen ser:

- que una millor estandardització dels procediments d'anàlisi permetria una millora en el rendiment diagnòstic de les malalties mitocondrials.
- que la implementació d'una metodologia de mesura de la biosíntesi de CoQ permetria identificar les deficiències primàries i evitar falsos diagnòstics.
- que aquestes millores en les metodologies també permetrien avançar en el coneixement de noves característiques bioquímiques i genètiques d'aquestes malalties.

Per aquestes raons, els OBJECTIUS proposats per a aquest treball varen ser:

- 1.** Implementar una nova metodologia per a l'estudi espectrofotomètric de les activitats dels enzims que formen la cadena respiratòria mitocondrial que millori la identificació de defectes en aquests enzims.

Objectius

2. Establir contactes amb altres laboratoris d'estudi dels enzims de la CRM per tal d'homogeneïtzar la metodologia, permetent la creació d'un punt de suport entre els diversos centres de diagnòstic.

3. Implementar la tècnica d'electroforesis en Blue Native per a l'estudi dels enzims de CRM i demostrar que és una bona eina complementària a les tècniques espectrofotomètriques.

4. Desenvolupar i establir una metodologia d'estudi de la via de biosíntesi de CoQ₁₀ en cèl·lules cultivades que permeti discriminar entre deficiències primàries i secundàries de CoQ₁₀.



MATERIAL I MÈTODES

3. MATERIAL I MÈTODES

La secció d'Errors Congènits del Metabolisme de l'Hospital Clínic de Barcelona és un centre de referència pel que respecte a al diagnòstic de malalties metabòliques, entre elles les malalties mitocondrials que analitza mostres procedents d'Hospitals de tot l'estat Espanyol.

En el desenvolupament d'aquets treball s'han utilitzat un total de 285 mostres humanes que inclouen biòpsies musculars, biòpsies de pell i teixit muscular cardíac per a dur a terme els diversos estudis. S'han analitzat mostres anonimitzades d'individus classificats com a control (individus sense patologia o sospita de malaltia mitocondrial) i mostres de pacients amb diverses patologies que portaven a la sospita de malaltia mitocondrial i/o deficiència de coenzim Q₁₀. Totes aquestes mostres es varen extreure, sota consentiment informat, pels corresponents facultatius mèdics dels respectius hospitals d'origen. Un cop obtingudes varen ser immediatament congelades, en el cas de biòpsies musculars i de teixit cardíac, o submergides en un medi de cultiu adequat, en el cas de les biòpsies de pell, i enviades a la Secció d'Errors Congènits del Metabolisme per al seu posterior estudi.

3.1 OBTENCIÓ I CULTIU DE FIBROBLASTS

Mostra

Tipus: Biòpsia de pell

Conservació: submergida en medi de cultiu i a temperatura ambient

Material i instrumentació auxiliar

- Incubador a 37°C i 5% flux de CO₂
- Campana de flux laminar
- Tisores i pinces estèrils

Reactius

- Medi MEM-GlutaMAX
- Medi DMEM
- Newborn Calf Serum (NBCS)
- Fetal Bovine Serum (FBS)
- Penicilina-estreptomicina
- Tripsina

Procediment

Es rep la biòpsia de pell, extreta en condicions estèrils, en medi de cultiu i a temperatura ambient.

- Amb l'ajuda d'unes pinces i tisores separar l'epidermis i tallar en trossets petits (explants).
- Sembrar els explants homogèniament en un flascó de 25 cm³ amb medi MEM-GlutaMAX complementat amb 15% de NBCS i 125 U/mL de penicilina-estreptomicina.
- Deixar el flascó en posició vertical, sense que el medi toqui els explants, a l'incubador a 37°C i 5% de CO₂ durant aproximadament dues hores per tal que quedin ben enganxats. Seguidament, posar el flascó en posició horitzontal i deixar-lo a l'incubador fins que arribi a la confluència.

- Tripsinitzar i sembrar de nou per tal d'obtenir un subcultiu de fibroblasts. Mantenir el subcultiu amb medi DMEM 10% FBS i 100 U/mL de penicilina-estreptomicina (medi DMEM normal).

3.2 DETERMINACIÓ DE PROTEÏNES PEL MÈTODE DE LOWRY

Es base en la reacció colorimètrica de les proteïnes amb una solució alcalina de tartrat cúpric i el reactiu de Folin. Les proteïnes reaccionen amb el coure en presència de medi alcalí. Aquestes proteïnes tractades amb coure redueixen el reactiu de Folin. El color que es forma es deu bàsicament als aminoàcids tirosina i triptòfan, però també hi poden intervenir la cisteïna, la cistina i la histidina. Les proteïnes provoquen la reducció del reactiu de Folin, que perd 1, 2 o 3 àtoms d'oxigen, donant lloc a espècies reactives que presenten un color blau característic que presenta pics de màxima i mínima absorbància a 750 nm i 405 nm respectivament (*Lowry 1951; Peterson 1979*).

Mostra

Tipus: Homogenat cel·lular

Conservació: congelació a $-18\pm 5^{\circ}\text{C}$ o inferior

Material i instrumentació auxiliar

- Microplaques de 96 pous de fons pla (NUNC)
- Agitador orbital de plaques
- Lector de microplaques (POLARstar Omega; BMG LABTECH)

Reactius

- Estàndard de proteïna: Bovine Serum Albumin (BSA) Standard 2 mg/mL (Thermo Scientific)
- Reactiu A: solució alcalina de tartrat cúpric (Bio-Rad DC Protein Assay)
- Reactiu B: reactiu de Folin diluït (Bio-Rad DC Protein Assay)

Procediment

Preparació de la recta patró:

La recta patró està formada per 7 punts:

1. **1,5 mg/mL** \rightarrow 375 μL estàndard 2 mg/mL + 125 μL aigua MiliQ
2. **1,25 mg/mL** \rightarrow 312,5 μL estàndard 2 mg/mL + 187,5 μL aigua MiliQ
3. **1 mg/mL** \rightarrow 250 μL estàndard 2 mg/mL + 250 μL aigua MiliQ

4. **0,8 mg/mL** → 200 µL estàndard 2 mg/mL + 300 µL aigua MiliQ
5. **0,4 mg/mL** → 100 µL estàndard 2 mg/mL + 400 µL aigua MiliQ
6. **0,2 mg/mL** → 50 µL estàndard 2 mg/mL + 450 µL aigua MiliQ
7. **0 mg/mL** → 500 µL aigua MiliQ

Un cop preparats, fer alíquotes de 100 µL de cada punt i guardar-les a $-18\pm 5^{\circ}\text{C}$.
Descongelar una alíquota de cada punt just abans d'utilitzar-la.

Preparació de la placa i quantificació de proteïnes:

- Sembrar, per triplicat, 5 µL de cada punt de la recta patró, en ordre creixent, i de la mostra (si la mostra està excessivament concentrada, diluir $\frac{1}{4}$ amb aigua MiliQ).
- Afegir 25 µL de Reactiu A a cada pou.
- Afegir 200 µL de Reactiu B a cada pou.
- Agitar la placa a la màxima velocitat durant uns 20 segons.
- Deixar actuar a la foscor durant 15 minuts.
- Llegir immediatament l'absorbància de cada pou al lector de microplaques a 750 nm de longitud d'ona.

3.3 DETERMINACIÓ DE PROTEÏNES PEL MÈTODE DE BCA

El mètode utilitza l'àcid bicinconinic (BCA) per a la detecció colorimètrica i la quantificació de proteïnes. És un mètode que combina la reducció de Cu^{+2} a Cu^{+1} causada per les proteïnes en presència de medi alcalí (reacció de biuret) amb una detecció colorimètrica del catió coure (Cu^{+1}) altament sensible i selectiva utilitzant un únic reactiu que conté àcid bicinconinic. La reacció porpra que es produeix és conseqüència de la quelació de dues molècules de BCA amb un ió coure. Aquest complex que es forma presenta una elevada absorptància a **562 nm** que és lineal en un rang de 20-2000 $\mu\text{g/mL}$ de proteïna.

Mostra

Tipus: Homogenat cel·lular

Quantitat mínima necessària: 15 μL de sobrenedant.

Conservació: congelació a $-18\pm 5^\circ\text{C}$ o inferior

Material i instrumentació auxiliar

- Microplaques de 96 pous de fons pla (NUNC)
- Agitador de plaques.
- Incubador de plaques termostitzat a 37°C
- Lector de microplaques (POLARstar Omega; BMG LABTECH)

Reactius

- Clorur de sodi (NaCl) 0,15 M. Es guarda a 4°C durant 12 mesos.
- Pierce BCA Protein Assay Kit (Pierce®):
 - Reactiu A: carbonat sòdic, bicarbonat sòdic, àcid bicinconinic i tartrat sòdic en una solució 0,1 M d'hidròxid de sodi
 - Reactiu B: solució al 4% de sulfat cúpric
- Estàndard de proteïna: *Bovine Serum Albumin* (BSA) Standard (2 mg/mL) de Thermo Scientific.

Procediment

Preparació de la recta patró:

La patró està formada per 8 punts:

1. **2 mg/mL** → estàndard comercial de BSA.
2. **1,5 mg/mL** → 300 µL estàndard 2 mg/mL + 100 µL NaCl 0,15 M
3. **1 mg/mL** → 250 µL estàndard 2 mg/mL + 250 µL NaCl 0,15 M
4. **0,5 mg/mL** → 100 µL estàndard 2 mg/mL + 300 µL NaCl 0,15 M
5. **0,250 mg/mL** → 50 µL estàndard. 2 mg/mL + 350 µL NaCl 0,15 M
6. **0,125 mg/mL** → 75 µL estàndard 1 mg/mL + 525 µL NaCl 0,15 M
7. **0,062 mg/mL** → 200 µL estàndard 0,125 mg/mL + 200 µL NaCl 0,15 M
8. **0 mg/mL** → NaCl 0,15 M

Un cop preparats, fer alíquotes de 100µL de cada punt i guardar a $-18\pm 5^{\circ}\text{C}$. Descongelar una alíquota de cada punt just abans d'utilitzar-la.

Preparació de la placa i quantificació de proteïnes

- Diluir la mostra 1/4 amb NaCl 0,15 M.
- Sembrar, per triplicat, 10 µL de cada punt de la recta patró, en ordre creixent, i de la mostra.
- Preparar el reactiu de quantificació barrejant 1 part de la Reactiu B en 50 parts de Reactiu A. Es prepara el volum just necessari per a la determinació.
- Afegir 200 µL del reactiu de quantificació a cada pou sembrat.
- Agitar a màxima velocitat amb l'agitador de plaques durant 20 segons.
- Incubar la placa tapada a 37°C durant 30 minuts a l'incubador de plaques.
- Deixar temperar durant aproximadament 1 minut.
- Llegir immediatament el color al lector de plaques a 562nm de longitud d'ona.

3.4 ACTIVITAT CITRAT SINTASA EN FIBROBLASTS (*Mètode de Srere*)

Es determina espectrofotomètricament segons el mètode descrit per Srere (*Srere 1969*). La citrat sintasa (CS) és un enzim del cicle de Krebs que catalitza la formació de citrat a partir d'oxalacetat i acetil-CoA. El CoA alliberat reacciona amb el DTNB:



Es mesura l'increment d'absorbància del TNB a 412 nm de longitud d'ona i 25°C de temperatura.

Mostra

Tipus: Fibroblasts (pellet corresponent al cultiu de 2 flascons de 25 cm³).

Conservació: L'estudi es porta a terme just després de tripsinitzar el cultiu, però el pellet també es pot guardar a -80±5°C fins a la seva utilització.

Material i instrumentació auxiliar

- Homogenitzador de teixits (B. Braun)
- Centrífuga
- Sonicador Labsonic 1510 (B. Braun)
- Cubetes semimicro de metacrilat de 1,5 mL
- Espectrofotòmetre termostatitzat (Uvikon)

Reactius

- Sèrum fisiològic (0,9 M NaCl)
- Tampó SETH pH 7,4: 0,25 M sacarosa, 10 mM Tris-hidroximetil-aminometa (Tris), 2 mM EDTA, 100 UI/mL heparina.
 - Pesar la sacarosa, Tris i EDTA necessaris per 50 mL de volum final. Dissoldre en 35 mL aigua MiliQ. Afegir 5 mL d'heparina (1000 UI/mL) i ajustar a pH 7,4 amb HCl. Enrasar el volum a 50 mL amb aigua MiliQ. Conservar a -18±5°C durant almenys 12 mesos.

- Tampó Tris-HCl 1 M pH 8,0.
 - Pesar 30,3 g de Tris i dissoldre en 245 mL d'aigua MiliQ. Ajustar a pH 8,0 amb HCl i enrasar el volum a 250 mL. Conservar a $-18\pm 5^{\circ}\text{C}$ durant almenys 12 mesos. Comprovar el pH abans d'utilitzar.
- DTNB 1 mM pH 8,0.
 - Pesar 3,9 mg de DTNB i dissoldre en 10 mL de Tris-HCl 1 M pH 8,0. Fer alíquotes de 1 mL i conservar a $-18\pm 5^{\circ}\text{C}$ durant almenys 12 mesos.
- Acetil CoA 10 mM.
 - Pesar 8,27 mg d'acetil CoA i dissoldre en 1 mL d'aigua MiliQ. Conservar a $-18\pm 5^{\circ}\text{C}$ durant almenys 6 mesos.
- Tritó X-100 10%. Conservació a $-18\pm 5^{\circ}\text{C}$ durant almenys 12 mesos.
- Àcid oxaloacètic 10 mM pH 8,0 (prepara el mateix dia de l'assaig i no guardar).
 - Pesar 4 mg d'oxalacetat i dissoldre en 0,3 mL de tampó Tris-HCl 1 M pH 8,0 i 2,7 mL d'aigua MiliQ.

Procediment

Preparació de l'extracte de teixit:

Centrifugar les cèl·lules a 1100 rpm 10 minuts. Rentar el *pellet* dues vegades amb suero fisiològic (0,9 M NaCl) i finalment suspendre amb 400 μL de tampó SETH.

Sonicar dues vegades durant 5 segons i mantenint el tub en gel.

Assaig d'activitat:

- En una cubeta semimicro afegir:
 - 50 μL de DTNB 1 mM
 - 15 μL d'homogenat de fibroblasts
 - 15 μL d'acetil CoA 10 mM.
 - 5 μL de triton X-100
 - 380 μL d'aigua destil·lada atemperada a 25 $^{\circ}\text{C}$.
- Agitar la cubeta suaument i llegir durant 3 minuts a 412 nm i 25 $^{\circ}\text{C}$.
- Afegir 25 μL d'oxalacetat 10 mM i agitar la cubeta suaument. Continuar la lectura durant 3 minuts més.

Material i Mètodes

- Calcular el pendent abans i després de l'addició d'oxalacetat i la diferència entre ambdós ($\Delta A/\text{min}$).

Càlcul de l'activitat CS

$$\begin{aligned} \text{Activitat} \\ \text{nmol/min/mg prot} &= \frac{(\Delta \text{Abs/min}) \times (\text{volum final cubeta mL}) \times (1000 \mu\text{g/mg})}{\epsilon \times 1 \text{ cm} \times (\text{volum mostra mL}) \times \text{prot mg/mL}} = \\ &= \frac{(\Delta \text{Abs/min}) \times 0,5 \text{ mL} \times 1000 \mu\text{g/mg}}{13,6 \times 1 \text{ cm} \times 0,01 \text{ mL} \times 2 \text{ mg/mL}} = \boxed{(\Delta \text{Abs/min}) \times 1838,2} \end{aligned}$$

Coefficient d'extinció molar del DTNB $\epsilon = 13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Unitats: nmol/min/mg prot

Resultats

Interval de referència:

11-29 nmol/min/mg prot

3.5 TEST DE VIABILITAT CEL·LULAR

Es base en la capacitat de les cèl·lules metabòlicament actives per reduir MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*) cap a formazan, un compost insoluble en aigua que precipita en forma de cristalls.

Els cristalls formats es solubilitzen, normalment amb DMSO, donant lloc a una solució lila l'absorbància de la qual es pot llegir a 540 nm de longitud d'ona. La concentració de MTT reduït és proporcional al nombre de cèl·lules vives.

Mostra

Tipus: Cultiu de fibroblasts

Material i instrumentació auxiliar

- Incubador a 37°C i 5% flux de CO₂
- Campana flux laminar
- Centrífuga
- Cambra de Neubauer
- Microscopi
- Microplaca de 96 pous de fons pla (NUNC)
- Agitador orbital de plaques
- Lector de microplaques (POLARstar Omega; BMG LABTECH)

Reactius

- Tripsina
- PBS estèril
- Solució de PBS-MTT 5mg/mL.
 - Dissoldre 5 mg de MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*; SIGMA) en 1 mL de PBS estèril
- DMSO

Procediment

- Tripsinitzar les cèl·lules d'un flascó de 25 cm³.
- Recollir i centrifugar les cèl·lules 1100 rpm 10 minuts.

Material i Mètodes

- Resuspendre el *pellet* de cèl·lules amb 1 mL de PBS estèril.
- Agafar 100 µL de la suspensió cel·lular i passar-los a un eppendorf amb 900 µL de PBS estèril (dilució 1/10).
- Carregar la Cambra de Neubauer i fer recompte de cèl·lules. Comptar les cèl·lules dels 4 quadrants, sense tenir en compte les cèl·lules que toquen la línia dels marges dret i inferior.

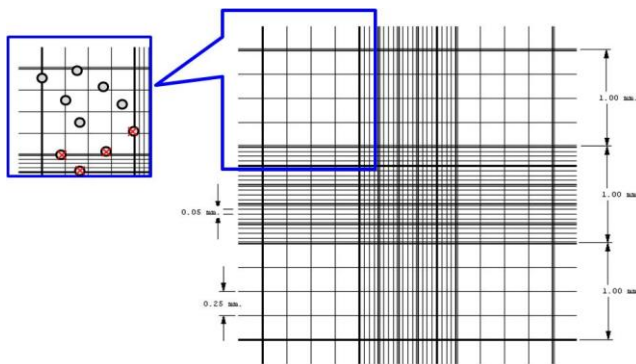


Figura 6. Esquema de la Cambra de Neubauer. Mostra les cèl·lules que s'han de tenir en compte pel recompte (cèl·lules de color blanc) i les que no (cèl·lules de color vermell).

- Calcular el nombre de cèl·lules totals de la suspensió cel·lular inicial:

$$\frac{\text{partícules recomptades} \times \text{dilució}}{\text{superfície (mm}^2\text{)} \times \text{profunditat (mm)}} = \frac{\text{partícules recomptades} \times 10}{4 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm}} = \mathbf{A \text{ cèl·lules}/\mu\text{L}}$$

$$\frac{\mathbf{A \text{ cèl.}}}{\mu\text{L}} \times \frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} \times 1 \text{ mL suspensió cel·lular} = \mathbf{B \text{ cèl·lules totals}}$$

- Tornar a centrifugar la suspensió cel·lular (1 mL) 10 minuts a 1100 rpm i resuspendre de nou amb 5 mL de medi DMEM normal.
- Calcular el volum de suspensió cel·lular necessari per obtenir una suspensió a una concentració de 5000 cèl/100 µL.

$$5000 \text{ cèl·lules}/100\mu\text{L} = 50000 \text{ cèl·lules}/\mu\text{L}$$

$$\frac{50000 \text{ cel}/\mu\text{L} \times 0,1 \text{ mL cèl·lules}}{\mathbf{B \text{ cèl totals}/5 \text{ mL}}} = \mathbf{X_1 \text{ mL suspensió cel·lular}}$$

Volum de suspensió cel·lular per un volum final de 100µL

- Calcular el volum necessari per sembrar tots els pous a tractar. Per exemple, si cal sembrar 30 pous, fer el càlcul per un volum final de 4mL:

$$\frac{\mathbf{X_1} \times 4 \text{ mL}}{0,1 \text{ mL}} = \mathbf{X_2 \text{ mL de suspensió cel·lular}}$$

Ajustar el volum fins a 4 mL amb medi de cultiu

- Sembrar tres pous per cada condició/tractament: control blanc (es fa un tractament posterior amb SDS), control amb medi normal i tractaments específics.
- Deixar la placa al incubador a 37 °C i 5% CO₂ durant 24h.
- El dia següent, substituir el medi de cultiu dels pous destinats als tractaments específics per 100 µL de medi de cultiu “problema” (tractat o complementat).
- Deixar la placa a l’incubador 37 °C i 5% CO₂ les hores establertes per a cada tractament o condició.
- Preparar la solució de PBS-MTT (5 mg/mL).
- Treure el medi i netejar els pous amb 100µL de PBS estèril.
- Posar 100 µL de medi DMEM normal a cada pou.
- Afegir 10 µL de solució PBS-MTT (5 mg/mL) a cada pou
- Agitar la placa a l’agitador orbital de plaques.
- Deixar la placa a l’incubador a 37 °C i 5% CO₂ durant 3-4 hores. Apareixen cristalls al fons del pou.
- Treure el medi i rentar els pous amb 100 µL de PBS estèril.
- Afegir 100 µL de DMSO estèril a cada pou i resuspendre els cristalls pipetejant repetidament (la solució pren color lila).
- Agitar la placa a l’agitador orbital de plaques.
- Tornar a deixar la placa al incubador a 37 °C i 5% CO₂ durant 10-20 minuts.
- Llegir l’absorbància a 540 nm de longitud d’ona al lector de microplaques (programa MTT).

Càlcul de la viabilitat cel·lular

- Fer la mitjana de les absorbàncies obtingudes en els triplicats de cada condició.
- Restar l’absorbància obtinguda en el blanc (pous tractats amb SDS) de la resta d’absorbàncies obtingudes, tant pel control normal com pels tractaments específics.
- L’absorbància obtinguda en el control normal sense tractar es considera el 100% de viabilitat. A partir d’aquesta relació, calcular els percentatges de viabilitat de cadascun dels tractaments específics duts a terme.

Resultats

Es considera que el tractament afecta la viabilitat cel·lular si el percentatge obtingut és inferior al 80%.

3.6 BIOSÍNTESI DE CoQ₁₀ EN FIBROBLASTS

Aquesta metodologia permet estudiar la síntesis endògena de CoQ₁₀ en fibroblasts cultivats.

Es base en la utilització d'intermediaris marcats de la via del CoQ₁₀: mevalonat deuterat (²H₃-Meva) i àcid para-hidroxibenzoic marcat amb ¹³C (¹³C₆-PHB), per tal de poder quantificar la síntesis endògena de CoQ₁₀ marcat mitjançant cromatografia líquida d'alta resolució i anàlisi per espectrometria de masses en tàndem (HPLC-MS/MS). La incubació del cultiu cel·lular amb ²H₃-Meva permet la obtenció de ²H₃-CoQ₁₀, mentre que en la incubació amb ¹³C₆-PHB s'obté ¹³C₆-CoQ₁₀.

Aquesta metodologia està basada en la descrita per *Teckle i col (Tekle 2008)*, on s'utilitzen substrats marcats radioactivament.

Mostra

Tipus: Cultiu de fibroblasts

Material i instrumentació auxiliar

- Incubador a 37°C i 5% flux de CO₂
- Campana de flux laminar
- Filtres de 0,22 µm (MILLEX[®] GP)
- Centrífuga
- Sonicador Labsonic 1510 (B. Braun)
- HPLC – MS/MS. HPLC (Alliance HT 2795) equipat amb una columna 2,1 x 50mm Symmetry C18 HPLC (mida de partícula 3,5µm; Waters); espectrometria de masses (MS/MS) realitzada amb un Micromass Quattro microTM API amb sistema MasslynxTM (V3.2) (Waters/Micromass, Manchester, UK).

Reactius

- Medi DMEM amb 10% FBS i 100U/mL penicilina-estreptomicina
- ²H₃-Meva 8,84 mM dissolt en etanol. Conservació a -80±5°C
- α-Ciclodextrina. Concentració de treball 2 mM

- Medi d'incubació 1,65 mM $^{13}\text{C}_6$ -PHB.
 - Pesar els mg de $^{13}\text{C}_6$ -PHB i de α -ciclodextrina necessaris segons el volum de medi d'incubació a preparar (2 mL de medi d'incubació per pou de cèl·lules). Dissoldre amb medi DMEM normal i deixar reposar durant almenys una hora. Filtrar amb filtres de 0,22 μm .
- Medi d'incubació 28 μM $^2\text{H}_3$ -Meva.
 - Agafar el volum de $^2\text{H}_3$ -Meva 8,84 mM necessari segons el volum de medi d'incubació a preparar (2 mL de medi d'incubació per pou de cèl·lules). Dissoldre amb medi DMEM normal i deixar reposar durant almenys una hora. Filtrar amb filtres de 0,22 μm .
- Tampó SETH pH 7,4: 0,25 M sacarosa, 10 mM Tris-hidroximetil-aminometa (Tris), 2 mM EDTA, 10 % heparina.
 - Pesar la sacarosa, Tris i EDTA necessaris per 50 mL de volum final. Dissoldre en 35 mL aigua MiliQ. Afegir 5 mL d'heparina (1000 UI/mL) i ajustar a pH 7,4 amb HCl. Enrasar el volum a 50 mL amb aigua MiliQ. Conservar a $-18\pm 5^\circ\text{C}$ durant almenys 12 mesos.
- Coenzim Q₉ (CoQ₉) ($\geq 96\%$; HPLC (SIGMA))
- Coenzim Q₁₀ (CoQ₁₀) ($\geq 99\%$; HPLC (SIGMA))

Procediment

Preparació del cultiu cel·lular:

- Quan el cultiu està confluent, el dia abans d'iniciar la sobrecàrrega amb substrats marcats, tripsinitzar-lo i sembrar-lo amb medi DMEM normal en una placa de 6 pous: un flascó confluent es divideix en 4 pous.

Per estudiar un pacient cal sembrar:

- dos pous per incubar en medi amb $^{13}\text{C}_6$ -PHB
- dos pous per incubar en medi amb $^2\text{H}_3$ -Meva
- un pou per incubar amb medi DMEM normal (blanc)

Paral·lelament al pacient/pacients, fer l'estudi amb un control.

Sobrecàrrega amb substrats marcats:

- Canviar el medi dels pous per 2 mL de medi d'incubació 1,65 mM $^{13}\text{C}_6$ -PHB o medi d'incubació 28 μM $^2\text{H}_3$ -Meva. Cada condició es fa per duplicat; canviar el medi del "blanc" per medi nou. Deixar a l'incubador a 37°C i 5% CO_2 durant 72 hores.
- Un cop acabada la sobrecàrrega, rentar les cèl·lules una vegada amb PBS estèril, tripsinitzar i centrifugar a 1100 rpm durant 10 minuts.
- Rentar dues vegades el *pellet* amb 500 μL de NaCl 0,9%.
- Resuspendre el *pellet* de cèl·lules amb 300 μL de tampó SETH.
- Sonicar les cèl·lules dues vegades durant 5 segons i guardar-ho congelat a -80°C fins a la seva utilització.
- A l'homogenat cel·lular que s'ha obtingut, determinar la concentració de proteïnes pel mètode de Lowry, l'activitat citrat sintasa (mètode de Srere) i els CoQ_{10} ($^2\text{H}_3$ - CoQ_{10} i $^{13}\text{C}_6$ - CoQ_{10}) que s'han sintetitzat a partir dels corresponents precursors marcats.

Extracció i quantificació de CoQ_{10} :

- Agafar 100 μL d'homogenat cel·lular i afegir-hi 800 μL de metanol i 10 μL de CoQ_9 1 μM (estàndard intern).
- Vortejar i centrifugar a 13000 rpm durant 10 minuts.
- Agafar 700 μL de la barreja anterior i assecar-ho mitjançant flux de nitrogen.
- Dissoldre el residu amb 100 μL de metanol. Vortejar.
- Injectar 50 μL a l'HPLC-MS/MS. La fase mòbil està formada per 50 % metanol amb 5 mM metilamina, 45% 2-propanol i 5% aigua acidificada amb àcid fòrmic (0,5 mL/L). La taxa de flux és de 0,2 mL/min i en condicions isocràtiques. La detecció del CoQ_{10} es dona en mode de ió positiu utilitzant la monitorització de reacció múltiple (MRM). Els ions precursors tan per CoQ_{10} com per CoQ_9 són molècules adductores de metil-amoní [(M + CH_3NH_3) $^+$]; el nitrogen i l'argó s'utilitzen com a gas nebulitzant i de col·lisió, respectivament. El conus de voltatge és de 15 V i l'energia de col·lisió de 20 eV. El temps de residència per a cada transició és de 200 ms i el temps d'execució 16 minuts. La concentració de CoQ_{10} es quantifica mitjançant una corba de calibració externa. La transició és 894>197 pel CoQ_{10} i m/z 826>197 pel CoQ_9 . La síntesi a partir de $^{13}\text{C}_6$ -PHB dona lloc a la formació de $^{13}\text{C}_6$ -

CoQ₁₀, mentre que a partir de ²H₃-Meva, s'obté ²H₃-CoQ₁₀, els quals presenten una transició *m/z* de 900>203 i 897>197 respectivament.

Càlcul de la concentració de CoQ₁₀

Per comparació amb l'estàndard intern (COQ₉), es transforma l'àrea de cada pic en un valor de CoQ₁₀ expressat en pmols. Com que el residu sec s'ha resuspès en 100 µL de metanol, tenim: X pmol/100µL

El resultat final s'expressa en funció del contingut proteic (gr prot) i de l'activitat citrat sintasa (UCS); per tant, el càlcul queda de la següent manera:

$$\frac{X \text{ pmol}}{100 \mu\text{L} \times \frac{\text{mg/mL}}{\text{proteïna}}} \times \frac{1 \text{ nmol}}{1000 \text{ pmol}} \times \frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} =$$

$$= \frac{X \text{ pmol} \times 1000}{100 \mu\text{L} \times \frac{\text{mg/mL}}{\text{proteïna}}} = \boxed{N \text{ nmol/gr prot}}$$

$$\frac{N \text{ nmol/gr prot}}{\text{CS}} = \boxed{C \text{ nmol/UCS}}$$

Resultats

Intervals de referència:

$$^{13}\text{C}_6\text{-CoQ}_{10} \left[\begin{array}{l} 28\text{-}38 \text{ nmol/g prot} \\ 0,84\text{-}1,00 \text{ nmol/UCS} \end{array} \right.$$

$$^2\text{H}_3\text{-CoQ}_{10} \left[\begin{array}{l} 3,8\text{-}5,4 \text{ nmol/g prot} \\ 0,09\text{-}0,17 \text{ nmol/UCS} \end{array} \right.$$

3.7 ESTUDI DE LA CADENA RESPIRATÒRIA MITOCONDRIAL EN BIÒPSIES DE MÚSCUL I FIBROBLASTS

Totes les determinacions descrites seguidament, es basen en la publicació de F. Medja i col. (*Medja 2009*). Com a control intern dels assajos, es valora en paral·lel un sobrenedant de múscul de porc, ajustat a 2 mg/mL de proteïna, que es manté congelat en alíquotes a $-80\pm 5^{\circ}\text{C}$.

3.7.1 Preparació de l'extracte de teixit

Mostra:

Tipus: biòpsia de teixit muscular

Quantitat mínima necessària: 20-50 mg de teixit muscular.

Conservació: congelació a $-80\pm 5^{\circ}\text{C}$.

Criteris de rebuig: Arribada de la mostra en condicions inadequades de transport. Teixit no congelat.

Material i instrumentació auxiliar

- Homogeneïtzador de teixits (B. Braun)
- Èmbol i tubs homogeneïtzadors de 2 mL
- Centrifuga

Reactius

- Tampó manitol pH 7,2 (225 mM manitol, 75 mM sacarosa, 10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA):
 - Pesar 2,05 g de manitol, 1,25 g de sacarosa, 60,6 mg de Tris, dissoldre en 40 mL d'aigua MiliQ i afegir 10 μL de EDTA 0,5 M. Ajustar el pH a 7,2 amb HCl i ajustar el volum a 50 mL. Guardar a 4°C durant 3 mesos.

Procediment per a teixit muscular

- Posar 200 μL de tampó manitol fred en un tub homogeneïtzador de 2 mL. Mantenir el tub amb el tampó en fred (per exemple, utilitzant una cubeta amb gel).

- Tallar un fragment de 20-50 mg de teixit muscular i posar-lo dins l'homogeneïtzador. Homogeneïtzar a 0-6°C amb l'èmbol motoritzat a 800 rpm (10 cops); evitar la sobre-homogeneïtzació.
- Rentar l'èmbol amb 100 µL de tampó manitol fred i recollir tot el volum en un tub eppendorf de 1,5 mL.
- Centrifugar a 650 g a 4°C i durant 20 minuts.
- Transferir el sobrenedant en un tub nou.
- Resuspendre el pellet amb 200 µL de tampó manitol fred i repetir el procés d'homogeneïtzació.
- Rentar el vas homogeneïtzador amb 100 µL de tampó manitol fred per tal de recollir el màxim d'homogenat.
- Centrifugar a 650 x g a 4°C i durant 20 minuts.
- Recollir el sobrenedant i ajuntar-lo amb l'anterior.
- Quantificar les proteïnes del sobrenedant amb el mètode de Pierce BCA Protein Assay Kit; cal fer una dilució 1/4 amb NaCl 0,15 M (10 µL de sobrenedant + 30 µL NaCl 0,15 M) per tal que el valor d'absorbància estigui comprès dins la recta patró.
 - Per a la determinació d'activitats enzimàtiques, ajustar la concentració de proteïnes del sobrenedant a 2 mg/mL amb tampó manitol. Guardar una alíquota de 100 µL en un eppendorf i congelar-la a -80±5°C fins a la seva utilització. La resta de sobrenedant s'utilitza el mateix dia.
 - Per a la resta d'estudis, congelar el sobrenedant a -80±5°C fins a la seva utilització.

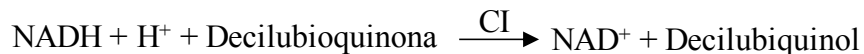
Procediment per a fibroblasts/cultius cel·lulars

- Recollir les cèl·lules de dos flascons de 25 cm³.
- Centrifugar les cèl·lules a 1100 rpm 10 minuts.
- Rentar el *pellet* amb sèrum fisiològic dues vegades.
- Reconstituir amb 100 µL de tampó manitol pH 7,4.
- Sonicar la suspensió cel·lular, mantenint-la en fred, dues vegades durant 5 segons a 80 Hz. Aquest pas permet trencar les membranes cel·lulars i alliberar el contingut mitocondrial.

- Quantificar les proteïnes de la suspensió obtinguda utilitzant el mètode de Pierce BCA Protein Assay Kit; cal fer una dilució 1/4 amb NaCl 0,15 M (10 µL de sobrenedant + 30 µL NaCl 0,15 M) per tal que el valor d'absorbància estigui comprès dins la recta patró.
 - Per a la determinació d'activitats enzimàtiques, ajustar la concentració de proteïnes del sobrenedant a 2 mg/mL amb tampó manitol.
 - Per a la resta d'estudis, congelar el sobrenedant a $-80\pm 5^{\circ}\text{C}$ fins a la seva utilització.

3.7.2 Activitat del complex I (NADH ubiquinona oxido-reductasa)

El complex I (NADH ubiquinona oxido-reductasa) transfereix electrons des del NADH cap a la ubiquinona o CoQ₁₀. L'activitat es inhibida per rotenona. Es mesura la disminució d'absorbància a 340 nm de longitud d'ona al oxidar-se el NADH a NAD. L'activitat del complex I ve donada per la diferència entre la mesurada amb i sense rotenona.



Temperatura de treball: 37°C

Mostra:

Tipus: sobredenant de múscul del pacient i sobredenant de múscul de porc (control intern) ajustats a 2 mg/mL de proteïna.

Quantitat mínima necessària: 30 µL de sobrenedant.

Conservació: congelació a $-80\pm 5^{\circ}\text{C}$.

Criteris de rebuig: Mostra no congelada adequadament.

Material i instrumentació auxiliar

- Cubetes semimicro de metacrilat de 1,5 mL
- Espectrofotòmetre termostatitzat (Uvikon)

Reactius

- Tampó fosfat 500 mM pH 7,5
 - Fosfat de potassi monobàsic (KH_2PO_4) 500 mM: pesar 3,4 g de KH_2PO_4 i dissoldre en 50 mL d'aigua MiliQ.
 - Fosfat de potassi dibàsic (K_2HPO_4) 500 mM: pesar 4,35 g de K_2HPO_4 i dissoldre en 50 mL d'aigua MiliQ.
 - Ajustar el pH a 7,5 afegint solució de KH_2PO_4 a la solució de K_2HPO_4 . Guardar a 4°C; estable durant 6 mesos.
- BSA 50 mg/mL
 - Pesar 500 mg de BSA i dissoldre a 20 µL/mg en aigua MiliQ. Fer alíquotes de 1 mL i guardar-les a $-18\pm 5^\circ\text{C}$; estable durant 12 mesos.
- Decilubiquinona 25 mM
 - Dissoldre tot el contingut del vial comercial de 10 mg en 1,261 mL de DMSO. Fer alíquotes de 50 µL i 88 µL i guardar-les a $-18\pm 5^\circ\text{C}$; estable durant 12 mesos.
- NADH 2 mM (preparar el mateix dia de l'assaig i no guardar)
 - Pesar almenys 1 mg de NADH i dissoldre a 0,685 mL/mg en aigua MiliQ.
- Rotenona 2,5 mM (mantenir en gel i tapada de la llum durant l'assaig d'activitat)
 - Pesar rotenona i dissoldre a 1,014 gL/mg en una solució 50/50 d'etanol 95% i DMSO. Fer alíquotes de 100 µL i guardar-les a $-18\pm 5^\circ\text{C}$ i tapades de la llum; estable durant 12 mesos.

Procediment

Composició del medi de reacció:

100 µM NADH

100 µM decilubiquinona

50 mM Tampó fosfat pH 7,5

3,75 mg/mL BSA

12,5 µM rotenona

20 µg de proteïna

Preparació del medi de reacció:

Reactius	Quantitat per mostra	N= 3 (volum x 4)	N= 4 (volum x 5)
500 mM Tampó fosfat pH 7,5	110 µL	440 µL	550 µL
50 mg/mL BSA	82,5 µL	330 µL	412,5 µL
25 mM decilubiquinona	4,5 µL	18 µL	22,5 µL
H ₂ O Mili Q	826 µL	3304 µL	4130 µL

Assaig d'activitat:

- Fer l'autozero de l'espectrofotòmetre a l'aire.
- Per a cada mostra, afegir, en un tub de 3 mL, 1022,5 µL de medi de reacció i 22 µL de sobrenedant ajustat a 2 mg/mL. Preparar 2 cubetes per cada mostra. Es poden llegir 6 cubetes a la vegada.
- Transferir 475 µL de la mix a cada cubeta.
- Afegir 2,5 µL de rotenona 2,5 mM en una de les dues cubetes.
- Agitar la cubeta que conté rotenona.
- Incubar les cubetes a 37°C durant 5 minuts.
- Començar la reacció afegint 25 µL de NADH 2 mM mantingut a temperatura ambient. Agitar la cubeta suaument.
- Llegir cada 10 segons durant 3 minuts a 340 nm.

Càlcul de l'activitat del complex I

$$\begin{aligned}
 \text{Activitat} &= \frac{(\Delta\text{Abs}/\text{min}) \times (\text{volum final cubeta mL}) \times (1000 \text{ nmol}/\mu\text{mol})}{\epsilon \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1} \times 1\text{cm} \times (\text{volum mostra mL}) \times \text{prot mg/mL}} \\
 \text{nmol/min/mg prot} &= \frac{(\Delta\text{Abs}/\text{min}) \times 0,5 \text{ mL} \times 1000 \text{ nmol}/\mu\text{mol}}{6,2 \text{ L/mmol/cm} \times 1\text{cm} \times 0,01 \text{ mL} \times 2 \text{ mg/mL}} = \boxed{(\Delta\text{Abs}/\text{min}) \times 4032,3}
 \end{aligned}$$

Coefficient d'extinció molar del NADH $\epsilon = 6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Calcular la diferència entre l'activitat mesurada amb i sense rotenona.

Resultats

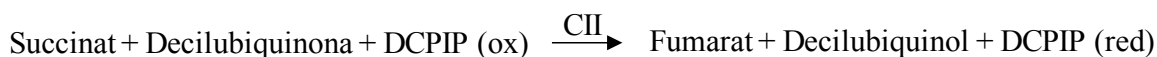
Intervals de referència:

- Músculs humans:
 - 29-66 nmol/min/mg prot
 - 0,18-0,33 nmol/min/UCS

- Múscul de porc:
 - 89-115 nmol/min/mg prot
 - 0,16-0,28 nmol/min/UCS

3.7.3 Activitat del complex II (Succinat ubiquinona oxido-reductasa)

El complex II (succinat ubiquinona oxido-reductasa) transfereix electrons des del succinat a la ubiquinona. Es mesura la disminució d'absorbància a 600 nm de longitud d'ona al reduir-se el DCPIP.



Temperatura de treball: 37°C

Mostra:

Tipus: sobrenedant de múscul del pacient i sobrenedant de múscul de porc (control intern) ajustats a 2 mg/mL de proteïna.

Quantitat mínima necessària: 15 µL de sobrenedant.

Conservació: congelació a -80±5°C.

Criteris de rebuig: Mostra no congelada adequadament.

Material i instrumentació auxiliar

- Cubetes semimicro de metacrilat de 1,5 mL
- Espectrofotòmetre termostatitzat (Uvikon)

Reactius

- Tampó fosfat 500 mM pH 7,5.
 - Fosfat de potassi monobàsic (KH₂PO₄) 500 mM: pesar 3,4 g de KH₂PO₄ i dissoldre en 50 mL d'aigua MiliQ
 - Fosfat de potassi dibàsic (K₂HPO₄) 500 mM: pesar 4,35 g de K₂HPO₄ i dissoldre en 50 mL d'aigua MiliQ.
 - Ajustar el pH a 7,5 afegint solució de KH₂PO₄ a la solució de K₂HPO₄. Guardar a 4°C; estable durant 6 mesos.
- Succinat 200 mM
 - Pesar 236,2 mg de succinat i dissoldre en 7 mL d'aigua MiliQ. Ajustar el pH a 7,4 amb KOH i enrasar el volum final a 10 mL. Fer alíquotes de 500µL. Guardar a -18±5°C; estable durant 12 mesos.

- BSA 50 mg/mL.
 - Pesar 500 mg de BSA i dissoldre a 20 µL/mg en aigua MiliQ. Fer alíquotes de 1 mL i guardar-les a -18±5°C; estable durant 12 mesos.
- KCN 10 mM (preparar el mateix dia de l'assaig i no guardar).
 - Pesar almenys 4 mg de KCN i dissoldre a 1,51 mL/mg en aigua MiliQ.
- DCPIP 5 mM
 - Pesar 7,25 mg de DCPIP i dissoldre en 5mL d'aigua MiliQ. Guardar a 4°C; estable només durant un mes.
- Decilubiquinona 25 mM.
 - Dissoldre tot el contingut del vial comercial de 10 mg en 1,261 mL de DMSO. Fer alíquotes de 50 µL i 88 µL i guardar-les a -18±5°C; estable durant 12 mesos.

Procediment

Composició del medi de reacció:

20 mM Tampó fosfat pH 7.5

20 mM succinat

2,0 mg/mL BSA

1 mM KCN

50 µM DCPIP

20 µg proteïna

Preparació del medi de reacció:

Reactius	Quantitat per mostra	N= 3 (volum x 4)	N= 4 (volum x 5)
500 mM Tampó fosfat pH 7.5	25 µL	100 µL	125 µL
50 mg/mL BSA	20 µL	80 µL	100 µL
200 mM succinat	50 µL	200 µL	250 µL
10 mM KCN	50 µL	200 µL	250 µL
5 mM DCPIP	5 µL	20 µL	25 µL
H ₂ O MiliQ	333 µL	1332 µL	1665 µL

Assaig d'activitat:

- Fer l'autozero de l'espectrofotòmetre a l'aire.
- Afegir a una cubeta 488 µL de medi de reacció i 10 µL de sobrenedant ajustat a 2 mg/mL. Agitar la cubeta suaument. Es poden processar 6 cubetes a la vegada.
- Incubar les cubetes a 37°C durant 5 minuts.
- Llegir la línia base cada 10 segons durant 3 minuts.
- Començar la reacció afegint 2 µL de decilubiquinona 25 mM mantinguda a temperatura ambient. Agitar les cubetes suaument.
- Llegir cada 10 segons durant 3 minuts a 600nm.

