



Universidad Autónoma de Madrid

Programa de Doctorado en Biociencias Moleculares

**Papel de las deshidrogenasas FAD dependientes  
en la fisiopatología del músculo esquelético**

Juan Cruz Herrero Martín

Madrid, 2022



FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Tesis doctoral:

# **Papel de las deshidrogenasas FAD dependientes en la fisiopatología del músculo esquelético**

Doctorando: Juan Cruz Herrero Martín  
Graduado en Biología  
Directora de tesis: Laura Formentini  
Centro de Biología Molecular Severo Ochoa  
Madrid, 2022

## **Agradecimientos**

En primer lugar, quiero agradecer a Laura Formentini, mi directora de tesis, por haber confiado en mí y haberse esforzado para que pudiese llevar a cabo esta tesis doctoral. Además, por haberme permitido avanzar con libertad, por haberme aguantado en mis malos momentos y por contagiarme diariamente su motivación por la ciencia.

A Pepe, por haberme dejado campar por su laboratorio, por aconsejarme y mostrarme cariño en todo momento.

A todo el laboratorio 326 por los buenos momentos dentro y fuera del laboratorio, que siempre recordaré. En especial manera a Cris Formen, Sandra y Beñat; a Fulvio, Sonia, Laura Torresano, Ana, Cris Técnico, Elena, Pau, Brenda, Inés y Yoli.

También quiero agradecer a Jesús Arenas, mi primer jefe, por haberme enseñado una filosofía de trabajo que me acompañará siempre.

Por último y no menos importante, quiero agradecer a mi familia por su apoyo y cariño constante e incondicional. A mi madre Inés y mi padre Mario, a mis hermanas Fer y Ana, a mi hermano Javi, a mi cuñado Paco, a mis sobrinos Leo y Jimena, y a mi novia Cris. Asimismo, quiero agradecer a esos grandes amigos que, a pesar de estar lejos, siempre los sentí cerca.

## Resumen

La flavoproteína transportadora de electrones deshidrogenasa (ETFDH) integra el catabolismo de los aminoácidos ramificados (BCAA) y la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos (FAO) a la fosforilación oxidativa mitocondrial (OXPHOS). A través de esta flavoproteína los electrones que derivan de la oxidación de lípidos y aminoácidos entran a la parte distal de la cadena respiratoria mitocondrial (ETC) generando el gradiente electroquímico necesario para la producción de ATP. La generación de líneas celulares de mioblastos deficientes por ETFDH y del primer modelo de ratón ETFDH KO condicional y específico de músculo esquelético han puesto de manifiesto el papel central que tiene ETFDH en el desarrollo de disfunciones mitocondriales. En esta tesis demostramos cómo la interacción directa de ETFDH con el complejo CIII de la ETC es necesaria para la actividad máxima del enzima, para el mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial y de la homeostasia redox de las células musculares. Concretamente, la ausencia de ETFDH provoca que la subunidad catalítica CytB del CIII se encuentre constitutivamente reducida e inhibida, llevando a la acumulación patológica de  $\text{CoQH}_2$  y de radical superóxido. La expresión de una oxigenasa alternativa AOX reduce la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), pero no restaura la actividad del CIII, indicando que ETFDH podría participar en el mecanismo de acción de este complejo, es decir, en el ciclo del CoQ.

Por otro lado, en músculo de ratón, hemos observado una interacción directa entre ETFDH y COQ2, una enzima de la biosíntesis del CoQ, por lo que ETFDH podría regular su biosíntesis y tener un papel esencial en el desarrollo de deficiencias secundarias de CoQ. Esto, en lugar de ser un evento patológico, sería una forma de adaptación de la célula para reducir el estrés mitocondrial asociado a la deficiencia de ETFDH. De hecho, reducir la cantidad de CoQ en miocitos murinos y en fibroblastos de pacientes minimiza las consecuencias patológicas de la disfunción de ETFDH.

Palabras clave: músculo esquelético, FAD, deshidrogenasas, coenzima Q, mitocondria, ETFDH, FAO, BCAA, complejo III, ROS.

## Abstract

Electron carrier flavoprotein dehydrogenase (ETFDH) integrates the catabolism of branched-chain amino acids (BCAA) and  $\beta$ -oxidation of fatty acids (FAO) to mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS). Through this flavoprotein, the electrons derived from the oxidation of lipids and amino acids enter the distal part of the mitochondrial respiratory chain (ETC), generating the electrochemical gradient necessary for the production of ATP. The generation of ETFDH-deficient myoblast cell lines and the first skeletal muscle-specific, conditional ETFDH KO mouse model have revealed the central role of ETFDH in the development of mitochondrial dysfunction. In this thesis, we demonstrate how the direct interaction of ETFDH with the CIII complex of the ETC is necessary for the maximum activity of the enzyme, the maintenance of the mitochondrial membrane potential, and the redox homeostasis of muscle cells. Specifically, the absence of ETFDH causes the CytB catalytic subunit of CIII to be constitutively reduced and inhibited, leading to the pathological accumulation of CoQH<sub>2</sub> and superoxide radicals. The expression of an alternative oxygenase AOX reduces the production of reactive oxygen species (ROS), but not restore the activity of CIII, indicating that ETFDH could participate in the mechanism of action of this complex, that is, in the CoQ cycle.

On the other hand, in mouse muscles, we have observed a direct interaction between ETFDH and COQ2, a CoQ biosynthesis enzyme, so that ETFDH could regulate its biosynthesis and play an essential role in the development of secondary CoQ deficiencies. This, instead of being a pathological event, would be a form of cell adaptation to reduce mitochondrial stress associated with ETFDH deficiency. In fact, reducing the amount of CoQ in murine myocytes and in fibroblasts from patients minimizes the pathological consequences of ETFDH dysfunction.

**Keywords:** skeletal muscle, FAD, dehydrogenases, coenzyme Q, mitochondria, ETFDH, FAO, BCAA, complex III, ROS.

# Índice

1. Introducción	23
1.1. Las deshidrogenasas FAD dependientes (DFDs) del músculo esquelético y su importancia en patologías metabólicas	23
1.2. La mitocondria	26
1.2.1. La $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos (FAO)	26
1.2.2. La fosforilación oxidativa (OXPHOS)	27
1.2.3. La cadena de transporte de electrones mitocondrial (ETC)	27
1.2.3.1. Complejo I (CI)	29
1.2.3.2. Flavoproteínas periféricas de la MMI (lado positivo)	29
- Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD2)	
- Dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH)	
1.2.3.3. Flavoproteínas periféricas de la MMI (lado negativo)	30
- Complejo II (CII)	
- Dihidrolipoamida deshidrogenasa (DLD)	
- Sulfuro deshidrogenasa (SQDH)	
- Prolina deshidrogenasa (PRODH)	
- Flavoproteína transportadora de electrones deshidrogenasa (ETFDH) y flavoproteína transportadora de electrones (ETF)	
1.2.3.4. Coenzima Q (CoQ)	34
1.2.3.5. Complejo III (CIII)	35
1.2.3.6. Complejo IV (CIV)	36
1.2.4. La ATP sintasa o complejo V (CV)	36
1.3. Especies reactivas del oxígeno (ROS)	37
2. Objetivos	43
3. Materiales y métodos	47
3.1. Materiales	47
3.1.1. Líneas celulares	47
3.1.2. Ratones	48
3.1.3. Cepas bacterianas	48
3.1.4. Plásmidos	48
3.1.5. Oligonucleótidos	49
3.1.6. Anticuerpos	53
3.1.7. Compuestos químicos y radioisótopos	55
3.2. Métodos	56
3.2.1. Métodos de Biología Molecular	56
3.2.1.1. Técnicas de ADN recombinante y estrategias de clonación	56
3.2.1.2. Transformación de bacterias	57
3.2.1.3. PCR	57
3.2.1.4. Electroforesis en geles de agarosa	58
3.2.1.5. Extracción de plásmidos y ADN genómico	58
3.2.1.6. Extracción de ARN	59

3.2.1.7. Reverse transcriptase PCR	59
3.2.1.8. Real time PCR	59
3.2.1.9. Secuenciación	59
3.2.1.10. Generación de líneas celulares knock-out mediante CRISPR-Cas9	59
3.2.2. Métodos de Bioquímica	60
3.2.2.1. Extracción y cuantificación de proteínas de células en cultivo y tejidos de ratón	60
3.2.2.2. Extracción y purificación de mitocondrias de células en cultivo y tejidos de ratón	60
3.2.2.3. Electroforesis en geles SDS-PAGE	61
3.2.2.4. Electroforesis en geles bidimensionales (IEF-SDS-PAGE)	61
3.2.2.5. Electroforesis en geles nativos Blue Native	62
3.2.2.6. Detección inmunológica de proteínas (Western blot)	62
3.2.2.7. Determinación y cuantificación del estado redox del CoQ mediante HPLC acoplada a espectrometría de masa	63
3.2.3. Métodos de Biología Celular	63
3.2.3.1. Cultivo y mantenimiento de líneas celulares	63
3.2.3.2. Tratamientos celulares	64
3.2.3.3. Transfección transitoria de plásmidos	64
3.2.3.4. Ensayos de viabilidad celular	64
3.2.3.5. Medida del consumo de O <sub>2</sub> : Ensayo Seahorse	65
3.2.3.6. Inmunoprecipitación de Core2/ETFDH	65
3.2.3.7. Inmuncaptura de los complejos de la ETC	66
3.2.3.8. Medida del flujo glucolítico: producción de lactato	66
3.2.3.9. Cuantificación de metabolitos: ATP/ADP, NAD/NADH, FAD/FADH, NADP/NADPH y GSH/GSSG	66
3.2.3.10. Medición de la actividad de los complejos respiratorios mitocondriales	67
3.2.3.11. Medición del estado de oxidación/reducción del citocromo b mitocondrial	68
3.2.3.12. Cuantificación de la producción de ROS por citometría de flujo	69
3.2.3.13. Determinación del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) mediante citometría de flujo	69
3.2.3.14. Medida del ciclo celular por citometría de flujo	69
3.2.3.15. Medida de la $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos	70
3.2.3.16. Medida del catabolismo y captación de <sup>14</sup> C (u)-leucina	70
3.2.3.17. Inmunofluorescencia en células fijadas	70
3.2.3.18. Proteómica cuantitativa (iTRAQ/TMT)	71
3.2.4. Métodos con ratones	71
3.2.4.1. Condiciones de mantenimiento, cuidado y manejo de ratones	71
3.2.5. Análisis estadísticos	71