Càlcul de l'activitat del complex II

$$\begin{aligned} \text{Activitat} &= \frac{(\Delta\text{Abs}/\text{min}) \times (\text{volum final cubeta mL}) \times (1000\text{nmol}/\mu\text{mol})}{\varepsilon \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1} \times 1\text{cm} \times (\text{volum mostra mL}) \times \text{prot mg/mL}} = \\ \text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot} &= \frac{(\Delta\text{Abs}/\text{min}) \times 0,5\text{mL} \times (1000\text{nmol}/\mu\text{mol})}{19,2 \text{ L}/\text{mmol}/\text{cm} \times 1\text{cm} \times 0,01 \text{ mL} \times 2 \text{ mg/mL}} = \boxed{(\Delta\text{Abs}/\text{min}) \times 1302,1} \end{aligned}$$

Coefficient d'extinció molar del DCPIP $\varepsilon = 19,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

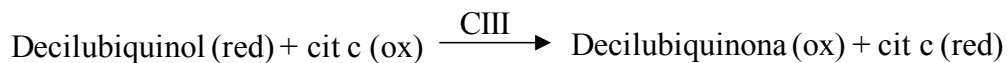
Resultats

Intervals de referència:

- Músculs humans:
46-87 nmol/min/mg prot
0,26-0,44 nmol/min/UCS
- Múscul de porc:
48-69 nmol/min/mg prot
0,1-0,16 nmol/min/UCS

3.7.4 Activitat del complex III (Ubiquinol-citocrom C oxido-reductasa)

El complex III transfereix electrons des de l'ubiquinol, o CoQ₁₀, cap al citocrom c. L'activitat es inhibida per antimicina. L'activitat del complex III ve donada per la diferència entre l'activitat mesurada amb i sense antimicina. Es mesura l'increment d'absorbància a 550 nm de longitud d'ona que es dona al reduir-se citocrom c.



Temperatura de treball: 37°C

Mostra:

Tipus: sobrenedant de múscul del pacient i sobrenedant de múscul de porc (control intern) ajustats a 2 mg/mL de proteïna.

Quantitat mínima necessària: 20 µL de sobrenedant.

Conservació: congelació a -80±5°C.

Criteris de rebuig: Mostra no congelada adequadament.

Material i instrumentació auxiliar

- Termoblock (130°C)
- Microcentrifuga
- Bany termostatitzat (37°C)
- Cubetes semimicro de metacrilat de 1,5 mL
- Espectrofotòmetre termostatitzat (Uvikon)

Reactius

- Tampó fosfat 500 mM pH 7,5
 - Fosfat de potassi monobàsic (KH₂PO₄) 500 mM: pesar 3,4 g de KH₂PO₄ i dissoldre en 50 mL d'aigua MiliQ
 - Fosfat de potassi dibàsic (K₂HPO₄) 500 mM: pesar 4,35 g de K₂HPO₄ i dissoldre en 50 mL d'aigua MiliQ.
 - Ajustar el pH a 7,5 afegint solució de KH₂PO₄ a la solució de K₂HPO₄. Guardar a 4°C; estable durant 6 mesos.

- Etanol 95%
 - Barrejar 47,5 mL etanol absolut + 2,5 mL d'aigua MiliQ.
Guardar a $-18\pm 5^{\circ}\text{C}$; estable durant 12 mesos.
- KCN 10 mM (preparar el mateix dia de l'assaig i no guardar)
 - Pesar almenys 4 mg de KCN i dissoldre a 1,51 mL/mg en aigua MiliQ.
- Citocrom C 1 mM (preparar el mateix dia de l'assaig i no guardar).
 - Pesar almenys 10 mg de citocrom C i dissoldre a 12,38 mg/mL en aigua MiliQ.
- EDTA 50 mM
 - Diluir EDTA 0,5 M comercial en aigua MiliQ. Guardar a 4°C ; estable durant 6 mesos.
- Decilubiquinona 25 mM
 - Dissoldre tot el contingut del vial comercial de 10 mg en 1,261 mL de DMSO. Fer alíquotes de 50 μL i 88 μL i guardar-les a $-18\pm 5^{\circ}\text{C}$; estables durant 12 mesos.
- Ditionita 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (100%) (preparar just abans d'utilitzar i no guardar)
 - Posar un eppendorf amb aigua MiliQ al *thermoblock* a 130°C .
 - Pesar almenys 270 mg de ditionita i dissoldre amb el mateix volum d'aigua MiliQ bullint.
 - Deixar a 130°C fins a que es dissolgui completament (no deixar que deixi de bullir).
 - Ràpidament fer un *spin* a la microcentrífuga (per precipitar les restes no dissoltes). Utilitzar el sobrenedant per reduir la decilubiquinona 25 mM.
- Decilubiquinol 25 mM (preparar just abans d'utilitzar i no guardar)
 - Afegir 15 μL de la solució de ditionita 100% calenta a una alíquota de 88 μL de decilubiquinona.
 - Vortejar suaument un cop i incubar-ho al bany a 37°C i tapat de la llum almenys durant mitja hora. La solució ha d'adquirir color blanquinós-transparent. Només és utilitzable durant 1 hora després de la seva completa reducció.

- Antimicina A 2,5 mg/mL (mantenir en gel i tapada de la llum durant l'assaig d'activitat)
 - Pesar antimicina i dissoldre a 0,4 mL/mg en etanol al 95%. Fer alíquotes de 100µL i guardar a -18±5°C tapat de la llum; estable durant 12 mesos.

Procediment

Composició del medi de reacció:

200 µM decilubiquinol

50 µM citocrom C

100 mM tampó fosfat pH 7,5

250 µM EDTA

1 mM KCN

12,5 µM antimicina A

15 µg de proteïna

Preparació del medi de reacció:

Reactius	Quantitat per mostra	N= 3 (volum x 4)	N= 4 (volum x 5)
500 mM Tampó fosfat pH 7,5	220µL	880µL	1100µL
1 mM citocrom C	55µL	220µL	275µL
50 mM EDTA	5,5µL	22µL	27,5µL
10 mM KCN	110µL	440µL	550µL
H ₂ O MiliQ	684µL	2736µL	3420µL

Assaig d'activitat:

- Fer l'autozero de l'espectrofotòmetre a l'aire.
- En un tub de 3 mL afegir 1074,5 µL del medi de reacció i 16,5 µL d'una dilució 1/3 del sobrenedant ajustat a 2 mg prot/mL. Preparar 2 cubetes per cada mostra. Llegir només 2 cubetes a la vegada.
- Transferir 496 µL de la mix a cada cubeta.
- Afegir 2,5 µL d'antimicina 2,5 mg/mL en una de les dues cubetes.
- Agitar la cubeta que conté antimicina suaument.
- Incubar les cubetes a 37°C durant 5 minuts.

Material i Mètodes

- Començar la reacció afegint 5 µL de decilubiquinol 25 mM mantingut a 37°C. Agitar les cubetes suaument.
- Llegir cada 10 segons durant 3 minuts a 550nm.

Càlcul de l'activitat del complex III

$$\begin{aligned} \text{Activitat} &= \frac{(\Delta\text{Abs}/\text{min}) \times (\text{volum final cubeta mL}) \times (1000 \text{ nmol}/\mu\text{mol}) \times 3}{\varepsilon \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1} \times 1\text{cm} \times (\text{volum mostra mL}) \times \text{prot mg/mL}} = \\ \text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot} &= \frac{(\Delta\text{Abs}/\text{min}) \times 0,5 \text{ mL} \times 1000 \text{ nmol}/\mu\text{mol} \times 3}{18,5 \text{ L}/\text{mmol}/\text{cm} \times 1 \text{ cm} \times 0,0075 \text{ mL} \times 2 \text{ mg/mL}} = \boxed{(\Delta\text{Abs}/\text{min}) \times 5405,4} \end{aligned}$$

Coefficient d'extinció molar del citocrom C $\varepsilon = 18,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Calcular la diferència entre l'activitat mesurada amb i sense antimicina.

Resultats

Intervals de referència:

- Músculs humans:
 - 89-167 nmol/min/mg prot
 - 0,54-0,87 nmol/min/UCS
- Múscul de porc:
 - 98-162 nmol/min/mg prot
 - 0,14-0,29 nmol/min/UCS

3.7.5 Activitat del complex IV (Citocrom C oxidasa)

Es mesura la disminució de l'absorbància a 550 nm de longitud d'ona que es dona al oxidar-se el citocrom c.



Temperatura: 37°C

Mostra:

Tipus: sobrenedant de múscul del pacient i sobrenedant de múscul de porc (control intern) ajustats a 2 mg/mL de proteïna.

Quantitat mínima necessària: 15 µL de sobrenedant.

Conservació: congelació a -80±5°C.

Criteris de rebuig: Mostra no congelada adequadament

Material i instrumentació auxiliar

- Cubetes semimicro de metacrilat de 1,5 mL
- Espectrofotòmetre termostatitzat (Uvikon – Pelltier)

Reactius

- Tampó fosfat 50 mM pH 7
 - Fosfat de potassi monobàsic (KH₂PO₄) 50 mM: pesar 0,34 g de KH₂PO₄ i dissoldre en 50 mL d'aigua MiliQ
 - Fosfat de potassi dibàsic (K₂HPO₄) 50 mM: pesar 0,435 g de K₂HPO₄ i dissoldre en 50 mL d'aigua MiliQ.
 - Ajustar el pH a 7 afegint solució de KH₂PO₄ a la solució de K₂HPO₄. Guardar a 4°C; estable durant 6 mesos.
- Citocrom C 100 µM
 - Pesar almenys 6 mg de citocrom C i dissoldre a 1,238 mg/mL en tampó fosfat 50 mM pH 7. Es prepara el mateix dia de l'assaig i no es guarda.
- Ditionita sòdica (Na₂S₂O₄)
- Ferrocianur de potassi (K₃[Fe(CN)₆])

Procediment

Composició del medi de reacció:

100 μ M citocrom C

20 μ g de proteïna

Preparació del medi de reacció:

- Preparar una solució de citocrom C 100% oxidada: posar 600 μ L de la solució inicial de citocrom C 100 μ M en una cubeta semimicro i afegir uns quants grans de ferrocianur de potassi (la solució es torna de color marró-groc).
- Preparar una solució de citocrom C 100% reduïda: posar 600 μ L de la solució inicial de citocrom C 100 μ M en una cubeta semimicro i afegir uns quants grans de ditionita sòdica (la solució es torna de color rosa-salmó).
- Llegir l'absorbància de la solució 100% oxidada a 550 nm després de fer un blanc a l'aire. L'absorbància hauria d'estar al voltant de 0.7-0.8.
- Fer el re-blanc de l'espectrofotòmetre amb la solució 100% oxidada i llegir l'absorbància de la solució 100% reduïda. Aquest valor es considera el 100% de reducció (per exemple: 1,6).
- Transferir alíquotes de 5-10 μ L de la solució 100% reduïda a la solució inicial de citocrom C i llegir de nou l'absorbància. S'han d'anar afegint alíquotes fins que l'absorbància estigui entre el 90 i 95% de l'absorbància de la solució 100% reduïda (per exemple 1,44-1,52).

Assaig d'activitat:

- Fer l'autozero a l'aire.
- Afegir a la cubeta 490 μ L de la solució de citocrom C 100 μ M reduïda i incubar a 37°C durant 5 minuts. Es poden llegir 6 cubetes a la vegada.
- Començar la reacció afegint 10 μ L de sobrenedant ajustat a 2 mg/mL. Agitar les cubetes suaument.
- Llegir cada 10 segons durant 3 minuts a 550 nm.

Càlcul de l'activitat del complex IV

$$\begin{aligned} \text{Activitat} &= \frac{(\Delta\text{Abs}/\text{min}) \times (\text{volum final cubeta mL}) \times (1000 \text{ nmol}/\mu\text{mol})}{\varepsilon \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1} \times 1 \text{ cm} \times (\text{volum mostra mL}) \times \text{prot mg/mL}} = \\ \text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot} &= \frac{(\Delta\text{Abs}/\text{min}) \times 0,5 \text{ mL} \times (1000 \text{ nmol}/\mu\text{mol})}{18,5 \text{ L}/\text{mmol}/\text{cm} \times 1 \text{ cm} \times 0,01 \text{ mL} \times 2 \text{ mg/mL}} = \boxed{(\Delta\text{Abs}/\text{min}) \times 1351,4} \end{aligned}$$

Coefficient d'extinció molar del citocrom C $\varepsilon = 18,5 \text{ mM}^{-1}\text{L}^{-1}$

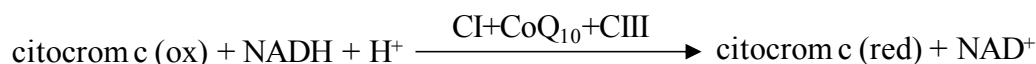
Resultats

Intervals de referència:

- Músculs humans:
 - 143-265 nmol/min/mg prot
 - 0,85-1,36 nmol/min/UCS
- Múscul de porc:
 - 182-239 nmol/min/mg prot
 - 0,3-0,6 nmol/min/UCS

3.7.6 Activitat combinada dels complexos I+III (NADH citocrom C oxidoreductasa)

L'activitat combinada dels complexos I i III transfereix electrons des del NADH, que s'oxida a NAD, cap al citocrom c a través del CoQ₁₀. L'activitat del complex I es inhibida per rotenona. L'activitat final ve donada per la diferència entre la mesurada amb i sense rotenona. Es mesura l'increment d'absorbància a 550 nm de longitud d'ona del citocrom c al reduir-se.



Temperatura de treball: 37°C

Mostra:

Tipus: sobrenedant de múscul del pacient i sobrenedant de múscul de porc (control intern) ajustats a 2 mg/mL de proteïna.

Quantitat mínima necessària: 30 µL de sobrenedant.

Conservació: congelació a -80±5°C.

Criteris de rebuig: Mostra no congelada adequadament

Material i instrumentació auxiliar

- Cubetes semimicro de metacrilat de 1,5 mL
- Espectrofotòmetre termostatitzat (Uvikon)

Reactius

- Tampó fosfat 500 mM pH 7,5
 - Fosfat de potassi monobàsic (KH₂PO₄) 500 mM: pesar 3,4 g de KH₂PO₄ i dissoldre en 50 mL d'aigua MiliQ
 - Fosfat de potassi dibàsic (K₂HPO₄) 500 mM: pesar 4,35 g de K₂HPO₄ i dissoldre en 50 mL d'aigua MiliQ.
 - Ajustar el pH a 7,5 afegint solució de KH₂PO₄ a la solució de K₂HPO₄. Guardar a 4°C; estable durant 6 mesos.
- BSA 50 mg/mL.
 - Pesar 500 mg de BSA i dissoldre a 20 µL/mg en aigua MiliQ. Fer alíquotes de 1 mL i guardar-les a -18±5°C; estable durant 12 mesos.

- KCN 10 mM (preparar el mateix dia de l'assaig i no guardar).
 - Pesar almenys 4 mg de KCN i dissoldre a 1,51 mL/mg en aigua MiliQ.
- Citocrom C 1 mM (preparar el mateix dia de l'assaig i no guardar).
 - Pesar almenys 10 mg de citocrom C i dissoldre a 12,38 mg/mL en aigua MiliQ.
- NADH 2 mM (preparar el mateix dia de l'assaig i no guardar)
 - Pesar almenys 1 mg de NADH i dissoldre a 0,685 mL/mg en aigua MiliQ.
- Rotenona 2,5 mM (mantenir en gel i tapada de la llum durant l'assaig d'activitat)
 - Pesar rotenona i dissoldre a 1,014 mL/mg en etanol 95%/DMSO (50/50). Fer alíquotes de 100µL i guardar-les a $-18\pm 5^{\circ}\text{C}$ i tapades de la llum; estable durant 12 mesos.

Procediment

Composició del medi de reacció:

200 µM NADH

100 µM citocrom C

50 mM Tampó fosfat pH 7,5

1,0 mg/mL BSA

1 mM KCN

12,5 µM rotenona

20 µg de proteïna

Preparació del medi de reacció:

Reactius	Quantitat per mostra	N= 3 (volum x 4)	N= 4 (volum x 5)
500 mM Tampó fosfat pH7,5	110µL	440µL	550µL
50 mg/mL BSA	22µL	88µL	110µL
10 mM KCN	110µL	440µL	550µL
1 mM citocrom C	110µL	440µL	550µL
H ₂ O MiliQ	616µL	2464µL	3080µL

Assaig d'activitat:

- Fer l'autozero de l'espectrofotòmetre a l'aire.
- En un tub de 3 mL afegir 968 μL del medi de reacció i 22 μL de sobrenedant ajustat a 2 mg/mL. Preparar 2 cubetes per cada mostra. Es poden llegir fins a 6 cubetes a la vegada.
- Transferir 450 μL de la mix a cada cubeta.
- Afegir 2,5 μL de rotenona 2,5 mM en una de les dues cubetes.
- Agitar la cubeta que conté rotenona suaument.
- Incubar les cubetes a 37°C durant 5 minuts.
- Començar la reacció afegint 50 μL de NADH 2 mM mantingut a temperatura ambient. Agitar la cubeta suaument.
- Llegir cada 10 segons durant 3 minuts a 550 nm.

Càlcul de l'activitat del complex I+III

$$\begin{aligned} \text{Activitat} &= \frac{(\Delta\text{Abs}/\text{min}) \times (\text{volum final cubeta mL}) \times (1000 \text{ nmol}/\mu\text{mol})}{\varepsilon \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1} \times 1 \text{ cm} \times (\text{volum mostra mL}) \times \text{prot mg/mL}} = \\ \text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot} &= \frac{(\Delta\text{Abs}/\text{min}) \times 0,5 \text{ mL} \times 1000 \text{ nmol}/\mu\text{mol}}{18,5 \text{ L}/\text{mmol}/\text{cm} \times 1\text{cm} \times 0,01 \text{ mL} \times 2 \text{ mg/mL}} = \boxed{(\Delta\text{Abs}/\text{min}) \times 1351,4} \end{aligned}$$

Coefficient d'extinció molar del citocrom C $\varepsilon = 18,5 \text{ mM}^{-1}\text{L}^{-1}$

Calcular la diferència entre l'activitat mesurada amb i sense rotenona.

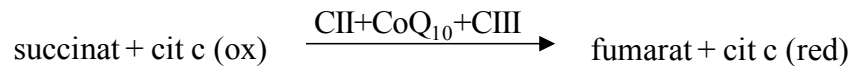
Resultats

Intervals de referència:

- Músculs humans:
15-36 nmol/min/mg prot
0,09-0,18 nmol/min/UCS
- Múscul de porc:
31-52 nmol/min/mg prot
0,08-0,12 nmol/min/UCS

3.7.7 Activitat combinada dels complexos II+III (Succinat citocrom C oxidoreductasa)

L'activitat combinada dels complexos II i III (succinat citocrom c oxidoreductasa) transfereix electrons des del succinat cap a citocrom c a través del CoQ₁₀. Es mesura l'increment d'absorbància a 550 nm de longitud d'ona del citocrom c al reduir-se.



Temperatura: 37°C

Mostra:

Tipus: sobrenedant de múscul del pacient i sobrenedant de múscul de porc (control intern) ajustats a 2 mg/mL de proteïna.

Quantitat mínima necessària: 15 µL de sobrenedant.

Conservació: congelació a -80±5°C.

Criteris de rebuig: Mostra no congelada adequadament.

Material i instrumentació auxiliar

- Cubetes semimicro de metacrilat de 1,5 mL
- Espectrofotòmetre termostatitzat (Uvikon)

Reactius

- Tampó fosfat 500 mM pH 7,5
 - Fosfat de potassi monobàsic (KH₂PO₄) 500 mM: pesar 3,4 g de KH₂PO₄ i dissoldre en 50 mL d'aigua MiliQ
 - Fosfat de potassi dibàsic (K₂HPO₄) 500 mM: pesar 4,35 g de K₂HPO₄ i dissoldre en 50 mL d'aigua MiliQ.
 - Ajustar el pH a 7,5 afegint solució de KH₂PO₄ a la solució de K₂HPO₄. Guardar a 4°C; estable durant 6 mesos.
- Succinat 200 mM
 - Pesar 236,2 mg de succinat i dissoldre en 7 mL d'aigua MiliQ. Ajustar el pH a 7,4 amb KOH.
 - Ajustar el volum final a 10 mL i fer alíquotes de 500 µL. Guardar a -18±5°C; estable durant 12 mesos.

Material i Mètodes

- BSA 50 mg/mL.
 - Pesar 500 mg de BSA i dissoldre a 20 µL/mg en aigua MiliQ. Fer alíquotes de 1 mL i guardar-les a $-18\pm 5^{\circ}\text{C}$; estable durant 12 mesos.
- KCN 10 mM (preparar el mateix dia de l'assaig i no guardar).
 - Pesar almenys 4 mg de KCN i dissoldre a 1,51 mL/mg en aigua MiliQ.
- Citocrom C 1 mM (preparar el mateix dia de l'assaig i no guardar).
 - Pesar almenys 10 mg de citocrom C i dissoldre a 12,38 mg/mL en aigua MiliQ.

Procediment

Composició del medi de reacció:

20 mM Tampó fosfat pH 7.5

20 mM succinat

2,0 mg/mL BSA

1 mM KCN

100 µM citocrom C

20 µg proteïna

Preparació del medi de reacció:

Reactius	Quantitat per mostra	N= 3 (volum x 4)	N= 4 (volum x 5)
500 mM Tampó fosfat pH7.5	20 µL	80 µL	100 µL
50 mg/mL BSA	20 µL	80 µL	100 µL
200 mM succinat	50 µL	200 µL	250 µL
10 mM KCN	50 µL	200 µL	250 µL
H ₂ O MiliQ	300 µL	1200 µL	1500 µL

Assaig d'activitat:

- Fer l'autozero de l'espectrofotòmetre a l'aire.
- Afegir a la cubeta 440 µL del medi de reacció i 10 µL de sobrenedant ajustat a 2 mg/mL. Agitar la cubeta suaument. Es poden llegir fins a 6 cubetes a la vegada.
- Incubar la cubeta a 37°C durant 5 minuts. Paral·lelament s'incuba una cubeta que només conté medi de reacció que servirà per fer la línia base de reactius.

- Començar la reacció afegint 50 µL de citocrom C 1 mM mantingut a temperatura ambient. Agitar la cubeta suaument.
- Llegir cada 10 segons durant 3 minuts a 550 nm.

Càlcul de l'activitat del complex II+III

$$\begin{aligned} \text{Activitat} &= \frac{(\Delta\text{Abs}/\text{min}) \times (\text{volum final cubeta mL}) \times (1000 \text{ nmol}/\mu\text{mol})}{\varepsilon \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1} \times 1 \text{ cm} \times (\text{volum mostra mL}) \times \text{prot mg/mL}} = \\ \text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot} &= \frac{(\Delta\text{Abs}/\text{min}) \times 0,5 \text{ mL} \times 1000 \text{ nmol}/\mu\text{mol}}{18,5 \text{ L}/\text{mmol}/\text{cm} \times 1 \text{ cm} \times 0,01 \text{ mL} \times 2 \text{ mg/mL}} = \boxed{(\Delta\text{Abs}/\text{min}) \times 1351,4} \end{aligned}$$

Coefficient d'extinció molar del citocrom C $\varepsilon = 18,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Calcular la diferència entre l'activitat de la cubeta que conté sobrenedant i la que només conté medi de reacció.

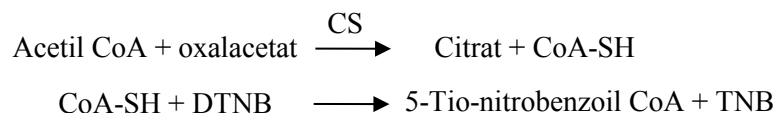
Resultats

Intervals de referència:

- Músculs humans:
25-55 nmol/min/mg prot
0,13-0,27 nmol/min/UCS
- Múscul de porc:
26-39 nmol/min/mg prot
0,07-0,12 nmol/min/UCS

3.7.8 Activitat Citrat Sintasa

La citrat sintasa (CS) és un enzim del cicle de Krebs que catalitza la formació de citrat a partir de oxalacetat i acetil-CoA. El CoA alliberat es valora mitjançant la reacció amb DTNB (5,5'-ditio-bis [-2-àcid nitrobenzoic]). Mesura de l'increment d'absorbància del TNB a 412nm de longitud d'ona.



Temperatura: 37°C

Aquest enzim es valora com a referència del contingut mitocondrial a la preparació per estudi de la cadena respiratòria.

Mostra:

Tipus: sobrenedant de múscul del pacient i sobrenedant de múscul de porc (control intern) ajustats a 2 mg/mL de proteïna.

Quantitat mínima necessària: 30 µL de sobrenedant.

Conservació: congelació a -80±5°C.

Criteris de rebuig: Mostra no congelada adequadament

Material i instrumentació auxiliar

- Cubetes semimicro de metacrilat de 1,5 mL
- Espectrofotòmetre termostatitzat (Uvikon)

Reactius

- Etanol 95%
 - Barrejar 47,5 mL etanol absolut + 2,5 mL d'aigua MiliQ. Guardar a -18±5°C; estable durant 12 mesos.
- DTNB 15 mM
 - Pesar DTNB i dissoldre a 0,168 mL/mg en etanol 95%. Guardar en alíquotes de 500 µL a -18±5°C tapat de la llum; estable durant 12 mesos.
- DTNB 5 mM (preparar just abans d'utilitzar i no guardar; mantenir en gel i tapat de la llum durant l'assaig d'activitat)

- Diluir 30 µL de DTNB 15 mM en 60 µL d'etanol 95%.
- Acetil-CoA 10 mM
 - Pesar acetil-CoA i dissoldre a 0,112 mL/mg en aigua MiliQ. Guardar a -18±5°C; estable durant 6 mesos.
- Tampó Tris-HCl 1 M pH 8,1
 - Pesar 6,06 g de Tris i dissoldre en 30 mL d'aigua MiliQ. Ajustar el pH a 8,1 amb HCl i ajustar el volum final a 50 mL. Guardar a 4°C; estable durant 6 mesos.
- Tampó Tris-HCl 100 mM pH 8,1
 - Diluir 10 vegades la solució de Tris-HCl 1M en aigua MiliQ. Guardar a 4°C; estable durant 6 mesos.
- Solució Triton X-100 (10%).
- Oxalacetat 10 mM (preparar just abans d'utilitzar i no guardar)
 - Pesar almenys 1,5 mg d'oxalacetat i dissoldre a 0,758 mL/mg en Tris-HCl 100 mM pH 8,1.

Procediment

Composició del medi de reacció:

100 µM DTNB

100 mM Tris-HCl pH 8.1

300 µM acetil-CoQ

500 µM oxalacetat

0,1 % Triton X-100

20 µg proteïna

Preparació del medi de reacció:

Reactius	Quantitat per mostra	N= 3 (volum x 4)	N= 4 (volum x 5)
5 mM DTNB	10 µL	40 µL	50 µL
10 mM acetil-CoA	15 µL	60 µL	75 µL
10% Triton X-100	5 µL	20 µL	25 µL
1 M Tris-HCl pH 8.1	47,5 µL	190 µL	237,5 µL
H ₂ O MiliQ	387,5 µL	1550 µL	1937,5 µL

Material i Mètodes

Assaig d'activitat:

- Fer l'autozero de l'espectrofotòmetre a l'aire.
- Afegir a la cubeta 465 μL del medi de reacció i 10 μL de sobrenedant ajustat a 2 mg/mL. Agitar la cubeta suaument. Es poden llegir fins a 6 cubetes a la vegada.
- Incubar la cubeta a 37°C durant 5 minuts.
- Llegir la línia base cada 10 segons durant 3 minuts.
- Començar la reacció afegint 25 μL d'oxalacetat 10 mM. Agitar la cubeta suaument.
- Llegir cada 10 segons durant 3 minuts a 412nm.

Càlcul de l'activitat citrat sintasa

$$\begin{aligned} \text{Activitat} &= \frac{(\Delta\text{Abs}/\text{min}) \times (\text{volum final cubeta mL}) \times (1000 \text{ nmol}/\mu\text{mol})}{\epsilon \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1} \times 1 \text{ cm} \times (\text{volum mostra mL}) \times \text{prot mg/mL}} = \\ \text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot} &= \frac{(\Delta\text{Abs}/\text{min}) \times 0,5 \text{ mL} \times 1000 \text{ nmol}/\mu\text{mol}}{13,6 \text{ L}/\text{mmol}/\text{cm} \times 1 \text{ cm} \times 0,01 \text{ mL} \times 2 \text{ mg/mL}} = \boxed{(\Delta\text{Abs}/\text{min}) \times 1838,2} \end{aligned}$$

Coefficient d'extinció molar del DTNB és $\epsilon = 13,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Calcular la diferència entre l'activitat amb i sense oxalacetat.

Resultats

Intervals de referència:

- Músculs humans:
147-250 nmol/min/mg prot
- Múscul de porc:
402-529 nmol/min/mg prot

3.8 BLUE NATIVE ELECTROFORESIS EN GELS DE POLIACRILAMIDA (BN-PAGE) EN MOSTRES DE MÚSCUL I FIBROBLASTS

3.8.1 BLUE NATIVE electroforesis

La tècnica de la electroforesis Blue Native (BN-PAGE) va ser descrita per Shägger (*Shägger 1991*) amb la finalitat de separar els complexos i les proteïnes de membrana mitocondrials, amb masses des de 10 a 10000 kDa, mitjançant un gel d'acrilamida en gradient (4-18%). Es basa en la utilització de detergents no iònics, per solubilitzar les membranes biològiques, i un colorant aniònic, el Coomassie Blue G-250, que s'uneix a la superfície de les proteïnes de membrana proporcionant càrrega negativa. La unió de molècules de colorant carregades negativament modifica el punt isoelèctric de les proteïnes i complexos proteics fent que migrin cap a l'ànode en una electroforesis a pH 7,5 sense tenir en compte el seu punt isoelèctric original. En el BN-PAGE les proteïnes i complexos proteics es separen únicament en funció de la seva massa gràcies al gel en gradient, fent que s'aturin quan arriben a una mida de porus específica i limitant. Les proteïnes unides al colorant de Coomassie estaran carregades negativament, permetent que siguin solubles en solucions lliures de detergent, de manera que les proteïnes i complexos proteics es separen en la seva forma nativa, mantenint l'activitat catalítica. A més, permet visualitzar-los durant la electroforesis en forma de bandes blaves, facilitant la seva identificació.

El mètode que es descriu a continuació es basa en les publicacions de *Shägger i col. (Shägger 1991)*, *Wittig i col. (Wittig 2006)*, *Reisinger i col (Reisinger 2006)* i *Petr Klement i col (Klement 1995)*.

Mostra:

Tipus: sobrenedant de múscul o homogenat de fibroblasts

Quantitat mínima necessària: 400 µg de proteïna (múscul) o dos flascons de 25 cm² de fibroblasts cultivats.

Conservació: congelació a -80±5°C.

Material i instrumentació auxiliar

- Vidres MiniProtean[®] 3 System (BioRad)
- Sistema de formació de gels en gradient

- Cambra MiniProtean de multidifusió (multicasting chamber; BioRad)
- Agitador magnètic
- Sistema d'electroforesis MiniProtean (BioRad)
- Càmbra a 4°C

Reactius (basat en la publicació de *Reisinger i col (2006) (8)*)

- Solució al 40% d'Acrilamida-Bisacrilamida 29:1 (33%C) (BioRad)
- Tampó de gel (3x) pH 7: 150 mM Bis-Tris, 1,5 M àcid 6-aminocaproic.
 - Pesar 3,14 gr de Bis-Tris i 19,67 gr d'àcid 6-aminocaproic. Dissoldre en 90 mL d'aigua Mili Q i ajustar el pH a 7 amb HCl. Enrasar el volum a 100 mL. Guardar a temperatura ambient.
- Persulfat amoni (APS)
- N,N,N,N'-Tetrametilendiamina (TEMED)
- Tampó de solubilització de múscul pH 7: 50 mM Bis-Tris, 0,5 M EDTA, 750 mM àcid 6-aminocaproic
 - Pesar 100 mg de Bis-Tris, 1,8 mg de EDTA i 980 mg d'àcid 6-aminocaproic. Dissoldre en 8 mL d'aigua MiliQ i ajustar el pH a 7 amb HCl. Enrasar el volum a 10 mL, fer alíquotes de 1 mL i guardar a -18±5°C.
- Tampó de solubilització de fibroblasts pH 7: 50 mM Bis-Tris, 1,5 M àcid 6-aminocaproic
 - Pesar 100 mg de Bis-Tris i 1,96 g d'àcid 6-aminocaproic. Dissoldre en 8 mL d'aigua MiliQ i ajustar el pH a 7 amb HCl. Enrasar el volum a 10 mL, fer alíquotes de 1 mL i guardar a -18±5°C.
- Dodecil β-maltòsid (lauril maltòsid) 20% (p/v)
 - Pesar 200 mg de dodecil β-maltòsid i dissoldre en 1 mL d'aigua Mili Q. Guardar a -18±5°C.
- Digitonina 8 mg/mL
 - Pesar almenys 8 mg de digitonina i dissoldre amb el volum necessari d'aigua MiliQ. Guardar a -18±5°C.
- Glicerol 50% (v/v)
 - Barrejar 575 µL de Glicerol 87% (v/v) i 425 µL d'aigua Mili Q. Guardar a -18±5°C.

- Tampó de càrrega: 750 mM àcid 6-aminocaproic, 5% (p/v) Coomassie G-250
 - Pesar 98 mg de àcid 6-aminocaproic i 50 mg de Coomassie G-250. Diluir en 1 mL d'aigua Mili Q i guardar a $-18\pm 5^{\circ}\text{C}$.
- Tampó Ànode pH 7: 50 mM Bis Tris
 - Pesar 10,46 gr de Bis Tris. Diluir en 900 mL d'aigua Mili Q i ajustar a pH 7 amb HCl. Enrasar a 1 L i guardar a 4°C .
- Tampó Càtode-Coomassie pH 7: 15 mM Bis Tris, 50 mM Tricina i 0,02% (p/v) Coomassie G-250
 - Pesar 3,14 gr de Bis Tris, 8,95 gr de Tricina i 0,2 gr de Coomassie G-250. Diluir en 900 mL d'aigua Mili Q i ajustar a pH 7 amb HCl. Enrasar a 1 L i guardar a 4°C .
- Tampó Càtode Incolor pH 7: 15 mM Bis Tris, 50 mM Tricina
 - Pesar 3,14 gr de Bis Tris 8,95 gr de Tricina. Diluir en 900 mL d'aigua Mili Q i ajustar a pH 7 amb HCl. Enrasar a 1 L i guardar a 4°C .
- Ferritina Tipus I (procedent de melsa de cavall) 85 mg/mL (SIGMA) (pes molecular dímer 960 kDa; pes molecular monòmer 480 kDa).

Procediment

Formació dels gels en gradient:

- Preparar la *MiniProtean multi-casting chamber* (permet la formació simultània de 3 gels en gradient) i el sistema de cambres per la formació de gels en gradient (BioRad).
- En vasos de precipitat, preparar les solucions al 4 i al 15% d'acrilamida.

	Solució 4% (Vf = 20 mL)	Solució 15% (Vf = 20 mL)
Acrilamida 40%	2 mL	7,5 mL
Tampó de gel (3x)	6,7 mL	6,7 mL
Aigua Mili Q	11,3 mL	5,8 mL
APS	100 μL	100 μL
TEMED	10 μL	10 μL

- Abocar les solucions d'acrilamida al sistema de formació de gels en gradient connectat a la *MiniProtean multi-casting chamber*. Obrir les vàlvules i deixar sortir

una mica de solució al 4% d'acrilamida. Tot seguit, i sense tancar la vàlvula de sortida, obrir la vàlvula que connecta la cambra 1 (*mixing chamber*) amb la 2 (*reservoir chamber*), on, mitjançant un agitador magnètic, es forma el gradient d'acrilamida.

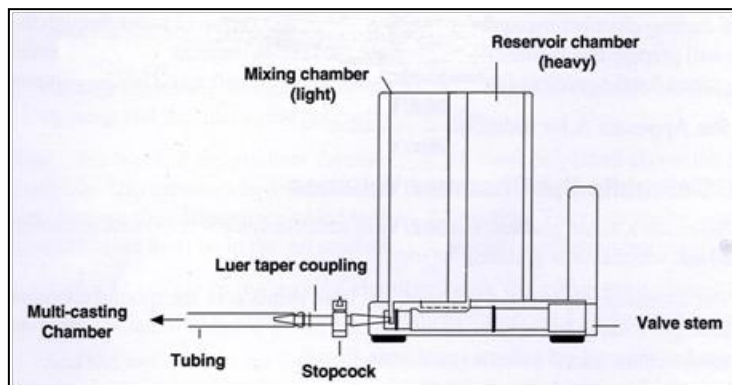


Figura 7. Esquema de la *MiniProtean multi-casting chamber*. La solució d'acrilamida al 15% és abocada al compartiment reservori (*reservoir chamber*) i la solució d'acrilamida al 4%, al compartiment de barreja (*mixing chamber*).

- Tancar la vàlvula quan l'acrilamida arribi al nivell desitjat a la cambra de multidifusió.
- Cobrir la superfície dels gels en gradient que s'han format amb una solució al 70% d'isopropanol per tal que el front superior dels gels quedi recte.
- Deixar polimeritzar els gels a temperatura ambient (aproximadament dues hores).
- Substituir l'isopropanol per aigua o tampó de càtode i guardar els gels, en una cambra humida, a 4°C fins a la seva utilització (guardar màxim una setmana).
- Preparar el gel d'apilament (o *stacking*), al 4% d'acrilamida, el mateix dia que es fa la electroforesi:

	Stacking 4% (Vf = 5mL)
Acrilamida 40%	0,5 mL
Tampó de gel (3x)	1,67 mL
Aigua Mili Q	2,83 mL
APS	55 µL
TEMED	5,5 µL

Preparació de la mostra de múscul:

Es basa en la publicació de *Shägger i col. (Schägger 1991)*.

La mostra ha d'estar en gel durant tot el procés.

Si es volen fer activitats en gel, tenir en compte que amb un carril de gel es poden fer dues activitats enzimàtiques.

- Agafar el volum d'homogenat de múscul corresponent a 400 µg de proteïna.
- Centrifugar a 10.000 x g 10 minuts a 4°C.
- Descartar el sobrenedant i resuspendre el pellet amb 40 µL de tampó de solubilització de múscul.
- Afegir 5 µL de lauril maltòsid 20%. Deixar actuar en gel durant 15 minuts i agitant cada 3 minuts.
- Centrifugar a 20.000 x g 20 minuts a 4°C.
- Agafar 40 µL de sobrenedant i afegir-hi 5 µL de glicerol 50% i 2,5 µL de tampó de càrrega.
- La mostra està a punt per ser carregada al gel.

Preparació de la mostra de fibroblasts:

Es basa en la publicació de *Petr Klement i col. (1995)*.

La mostra ha d'estar en gel durant tot el procés.

Si es volen fer activitats en gel, tenir en compte que amb un carril de gel es poden fer dues activitats enzimàtiques.

- Agafar el *pellet* de fibroblasts corresponent a un flascó de cultiu de 25 cm² (equivalent a uns 0,5 mg de proteïna).
- Resuspendre el *pellet* amb 100 µL de PBS.
- Afegir 100 µL de digitonina, barrejar bé i deixar actuar durant 15 minuts en gel; agitar cada 5 minuts amb els dits.
- Separar 10 µL de cada tub per quantificar proteïnes (mètode de BCA). La quantificació de proteïna s'ha de fer en paral·lel a la preparació de la mostra.
- Aturar la reacció del detergent afegint 1,2 mL de PBS
- Centrifugar a 10.000 x g 10 minuts a 4°C.
- Descartar el sobrenedant i resuspendre el *pellet* amb 50 µL de tampó de solubilització de fibroblasts.

Material i Mètodes

- Afegir 5 µL de lauril maltòsid 10%. Deixar actuar en gel durant 15 minuts agitant cada 3 minuts.
- Centrifugar a 20.000 x g 20 minuts a 4°C.
- Si el contingut proteic de les mostres és similar entre elles, agafar 50 µL de sobrenedant i afegir-hi 5 µL de glicerol 50% i 2,5 µL de tampó de càrrega. Si el contingut proteic varia o és superior a 0,5-0,6 mg de proteïna (quantitat ideal de proteïna), ajustar el volum de sobrenedant per tal de carregar quantitats similars, i al voltant de 0,5-0,6 mg, de proteïna al gel. La mostra està a punt per ser carregada al gel.

Electroforesis

El gel d'electroforesis corre a 4°C durant aproximadament 3 hores.

- Muntar el sistema d'electroforesi Mini-Protean (Bio Rad).
- Retirar la pinta del gel d'apilament i rentar els pous amb tampó de càtode incolor pH 7.
- Traslladar tot el sistema a la cambra a 4°C.
- Omplir les cambres interior i exterior amb tampó Càtode-Comassie pH 7 i tampó Ànode pH 7 respectivament, fins a la meitat.
- Carregar el marcador de pes molecular (ferritina) i les mostres al gel.
- Acabar d'afegir tampó Càtode-Comassie pH 7, fins que els pous quedin ben coberts, i tampó Ànode pH 7.
- Iniciar al electroforesi a 90 V.
- Quan les mostres hagin superat el gel d'*stacking* i hagin entrat al gel en gradient, pujar fins a 100 V i deixar córrer fins que el front blau hagi corregut 2/3 del gel en gradient.
- Pausar l'electroforesi i canviar el tampó Càtode-Comassie pH 7 per tampó Càtode Incolor pH 7.
- Continuar la electroforesi a 200-250V o bé a 15 mA fins que el front blau surti del gel.
- Parar la electroforesi just quan el front blau s'hagi perdut; no deixar córrer més perquè es podrien perdre els complexos proteics més petits.

Un cop el gel ha corregut, es poden seguir tres vies:

- tenyir el gel amb una solució de Coomassie per tal de visualitzar bé les bandes corresponents als complexos de cadena respiratòria mitocondrial.
- fer les activitats enzimàtiques dels complexos I, II, IV i V en gel.
- transferir el gel a una membrana de nitrocel·lulosa (Western Blot) i tenyir els complexos proteics amb anticossos específics.

3.8.2 Tinció del gel amb Blau de Coomassie

Material i instrumentació auxiliar

Cubetes de plàstic per tenyir el gel

Agitador orbital

Campana de flux laminar

Reactius

- Solució colorant de Coomassie:
 - 0,25% (p/v) Coomassie G-250
 - 45% (v/v) metanol
 - 10% (v/v) àcid acètic concentrat

Guardar a temperatura ambient.

- Solució decolorant:
 - 5% (v/v) etanol
 - 7,5% (v/v) àcid acètic concentrat

Guardar a temperatura ambient.

Procediment

- Submergir el gel en la solució colorant de Coomassie, que quedi ben cobert.
- Deixar 10 minuts en agitació orbital suau.
- Decantar la solució colorant (es pot reciclar) i cobrir el gel amb solució decolorant de Coomassie.
- Deixar tota la nit a la campana de flux vertical i en agitació orbital. Per ajudar a la decoloració, posar dos rotllos de paper absorbent dins la cubeta per tal que vagin absorbint el color blau.

Material i Mètodes

- Decantar la solució decolorant i hidratar el gel amb aigua destil·lada durant aproximadament 30 minuts com a mínim. El gel es pot guardar en aigua o bé es pot plastificar (sistema de Bio Rad).

El patró de bandes que s'obté es mostra a la Figura 8.

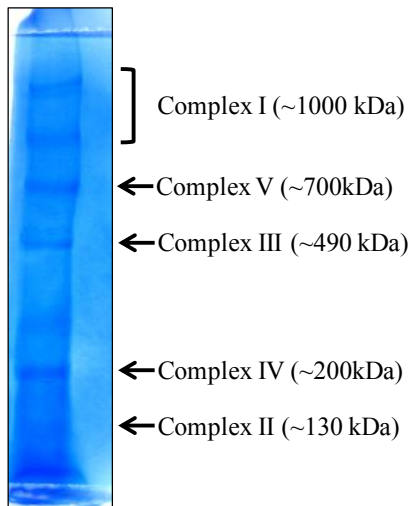


Figura 8. Patró de bandes dels complexos I-V obtingut per tinció amb solució de Blau de Coomassie.

3.8.3 Activitats enzimàtiques en gel de Blue Native

Es base en els articles publicats per *E. Zerbetto i col. (Zerbetto 1997)* i *Nitjtmans i col. (Nitjtmans 2002)*.

Material i instrumentació auxiliar

Tubs de 10 mL fons cònic

Bany amb agitació termostatitzat a 37°C

Agitador orbital

GelAir Drying System (BioRad)

Reactius

- Solució de fixació
 - 50% (v/v) metanol
 - 10% (v/v) àcid acètic
- Guardar a temperatura ambient.

Complex	Tampó	Reactius
Complex I	Tris-HCl 2 mM pH 7,4	0,1 mg/mL NADH 2,5 mg/mL NBT
Complex II	Tampó fosfat 50 mM pH 7,4	4,5 mM EDTA 84 mM succinat 0,2 mM PMS 2 mg/mL NBT 10 mM KCN
Complex IV	Tampó fosfat 50 mM pH 7,4 75 mg/mL sacarosa	1 mg/mL DAB 20 µg/mL catalasa 1 mg/mL citocrom C
Complex V	34 mM Tris 270 mM glicina, pH 7,8 14 mM MgSO ₄	8 mM ATP 0,2 % nitrat de plom

Complex I:

Tampó de reacció:

- Tampó Tris-HCl 2 mM pH 7,4
 - Pesar 12 mg de Tris i dissoldre en 40 mL d'aigua Mili Q. Ajustar a pH 7,4 amb HCl i enrasar a 50 mL. Guardar a 4°C.

Material i Mètodes

Reactius (Vf = 10 mL): preparar mentre les mostres corren al gel amb tampó de càtode incolor.

- NADH 0,1 mg/mL
 - Pesar 1 mg de NADH per a 10 mL de solució final.
- NBT (Nitrotetrazolium Blue Chloride) 2,5 mg/mL
 - Pesar 25 mg de NBT per a 10 mL de solució final.

Dissoldre els reactius en 10 mL de tampó de reacció. Guardar a temperatura ambient i tapat de la llum fins a la seva utilització.

Resultat: la reducció del NBT per part del complex I dona lloc a un complex insoluble de color morat. A la zona on hi ha complex I, apareix una banda morada.

Complex II:

Tampó de reacció:

- Tampó Fosfat 50 mM pH 7,4
 - Fosfat de potassi monobàsic (KH_2PO_4) 50 mM: pesar 680,5 mg de KH_2PO_4 i dissoldre en 100 mL d'aigua MiliQ
 - Fosfat de potassi dibàsic (K_2HPO_4) 50 mM: pesar 870,9 mg de K_2HPO_4 i dissoldre en 100 mL d'aigua MiliQ.
 - Ajustar el pH a 7,4 afegint solució de KH_2PO_4 a la solució de K_2HPO_4 . Guardar a 4°C.

Reactius (Vf = 10 mL): preparar mentre les mostres corren al gel amb tampó de càtode incolor.

- EDTA 4,5 mM
 - Agafar 90 μL de EDTA 0,5 M per a 10 mL de volum final.
- Succinat 84 mM
 - Pesar 99,2 mg de succinat per a 10 mL de volum final.
- PMS 0,2 mM
 - Pesar 0,6 mg de PMS per a 10 mL de volum final.
- NBT (Nitrotetrazolium Blue Chloride) 2 mg/mL
 - Pesar 20 mg de NBT per a 10 mL de volum final.

- KCN 10 mM
 - Pesar 6,5 mg de KCN per a 10 mL de volum final.

Dissoldre tots els reactius en 9 mL de tampó de reacció. Tornar a ajustar a pH 7,4 amb KOH i enrasar a 10 mL. Guardar a temperatura ambient i tapat de la llum fins a la seva utilització.

Resultat: la reducció del NBT dóna lloc a un complex insoluble de color morat. A la zona on hi ha complex II, apareix una banda morada.

Complex IV:

Tampó de reacció:

- Tampó Fosfat 50 mM pH 7,4
 - Fosfat de potassi monobàsic (KH_2PO_4) 50 mM: pesar 680,5 mg de KH_2PO_4 i dissoldre en 100 mL d'aigua MiliQ
 - Fosfat de potassi dibàsic (K_2HPO_4) 50 mM: pesar 870,9 mg de K_2HPO_4 i dissoldre en 100 mL d'aigua MiliQ.
 - Ajustar el pH a 7,4 afegint solució de KH_2PO_4 a la solució de K_2HPO_4 . Guardar a 4°C.
- Sacarosa 75 mg/mL
 - Pesar 3,75 g de sacarosa i dissoldre en 50 mL de tampó fosfat 50 mM pH 7,4. Guardar a 4°C.

Reactius ($V_f = 10 \text{ mL}$): preparar mentre les mostres corren al gel amb tampó de càtode incolor.

- 3,3'-Diamnbenzidina (DAB) 1 mg/mL
 - Pesar 10 mg de DAB per a 10 mL de volum final.
- Catalasa 20 $\mu\text{g/mL}$
 - Pesar 0,2 mg de catalasa per a 10 mL de volum final.
- Citocrom C 1 mg/mL
 - Pesar 10 mg de citocrom C per a 10 mL de volum final.

Dissoldre tots els reactius en 10 mL de tampó de reacció. Guardar a temperatura ambient i tapat de la llum fins a la seva utilització.

Resultat: la oxidació de la DAB dóna lloc a l'aparició d'un precipitat de color marró-taronja fosc. La reducció de l'NBT dóna lloc a un complex insoluble de color morat. A la zona on hi ha complex IV, apareix una banda d'aquest color.

Complex V:

Tampó de reacció:

- Tampó Tris 34 mM-Glicina 270 mM pH 7,8
 - Pesar 205,94 mg de Tris per a un volum final de 50 mL.
 - Pesar 1,01 g de glicina per a un volum final de 50 mL
 - Dissoldre la glicina i el Tris en 45 mL d'aigua Mili Q. Ajustar a pH 7,8 amb KOH. Guardar a 4°C.
- MgSO₄ 14 mM
 - Pesar 0,17 g de MgSO₄ i dissoldre en 50 mL de tampó tris-glicina. Guardar a 4°C.

Reactius (Vf = 10 mL): preparar mentre les mostres corren al gel amb tampó de càtode incolor.

- ATP 8 mM
 - Pesar 44,09 mg de ATP per a 10 mL de volum final.
- Nitrat de plom 0,02% (p/v)
 - Pesar 20 mg de nitrat de plom per a 10 mL de volum final.

Dissoldre tots els reactius en 10 mL de tampó de reacció.

Comprovar que el pH de la solució sigui de 7,8; si cal, ajustar de nou amb KOH. Guardar a temperatura ambient i tapat de la llum fins a la seva utilització.

Resultat: per acció de la ATPasa (subunitat F₁ del complex V) el nitrat de plom precipita, donant lloc a la formació d'una banda de color blanquinós (per millorar el contrast, posar visualitzar la banda sobre un fons fosc).

Procediment

- Un cop el gel en gradient ha corregut, tallar-lo en funció dels complexos que es volen estudiar. Posar els fragments en recipients que es puguin tapar.

- Incubar cada fragment de gel durant 10 minuts, a temperatura ambient i en agitació, amb el tampó de reacció corresponent a l'activitat enzimàtica que es vol estudiar.
- Substituir el tampó de reacció per la solució que conté els reactius. Tapar bé el recipient i segellar-lo amb parafilm.
- Incubar al bany termostatitzat a 37°C i en agitació.

El temps que tarda a aparèixer la banda o bandes corresponents a l'activitat enzimàtica varia en funció del complex:

Complex I: 30 minuts d'incubació aproximadament

Complex II: 45 minuts d'incubació aproximadament

Complex IV: a partir de 3 hores d'incubació i fins a o/n

Complex V: 60-75 minuts en múscul i a partir de 3 hores en fibroblasts

Aquests temps són aproximats i cal estar pendents de les activitats, ja que s'han d'aturar just quan apareixen les bandes per tal que siguin visibles les deficiències. Si es deixa actuar massa estona, en les mostres deficients pot acabar igualant-se la banda a la del control, de manera que s'estaria sobreestimant l'activitat enzimàtica, portant a errors d'interpretació.

- Per aturar l'activitat dels complexos I, II i IV, submergir el gel en solució de fixació (a la campana de flux laminar) durant 15 minuts. Pel complex V, submergir el gel en aigua destil·lada.
- Hidratar el gel amb aigua destil·lada durant mitja hora.
Un cop les bandes d'activitat s'han fixat, es pot deixar el gel completament submergit en aigua destil·lada fins l'endemà.
- Assecar el gel mitjançant el GelAir Drying System de BioRad.

3.8.4 Western-Blot dels complexos de cadena respiratòria mitocondrial a partir d'un gel de Blue Native

Consisteix en transferir les proteïnes del gel en gradient a una membrana de nitrocel·lulosa per tal de poder detectar, mitjançant anticossos específics, les proteïnes que formen els complexos de cadena respiratòria mitocondrial.

Material i instrumentació auxiliar

- Membrana Immobilon®-P 0,45 µm poresize PVDF (Millipore)
- Paper Whatman
- Kit de transferència (BioRad)
- Revelador OPTI-4CN Anti Mouse Detection Kit (BioRad)
- Agitador orbital

Reactius

- Tampó de transferència: Tris 25 mM, glicina 192 mM, 0,1% SDS i 20% etanol.
 - Pesar 3,02 g de Tris, 14,4 g de glicina i 200 mg de SDS. Dissoldre en 700 mL d'aigua destil·lada i 200 mL d'etanol. Enrasar a volum final de 1 L amb aigua destil·lada. Guardar a 4°C.
- Solució de rentat: 0,1% (v/v) de Tween 20 en PBS
- Solució de bloqueig: solució de PBS amb 3% BSA (p/v) i 0,1% de Tween 20 (v/v)
- Anticòs primari anti Complex I (anti NDUFA9, Invitrogen)
 - Solució de treball: 0,5 µg/mL (estoc comercial a 1 µg/µL) en solució de bloqueig.
Guardar a 4°C. Es pot reutilitzar varies vegades.
- Anticòs primari anti Complex II (anti Subunitat de 70 kDa, Invitrogen)
 - Solució de treball: 0,1 µg/mL (estoc comercial a 0,5 µg/µL) en solució de bloqueig.
Guardar a 4°C. Es pot reutilitzar varies vegades.
- Anticòs primari anti Complex III (anti Subunitat Core 2, Invitrogen)
 - Solució de treball: 0,4 µg/mL (estoc comercial a 1 µg/µL) en solució de bloqueig.
Guardar a 4°C. Es pot reutilitzar varies vegades.

- Anticòs primari anti Complex III (anti Rieske UQCRFS1[5A5], Abcam)
 - Solució de treball: 1 µg/mL (estoc comercial a 1 µg/µL) en solució de bloqueig.
Guardar a 4°C. Es pot reutilitzar varies vegades.
- Anticòs primari anti Complex IV (anti Subunitat Va, MitoScience)
 - Solució de treball: 1 µg/mL (estoc comercial a 1 µg/µL) en solució de bloqueig.
Guardar a 4°C. Es pot reutilitzar varies vegades.
- Anticòs primari anti Complex V (anti ATP5A [15H4C4], MitoScience)
 - Solució de treball: 1 µg/mL (estoc comercial a 1 µg/µL) en solució de bloqueig.
Guardar a 4°C. Es pot reutilitzar varies vegades.
- Solució anticòs secundari GAM (*goat anti mouse*) marcat amb peroxidasa de rave (OPTI-4CN Anti Mouse detection kit, BioRad)
 - Dilució de treball: 1:2500 en solució de bloqueig.

Procediment

- Un cop el gel en gradient ha corregut, separar el gel stacking del gel en gradient.
- Tallar un tros de membrana de nitrocel·lulosa de la mateixa mida que el gel.
- Activar la membrana submergint-la en metanol durant uns segons. Seguidament, submergir-la en tampó de transferència.
- Tallar 4 papers Whatman i submergir-los en tampó de transferència.
- Muntar el *sandwich* de transferència seguint el següent ordre: part negra del *cassette* - esponja xopa de tampó de transferència - dos papers Watman - membrana de nitrocel·lulosa - gel en gradient - dos papers Watman - esponja - part blanca del *cassette*. Les proteïnes tenen càrrega negativa de manera que es desplaçaran del pol negatiu al positiu. Per això, és important col·locar el gel a la banda del pol negatiu i la membrana, a la del pol positiu.
- Fer la transferència a 4°C a 35V durant tota la nit.
- Un cop finalitzada la transferència, bloquejar la membrana amb solució de bloqueig durant 1 hora i amb agitació.

Material i Mètodes

- Eliminar l'excés de solució bloquejadora rentant la membrana 3 cops amb solució de rentat durant 15, 5 i 5 min.
- Incubar la membrana amb l'anticòs corresponent durant 1 hora a temperatura ambient i amb agitació.
- Eliminar l'excés d'anticòs primari rentant la membrana 3 cops amb solució de rentat durant 15, 5 i 5 min.
- Incubar la membrana amb anticòs secundari durant 1 hora a temperatura ambient i amb agitació.
- Eliminar l'excés d'anticòs secundari rentant la membrana 3 cops amb solució de rentat durant 15, 5 i 5 min.
- Revelar per color amb el kit de detecció OPTI-4CN de BioRad seguint les indicacions del fabricant. Aturar la reacció submergint la membrana en aigua destil·lada.

3.9 EXTRACCIÓ D'ADN

Mostra

Tipus: Sang entera, fibroblasts

Material i instrumentació auxiliar

- Centrifuga
- NanoDrop Spectrophotometer ND-1000

Reactius

- Kit d'extracció de DNA Puregene TM (Gentra Systems), que conté:
 - *RBC Lysis Solution*
 - *Cell Lysis Solution*
 - *Protein Precipitation Solution*
 - *DNA Hydration Solution*
- Etanol
- Isopropanol
- SDS 10% (p/v)

Procediment (segons les instruccions del fabricant)

Lisis cel·lular:

- Afegir 1 mL de **SANG** total en un tub estèril de 15 mL que contingui 3 mL de RBC Lysis Solution. Barrejar per inversió i incubar 10 minuts a temperatura ambient (RT). Tornar a invertir el tub, almenys un cop, durant la incubació.
- Centrifugar a 2000 x g 10 minuts. Treure el sobrenedant amb una pipeta estèril deixant al *pellet* uns 100-200 µL de líquid residual.
- El procediment comença en aquest punt quan l'extracció d'ADN es fa a partir de **FIBROBLASTS**. Afegir 100-200 µL de RBC Lysis Solution al pellet de fibroblasts.
- Vortejar el tub vigorosament per tal de resuspendre les cèl·lules en el líquid residual.

- Afegir 1 mL de Cell Lysis Solution i lisar les cèl·lules pipetejant repetidament amb una pipeta estèril. Si costa que es doni la lisi, incubar a 37°C fins a obtenir una solució homogènia. Deixar temperar les mostres a RT.

Precipitació de proteïnes

- Afegir 333 µL de Protein Precipitation Solution al lisat cel·lular.
- Vortejar vigorosament almenys durant 20 segons per tal que la barreja quedi homogènia.
- Centrifugar a 2000 x g 10 minuts. El precipitat de proteïna formarà un pellet consistent i de color marró fosc. Si el precipitat no es veu prou consistent, tornar a repetir el pas anterior, incubar durant 5 minuts en gel i tornar a centrifugar.

Precipitació de l'ADN

- Recollir el sobrenedant amb una pipeta estèril i passar-lo a un tub de 15 mL estèril que contingui 1 mL d'isopropanol 100%.
- Barrejar per inversió (unes 50 vegades) fins que s'observi un precipitat blanc (medusa), corresponent a l'ADN.
- Centrifugar a 2000 x g 3 minuts per precipitar l'ADN (*pellet* petit i blanc).
- Descartar el sobrenedant per decantació i assecar el tub amb paper absorbent deixant-lo breument boca avall.
- Afegir 1 mL d'etanol 70% i invertir el tub varies vegades per tal de netejar bé el *pellet* d'ADN.
- Centrifugar a 2000 x g 1 minut. Decantar el sobrenedant amb compte de no perdre el *pellet*.
- Invertir el tub i assecar completament durant 15 minuts a RT.

Hidratació de l'ADN

- Afegir 50-100 µL de *DNA Hydration Solution* al tub.
- Deixar que es dissolgui l'ADN incubant tota la nit a 37°C. Quantificar amb el NanoDrop.

3.10 EXTRACCIÓ DE ARN I OBTENCIÓ DE cADN

Mostra

Tipus: cultiu fresc de fibroblasts.

Material i instrumentació auxiliar

- Centrifuga
- Campana de flux laminar
- NanoDrop Spectrophotometer ND-1000

Reactius

- Kit d'extracció RNA QIAshredder i RNeasy (Qiagen):
 - RLT Buffer
 - RW1 Buffer
 - RPE Buffer
 - H₂O RNase free
 - Columnes *QIAshredder* i *RNeasy mini spin*
- B-mercaptoetanol (BioRad)
- Solució d'extracció de RNA:
 - RLT solution amb un 1% de β -mercaptoetanol.
- Etanol 100%
- Oligo dT 15 Primer (500 μ g/mL) (Promega)
- MMLV Transcriptasa reversa, RNase H Minus, Point Mutant (Promega)
- Tampó de transcriptasa reversa (M-MLV RT Buffer) (Promega)
- Mix de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Promega)
 - En un tub eppendorf, barrejar 20 μ L de cadascun dels dNTPs (estoc comercial a 100 mM) en 120 μ L d'aigua estèril. Guardar a -18 ± 5 °C.
- Aigua estèril

Procediment (segons les instruccions del fabricant)

Extracció de ARN

Treballar sota la campana de flux laminar, per evitar contaminacions.

- Descartar el medi de cultiu del pellet de fibroblasts frescos.

- Afegir 350 µL de solució d'extracció de RNA al pellet de fibros, barrejar amb una pipeta estèril i passar-ho tot a una columna *QIAshredder* amb tub col·lector.
- Centrifugar a 16000 x g 2 minuts. El filtrat que s'obté és estable a -80°C.
- Afegir el mateix volum d'etanol 100% (350µL) al filtrat, barrejar amb una pipeta estèril i traspasar tot el contingut a la columna *RNeasy mini spin* amb tub col·lector.
- Centrifugar a 16000 x g 15 segons. Descartar el filtrat.
- Afegir 700 µL de RW1 Buffer a la columna i centrifugar a 16000 x g 15 segons.
- Canviar el tub col·lector, afegir 500 µL de solució RPE i centrifugar a 16000 x g 15 segons. Descartar el líquid del tub col·lector.
- Tornar a afegir 500 µL de la solució RPE i centrifugar a 16000 x g 2 minuts. Descartar el líquid del tub col·lector.
- Centrifugar durant 1 minut més a 16000 x g per assecar la columna.
- Canviar el tub col·lector per un eppendorf estèril. Afegir entre 30-50 µL d'aigua RNase free directament sobre el filtre de la columna i deixar rehidratar durant 1 minut.
- Centrifugar a 16000 x g 1 minut. El filtrat que s'obté és l'ARN.
- Guardar a -80°C.

Síntesis de cADN

Es realitza a partir de l'ARN extret a partir dels fibroblasts cultivats.

- En un tub eppendorf estèril barrejar:
 - 13 µL d'aigua RNase free
 - 1 µL d'Oligo dT
 - 1 µL de ARN
- Incubar a 70°C durant 5 minuts i seguidament clavar el tub en gel durant 5 minuts més. Aquest pas serveix per eliminar les estructures secundàries que hagi pogut adquirir l'ARN.

- A la barreja anterior, afegir:
 - 5µL tampó de transcriptasa reversa
 - 1 µL de dNTPs 20 µM
 - 3 µL RNase free
 - 1 µL RNase free
 - 1 µL MMLV transcriptasa reversa

- Amb aquesta barreja, realitzar un programa de PCR que consisteix en 1 cicle a 42°C durant 1 hora i tot seguit 10 minuts a 70°C per inactivar la reacció.
- El producte que s'obté és cADN. Quantificar amb el NanoDrop.

3.11 CERCA DE MUTACIONS EN cADN i ADN DE GENS IMPLICATS EN LA VÍA DE SÍNTESI DE CoQ₁₀

Mostra

Tipus: cADN i ADN.

Material i instrumentació auxiliar

- Termociclador
- Centrífuga de eppendorf
- Cubeta d'electroforesi
- AlphaImager®HP (Apha Innotech)

Reactius

- Taq polimerasa (Roche)
- Tampó per la Taq polimerasa sense MgCl₂ (Roche)
- Clorur de magnesi (MgCl₂) per la Taq polimerasa (Roche)
- Mix de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Promega)
 - En un tub eppendorf, barrejar 20 µL de cadascun dels dNTPs (estoc comercial a 100 mM) en 120 µL d'aigua estèril. Guardar a -18±5 °C.
- DMSO
- Encebadors directe i revers per cADN (dissenyats utilitzant el programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>)) a concentració final de treball 25 µM:

Gen	Fragment	Encebador directe (D) (5'-3')	Encebador revers (R) (5'-3')
CABC1	F1	GAGGCGGCTAGAAGGTGAC	GAAAGCCCATGGCAGAGAAT
	F2	GGCCAGTGGACCCTTTAGA	CGCTCCTCGAAGTATTCCAA
	F3	GCCACTGAAGCAGATGATGA	CACAGTCTCCCTGTCCCTGT
	F4	CAGATCCTTCACCGACCTCT	AGCAACAGAAACCGTGGAAA
PDSS1	F1A	GCCGCGACTTTCAGACTC	GACCTTTC AAGTCTCTCCAACC
	F1B	CATCACACAACCCAGACAG	CTCCAGCAAGAACAGCCTTC
	F1C	ATGGCCTCGCGCTGGTGG	TCATTTATCTCTTGTGAG
	F2	TTGCAGAAATGATCCCACTG	CGTCGCATGATCATAGCATT
	F3	GATCTGAAGCTCGGGTTACG	AAATTGCCCATCAATAAGTTTG

Gen	Fragment	Encebador directe (D) (5'-3')	Encebador revers (R) (5'-3')
PDSS2	F1	AAGAATTGCCGCTTCCTTTT	GCTAAAAGTTCCACAACCTTG G
	F2	TGGTCCACTGAAAGACATGC	GCTCCCAATCAACCTCATTC
COQ4	F1	TCCGTCGCCTGACAGAAT	GTGGGTGCTCGGGTGTCT
	F2	GACATCCACCCTCGACCTG	TGTCCAAGGGTCAGTGTCA

- Encebadors directe i revers per ADN (dissenyats utilitzant el programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>)) a una concentració final de treball 25µM:

Gen	Exó	Encebador directe (5'-3')	Encebador revers (5'-3')
PDSS1	1	CAAGCGAGGAAGAGCGAAC	AGCTACCCCGGAGCTACCC
	9-10	GACTGGAAATGCGGTTTTGT	TTATGCAATCTTCCCATCAGC
	11	GGCATAGACGGTGGATGTCT	CACATCAAGAGTTGACCAAACAG
	12	CTCAGTCATCTGATCTCAAAC	CCATTCTCCTATATGAAATTTGG

- Tampó de càrrega (LB): 20 % Ficoll en pols, 0,1% SDS, 1 mM EDTA, 0,05% xilencianol, 0,05% bromofenol
 - Per un volum final de 50 mL, pesar 10 g de Ficoll, 0,05 g de SDS, 0,025 g de xilencianol i 0,025 g de bromofenol. Dissoldre amb aigua destil·lada i afegir 100 µL de EDTA.
- Agarosa D1 Low EEO
- Marcador de pes molecular
 - 15 µL de marcador ZR DNA Molecular Weigh Markers TM ZR 50bp 0,5 mg/mL, 50 µL de LB i 185 µL d'aigua destil·lada.
- Bromur d'etidi 1 mg/L
 - Dissoldre 100 µL de bromu d'etidi 10 mg/mL en 1 L d'aigua destil·lada.

Procediment

Preparació de la reacció de PCR

Gen	Fragment	ADN (μL)	dNTPs (μL)	Encebador D+R (μL)	Buffer 10X (μL)	Mg ²⁺ (μL)	DMSO (μL)	Taq (μL)	H ₂ O (μL)	Programa PCR
CABC1	F1	1	1	1+1	5	3	5	0,2	32,8	NPC18C
	F2	1	1	1+1	5	3,5	5	0,2	32,3	NPC18C
	F3	1	1	1+1	5	3	5	0,2	32,8	NPC18C
	F4	1	1	1+1	5	3	5	0,2	32,8	NPC18C
PDSS1	F1	1	1	1+1	5	2	5	0,2	33,3	NPC18C
	F2	1	1	1+1	5	3	-	0,2	37,8	NPC18C
	F3	1	1	1+1	5	3,5	-	0,2	37,3	NPC18C
PDSS2	F1	1	1	1+1	5	3	5	0,2	32,8	NPC18C
	F2	1	1	1+1	5	3,5	5	0,2	32,3	NPC18C
COQ4	F1	1	1	1+1	5	3,5	5	0,2	32,3	NPC18C
	F2	1	1	1+1	5	3,5	5	0,2	32,3	NPC18C

El programa d'amplificació utilitzat consta de les següents etapes:

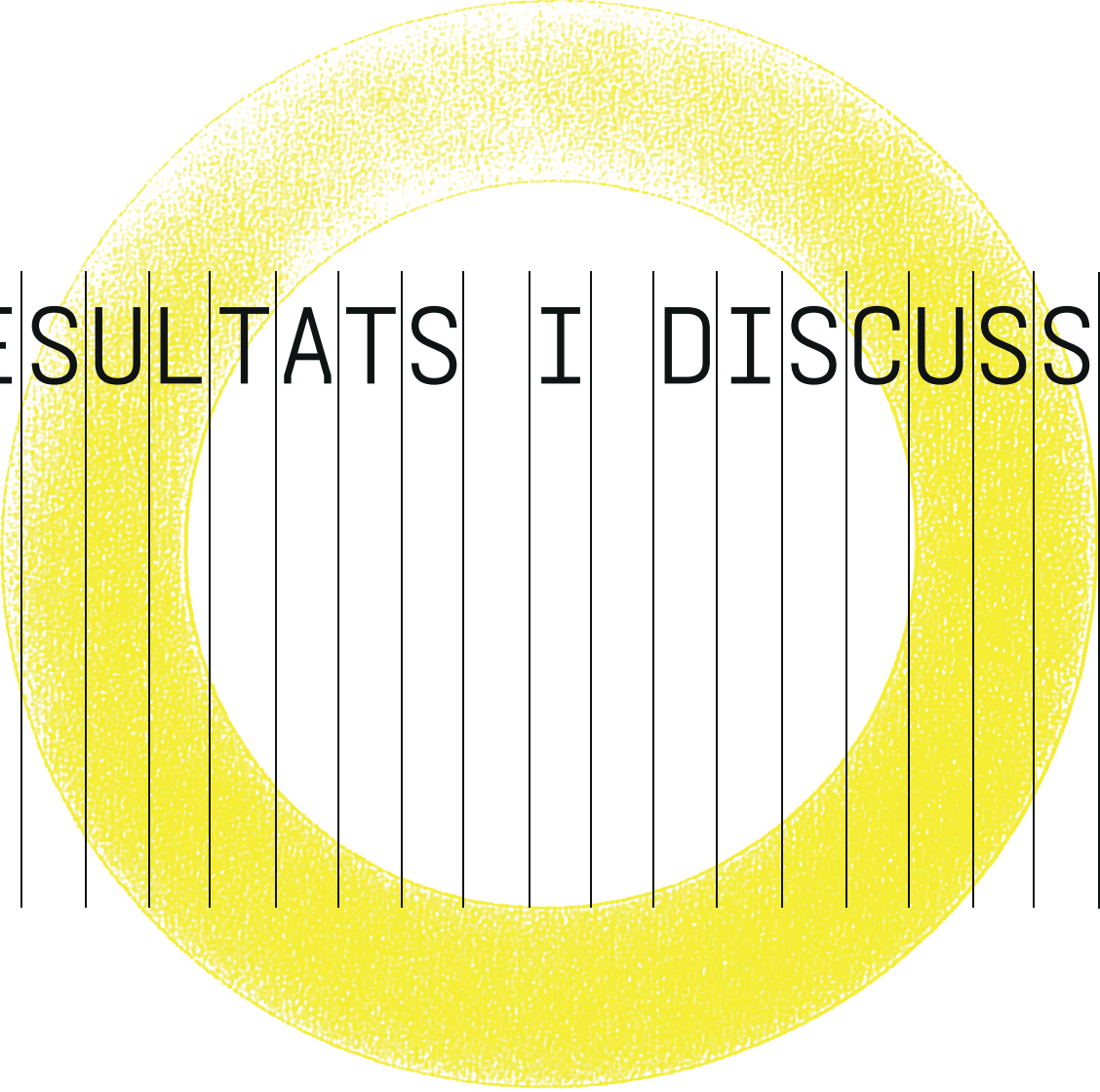
Programa NPC18C	
1) 5 minuts a 94°C	} x 32 cicles
2) 45 segons a 94°C	
3) 1 minut a 58°C	
4) 1 minuts a 72°C	
5) 5 minuts 72°C	
6) 15°C	

Comprovació de la PCR

- Un cop realitzada la PCR, comprovar que s'ha amplificat correctament carregant 5 μL de producte de PCR barrejat amb 3 μL de tampó de càrrega (LB) en un gel d'agarosa al 2%.
- Córrer la electroforesi a 100V.
- La observació de les bandes s'aconsegueix incubant el gel en una solució de bromur d'etidi (intercalador de bases) durant 10-15 minuts i exposant a llum UV amb l'equip AlphaImager.

Seqüenciació

- Els productes de PCR són enviats a MacroGen® per tal de seqüenciar-los.



RESULTATS I DISCUSSIÓ

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1 Implementació d'una nova tècnica per a l'estudi espectrofotomètric de l'activitat dels enzims que formen la cadena respiratòria mitocondrial (CRM).

El diagnòstic de les malalties mitocondrials implica estudis metabòlics, morfològics i bioquímics, entre els quals hi ha l'estudi de les activitats enzimàtiques dels complexos que formen la CRM, que permet identificar alteracions del metabolisme energètic, entre elles les deficiències de CoQ₁₀.

Les activitats dels enzims dels complexos que formen la CRM (complex I-IV) es determinen espectrofotomètricament. Tot i que és una mesura *in vitro*, aporta informació crucial sobre el funcionament catalític d'aquests enzims. En aquests estudis, però, no s'inclou el complex V donada la poca fiabilitat dels resultats obtinguts a partir de teixit muscular congelat o cèl·lules cultivades. Per a aquest complex, existeixen altres mètodes de mesura, com per exemple la tècnica del Blue-Native, que més endavant es descriurà amb detall.

L'estudi es porta a terme a partir d'homogenat de biòpsia de teixit muscular congelat (-80±5°C) o a partir d'homogenat de fibroblasts cultivats procedents de biòpsia de pell. També podrien utilitzar-se homogenats de mitocondris aïllats a partir de teixit muscular fresc o cervell, i plaquetes (*Angelini 1986*), entre d'altres, tot i que no sempre les deficiències en teixit muscular poden detectar-se en altres tipus de teixit (*Janssen 2003*). Un dels avantatges d'utilitzar teixit muscular congelat és que, a part de facilitar el transport des del centre d'extracció al de diagnòstic, el procés de congelació trenca les membranes mitocondrials, fent més accessibles els enzims de la CRM (*Spinazzi 2012*). L'estudi de la CRM ha de ser prou sensible i precís per tal de detectar defectes parcials de funció. A més, ha de permetre realitzar l'estudi a partir de petites quantitats de teixit, especialment en casos pediàtrics (*Spinazzi 2011*).

4.1.1 Estudi espectrofotomètric de l'activitat dels enzims de CRM en teixit muscular

L'etapa inicial d'aquest treball es va centrar en la determinació de les activitats dels enzims que formen la cadena respiratòria mitocondrial a partir de biòpsies de teixit muscular. L'objectiu era seleccionar possibles deficiències de CoQ₁₀. Es varen analitzar

un total de 223 biòpsies musculars, la majoria de pacients pediàtrics, amb sospita de malaltia mitocondrial i/o deficiència de CoQ₁₀. L'estudi de CRM d'aquestes mostres va donar lloc a 79 resultats normals (35,4%), 8 defectes de piruvat deshidrogenasa (PDH) (3,6%), 6 defectes de complex I (2,7%), 2 defectes de complex II (0,9%), 10 defectes de complex III (4,5%), 3 defectes de complex IV (1,3%), 3 defectes de CV (1,3%), 15 defectes combinats (6,7%), 51 defectes múltiples (22,9%) i 11 casos amb un patró suggestiu de defecte de CoQ₁₀ (defecte de l'activitat I+III i II+III) (4,9%). En 22 casos es va arribar a un diagnòstic genètic definitiu. Tot i això, en un 15,8% dels pacients, els resultats no varen ser concloents.

Compartint informació amb altres centres de diagnòstic espanyols es va veure que els protocols que s'utilitzaven per a l'estudi bioquímic de la cadena respiratòria mitocondrial eren molt variats i amb rangs de normalitat molt dispars, fet que impedia la comparació dels resultats obtinguts entre diferents centres. La falta d'uniformitat metodològica porta a importants divergències en els resultats, fet demostrat en un estudi multicèntric on es van comparar els resultats de l'estudi dels enzims de la cadena respiratòria realitzat per diversos centres a partir d'un mateix homogenat de teixit muscular (*Gellerich 2004*).

Per tal de minimitzar aquestes divergències varem iniciar el treball que es descriu a continuació, amb l'objectiu d'optimitzar i unificar els mètodes bioquímics d'estudi enzimàtic de la CRM i on han participat 7 centres de diagnòstic espanyols que pertanyen al *CIBER de Enfermedades Raras* (CIBERER): Hospital Vall d'Hebron de Barcelona (HVd'H), Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Hospital 12 de Octubre de Madrid (H12O), Universidad Pablo de Olavide de Sevilla (UPO), Universidad de Zaragoza (UZ), Departament de Medicina Interna de l'Hospital Clínic de Barcelona (HCL) i Secció d'Errors Congènits del Metabolisme del Departament de Bioquímica i Genètica Molecular de l'Hospital Clínic de Barcelona (IBC).

Aquesta iniciativa d'optimització ja l'han portat a terme altres centres (*Medja 2009; Spinazzi 2011*), amb el mateix objectiu. Aprofitant l'experiència de *Medja i col.*, aquest treball s'ha basat en els protocols publicats per ells l'any 2009 i que varen sorgir de la mateixa iniciativa empresa per tots els laboratoris francesos implicats en el diagnòstic genètic i bioquímic de malalties mitocondrials humanes amb l'objectiu final d'unificar els seus mètodes. El treball de *Medja (2009)*, igual que el treball publicat per *Spinazzi i*

col. (2011), va consistir en la determinació de les condicions òptimes d'estudi per a cadascun dels enzims que formen la CRM.

Aquesta iniciativa ha portat a implementar a la Secció d'Errors Congènits del Metabolisme de l'Hospital Clínic una nova metodologia per a l'estudi dels enzims que formen part de la cadena respiratòria mitocondrial. La connexió amb els altres 6 centres de diagnòstic ha permès posar en comú problemes i discutir solucions, amb el fi d'unificar la metodologia en aquest camp.

L'activitat enzimàtica dels complexos que formen part de la CRM es determina mitjançant tècniques espectrofotomètriques que permeten analitzar l'activitat dels complexos individualment o combinats amb altres complexos, com ara el complex I+III (NADH:citocrom c reductasa) i el complex II+III (succinat:citocrom c reductasa). Per a una millor interpretació dels resultats, els valors d'activitat obtinguts es normalitzen en funció de l'activitat citrat sintasa, un enzim utilitzat com a indicador de la quantitat de mitocondris presents en la mostra d'estudi, permetent, així, corregir l'activitat enzimàtica en funció del grau de proliferació mitocondrial (*Reisch 2007*) o de la recuperació de mitocondris en el procés d'homogeneïtzació del teixit estudiat.

Per tal de dur a terme aquest procés d'unificació de manera estructurada, es varen definir 4 etapes principals:

- **Etapa I:** definició de la metodologia per a l'assaig de les activitats enzimàtiques i elecció dels reactius necessaris per a dur-les a terme.
- **Etapa II:** posta a punt i familiarització amb la tècnica utilitzant teixit muscular procedent de rata.
- **Etapa III:** aplicació de la metodologia a músculs control humans
- **Etapa IV:** estudis de variabilitat (interserie i intraserie) i establiment d'un rang control propi.

A continuació es detallen cadascuna de les etapes i els entrebancs que varen anar sorgint, així com les accions que es varen prendre per tal de solucionar-los.

► ***Etapa I: definició de la metodologia***

Tal i com s'ha comentat anteriorment, aquest projecte es basa en el treball publicat per *Medja i col. (2009)*, de manera que s'han seguit els seus protocols publicats fruit d'un

extens treball per tal de determinar les millors condicions d'estudi per a cadascun dels complexos enzimàtics que formen la CRM.

La primera acció que es va dur a terme per a la unificació metodològica va ser estandarditzar la procedència comercial i les referències de tots els reactius necessaris, de manera que tots els grups utilitzessin els mateixos. En el cas de reactius no referenciats, ens varem posar d'acord per tal d'utilitzar els mateixos. A partir d'aquí, i seguint el treball dels investigadors francesos, es varen preparar tots els tampons i reactius necessaris per al procés d'homogeneïtzació del teixit i el posterior estudi de les activitats enzimàtiques.

Les activitats enzimàtiques s'analitzen individualment per cada complex o conjunt de complexos i s'expressen tant en funció de la quantitat de proteïna (nmol/min·mg prot), com també del contingut mitocondrial de la mostra (U/UCS). Per altra banda, també s'estudia la relació entre complexos.

Cal comentar que en el nostre grup, a diferència de la resta de centres, es va reduir el volum final de treball de 1 mL a 500 µL, permetent així la utilització de la meitat d'homogenat necessari per dur a terme l'estudi. És important tenir en compte que aquests protocols s'aplicaran en el diagnòstic de pacients de manera rutinària i, considerant que la majoria de mostres són pediàtriques, han de permetre la utilització de la menor quantitat de mostra possible.

► ***Etapa II: posta a punt i familiarització a partir de teixit muscular de rata***

L'objectiu principal d'aquesta etapa era la posta a punt i la familiarització amb la nova metodologia i, per fer-ho, es va utilitzar teixit muscular de rata, ja que era fàcil d'obtenir i en abundància.

Aquesta etapa només la varem dur a terme 5 dels 7 grups participants en la iniciativa: HVd'H, HCL, UAM, H12O i IBC.

El grup de l'Hospital Vall d'Hebron (HVd'H) va preparar i posteriorment distribuir un pool d'homogenat de múscul de rata (Pool rata) als diversos centres participants, els quals el varen diluir amb tampó manitol pH 7,2 a raó de 1 mg/mL. Tot i que en els protocols de *Medja i col.* els homogenats humans s'ajustaven a 2 mg/mL de proteïna, els homogenats de teixit muscular de rata es varen ajustar a 1 mg/mL, ja que aquest teixit és enzimàticament més actiu que l'humà.

Primer de tot, es varen dur a terme estudis de linealitat per a cadascuna de les activitats enzimàtiques. Els resultats d'aquests estudis no s'han inclòs, ja que formen part de la memòria presentada per a la obtenció del títol de Màster de Biotecnologia Molecular de la Universitat de Barcelona. Bàsicament, es posava de manifest que, excepte el complex IV, totes les activitats enzimàtiques estudiades presentaven una cinètica molt lineal fins i tot a elevades quantitats de proteïna. Es va concloure que per a l'estudi amb homogenats de múscul humans es treballaria amb la quantitat de proteïna descrita pels investigadors francesos (2 mg/mL), ja que en aquest punt les cinètiques eren lineals per a tots els complexos estudiats.

Els resultats d'activitat obtinguts a partir d'homogenat de múscul de rata en aquesta etapa de familiarització, es mostren a la Taula 1. No es mostren valors de referència ja que no es disposava de valors control per a aquest tipus de teixit. No es va poder estudiar l'activitat del complex III perquè, tot i seguir les instruccions dels investigadors francesos, no es va aconseguir reduir correctament la decilubiquinona per tal d'obtenir decilubiquinol.

A partir dels valors d'activitat obtinguts a cadascun dels centres participants, es va calcular la mitjana, la desviació estàndard (SD) i el coeficient de variació (CV), eliminant els valors que més extrems (Taula 1-B).

Per al conjunt global de resultats i considerant com a acceptable un valor de %CV entre el 10 i el 15%, es va veure que, exceptuant el complex II i el complex I+III, no hi havia gaire variabilitat en els resultats (%CV <15%). Per tant, ens acostàvem a l'objectiu desitjat que era obtenir resultats d'activitat que fossin comparables entre grups. Per altra banda, l'elevada variabilitat observada pel complex I+III segurament es podria associar al baix nombre de valors utilitzats pels càlculs (n=2).

Per tant, aquesta etapa va permetre :

- Familiaritzar els diversos grups participants amb la nova metodologia utilitzant teixit muscular de rata, que és de fàcil obtenció.
- Confirmar que la concentració de proteïna adequada pels homogenats de teixit muscular humà, tal i com havien publicat (*Medja 2009*) era de 2 mg/mL i de 1 mg/mL, per a múscul de rata.
- Obtenir uns valors d'activitat enzimàtica acceptables i comparables entre grups, ja que el % CV estava al voltant del 15%.

A

Activitats enzimàtiques (nmol/min/mg prot)		Pool rata
Complex I		102
Complex II		99
Complex IV		659
Complex I+III		31
Complex II+III		78
CS		436
RELACIONS	I/II	1,03
	I/CS	0,23
	II/CS	0,23
	IV/I	6,46
	IV/II	6,66
	IV/CS	1,51
	I+III/CS	0,07
	II+III/II	1,27
	II+III/CS	0,18

B

Activitats enzimàtiques (nmol/min/mg prot)		Pool rata	
Complex I	mitjana	137 (n=3)	
	SD	17,6	
	CV (%)	12,8	
Complex II	mitjana	88 (n=4)	
	SD	15,1	
	CV (%)	17,3	
Complex IV	mitjana	509 (n=4)	
	SD	75,0	
	CV (%)	14,7	
Complex I+III	mitjana	25 (n=2)	
	SD	9,2	
	CV (%)	37,5	
Complex II+III	mitjana	71 (n=3)	
	SD	7,0	
	CV (%)	9,9	
CS	mitjana	299 (n=3)	
	SD	25,2	
	CV (%)	8,4	
RELACIONS	I/CS	mitjana	0,52 (n=4)
		SD	0,07
		CV (%)	13,9
	II/CS	mitjana	0,30 (n=4)
		SD	0,06
		CV (%)	31,8
	IV/CS	mitjana	1,63 (n=4)
		SD	0,15
		CV (%)	9,24
	I+III/CS	mitjana	0,05 (n=3)
		SD	0,04
		CV (%)	75,8
	II+III/CS	mitjana	0,21 (n=4)
		SD	0,04
		CV (%)	20,5

Taula 1. Resultats d'activitat dels enzims de cadena respiratòria mitocondrial obtinguts a partir del pool d'homogenat de múscul de rata (*Pool rata*). **A)** Resultats obtinguts al nostre centre (IBC). **B)** Resultats globals de tots els centres participants (HVd'H, HCL, UAM, H12O i IBC).