4. Resultados	75
4.1. Generación de líneas celulares KO estables para una serie de DFDs	75
4.2. La pérdida de ETFDH conlleva la incapacidad de oxidar los ácidos grasos y los BCAA	76
4.3. La ausencia de ETFDH provoca una dependencia metabólica de la glucólisis en mioblastos	77
4.4. En ausencia de ETFDH la leucina es empleada para síntesis proteica	78
4.5. La pérdida de ETFDH produce una disfunción de la OXPHOS	79
4.6. ETFDH interacciona molecularmente con la subunidad UQCRC2 del CIII	81
4.7. La falta de interacción entre ETFDH y el CIII inhibe la actividad de la ETC	83
4.8. La disfunción del CIII y, en menor medida, ETF están en el origen de la sobreproducción de ROS en mioblastos ETFDH KO	86
4.9. La falta de ETFDH causa peroxidación lipídica y susceptibilidad a ferroptosis.	88
4.10. El flujo de electrones a través de la ruta de ETFDH garantiza la homeostasia redox	89
4.11. La expresión de una oxidasa alternativa exógena (AOX) revierte sólo parcialmente el fenotipo generado por la ausencia de ETFDH en fibroblastos de ratón	91
4.12. La pérdida de actividad del CIII no ocurre con otras DFDs y tiene efectos adaptativos en la célula	93
4.13. La disfunción mitocondrial produce la parada del ciclo celular en G2 y una miogénesis aberrante	95
4.14. ETFDH interacciona con la maquinaria de la biosíntesis de CoQ y podría tener un papel en la regulación de esta ruta	98
4.15. Generación y caracterización del primer modelo animal ETFDH-KO condicional y específico de músculo esquelético	100
5. Discusión	107
6. Conclusiones	117
7. Bibliografía	121

## Clave de abreviaturas

2G-SDS-PAGE: electroforesis en geles bidimensionales

4-CBA: ácido 4-clorobenzoico

Å: amstrong

ACADs: Acil CoA deshidrogenasas

ACC: acetyl-CoA carboxylase

ACLY: ATP-citrate synthase

ACTA1: actin, alpha skeletal muscle

ACTB: actin, cytoplasmic 1

ADP: adenosín difosfato

ATP: adenosín trifosfato

Ant A: antimicina A

BCKDH: branched-chain alpha-keto dehydrogenase

BN: blue native

BN-PAGE: geles nativos en gradiente de poliacrilamida

BSA: albúmina fetal bovina

C: carbono

CI: complejo I mitocondrial

CII: complejo II mitocondrial

CIII: complejo III mitocondrial

CIV: complejo IV mitocondrial

CV: complejo V mitocondrial o ATP sintasa

CHDH: colina deshidrogenasa

Cit b: citocromo b

Cit b<sub>L</sub>: citocromo b "low potential"

Cit b<sub>H</sub>: citocromo b "high potential"

Cit c: citocromo c

CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono

CoQ/CoQH<sub>2</sub>: coenzima Q oxidado/reducido

CoQ•: coenzima Q (semiquinona)

COQ2: 4-hidroxibenzoato polipreniltransferasa

COQ7: 5-demethoxyubiquinone hydroxylase, mitochondrial

Cre: recombinasa

DFDs: deshidrogenasas FAD dependientes

DHODH: dihidroorotato deshidrogenasa

DLD: dihidrolipoamida deshidrogenasa

DMEM: Dulbecco's modified Eagle médium

DNP: 2,4-dinitrofenol

DRP1: dynamin-related protein 1

DTT: ditiotreitól

DUF: dominio de unión a FAD

DUM: dominio de unión a membrana

DUQ: dominio de unión al coenzima Q  
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético  
ETC: cadena de transporte de electrones o cadena respiratoria mitocondrial  
ETFA: electron transfer flavoprotein, subunit A  
ETFB: electron transfer flavoprotein, subunit B  
ETFDH: electron transfer flavoprotein dehydrogenase  
FACS: Fluorescence-Activated Cell Sorting  
FAD/FADH<sub>2</sub>: dinucleótido de flavina y adenina oxidado/ reducido  
FAD•: dinucleótido de flavina y adenina semirreducido  
FAO: β- oxidación de los ácidos grasos mitocondrial  
FASN: Fatty acid synthase  
FCCP: carbonil cianida-4-(trifluorometoxy)fenilhidrazona  
FDPs: Farnesyl pyrophosphate synthase  
Fe/S: centro ferrosulfurado  
FLP: flipasa  
FMN: mononucleótido de flavina  
FNTA: farnesyl transferase/geranylgeranyl transferase subunit alpha  
HADHA: Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial  
GSH: glutatión reducido  
GHHS: glutatión oxidado  
GPD2: glicerol-3-fosfato deshidrogenasa  
H<sub>2</sub>S: sulfuro de hidrógeno  
IgGs: inmunoglobulinas G  
KO: knock-out  
LDH: lactato deshidrogenasa  
mA: miliamperios  
MADD: Deficiencia múltiple de Acil CoA deshidrogenasas  
MMI: membrana mitocondrial interna  
MME: membrana mitocondrial externa  
MFN1: Mitofusin 1  
MFN2: Mitofusin 2  
mtDNA: ADN mitocondrial  
Myxo: myxothiazol  
NAD/NADH: nicotinamida adenina dinucleótido oxidado/reducido  
NADP: nicotinamida adenina dinucleótido  
RABGGTA: Geranylgeranyl transferase type-2 subunit alpha  
RET: retrograde electron transport  
ROS: especies reactivas del oxígeno  
RT-PCR: real time PCR  
O<sub>2</sub>: oxígeno molecular  
O<sub>2</sub>•: anión superóxido  
OCR: tasa de consumo de oxígeno  
OL: oligomicina

OPA1: Optic atrophy 1  
OSR: respiraci3n sensible a oligomicina  
OXPHOS: fosforilaci3n oxidativa  
PBS: tamp3n fosfato salino  
PCR: reacci3n en cadena de la polimerasa  
PFA: paraformaldehido  
PRODH: prolina deshidrogenasa  
Rot: Rotenona  
SDS: Dodecilsulfato s3dico  
SDS-PAGE: geles de poliacrilamida desnaturalizantes  
SFB: suero fetal bovino  
SQOR: sulfuro ubiquinona oxidorreductasa  
TBS: Tris-borato  
TCA: ciclo de los 3cidos tricarb3xlicos  
TMRM: tetrametilrodamina metil 3ster  
UQCRC2: coenzima Q-citocromo bc1 oxidorreductasa complejo 2 (Core2)  
V: voltage  
v/v: volumen/volumen  
VDAC: Voltage-dependent anion-selective channel  
WB: Western blot  
 $\Delta\Psi_m$ : potencial de membrana mitocondrial