► Etapa III: aplicació de la metodologia a mostres de múscul control humanes

Després de l'estandardització, es va procedir a treballar amb teixit muscular humà (CH1, CH2, CH3, CH4, CH5, CH6, CH7, CH8, CH10, CH12, CH15 i CH16). Les mostres procedien de pacients que no presentaven signes de malaltia mitocondrial. Totes les mostres es varen extreure a l'Hospital Clínic de Barcelona sota consentiment informat del pacient i varen ser homogeneïtzades per l'HVd'H seguint el protocol establert. A partir de la quantificació proteica realitzada al mateix HVd'H, cada centre va ajustar els homogenats a 2 mg/mL de proteïna i va procedir a l'estudi enzimàtic dels complexos de la CRM. A més a més, en cada assaig, paral·lelament a l'estudi dels músculs humans, es va incloure homogenat de múscul de rata (Pool rata) com a control intern de la tècnica.

Els resultats que es varen obtenir per a aquestes mostres control humanes quedaven fóra del rang de referència dels investigadors francesos tot i que no se n'allunyaven gaire (Taula 2), sobretot quan es referien a citrat sintasa.

Per altra banda, els % CV entre els diferents grups (majoritàriament superiors al 15%) indicaven una gran heterogeneïtat en els resultats (dades no incloses). Donat que la homogeneïtzació del teixit l'havia dut a terme un sol centre i que l'assaig d'activitat s'havia realitzat a partir dels mateixos homogenats, es descartava que aquesta heterogeneïtat observada entre els diferents grups fos causada pel procés d'homogeneïtzació. Tot i això, que les activitats fossin inferiors a les desitjades, si que podia associar-se al procés d'homogeneïtzació del teixit ja que, una menor recuperació en el nombre de mitocondris explicaria unes activitats enzimàtiques més baixes que es corregirien al referir-les a l'enzim marcador mitocondrial citrat sintasa. S'ha vist que la velocitat de rotació (rpm) de l'èmbol d'homogeneïtzació i el nombre de cops té un impacte directe sobre les activitats enzimàtiques dels enzims que formen la CRM (*Spinazzi 2011*). Per tant, per obtenir activitats enzimàtiques òptimes i resultats que siguin comparables entre grups, calia estandarditzar acuradament el procés d'homogeneïtzació del teixit.

Activitats enzimàtiques (nmol/min/mg prot)	Pool rata	CH1	CH2	CH3	CH4	CH5	CH6	CH7	CH8	CH10	CH12	CH15	CH16	valors control grup francès*	
Complex I	136	21	22	15	30	25	70	8	22	17	56	39	19	27-35	
Complex II	133	21	22	30	53	33	61	14	27	16	45	42	31	42-60	
Complex IV	879	165	170	153	243	175	412	95	114	130	255	199	152	130-195	
Complex I+III	43	0	6	0	5	8	22	5	9	5	18	13	10	16-48	
Complex II+III	104	32	29	44	63	43	64	22	33	19	57	42	31	33-65	
CS	518	106	108	150	197	139	412	121	162	137	211	263	132	146-294	
RELACIONS	I/II	1,02	1,00	1,00	0,50	0,57	1,15	0,57	0,81	1,06	1,24	0,93	0,61	0,61	0,58-0,82
	I/CS	0,23	0,20	0,20	0,10	0,15	0,17	0,07	0,14	0,12	0,27	0,15	0,14	0,14	0,18-0,28
	II/CS	0,23	0,20	0,20	0,20	0,27	0,15	0,12	0,17	0,12	0,21	0,16	0,23	0,23	0,23-0,35
	IV/I	6,46	7,86	7,73	10,20	8,10	5,89	11,88	5,18	7,65	4,55	5,10	8,00	8,00	3,2-5,6
	IV/II	6,61	7,86	7,73	5,10	4,58	6,75	6,79	4,22	8,13	5,67	4,74	4,90	4,90	2,5-3,5
	IV/CS	1,51	1,56	1,57	1,02	1,23	1,00	0,79	0,70	0,95	1,21	0,76	1,15	1,15	0,7-1,0
	I+III/CS	0,07	0,00	0,06	0,00	0,03	0,05	0,04	0,06	0,04	0,09	0,05	0,08	0,08	no consta
	II+III/II	1,28	0,66	0,76	0,68	0,84	0,95	0,64	0,82	0,84	0,79	1,00	1,00	1,00	0,65-0,95
	II+III/CS	0,18	0,30	0,27	0,29	0,32	0,16	0,18	0,20	0,14	0,27	0,16	0,23	0,23	0,17-0,29

Taula 2. Resultats d'activitat obtingudes al nostre centre de diagnòstic (IBC) per les mostres d'homogenat de teixit muscular humà (CH1-CH8, CH10, CH12, CH15 i CH16) i de rata (Pool rata). *Rang control cedit per el Departament de Bioquímica Metabòlica del *Centre de Génétique Moléculaire et Chromosomique* del Grup Hospitalari Pitié Salpêtrière.

En la segona part d'aquesta etapa cada centre, individualment, va homogeneïtzar dues biòpsies musculars humanes (CH11 i CH13). Aquest punt permetria veure com el procés d'homogeneïtzació influïa en les activitats enzimàtiques finals.

Les activitats obtingudes al nostre centre per a aquests dos músculs (Taula 3) seguien la mateixa tendència que els homogenats estudiats anteriorment: eren inferiors als valors control francesos, millorant quan es referien a citrat sintasa.

Activitats enzimàtiques (nmol/min/mg prot)		CH11	CH13	valors control grup francès*
Complex I		21	12	27-35
Complex II		39	28	42-60
Complex IV		185	135	130-195
Complex I+III		7	5	16-48
Complex II+III		39	28	33-65
CS		119	146	146-294
RELACIONS	I/II	0,54	0,43	0,58-0,82
	I/CS	0,18	0,08	0,18-0,28
	II/CS	0,33	0,19	0,23-0,35
	IV/I	8,81	11,25	3,2-5,6
	IV/II	4,74	4,82	2,5-3,5
	IV/CS	1,55	0,92	0,7-1,0
	I+III/CS	0,06	0,03	no consta
	II+III/II	1,00	1,00	0,65-0,95
	II+III/CS	0,33	0,19	0,17-0,29

Taula 3. Resultats d'activitat obtinguts al nostre centre de diagnòstic per les mostres CH11 i CH13. *Rang control cedit per el Departament de Bioquímica Metabòlica del *Centre de Génétique Moléculaire et Chromosomique* del Grup Hospitalari Pitié Salpêtrière.

Les dificultats per a la obtenció de decilubiquinol necessari per l'estudi de l'activitat del complex III juntament amb que les activitats enzimàtiques que s'obtenien no s'ajustaven del tot al rang de referència esperat, va propiciar que ens poséssim en contacte amb la doctora Anne Lombès, del departament de Fisiopatologia cel·lular i molecular de malalties mitocondrials del *Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moëlle (CRICM)*, i la doctora Claude Jardel, del Departament de Bioquímica Metabòlica del *Centre de Génétique Moléculaire et Chromosomique* del Grup Hospitalari Pitié Salpêtrière, ambdues participants en la publicació utilitzada com a

referència per a la posta a punt del mètode. A partir d'aquí, va sorgir una estada als seus laboratoris per tal de veure *in situ* la metodologia que ells havien posat a punt.

Arrel de l'estada als laboratoris francesos, foren aplicats un seguit de canvis que varen millorar significativament l'estudi de les activitats enzimàtiques de la CRM:

- un mètode d'homogeneïtzació més eficient (mètode descrit a l'apartat de Materials i Mètodes).
- un nou mètode per a la quantificació del contingut proteic dels homogenats (quantificació basada en el Mètode de l'àcid bicinconinic; descrit a l'apartat de Material i Mètodes); aquest mètode no interfereix amb el tampó manitol (Taula de problemes/solucions).
- canvis en la metodologia de reducció de la decilubiquinona a decilubiquinol per a la determinació de l'activitat del complex III.
- correcta reducció del citocrom C (descriu en l'apartat de Materials i mètodes) per a l'assaig del complex IV. La optimització en l'addició del reductor (ditiotionita) és particularment important en el cas del complex IV, ja que excessives quantitats d'aquest substrat inhibirien l'activitat citocrom oxidasa (*Spinazzi 2011*).
- incorporació d'una nova rutina per a l'estudi de totes les activitats del complex de cadena respiratòria mitocondrial que implica que la homogeneïtzació, la quantificació de proteïna i l'estudi de totes les activitats enzimàtiques es portin a terme el mateix dia (no s'utilitza mai homogenat congelat) i estableix un ordre explícit per a l'assaig de les activitats en funció de l'estabilitat dels complexos: complex IV, complex III, complex I, complex II, complex I+III, complex II+III i citrat sintasa.

Aplicant aquests canvis metodològics, es va procedir a estudiar, de nou, les activitats d'alguns dels homogenats de múscul control humans (CH2, CH3, CH4, CH6, CH7) i de les dues biòpsies musculars control humanes (CH11 i CH13) utilitzades en etapes anteriors (Taula 4).

Gràcies a les millores introduïdes totes les activitats, tant dels homogenats (CH2-CH7) com de les biòpsies musculars (CH11 i CH13), s'ajustaven millor al rang control de referència establert pels investigadors francesos. Una de les raons principals que explicaria aquesta millora seria una homogeneïtzació del teixit més eficient que

permetria recuperar més quantitat de mitocondris i/o més complexos de la cadena respiratòria mitocondrial.

Activitats enzimàtiques (nmol/min/mg prot)	CH2	CH3	CH4	CH6	CH7	CH11	CH13	valors control grup francès*	
Complex I	26	49	102	43	70	31	44	27-35	
Complex II	33	44	86	48	56	46	56	42-60	
Complex III	117	140	166	124	126	159	192	110-185	
Complex IV	94	186	216	190	215	101	138	130-195	
Complex I+III	8	18	44	17	20	11	19	16-48	
Complex II+III	36	45	80	47	50	36	32	33-65	
CS	87	196	418	212	290	108	229	146-294	
RELACIONS	I/III	0,22	0,35	0,61	0,35	0,56	0,19	0,23	0,12-0,48
	I/II	0,79	1,11	1,19	0,90	1,25	0,67	0,79	0,58-0,82
	I/CS	0,30	0,25	0,24	0,20	0,24	0,29	0,19	0,18-0,28
	II/CS	0,38	0,22	0,21	0,23	0,19	0,43	0,24	0,23-0,35
	III/II+III	3,25	3,11	2,08	2,64	2,52	4,42	6,00	2,5-4,0
	III/II	3,55	3,18	1,93	2,58	2,25	3,46	3,43	1,8-3,8
	III/CS	1,34	0,71	0,40	0,58	0,43	1,47	0,84	0,5-1,0
	IV/I	3,62	3,80	2,12	4,42	3,07	3,26	3,41	3,2-5,6
	IV/III	0,80	1,33	1,30	1,53	1,71	0,64	0,72	0,7-1,7
	IV/II	2,85	4,23	2,51	3,96	3,84	2,20	2,46	2,5-3,5
	IV/CS	1,08	0,95	0,52	0,90	0,74	0,94	0,60	0,7-1,0
	I+III/CS	0,09	0,09	0,11	0,08	0,07	0,10	0,08	no consta
	II+III/II	1,09	1,02	0,93	0,98	0,89	0,78	0,57	0,65-0,95
II+III/CS	0,41	0,23	0,19	0,22	0,17	0,33	0,14	0,17-0,29	

Taula 4. Resultats obtinguts per les mostres d'homogats i teixit muscular estudiats en etapes anteriors aplicant les millores metodològiques. *Rang control cedit per el Departament de Bioquímica Metabòlica del Centre de Génétique Moléculaire et Chromosomique del Grup Hospitalari Pitié Salpêtrière.

Per tant, l'estada als laboratoris francesos va suposar un gran avanç i una millora considerable en l'estudi de les activitats enzimàtiques dels enzims de la CRM.

Al llarg d'aquesta etapa varen sorgir, també, altres dificultats metodològiques que es varen anar solucionant aplicant diverses mesures (Taula 5).

ETAPA III		
PUNT	PROBLEMES/DIFICULTATS	SOLUCIONS/EXPLICACIÓ
Homogenització de teixit amb vidre-vidre	Tan el grup francès com l'italià (<i>Medja 2009; Spinazzi 2011</i>) homogenitzen el teixit muscular amb un homogenitzador motoritzat amb vidre-vidre (tub-èmbol), ja que s'havia vist que era el mètode que permetia obtenir activitats més elevades (<i>Grace 1996</i>). Quan es va utilitzar la homogeneïtzació vidre-vidre al nostre grup, les activitats enzimàtiques dels teixits homogenats varen resultar extremadament baixes i properes a zero.	La fricció vidre-vidre del nostre homogenitzador era massa agressiva, afectant l'estructura dels complexos multiproteics que formen la CRM i, per tant, a la seva activitat enzimàtica. Es va solucionar utilitzant un homogeneïtzador motoritzat de tefló, de manera que la homogeneïtzació era mitjançant la fricció vidre-tefló (tub-èmbol).
Interferències del tampó d'homogeneïtzació amb el mètode de quantificació proteica.	El tampó manitol, utilitzat per a la homogeneïtzació del teixit, interferia amb el mètode de quantificació proteica Lowry-DC Protein Assay (BioRad), basat en el mètode de Lowry. Tot i que el fabricant no descrivia que cap dels components del tampó manitol (manitol, sacarosa, tris-HCl, EDTA) interferís en la quantificació proteica, el tampó manitol reaccionava amb els reactius del mètode de quantificació, portant a una quantificació irreal del contingut proteic de l'homogenat.	Inicialment es va decidir quantificar, per a cada assaig, una mostra del tampó manitol utilitzat en la homogeneïtzació. D'aquesta manera, es podria restar l'absorbància afegida pel tampó manitol a cadascuna de les mostres i, a partir d'aquí, calcular la concentració real de proteïna dels homogenats de teixit. Aplicant aquesta mesura, es va veure que la quantitat real de proteïna dels homogenats era un 25% menor a la inicial. Posteriorment, a partir de l'estada als laboratoris francesos, es va començar a utilitzar un mètode de quantificació proteic basat en l'àcid bicinconínic, que no interacciona amb cap dels components del tampó manitol.
Cinètica no lineal en l'estudi del complex III	Tot i que, després de l'estada als laboratoris francesos la obtenció de decilubiquinona reduïda ja no presentava problemes metodològics, la cinètica enzimàtica que s'obtenia en l'estudi del complex III no era del tot lineal, arribant ràpidament al punt de saturació. Com a conseqüència, l'activitat del complex III era inferior a l'esperada.	Les baixes activitats obtingudes per al complex III podrien associar-se a que no s'aconseguia reduir al 100% la decilubiquinona de manera que, quan s'assajava l'activitat del complex, la quantitat de decilubiquinol disponible era menor a la quantitat òptima, essent ràpidament oxidat en presència de complex III i impedit obtenir cinètiques lineals. Reduint la quantitat de proteïna utilitzada per a l'assaig d'activitat, es redueix proporcionalment la quantitat de complex III present, fent que la decilubiquinona correctament reduïda ja no sigui limitant, aconseguint cinètiques lineals. Per fer-ho, es va afegir un pas previ de dilució de l'homogenat de teixit (dilució 1/3), de manera que es passava d'utilitzar 15 µg a 5 µg de proteïna (per a la resta d'activitats s'utilitza uns 20 µg de proteïna). <i>Spinazzi i col. (2011)</i> també utilitzen menor quantitat de proteïna per a l'estudi de complex III i IV que per a la resta de complexos.

Taula 5. Taula resum de les dificultats metodològiques que varen sorgir al llarg de l'etapa III.

► ***Etapa IV: estudis de variabilitat i establiment d'un rang control propi***

Un cop s'havia aconseguit obtenir resultats d'activitat propers als dels investigadors francesos, l'objectiu d'aquesta última etapa era:

- realitzar estudis de variació interserie i intraserie (% coeficient de variació) utilitzant teixit muscular de porc per tal de valorar la robustesa i la precisió de la tècnica i determinar l'efecte del procés d'homogeneïtzació sobre les activitats enzimàtiques, ja que aquest punt del procés és clau per a la obtenció de valors representatius.
- establir un rang control de referència propi.

En aquesta etapa es va decidir utilitzar múscul de porc (MP) perquè és un teixit bastant similar a l'humà que ens permetria realitzar estudis complementaris per a millorar la tècnica estalviant material humà. A més, al ser un teixit fàcil d'obtenir en abundància, es va decidir implementar-lo com a control intern quan s'estudiessin mostres de pacients.

Per a l'estudi de la variació interserie es va homogeneïtzar múscul de porc, es va ajustar a 2 mg/mL de proteïna i es va guardar congelat ($-80\pm 5^{\circ}\text{C}$) en alíquotes. A partir d'aquest homogenat, es varen determinar totes les activitats dels enzims de la cadena respiratòria mitocondrial en 8 dies independents. Els resultats obtinguts es mostren a la Taula 6.

Al expressar les activitats en funció del contingut proteic, els coeficients de variació eren inferiors o propers al 15% per a tots els complexos excepte per a l'activitat específica del complex III (CV 18%). Per altra banda, la variabilitat de les activitats expressades respecte l'enzim CS era majoritàriament superior al 15%. Aquesta diferència podria atribuir-se al fet que les relacions entre complexos es mouen en un rang de valors més estret i petites diferències farien desviar ràpidament el coeficient de variació. Tot i això, es va considerar que la variació interserie era acceptable i que aquesta metodologia tenia una bona reproductibilitat.

Activitats enzimàtiques (nmol/min/mg prot)		Mitjana	SD	CV (%)
Complex I		90	8,6	9,5
Complex II		49	3,2	6,6
Complex III		61	11,2	18,3
Complex IV		186	18,7	10,0
Complex I+III		33	2,2	6,8
Complex II+III		36	6,0	16,8
CS		480	51,8	10,8
RELACIONS	Complex I/CS	0,19	0,04	18,9
	Complex II/CS	0,10	0,02	16,2
	Complex III/CS	0,11	0,03	29,9
	Complex IV/CS	0,40	0,09	22,6
	Complex I+III/CS	0,07	0,01	9,6
	Complex II+III/CS	0,08	0,02	24,9

Taula 6. Variació interserie. Els resultats corresponen a l'estudi d'un mateix homogenat muscular de porc en 8 tests independents.

Per a dur a terme l'estudi de la variació intraserie, a partir d'homogenat de teixit muscular de porc, es varen determinar les activitats enzimàtiques per triplicat. Aquest procés es va repetir en 2 dies diferents. Els resultats obtinguts es mostren a la Taula 7.

Activitats enzimàtiques (nmol/min/mg prot)		DIA 1			DIA 2		
		Mitjana	SD	CV (%)	Mitjana	SD	CV (%)
Complex I		118	2,5	2,1	104	1,5	1,5
Complex II		69	1,5	2,2	67	2,1	3,1
Complex IV		222	4,4	2,0	209	3,8	1,8
Complex I+III		46	1,5	3,3	41	2,3	5,6
Complex II+III		48	1,5	3,20	54	3,2	6,0
CS		419	4,6	1,1	416	5,1	1,2
RELACIONS	Complex I/CS	0,28	0,003	1,2	0,25	0,006	2,6
	Complex II/CS	0,17	0,005	3,3	0,16	0,003	2,2
	Complex IV/CS	0,53	0,016	3,1	0,50	0,005	1,1
	Complex I+III/CS	0,11	0,005	4,4	0,10	0,007	6,6
	Complex II+III/CS	0,11	0,003	2,2	0,13	0,090	7,2

Taula 7. Variació intraserie. Els resultats de cada activitat corresponen a la mitjana aritmètica i la SD de tres rèpliques. Aquest procés es va repetir en 2 dies independents.

Tal i com s'observa a la Taula 7, es varen obtenir %CV de variació inferiors al 8 % per a totes les activitats enzimàtiques, tant expressades en funció del contingut proteic com de l'enzim citrat sintasa. Aquest resultats tan homogenis indicaven que la tècnica és robusta i precisa. El complex III no es va poder estudiar degut a problemes en el procés de reducció de la decilubiquinona.

Per tal de veure com influïa el procés d'homogeneïtzació del teixit sobre les activitats enzimàtiques es varen homogeneïtzar separatament tres trossos de teixit d'una mateixa biòpsia muscular de porc i se'n varen estudiar les activitats dels enzims de la CRM. Els resultats obtinguts (Taula 8) indiquen que el procés d'homogeneïtzació té un cert efecte sobre totes les activitats dels complexos enzimàtics. Sorpren que aquest efecte es vegi més clar quan s'expressen les activitat en funció de l'activitat citrat sintasa. Això confirma les observacions prèvies de que el procés d'homogeneïtzació és un factor molt important en la determinació de les activitats dels enzims de cadena respiratòria. Una homogeneïtzació eficient permetrà una millor disrupció de les membranes cel·lulars, solubilitzant els enzims mitocondrials i fent-los accessibles sense inactivar-los, ja que són molt sensibles als tractaments fisicoquímics (*Spinazzi 2011*).

Activitats enzimàtiques (nmol/min/mg prot)		Mitjana	SD	CV (%)
Complex I		110	9,0	8,1
Complex II		75	8,9	11,9
Complex III		84	2,8	3,4
Complex IV		229	24,5	10,7
Complex I+III		32	7,2	22,5
Complex II+III		53	6,7	12,6
CS		451	48,8	10,8
RELACIONS	Complex I/CS	0,25	0,043	17,4
	Complex II/CS	0,17	0,036	21,6
	Complex III/CS	0,19	0,033	17,1
	Complex IV/CS	0,51	0,112	21,8
	Complex I+III/CS	0,07	0,023	31,9
	Complex II+III/CS	0,12	0,025	21,3

Taula 8. Variació intraserie. Els resultats corresponen a les activitats obtingudes en tres trossos diferents d'una mateixa biòpsia muscular de porc.

Tal i com s'ha esmentat anteriorment, el segon objectiu d'aquesta etapa era establir un rang de referència propi. A partir de mostres del banc de teixits del nostre centre es varen estudiar un total de 30 biòpsies de múscul de pacients que en estudis anteriors s'havia vist que presentaven activitats normals dels complexos de cadena respiratòria mitocondrial.

Amb els resultats obtinguts, es va definir un rang control basant-nos en la mitjana \pm 1SD. Com a dada informativa, paral·lelament també es va determinar un segon rang control amb els valors mínim i el màxim obtinguts per a cadascuna de les activitats estudiades (Taula 9).

El rang control (mitjana \pm 1SD) que es va definir al nostre centre és similar al dels investigadors francesos, fet que posa en evidència que aquesta tècnica d'estudi s'ha implementat i desenvolupat correctament.

Activitats enzimàtiques (nmol/min/mg prot)	mitjana (n=30)	SD (n=30)	Rang control mitjana \pm 1SD	Rang control valor mín-màx	valors control grup francès*	
Complex I	47	18,42	29-66	27-92	27-35	
Complex II	66	20,34	46-87	37-117	42-60	
Complex III	128	39,06	89-167	83-209	110-185	
Complex IV	204	60,70	143-265	134-371	130-195	
Complex I+III	25	10,37	15-36	16-53	16-48	
Complex II+III	40	15,07	25-55	20-78	33-65	
CS	198	51,48	147-250	127-289	146-294	
RELACIONS	I/III	0,35	0,12	0,23-0,47	0,26-0,63	0,12-0,48
	I/II	0,73	0,16	0,57-0,88	0,54-1,12	0,58-0,82
	I/CS	0,25	0,08	0,18-0,33	0,18-0,39	0,18-0,28
	II/CS	0,26	0,44	0,26-0,44	0,26-0,46	0,23-0,35
	III/II+III	2,58	4,99	2,5-8,5	1,9-5,9	2,5-4,0
	III/II	1,55	2,77	1,55-2,77	1,42-2,67	1,8-3,8
	III/CS	0,54	0,87	0,54-0,87	0,51-0,78	0,5-1,0
	IV/I	4,40	1,13	3,27-5,54	2,46-4,97	3,2-5,6
	IV/III	1,90	0,36	1,54-2,26	1,12-2,32	0,7-1,7
	IV/II	3,24	0,72	2,52-3,96	1,87-3,84	2,5-3,5
	IV/CS	1,11	0,26	0,85-1,36	0,73-1,3	0,7-1,0
	I+III/CS	0,09	0,18	0,09-0,18	0,07-0,24	no consta
	II+III/II	0,46	0,74	0,46-0,74	0,38-0,9	0,65-0,95
II+III/CS	0,13	0,27	0,13-0,27	0,11-0,33	0,17-0,29	

Taula 9. Rang de valors control establerts al nostre centre de diagnòstic (IBC). *Rang control cedit per el Departament de Bioquímica Metabòlica del *Centre de Génétique Moléculaire et Chromosomique* del Grup Hospitalari Pitié Salpêtrière

Tal i com s'ha comentat anteriorment, la homogeneïtzació del teixit, amb la posterior quantificació proteica, i les activitats enzimàtiques es portaven a terme inicialment en un mateix dia. Per tal d'adaptar la nova metodologia a la rutina de treball del laboratori, es va estudiar com afectava sobre les activitats enzimàtiques la congelació de l'homogenat (ajustat a 2 mg/mL de proteïna) a $-80 \pm 5^\circ\text{C}$. Es va veure que les activitats dels complexos I, I+III, III i CS es veien negativament afectades quan es congelava l'homogenat (resultats no inclosos). A partir d'aquesta observació, es va decidir dividir la tècnica d'estudi en dos dies: el primer dia s'estudiaven les activitats dels complexos més sensibles (complexes I, I+III, III i CS), i el segon dia s'estudiaven la resta de complexos (complex II, II+III i complex IV).

Actualment en a la Secció d'errors congènits del metabolisme (Hospital Clínic de Barcelona) s'ha implementat aquesta tècnica per a l'estudi de les activitats dels enzims que formen la cadena respiratòria mitocondrial en pacients amb sospita de defecte mitocondrial. El rang control s'ha anat perfeccionant amb els valors de pacients amb resultats dins del rang de normalitat (Taula 13).

4.1.2 Estudi espectrofotomètric de l'activitat dels enzims de CRM en fibroblasts cultivats

A l'article publicat per *Medja i col. (2009)* també es feia esment a la determinació de les activitats dels enzims de cadena respiratòria en fibroblasts cultivats obtinguts a partir de biòpsia de pell; les mostres es varen obtenir en els pertinents hospitals d'origen i sota consentiment informat. Donat que al nostre centre es portava a terme l'estudi en fibroblasts, també es va introduir la metodologia francesa per aquest tipus de material. Amb les tècniques utilitzades fins aleshores en fibroblasts només es podien estudiar les activitats dels complexos IV, II+III i CS; amb l'aplicació de la nova metodologia, l'estudi s'ampliava, permetent determinar les activitats dels complexos II, III, IV, I+III, II+III i CS. L'activitat del complex I no és possible estudiar-la en fibroblasts a través de tècniques espectrofotomètriques, però amb l'estudi del conjunt I+III indirectament s'obté informació sobre l'activitat del complex I, que es pot complementar amb l'activitat del complex III i la quantificació del CoQ₁₀. L'estudi de complex I en cèl·lules cultivades només és possible a partir de la obtenció de fraccions mitocondrials

enriquides degut a la elevada proporció d'activitat NADH-oxidoreductasa insensible a la rotenona (Spinazzi 2012).

L'estudi dels enzims de cadena respiratòria es va dur a terme de la mateixa manera que per al teixit muscular. Com a control intern es va utilitzar múscul de porc.

Durant el període en el que es va desenvolupar aquest treball, es varen estudiar les activitats en fibroblasts cultivats procedents de biòpsia de pell de 5 pacients sense sospita de malaltia de metabolisme energètic; els resultats que es varen obtenir es mostren a la Taula 10. Per les 5 mostres estudiades les cinètiques varen ser lineals per a tots els complexos i es va observar una bona inhibició dels complexos III i I+III al afegir antimicina o rotenona al medi de reacció, respectivament.

Referent a la activitat NADH:citocromo c oxidorreductasa (complex I+III), la cinètica obtinguda en l'estudi de l'activitat total donava valors d'activitats molt elevats que es reduïen entre 90-95% en presència de rotenona. No obstant, els valors d'activitat sensible a rotenona es mantenien dins el rang control de normalitat determinat pels investigadors francesos. Això ens indica que hi ha molta activitat inespecífica que ens podria emascarar una deficiència.

Activitats enzimàtiques (nmol/min/mg prot)	F1	F2	F3	F4	F5	mitjana	SD	Rang control (mitjana \pm 1SD)	Valors control grup francès*
Complex II	25	19	37	32	37	30	7,9	22-38	21-35
Complex III	50	54	53	43	51	50	4,3	46-55	38-72
Complex IV	87	92	77	95	110	92	12,1	80-104	68-98
Complex I+III	18	26	13	19	25	20	5,4	15-26	17-31
Complex II+III	22	16	22	23	32	23	5,8	17-29	23-37
CS	51	51	65	53	62	56	6,6	50-63	61-97
Complex II/CS	0,49	0,37	0,57	0,60	0,60	0,53	0,10	0,43-0,62	0,26-0,46
Complex III/CS	0,98	1,06	0,82	0,81	0,82	0,90	0,11	0,78-1,01	0,54-1,04
Complex IV/CS	1,71	1,80	1,18	1,79	1,77	1,65	0,26	1,39-1,92	1-1,34
Complex I+III/CS	0,35	0,51	0,20	0,36	0,40	0,36	0,11	0,25-0,48	ND
Complex II+III/CS	0,43	0,31	0,34	0,43	0,52	0,41	0,08	0,33-0,49	ND

Taula 10. Resultats d'activitats dels enzims de cadena respiratòria mitocondrial obtinguts en fibroblasts.

ND: no disponible. *Rang control cedit per el Departament de Bioquímica Metabòlica del *Centre de Génétique Moléculaire et Chromosomique* del Grup Hospitalari Pitié Salpêtrière

Per a la resta d'activitats estudiades, els valors obtinguts quedaven compresos dins el rang control de referència del grup francès.

Posteriorment a aquest treball, l'estudi en fibroblasts ha continuat. S'han estudiat les activitats dels enzims de CRM en 28 mostres de fibroblasts cultivats, establint un rang control propi (Taula 11).

Cal continuar ampliant l'estudi en fibroblast per tal de poder establir un rang control fiable que permeti identificar possibles defectes en les activitats dels complexos que formen la CRM.

Activitats enzimàtiques (nmol/min/mg prot)		Rang control n=28 (mitjana ±1SD)	Valors control grup francès* n=50 (mitjana ±1SD)
Complex II		23-35	21-35
Complex III		24-48	38-72
Complex IV		33-57	68-98
Complex I+III		14-42	17-31
Complex II+III		12-20	23-37
CS		40-62	61-97
RELACIONS	Complex II/CS	0,53-0,75	0,26-0,46
	Complex III/CS	0,50-1,06	0,54-1,04
	Complex IV/CS	0,85-1,15	0,90-1,34

Taula 11. Rang de valors control de les activitats enzimàtiques en fibroblasts.

*Rang control cedit per el Departament de Bioquímica Metabòlica del Centre de Génétique Moléculaire et Chromosomique del Grup Hospitalari Pitié Salpêtrière

4.1.3 Situació actual

Després d'aquest treball, s'ha continuat treballant per millorar la mesura de les activitats enzimàtiques en homogenat de teixit muscular i en fibroblasts cultivats

S'han aplicat alguns canvis respecte la metodologia inicial (Taula 12) que han permès obtenir menor variació inter-laboratori. Alguns d'aquests canvis són:

- dilució de l'homogenat inicialment ajustat a 2 mg/mL de proetina per tal d'obtenir cinètiques més lineals i més estables en l'estudi de les activitat del complex III i el complex IV.
- variació del mètode per a la obtenció de decilubiquinol reduït, permetent una millor reproductibilitat en la metodologia d'estudi del complex III.

- addició d'un detergent suau, com el Tween 20, en la mix de reacció per a l'estudi de l'activitat del complex III, permetent una major accessibilitat del complex al medi de reacció i, per tant, cinètiques més lineals.

Punt	Xarxa Francesa (Medja 2009)	Xarxa Espanyola	Objectiu del canvi
Homogeneïtzació	Vidre-vidre	Tefló-vidre	Evitar danyar els enzims de la CRM.
Estudi de les activitats enzimàtiques de la CRM	Un dia	Possible en un dia però dividit en dos dies utilitzant alíquotes congelades d'homogenat.	Adaptació del protocol als hàbits de treball del laboratori.
Activitat complex III	Reducció del decilubiquinol mitjançant ditionita	Reducció del decilubiquinol mitjançant borohidrat de sodi.	Mètode més llarg; reducció més estable.
	Sense detergent	Tween 20	Cinètiques més lineals.
	Mostra no diluïda (homogenat ajustat a 2mg/mL proteïna)	Dilució 1/3 addicional de l'homogenat de teixit.	Cinètiques més lineals.
Activitat complex IV	Mostra no diluïda (homogenat ajustat a 2 mg/mL proteïna)	Dilució 1/3 addicional de l'homogenat de teixit.	Cinètiques més lineals.
Estudi de la CRM	Temps d'anàlisi de les cinètiques enzimàtiques no definit	Temps d'anàlisi de les cinètiques enzimàtiques estandarditzat i específic per a cada activitat.	Resultats més consistents.
Mostra control	Específica de cada laboratori	Comuna per a tots els laboratoris.	Permet una comparació de les activitats obtingudes als diversos laboratoris, fent més fàcil la identificació de possibles problemes metodològics.
Registre <i>online</i> els lots utilitzats per cada reactius	No especificat	Registre i comparativa de resultats en funció del lot dels reactius.	PermetAllowing inter-site result comparison and batch-specific problem detection

Taula 12. Comparativa entre la metodologia francesa i la definida per la xarxa de laboratoris espanyols.

Actualment aquesta metodologia s'utilitza rutinàriament en els estudis de les activitats dels enzims de la CRM en mostres de pacients amb sospita de malaltia mitocondrial, no només al nostre centre de diagnòstic, sinó també als altres centres de la xarxa espanyola establerta.

Tot i que el rang control està ben definit, cal continuar treballant-t'hi per tal que permeti identificar clarament una activitat patològica d'una activitat enzimàtica dins la normalitat. A la Taula 13 es mostren els rangs de valors control actuals que cada centre de diagnòstic ha establert. Tot i que s'observen diferències entre els diversos centres, aquestes es minimitzen quan les activitats es refereixen a l'enzim citrat sintasa.

Aquesta metodologia ha permès millorar significativament la qualitat analítica en els estudis de CRM, sobretot pel que fa a la determinació dels complexos I, III i IV. A més, ha permès crear una xarxa espanyola per a l'estudi d'aquests enzims, facilitant el treball en equip i l'intercanvi d'experiències per tal d'assolir diagnòstics per acurats.

Complex	Activitats enzimàtiques (nmol/min/mg prot)	IBC (n=119)	HCL (n=29)	H12O (n=25)	HVd'H (n=14)	UPO (n=75)	Valors control grup francès*
I	Absoluta	38±15	25±9	74±20	27±6	33±11	27-35
	Relativa a CS	0.23±0.07	0.22±0.04	0.37±0.07	0.16±0.03	0.21±0.04	0,18-0,28
II	Absoluta	62±23	41±9	86±17	50±13	34±9	42-60
	Relativa a CS	0.37±0.08	0.32±0.13	0.43±0.06	0.29±0.03	0.20±0.02	0,23-0,35
III	Absoluta	164±46	130±45	223±55	101±20	142±44	110-185
	Relativa a CS	0.92±0.24	1.23±0.20	1.08±0.16	0.59±0.14	0.95±0.27	0,5-1,0
IV	Absoluta	135±53	88±32	273±54	81±33	132±29	130-195
	Relativa a CS	0.81±0.28	0.72±0.13	1.53±0.20	0.43±0.14	0.80±0.12	0,7-1,0
I+III	Absoluta	21±12	16±7	38±7	16±5	19±6	16-48
	Relativa a CS	0.13±0.06	0.10±0.03	0.20±0.03	0.07±0.03	0.12±0.03	no consta
II+III	Absoluta	36±11	26±6	46±7	24±3	32±6	33-65
	Relativa a CS	0.21±0.06	0.21±0.08	0.19±0.03	0.12±0.03	0.21±0.04	0,17-0,29
CS	Absoluta	172±48	121±30	196±39	192±61	161±27	146-294

Taula 13 . Rang de valors control per a múscul esquelètic de cinc dels set centres espanyols participants. IBC: Secció d'Errors Congènits del Metabolisme (Hospital Clínic de Barcelona); HCL: Hospital Clínic de Barcelona; H12O: Hospital 12 de Octubre de Madrid; HVd'H: Hospital Vall d'Hebrón; UPO: Universidad Pablo de Olavide de Sevilla. *Rang control cedit per el Departament de Bioquímica Metabòlica del *Centre de Génétique Moléculaire et Chromosomique del Grup Hospitalari Pitié Salpêtrière*.

4.2 Estudi dels complexos que formen la cadena respiratòria mitocondrial en pacients amb sospita de malaltia mitocondrial mitjançant la tècnica del Blue Native PAGE

La tècnica del Blue Native PAGE (BN) es va desenvolupar per tal de separar, en la seva forma nativa i mitjançant gels en gradient d'acrilamida, les proteïnes i els complexos de membrana mitocondrials amb pesos moleculars compresos entre 10 kDa i 10 MDa (*Schägger 1991; Schägger 1994*). Els gels es poden revelar mitjançant l'assaig d'activitats enzimàtiques en gel o bé per Western Blot (WB) tenyint els complexos enzimàtics amb anticossos específics. Per altra banda, si només es volen visualitzar les bandes proteiques, es pot dur a terme una tinció senzilla amb solució colorant de *Comassie Blue*.

Tot i que l'estudi de les activitats en gel és un anàlisi semi-quantitatiu, permet complementar els resultats obtinguts en l'estudi en cubeta. A través d'aquesta tècnica es poden assajar les activitats dels complexos I, II, IV i V. S'ha descrit algun mètode que permet l'estudi de l'activitat del complex III en gel (*Smet 2011; Wittig 2007*) però en les nostres mans no ha resultat suficientment resolutiu per discriminar deficiències.

Un dels grans avantatges de la metodologia del BN és la determinació de l'activitat enzimàtica del complex V, ja que l'estudi mitjançant tècniques espectrofotomètriques i a partir de teixit congelat és poc fiable i, a més, requereix una elevada quantitat de mitocondris que no podem obtenir a partir de les petites mostres dels pacients que arriben al nostre centre de diagnòstic. Un altre avantatge és l'assaig d'activitat de complex I en fibroblasts, ja que aquesta activitat no es pot determinar en cubeta.

El WB amb anticossos específics permet detectar la presència o absència dels complexos mutiproteics i, mitjançant el pes molecular, saber si estan correctament acoblats.

Determinats defectes o mutacions mostren un perfil de bandes característic. La detecció d'aquests perfils permet ajustar la cerca mutacional a determinats gens per tal de poder arribar directament a la causa arrel de la patologia, que pot ser molt útil per obtenir un diagnòstic precoç.

Nosaltres hem utilitzat la tècnica del BN per a l'estudi de mostres de teixit muscular i fibroblasts cultivats. A l'hora d'interpretar els resultats, a part de comparar les mostres dels pacients amb una mostra control, també es té en compte la intensitat relativa de les bandes corresponents als complexos dins del global de cada pacient, ja que no sempre una banda de menor intensitat que el control indica deficiència si la resta de complexos també estan disminuïts.

Donat que el tampó d'electroforesi utilitzat conté colorant de Comassie, les bandes corresponents als complexos proteics són fàcilment visibles al finalitzar la electroforesis. Per això, com a control de pes molecular s'ha utilitzat una solució de Ferritina tipus I comercial.

En el període de temps durant el qual s'ha desenvolupat aquesta tesi, s'han estudiat per BN un total de 33 pacients (Taula 14):

- 3 pacients amb sospita de defecte de complex I
- 6 pacients amb sospita de defecte de complex II
- 7 pacients amb sospita de defecte de complex III
- 2 pacients amb sospita de defecte de complex IV
- 15 pacients amb sospita de defecte de complex V

Pacient	Clínica	Estudi Metabolisme Energètic		Blue Native				Diagnòstic definitiu
		Fibroblasts	Teixit muscular	Activitats en gel		Western Blot		
				Fibroblasts	Teixit muscular	Fibroblasts	Teixit muscular	
1	Afectació severa extrapiramidal distònica en les quatre extremitats amb hiperreflèxia.	ND	↓ CI	Normal	Normal	Normal	ND	
2	Acidosis làctica i cetosis; afectació renal amb hepatomegàlia.	↓Taxa oxidació de piruvat	↓ CI clara; disminució general complexos CRM	ND	Normal	ND	ND	
3	Acidosis metabòlica greu amb hiperlactacidèmia greu. Nivells elevats d'àcid làctic i àcids orgànics en orina. Exitus als 3 dies de vida.	ND	↓ CI ↓ PDH ↓ PDH E1	ND	Normal	ND	ND	
4	Fenotip clínic no disponible	ND	↓ CII	ND	↓ CII	ND	Normal	Mutació gen <i>NFUI</i>
5	Retard psicomotor i de desenvolupament, regressió neurològica i leucodistrofia	ND	↓ CII	ND	ND	ND	CII deficient	Mutació gen <i>NFUI</i>
6	Apnees neonatals, dismòrfia facial, ptosis, retard psicomotor, tetraparèsia espàstica greu, epilèpsia multifocal. Atròfia del cos callós i alteració de substància blanca. Discreta hiperlactacidèmia.	Normal	↓ CII	ND	Normal	ND	lleugera ↓ CII	
7	Degeneració de substància blanca y de mielina en nervi perifèric. Inici malaltia al any de vida, leucodistrofia	↓ CII+III PDH i taxes oxidació substrats normal	↓ CII	ND	↓ CII	ND	↓ CII	Mutació gen <i>NFUI</i>
8	Atàxia, alteració de la substància blanca del SNC, leucodistrofia severa, sordera, anomalies cutànies i diabetes,	ND	↓ CII	ND	Normal	ND	ND	
9	Hipoglucèmia, hiperlactacidèmia, hiperamonèmia, nivells elevats de α-cetoglutarat. Cardiopatia i hipertensió pulmonar. Exitus als 9 dies de vida.	CR normal. ↓ PDH i taxes oxidació de substrats	CR normal. ↓ PDH PDH E1 y E3 normals	Normal	ND	Normal	ND	Mutació gen <i>LIPT1</i>
10	Encefalopatia amb retard psicomotor. Hepatopatia. Augment de lactat i d'enzimes hepàtics en sang. Mutació en BCS1L (p.R56X/p.R69C).	Normal	↓ CIII	Normal	ND	Prot. Rieske i BCS1L normals	ND	Mutació gen <i>BCS1L</i>
11	Mort sobtada per parada cardiorespiratòria.	ND	Normal	ND	ND	Normal	ND	

Taula 14. Taula de pacients estudiats mitjançant la tècnica del Blue Native. ND: No determinat.

Pacient	Clínica	Estudi Metabolisme Energètic		Blue Native				Diagnòstic definitiu
				Activitats en gel		Western Blot		
		Fibroblasts	Teixit muscular	Fibroblasts	Teixit muscular	Fibroblasts	Teixit muscular	
12	Dismòrfia facial, mioclonies no epilèptiques, hipotonia, cataractes i cardiomiopatia. Hipocalcèmia i hiponatrèmia greus, atrofia cerebral desmielinitzant greu. Perfil d'àcids orgànics compatibles amb defecte de β -oxidació mitocondrial i AGCML compatibles amb malaltia peroxisomal. Èxitus a les 7 setmanes de vida.	Normal	↓CIII	ND	ND	↓CIII-Proteïna de Rieske	ND	
13	Hipotonia, cataractes, acidosi làctica, neuropatia axonal. Fill de pares consanguinis.	ND	↓CII+III, ↓CIII	Normal	Normal	Normal	Normal	
14	Hiperlactacidèmia, hepatitis neonatal fulminant amb fallida multiorgànica.	ND	↓CIII, ↓CIV ↓CoQ	ND	Normal	ND	↓CIII	
15	Hepatopatia, retard pondoestatural	Normal	↓CIII, ↓CIV; CoQ ₁₀ normal	ND	ND	ND	Normal	
16	Retard psicomotor, ratio làctic/pirúvic alterat.	Normal ↓taxes oxidació de substrats	↓CIII	↓CIV	↓CIV	ND	Normal	
17	Hiperlactacidèmia i acidosis metabòlica. Hipotonia axial, alteració dels reflexes, hipertonia en extremitats inferiors.	Normal	↓CIV, ↓CII+III	ND	↓CIV	ND	↓CIV	Defecte complex IV de causa desconeguda
18	Nivells elevats d'àcid làctic. Astenia limitant amb incapacitats per dur a terme exercici físic aeròbic.	ND	↓CIV	ND	Normal	ND	Normal	
19	Ratio làctic/pirúvic alterat. Convulsions i hipotonia generalitzada. Síndrome de Leigh amb miocardiopatia fulminant. Mutació m.8993T>G.	Normal	Normal	ND	CV subcomplexes	ND	Normal	m.8993T>G MT-ATP6
20	Portadora de mutació m.8993T>G.	ND	ND	Normal	CV subcomplexes	ND		m.8993T>G MT-ATP6
21	Mort neonatal. Acidosi, hiperamonèmia i miocardiopatia hipertrofica. Diagnosticada de Glucogenosi tipus IX.	ND	ND	ND	↓CV (múscul cardíac)	ND	↓CV (múscul cardíac)	Mutació gen TMEM70
22	Èxitus a 13 dies de vida, hiperlactacidèmia, augment d'àcid 3-metilglutacònic. Pares no consanguinis. 2 germanes mortes neonatalment amb sospita de malaltia metabòlica, la primera sense diagnòstic i la segona es la pacient 21. Germà viu i sa.	ND	Normal	↓CV subcomplexes	ND	ND	↓CV	Mutació gen TMEM70

Taula 14 (continuació). Taula de pacients estudiats mitjançant la tècnica del Blue Native. ND: No determinat.

Pacient	Clínica	Estudi Metabolisme Energètic		Blue Native				Diagnòstic definitiu
		Fibroblasts	Teixit muscular	Activitats en gel		Western Blot		
				Fibroblasts	Teixit muscular	Fibroblasts	Teixit muscular	
23	Atàxia congènita, anomalies cefàliques, ptosis, disfunció cognitiva, tremolors. Nivells elevats d'àcid 3-metilglutàric i 3-metilglutacònic.	ND	ND	Normal	↓ CV	Normal	ND	Mutació gen <i>DNAJC19</i>
24	Degeneració psicomotora a partir dels 6 anys de vida per una tetraparesia espàstica progressiva. Neuropatia axonal.	Normal	Normal	ND	Normal	ND	Normal	
25	Hiperlactacidèmia i cetosis en orina. Retard psicomotor, ponderal i estatural. Paràlisi cerebral amb tetraparesia espàstica.	ND	Normal	ND	Normal	ND	ND	
26	Episodis d'hipotonia amb cianosi des dels 3 mesos de vida; pare amb minusvalia psíquica. Augment de lactat, piruvat, alanina i prolina en plasma, i de lactat en orina.	ND	Normal	ND	Normal	ND	ND	
27	Clínica no disponible	ND	ND	Normal	ND	ND	ND	
28	Clínica no disponible	ND	Normal	ND	Normal	ND	Normal	
29	Síndrome de Leigh amb mutació m.8993T>G (ATP6)	↓taxes d'oxidació de substrats	Normal	Normal	ND	ND	ND	m.8993T>G <i>MT-ATP6</i>
30	Miocardiopatia hipertròfica greu, hepatopatia, insuficiència renal crònica, enterocolitis necrotitzant, leucomalàcia periventricular, macroglòssia, nefrocalcinosis, anèmia, trombopènia. Nivells elevats de lactat. Èxitus	Normal	ND	Normal	ND	ND	ND	
31	Hipouricèmia renal, Síndrome asteniforme recurrent. Hiperlactacidèmia. Exploració neurològica normal. Augment d'àcid 3-metilglutàric y 3-metilglutacònic.	ND	↓CI+III, ↓CII+III CoQ ₁₀ normal	ND	Normal	ND	ND	
32	Mort sobtada als 2 mesos de vida per parada cardiorespiratòria. Nivells elevats d'àcid 3-metilglutacònic.	ND	Normal	ND	↓CV	ND	↓CV	
33	Acidosis làctica, nivell elevats d'àcid 3-metilglutacònic. Afectació hepàtica.	Normal	↓CIV	ND	Normal	ND	ND	

Taula 14 (continuació). Taula de pacients estudiats mitjançant la tècnica del Blue Native. *ND*: No determinat.

4.2.1 Estudis de complex I

Es va estudiar l'activitat enzimàtica en gel del complex I en 3 pacients (pacients 1-3) que havien mostrat una activitat deficient en l'estudi de les activitats de la CRM realitzat a partir de teixit muscular.

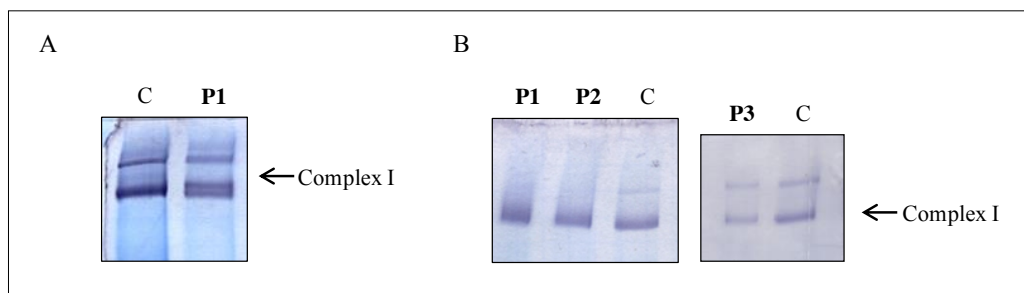


Figura 9. Imatges dels resultats de l'estudi de BN-activitat en gel del complex I realitzat a partir de fibroblasts cultivats (A) i teixit muscular (B) del pacient 1 (P1), pacient 2 (P2) i pacient 3 (P3). C: control.

Tal i com s'observa a la Figura 9, sovint apareixen dues bandes quan es tenyeix el complex I. La banda inferior correspon al complex I pròpiament (1000 kDa, aproximadament), mentre que la banda superior seria el resultat de l'associació del complex I amb altres complexos que formen la cadena respiratòria mitocondrial (supercomplexos), sobretot amb el complex III (Schägger 2000).

En cap dels pacients estudiats es va observar una disminució significativa en l'activitat enzimàtica en gel ni tampoc cap alteració en l'acoblament de les subunitats que formen aquest complex. Per tant, els resultats obtinguts per BN no confirmaven la deficiència observada per espectrofotometria, de manera que no hi havia indicis de en quin direcció s'havia de continuar l'estudi.

4.2.2 Estudis de complex II

Es varen estudiar 6 pacients (pacients 4-9) en els quals s'havia observat una activitat enzimàtica deficient del complex II en els estudis espectrofotomètrics inicials.

Cal destacar l'estudi dels pacients 4, 5, 7 i 9, que es descriuen a continuació. Els estudis de BN pels pacients 6 i 8 no varen confirmar el defecte observat ni varen aportar informació addicional (resultats no inclosos).

► **Pacients 4 i 5**

Aquests dos pacients presentaven un fenotip clínic similar caracteritzat per leucodistrofia, hipertensió pulmonar, acidosis làctica, hiperglicinèmia i elevada excreció d'àcid 2-cetoglutàric, àcid 2-cetoadípic i àcid 2-hidroxiadípic en orina.

L'estudi dels enzims de cadena respiratòria mitocondrial realitzat en teixit muscular havia mostrat deficiència en l'activitat del complex II i en l'activitat combinada dels complexos II+III. També es va veure que en ambdós pacients l'activitat PDH i la oxidació de substrats en fibroblasts donaven resultats inferiors al nivell de normalitat.

Per una banda, mitjançant BN-WB es va estudiar l'acoblament dels complexos I, II i III a partir d'homogenat de teixit muscular. Es va veure que la banda corresponent al complex II del pacient 4 (P4) era similar a la del control, mentre que era inexistent o molt dèbil en el pacient 5 (P5) (Figura 10).

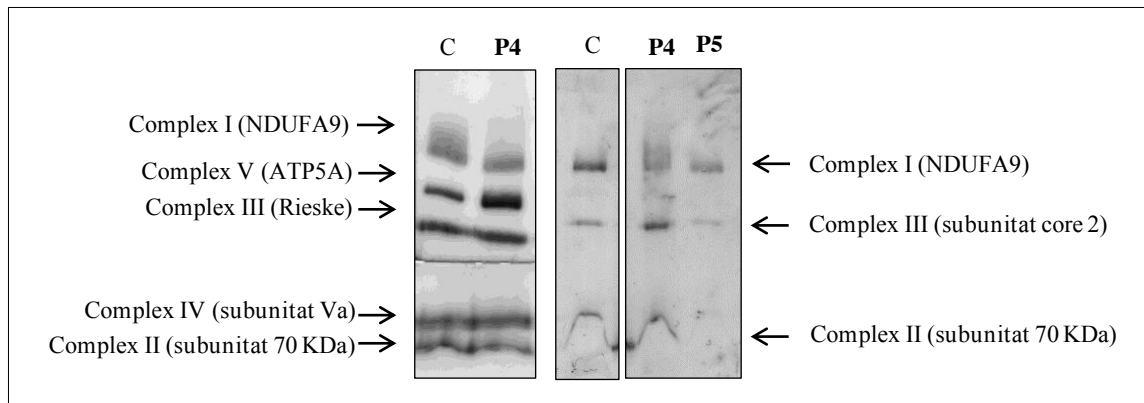


Figura 10. Imatge dels resultats de BN-WB amb anticossos específics pels complexos I-IV obtinguts a partir d'homogenat de teixit muscular dels pacients 4 (P4) i 5 (P5). C: control.

Es varen estudiar també les activitats enzimàtiques en gel en teixit muscular del pacient 4 (Figura 11). La mostra del pacient 5 era molt petita i no es va poder dur a terme aquest estudi.

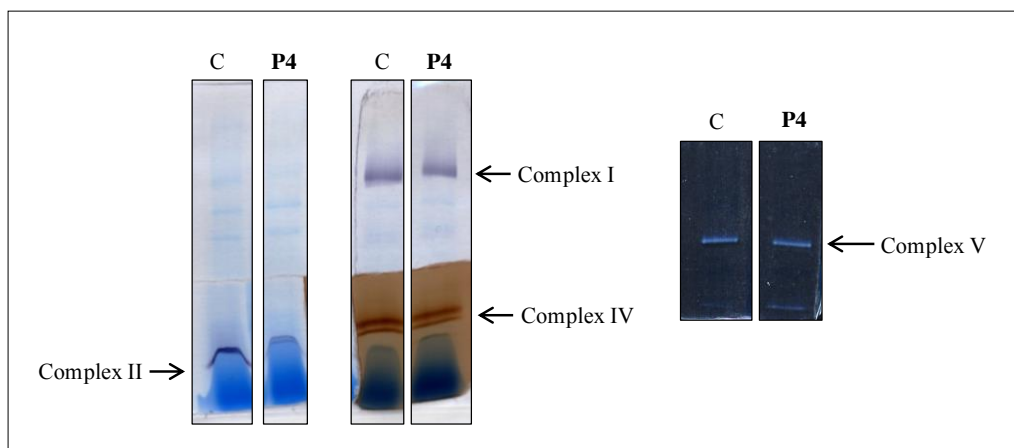


Figura 11. Estudi de BN-activitat en gel dels complexes I, II IV i V del pacient 4 (P4) a partir de teixit muscular. *C: control*

Tal i com s'observa en la imatge (Figura 11), la banda corresponent al complex II en el pacient 4 (P4) era de pes molecular similar a la del múscul control, indicant que aquest complex estava ben format i ben acoblat, però s'observava una clara deficiència en l'activitat enzimàtica, confirmant els resultats obtinguts en l'anàlisi inicial de la CRM.

Donat que la clínica i la bioquímica d'aquests pacients era molt semblant a la d'altres pacients ja descrits on s'havia identificat una mutació en el gen *NFU1*, en el nostre centre es va dur a terme l'estudi mutacional d'aquest gen. Es va veure que ambdós pacients eren homozigots per la mutació *missense* (c.622C>T/c.622C>T (p.Gly208Cys/p.Gly208Cys)), que provoca el canvi d'un aminoàcid glicina altament conservat (Navarro-Sastre 2011).

NFU1 és una proteïna implicada en la biogènesi dels *clusters* de ferro-sofre (Fe-S), cofactors essencials en una gran varietat de reaccions enzimàtiques, inclosa la transferència d'electrons als complexos I i III de la cadena respiratòria mitocondrial. Els clusters de Fe-S també participen en la síntesis d'àcid lipoic, catalitzada per l'enzim mitocondrial lipoic àcid sintasa (LIAS) (Johnson 2005; Beinert 2000; Booker 2007; Lill 2012). L'àcid lipoic és un cofactor essencial que s'uneix covalentment a les subunitats E2 de piruvat deshidrogenasa (PDH), α -cetoglutarat deshidrogenasa (KGDH), deshidrogenasa dels α -ceto àcids ramificats (BCKDH) i a la subunitat H del complex glicina descarboxilasa (GCS) (Hiltunen 2010). A partir d'estudis d'immuno-tinció i d'expressió en línies cel·lulars, es va veure que la depleció de NFU1 provocava una disminució en el percentatge de proteïnes lipoilades i en l'activitat i la quantitat de

l'enzim succinat deshidrogenasa (SDH, complex II), suggerint que NFU1 és una proteïna essencial per a l'activitat de la LIAS, donant lloc a un defecte en la biosíntesi d'àcid lipoic, i per a la SDH (Navarro-Sastre 2011; Ferrer-Cortés 2013).

Així, la mutació en el gen *NFU1* descrita en els pacients 4 i 5 explicaria els resultats observats i les característiques clíniques dels pacients. Tot i ser portadors de la mateixa mutació en homozigosi, en els estudis realitzats en teixit muscular es va observar que el pacient 5 presentava un defecte gairebé total de complex II en el BN-WB mentre que en el pacient 4 la banda corresponent al complex II era d'intensitat i pes molecular igual que la mostra control, tot i que l'activitat en gel era clarament deficient (Figura 11). S'ha vist que en determinats teixits, inclòs el teixit muscular, els pacients amb mutacions a *NFU1* sovint no mostren patrons d'expressió dels complexos I, II i III de la CRM anòmals, mentre que en fibroblasts es demostra que els patrons d'expressió de les subunitat dels complexos I i II són sempre anòmals. L'únic marcador constant és la lipoilació, que és sempre deficient en aquests pacients (Navarro-Sastre 2011; Ferrer-Cortés 2012; Cameron 2011). Es desconeix la causa d'aquestes diferències en els patrons.

► Pacient 7

En aquest pacient, amb una clínica de leucodistrofia similar a la dels pacients 4 i 5, també es va observar un defecte en l'activitat del complex II en teixit muscular i de l'activitat combinada del complex II+III en l'estudi realitzat en fibroblasts cultivats. El defecte en l'activitat de complex II es va confirmar en l'estudi de BN-activitats en gel (Figura 12-A) i per BN-WB la banda corresponent al complex II era de menor intensitat comparant amb la mostra control (Figura 12-B).

Donat que en aquest pacient l'activitat de l'enzim PDH i la taxa d'oxidació de substrats havien donat resultats dins el rang control, es va sospitar la presència de mutacions en els gens *SDH* directament implicats en el complex II, però no es varen identificar canvis (estudi realitzat pel Dr. Taylor, Newcastle University). L'equip de Newcastle, motivat pel treball publicat per Navarro-Sastre *i col* (2011), va suggerir seqüenciar el gen *NFU1*, on es va identificar la mencionada mutació c.622G>T, majoritàriament descrita

en els pacients NFU1, en heterozigosi composta amb la mutació c.545+5G>A, també descrita prèviament (*Navarro-Sastre 2011*) i que provoca *exon-skipping* de l'exó 6.

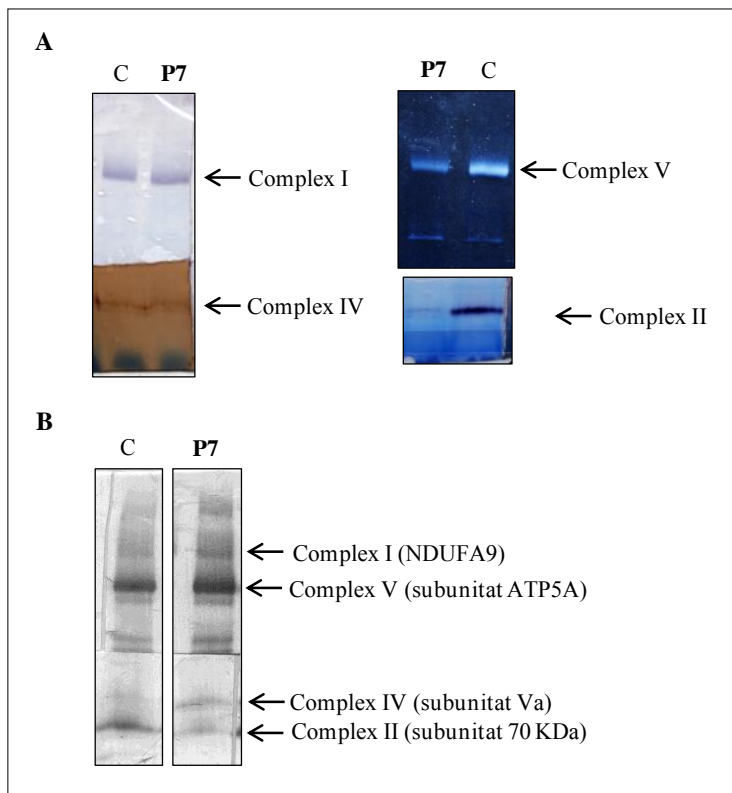


Figura 12. Resultats dels estudis de BN-activitats en gel (A) i BN-WB (B) en teixit muscular del pacient 7 (P7).

Tal i com s'ha esmentat anteriorment, NFU1 és una proteïna implicada en el metabolisme de l'àcid lipoic la depleció de la qual s'ha vist que provoca una alteració en l'activitat de l'enzim PDH i dels complexes de CRM I, II i III. El pacient 7, a diferència dels casos fins aleshores descrits, no presentava alteració en l'activitat PDH ni en la oxidació de substrats, tot i que el defecte en l'activitat del complex II era molt clar. Es varen revisar altres casos i es va veure que els pacients homozigots per la mutació c.622G>T mostraven una absència total d'àcid lipoic lligat a proteïna. En contrast, en pacients heterozigots compostos per c.622G>T i c.545+5G>A, com el pacient 7, els nivells de proteïnes lipoilades eren molt reduïts però es podien detectar en tots els casos. Els estudis moleculars realitzats al nostre centre a partir de fibroblasts varen demostrar una regulació peculiar del punt d'*splicing* mutant en els pacients heterozigots, la qual cosa produeix nivells residuals (fins al 10%) de la proteïna NFU1 salvatge. Aquets nivells podrien ser suficients per activar la lipoic àcid sintasa i lipoilar parcialment, restaurant l'activitat d'alguns enzims dependents d'àcid lipoic, com per exemple la subunitat E2 de l'enzim PDH (*Ferrer-Cortés 2012*).

El nostre estudi va contribuir a establir noves perspectives sobre les bases moleculars de la deficiència de NFU1.

► **Pacient 9**

La pacient 9, filla de pares no consanguinis, presentava un quadre clínic amb important bradicardia, disfunció hepàtica, hipoactivitat, hipertonia amb moviments distònics de mans i peus, i hipertensió pulmonar; va morir als 9 dies de vida. En l'estudi bioquímic de plasma es va detectar una important acidosis làctica i hipoaminoacidèmia amb nivells elevats d' α -alanina. El perfil d'àcids orgànics en orina mostrava elevada excreció de lactat i 2-cetoglutarat.

El quadre clínic junt amb la acidosis làctica i els alts nivells d' α -alanina i 2-cetoglutarat eren indicatius d'una alteració del metabolisme energètic, de manera que es va procedir a l'estudi enzimàtic a partir de teixit muscular i fibroblasts cultivats. En ambdós teixits les activitats dels enzims de cadena respiratòria estaven dins el rang de normalitat, però es va observar una clara deficiència en l'activitat del complex piruvat deshidrogenasa (PDH), amb activitat normal dels components E1 i E3. La oxidació de piruvat i leucina en fibroblasts cultivats també va resultar ser deficient.

No es varen trobar canvis mutacionals en els gens que codifiquen les subunitats de l'enzim PDH, descartant una deficiència primària de PDH. Per tant, es va seguir l'estudi dels enzims de cadena respiratòria mitocondrial per BN a partir de fibroblasts cultivats (Figura 13), ja que no es disposava de prou teixit muscular.

Els resultats tant de BN-activitat en gel com de BN-WB amb tinció amb anticossos específics no varen mostrar cap anormalitat.

Donada la clínica de la pacient i amb l'experiència anterior de pacients amb mutacions al gen *NFU1*, es va pensar en una possible deficiència del metabolisme de l'àcid lipoic. Finalment, investigadors del nostre centre varen confirmar una deficient lipoilació de proteïnes mitjançant tècniques d'immunotinció en fibroblasts (Tort 2014).

Tal i com s'havia vist en altres pacients estudiats (pacient 4, 5 i 7), els portadors de mutacions en gens implicats en el metabolisme de l'àcid lipoic, com ara el gen *NFU1*, presenten un fenotip clínic i bioquímic similar d'aparició molt inicial i caracteritzat

per deficiència en la lipoilació de proteïnes, baixa activitat PDH, BCKDH, KGDH i nivells gairebé indetectables del complex de la glicina decarboxilasa en fetge. A més a més, tots els defectes, exceptuant el de la sintetasa d'àcid lipoic (LIAS), que catalitza l'últim pas de la via de síntesi d'àcid lipoic, estan associades a defectes dels enzims de la cadena respiratòria mitocondrial.

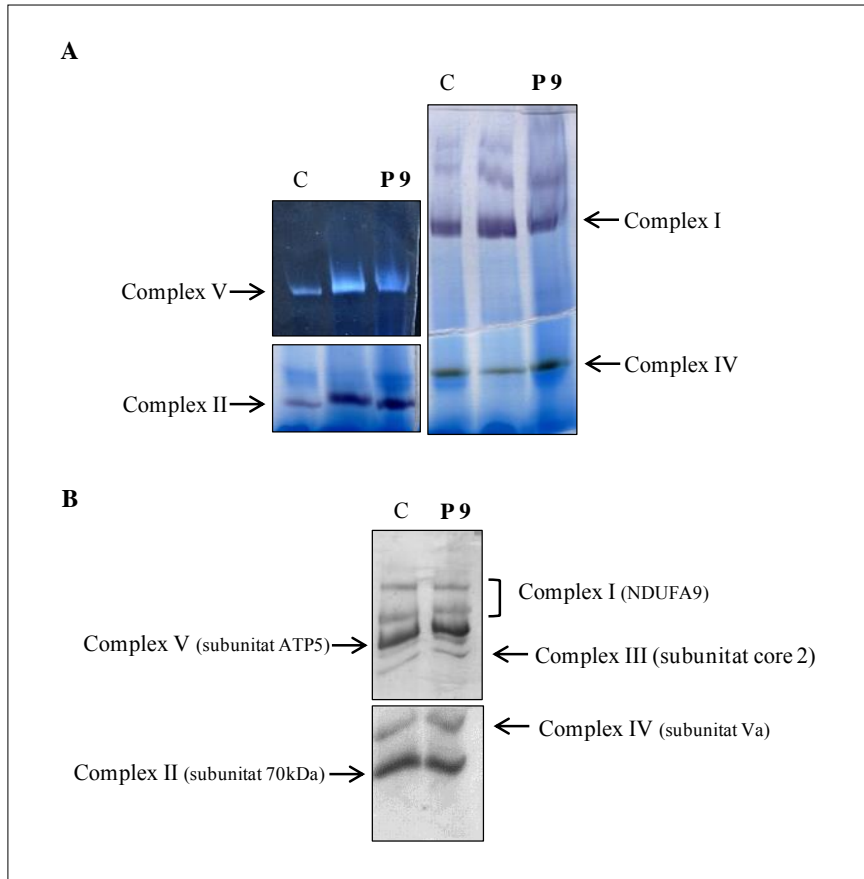


Figura 13. Resultats de BN-activitat en gel (A) i BN-WB (B) obtinguts a partir de fibroblasts cultivats del pacient 9 (P9). C: control

El pacient 9, tal i com s'ha vist en els defectes de LIAS ja descrits (Mayr 2011), presentava unes activitats enzimàtiques de CRM en fibroblasts i múscul completament normals (Figura 13), però l'anàlisi de seqüència del gen que codifica per la LIAS no va mostrar alteracions patològiques.

Estudiant la via de biosíntesi de l'àcid lipoic es va seleccionar *LIPT1* com a possible gen responsable, i en l'anàlisi de seqüència es varen identificar dues mutacions en heterozigosi: p.Ser71Phe i p.Arg98Gly. L'anàlisi *in silico* (Polyphen2[®]) va classificar els dos canvis com a deleteris, fet que es va confirmar posteriorment mitjançant estudis d'expressió gènica en cèl·lules cultivades. *LIPT1* és una proteïna requerida per a la

lipoilació i activació de determinats enzims dependents d'àcid lipoic. La funció i el mecanisme a través del qual l'àcid lipoic s'uneix i es transfereix a les proteïnes diana encara no és del tot ben conegut en humans (*Tort 2014*).

4.2.3 Estudis de complex III

Es va dur a terme l'anàlisi per BN-WB en 6 pacients diagnosticats amb defecte del complex III mitjançant espectrofotometria (pacients 10-15).

En el pacient 10 es va observar una clara deficiència en l'activitat del complex III en l'estudi realitzat a partir de biòpsia muscular. Donada la clínica d'hepatopatia, es va remetre directament al *Laboratorio de Enfermedades Mitocondriales* del Hospital Universitario 12 de Octubre per a l'estudi mutacional del gen *BCS1L*, on es va veure que era heterozigot compost per les mutacions p.R56X (*De Meirlirr 2003*), i p.R69C. *BCS1L* és una proteïna mitocondrial necessària per a la biogènesi del complex III que participa en l'ensamblatge de la proteïna de Rieske en aquest complex (*Cruciat 1999*; *Nobrega 1992*). Les alteracions en *BCS1L* provoquen que el complex III no s'acobli correctament, donant lloc a un complex no funcional.

El canvi p.R56X provoca un *stop* prematur que comporta un transcrit més curt i, per tant, la pèrdua de funció de l'al·lel. Per altra banda, l'anàlisi *in silico* (Polyphen2®) va determinar que el canvi p.R69C és un canvi no sinònim probablement patològic.

L'objectiu d'aplicar la tècnica del BN en aquest pacient era veure si s'observava un perfil de bandes característic que ens permetés detectar possibles alteracions d'aquest gen en altres pacients amb una activitat de complex III deficient.

Seguint el treball publicat per *Smet i col.* el 2011 es va intentar dur a terme l'estudi de l'activitat en gel del complex III, però no es varen obtenir resultats concloents, de manera que només es va poder dur a terme l'estudi d'ensamblatge per BN-WB. Els estudis es varen realitzar a partir de fibroblasts cultivats, ja que no es disposava de prou mostra de múscul, i es varen utilitzar anticossos específics anti-proteïna de Rieske i anti-subunitat Core 2 del complex III. Tal i com s'observa a la figura 14, al tenyir el complex III amb anticòs anti-Rieske no es va observar cap diferència entre el pacient 10, portador de dos canvis patològics en *BCS1L*, i la resta de pacients. Per altra banda,

es va obtenir una banda de menor intensitat en el pacient 12 que podria atribuir-se a una alteració patològica de *BCSL1*. Tot i això, l'anàlisi de seqüència de *BCS1L* no va mostrar cap alteració patològica.

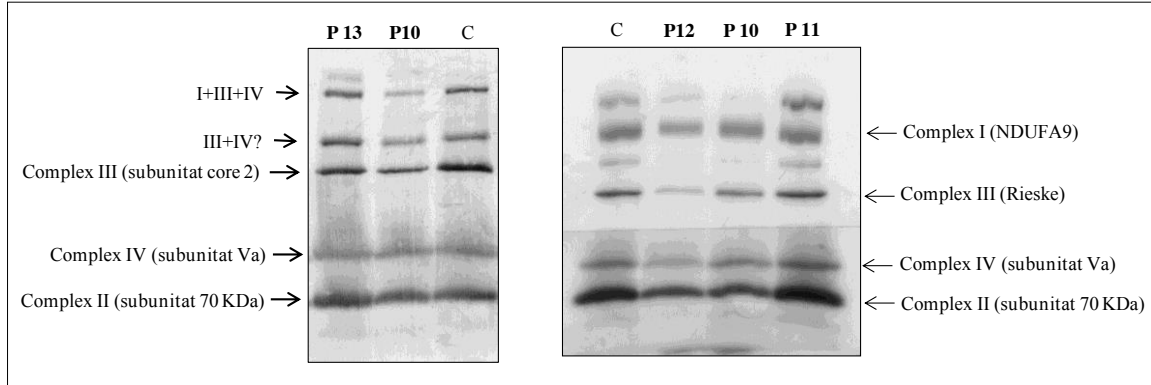


Figura 14. Resultats de BN-WB de l'estudi a partir de fibroblasts cultivats del pacient 10 (P10), pacient 11 (P11), pacient 12 (P12) i pacient 13 (P13). *C*: control.

Per complementar aquests resultats es va córrer la mostra d'homogenat de fibroblasts en un gel d'acrilamida en condicions desnaturalitzants (SDS-PAGE) seguit de WB (Figura 15). En aquest cas, es va utilitzar anticòs anti-*BCS1L* i anticòs anti-Rieske. No es va observar cap diferència en el contingut de Rieske ni en *BCS1L* en el pacient 10, indicant que tot i la presència de les mutacions, la proteïna *BCS1L* no es degrada, cosa que explicaria que hi hagués certa activitat residual que permetés la unió d'una part de Rieske al complex III.

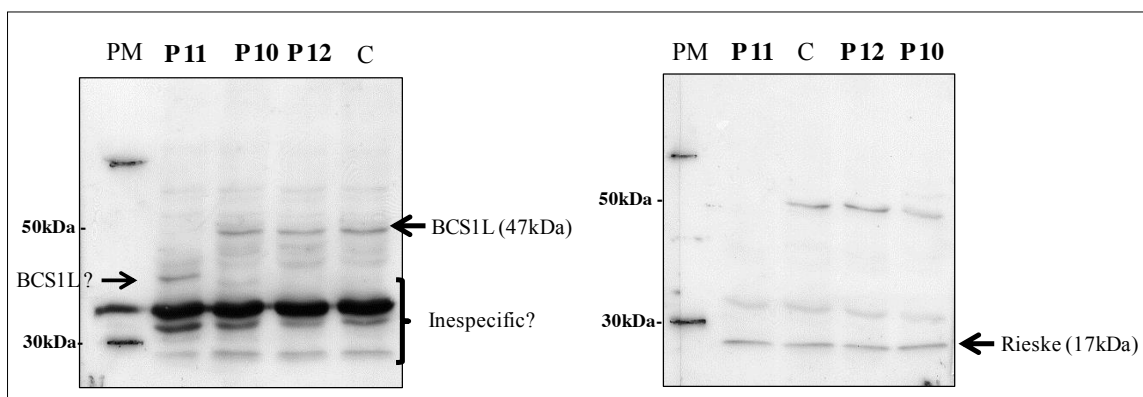


Figura 15. SDS-PAGE a partir d'homogenat de fibroblasts cultivats del pacient 10 (P10), pacient 11 (P11) i pacient 12 (P12) i WB amb anticossos específics per la proteïna de Rieske i *BCS1L*. *C*: control; PM: marcador de pes molecular.

Pel que fa al pacient 11, en la tinció de BCS1L es va observar una banda de menor pes molecular comparant amb la resta de pacients i el control (Figura 15), però en el BN-WB realitzat a partir de fibroblasts cultivats (Figura 16) no es va observar cap alteració. Seria convenient seqüenciar el gen *Bcs1l* d'aquest pacient per veure si aquesta banda de menor pes molecular es deu a una alteració d'aquest gen.

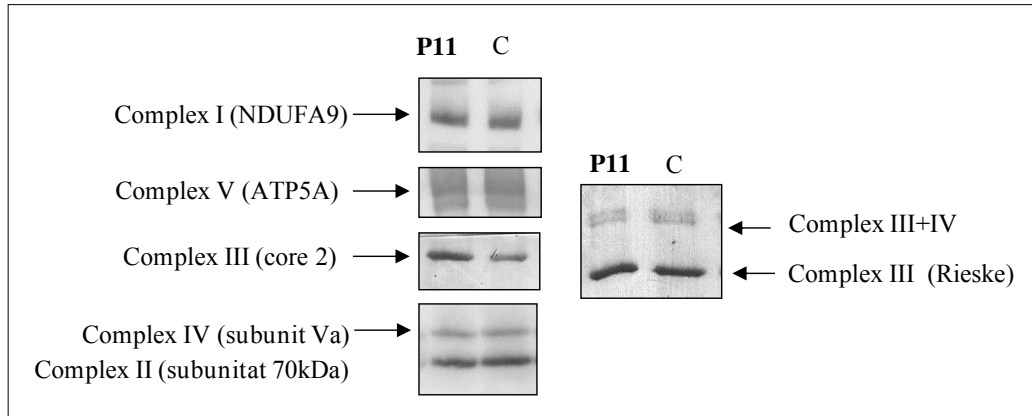


Figura 16. Resultats de l'estudi per BN-WB a partir de fibroblasts cultivats del pacient 11 (P11).

Per a la resta de pacients estudiats amb sospita de deficiència de complex III no es va observar cap alteració a nivell de BN-WB, de manera que no es va poder arribar a cap diagnòstic definitiu.

Així doncs, l'estudi per BN-WB no va permetre identificar el pacient portador de mutacions patològiques de la resta de pacients amb defecte de complex III de causa desconeguda.

4.2.4 Estudi del complex IV

Es varen estudiar 2 pacients (pacient 17 i pacient 18) que havien mostrat defecte en l'activitat del complex IV en els estudis espectrofotomètrics. El pacient 18 no va mostrar cap alteració en les activitats en gel (Figura 17), mentre que en el pacient 17 hi havia una clara deficiència en l'activitat del complex IV en teixit muscular. No es disposava de biòpsia de pell per tal de fer l'estudi amb fibroblasts cultivats.

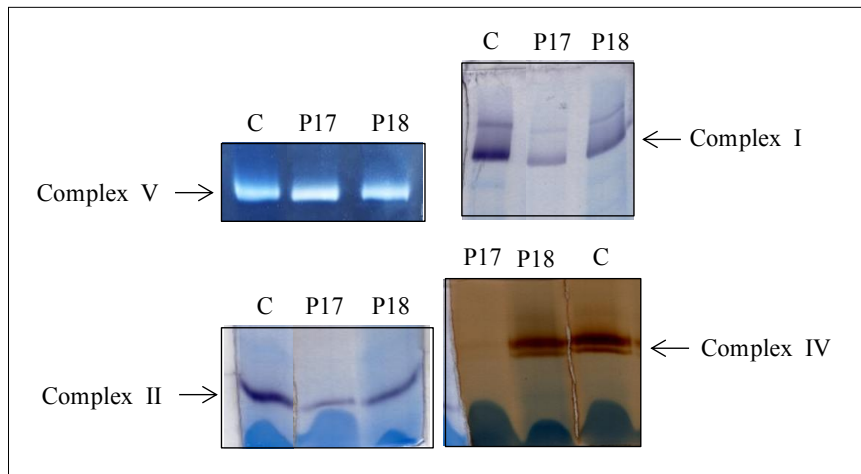


Figura 17. Resultats de l'estudi de BN-activitats en gel en teixit muscular del pacient 17 (P17) i pacient 18 (P18). *C: control.*

En el BN-WB realitzat amb teixit muscular, no es va observar la banda corresponent al complex IV en el pacient 17, indicant que segurament el defecte venia causat per una alteració en l'ensamblatge de les subunitats que formen aquest complex.

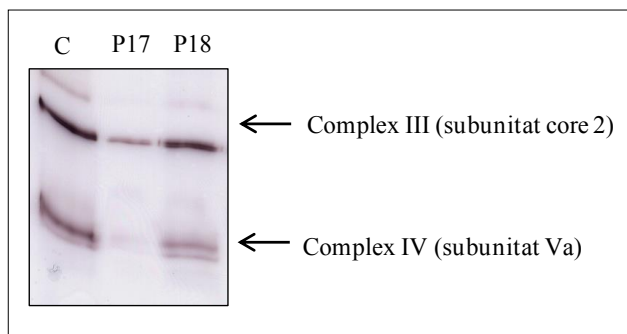


Figura 18. Resultats de l'estudi de BN-WB en teixit muscular del pacient 17 (P17) i pacient 18 (P18). *C: control.*

Per tant, l'estudi per BN va permetre confirmar el defecte de complex IV observat en el pacient 17. Està en curs l'estudi genètic per tal de trobar la causa arrel del defecte observat.

4.2.5 Estudis de complex V

Es varen estudiar 15 pacients (pacients 19-33) amb sospita de defecte en l'activitat del complex V, i en 5 es va observar una alteració en l'activitat d'aquest complex.

Tal i com s'ha introduït anteriorment, el complex V està format per dos dominis: F_1 , exposat a la matriu mitocondrial, i F_0 , ancorat a la membrana mitocondrial interna. Totes les subunitats que formen els dos dominis vénen codificades per gens nuclears, exceptuant la *a* i la A6L de la unitat F_0 , que vénen codificades per gens mitocondrials (*ATP6* i *ATP8*, respectivament) (Schägger 2000; Jonckheere 2012).

El conjunt F_1F_0 posseeix la capacitat ATPsintasa, però el domini F_1 també té activitat ATPasa (Jonckheere 2012). En condicions normals, la diferència de potencial entre el mitocondri i el citosol afavoreix l'activitat F_1F_0 ATPsintasa i, per tant, la síntesi d'ATP (Campanella 2009). Quan la respiració mitocondrial està en condicions compromeses, la diferència de potencial disminueix, afavorint l'activitat ATPasa. Per evitar la degradació de l'ATP hi ha la proteïna inhibidora IF1, que inhibeix l'activitat F_1 -ATPasa en condicions dependents de pH: IF1 és actiu a pH inferior a 6.5 (Pullman 1963; Van Heeke 1993; Cabezon 2000).

Amb la metodologia *in vitro* de BN-activitats en gel utilitzada només és possible assajar l'activitat ATPasa del domini F_1 (pH de treball de 7,8), de manera que, amb aquesta metodologia, només detectarem els defectes que alterin l'activitat ATPasa (Smet 2009).

En els pacients 19, 20 i 29 es varen detectar mutacions en el gen *MT-ATP6*, que codifica per a la subunitat *a* del domini F_0 . L'activitat en gel del complex V en homogenat de teixit muscular en els pacients 19 i 20, portadors de la mutació m.8993T>G *MT-ATP6*, mostrava la presència de dues bandes extra de menor pes molecular (subcomplexes) que no hi eren presents en els controls (Figura 19-A). Per altra banda, no es va observar la presència de F_1 -subcomplexes en l'estudi realitzat a partir de fibroblasts del pacient 29 i del pacient 20, portador de la mateixa mutació (Figura 19-B). Hauria estat convenient l'estudi en teixit muscular d'aquest pacient, ja que s'ha observat que en fibroblasts no sempre es poden detectar les deficiències dels enzims de CRM, possiblement degut a un menor grau d'heteroplasmia (Smet 2009). Malauradament, no es disposava d'aquest teixit.

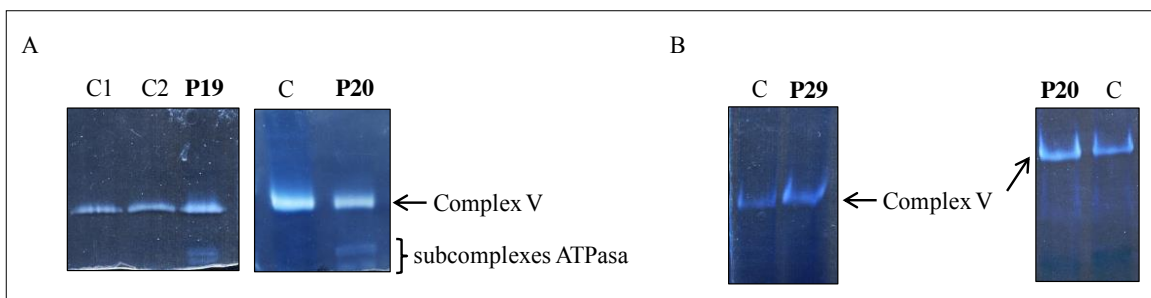


Figura 19. BN-activitat en gel del complex V en teixit muscular (A) dels pacient 19 i 20, i fibroblasts cultivat (B) del pacient 20 (P20) i el pacient 29 (P29).

La funció principal de la subunitat *a* és conduir els protons des de la membrana mitocondrial interna cap a la matriu a través de l'anell de subunitats *c* del domini F_0 . L'energia que es produeix en la rotació permet el canvi conformacional del centre catalític de F_1 , permetent la síntesi d'ATP. La mutació m.8993T>G provoca un canvi d'aminoàcid de Leu, un aminoàcid altament conservat en eucariotes, a Arg (p.Leu156Arg). La introducció de l'Arg causa un canvi estructural de la proteïna que altera la rotació de l'anell de subunitats *c*. Per això, en principi, ni l'activitat ATPasa ni l'acoblament dels dominis F_0 i F_1 no es veuen alterats (Sgarbi 2006). Tot i això, les mutacions a *MT-ATP6* afectarien negativament l'estabilitat de l'holocomplex F_1F_0 , donant lloc a l'aparició d'aquestes bandes de menor pes molecular. La intensitat de les bandes dels subcomplexes dependrà del grau d'heteroplàsmia de la mutació (Smet 2009).

► Pacient 21 i Pacient 22

Les pacients 21 i 22 eren germanes, filles de pares no consanguinis amb antecedents de 3 filles mortes i un fill sa. La primera filla, amb retard psicomotor, va morir als 15 mesos de vida a causa d'una sèpsia generalitzada. La segona filla (pacient 21), amb un quadre clínic d'acidosis làctica, hiperamonèmia, cardiomiopatia hipertròfica i hipertensió pulmonar, va morir als 8 dies de vida i va ser diagnosticada *postmortem* de glucogenosis tipus IX al observar-se una acumulació de glicogen lliure al cor. La quarta filla (pacient 22), que va morir als 13 dies de vida per una parada cardiorespiratòria, presentava una clínica d'acidosis làctica, hipoglucèmia, hipotonia, hiperamonèmia i hipertensió pulmonar. En l'estudi espectrofotomètric de les activitats enzimàtiques de la

CRM realitzat en teixit muscular es varen observar activitats dels complexos I-IV i II+III dins el rang de normalitat i una activitat lleugerament reduïda del conjunt I+III. La quantificació de CoQ₁₀ va mostrar nivells deficients en múscul (1,7 nmol/UCS; rang control 2,6-8,4 nmol/UCS) i l'anàlisi d'àcids orgànics en orina mostrava un increment d'excreció d'àcid 3-metilglutaconic i àcid 3-metilglutàric.