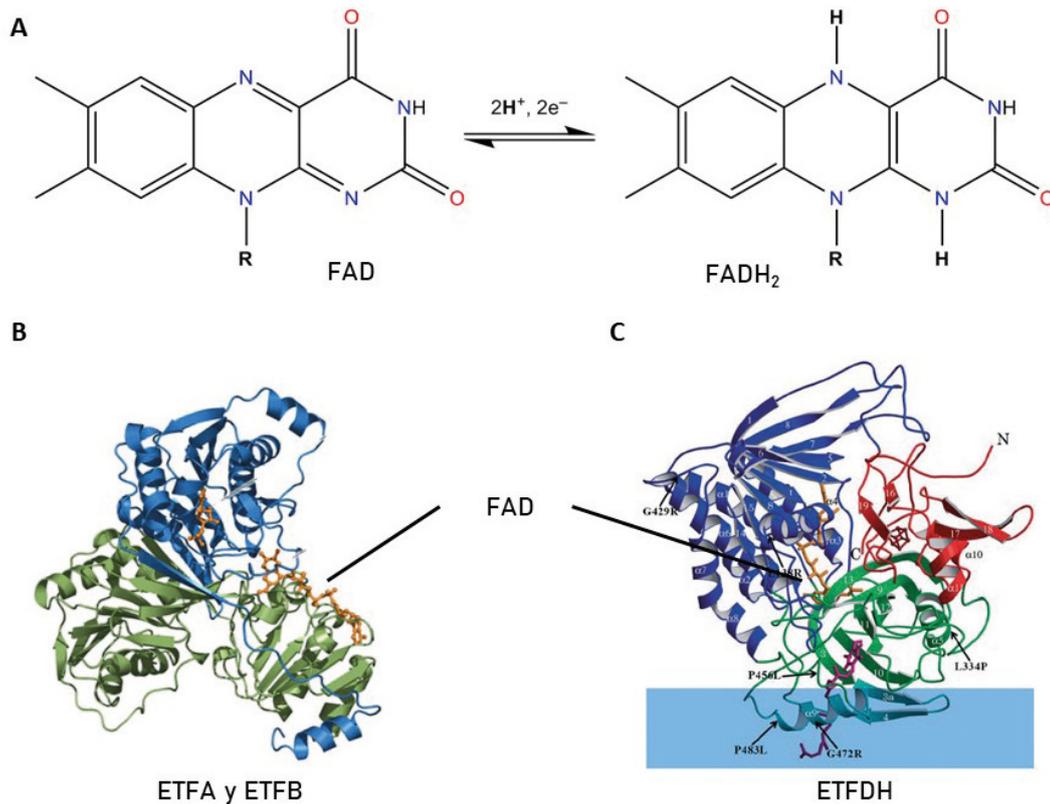
## INTRODUCCIÓN

## 1. Introducción

### 1.1. Las deshidrogenasas FAD dependientes (DFDs) del músculo esquelético y su importancia en patologías metabólicas.

El músculo esquelético es uno de los órganos más grandes del cuerpo humano y uno de los tejidos con más elevada demanda energética. Su metabolismo está finamente regulado por diferentes vías de señalización que son activadas o reprimidas por estímulos nutricionales, hormonales, inflamatorios y nerviosos (Evans *et al.*, 2010). El metabolismo del músculo es altamente dependiente de la actividad mitocondrial (Russell *et al.*, 2014), y estudios en modelos animales y cohortes de pacientes han puesto de manifiesto que la mayoría de las enfermedades musculares cursan con daño oxidativo y disfunción de la actividad mitocondrial (Ramadasan-Nair *et al.*, 2014; Sunitha *et al.*, 2016; Debashree *et al.*, 2018; Sánchez-González *et al.*, 2020). La mitocondria del músculo es, de hecho, el principal sitio donde se catabolizan los ácidos grasos y los aminoácidos ramificados (BCAA: leucina, isoleucina y valina) para producir energía biológica a través de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) y, así, sustentar la contracción de las fibras musculares y los procesos anabólicos. Entre las enzimas que intervienen en los procesos catabólicos juegan un papel principal las deshidrogenasas FAD dependientes (DFDs), oxidorreductasas que utilizan como coenzimas mononucleótidos de flavina (FMN) y dinucleótidos de flavina y adenina (FAD). Los coenzimas FMN y FAD poseen un anillo de isoaloxazina heteroaromático tricíclico que puede aceptar y donar reversiblemente uno o dos electrones (Figura 1A), lo que les convierte en importantes mediadores en reacciones de oxido-reducción (redox). De hecho, la mayoría de las DFDs están implicadas en las reacciones redox de procesos como la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos (FAO), el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) o la degradación de aminoácidos, donde compuestos altamente reducidos son oxidados generando un flujo de electrones que son transportados de deshidrogenasa a deshidrogenasa hasta entrar a la parte distal de la cadena respiratoria mitocondrial (ETC) para la producción de ATP. Por otro lado, algunas de estas DFDs están implicadas en rutas anabólicas como la biosíntesis del coenzima Q (CoQ), esteroides y otras hormonas y cofactores esenciales (Brizio *et al.*, 2006; Ozeir *et al.*, 2015; Balasubramaniam, Christodoulou and Rahman, 2019). Por tanto, las DFDs son requeridas para el correcto funcionamiento de numerosos procesos biológicos y la integración del metabolismo mitocondrial y celular.

Hasta la fecha, en el genoma humano han sido identificados 90 genes que codifican para flavoproteínas DFDs, además de 6 genes que codifican para proteínas implicadas en la absorción y transformación de riboflavina (vitamina B2), precursor de los coenzimas funcionales FMN y FAD. La mayoría de las flavoproteínas utiliza sólo una de las coenzimas (16% FMN frente al 84% FAD), aunque unas pocas pueden utilizar ambos (Lienhart, Gudipati and Macheroux, 2013). A diferencia de NAD y NADP, el FAD está fuertemente unido a la proteína de manera covalente, formando un grupo prostético (Figura 1B). Por tanto, el mecanismo molecular del pasaje de electrones mediado por FMN y FAD difiere del mediado por NAD o NADP; estos últimos difunden por el medio desde una enzima a otra, mientras que FMN/FAD proporcionan un medio por el que la flavoproteína puede retener temporalmente los electrones mientras cataliza su transferencia



**Figura 1. Estructura molecular de FAD y su inserción en la estructura tridimensional de las flavoproteínas ETF y ETFDH.** (A) Representación de la estructura molecular simplificada de una molécula de FAD y  $\text{FADH}_2$ , donde se observa la reacción reversible de aceptación y cesión de dos electrones. (B) Estructura tridimensional de la flavoproteína ETF, formada por ETFA (verde) y ETFB (azul), y una molécula de FAD (amarillo) insertada en su estructura (extraída y modificada de Henriques *et al.*, 2021). (C) Estructura tridimensional de la flavoproteína ETFDH insertada en la MMI (región celeste sombreada), dónde se pueden apreciar los cuatro dominios funcionales y una molécula de FAD embebida en su estructura (extraída y modificada de Zhang, Frerman and Kim, 2006).

desde un sustrato reducido (que puede ser proteico) a un aceptor oxidado.

La importancia de las DFDs en el metabolismo del músculo esquelético queda patente al observar las consecuencias patológicas de su alterada funcionalidad. Mutaciones en los genes que codifican para flavoproteínas dan origen a trastornos metabólicos musculares y sistémicos (ver Tabla 1). Por ejemplo, mutaciones en las acil CoA- deshidrogenasas (ACADs), en la flavoproteína transportadora de electrones (ETF) y/o la ETF deshidrogenasa (ETFDH), DFDs implicadas en la FAO, están asociadas a acidosis metabólicas como la Deficiencia Múltiple de Acil coA- Deshidrogenasas (MADD) o Acidosis Glutárica tipo II (OMIM 231680)(Fan *et al.*, 2018; Missaglia *et al.*, 2018). Esta patología cursa con trastornos clínicamente heterogéneos que, dependiendo del grado de disfuncionalidad en las flavoproteínas implicadas, pueden presentarse como enfermedades leves de la infancia o la edad adulta con descompensación metabólica episódica, almacenamiento de lípidos en el músculo, debilidad muscular e insuficiencia respiratoria o, de forma grave, diagnosticadas en la etapa neonatal y caracterizadas por acidosis sistémica, miocardiopatía y hepatopatía (Angle and Burton, 2008; Liang *et al.*, 2009; Grünert, 2014; Wakitani

Enfermedad	Enzima relacionada	Localización	Código OMIM
<b>Diabetes mellitus tipo 2</b>	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa	Mitocondria	138430
<b>Deficiencia del CII</b>	Succinato deshidrogenasa	Mitocondria	600857
<b>Aciduria glutárica tipo III</b>	Glutaril-coA-oxidasa	Peroxisoma	231690
<b>Acidemia glutárica</b>	Glutaril-coA-deshidrogenasa	Mitocondria	608801
<b>Acidemia isovalérica</b>	Isolvaleril-coA-deshidrogenasa	Mitocondria	607036
<b>Síndrome de Brunner/ Autismo</b>	Monoamino oxidasa	Mitocondria	309850
<b>Esclerosis lateral amiotrófica</b>	D-amino ácido oxidasa	Peroxisoma	124050
<b>Sarcosinemia</b>	Sarcosina deshidrogenasa	Mitocondria	604455
<b>Hiperprolinemia</b>	Prolina deshidrogenasa	Mitocondria	606810
<b>Miopatía</b>	Sulfidril oxidasa	Mitocondria	600924
<b>Enfermedad granulomatosa crónica</b>	NAD(P)H oxidasa	Fagocitos	300481
<b>Síndrome de Miller</b>	Dihidroorotato deshidrogenasa	Mitocondria	126064
<b>Acidemia glutárica tipo IIC</b>	Flavoproteína transportadora de electrones deshidrogenasa	Mitocondria	231675
<b>Acidemia glutárica tipo IIA/IIB</b>	Flavoproteína transportadora de electrones A/B	Mitocondria	608053/ 130410

**Tabla 1. Ejemplos de enfermedades provocadas por defectos en flavoproteínas.**

*et al.*, 2014; Koren and Palladino, 2016; Macchione *et al.*, 2020).