L'àcid 3-metilglutaconic (3-MGA) i l'àcid 3-metilglutàric són intermediaris del catabolisme mitocondrial de la leucina que s'acumulen quan hi ha un defecte en aquesta via. En la orina de pacients sans només es detecten traces de 3-MGA. S'han descrit 5 tipus d'acidúries 3-metilglutaconiques (I-V). Tot i que els tipus I, II, III i V estan clínicament i bioquímica ben definits, la tipus IV (OMIM 250951) és un grup heterogeni que inclou pacients que presenten nivells des de moderats fins a elevats de 3-MGA en orina. La majoria de pacients descrits amb 3-MGA tipus IV presenten cardiomiopatia hipertròfica d'aparició primerenca, acidosis làctica i hipotonia, i la patologia sovint és deguda a un defecte en l'activitat del complex V (*Wortmann 2009*).

Els símptomes clínics juntament amb l'elevada excreció de 3-MGA en orina del pacient 22 varen fer pensar en una acidúria 3 metilglutaconica de tipus IV, de manera que es va dur a terme el BN-activitats en gel i BN-WB dels enzims de CRM (Figura 20).

En el BN-activitats en gel es va veure una clara alteració de l'activitat del complex V i la presència de dues bandes actives de menor pes molecular (subcomplexes actius) que no eren presents en el control. La resta d'activitats enzimàtiques eren comparables a les del control (Figura 20-A). En l'estudi de BN-WB (Figura 20-B), es va observar que la banda corresponent al complex V del pacient 22 era clarament menys intensa que la dels controls.

Tot i que en el pacient 21 no es va detectar increment d'excreció de 3-MGA en orina, considerant els resultats obtinguts en la germana (pacient 22) i els símptomes clínics comuns, es va decidir estudiar l'activitat del complex V en teixit cardíac, l'únic material del que es disposava. Tant en les activitats en gel com en el WB es va observar una clara deficiència de complex V.

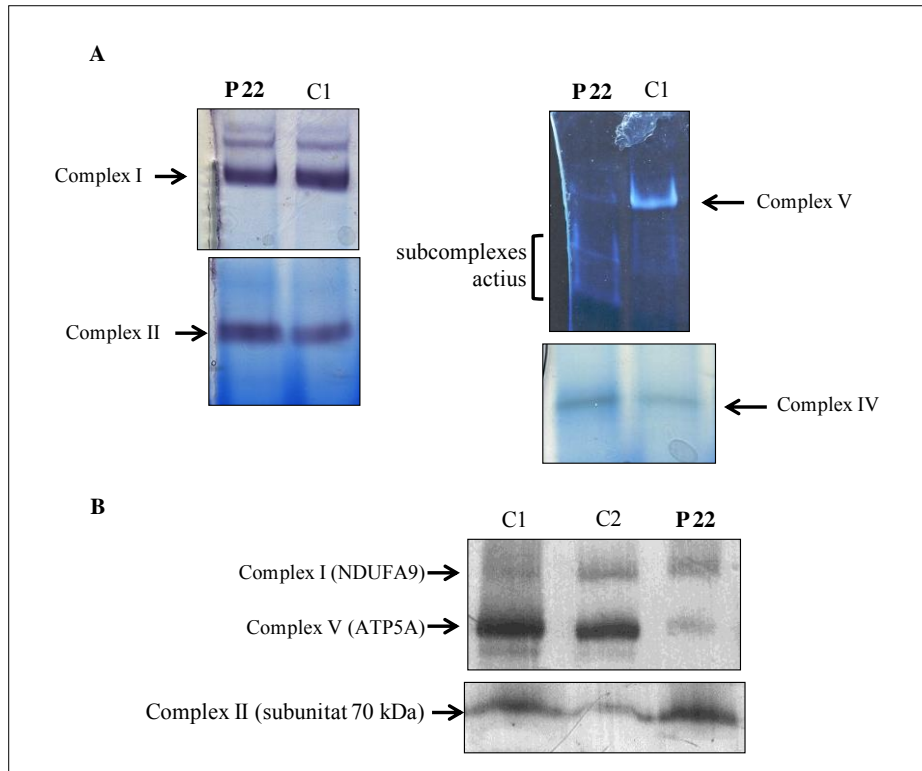


Figura 20. BN-activitats en gel en fibroblasts cultivats (A) i BN-WB a partir de teixit muscular (B) del pacient 22 (P22). C: *Control*.

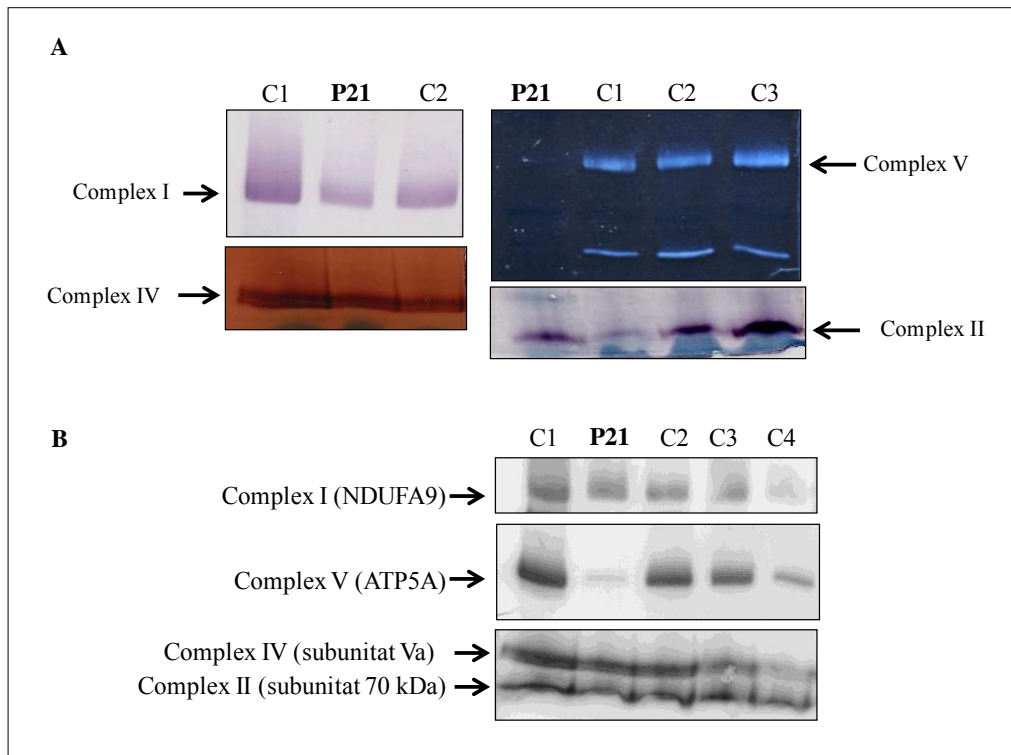


Figura 21. Resultats de l'estudi de BN-activitats en gel (A) i BN-WB (B) en teixit cardíac de la pacient 21 (P21). C: *Control*.

Aquests resultats indicaven que les dos pacients estaven afectades per la mateixa deficiència, tot i que inicialment la pacient 21 va ser diagnosticada de glucogenosis tipus IX i que no es va detectar increment en l'excreció de 3-MGA. De fet, ambdues patologies tenen similituds. Tant la 3-MGA tipus IV com la glucogenosis IX presenten cardiomiopatia hipertròfica; alguns autors han descrit que l'acidúria 3-MGA pot donar-se secundàriament en pacients amb alteracions primàries o secundàries del fetge, incloses les glucogenosis tipus I i IX (Law 2003; Wortmann 2006). I també està descrit que l'excreció de 3-MGA en orina pot ser intermitent en aquets pacients tipus IV (Hončík 2010).

Tal i com s'ha comentat anteriorment, les acidúries 3-MGA sovint van associades a un defecte de complex V. S'han descrit 3 gens d'origen nuclear involucrats amb defectes de complex V: *ATP12*, *ATP5E* i *TMEM70*, essent aquest últim el de major prevalença (Hončík 2010). Així doncs, *TMEM 70* va ser el gen d'elecció per a iniciar l'estudi dels pacients 21 i 22. Es va extreure ADN de teixit cardíac del pacient 21 i de fibroblasts del pacient 22 per tal de seqüenciar aquest gen. Es va veure que ambdós pacients eren homozigots per a la mutació c.317-2A>G. L'anàlisi genètic de *TMEM70* també es va dur a terme en els pares i els dos eren heterozigots portadors de la mutació detectada en les 2 filles. Aquesta mutació, ja descrita anteriorment, és la més prevalent per a aquest gen i es localitza en el lloc d'*splicing* de l'intró 2, donant lloc a una proteïna aberrant no funcional (Houstek 1999).

TMEM70 és una proteïna transmembrana implicada en la biogènesis del complex V, participant en l'acoblament de la subunitat F_1 (Houstek 2009). Tenint en compte que les mutacions en aquest gen inhibeixen la producció de proteïna *TMEM70*, aquest factor no deu ser essencial per a la biogènesis del complex V, ja que s'ha vist que petites quantitats de complex V són sempre presents en els teixits afectats (Houstek 1999). Així, les bandes addicionals observades en l'activitat del complex V en el pacient 22 correspondrien a subcomplexes conseqüència del desacoblament de la subunitat F_1 del complex V que mantindrien l'activitat ATPasa (Figura 20) (Carrozzo 2006).

Les característiques clíniques dels pacients amb alteracions a *TMEM70* inclouen generalment hipotonia, cardiomiopatia hipertròfica, acidosis làctica, hiperamonèmia i nivells alterats, i intermitents, d'àcid 3-metilglutàric i àcid 3-metilglutacònic en orina (Hončík 2010), símptomes presents en els pacients 21 i 22.

Per tant, cal tenir en compte que la presència de 3-MGA en orina en pacients diagnosticats clínicament amb glucogenosis tipus IX podria no ser un efecte secundari, sinó un marcador de la deficiència primària de complex V causada per mutacions en el gen *TMEM70*.

► **Pacient 23**

Els elevats nivells de 3-MGA i àcid 3-metilglutàric, juntament amb un fenotip clínic molt sever varen fer sospitar d'un defecte en l'activitat del complex V.

En teixit muscular es va observar un clar defecte en l'activitat d'aquest complex (Figura 22-A), mentre que no es va veure cap alteració en l'estudi realitzat a partir de fibroblasts cultivats (Figura 22-B,C).

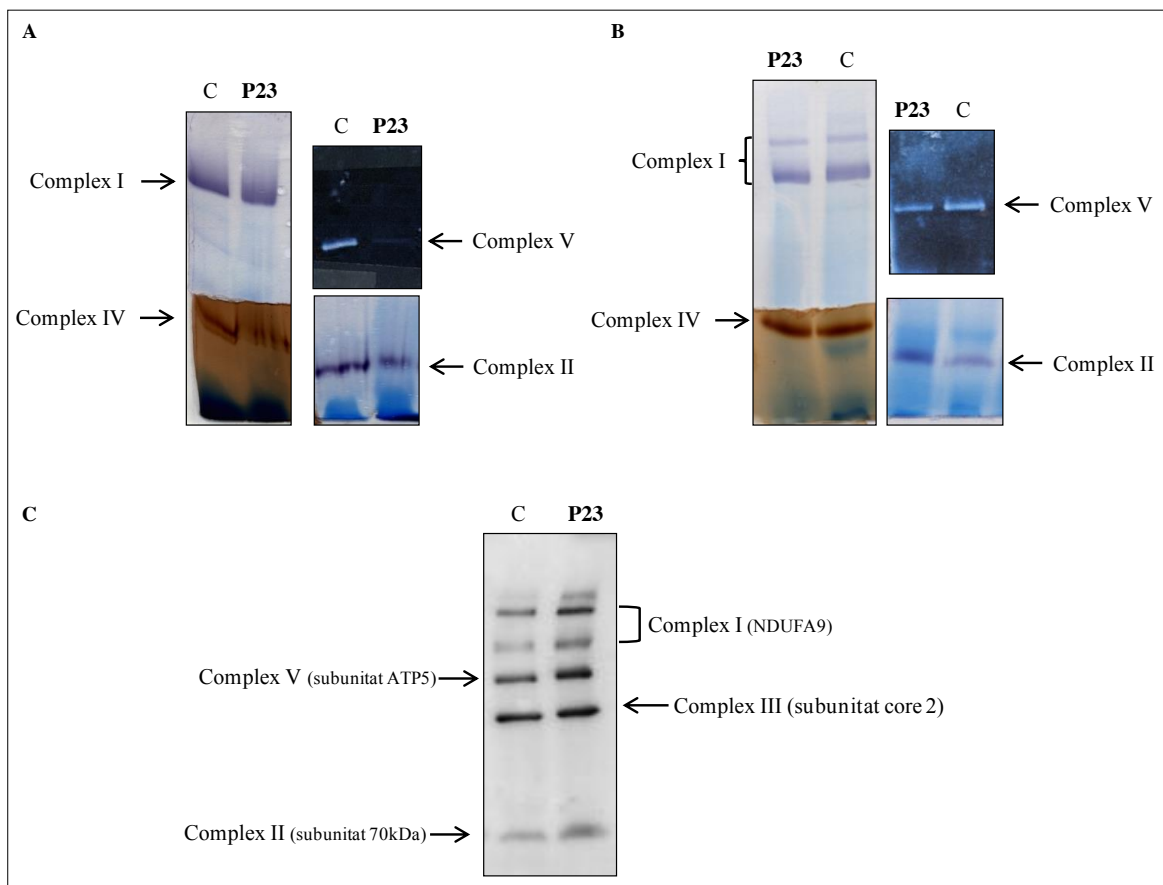


Figura 22. Resultats de BN-activitats en gel en teixit muscular (A) i fibroblasts (B) del pacient 23. BN-WB en fibroblasts (C) del pacient 23 (P23).

Es varen seqüenciar els gens TMEM70, ATP5E i ATP12 però no es va identificar cap mutació patològica.

Finalment aquest pacient es va incloure en el programa de seqüenciació massiva de l'exoma (panells Haplotex) que inclou, entre d'altres, tots els gens implicats en les 3-MGA-úries (subvencionat pel CIBERER) on, a partir dels resultats obtinguts, es va poder identificar una mutació patològica homocigota (c.178dupT; pTer60LeufsTer40) en el gen DNAJC19.

DNAJC19 codifica per una proteïna de la membrana mitocondrial interna implicada en el transport ATP-dependent de proteïnes cap a l'interior de la matriu mitocondrial. La falta d'aquesta proteïna comporta un defecte en l'import de proteïnes mitocondrials de codificació nuclear cap a l'interior del mitocondri (*Davey 2009; Richter-Dennerlein 2014*). *DNAJC19* està relacionada amb el metabolisme de la cardiolipina, un fosfolípid de la membrana mitocondrial interna involucrat en la biogènesis del mitocondri i en la dinàmica i la organització supramolecular de les membranes mitocondrials. Està demostrat que la cardiolipina és necessària per la correcta formació dels supercomplexes de la CRM (*Pfeiffer 2003; Osman 2011; Richter-Dennerlein 2014*). Semblaria que el defecte de complex V observat seria una conseqüència secundària a l'alteració de *DNAJC19*.

4.2.6 Consideracions en els estudis enzimàtics mitjançant la tècnica del Blue Native

Els estudis de Blue Native, ja sigui Western blot o les activitats en gel, ens donen informació sobre el correcte acoblament i funcionalitat dels complexos multiproteics que formen la cadena respiratòria mitocondrial. Com que es tracta d'un mètode qualitatiu, és important utilitzar en paral·lel altres metodologies que permetin una millor interpretació conjunta dels resultats obtinguts.

Tot i que el teixit d'elecció preferent per als estudis bioquímics és el teixit muscular, s'ha vist que els pacients amb mutacions al gen *NFUI* presenten patrons d'expressió dels complexos I, II i III de la CRM heterogenis en aquest tipus de teixit, a diferència que en els fibroblasts (*Navarro-Sastre 2011; Ferrer-Cortès 2012; Cameron 2011*). Per

tant, per a sospites de defectes de complex II, és convenient realitzar l'estudi també en fibroblasts cultivats.

Per altra banda, i donat que es tracta d'una metodologia que requereix teixits d'estudi que s'obtenen de forma invasiva, és important disposar del fenotip clínic del pacient en estudi, ja que determinats símptomes o patrons bioquímics (nivells de lactat, aminoàcids, àcids orgànics...) poden ser clau a l'hora d'enfocar els estudis posteriors i, per tant, de trobar la causa arrel de la malaltia.

L'activitat en el gel de Blue Native permet estudiar el complex V, de manera que aquesta serà sempre la metodologia d'elecció en aquells pacients on el perfil bioquímic o el fenotip clínic siguin indicatius d'aquest tipus de defecte.

A més a més, aquesta tècnica permet l'estudi estructural i enzimàtic del complex I en fibroblasts cultivats, la qual no es pot determinar mitjançant tècniques espectrofotomètriques.

Els estudis complementaris mitjançant la tècnica de Blue Native PAGE han contribuït positivament en la millora del rendiment diagnòstic en pacients amb sospita de malaltia mitocondrial, arribant al diagnòstic genètic en el 21% dels pacients estudiats, mentre que utilitzant únicament els estudis espectrofotomètrics d'activitat dels enzims de CRM, només en el 9,8% dels pacients estudiats s'havia arribat a un diagnòstic genètic definitiu.

4.3 Estudi de la via de síntesi del CoQ₁₀ en fibroblasts de pacients amb sospita de deficiència primària o secundària de CoQ₁₀

El CoQ (CoQ) és una molècula lipofílica present en totes les membranes cel·lulars i teixits que inicialment va ser descrita com a un component de la cadena respiratòria mitocondrial situat a la membrana interna mitocondrial, transferint electrons des del complex I (NADH-ubiquinona oxidoreductasa) i el complex II (succinat-ubiquinona oxidoreductasa) cap al complex III (ubiquinol-citocrom C reductasa). En els humans, la forma majoritària és el coenzim Q₁₀ (CoQ₁₀), tot i que el coenzim Q₉ (CoQ₉) també es pot trobar en petites quantitats degut a la incorporació a través de la dieta o de la síntesi per part de microorganismes intestinals (*Turunen 2004; Rahman 2012*).

El CoQ₁₀ està format per un anell de benzoquinona i una cadena lateral decaprenil. L'anell quinona deriva dels aminoàcids tirosina o fenilalanina, mentre que la cua isoprenoide prové de la via del mevalonat que, després de successives addicions de molècules de isopentenil difosfat (IPP) al farnesil difosfat per un procés enzimàtic complex catalitzat per la prenil-difosfat sintasa, acaba donant lloc a la formació de decaprenil difosfat (DPP). La via del mevalonat comprèn totes les reaccions que es donen des de l'acetil-coenzim A (acetil-CoA) fins a la obtenció de farnesil pirofosfat (FPP), que és el substrat per a la biosíntesi de CoQ, colesterol, dolicol i proteïnes isoprenilades. El FPP deriva a DPP i posteriorment aquest és condensat amb el parahidroxibenzoat (PHB) en una reacció catalitzada per la PHB-poliprenil transferasa (COQ2). Posteriorment, l'anell de benzoat és modificat almenys per 6 enzims que catalitzen reaccions de metilació, descarboxilació i hidroxilació per tal de sintetitzar la molècula de CoQ₁₀ final (Figura 23) (*Turunen 2004*).

Molts estudis reporten deficiències de CoQ₁₀ en pacients on les activitats dels complexos I+III i II+III de la cadena respiratòria estan disminuïdes, així com també nivells baixos de CoQ₁₀ tant en teixit muscular com en fibroblasts cultivats (*Ogasahara 1989; Rötig 2000; Rustin 2004; Salviati 2005; Horvath 2006; Quinzii 2007*). Les deficiències de CoQ₁₀ es poden classificar com a primàries, si venen causades per mutacions en gens involucrats en la via de biosíntesi de CoQ₁₀ (gens COQ), o secundàries, si són conseqüència de mutacions en gens no involucrats directament en la via de síntesi, com ara el gen que codifica per la deshidrogenasa de la flavoproteïna transferidora d'electrons (ETFDH) entre d'altres (*Gempel 2007; Liang 2009; Quinzii*

200; Aeby 2007). També s'han descrit deficiències secundàries en pacients afectes de malalties mitocondrials causades per mutacions o delecions en el ADN mitocondrial (ADNmt) (Matsuoka 1991; Sacconi 2010; Rahman 2012). Per altra banda, s'ha especulat de la existència de determinats factors genètics que poden conferir certa susceptibilitat a desenvolupar deficiències secundàries de CoQ₁₀ (Sacconi 2010).

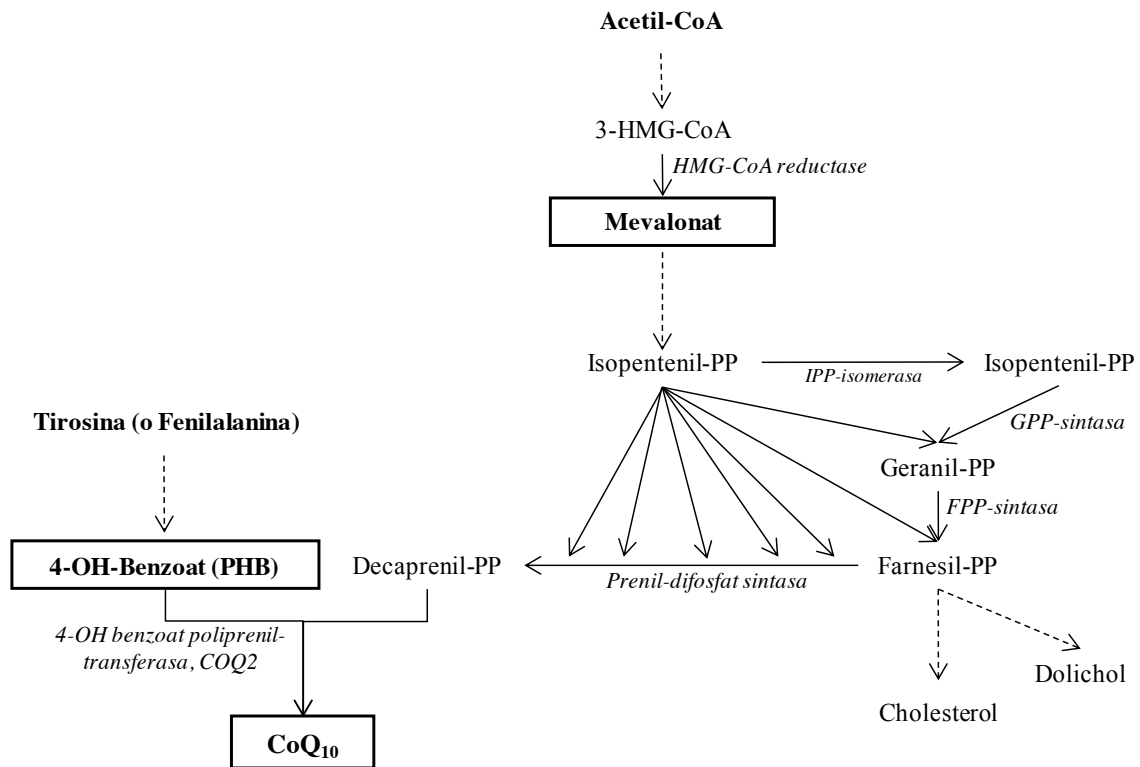


Figura 23. Esquema de la via de biosíntesi del CoQ₁₀. Modificada de Dallner (2000).

Generalment, el múscul esquelètic està considerat com al millor teixit per a la determinació de CoQ₁₀, però les biòpsies de múscul s'obtenen a través d'un procediment invasiu. Per això, disposar d'una tècnica que permetés fer un *screening* per a la determinació de deficiències de CoQ utilitzant mètodes no invasius, com ara les línies cel·lular limfoblastoides, els fibroblasts, els mioblasts o el limfòcits (Montero 2008; Rahman 2012; Arias 2012), suposaria un gran avantatge. Val a dir que, la gran diversitat de símptomes presents en aquest tipus de defectes juntament amb l'elevat nombre de gens involucrats en la via de síntesi i la elevada freqüència de deficiències secundàries, dificulten la obtenció d'un diagnòstic definitiu.

Les deficiències primàries s'han definit, fins al moment, com a desordres autosòmics recessius que presenten una bona resposta al tractament per complementació amb CoQ₁₀. La ràpida aplicació de tractament permet una millor correcció de la malaltia. Tenint en compte això, és molt important establir una metodologia bioquímica que permeti un ràpid diagnòstic d'aquestes deficiències primàries.

L'objectiu d'aquest treball va ser introduir una nova metodologia per a l'estudi de la biosíntesi endògena de CoQ₁₀ en fibroblasts que permet discriminar les deficiències primàries de les secundàries. L'estudi de la via de biosíntesis es va dur a terme utilitzant mevalonat deuterat (Meva-²H₃) i PHB marcat amb ¹³C (PHB-¹³C₆) com a precursors intermedis de la via; l'anàlisi del CoQ₁₀ marcat (²H₃-CoQ₁₀ i ³C₆-CoQ₁₀, respectivament) es va fer utilitzant un HPLC-MS/MS.

Els resultats d'aquest treball estan publicats en el següent article:

Characterization of CoQ₁₀ biosynthesis in fibroblasts of patients with primary and secondary CoQ₁₀ deficiency.

Buján, N., Arias, A., Montero, R., García-Villoria, J., Lissens, W., Seneca, S., Espinós, C., Navas, P., Der Meirleir, L., Artuch, R. Briones, P., i Ribes, A. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 2014; 37(1), 53–62.

4.3.1 Posta a punt de la metodologia

Per a la posta a punt de la metodologia es van utilitzar fibroblasts cultivats de pacients amb nivells de CoQ₁₀ dins els valors de normalitat, tant en fibroblasts com en teixit muscular. Els fibroblasts, procedents de biòpsia de pell, es varen fer créixer en medi DMEM complementat al 10% amb sèrum fetal boví (FBS) i 1% de penicilina-estreptomicina. Quan el cultiu arribava al 60-70% de confluència, es substituïa el medi de creixement per medi complementat amb els substrats marcats (PHB-¹³C₆ o Meva-²H₃). Inicialment es varen estudiar diversos temps d'incubació (24, 48 o 72 hores) així com també diferents concentracions de substrats precursors marcats: per al PHB-¹³C₆ es varen assajar concentracions de 1,65 mM i 3,3 mM; per al Meva-²H₃ es varen estudiar concentracions de 14 µM, 28 µM, 42 µM, 56 µM, 112 µM, 140 µM i 280 µM. Aquestes condicions es basaven en l'article publicat per *Tekle i col.* (Tekle 2008), on s'utilitzava

PHB i mevalonat radioactius (^{14}C -PHB i ^3H -mevalonat) a concentracions de 1,65 mM i 14 μM , respectivament. La utilització de substrats deuterats o marcats amb ^{13}C en comptes de substrats radioactius representa un gran avantatge per a la metodologia.

La quantificació del CoQ_{10} marcat es va fer per HPLC-MS/MS aplicant les condicions analítiques descrites per *Arias i col.* (*Arias 2012*), que es basen en el treball publicat per *Teshima i Kondo* (*Teshima 2005*), i utilitzant una corba de calibració externa i un estàndard intern (CoQ_9). La transició pel CoQ_{10} és de m/z 894>197 i de m/z 826>197 pel CoQ_9 . La síntesi de CoQ_{10} a partir de PHB- $^{13}\text{C}_6$ dóna lloc a la formació de $^{13}\text{C}_6$ - CoQ_{10} , mentre que a partir de Meva- $^2\text{H}_3$, s'obté $^2\text{H}_3$ - CoQ_{10} , els quals presenten una transició m/z de 900>203 i 897>197, respectivament (Figura 24).

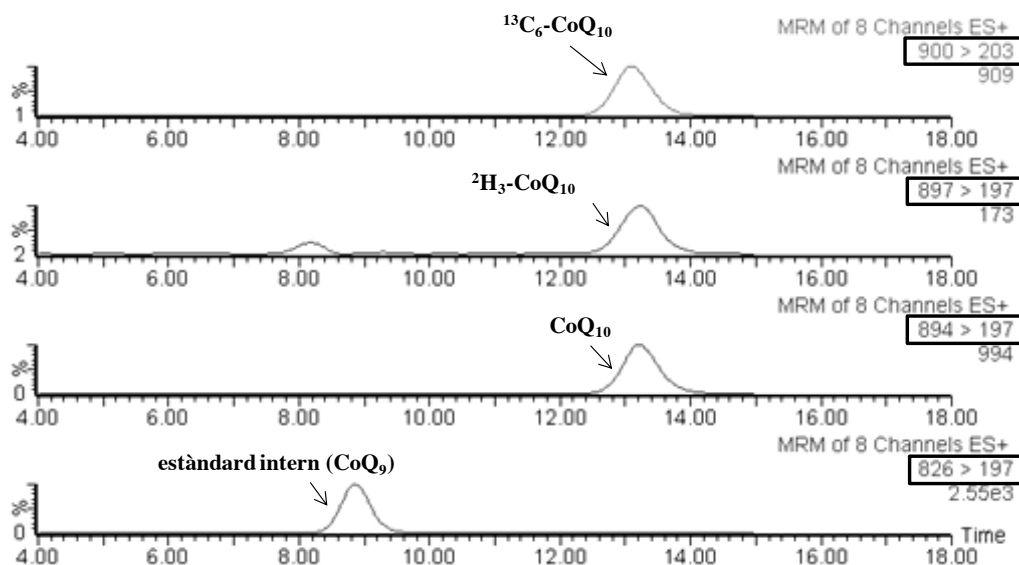


Figura 24. Quantificació, mitjançant HPLC-MS/MS, de la síntesi CoQ_{10} a partir de PHB- $^{13}\text{C}_6$ ($^{13}\text{C}_6$ - CoQ_{10}) i a partir de Meva- $^2\text{H}_3$ ($^2\text{H}_3$ - CoQ_{10}). També es mostren el pic de CoQ_{10} sintetitzat endògenament (CoQ_{10}) i el pic de CoQ_9 , utilitzat com a estàndard intern.

La determinació del contingut proteic i de l'activitat citrat sintasa de l'homogenat cel·lular es va dur a terme tal i com es descriu a l'apartat de Materials i Mètodes (*Biosíntesi de CoQ_{10} en fibroblasts*).

El límit de detecció (LOD) i el límit de quantificació (LLOQ) es varen establir mitjançant dilucions progressives de solució de calibració de CoQ_{10} i quan el nivell de *signal-to-noise ratio* (S/N) era almenys de 3 en el cas del LOD i quan $\text{S/N} > 10$, pel

LLOQ. D'aquesta manera, pel CoQ₁₀ es va definir el LOD a 0,001 nmol/L i el LLOQ a 0,01 nmol/L.

Els resultats obtinguts en fibroblasts mostraven que, utilitzant PHB-¹³C₆ com a precursor de la via (Figura 25-A), la biosíntesi de CoQ₁₀ augmentava linealment en

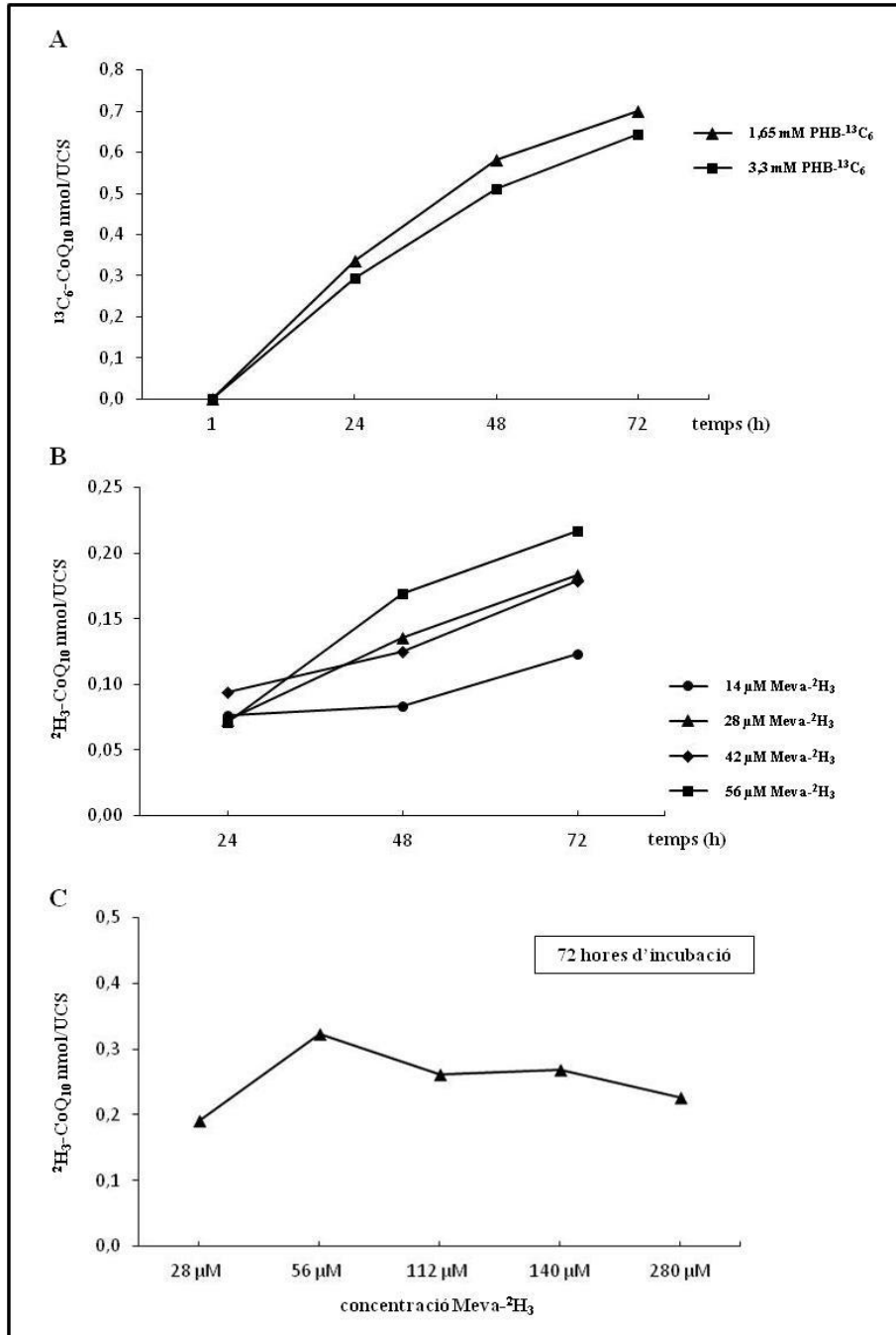


Figura 25. Biosíntesi de CoQ₁₀ utilitzant PHB-¹³C₆ i Meva-²H₃ com a substrats de la via a diferents concentracions i temps d'incubació. (A) Biosíntesi de ¹³C₆-CoQ₁₀ a partir de PHB-¹³C₆ a concentracions de 1,65 mM i 3,3 mM. (B) Biosíntesi de ²H₃-CoQ₁₀ a partir de Meva-²H₃ a concentracions de 14 a 56 μM, i fins a 280 μM i 72 h d'incubació (C).

funció del temps (24-72 hores) independentment de la concentració inicial de substrat (1,65 mM o 3,3 mM), i que la quantitat final de CoQ₁₀ marcat sintetitzat era la mateixa per a ambdues concentracions. Per altra banda, utilitzant Meva-²H₃ com a precursor en concentracions de 14 a 56 μM, la biosíntesi de CoQ₁₀ també era lineal en funció del temps (24-72h) però augmentava a major quantitat de precursor inicial (Figura 25-B). Donat que a major temps d'incubació, major biosíntesi de CoQ₁₀ hi havia, es varen estudiar concentracions més altes de Meva-²H₃ (112 μM, 140 μM i 280 μM) durant 72 hores d'incubació. Es va veure que la quantitat final de CoQ₁₀ marcat disminuïa quan s'utilitzaven concentracions de precursor Meva-²H₃ superiors a 56 μM (Figura 25-C). Així doncs, per tal de no treballar en condicions limitants, es va determinar que la concentració òptima de treball per a Meva-²H₃ era de 28 μM.

Per tant, amb els resultats obtinguts es varen fixar les concentracions de treball a 1,65 mM per al precursor PHB-¹³C₆ i 28 μM per al Meva-²H₃ durant 72 hores d'incubació, ja que aquestes condicions permetien obtenir un pic de CoQ₁₀ marcat (¹³C₆-CoQ₁₀ i ²H₃-CoQ₁₀) quantificable per HPLC-MS/MS.

Tekle i col. (2008) varen obtenir nivells baixos de CoQ₁₀ marcat quan utilitzaven ¹⁴C-PHB com a precursor, fet indicatiu de que l'anell de benzoquinona presenta una permeabilitat cel·lular limitada en les condicions de cultiu utilitzades. Per solucionar-ho varen afegir α-ciclodextrines al medi. Donats aquests resultats favorables, nosaltres també varem introduir aquest compost als nostres experiments. Les ciclodextrines són uns oligòmers cíclics formats per molècules de glucopiranososa que s'utilitzen per a la translocació de determinades molècules a l'interior de les cèl·lules, ja que presenten una superfície exterior hidrofílica i un espai intern hidrofòbic apte per a una gran varietat de compostos (*Szejtli 2004*). En el nostre cas, l'addició de α-ciclodextrina a una concentració de 2 mM va millorar lleugerament la quantitat de CoQ₁₀ a partir del PHB-¹³C₆ (¹³C₆-CoQ₁₀) (Figura 26-A). Tot i això, es va decidir utilitzar-ho donats els resultats observats per *Tekle i col. (2008)* i treballar en les condicions més òptimes.

Per tal d'eliminar qualsevol possible limitació hipotètica de la via de síntesi del CoQ₁₀ donada per una alteració en algun dels enzims implicats en la via, es va complementar el medi que contenia Meva-²H₃ amb PHB no marcat i el medi que contenia PHB-¹³C₆ amb mevalonat no marcat, en les mateixes concentracions que els seus homòlegs marcats. Els resultats obtinguts (Figura 26-B,C) mostraven que la complementació amb substrats

no marcats no millorava la biosíntesi de CoQ₁₀ marcat, de manera que es va decidir no afegir els substrats no marcats al medi d'incubació.

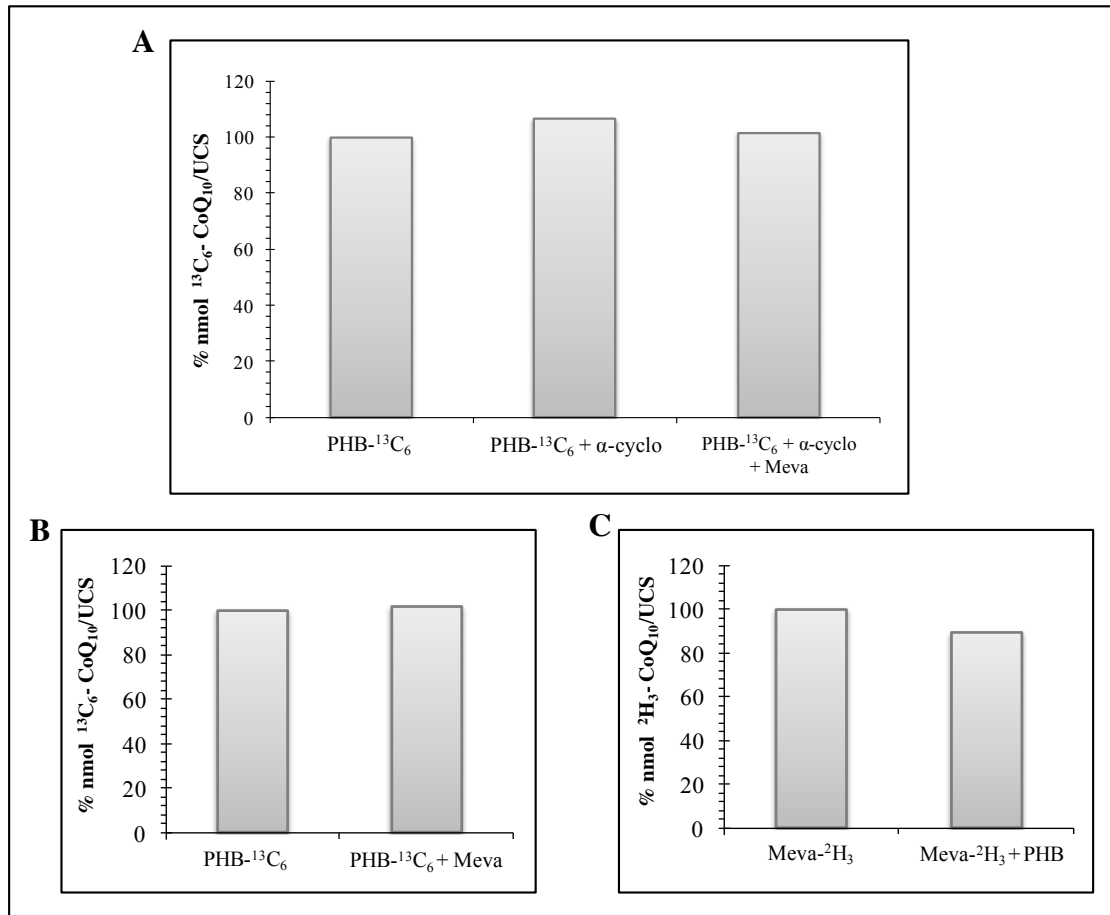


Figura 26. (A) Efecte de l'addició d'α-ciclodextrina al medi de reacció amb PHB-¹³C₆ sobre la síntesi de. (B) Efecte sobre la síntesi de ¹³C₆-CoQ₁₀ quan es complementa el medi de reacció que conté PHB-¹³C₆ amb mevalonat no marcat. (C) Efecte sobre la síntesi de ²H₃-CoQ₁₀ al complementar el medi de reacció que conté Meva-²H₃ amb PHB no marcat.

Finalment, les condicions de treball establertes varen ser 28 μM per a Meva-²H₃ i 1,65 mM per al PHB-¹³C₆ en presència de 2 mM de α-ciclodextrina durant un període d'incubació de 72 hores. La concentració de PHB-¹³C₆ utilitzada corresponia a la mateixa que Tekle *i col.* (2008) varen utilitzar en els seus estudis, mentre que la concentració del precursor Meva-²H₃ corresponia al doble que la utilitzada per Tekle *i col.* (2008). Tot i que les condicions per al Meva-²H₃ no eren saturants, es va determinar que eren adequades per als estudis de sobrecàrrega, ja que s'obtenien pics de CoQ₁₀ marcat perfectament quantificables que permetien reduir els costos de l'assaig. Els estudis de correlació entre ¹³C₆-CoQ₁₀ i el ²H₃-CoQ₁₀ quantificats per a una mateixa

mostra ens mostraven que ambdós productes tenien tendència a incrementar conjuntament (Bujan 2014) i això, junt amb que mesuraven diferents etapes en la biosíntesis del CoQ₁₀ es va decidir que l'estudi de la via de biosíntesis de CoQ es portés a terme utilitzant els dos substrats paral·lelament. Per altra banda, l'anàlisi en paral·lel de les dues vies permetria, en futurs estudis, determinar intermediaris acumulats en pacients que presentessin uns resultats de síntesi de CoQ₁₀ deficients, permetent acotar l'enzim defectuós de la via causant de la deficiència.

Un cop decidides les concentracions de treball dels substrats precursors, calia veure que les quantitats de precursor determinades no eren tòxiques per les cèl·lules. Per això es va dur a terme un test de viabilitat cel·lular (test descrit a l'apartat de *Materials i Mètodes*). Els resultats del test (Taula 15) varen demostrar que l'addició de Meva-²H₃ a una concentració de 28 µM no afectava l'estabilitat ni la viabilitat dels fibroblasts en cap dels temps d'incubació assajats (24-72h). El mateix resultat es va observar per el PHB-¹³C₆ a una concentració de 1,65 mM durant els temps d'incubació de 24 i 48h. Per altra banda, la viabilitat cel·lular dels fibroblasts es veia lleugerament reduïda (viabilitat del 80%) quan s'allargava el període d'incubació fins a les 72 hores d'incubació. Tot i això, el pic de ¹³C₆-CoQ₁₀ quantificat equivalia a 3 vegades el LLOQ i, per tant, es va decidir mantenir les 72 hores d'incubació per a aquest precursor.

Tractament		% viabilitat
Blanc		100 %
¹³ C ₆ -PHB 1,65 mM	24 hores	102 %
	48 hores	96 %
	72 hores	80 %
Meva- ² H ₃ 28 µM	24 hores	104 %
	48 hores	108 %
	72 hores	95 %

Taula 15. Efecte sobre la viabilitat cel·lular al afegir substrats marcats (¹³C₆-PHB i Meva-²H₃) al medi de cultiu.

Seguidament es varen dur a terme estudis de variació intraserie i interserie (coeficient de variació (CV)). Per a l'anàlisi de la variació intraserie es varen realitzar 6 anàlisis en paral·lel a partir d'un mateix cultiu cel·lular; mentre que, per a la variació interserie, l'anàlisi es va dur a terme 6 dies independents utilitzant la mateixa línia cel·lular. Pel que fa a la variabilitat intra-dia, els CV obtinguts varen ser del 10% per al PHB-¹³C₆ al

expressar els resultats com a nmol CoQ₁₀/gr proteïna i del 9% si s'expressaven com a nmol CoQ₁₀/UCS; respecte el Meva-²H₃, els CV varen ser del 12% i el 8%, expressats en nmol CoQ₁₀/g prot i nmol CoQ₁₀/UCS respectivament. Per que fa a la variabilitat inter-dia, els CV per al PHB-¹³C₆ varen ser del 19% al expressar-ho com a nmol CoQ₁₀/gr prot i del 4% si s'expressava com a nmol CoQ₁₀/UCS; en el cas del Meva-²H₃, els CV obtinguts varen ser del 13% i el 16% en nmol CoQ₁₀/gr prot i nmol CoQ₁₀/UCS, respectivament. Els CV obtinguts generalment milloraven quan s'expressaven en funció del contingut mitocondrial (nmol CoQ₁₀/UCS) i tots es varen considerar acceptables, tant per a la variació intraserie com per a la interserie. Donats aquests resultats, es va decidir expressar sempre els resultats referits en funció de l'enzim citrat sintasa.

Per tal d'establir un rang de valors control de referència es varen estudiar 13 línies cel·lulars de fibroblasts d'individus sense sospita de malaltia mitocondrial procedents del banc de teixits del nostre hospital. A partir dels valors obtinguts es va calcular la mitjana i es definí un rang de referència a partir de la mitjana±2SD: la mitjana (i el rang de referència) per a la biosíntesi de ¹³C₆-CoQ₁₀ i el ²H₃-CoQ₁₀ es varen definir a 0,94 (0,84-1,0) nmol/UCS i 0,13 (0,09-0,17) nmol/UCS, respectivament.

4.3.2 Validació del mètode

Per validar la metodologia i demostrar que permet distingir les deficiències primàries de CoQ₁₀ de les secundàries, es va estudiar la biosíntesi de CoQ₁₀ utilitzant els dos precursors marcats en un total de 7 pacients amb diagnòstic definitiu i que presentaven deficiència de CoQ₁₀ en fibroblasts (Taula 16):

- un pacient prèviament diagnosticat amb deficiència primària de CoQ₁₀ causada per una mutació en homozigosis al gen COQ2 (pacient 1), que codifica per l'enzim para-hidroxibenzoat poliprenil transferasa (OMIM*609825).
- 4 pacients diagnosticats amb altres errors congènits del metabolisme però amb deficiència de CoQ₁₀ en fibroblast: deficiència múltiple de Acil-CoA deshidrogenasa (MADD; OMIM#231680) (pacients 2 i 3), deficiència de la acil-CoA deshidrogenasa de cadena molt llarga (VLCADD; OMIM#201475) (pacient 4) i encefalopatia mitocondrial amb deficiència de complex III i mutació l'ADNmt (pacient 5).

- 2 pacients afectes de Nieman-Pick Tipus C (NPC; OMIM#257220), un trastorn del metabolisme lipídic que s'ha descrit que afecta secundàriament la síntesi de CoQ a través de la inhibició per feedback de la HMG-CoA reductasa a causa de l'acumul de colesterol (pacients 6-7).

Pacient	Diagnòstic	Mutació	Quantificació de CoQ ₁₀ (nmol/UCS)		Biosíntesi de CoQ ₁₀ (nmol/UCS)	
			fibroblasts	múscul	Meva- ² H ₃	PHB- ¹³ C ₆
1	COQ2	c.437G>A i c. c.437G>A ^a	0,4	ND	0,04	0,29
2	MADD-ETFB	c.124T>C i c.604_606delAAG	1,2	ND	0,17	0,87
3	MADD-ETFDH	c.779T>C i c.41_42ins14pb	1,9	ND	0,13	0,96
4	VLCAD	c.848T>C i c.1748C>T	1,9	ND	0,18	0,89
5	Deficiència complex III	m.3229A ins	1,7	1,8	0,17	0,91
mitjana control (mitjana±2SD) n=número de controls			2,4 (2,0-2,8) n=66	5,4 (2,7-8,5) n=37	0,13 (0,09-0,17) n=13	0,94 (0,84-1,0) n=13

Taula 16. Resum dels resultats obtinguts en els pacients estudiats per validar el nostre mètode. Els resultats alterats estan destacats en negreta. Cada valor individual correspon a la mitjana de, almenys, un duplicat.

^aMutació descrita prèviament per *Diomedi-Camassei (2007)*. ND:no determinat.

Tal i com s'esperava per al pacient amb deficiència primària de CoQ₁₀ causada per una mutació a *COQ2* (pacient 1), els resultats de biosíntesi mostraven una taxa de síntesis clarament reduïda, tant si s'utilitzava PHB-¹³C₆ (0,29 nmol/UCS; controls 0,84-1,0 nmol/UCS) com Meva-²H₃ (0,04 nmol/UCS; controls 0,09-0,170 nmol/UCS) com a substrats precursors. Un comportament similar ja s'havia observat anteriorment en un pacient portador d'una mutació en homozigosis a *COQ2* utilitzant ¹⁴C-PHB i ³H-decaprenil-difosfat com a substrats de la via (*Quinzii 2006*).

Per altra banda, i tal i com s'esperava, les taxes de síntesi de CoQ₁₀ varen resultar ser normals pels pacients 2-5, que presentaven una deficiència secundària de CoQ₁₀ derivada d'altres errors congènits del metabolisme (MADD, VLCADD, i deficiència de complex III).

La deficiència múltiple d'acil-CoA deshidrogenasa (MADD) està causada per defectes en la flavoproteïna transferidora d'electrons (*electron transfer flavoprotein*, ETF), que

està formada per dues subunitats, la subunitat α (ETF α) i la β (ETF β); en la ETF-ubiquinona oxidoreductasa (ETF-QO); o bé per una anormalitat, encara no del tot identificada, del metabolisme o el transport de les flavines (*Frerman 2001*). La ETF, que es troba a la matriu mitocondrial, transfereix electrons cap a la ETF-QO, localitzada a la membrana mitocondrial interna, i els electrons finalment passen a la ubiquinona i a la cadena respiratòria. S'ha descrit que mutacions en el gen *ETFDH*, que codifica per a la ETF-QO, poden causar deficiències secundàries de CoQ₁₀ (*Gemple 2007; Liang 2009*). *Olsen i col. (2003)* proposava que, com que el CoQ₁₀ és un acceptor directe d'electrons procedents de la ETF-QO, l'absència d'enzim reductor podria, via algun mecanisme de feedback, disminuir la síntesi de CoQ₁₀; alternativament, ells suggereixen que un error en la unió de l'enzim al CoQ₁₀ resultaria en una degradació excessiva de molècula acceptora, és a dir, de CoQ₁₀. Tot i això, la raó per la qual aquests pacients presenten deficiència de CoQ₁₀ no està del tot clara. Per altra banda, i tal i com s'esperava, en els dos pacients afectes de MADD amb mutacions als gens *ETFB* i *ETFDH* (pacients 2 i 3, respectivament), es va observar que la biosíntesi de CoQ₁₀ a partir de precursors marcats era completament normal, fet que demostrava que la deficiència de CoQ₁₀ observada en fibroblasts era secundària.

També varem tenir la oportunitat d'estudiar fibroblasts d'un pacient amb deficiència de acyl-CoA deshidrogenasa de cadena molt llarga (VLCADD) amb nivells de CoQ₁₀ en fibroblasts per sota dels valors de referència (pacient 4); la associació entre VLCADD i nivells deficients de CoQ₁₀ s'havia descrit prèviament només en un pacient, que també presentava activitats de cadena respiratòria per sota de la normalitat (*Laforêt 2009*). En l'estudi de la via de biosíntesi de CoQ₁₀ utilitzant substrats marcats es varen obtenir valors dins la normalitat, demostrant així, que la deficiència de CoQ₁₀ observada era secundària.

Per altra banda, a la bibliografia també trobem pacients amb delecions a l'ADNmt o mutacions puntuals al mt-tARN que presenten deficiències secundàries de CoQ₁₀ (*Matsuoka 1991; Sacconi 2010; Rahman 2011*). En el pacient número 5, amb una deficiència clara de complex III i un quadre simptomàtic corresponent a MELAS (*mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes*; OMIM#540000), portador de 3229AIns a l'ADNmt i amb deficiència de CoQ₁₀ tant en teixit muscular com en fibroblasts, es va observar que la via de síntesi de CoQ₁₀ presentava valors dins la normalitat.

A més a més, també es varen estudiar dos pacients (pacient 6 i pacient 7) afectes de Niemann-Pick tipus C (NPC) (Macías-Vidal 2011), una malaltia neurodegenerativa autosòmica recessiva caracteritzada per un defecte del transport intracel·lular de lípids i de colesterol que provoca un acúmulo de colesterol en els lisosomes; la majoria dels casos de NPC es deuen a mutacions al gen *NPCI*, que codifica per una proteïna de transport transmembrana de l'endosoma lipídic. Alguns autors havien observat que, en el fetge de models murins de NPC, l'acumulació de colesterol era paral·lela a l'increment de dolicol-P i a la disminució de les concentracions de CoQ₁₀ (Schedin 1998). La part inicial de la via del mevalonat implica la condensació de tres molècules de acetil-CoA per formar 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzim A (HMG-CoA). Posteriorment, la HMG-CoA reductasa converteix la molècula de HMG-CoA a mevalonat (Figura 23). El colesterol regula l'activitat de la HMG-CoA reductasa a través d'un mecanisme d'inhibició per *feedback*. En els pacients NPC, l'acumulació de colesterol reduiria l'activitat de la HMG-CoA reductasa, disminuint la formació de mevalonat i, conseqüentment, la síntesi de CoQ₁₀ (Turunen 2004). En els pacients afectes de NPC, (pacients 6 i 7) es va observar que la biosíntesi de CoQ₁₀ era normal quan s'utilitzava Meva-²H₃ com a precursor de la via, mentre que la formació de CoQ₁₀ es veia disminuïda quan s'utilitzava PHB-¹³C₆ (Taula 17). Administrant mevalonat a les cèl·lules, saltem el punt de regulació de la HMG-CoA reductasa, de manera que la via segueix el seu curs normal fins a la obtenció de CoQ₁₀; per altra banda, quan s'utilitza PHB com a substrat precursor de la via, la HMG-CoA reductasa és inhibida per l'acúmulo de colesterol, de manera que el ratio de decaprenil-PP disminueix i, com a conseqüència, la via de síntesi de CoQ queda trucada. En aquests pacients, es va repetir l'estudi afegint mevalonat no marcat al medi complementat amb PHB-¹³C₆ per tal de evitar la regulació de la via per part de la HMG-CoA reductasa i, així, millorar la biosíntesi de CoQ₁₀. No es va veure cap millora en la concentració final de CoQ₁₀ en l'estudi d'aquests pacients (Taula 17). Segurament hi hauria altres proteïnes implicades en la regulació de la via que no s'activarien només addicionant mevalonat al medi de creixement.

Tots aquests resultats obtinguts demostraven que aquesta metodologia és útil per a discriminar entre deficiències primàries i secundàries de CoQ₁₀.

Pacient	Diagnòstic	Mutació	Quantificació de CoQ ₁₀ (nmol/UCS)		Biosíntesi de CoQ ₁₀ (nmol/UCS)		
			fibroblasts	múscul	Meva- ² H ₃	PHB- ¹³ C ₆	PHB- ¹³ C ₆ + Meva
6	Niemann-Pick Tipus C	p.Arg978Cys ⁱ i p.Phe995Leu ^b	1,3	ND	0,13	0,54	0,54
7	Niemann-Pick Tipus C	p.Asn916del ⁱ i p.Ala1151Thr ^b	1,5	ND	0,10	0,60	0,57
mitjana control (mitjana±2SD) n=número de controls			2,4 (2,0-2,8) n=66	5,4 (2,7-8,5) n=37	0,13 (0,09-0,17) n=13	0,94 (0,84-1,0) n=13	

Taula 17. Biosíntesi de CoQ₁₀ en pacients afectes de Niemann-Pick tipus C. Els resultats alterats estan destacats en negreta. Cada valor individual correspon a la mitjana de, almenys, un duplicat.

^bMacias-Vidal 2011. ND: no determinat.

4.3.3 Estudi de la via de biosíntesi de CoQ₁₀ en pacients seleccionats

Un cop la metodologia d'estudi es va haver definit, es va procedir a l'anàlisi de pacients amb deficiència de CoQ₁₀ en fibroblasts i/o teixit muscular per tal de determinar si es tractava de deficiències primàries o secundàries.

Per a l'estudi de la via de síntesi, els pacients seleccionats es varen dividir en 3 grups:

- **grup 1:** 3 pacients (pacients 8-10) portadors d'una mutació en heterozigosis en un dels gens involucrats en la via de biosíntesi.
- **grup 2:** 5 pacients (pacients 11-15) que presentaven resposta clínica a la complementació oral amb CoQ₁₀ però sense mutacions en els gens estudiats.
- **grup 3:** 9 pacients (pacients 16-23) nous amb una clara deficiència de CoQ₁₀ en fibroblasts, sense mutacions en els gens estudiats o bé sense estudi mutacional ni resposta a tractament documentada.

També es va dur a terme l'estudi de els pares del pacient 8 (pacients 24 i 25).

En alguns d'aquests pacients seleccionats, anteriorment a la posta a punt de la metodologia per a l'estudi de la biosíntesi de CoQ₁₀, es va realitzar un *screening* mutacional en l'ADN genòmic de 13 gens implicats en la biosíntesi del CoQ₁₀ (*COQ2*, *COQ4*, *COQ9*, *COQ5*, *COQ3*, *COQ6*, *PDSS1*, *PDSS2*, *ADCK1*, *ADCK2*, *ADCK3*, *ADCK4* i *ADCK5*) (Taula 3). Aquest estudi es va dur a terme en col·laboració amb l'Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona i l'Institut de Biomedicina de València (Taula

18). L'ADN genòmic es va extreure de sang, fibroblasts cultivats o teixit utilitzant protocols estandarditzats (veure Materials i Mètodes).

Per altra banda, també es va aïllar l'ARN total de fibroblasts cultivats d'alguns d'aquests pacients i es va obtenir el cADN utilitzant protocols estàndard (veure Materials i Mètodes). Paral·lelament també es va extreure ARN de fibroblasts cultivats tractats amb una solució 500 µg/mL de cicloheximida (CHX) durant 7 hores per tal d'inhibir la degradació de mRNA pel procés de *nonsense mediated decay* (NMD). Es va dur a terme un screening mutacional de segments solapats de cADN dels gens *CABC1*, *PDSS1*, *PDSS2* i *COQ4* (Taula 18).

Pel que fa als resultats obtinguts per a la via de biosíntesi de CoQ₁₀, la Taula 19 en mostra un resum.

Els pacients que formen el **grup 1** (pacients 8-10) són portadors d'una mutació en heterozigosis en algun dels gens implicats en la via de síntesi. Malauradament, no s'ha pogut trobar una segona mutació en heterozigosis tot i l'estudi de cADN extret a partir de fibroblasts cultivats i tractats amb cicloheximida, que permet la detecció de mutacions d'splicing intròniques profundes. Només el pacient 8, amb una mutació en heterozigosi al gen *COQ4* (p.Glu161Asp), mostrava una síntesi de CoQ₁₀ deficient. Paral·lelament es va poder realitzar l'estudi mutacional en la mare (pacient 24) i el pare (pacient 25) d'aquest pacient i es va veure que el pare era portador de la mateixa mutació en heterozigosis. Es va procedir a l'estudi de biosíntesi de CoQ₁₀ en els pares i es va veure que pel pare (pacient 25) s'obtenien valors de biosíntesis completament normals, però en el cas de la mare (pacient 24), la síntesi de CoQ₁₀ donava valors just en el límit inferior del rang control quan s'usava PHB-¹³C₆ com a precursor de la via (0,84 nmol/UCS; rang control 0,84-1,0 nmol/UCS). Això es podria explicar, hipotèticament, per la presència d'una mutació en algun altre punt (desconegut) de la via de biosíntesi del COQ₁₀ que disminuiria la taxa de síntesi però que no mostraria efectes clínics quan es troba en heterozigosis. La mutació en heterozigosi present en els pacients 8 i 25 es defineix com a probablement perjudicial (*score* 1,000) quan s'analitza amb programes bio-informàtics de predicció de funcionalitat (PolyPhen-2). Donat que la presència d'aquesta mutació no causa efecte quan es troba en heterozigosi (pacient 25), es podria

	Pacient	Estudi molecular-gens de la via de CoQ													
		COQ1	COQ2	COQ3	COQ4	COQ5	COQ6	COQ9	PDSS1	PDSS2	ADCK1	ADCK2	ADCK3	ADCK4	ADCK5
grup 1	8				p. [Glu161Asp]/+										
	9											p.[Leu609Val]/+			
	10								p. [Ala380Thr]/+						
grup 2	11														
	12														
	13														
	14														
	15														
grup 3	16														
	17														
	18														
	19														
	20														
	21														
	22														
	23														
grup 4	24														
	25				p. [Glu161Asp]/+										

DNA genòmic sense mutació
 cDNA sense mutació
 no estudiat

Taula 18. Screening mutacional de gens relacionats amb la via de síntesi de CoQ₁₀ en pacients amb nivells deficitars de CoQ₁₀.

dir que el pacient 8 seria portador de dues alteracions genètiques (una mutació a *COQ4* i una altra mutació hipotètica en un altre gen, probablement procedent de la mare (pacient 24)) que juntes podrien explicar la deficiència observada. Aquesta família va ser candidata en els estudis de seqüenciació completa de l'exoma realitzats en col·laboració amb el CNAG (Centre Nacional d'Anàlisi Genòmica) per tal de seleccionar possibles gens candidats que expliquessin la deficiència de CoQ₁₀ observada. Actualment s'està duent a terme la interpretació dels resultats obtinguts però de moment no s'ha trobat el gen responsable de la deficiència.

Els altres dos pacients del grup 1 (pacients 9 i 10) són portadors d'una mutació en heterozigosis en els gens *ADCK3* (p.Leu609Val) i *PDSSI* (p.Ala380Thr). Tot i que els programes de predicció de funcionalitat (PolyPhen-2) classifiquen les dues mutacions com a probablement perjudicials (*score* 0,999 i 1,000, respectivament) els valors obtinguts mostraven una biosíntesi de CoQ₁₀ dins el rang de referència. Per tant, i tenint en compte que les activitats de cadena respiratòria en ambdós pacients eren normals, es podria dir que la deficiència de CoQ₁₀ observada seria secundària i que les mutacions per les quals són portadors, no són la causa de la deficiència.

Pel que fa als pacients del **grup 2**, pacients amb bona resposta clínica al tractament amb complementació amb CoQ₁₀ (*Pineda 2010*), tots excepte el pacient 12 i el 15, varen mostrar una biosíntesi de CoQ₁₀ deficient. Tot i que en la recerca mutacional realitzada no es va trobar cap canvi patològic, aquests resultats indicarien que es tracta de deficiències de CoQ₁₀ amb significació clínica. El pacient 15 és el pare del pacient 11, la clínica, les característiques bioquímiques i la resposta a tractament del qual ja es varen descriure prèviament (*Artuch 2006; Pineda 2010*). El pacient 15, amb una via de síntesi de CoQ₁₀ dins la normalitat, presentava un quadre clínic lleu que incloïa tremolor, certa alteració de la fluència, nistagme transitori i moviments oculars sacàdics que es va corregir amb tractament. Tot i que els seus nivells de CoQ₁₀ eren baixos en fibroblasts, la quantificació de CoQ₁₀ i les activitats dels enzims de cadena respiratòria en teixit muscular eren normals. Per contra, la seva filla (pacient 11), amb una atàxia més severa i alteracions bioquímiques tan en fibroblasts com en múscul, va mostrar una deficiència clara en la síntesi de CoQ₁₀. És possible que, en aquesta família, la malaltia vingui causada per mutacions en un gen on l'heterozigosis causi alteracions lleus com

les que presenta el pare i que la forma més severa de la malaltia present en la filla vingui causada per la mutació en homozigosis o bé per una heterozigosis composta.

Seria convenient la seqüenciació de l'exoma en els pacients del grup 2 per tal de poder definir els gens causants d'aquestes deficiències de CoQ₁₀.

En 4 dels 8 pacients del **grup 3** (pacients amb una clara deficiència de CoQ₁₀ en fibroblasts, sense estudi mutacional ni resposta a tractament documentada), presentaven una biosíntesi dins el rang de normalitat. Aquests pacients es podrien classificar com a deficiències secundàries de CoQ₁₀ no causades directament per una alteració en algun dels enzims implicats es la via de biosíntesi. Per contra, els resultats obtinguts pel pacient 23, igual que els obtinguts pel pacient 12 del grup 2, eren de difícil interpretació: la biosíntesi de CoQ₁₀ a partir del substrat precursor Meva-²H₃ estava en el límit inferior del rang control (0,09 nmol/UCS; control 0,09-0,17 nmol/UCS) i eren deficients (0,77 i 0,64 nmol/UCS, respectivament; control 0,84-1,0 nmol/UCS) quan s'utilitzava PHB-¹³C₆. Donats aquests resultats, és difícil definir si es tracta d'una deficiència primària o secundària de CoQ₁₀. Seria convenient complementar l'estudi amb l'anàlisi dels possibles intermediaris de la via acumulats o bé amb un estudi mutacional dels gens COQ o de la via del mevalonat.

La síntesis de CoQ₁₀ del pacient 16 estava lleugerament per sota el límit inferior quan s'utilitzava PHB-¹³C₆ com a substrat (0,7 nmol/UCS; control 0,84-1,0 nmol/UCS). Aquest pacient, que ja s'havia reportat anteriorment (*Montero 2009*), presenta depleció de ADNmt juntament amb deficiència de CoQ₁₀. Donat que fins ara no s'ha trobat cap relació directe entre la deficiència de CoQ₁₀ i la depleció de ADN mitocondrial, seria convenient realitzar seqüenciació de l'exoma per tal d'arribar a la causa arrel de la malaltia. Probablement aquesta associació es secundària, ja que un percentatge molt important de pacients amb depleció del mtADN presenten deficiència de CoQ (*Montero 2013*).

Pacient	Dades clíniques	Activitats de cadena respiratòria mitocondrial		Concentració CoQ ₁₀ (nmol/UCS)		Biosíntesis CoQ ₁₀		Gens COQ alterats/genotip	
		fibroblasts	múscul	fibroblasts	múscul	² H ₃ -Meva	¹³ C ₆ -PHB		
Grup 1	8	Hipotonia muscular, debilitat, retard psicomotor, rabdiomiolisis, CK elevades, acúmul às. grassos i cossos cetònics	normal	múltiples deficiències	2,6*	1,2	0,06	0,54	COQ4 p.[Glu161Asp]+[=]
	9	Ataxia	ND	normal	2,5*	1,3	0,23	0,91	ADCK3 p.[Leu609Val]+[=]
	10	Rabdiomiolisis, miopatia, CK elevades	normal	ND	1	ND	0,14	0,99	PDSS1 p.[Ala380Thr]+[=]
Grup 2	11	Ataxia, debilitat muscular, atrofia cerebel·lar (<i>Montero 2009</i>)	normal	↓CI+III, ↓CII+III	0,6*	2	0,04	0,63	NT
	12	Ataxia, retard psicomotor, mioclonies, atrofia cerebel·lar (<i>Schedin 1998</i>)	normal	ND	1,8*	ND	0,09	0,77	NT
	13	Ataxia, retard psicomotor, mioclonies, atrofia cerebel·lar (<i>Schedin 1998</i>)	normal	ND	0,9*	ND	0,07	0,55	NT
	14	Ataxia, retard psicomotor, epilèpsia, convulsions (<i>Schedin 1998</i>)	normal	normal	1,8*	1,6	0,08	0,78	NT
	15	Atrofia cerebel·lar, maldestresa, caigudes freqüents, nistagme (<i>Montero 2009</i>)	ND	normal	1,2*	7,9	0,14	1,05	NT
Grup 3	16	Hepatopatia, acidosis làctica i metabòlica, 78% depleció ADNmt	normal	↓CII+III	1	1,6	0,15	0,70	NT
	17	Retard psicomotor, cetosis i acidosis làctica	ND	ND	0,9	ND	0,12	0,82	NT
	18	Ataxia, síndrome cerebel·lar	ND	↓CI+III, ↓CII+III,	1,1*	3,8	0,14	0,91	ND
	19	Retard psicomotor, mioclonies, lactat i alanina elevats, hipoplàsia del corpus callosum	ND	↓CI+III, ↓CII+III, ↓CIV	2,9*	1,2	0,18	1,01	ND
	20	Miopatia amb intolerància al exercici, lactat i ratio lactat/piruvat elevats	normal	↓CI+III, ↓CII+III	1,3*	ND	0,12	0,96	ND
	21	Retard psicomotor, atrofia cerebel·lar, hipotonia, ataxia, cardiopatia hipertrofica	ND	múltiples deficiències	2,8*	1,3	0,11	0,86	ND
	22	Retard psicomotor, ataxia, epilèpsia, atrofia de cerebel. Posteriorment diagnosticat de lipofuscinosis neuronal ceroidea tipus 2	ND	ND	1,6	ND	0,12	0,65	ND
	23	Retard psicomotor, convulsions, atrofia cerebel·lar, epilèpsia	ND	↓CI	1,1	ND	0,09	0,64	ND
Pares	24	asimptomàtic	ND	ND	4,9*	ND	0,16	0,84	NT
	25	asimptomàtic	ND	ND	5,2*	ND	0,16	1,02	COQ4 p.[Glu161Asp]+[=]
		Valor control (mitjana±2SD): n=número de controls:			2,4 (2,0-2,8) n=66	5,4 (2,7-8,5) n=37	0,13 (0,09-0,17) n=13	0,94 (0,84-1,0) n=13	

Taula 19. Biosíntesis de CoQ₁₀ en pacients amb deficiència de CoQ₁₀ en múscul i/o fibroblasts. Grup 1: pacients amb una ola mutació en un dels gens COQ. Grup 2: pacients amb bona resposta clínica al tractament amb CoQ₁₀. Grup 3: pacients amb clara deficiència de CoQ₁₀ en fibroblasts, sense estudi mutacional ni resposta a tractament documentada. La biosíntesi de CoQ₁₀ s'ha evaluat quantificant el corresponent CoQ₁₀ marcat (nmol/UCS). Els resultats alterats estan destacats en negreta. Cada valor individual correspon a la mitjana de, almenys, un duplicat.

* Determinat per HPLC seguint la metodologia descrita (*Teshima 2005*). ND: no determinat; NT: no trobat.

Per altra banda, els resultats obtinguts pels pacient 17 i 22 no varen ser conclouents ja que usant PHB-¹³C6 com a substrat, la quantitat de CoQ₁₀ sintetitzat estava dins la normalitat, però amb Meva-³H₂, la biosíntesi era deficient. Probablement, la lleugera deficiència observada en el pacient 17 no resulti ser significativa, podent tractar-se d'una deficiència secundària de CoQ₁₀ derivada d'una altra patologia. El pacient 22 correspon a una nena que posteriorment a aquest estudi va ser diagnosticada de lipofusinosi neuronal ceroidea tipus 2 (OMIM#204500), un desordre neurodegeneratiu caracteritzat per l'acumulació de lipopigment en diferents patrons, però es desconeix el mecanisme que ho causa. Està descrit que els pacients afectes d'aquesta patologia acumulen formes de dolicol (*Cho 2005*), un producte secundari de la via del mevalonat; l'addició de substrat Meva-³H₂ podria contribuir afavorint la síntesi de dolicol, cosa que explicaria la deficient síntesi de CoQ₁₀ observada en els nostres estudis. Tot i això, la relació d'aquesta malaltia i la deficiència de CoQ₁₀ no s'ha descrit prèviament.

4.3.4 Anàlisi d'intermediaris de la via acumulats

L'anàlisi de possibles intermediaris acumulats de la via de biosíntesis es va iniciar basant-nos en el treball publicat per *Henneman i col. (2011)*.

A part de la quantificació del CoQ₁₀ marcat sintetitzat, els fibroblasts del pacient 1 (amb una mutació en homozigosis del gen COQ2) es varen analitzar de nou per tal de detectar possibles intermediaris de la via acumulats. Es va poder quantificar un pic corresponent a farnesil piro-fosfat (FPP) que no es detectava en el control (Figura 27). Aquests substrat acumulat és una conseqüència directa de la mutació en el gen COQ2, que bloqueja la via en aquest punt.

Aquests resultats obren una nova línia d'investigació per tal de determinar l'acumul de substrats en pacients amb una via de biosíntesi de CoQ₁₀ deficient que ens acostaria cap al punt on la via està truncada.

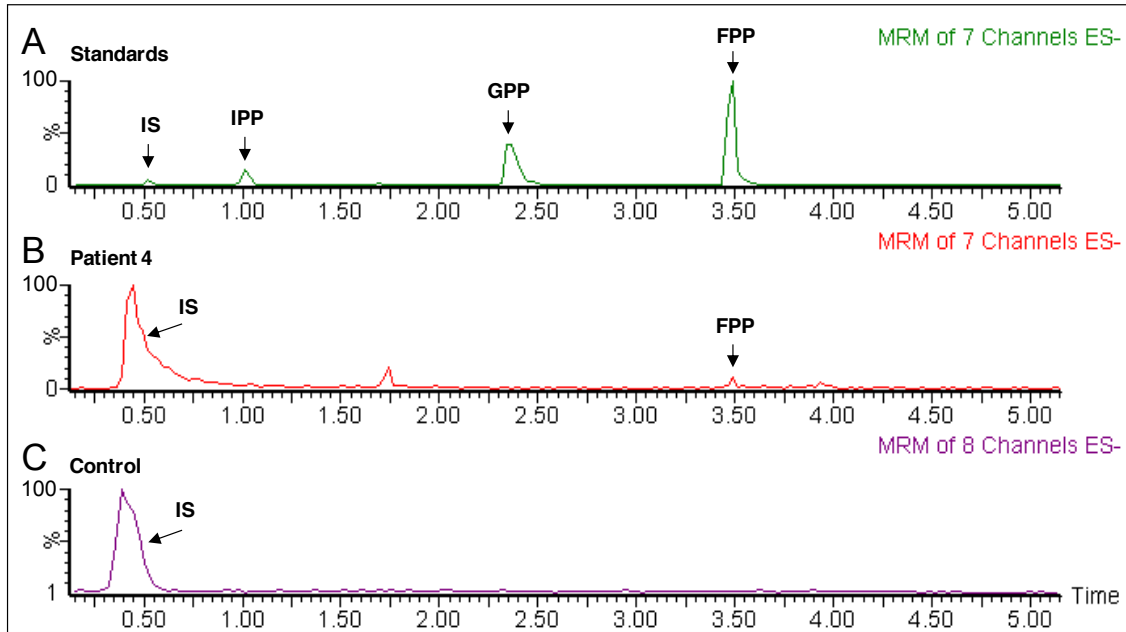


Figura 27. Quantificació per HPLC-MS/MS d'intermediaris de la via de síntesi de CoQ₁₀; IS (estàndard intern). **(A)** Anàlisi de solucions estàndard de isopentenil-PP (IPP), geranil-PP (GPP) i farnesil-PP (FPP). **(B)** Anàlisi d'intermediaris acumulats en fibroblasts cultivats del pacient 1. **(C)** No s'observen intermediaris acumulats en fibroblasts cultivats del pacient control.

4.3.5 Consideracions per l'estudi de la via de biosíntesi de CoQ₁₀ en fibroblasts

Tot i que, tal i com s'ha vist en els resultats obtinguts, s'ha pogut posar a punt una tècnica que permet discriminar entre defectes primaris i secundaris de CoQ₁₀, cal tenir en compte que els intervals de referència es podrien ajustar millor si es disposés de biòpsies de pell procedents de pacients sans.

Aquesta tècnica permet detectar deficiències primàries de CoQ₁₀ en pacients candidats. Això permet aplicar un tractament més acurat i, per tant, millora significativament la clínica dels pacients.

4.4 Protocol diagnòstic per a l'estudi de pacients amb sospita de malaltia mitocondrial

L'experiència adquirida al llarg del desenvolupament d'aquest treball ha contribuït a dissenyar un protocol d'estudi dels pacients amb sospita de malaltia mitocondrial (defectes en la CRM i de CoQ₁₀) entre l'Hospital Sant Joan de Déu (HSJD) i la Secció d'Errors congènits del metabolisme (Hospital Clínic de Barcelona). Donada la heterogeneïtat bioquímica dels pacients, aquest protocol d'estudi té l'objectiu de facilitar i/o acotar el diagnòstic en pacients amb sospita de malaltia mitocondrial i/o defecte de CoQ₁₀ (Figura 28).

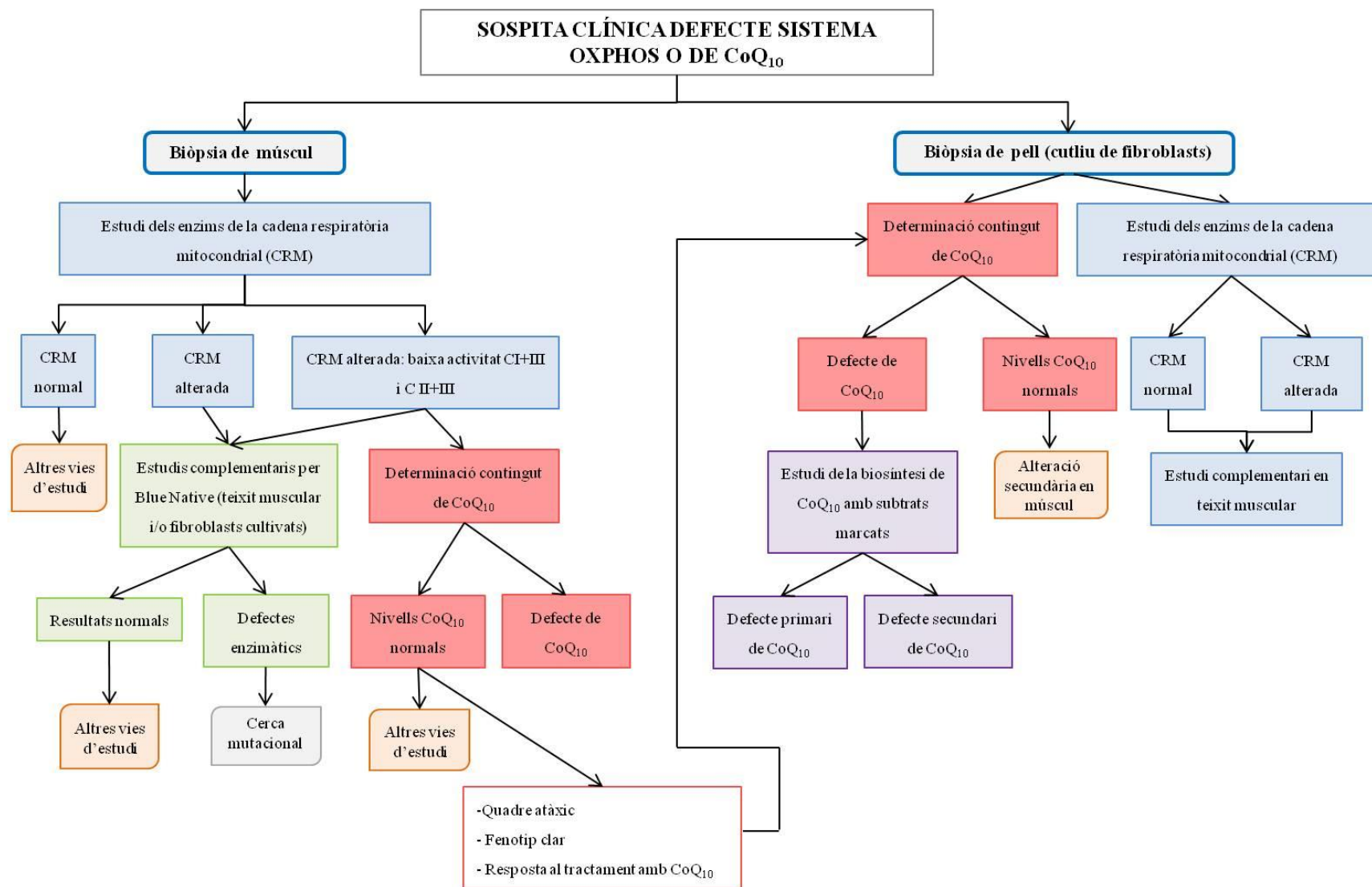


Figura 28. Protocol d'estudi dels pacients amb sospita de defecte en el sistema OXPPOS i defectes de CoQ₁₀.



CONCLUSIONS

5. CONCLUSIONS

- 1) S'ha implementat, a la Secció d'Errors Congènits del metabolisme (Hospital Clínic de Barcelona) una actualització metodològica per a l'estudi de les activitats dels enzims que formen la cadena respiratòria mitocondrial (CRM). Aquests nous mètodes han millorat considerablement l'estudi tant en teixit muscular com en fibroblasts cultivats obtinguts a partir de biòpsia de pell.
- 2) Els aspectes més crítics de la mesura dels enzims de la CRM eren la reproducibilitat en la determinació del complex I i el complex III aïllats i la linearitat en la determinació de l'activitat del complex IV, i després de l'adaptació metodològica s'ha millorat notablement la seva qualitat analítica.
- 3) L'estudi de la CRM s'ha implementat homogèniament en 7 centres de diagnòstic espanyols mitjançant la creació d'una xarxa espanyola per a l'estudi d'aquests enzims, amb l'objectiu de compartir experiència i facilitar el treball en equip per a uns diagnòstics més acurats.
- 4) S'ha establert l'electroforesis en Blue Native-gel com a tècnica complementària dels estudis espectrofotomètrics dels enzims de CRM, millorant significativament el rendiment diagnòstic en els pacients estudiats i el coneixement dels mecanismes de malaltia en alguns casos.
- 5) La tècnica del Blue Native-gel permet dur a terme l'estudi de l'activitat ATPasa del complex V, tant en teixit muscular com en fibroblats, i l'activitat del complex I en fibroblats, les quals no es poden determinar mitjançant tècniques espectrofotomètriques.
- 6) Els canvis aplicats i la implementació de la tècnica de Blue Native-gel han permès millorar notablement el rendiment diagnòstic dels pacients estudiats.
- 7) Aquestes millores metodològiques han jugat un paper essencial en l'estudi de determinats pacients, com ara la descripció per primera vegada de la deficiència de LIPT1 o la descripció d'algunes característiques especials en pacients amb alteració de la proteïna NFU1.

- 8) L'estudi de la via de síntesi de CoQ₁₀ en fibroblasts cultivats mitjançant substrats marcats permet detectar i discriminar entre deficiències primàries i secundàries de CoQ₁₀.
- 9) La posta a punt i millora del procediment de mesura de les activitats de la CRM, junt amb els estudis mitjançant la tècnica de Blue Native-gel i l'estudi de la via de biosíntesis endògena de CoQ₁₀ han millorat significativament la qualitat analítica i el diagnòstic en pacients amb sospita de malaltia mitocondrial en general i/o deficiència de CoQ₁₀ en particular.
- 10) L'experiència adquirida ha permès dissenyar i establir un protocol d'estudi dels pacients amb sospita de malaltia mitocondrial (defectes en la CRM i de CoQ₁₀) entre l'Hospital Sant Joan de Déu (HSJD) i la Secció d'Errors congènits del metabolisme (Hospital Clínic de Barcelona).



BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFIA

◆ A

- Acín-Pérez, R., Bayona-Bafaluy, M. P., Fernández-Silva, P., Moreno-Loshuertos, R., Pérez-Martos, A., Bruno, C., Moraes, C.T., i Enríquez, J. A. (2004). Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria. *Molecular Cell*, 13(6), 805–15.
- Aeby, A., Sznajer, Y., Cavé, H., Rebuffat, E., Van Coster, R., Rigal, O., i Van Bogaert, P. (2007). Cardiofaciocutaneous (CFC) syndrome associated with muscular coenzyme Q10 deficiency. *Journal of inherited metabolic disease*, 30(5), 827.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., i Walter, P. (2003). *Biología molecular de la célula* (4rta ed). Barcelona: Ediciones Omega.
- Alston, C. L., Davison, J. E., Meloni, F., van der Westhuizen, F. H., He, L., Hornig-Do, H.-T., Peet, A.C., Gissen, P., Goffrini, P., Ferrero, I., Wassmer, E., McFarland, R. i Taylor, R. W. (2012). Recessive germline SDHA and SDHB mutations causing leukodystrophy and isolated mitochondrial complex II deficiency. *Journal of Medical Genetics*, 49(9), 569–77.
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R., I Young, I. G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290(5806), 457–65.
- Angelini, C., Bresolin, N., Pegolo, G., Bet, L., Rinaldo, P., Trevisan, C., & Vergani, L. (1986). Childhood encephalomyopathy with cytochrome c oxidase deficiency, ataxia, muscle wasting, and mental impairment. *Neurology*, 36(8), 1048–52.
- Arias, A., García-Villoria, J., Rojo, A., Buján, N., Briones, P., i Ribes, A. (2012). Analysis of coenzyme Q(10) in lymphocytes by HPLC-MS/MS. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 908, 23–6.

- Artuch, R., Brea-Calvo, G., Briones, P., Aracil, A., Galván, M., Espinós, C., ... Pineda, M. (2006). Cerebellar ataxia with coenzyme Q10 deficiency: diagnosis and follow-up after coenzyme Q10 supplementation. *Journal of the Neurological Sciences*, 246(1-2), 153–8.

◆ **B**

- Barel, O., Shorer, Z., Flusser, H., Ofir, R., Narkis, G., Finer, G., Shalev, H., Nasasra, A., Saada, A., i Birk, O. S. (2008). Mitochondrial complex III deficiency associated with a homozygous mutation in UQCRCQ. *American Journal of Human Genetics*, 82(5), 1211–6.

- Beinert, H. (2000). Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* CCPublication of the Society of Biological Inorganic Chemistry, 5(1), 2–15.

- Bentinger, M., Tekle, M., & Dallner, G. (2010). Coenzyme Q--biosynthesis and functions. *Biochemical and biophysical research communications*, 396(1), 74-9.

- Bianchi, C., Genova, M. L., Parenti Castelli, G., i Lenaz, G. (2004). The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly: kinetic evidence using flux control analysis. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(35), 36562–9.

- Blakely, E. L., Mitchell, A. L., Fisher, N., Meunier, B., Nijtmans, L. G., Schaefer, A. M., Jackson, M., Turnbull, D.M., i Taylor, R. W. (2005). A mitochondrial cytochrome b mutation causing severe respiratory chain enzyme deficiency in humans and yeast. *The FEBS Journal*, 272(14), 3583–92.

- Booker, S. J., Cicchillo, R. M., i Grove, T. L. (2007). Self-sacrifice in radical S-adenosylmethionine proteins. *Current Opinion in Chemical Biology*, 11(5), 543–52.