Otro ejemplo es el de BCKDH, enzima mitocondrial implicada en el catabolismo de los BCAA. Mutaciones patológicas en BCKDH resultan en la enfermedad llamada “*Jarabe de arce*” que causa disfunción de las células del músculo esquelético, del sistema inmunitario y del sistema nervioso central (Harris *et al.*, 1990; Ævarsson *et al.*, 2000; Strauss *et al.*, 2020). Por el contrario, se ha observado que algunas enfermedades metabólicas pueden alterar la expresión y funcionalidad de las DFDs. Por ejemplo, un estudio proteómico en biopsias de pacientes que padecen obesidad y diabetes tipo 2 puso de manifiesto cómo la expresión de las flavoproteínas en el músculo estaba profundamente alterada frente a la de los sujetos sanos, sugiriendo un importante papel regulador de esta clase de proteínas en el metabolismo (Formentini, Ryan, *et al.*, 2017).

Cabe destacar que un elevado número de los trastornos metabólicos detallados en la Tabla 1

se producen por defectos en flavoproteínas mitocondriales. Al ser la mitocondria un orgánulo esencial en el mantenimiento de la homeostasis celular (Spinelli and Haigis, 2018; Vercellino and Sazanov, 2022), controlando no solamente la producción de energía biológica, sino procesos como la muerte celular (Formentini *et al.*, 2014), la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS)(Formentini, Sánchez-Aragó, Sánchez-Cenizo and J. M. C. Cuezva, 2012), la inflamación (Formentini, Santacatterina, Nuñez de Arenas, *et al.*, 2017), el crecimiento tumoral (Santacatterina *et al.*, 2016) o el rendimiento físico (Sánchez-González *et al.*, 2020; Vercellino and Sazanov, 2022), alteraciones en el proteoma mitocondrial o en su entramado metabólico tienen consecuencias drásticas sobre la salud y merecen un estudio detallado.

### 1.2. La mitocondria

La mitocondria es un orgánulo de origen procariota que sintetiza energía en forma de ATP. Su metabolismo es multifacético, lo que se ve reflejado en sus diversas funciones. Además de ATP, las mitocondrias producen precursores metabólicos de macromoléculas y participan en procesos anabólicos como la biosíntesis de nucleótidos, ácidos grasos, colesterol, aminoácidos y grupos hemo. Coordinan la adaptación celular a factores de estrés como la privación de nutrientes, el estrés oxidativo, el daño al ADN y el estrés del retículo endoplasmático. Además, generan subproductos metabólicos, como ROS y amoníaco, y poseen mecanismos para eliminar o utilizar estos productos de desecho.

Gran parte de la actividad mitocondrial se debe a su estructura, y en especial manera, a la de la membrana mitocondrial interna (MMI), de origen procariota (Sagan, 1967) y enriquecida en cardiolipina. La MMI es impermeable a la mayoría de moléculas, incluso al protón (H<sup>+</sup>), y las especies que la cruzan lo hacen a través de transportadores de membrana específicos, como ocurre para los intermediarios de las rutas metabólicas de la matriz (como son el piruvato, los ácidos grasos y los aminoácidos). Esta característica hace que sea posible el mantenimiento de un potencial electroquímico, generado a través de la OXPHOS y necesario para diversos procesos mitocondriales, desde la síntesis de ATP hasta el importe de proteínas a la mitocondria.

#### 1.2.1. La $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos (FAO)

Una de las rutas de obtención de energía más importantes es la FAO, que sucede en la matriz mitocondrial. El músculo utiliza como fuente de energía para la contracción muscular los carbohidratos y los ácidos grasos, siendo la contribución de los BCAA al gasto total de energía muy reducida (Romijn *et al.*, 1993; Hoppeler, 1999). El palmitato, un ácido graso de 16C, almacena 39 KJ/g de energía en comparación con los 16 KJ/g almacenados en 1 molécula de glucosa. Por lo tanto, los ácidos grasos son una fuente importante de energía celular, particularmente durante el ayuno (en condiciones de privación de glucosa) y el ejercicio aerobio (Soeters *et al.*, 2012), así, la regulación dinámica de la FAO es clave para el mantenimiento de la fisiología del músculo. Por ello, las mitocondrias han desarrollado un complejo conjunto de reacciones para permitir que la grasa acceda a la maquinaria de la FAO en un proceso finamente regulado e integrado con el resto de procesos metabólicos mitocondriales.

La FAO es un proceso catabólico que consta de cuatro reacciones en cadena (oxidación mediada por FAD, hidratación, oxidación mediada por NAD y tiólisis) durante las cuales los ácidos grasos sufren la remoción de dos átomos de C sucesivamente en cada ciclo del proceso, hasta que el ácido graso se descompone por completo en forma de moléculas de acetil-CoA y coenzimas reducidos de  $\text{FADH}_2$  y  $\text{NADH}$ , que serán posteriormente oxidados para generar ATP en la OXPHOS (Adeva-Andany *et al.*, 2019).

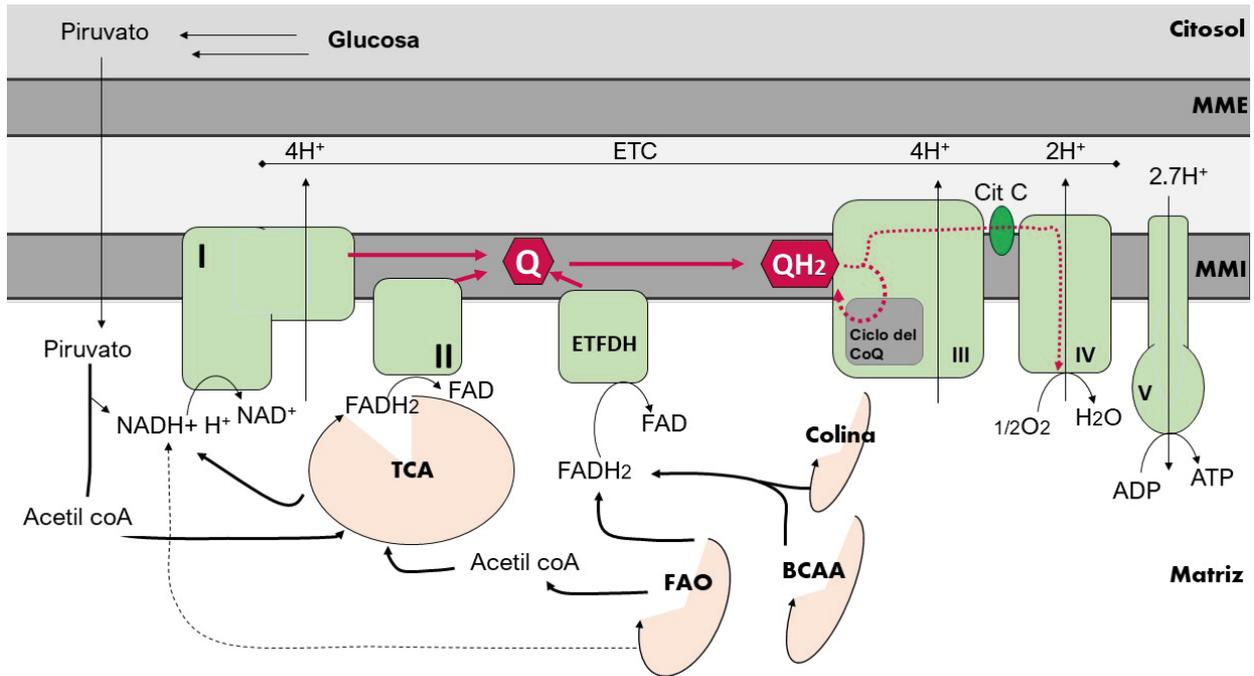
### 1.2.2. La fosforilación oxidativa (OXPHOS)

Las células musculares consumen nutrientes para generar energía biológica en forma de ATP. La oxidación de substratos termina en la generación de un gradiente electroquímico en la MMI, que lleva al consumo de oxígeno ( $\text{O}_2$ ) y la formación de un potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). En la OXPHOS, se acopla la respiración mitocondrial con la generación de ATP (Figura 2). Este proceso se basa en la teoría quimiosmótica planteada por Peter Mitchell en 1961 (Mitchell, 1961), según la cual la ATP sintasa utiliza el  $\Delta\Psi_m$  como fuerza motriz para la síntesis de ATP. Existen tres etapas clave en la OXPHOS (Figura 2):

- 1) las moléculas de  $\text{NADH}$  y  $\text{FADH}_2$  generadas por oxidación de los nutrientes pasan electrones a la ETC, generando un flujo que termina con el pasaje de electrones al  $\text{O}_2$ , que se reduce a  $\text{H}_2\text{O}$  (consumo de  $\text{O}_2$ ).
- 2) la energía libre de este flujo electrones es empleada para el transporte de protones en contra de gradiente a través de la MMI. De esta manera, se conserva la energía libre de oxidación de los combustibles metabólicos en forma de potencial electroquímico transmembrana (generación de  $\Delta\Psi_m$ ).
- 3) el flujo transmembrana de protones a favor de su gradiente de concentración proporciona la energía para la síntesis de ATP por medio de la ATP sintasa (síntesis de ATP).

### 1.2.3. La cadena de transporte de electrones mitocondrial (ETC)

La ETC transporta los electrones derivados de la oxidación de diferentes nutrientes hasta el  $\text{O}_2$  (Figura 2). Todos los electrones entran a la ETC por medio de flavoproteínas integrales (CI) o periféricas (CII y otras DFDs) de la MMI, que transfieren los electrones al CoQ, reduciéndolo a ubiquinol ( $\text{CoQH}_2$ ). Clásicamente, se ha descrito que los electrones pueden entrar a la cadena a través (i) del CI, que oxida el  $\text{NADH}$  producido en la glucólisis, y (ii) del CII, que oxida el succinato, en una reacción compartida con el TCA. El  $\text{CoQH}_2$  cede los electrones al CIII que los transporta hasta el citocromo c (Cit c), que a su vez los cede al CIV donde se reduce el  $\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$ . Durante la transferencia de electrones, los CI, CIII y CIV translocan 4, 4 y 2 protones, respectivamente, al espacio intermembrana desde la matriz, generando el  $\Delta\Psi_m$ . La ATP sintasa o complejo V, genera 1 molécula de ATP por cada 8/3 (2.7) protones reintroducidos del espacio intermembrana a la matriz (Figura 2). De esta estequiometría de reacción queda de manifiesto que el ratio p/o



**Figura 2. Esquema clásico de la OXPHOS.** Los coenzimas reducidos NADH y FADH<sub>2</sub> producidos en las principales rutas catabólicas (la glucólisis, la FAO, el catabolismo de los BCAA y el TCA) son oxidados por medio de los CI, CII y ETFDH localizados en la MMI. Los electrones son transportados hasta el CIII por medio del CoQ. El CIV reduce el O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O. El complejo V o la ATP sintasa utiliza el gradiente de protones generado por los CI, CIII y CIV para generar ATP en la matriz mitocondrial.

(nmol de ATP producido / nmol de O<sub>2</sub> consumido) depende del sustrato oxidado y del punto de entrada de los electrones a la ETC. Así, se generarán alrededor de 3 moléculas de ATP por cada NADH oxidado, mientras que solamente 2 ATP de la oxidación del succinato. En otros términos, a paridad de ATP producido, el consumo de O<sub>2</sub> será menor cuando los electrones entran a la ETC a través del CI que a través del CII. Esto se debe a la peculiaridad del CII, único complejo de la ETC que no transloca protones al espacio intermembrana. De hecho, (i) esta característica, junto con (ii) el hecho de que ninguna de las subunidades de este complejo es codificada por el ADN mitocondrial, hacen que el CII, aunque clásicamente nombrado como parte de la OXPHOS, no difiera de al menos otras 5 flavoproteínas que reducen el CoQ a CoQH<sub>2</sub>.

Estas flavoproteínas accesorias a la OXPHOS, a menudo infravaloradas, integran importantes funciones mitocondriales con la producción de ATP, como son la síntesis de pirimidinas (DHODH), el metabolismo de prolina y glutamato (PRODH), y el catabolismo de glúcidos (GPD2), aminoácidos y ácidos grasos (DLD y ETFDH). Sin embargo, y de manera sorprendente, existen pocos estudios que ahondan en el rol metabólico de estas flavoproteínas como integradores de diferentes funciones de la mitocondria. Por ello, en esta tesis proponemos un estudio pormenorizado de ellas, para entender las causas que provocan los trastornos metabólicos mitocondriales asociados a ellas y su directa implicación en la OXPHOS, así como la definición de posibles dianas terapéuticas.

A continuación, se explican detalladamente las proteínas, complejos proteicos y moléculas que intervienen en la OXPHOS.

### 1.2.3.1. Complejo I (CI)

El complejo I (CI) o NADH-ubiquinona oxidorreductasa, representa el punto de entrada a la mitocondria de los electrones en forma de coenzima NADH reducido provenientes de la glucólisis y otros procesos catabólicos. El CI de mamíferos conforma una proteína integral de membrana en forma de “L” que comprende 45 subunidades: 14 subunidades “*centrales*”, que están conservadas desde bacterias a humanos y son suficientes para la catálisis por medio de sus nueve cofactores (un FMN y ocho centros ferrosulfurados (FeS)); y 31 subunidades “*suplementarias*”, que son necesarias para el ensamblaje, la estabilidad, la regulación o el cumplimiento de funciones independientes de las funciones catalíticas (Hirst, 2013; Rodenburg, 2016; Zhu, Vinothkumar and Hirst, 2016). Siete de estas subunidades están codificadas por el ADN mitocondrial. Así, el CI cataliza la oxidación de NADH a NAD<sup>+</sup> en la matriz y la transferencia de dos electrones por medio de sus centros FeS y FMN al CoQ generando CoQH<sub>2</sub>, con la translocación de cuatro protones a través de la MMI (Ripple, Kim and Springett, 2013).

### 1.2.3.2. Flavoproteínas periféricas de la MMI (lado positivo)

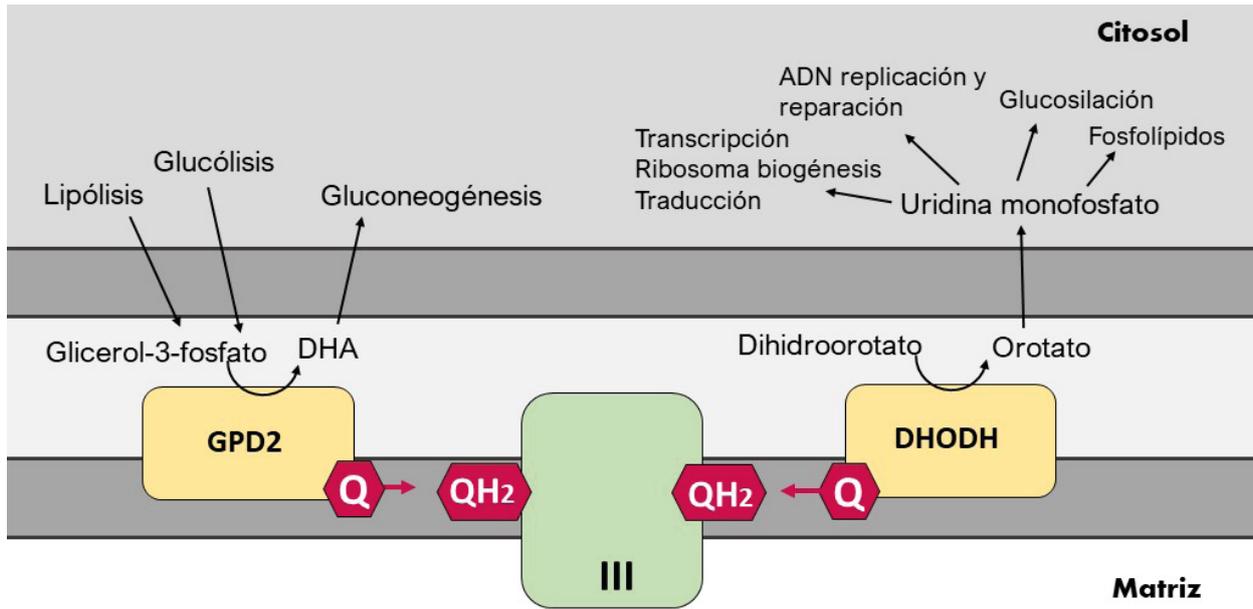
Como he comentado anteriormente, los electrones pueden entrar a la ETC a través de una serie de DFDs que son capaces de reducir el CoQ a CoQH<sub>2</sub>, aportando electrones de diversas rutas catalíticas y, algunas lo hacen desde el espacio intermembrana (Figura 3):

#### Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD2)

La glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD2) es una DFD que cataliza la oxidación del glicerol-3-fosfato a dihidroxiacetona fosfato en la superficie exterior de la MMI, a la cual está anclada. Un par de electrones se transfieren desde el glicerol-3-fosfato al grupo prostético FAD para producir FADH<sub>2</sub>, que transfiere los electrones al CoQ, entrando en la ETC (Figura 3) (Ansell *et al.*, 1997; Mráček, Drahotka and Houštěk, 2013). La GPD2 es muy utilizada en los músculos ya que permite mantener una alta velocidad de OXPHOS, alimentando la ETC con electrones provenientes de la glucólisis, eludiendo el CI (Gaviraghi *et al.*, 2019). Recientemente, se ha observado que la sobreexpresión de GPD2 promueve el metabolismo del glicerol en hipoxia, previniendo la disfunción cardíaca durante los fenómenos isquémicos (Ishihama *et al.*, 2021). Además, su papel en la generación de ROS ha sido propuesto como una diana terapéutica contra el cáncer (Singh, 2014).

#### Dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH)

En mamíferos, la dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH) cataliza el cuarto paso en la biosíntesis de pirimidinas *de novo*, que implica la oxidación mediada por CoQ de dihidroorotato a orotato y la reducción de FMN a FMNH<sub>2</sub>, que se encuentra unido covalentemente a la enzima; el orotato luego se convierte en uridina monofosfato, el nucleótido de ARN involucrado en la biogénesis de los ribosomas (Figura 3) (Mao *et al.*, 2021). En los últimos años, se ha puesto de manifiesto el rol central de la DHODH en las terapias de lucha contra el cáncer, ya que su actividad está asociada



**Figura 3. CoQ reductasas localizadas en lado positivo de la MMI.** La GPD2 es una CoQ reductasa que utiliza FAD como cofactor para introducir los electrones provenientes de la oxidación del glicerol-3-fosfato generados en la glucólisis y lipólisis. La DHODH acopla la OXPHOS con la biosíntesis de pirimidinas, que se emplean para funciones celulares tan importantes como la transcripción y la replicación del ADN. El CoQH<sub>2</sub> generado por estas DFD es posteriormente oxidado en el CIII.

a la defensa de la ferroptosis (una forma de muerte celular regulada que es inducida por una peroxidación lipídica excesiva) en coordinación con GPX4 y FSP1 (Mohamad Fairus *et al.*, 2017; Leanne *et al.*, 2019; Madak *et al.*, 2019; Boukalova *et al.*, 2020; Wang and Min, 2021).