- Boumans, H., Grivell, L. A., i Berden, J. A. (1998). The respiratory chain in yeast behaves as a single functional unit. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(9), 4872–7.

- Bourgeron, T., Rustin, P., Chretien, D., Birch-Machin, M., Bourgeois, M., Viegas-Péquignot, E., I Rötig, A. (1995). Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nature Genetics*, 11(2), 144–9.
- Brea-Calvo, G., Haack, T. B., Karall, D., Ohtake, A., Invernizzi, F., Carrozzo, R., ... Ghezzi, D. (2015). COQ4 mutations cause a broad spectrum of mitochondrial disorders associated with CoQ10 deficiency. *American Journal of Human Genetics*, 96(2), 309–17.
- Buján, N., Arias, A., Montero, R., García-Villoria, J., Lissens, W., Seneca, S., ... Ribes, A. (2014). Characterization of CoQ₁₀ biosynthesis in fibroblasts of patients with primary and secondary CoQ₁₀ deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 37(1), 53–62.
- Burgeois, M., Goutieres, F., Chretien, D., Rustin, P., Munnich, A., I Aicardi, J. (1992). Deficiency in complex II of the respiratory chain, presenting as a leukodystrophy in two sisters with Leigh syndrome. *Brain & Development*, 14(6), 404–8.

◆ C

- Cabezon, E., Butler, P. J., Runswick, M. J., i Walker, J. E. (2000). Modulation of the oligomerization state of the bovine F1-ATPase inhibitor protein, IF1, by pH. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(33), 25460–4.
- Calvo, S., Jain, M., Xie, X., Sheth, S. A., Chang, B., Goldberger, O. A., Spinazzola, A., Zeviani, M., Carr, S.A i Mootha, V. K. (2006). Systematic identification of human mitochondrial disease genes through integrative genomics. *Nature Genetics*, 38(5), 576–82.
- Cameron, J. M., Janer, A., Levandovskiy, V., Mackay, N., Rouault, T. A., Tong, W.-H., ... Robinson, B. H. (2011). Mutations in iron-sulfur cluster scaffold genes NFU1 and BOLA3 cause a fatal deficiency of multiple respiratory chain and 2-oxoacid dehydrogenase enzymes. *American Journal of Human Genetics*, 89(4), 486–95.

- Campanella, M., Parker, N., Tan, C. H., Hall, A. M., & Duchon, M. R. (2009). IF(1): setting the pace of the F(1)F(o)-ATP synthase. *Trends in Biochemical Sciences*, 34(7), 343–50.
- Carrozzo, R., Wittig, I., Santorelli, F. M., Bertini, E., Hofmann, S., Brandt, U., i Schägger, H. (2006). Subcomplexes of human ATP synthase mark mitochondrial biosynthesis disorders. *Annals of Neurology*, 59(2), 265–75
- Cho, S. K., Gao, N., Pearce, D. A., Lehrman, M. A., i Hofmann, S. L. (2005). Characterization of lipid-linked oligosaccharide accumulation in mouse models of Batten disease. *Glycobiology*, 15(6), 637–48.
- Crane, F. L., Hatefi, Y., Lester, R. L., i Widmer, C. (1957). Isolation of a quinone from beef heart mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 25(1), 220–1.
- Cruciat, C. M., Hell, K., Fölsch, H., Neupert, W., & Stuart, R. A. (1999). Bcs1p, an AAA-family member, is a chaperone for the assembly of the cytochrome bc(1) complex. *The EMBO Journal*, 18(19), 5226–33.
- Cwerman-Thibault, H., Sahel, J.-A., i Corral-Debrinski, M. (2011). Mitochondrial medicine: to a new era of gene therapy for mitochondrial ADN mutations. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 34(2), 327–344.

◆ **D**

- Dallner, G., i Sindelar, P. J. (2000). Regulation of ubiquinone metabolism. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(3-4), 285–294.
- Dallner, G., Brismar, K., Chojnacki, T., & Swiezewska, E. (2003). Regulation of coenzyme Q biosynthesis and breakdown. *BioFactors (Oxford, England)*, 18(1-4), 11–22.
- Darin, N., Oldfors, A., Moslemi, A. R., Holme, E., i Tulinius, M. (2001). The incidence of mitochondrial encephalomyopathies in childhood: clinical features and morphological, biochemical, and ADN abnormalities. *Annals of Neurology*, 49(3), 377–83.

- Davey, K. M., Parboosingh, J. S., McLeod, D. R., Chan, A., Casey, R., Ferreira, P., ... Bernier, F. P. (2006). Mutation of DNAJC19, a human homologue of yeast inner mitochondrial membrane co-chaperones, causes DCMA syndrome, a novel autosomal recessive Barth syndrome-like condition. *Journal of Medical Genetics*, 43(5), 385–93.
- Debray, F.-G., Lambert, M., & Mitchell, G. A. (2008). Disorders of mitochondrial function. *Current Opinion in Pediatrics*, 20(4), 471–82.
- De Meirleir, L., Seneca, S., Damis, E., Sepulchre, B., Hoorens, A., Gerlo, E., ... Van Coster, R. (2003). Clinical and diagnostic characteristics of complex III deficiency due to mutations in the BCS1L gene. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 121A(2), 126–31.
- Diaz, F., Fukui, H., Garcia, S., i Moraes, C. T. (2006). Cytochrome c oxidase is required for the assembly/stability of respiratory complex I in mouse fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology*, 26(13), 4872–81.
- Diomedei-Camassei, F., Di Giandomenico, S., Santorelli, F. M., Caridi, G., Piemonte, F., Montini, G., ... Emma, F. (2007). COQ2 nephropathy: a newly described inherited mitochondriopathy with primary renal involvement. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 18(10), 2773–80.
- DiMauro, S., i Davidzon, G. (2005). Mitochondrial ADN and disease. *Annals of Medicine*, 37(3), 222–32.
- DiMauro, S. (2007). Mitochondrial ADN medicine. *Bioscience Reports*, 27(1-3), 5–9.
- Doimo, M., Desbats, M. a., Cerqua, C., Cassina, M., Trevisson, E., & Salviati, L. (2014). Genetics of Coenzyme Q10 Deficiency. *Molecular Syndromology*, 156–162.
- Dudkina, N. V., Sunderhaus, S., Boekema, E. J., i Braun, H.-P. (2008). The higher level of organization of the oxidative phosphorylation system: mitochondrial supercomplexes. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 40(5), 419–24.
- Dudkina, N. V., Kouril, R., Peters, K., Braun, H.-P., I Boekema, E. J. (2010). Structure and function of mitochondrial supercomplexes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1797(6-7), 664–70.

- Duncan, A. J., Bitner-Glindzicz, M., Meunier, B., Costello, H., Hargreaves, I. P., López, L. C., Hirano, M., et al. (2009). A nonsense mutation in COQ9 causes autosomal-recessive neonatal-onset primary coenzyme Q10 deficiency: a potentially treatable form of mitochondrial disease. *American Journal of human genetics*, 84(5), 558-66.

◆ **E**

- Elston, T., Wang, H., i Oster, G. (1998). Energy transduction in ATP synthase. *Nature*, 391(6666), 510–3.

- Eubel, H., Jänsch, L., i Braun, H.-P. (2003). New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II. *Plant Physiology*, 133(1), 274–86.

- Eubel, H., Heinemeyer, J., Sunderhaus, S., i Braun, H.-P. (2004). Respiratory chain supercomplexes in plant mitochondria. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB / Société Française de Physiologie Végétale*, 42(12), 937–42.

◆ **F**

- Fang, X., i Lee, C. S. (2009). Proteome characterization of mouse brain mitochondria using electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Methods in Enzymology*, 457, 49–62.

- Fassone, E., i Rahman, S. (2012). Complex I deficiency: clinical features, biochemistry and molecular genetics. *Journal of Medical Genetics*, 49(9), 578–90.

- Ferrer-Cortès, X., Font, A., Bujan, N., Navarro-Sastre, A., Matalonga, L., Arranz, J. A., ... Tort, F. (2013). Protein expression profiles in patients carrying NFU1 mutations. Contribution to the pathophysiology of the disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 36(5), 841–7.

- Festenstein, G. N., Heaton, F. W., Lowe, J. S, i Morton, R.A. J (1955). A constituent of the unsaponifiable portion of animal tissue lipids (λ max. 272 m μ). *The Biochemical Journal*, 59(4), 558–66.

- Frerman FE, Goodman SI. (2001) Defects of electron transfer flavoprotein and electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase: glutaric academia type II. The metabolic and molecular bases of inherited disease. New York: McGraw-Hill.

◆ G

- Galante, Y. M. i Hatefi, Y. (1979). Purification and molecular and enzymic properties of mitochondrial NADH dehydrogenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 192(2), 559–68.

- Gellerich, F. N., Mayr, J. a., Reuter, S., Sperl, W., i Zierz, S. (2004). The problem of interlab variation in methods for mitochondrial disease diagnosis: Enzymatic measurement of respiratory chain complexes. *Mitochondrion*, 4, 427–439.

- Gempel, K., Topaloglu, H., Talim, B., Schneiderat, P., Schoser, B. G. H., Hans, V. H., Pálmafy, B., Kale, G., Tokatli, A., Quinzii, C., Hirano, M., Naini, A., DiMauro, S., Prokisch, H., Lochmüller, H., i Horvath, R. (2007). The myopathic form of coenzyme Q₁₀ deficiency is caused by mutations in the electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase (ETFDH) gene. *Brain : A Journal of Neurology*, 130(Pt 8), 2037–44.

- Gerards, M., van den Bosch, B., Calis, C., Schoonderwoerd, K., van Engelen, K., Tijssen, M., de Coo, R., et al. (2010). Nonsense mutations in CABC1/ADCK3 cause progressive cerebellar ataxia and atrophy. *Mitochondrion*, 10(5), 510-5.

- Ghezzi, D., Goffrini, P., Uziel, G., Horvath, R., Klopstock, T., Lochmüller, H., D'Adamo, P., Gasparini, P., Strom, T.M., Prokisch, H., Invernizzi, F., Ferrero, I., i Zeviani, M. (2009). SDHAF1, encoding a LYR complex-II specific assembly factor, is mutated in SDH-defective infantile leukoencephalopathy. *Nature Genetics*, 41(6), 654–6.

- Ghezzi, D., Arzuffi, P., Zordan, M., Da Re, C., Lamperti, C., Benna, C., D'Adamo, P., Diodato, D., Costa, R., Mariotti, C., Uziel, G., Smiderle, C. i Zeviani, M. (2011).

Mutations in TTC19 cause mitochondrial complex III deficiency and neurological impairment in humans and flies. *Nature Genetics*, 43(3), 259–63.

- Gironi, M., Lamperti, C., Nemni, R., Moggio, M., Comi, G., Guerini, F. R., ... DiMauro, S. (2004). Late-onset cerebellar ataxia with hypogonadism and muscle coenzyme Q₁₀ deficiency. *Neurology*, 62(5), 818–20.

- Grace, M., Fletcher, L., Powers, S. K., Hughes, M., & Coombes, J. (1996). A comparison of maximal bioenergetic enzyme activities obtained with commonly used homogenization techniques. *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, 36(4), 281–6.

◆ **H**

- Henneman, L., van Cruchten, A. G., Kulik, W., & Waterham, H. R. (2011). Inhibition of the isoprenoid biosynthesis pathway; detection of intermediates by UPLC-MS/MS. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1811(4), 227–33.

- Heeringa, S. F., Chernin, G., Chaki, M., Zhou, W., Sloan, A. J., Ji, Z., Xie, L. X., et al. (2011). COQ6 mutations in human patients produce nephrotic syndrome with sensorineural deafness. *The Journal of clinical investigation*, 121(5), 2013–24.

- Hiltunen, J. K., Autio, K. J., Schonauer, M. S., Kursu, V. A. S., Dieckmann, C. L., i Kastaniotis, A. J. (2010). Mitochondrial fatty acid synthesis and respiration. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1797(6-7), 1195–202.

- Hirano, M., Marti, R., Ferreira-Barros, C., Vilà, M. R., Tadesse, S., Nishigaki, Y., Nishino, I., i Vu, T. H. (2001). Defects of intergenomic communication: autosomal disorders that cause multiple deletions and depletion of mitochondrial ADN. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 12(6), 417–27.

- Honzík, T., Tesarová, M., Mayr, J. A., Hansíková, H., Jesina, P., Bodamer, O., ... Zeman, J. (2010). Mitochondrial encephalocardio-myopathy with early neonatal onset due to TMEM70 mutation. *Archives of Disease in Childhood*, 95(4), 296–301.

- Horvath, R., Schneiderat, P., Schoser, B. G. H., Gempel, K., Neuen-Jacob, E., Plöger, H., ... Lochmüller, H. (2006). Coenzyme Q10 deficiency and isolated myopathy. *Neurology* 66, 253–255.
- Houstek, J., Klement, P., Floryk, D., Antonická, H., Hermanská, J., Kalous, M., Hansíková, H., et al. (1999). A novel deficiency of mitochondrial ATPase of nuclear origin. *Human molecular genetics*, 8(11), 1967–74.
- Houstek, J., Kmoch, S., & Zeman, J. (2009). TMEM70 protein - a novel ancillary factor of mammalian ATP synthase. *Biochimica et biophysica acta*, 1787(5), 529–32.
- Hsu, A. Y., Do, T. Q., Lee, P. T., i 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(2-3), 287-97.

◆ J

- Janssen, A. J. M., Smeitink, J. A. M., & van den Heuvel, L. P. (2003). Some practical aspects of providing a diagnostic service for respiratory chain defects. *Annals of Clinical Biochemistry*, 40(Pt 1), 3–8.
- Janssen, R. J. R. J., van den Heuvel, L. P., & Smeitink, J. A. M. (2004). Genetic defects in the oxidative phosphorylation (OXPHOS) system. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 4(2).
- Jackson, C. B., Nuoffer, J.-M., Hahn, D., Prokisch, H., Haberberger, B., Gautschi, M., Häberli, A., Gallati, S., i Schaller, A. (2014). Mutations in SDHD lead to autosomal recessive encephalomyopathy and isolated mitochondrial complex II deficiency. *Journal of Medical Genetics*, 51(3), 170–5.
- Johnson, D. C., Dean, D. R., Smith, A. D., i Johnson, M. K. (2005). Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annual Review of Biochemistry*, 74, 247–81.

- Jonckheere, A. I., Smeitink, J. A. M., & Rodenburg, R. J. T. (2012). Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 35(2), 211–25.

◆ **K**

- Kinoshita, K., Adachi, K., i Itoh, H. (2004). Rotation of F1-ATPase: how an ATP-driven molecular machine may work. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 33, 245–68.

- Kirby, D. M., i Thorburn, D. R. (2008). Approaches to finding the molecular basis of mitochondrial oxidative phosphorylation disorders. *Twin Research and Human Genetics : The Official Journal of the International Society for Twin Studies*, 11(4), 395–411.

- Klement, P., Nijtmans, L. G., Van den Bogert, C., i Houstěk, J. (1995). Analysis of oxidative phosphorylation complexes in cultured human fibroblasts and amniocytes by blue-native-electrophoresis using mitoplasts isolated with the help of digitonin. *Analytical biochemistry*, 231(1), 218–24.

- Koene, S., & Smeitink, J. (2009). Mitochondrial medicine: entering the era of treatment. *Journal of Internal Medicine*, 265(2), 193–209.

◆ **L**

- Laforêt, P., Acquaviva-Bourdain, C., Rigal, O., Brivet, M., Penisson-Besnier, I., Chabrol, B., ... Vianey-Saban, C. (2009). Diagnostic assessment and long-term follow-up of 13 patients with Very Long-Chain Acyl-Coenzyme A dehydrogenase (VLCAD) deficiency. *Neuromuscular Disorders : NMD*, 19(5), 324–9.

- Lagier-Tourenne, C., Tazir, M., López, L. C., Quinzii, C. M., Assoum, M., Drouot, N., Busso, C., 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(3), 661-72.

- Lamperti, C., Naini, A., Hirano, M., De Vivo, D. C., Bertini, E., Servidei, S., ... DiMauro, S. (2003). Cerebellar ataxia and coenzyme Q10 deficiency. *Neurology*, *60*(7), 1206–1208.
- Law, L. K., Tang, N. L. S., Hui, J., Lam, C. W. K., & Fok, T. F. (2003). 3-methylglutaconic aciduria in a Chinese patient with glycogen storage disease Ib. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *26*(7), 705–9.
- Le Ber, I., Dubourg, O., Benoist, J.-F., Jardel, C., Mochel, F., Koenig, M., ... Dürr, A. (2007). Muscle coenzyme Q10 deficiencies in ataxia with oculomotor apraxia 1. *Neurology*, *68*(4), 295–7. doi:10.1212/01.wnl.0000252366.10731.43
- Liang, W.-C., Ohkuma, A., Hayashi, Y. K., López, L. C., Hirano, M., Nonaka, I., ... Nishino, I. (2009). ETFDH mutations, CoQ10 levels, and respiratory chain activities in patients with riboflavin-responsive multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Neuromuscular Disorders : NMD*, *19*(3), 212–6.
- Lill, R., Hoffmann, B., Molik, S., Pierik, A. J., Rietzschel, N., Stehling, O., ... Mühlenhoff, U. (2012). The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1823*(9), 1491–508.
- Lin, T.-K., Liou, C.-W., Chen, S.-D., Chuang, Y.-C., Tiao, M.-M., Wang, P.-W., ... Chuang, J.-H. (2009). Mitochondrial dysfunction and biogenesis in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Chang Gung Medical Journal*, *32*(6), 589–99.
- López, L. C., Schuelke, M., Quinzii, C. M., Kanki, T., Rodenburg, R. J. T., Naini, A., ... 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*(6), 1125–9.
- López, L. C., Quinzii, C. M., Area, E., Naini, A., Rahman, S., Schuelke, M., ... Hirano, M. (2010). Treatment of CoQ(10) deficient fibroblasts with ubiquinone, CoQ analogs, and vitamin C: time- and compound-dependent effects. *PloS One*, *5*(7), e11897.

- Lowry, O. H., Risenbough, N. J., Farr, A. L., I Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, 193(1), 265-75

◆ **M**

- Macías-Vidal, J., Rodríguez-Pascau, L., Sánchez-Ollé, G., Lluch, M., Vilageliu, L., Grinberg, D., & Coll, M. J. (2011). Molecular analysis of 30 Niemann-Pick type C patients from Spain. *Clinical Genetics*, 80(1), 39–49.

- Matsuoka, T., Maeda, H., Goto, Y., i Nonaka, I. (1991). Muscle coenzyme Q10 in mitochondrial encephalomyopathies. *Neuromuscular Disorders : NMD*, 1(6), 443–7.

- Mayr, J. A., Zimmermann, F. A., Fauth, C., Bergheim, C., Meierhofer, D., Radmayr, D., ... Sperl, W. (2011). Lipoic acid synthetase deficiency causes neonatal-onset epilepsy, defective mitochondrial energy metabolism, and glycine elevation. *American Journal of Human Genetics*, 89(6), 792–7.

- Medja, F., Allouche, S., Frachon, P., Jardel, C., Malgat, M., Mousson de Camaret, B., ... Lombès, A. (2009). Development and implementation of standardized respiratory chain spectrophotometric assays for clinical diagnosis. *Mitochondrion*, 9(5), 331–9.

- Miyake, N., Yano, S., Sakai, C., Hatakeyama, H., Matsushima, Y., Shiina, M., Watanabe, Y., Bartley, J., Abdenur, J.E., Wang, R.Y., Chang, R., Tsurusaki, Y., Doi, H., Nakashima, M., Saitsu, H., Ogata, K., Goto Y., i Matsumoto, N. (2013). Mitochondrial complex III deficiency caused by a homozygous UQCRC2 mutation presenting with neonatal-onset recurrent metabolic decompensation. *Human Mutation*, 34(3), 446–52.

- Mollet, J., Giurgea, I., Schlemmer, D., Dallner, G., Chretien, D., Delahodde, A., Bacq, D., et al. (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(3), 765-72.

- Mollet, J., Delahodde, A., Serre, V., Chretien, D., Schlemmer, D., Lombes, A., Boddaert, N., et al. (2008). CABC1 gene mutations cause ubiquinone deficiency with cerebellar ataxia and seizures. *American Journal of human genetics*, 82(3), 623-30.
- Montero, R., Artuch, R., Briones, P., Nascimento, A., García-Cazorla, A., Vilaseca, M. A., ... Pineda, M. (2005). Muscle coenzyme Q₁₀ concentrations in patients with probable and definite diagnosis of respiratory chain disorders. *BioFactors (Oxford, England)*, 25(1-4), 109–15.
- Montero, R., Sánchez-Alcázar, J. A., Briones, P., Hernández, A. R., Cordero, M. D., Trevisson, E., ... Artuch, R. (2008). Analysis of coenzyme Q₁₀ in muscle and fibroblasts for the diagnosis of CoQ₁₀ deficiency syndromes. *Clinical Biochemistry*, 41(9), 697–700.
- Montero, R., Sánchez-Alcázar, J. A., Briones, P., Navarro-Sastre, A., Gallardo, E., Bornstein, B., ... Artuch, R. (2009). Coenzyme Q₁₀ deficiency associated with a mitochondrial DNA depletion syndrome: a case report. *Clinical Biochemistry*, 42(7-8), 742–5.
- Montero, R., Grazina, M., López-Gallardo, E., Montoya, J., Briones, P., Navarro-Sastre, A., ... Navas, P. (2013). Coenzyme Q₁₀ deficiency in mitochondrial DNA depletion syndromes. *Mitochondrion*, 13(4), 337–341.
- Moslemi, A.-R., i Darin, N. (2007). Molecular genetic and clinical aspects of mitochondrial disorders in childhood. *Mitochondrion*, 7(4), 241–52.
- Musumeci, O., Naini, a, Slonim, a E., Skavin, N., Hadjigeorgiou, G. L., Krawiecki, N., ... DiMauro, S. (2001). Familial cerebellar ataxia with muscle coenzyme Q₁₀ deficiency. *Neurology*, 56(7), 849–55.

◆ N

- Navarro-Sastre, A., Tort, F., Stehling, O., Uzarska, M. A., Arranz, J. A., Del Toro, M., ... Lill, R. (2011). A fatal mitochondrial disease is associated with defective NFU1 function in the maturation of a subset of mitochondrial Fe-S proteins. *American Journal of Human Genetics*, 89(5), 656–67.

- Nelson, D.L., i Cox, M.M. (2005). Lehninger. Principios de bioquímica (4ta ed). Barcelona: Ediciones Omega.
- Nijtmans, L. G. J., Henderson, N. S., i Holt, I. J. (2002). Blue Native electrophoresis to study mitochondrial and other protein complexes. *Methods (San Diego, Calif.)*, 26(4), 327–34.
- Nobrega, F. G., Nobrega, M. P., i Tzagoloff, A. (1992). BCS1, a novel gene required for the expression of functional Rieske iron-sulfur protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 11(11), 3821–9.

◆ O

- Ogasahara, S., Engel, A. G., Frens, D., & 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(7), 2379–82.
- Olsen, R. K. J., Andresen, B. S., Christensen, E., Bross, P., Skovby, F., & Gregersen, N. (2003). Clear relationship between ETF/ETFDH genotype and phenotype in patients with multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency. *Human Mutation*, 22(1), 12–23.
- Osman, C., Voelker, D. R., & Langer, T. (2011). Making heads or tails of phospholipids in mitochondria. *The Journal of Cell Biology*, 192(1), 7–16.

◆ P

- Peterson, G. L. (1979). Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Analytical biochemistry*, 100(2), 201–20.
- Pfeiffer, K., Gohil, V., Stuart, R. A., Hunte, C., Brandt, U., Greenberg, M. L., & Schägger, H. (2003). Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(52), 52873–80.
- Pineda, M., Montero, R., Aracil, A., O’Callaghan, M. M., Mas, A., Espinos, C., ... Artuch, R. (2010). Coenzyme Q(10)-responsive ataxia: 2-year-treatment follow-up.

Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society, 25(9), 1262–8.

- Pullman, M. E., i Monroy, G. C. (1963). A naturally occurring inhibitor of mitochondrial adenosine triphosphatase. *The Journal of Biological Chemistry*, 238, 3762–9.

◆ **Q**

- Quinzii, C. M., Kattah, A. G., Naini, A., Akman, H. O., Mootha, V. K., DiMauro, S., & Hirano, M. (2005). Coenzyme Q deficiency and cerebellar ataxia associated with an aprataxin mutation. *Neurology*, 64 (3), 539-41.

- 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. *American Journal of human genetics*, 78(2), 345-9.

- Quinzii, C. M., DiMauro, S., i Hirano, M. (2007). Human Coenzyme Q10 Deficiency. *Neurochemical Research*, 32(4-5), 723–727.

- Quinzii, C. M., & Hirano, M. (2010). Coenzyme Q and mitochondrial disease. *Developmental Disabilities Research Reviews*, 16(2), 183–8.

◆ **R**

- Rahman, S., Clarke, C. F., & Hirano, M. (2012). 176th ENMC International Workshop: diagnosis and treatment of coenzyme Q₁₀ deficiency. *Neuromuscular disorders : NMD*, 22(1), 76-86.

- Reisch, A. S., & Elpeleg, O. (2007). Biochemical assays for mitochondrial activity: assays of TCA cycle enzymes and PDHc. *Methods in Cell Biology*, 80, 199–222.

- Reisinger, V., & Eichacker, L. A. (2006). Analysis of membrane protein complexes by blue native PAGE. *Proteomics*, 6 Suppl 2, 6–15.

- Richter-Dennerlein, R., Korwitz, A., Haag, M., Tatsuta, T., Dargazanli, S., Baker, M., ... Langer, T. (2014). DNAJC19, a mitochondrial cochaperone associated with cardiomyopathy, forms a complex with prohibitins to regulate cardiolipin remodeling. *Cell Metabolism*, 20, 158–171.
- Rötig, A., Appelkvist, E. L., Geromel, V., Chretien, D., Kadhom, N., Edery, P., ... Rustin, P. (2000). Quinone-responsive multiple respiratory-chain dysfunction due to widespread coenzyme Q10 deficiency. *Lancet*, 356(9227), 391–5.
- Rustin, P., Munnich, A., i Rötig, A. (2002). Succinate dehydrogenase and human diseases: new insights into a well-known enzyme. *European Journal of Human Genetics : EJHG*, 10(5), 289–91.
- Rustin, P., Munnich, A., i Rötig, A. (2004). Mitochondrial respiratory chain dysfunction caused by coenzyme Q deficiency. *Methods in Enzymology*, 382, 81–8.

◆ **S**

- Sacconi, S., Trevisson, E., Salviati, L., Aymé, S., Rigal, O., Redondo, A. G., ... Desnuelle, C. (2010). Coenzyme Q10 is frequently reduced in muscle of patients with mitochondrial myopathy. *Neuromuscular Disorders : NMD*, 20(1), 44–8.
- Salviati, L., Sacconi, S., Murer, L., Zacchello, G., Franceschini, L., Laverda, A.M., Basso, G., Quinzii, C., Angelini, C., Hirano, M., Naini, A.B., Navas, P., DiMauro, S., i Montini, G. (2005). Infantile encephalomyopathy and nephropathy with CoQ10 deficiency: a CoQ10-responsive condition. *Neurology* 65(4):606-8.
- Salviati, L., Trevisson, E., Rodriguez Hernandez, M. A., Casarin, A., Pertegato, V., Doimo, M., ... Navas, P. (2012). Haploinsufficiency of COQ4 causes coenzyme Q10 deficiency. *Journal of Medical Genetics*, 49(3), 187–91.
- Salway, J. G. (2004). *Metabolism at a Glance (Third Edition)*. Blackwell Publishing.
- Schägger, H., & von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical biochemistry*, 199(2), 223–31.

- Schägger, H., Cramer, W. A., i Von Jagow, G. (1994). Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 217(2), 220–30.
- Schägger, H., i Pfeiffer, K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *The EMBO Journal*, 19(8), 1777–83.
- Schedin, S., Pentchev, P., & Dallner, G. (1998). Reduced cholesterol accumulation and improved deficient peroxisomal functions in a murine model of Niemann-Pick type C disease upon treatment with peroxisomal proliferators. *Biochemical Pharmacology*, 56(9), 1195–9.
- Sgarbi, G., Baracca, A., Lenaz, G., Valentino, L. M., Carelli, V., i Solaini, G. (2006). Inefficient coupling between proton transport and ATP synthesis may be the pathogenic mechanism for NARP and Leigh syndrome resulting from the T8993G mutation in mtDNA. *The Biochemical Journal*, 395(3), 493–500.
- Smet, J., Seneca, S., De Paepe, B., Meulemans, A., Verhelst, H., Leroy, J., ... Van Coster, R. (2009). Subcomplexes of mitochondrial complex V reveal mutations in mitochondrial DNA. *Electrophoresis*, 30(20), 3565–72.
- Smet, J., De Paepe, B., Seneca, S., Lissens, W., Kotarsky, H., De Meirleir, L., ... Van Coster, R. (2011). Complex III staining in blue native polyacrylamide gels. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 34(3), 741–7.
- Spinazzi, M., Casarin, A., Pertegato, V., Ermani, M., Salviati, L., i Angelini, C. (2011). Optimization of respiratory chain enzymatic assays in muscle for the diagnosis of mitochondrial disorders. *Mitochondrion*, 11(6), 893–904.
- Spinazzi, M., Casarin, A., Pertegato, V., Salviati, L., i Angelini, C. (2012). Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nature Protocols*, 7(6), 1235–46.
- Srere, P.A. (1969) Citrate synthase. *Methods Enzymol* 13:3-11

- Strauss, M., Hofhaus, G., Schröder, R. R., & Kühlbrandt, W. (2008). Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *The EMBO Journal*, 27(7), 1154–60.
- Suomalainen, A. (2011). Biomarkers for mitochondrial respiratory chain disorders. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 34(2), 277–82.
- Szejtli J. (2004) Past, present, and future for cyclodextrin research. *Pure Appl Chem*; 76:1825-45

◆ **T**

- Tekle, M., Turunen, M., Dallner, G., Chojnacki, T., i Swiezewska, E. (2008). Investigation of coenzyme Q biosynthesis in human fibroblast and HepG2 cells. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(6), 909–17.
- Teshima, K., & Kondo, T. (2005). Analytical method for ubiquinone-9 and ubiquinone-10 in rat tissues by liquid chromatography/turbo ion spray tandem mass spectrometry with 1-alkylamine as an additive to the mobile phase. *Analytical Biochemistry*, 338(1), 12–9.
- Tort, F., Ferrer-Cortès, X., Thió, M., Navarro-Sastre, A., Matalonga, L., Quintana, E., Bujan, N., Arias, A., García-Villoria, J., Acquaviva, C., Vianey-Saban, C., Artuch, R., García-Cazorla, A., Briones, P., i Ribes, A. (2014). Mutations in the lipoyltransferase LIPT1 gene cause a fatal disease associated with a specific lipoylation defect of the 2-ketoacid dehydrogenase complexes. *Human Molecular Genetics*, 23(7), 1907–15.
- Tran, U. C., & Clarke, C. F. (2007). Endogenous synthesis of coenzyme Q in eukaryotes. *Mitochondrion*, 7 Suppl, S62-71.
- Triepels, R. H., Van Den Heuvel, L. P., Trijbels, J. M., i Smeitink, J. A. (2001). Respiratory chain complex I deficiency. *American Journal of Medical Genetics*, 106(1), 37–45.
- Trevisson, E., DiMauro, S., Navas, P., i Salviati, L. (2011). Coenzyme Q deficiency in muscle. *Current Opinion in Neurology*, 24(5), 449–56.

- Tucker, E. J., Wanschers, B. F. J., Szklarczyk, R., Mountford, H. S., Wijeyeratne, X. W., van den Brand, M. A. M., Leenders, A.M., Rodenburg, R.J., Reljic, B., Compton, A.G., Frazier, A.E., Bruno, D.L., Christodoulou, J., Endo, H., Ryan, M., Nijtmans, L.G., Huynen, M.A., i Thorburn, D. R. (2013). Mutations in the UQCC1-interacting protein, UQCC2, cause human complex III deficiency associated with perturbed cytochrome b protein expression. *PLoS Genetics*, 9(12).

- Turunen, M., Olsson, J., i Dallner, G. (2004). Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1660(1-2), 171–99.

◆ U

- Ugalde, C., Janssen, R. J. R. J., van den Heuvel, L. P., Smeitink, J. A. M., i Nijtmans, L. G. J. (2004). Differences in assembly or stability of complex I and other mitochondrial OXPHOS complexes in inherited complex I deficiency. *Human Molecular Genetics*, 13(6), 659–67.

◆ V

- Van Heeke, G., Deforce, L., Schnizer, R. A., Shaw, R., Couton, J. M., Shaw, G., ... Schuster, S. M. (1993). Recombinant bovine heart mitochondrial F1-ATPase inhibitor protein: overproduction in *Escherichia coli*, purification, and structural studies. *Biochemistry*, 32(38), 10140–9.

- Van Maldergem, L., Trijbels, F., DiMauro, S., Sindelar, P. J., Musumeci, O., Janssen, A., ... Gillerot, Y. (2002). Coenzyme Q-responsive Leigh's encephalopathy in two sisters. *Annals of Neurology*, 52(6), 750–4.

◆ W

- Wallace, D. C., i Fan, W. (2009). The pathophysiology of mitochondrial disease as modeled in the mouse. *Genes & Development*, 23(15), 1714–36.

- Wanschers, B. F. J., Szklarczyk, R., van den Brand, M. A. M., Jonckheere, A., Suijskens, J., Smeets, R., Rodenburg, R.J., Stephan, K., Helland, I.B., Elkamil, A., Rootwelt, T., Ott, M., van den Heuvel, L., Nitjmans, L.G i Huynen, M. A. (2014). A mutation in the human CBP4 ortholog UQCC3 impairs complex III assembly, activity and cytochrome b stability. *Human Molecular Genetics*, 23(23), 6356–65.
- Wittig, I., Braun, H.-P., i Schägger, H. (2006). Blue native PAGE. *Nature protocols*, 1(1), 418–28.
- Wittig, I., Karas, M., i Schägger, H. (2007). High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 6(7)
- Wortmann, S. B., Rodenburg, R. J. T., Jonckheere, A., de Vries, M. C., Huizing, M., Heldt, K., van den Heuvel, L. P., et al. (2009). Biochemical and genetic analysis of 3-methylglutaconic aciduria type IV: a diagnostic strategy. *Brain : a journal of neurology*, 132(Pt 1), 136–46.
- Wolf, D.H., Hoffman, C.H., Trenner, N.R., Arison, B.H, Shunk, C.H., Linn, B.O., McPherson, J.F., I Folkers, K. (1958). Coenzyme Q. Structure studies on the coenzyme Q group. *Journal of American Chemical Society*, 80, 4750-4752.

◆ **Y**

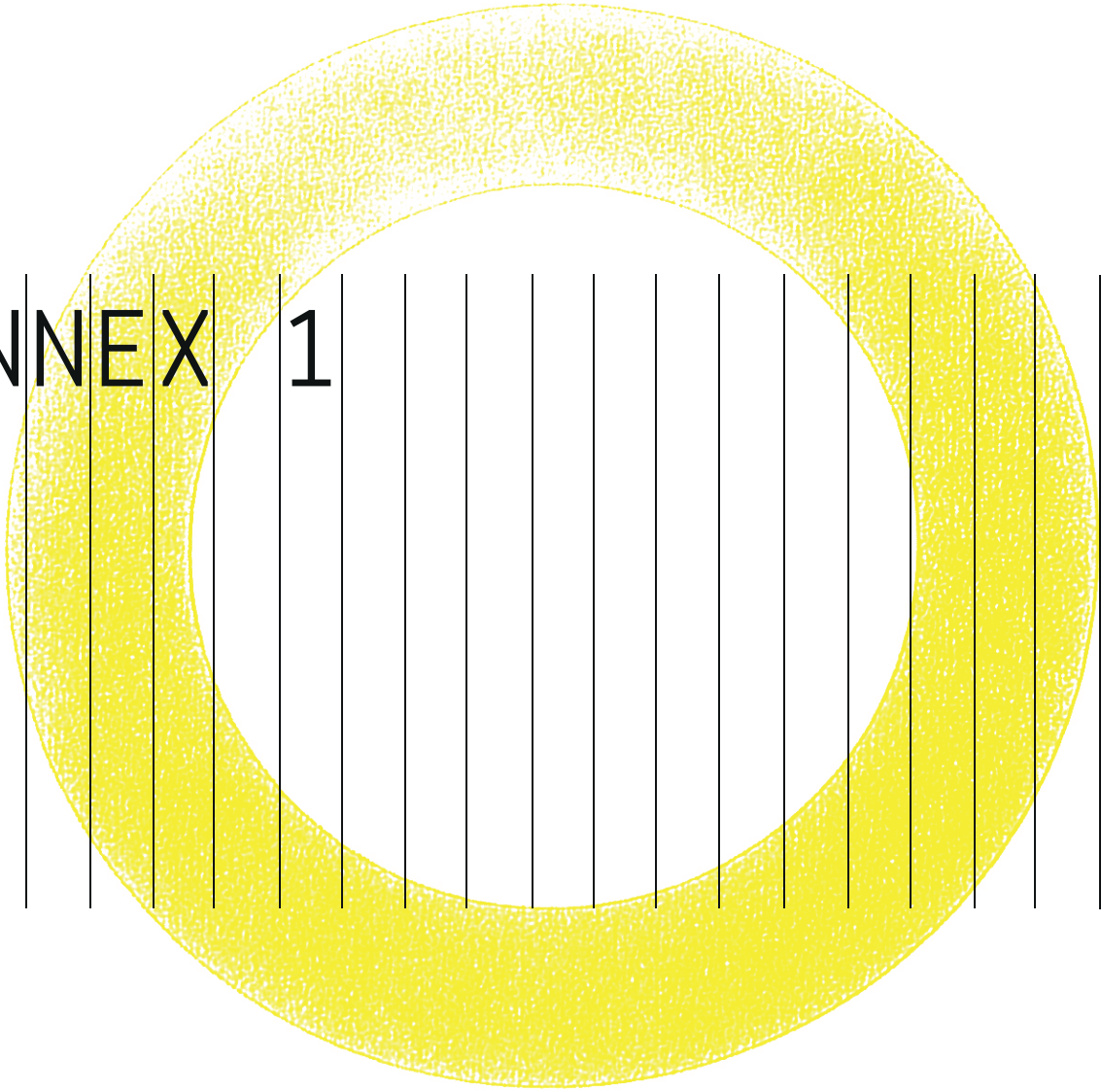
- Yubero, D., O’Callaghan, M., Montero, R., Ormazabal, A., Armstrong, J., Espinos, C., ... Artuch, R. (2014). Association between coenzyme Q10 and glucose transporter (GLUT1) deficiency. *BMC Pediatrics*, 14(1), 1–5.

◆ **Z**

- Zerbetto, E., Vergani, L., & Dabbeni-Sala, F. (1997). Quantification of muscle mitochondrial oxidative phosphorylation enzymes via histochemical staining of blue native polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 18(11), 2059–64.

- Zierz, S., Jahns, G., i Jerusalem, F. (1989). Coenzyme Q in serum and muscle of 5 patients with Kearns-Sayre syndrome and 12 patients with ophthalmoplegia plus. *Journal of neurology*, 236(2), 97-101.

ANNEX 1



Annex 1:

Characterization of CoQ₁₀ biosynthesis in fibroblasts of patients with primary and secondary CoQ₁₀ deficiency.

Buján, N., Arias, A., Montero, R., García-Villoria, J., Lissens, W., Seneca, S., Espinós, C., Navas, P., Der Meirleir, L., Artuch, R. Briones, P., i Ribes, A.

Journal of Inherited Metabolic Disease (2014); 37(1), 53–62.

Buján, N., Arias, A., Montero, R., García-Villoria, J., Lissens, W., Seneca, S., Espinós, C., Navas, P., Der Meirleir, L., Artuch, R. Briones, P., i Ribes, A Characterization of CoQ₁₀ biosynthesis in fibroblasts of patients with primary and secondary CoQ₁₀ deficiency . *Journal of Inherited Metabolic Disease* (2014); 37(1), 53–62.

<http://dx.doi.org/10.1007/s10545-013-9620-4>

<http://link.springer.com/article/10.1007/s10545-013-9620-4>

Received: 2 October 2012

Revised: 7 May 2013

Accepted: 13 May 2013

Published online: 18 June 2013

© SSIEM and Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

Abstract

Primary coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀) deficiencies are associated with mutations in genes encoding enzymes important for its biosynthesis and patients are responsive to CoQ₁₀ supplementation. Early treatment allows better prognosis of the disease and therefore, early diagnosis is desirable. The complex phenotype and genotype and the frequent secondary CoQ₁₀ deficiencies make it difficult to achieve a definitive diagnosis by direct quantification of CoQ₁₀. We developed a non-radioactive methodology for the quantification of CoQ₁₀ biosynthesis in fibroblasts that allows the identification of primary deficiencies. Fibroblasts were incubated 72 h with 28 μmol/L ²H₃-mevalonate or 1.65 mmol/L ¹³C₆-p-hydroxybenzoate. The newly synthesized ²H₃- and ¹³C₆-labelled CoQ₁₀ were analysed by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The mean and the reference range for ¹³C₆-CoQ₁₀ and ²H₃-CoQ₁₀ biosynthesis were 0.97 (0.83–1.1) and 0.13 (0.09–0.17) nmol/Unit of citrate synthase, respectively. We validated the methodology through the study of one patient with *COQ2* mutations and six patients with CoQ₁₀ deficiency secondary to other inborn errors of metabolism. Afterwards we investigated 16 patients' fibroblasts and nine showed decreased CoQ₁₀ biosynthesis. Therefore, the next step is to study the *COQ* genes in order to reach a definitive diagnosis in these nine patients. In the patients with normal rates the deficiency is probably secondary. In conclusion, we have developed a non-invasive non-radioactive method suitable for the detection of defects in CoQ₁₀ biosynthesis, which offers a good tool for the stratification of patients with these treatable mitochondrial diseases.

Annex 2:

Spanish network for the standardization of clinical diagnosis of human mitochondrial respiratory chain defects.

Bujan, Nuria; Morén, Constanza; Blázquez, Alberto; Carnicer, Clara; Cascajo, M.Victoria; Bretón, Begoña; López-Gallardo, Ester; Gort, Laura; Martinez, Ramiro; Martin, M. Ángel; Cardellach, Francesc; Bornstein, Belen; Briones, Paz; Delmiro, Aitor; Garcia-Arumí, Elena; Rodriguez-Aguilera, J.Carlos; Garrabou, Glòria.

Article sota consideració de l'editor.

Embargoed until publication

Bujan, N., Morén, C., Blázquez, A., Carnicer, C., Cascajo, M.V., Bretón, Begoña, López-Gallardo, E., Gort, L., Martínez, R., Martín, M. A., Cardellach, F., Bornstein, B., Briones, P., Delmiro, A., Garcia-Arumí, E., Rodríguez-Aguilera, J.C., Garrabou, G. Spanish network for the standardization of clinical diagnosis of human mitochondrial respiratory chain defects. Manuscript submitted for publication

Abstract

Quantification of mitochondrial respiratory chain (MRC) enzymatic activities is essential for diagnosis of mitochondrial diseases, for toxicological assays and for the research in the mitochondrial basis of physiologic or pathological processes. Seven Spanish mitochondrial research and diagnostic centres set up and standardized common protocols for spectrophotometric MRC enzymatic assay measurements using minute amounts of sample. Detailed protocols, reference ranges obtained in different human tissues together with experimental differences with respect to previously reported methods are presented herein to improve experimental variability and statistical result robustness. We summarize our networking experience to achieve sensitive, specific, standardized and validated methods for MRC enzyme diagnostic and research measurement.

Keywords

Mitochondrial respiratory chain, enzyme activity, standardization, diagnosis, muscle homogenate, mitochondrial disease