### 1.2.3.3. Flavoproteínas periféricas de la MMI (lado negativo)

En cambio, otras DFDs son capaces de reducir el CoQ a CoQH<sub>2</sub>, desde la matriz mitocondrial (Figura 4):

#### Complejo II (CII)

El complejo II (CII) o succinato-ubiquinona oxidorreductasa, constituye la vía de entrada de los electrones procedentes del ciclo del TCA, catalizando la oxidación de succinato a fumarato en la matriz mitocondrial. A su vez, estos electrones son transportados a través del complejo para reducir CoQ a CoQH<sub>2</sub> (Cecchini, 2003; Maklashina and Cecchini, 2010). A pesar de que el ciclo del TCA ocurre en la matriz mitocondrial, el CII se encuentra anclado a la MMI desde el lado de la matriz. Su estructura, compuesta por 4 cadenas polipeptídicas SDHA, SDHB, SDHC y SDHD, le permite transferir los electrones hacia la ETC. Esto se debe a que SDHA y SDHB forman un dominio soluble grande orientado hacia la matriz, mientras que SDHC y SDHD forman un pequeño dominio integral de membrana. La subunidad SDHA contiene un FAD enterrado en su estructura y unido covalentemente, que es el que acepta 2e<sup>-</sup>/2H<sup>+</sup> del succinato. La subunidad SDHB contiene un 2Fe-2S, un 4Fe-4S y un 3Fe-4S, que transportan los electrones (en este

orden) desde el FAD hasta el grupo hemo que forman SDHC y SDHD (Sun *et al.*, 2005). Este último, también se denomina sitio Q, pues es donde se produce finalmente la transferencia de electrones al CoQ (Iverson, 2013).

### **Dihidrolipoamida deshidrogenasa (DLD)**

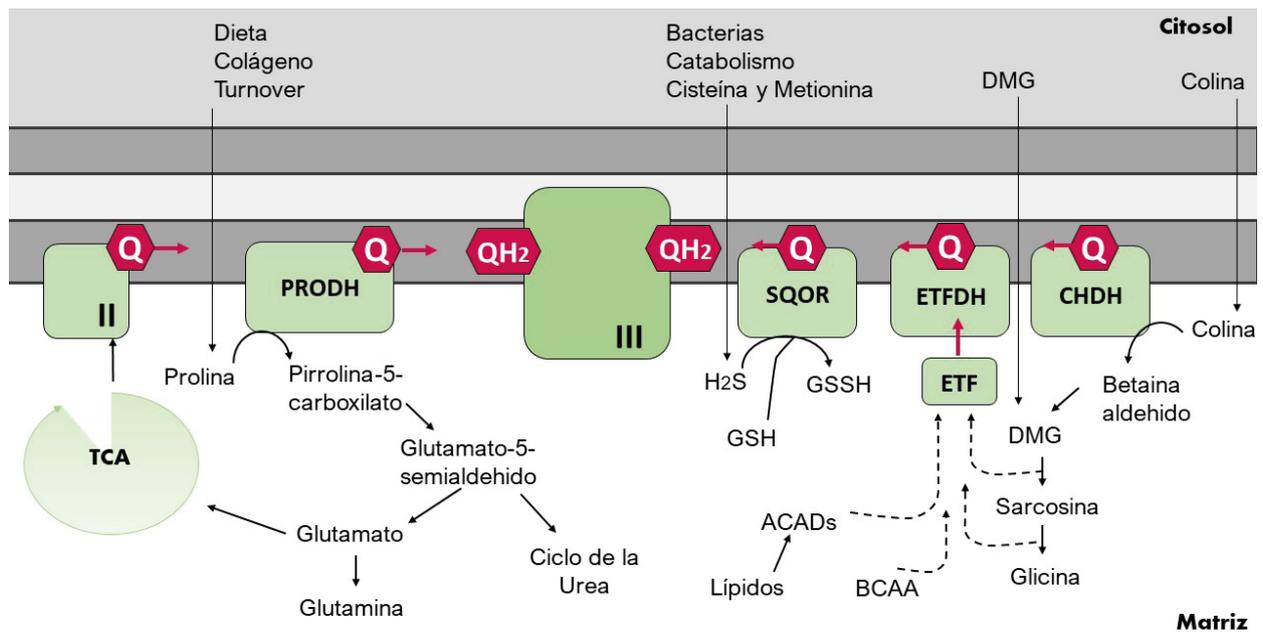
La dihidrolipoamida deshidrogenasa (DLD) es una oxidorreductasa muy versátil con múltiples funciones críticas en el metabolismo energético y el equilibrio redox (Carothers, Pons and Patel, 1989; Babady *et al.*, 2007). En la matriz mitocondrial, el homodímero DLD funciona como componente de los complejos de la piruvato deshidrogenasa, la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa, la BCKDH y el sistema de ruptura de la glicina (Bryk *et al.*, 2002; Klyachko *et al.*, 2005). Es capaz de reducir el CoQ a CoQH<sub>2</sub> e introducir electrones a la ETC. Algunos estudios muestran que tiene un papel prooxidante (Petrat *et al.*, 2003), sin embargo, otros sugieren que DLD también puede tener un papel antioxidante (Xia *et al.*, 2001; Igamberdiev *et al.*, 2004). Investigaciones recientes, realizadas por Yang *et al.*, han demostrado que la inhibición de DLD induce respuestas antioxidantes y atenúa el estrés oxidativo en la diabetes tipo 2 (Yang, Song and Yan, 2019).

### **Sulfuro ubiquinona oxidorreductasa (SQOR)**

La sulfuro ubiquinona oxidorreductasa (SQOR) utiliza el sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) producido por el metabolismo de la cisteína y metionina, así como el producido por bacterias, para introducir electrones a la ETC, de esta manera protege a los tejidos de la toxicidad de este gas, protegiendo a las proteínas y los lípidos. Es muy probable que el metabolito celular glutatión (GSH) sirva como aceptor fisiológico del azufre, interviniendo en las defensas antioxidantes (Banerjee, Purhonen and Kallijärvi, 2021; Kumar and Banerjee, 2021).

### **Prolina deshidrogenasa (PRODH)**

La prolina deshidrogenasa (PRODH) es una DFD que cataliza la conversión de L-prolina a  $\Delta$ -1-pirrolina-5-carboxilato (P5C), con la consiguiente reducción de CoQ a CoQH<sub>2</sub> (Bender *et al.*, 2005). Además de su papel en la OXPHOS, numerosos estudios muestran que PRODH desempeña un papel importante en la inhibición del crecimiento de tumores al actuar en las vías apoptóticas mediadas por el supresor de tumores p53 (Liu and Phang, 2012; Raimondi *et al.*, 2013). De hecho, PRODH es uno de los 14 genes más inducidos por p53 (Polyak *et al.*, 1997). Se ha demostrado que induce la parada del ciclo celular, autofagia y apoptosis a través de la generación de ROS en una variedad de tipos de cáncer (Maxwell and Rivera, 2003; Natarajan *et al.*, 2012; Servet *et al.*, 2012; Liang *et al.*, 2013; Nagano *et al.*, 2017; Huynh *et al.*, 2020).



**Figura 4. CoQ reductasas localizadas en lado positivo de la MMI.** Esquema de una parte de las DFDs que participan en la OXPHOS introduciendo electrones desde la matriz mitocondrial. Entre ellas el CII (ciclo del TCA), PRODH (metabolismo de la prolina/glutamato), ETFDH (FAO y catabolismo de BCAA), CHDH (metabolismo de la colina) y SQOR (metabolismo de H<sub>2</sub>S). El CoQH<sub>2</sub> generado por estas DFDs es posteriormente oxidado en el CIII.

### Flavoproteína transportadora de electrones deshidrogenasa (ETFDH) y Flavoproteína transportadora de electrones (ETF)

Una de las más importantes DFDs es la flavoproteína transportadora de electrones deshidrogenasa (ETFDH), que acepta electrones de flavoproteína de transferencia de electrones (ETF), para transferirlos al CoQ (Ruzicka and Beinert, 1977). Estos electrones provienen de la FAO, del catabolismo de los BCAA y del metabolismo de la colina. Por lo tanto, ETFDH juega un papel central en la bioenergética de los mamíferos, así como de otros organismos aeróbicos y anaeróbicos. La preproteína humana contiene una secuencia líder de 33 residuos de aminoácidos correspondiente al péptido señal mitocondrial, que se elimina proteolíticamente una vez que la proteína ha atravesado la MMI, donde se inserta periféricamente del lado de la matriz. La estructura tridimensional de ETFDH obtenida mediante cristalografía de rayos X muestra una proteína monomérica con cuatro dominios funcionales: el dominio de unión a FAD (DUF), el centro 4Fe-4S, el dominio de unión al CoQ (DUQ) y un dominio de unión a la membrana (DUM) dentro del DUQ (Figura 1B) (Roberts, Frerman and Kim, 1996; ŠIMKOVIČ *et al.*, 2002; Zhang, Frerman and J.-J. P. Kim, 2006).

El DUF contiene una molécula de FAD con una conformación alargada y está completamente enterrado en la proteína. Como en otras flavoproteínas, la pirimidina del anillo de isoaloxazina está unido por puentes de hidrógeno al polipéptido (Zhang, Frerman and J.-J. P. Kim, 2006). Se cree que el centro 4Fe-4S enterrado en la estructura, pero más próximo a la superficie, es el punto de entrada de los electrones desde ETF (GOODMAN *et al.*, 1994; Swanson *et al.*, 2008). El 4Fe-

4S pasa los electrones al FAD y, finalmente, de éste pasan al CoQ (Zhang, Frerman and J.-J. P. Kim, 2006; Watmough and Frerman, 2010). El DUQ está compuesto principalmente por residuos hidrófobos, que forman un bolsillo donde penetra el CoQ para ser reducido. La cola isoprenoide del CoQ crea enlaces de van der Waal con la mayoría de los residuos hidrofóbicos que la rodean. El anillo de benzoquinona del CoQ penetra profundamente en el bolsillo y solo uno de los dos átomos de oxígeno del carbonilo (O4) forma enlaces de hidrógeno con la cadena polipeptídica. El átomo de O4 del anillo de benzoquinona, en particular, forma enlaces de hidrógeno con los residuos G272 y G273 de la cadena polipeptídica de ETFDH. Los residuos que forman el bolsillo hidrófobo están altamente conservados entre las secuencias de ETFDH de diferentes especies, G273 en particular, que está absolutamente conservada en todas las secuencias de ETFDH estudiadas (Zhang, Frerman and J. P. Kim, 2006).

ETFDH se une a la cara electronegativamente cargada de la MMI, pero no la atraviesa completamente. Esto sucede debido a que posee en su estructura dos segmentos polipeptídicos altamente hidrofóbicos localizados en la superficie de la molécula y alrededor del DUQ, que forman la entrada del bolsillo por donde penetra el CoQ y le permite anclarse a la membrana. Mutaciones puntuales en el DUF o en DUQ, así como mutaciones en ETF, provocan el desarrollo de MADD con distintos niveles de afección en los individuos (Frerman and Goodman, 1985; Olsen *et al.*, 2007). No obstante, aunque ETFDH tiene un papel esencial para satisfacer las necesidades energéticas del músculo cardíaco y el músculo esquelético, no se ha generado hasta la fecha ningún modelo animal knock-out de ETFDH que permita estudiar los mecanismos moleculares que conllevan a la aparición de MADD, así como otras implicaciones que conlleva la ausencia de ETFDH en mamíferos. En este sentido, las bases de datos de repositorios de fenotipos murinos indican un 100% de letalidad neonatal para mutaciones en ETFDH (<https://www.mousephenotype.org/>), lo que supone un desafío para su estudio.

Por otro lado, la ETF es una enzima dimérica compuesta por dos subunidades diferentes, ETFA y ETFB, codificadas por dos genes diferentes, *ETF A* y *ETF B*, respectivamente, y una molécula de FAD y AMP. ETF se encuentra en la matriz mitocondrial y media la transferencia de electrones desde una serie de flavoenzimas mitocondriales a la ETC, a través de ETFDH. Se ha demostrado que el 4Fe-4S de ETFDH es el aceptor de electrones de ETF, y que la interacción entre las dos enzimas se realiza a través de ETFB (Swanson *et al.*, 2008). Al menos otras 14 enzimas humanas transfieren electrones a ETF (Henriques *et al.*, 2021), lo que plantea el sorprendente desafío de unirse e interactuar específicamente con flavoenzimas de diferentes rutas oxidativas (Figura 1). Un grupo son las acil-CoA deshidrogenasas (ACADs) involucradas en la FAO (VLCAD, LCAD, MCAD y SCAD) y otras tres ACADs (ACAD9, ACAD10 y ACAD11) que deshidrogenan los sustratos de la cadena de acilo. ACAD9 es esencial para el ensamblaje del CI (Nouws *et al.*, 2010), mientras que ACAD10 y ACAD11 deshidrogenan ciertos acil-CoA de cadena larga y cadena ramificada (He *et al.*, 2011). Un segundo grupo consiste en ACADs que oxidan intermediarios en la degradación de aminoácidos (IBDH, SBCAD, IVD, GCDH). Un tercer grupo está compuesto por deshidrogenasas involucradas en el metabolismo de la colina (SARDH y DMGDH), que son ortólogos evolutivos pero que no comparten una similitud de secuencia significativa con las ACADs. Recientemente, se ha demostrado que la D-2-hidroxisuccinato deshidrogenasa (D2HSDH), cuyas

mutaciones están asociadas con el trastorno neurometabólico D-2-hidroxiglutarato aciduria, utiliza ETF comoceptor de electrones (Toplak *et al.*, 2019). La participación en una multitud de procesos metabólicos en la matriz mitocondrial indica que ETF y ETFDH representan un centro regulador que controla el flujo de electrones a la ETC desde diferentes rutas a través de otras flavoenzimas. Las deficiencias genéticas en sus genes codificantes afectarán las vías metabólicas “*aguas arriba*”, lo que da como resultado la acumulación de metabolitos intermedios y una disminución en la producción de ATP.

#### 1.2.3.4. Coenzima Q (CoQ)

El CoQ es una molécula hidrófoba y móvil que se encuentra en las membranas de todos los dominios de vida (Lester and Crane, 1959). Recibe electrones de diferentes rutas metabólicas, en las que intervienen tanto NADH como FADH<sub>2</sub>, por tanto, es considerado un componente esencial que conecta el CI y otras DFDs con el CIII en la MMI. En la ETC, el estado redox del CoQ se encuentra en constante equilibrio y se reduce mediante dos transferencias de un electrón: (i) al aceptar un electrón, transformándose en el radical ubisemiquinona (CoQH•), y (ii) al aceptar el segundo electrón, formando CoQH<sub>2</sub>. Los sitios aceptores de electrones son el O1 y el O4 del anillo de benzoquinona.

Estructuralmente, está formado por un anillo de benzoquinona liposoluble unido a una larga cadena lateral isoprenoide (C9 en ratones y C10 en humanos) (Bentinger, Tekle and Dallner, 2010; Alcázar-Fabra, Navas and Brea-Calvo, 2016). Al ser una molécula pequeña e hidrofóbica puede difundir fácilmente dentro de la bicapa lipídica de la MMI. La cola isoprenoide estabiliza la molécula en el medio de la bicapa lipídica, mientras la cabeza se mueve desde el interior hasta la superficie de la membrana dependiendo de su estado redox, siendo el estado reducido (CoQH<sub>2</sub>) el que se mueve hacia la superficie debido a su carácter más polar (Bentinger, Tekle and Dallner, 2010).

El CoQ se sintetiza endógenamente en todas las células y en la membrana de gran variedad de orgánulos celulares (Wang and Hekimi, 2016), donde cumple distintas funciones, desde su imprescindible papel en la OXPHOS, hasta la generación de ROS mitocondriales (Turunen, Olsson and Dallner, 2004). De hecho, se cree que el intermediario CoQH• producido en la transferencia de electrones puede reaccionar con el O<sub>2</sub> y generar superóxido (O<sub>2</sub>•) (Chen *et al.*, 2003; Treberg, Quinlan and Brand, 2011). Por el contrario, la forma reducida ha sido sugerida como un antioxidante, protegiendo a las membranas de la peroxidación lipídica (Bentinger, Brismar and Dallner, 2007).

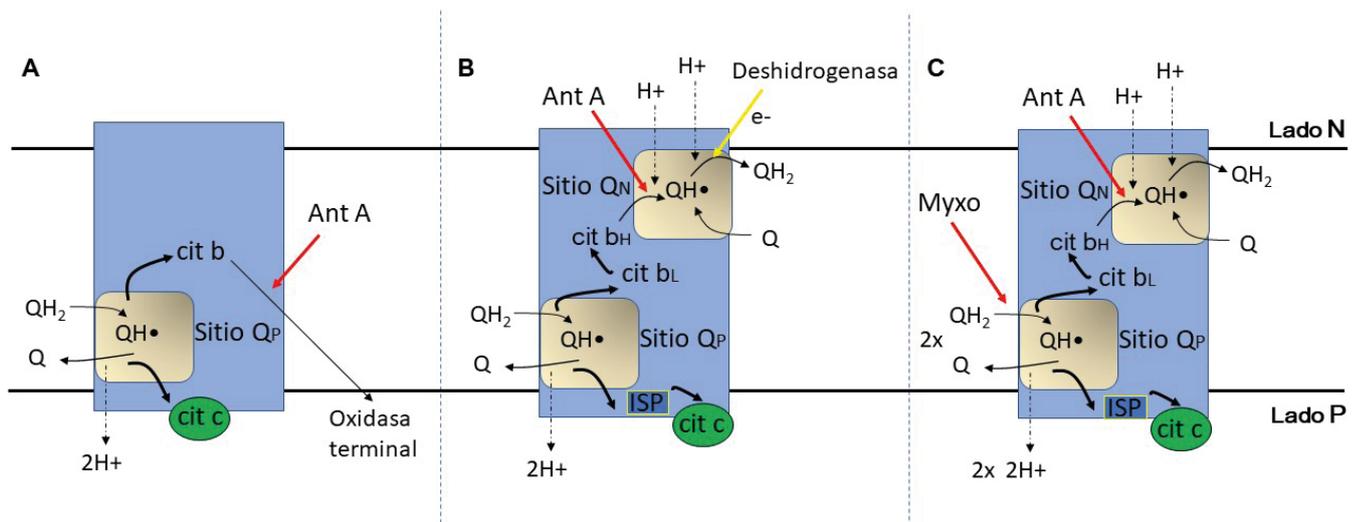
Defectos genéticos en la biosíntesis de CoQ pueden causar enfermedades como miopatías y ataxias (Stefely and Pagliarini, 2017), y por lo contrario, enfermedades metabólicas y musculares pueden cursar con defectos primarios o secundarios de CoQ (Alcázar-Fabra, Navas and Brea-Calvo, 2016). Además, se ha descrito que la abundancia de CoQ disminuye con la edad (Kalén, Appelkvist and Dallner, 1989; Wang, Oxer and Hekimi, 2015). Si bien altos niveles de CoQ están generalmente asociados con la homeostasia celular, los mecanismos que regulan su biosíntesis

permanecen en parte sin definir. La mayor parte de la CoQ eucariótica se genera en la MMI, pero una parte de la CoQ puede producirse fuera de las mitocondrias (Stefely and Pagliarini, 2017). La biosíntesis de CoQ requiere (i) la producción de la cabeza, (ii) la biosíntesis de isopreno y la polimerización de la cola, (iii) la unión de la cola al grupo de la cabeza y (iv) una serie de modificaciones del grupo de la cabeza. Para ello, se cree que se forma en la MMI un “complejo Q” que contiene las proteínas necesarias para la etapa terminal de la biosíntesis de CoQ (COQ3-COQ9), lípidos (fosfolípidos y lípidos isoprenoides), cofactores de moléculas pequeñas e iones metálicos (Alcázar-Fabra, Navas and Brea-Calvo, 2016; Stefely and Pagliarini, 2017). Sin embargo, queda por determinar un catálogo completo de las proteínas, lípidos y metabolitos que componen el complejo Q. Muchas preguntas sobre la biosíntesis de CoQ siguen sin respuesta, por ejemplo, ¿el complejo Q se localiza en una región específica de la MMI?, ¿el complejo Q interactúa con alguno de los complejos de la OXPHOS?, o si, ¿puede esta interacción regular su biosíntesis?

### 1.2.3.5. Complejo III (CIII)

El complejo III (CIII) o ubiquinol-citocromo c oxidorreductasa (o citocromo bc1), es el encargado de aceptar los electrones procedentes del  $\text{CoQH}_2$  (reducido en los CI y CII, o por alguna otra DFDs) y transferirlo al citocromo c, utilizando esta energía a favor de gradiente para translocar 4 protones al espacio intermembrana. Estructuralmente, el CIII mitocondrial es un homodímero en el que cada monómero está formado por 11 subunidades, 8 de las cuales tienen funciones estructurales y 3 de ellas contienen centros activos. Entre estas últimas, un citocromo b (cit b) (con dos grupos hemo tipo b), un cit c (con un grupo hemo tipo c) y una proteína tipo Rieske que contiene un centro ferrosulfurado  $2\text{Fe}-2\text{S}$  (Iwata *et al.*, 1998). La subunidad del citocromo b está codificada por el ADN mitocondrial y el resto está codificada por genes nucleares. El mecanismo de acción es conocido como el ciclo del CoQ y consiste en una versión modificada de ciclo del CoQ propuesto por Mitchell (Mitchell, 1976; Crofts, 2004a) (Figura 5). En el CIII se identifican un sitio de oxidación del CoQ (sitio  $\text{Q}_p$ ), situado en el lado de la membrana que da al espacio intermembrana cargado positivamente, y un sitio de reducción del CoQ (sitio  $\text{Q}_N$ ), situado en el lado opuesto que da la matriz, cargado negativamente.

El mecanismo de acción sucede en dos rondas, en cada una de la cual se liberan 2 protones al espacio intermembrana (Figura 5C). La reacción comienza cuando una molécula de  $\text{CoQH}_2$  se une al complejo en el sitio  $\text{Q}_p$ . Aquí se produce el paso de oxidación mediante una bifurcación de los electrones. El primer electrón es transferido al centro  $2\text{Fe}-2\text{S}$  de la proteína Rieske, que a su vez transfiere el electrón al cit c que difunde por la membrana hasta el CIV. Mientras, el segundo electrón es transferido al primer grupo hemo (cit  $b_L$ ), que a su vez lo transfiere al segundo grupo hemo (cit  $b_H$ ) que cede el electrón a una molécula de CoQ oxidado unido previamente al sitio  $\text{Q}_N$ , quedando como la forma intermedia semiquinona ( $\text{CoQH}\bullet$ ) que permanece unida al sitio  $\text{Q}_N$ . Para completar el ciclo, una segunda molécula de  $\text{CoQH}_2$  se une al sitio  $\text{Q}_p$ . El primer electrón sigue los pasos descritos arriba hasta el cit c, mientras el segundo es transferido por los grupos hemo b hasta la  $\text{CoQH}\bullet$  dando lugar a un  $\text{CoQH}_2$  que sale del complejo y cierra el ciclo (Figura 5C) (Xia *et al.*, 2013).



**Figura 5. Evolución de las teorías del mecanismo de acción del CIII, conocido como el ciclo del CoQ.** (A) Teoría inicial del camino bifurcado de los electrones el CIII, propuesto por Wikström y Berden (1972), que dio lugar a las teorías posteriores del ciclo del CoQ. (B) Teoría original del ciclo del CoQ propuesta por Mitchell (1975), en la que interviene una deshidrogenasa alternativa. (C) Teoría modificada del ciclo del CoQ, en la que es necesaria una segunda molécula de CoQ para completar el mecanismo de acción del CIII. Abreviaturas: Ant A (antimicina A), Myxo (myxothiazol), cit b (citocromo b), cit bL (citocromo b low potential), cit bH (citocromo b high potential), cit c (citocromo c). ISP (proteína ferrosulfurada), sitio QP (sitio de oxidación del QH<sub>2</sub>), sitio QN (sitio de reducción del Q), Q (coenzima Q), QH<sub>2</sub> (coenzima Q reducido), QH• (radical ubisemiquinona).

### 1.2.3.6. Complejo IV (CIV)

El complejo IV (CIV) o citocromo c oxidasa, se encarga de aceptar los electrones procedentes del cit c reducido y transferirlos al O<sub>2</sub>, generando H<sub>2</sub>O, acoplado el transporte de dos protones al espacio intermembrana (Yoshikawa and Shimada, 2015). En la mayoría de las estructuras cristalinas del CIV aislado, aparece como un dímero. Cada monómero del CIV contiene 13 subunidades bien establecidas, de las cuales las tres subunidades centrales incrustadas en la membrana están codificadas por ADN mitocondrial, mientras que las otras están codificadas en el genoma nuclear (Timón-Gómez et al., 2018). Una decimocuarta subunidad adicional, NDUFA4 (antes asociada al CI), ha sido descubierta en la estructura monomérica del CIV en una posición que evitaría la formación de dímeros (Zong et al., 2018).

### 1.2.4. La ATP sintasa o complejo V (CV)

La ATP sintasa o el complejo V (CV) utiliza el gradiente de protones generado por los CI, III y IV para fosforilar ADP y generar ATP (Mitchell, 1961). Las ATP sintasa también pueden funcionar en la dirección opuesta (forma reversa), para generar fuerza motriz de protones a través de la hidrólisis de ATP (es decir, funcionando como ATPasa) (Abbas *et al.*, 2020). La ATP sintasa humana está constituida por 27 subunidades de 18 tipos, codificadas en el ADN nuclear y 2 por el ADN mitocondrial, que forman dos dominios principales: el dominio Fo-ATPasa (formado, entre otras, por las subunidades a y 8c), embebido en la MMI y el dominio catalítico F1-ATPasa

(formado por las subunidades 3 $\alpha$ , 3 $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ ) que sobresale en la matriz mitocondrial (Runswick *et al.*, 2013). Ambos dominios están unidos por el brazo central que componen las subunidades  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  del dominio F1 y el brazo periférico que contiene las subunidades b, d, F6 y OSCP (Rees *et al.*, 2012). Además, la actividad de la ATP sintasa puede ser regulada por su inhibidor específico IF1 (Formentini, Sánchez-Aragó, Sánchez-Cenizo and J. M. Cuezva, 2012; Formentini, Ryan, *et al.*, 2017; Boreikaite *et al.*, 2019). IF1 fue identificado inicialmente como inhibidor de su forma reversa, sin embargo, hoy se conoce que IF1 puede inhibir su forma directa mediante su unión entre las subunidades catalíticas de la sintasa (Sánchez-Cenizo *et al.*, 2010; Esparza-Moltó, Nuevo-Tapióles and Cuezva, 2017).

### 1.3. Especies reactivas del oxígeno (ROS)

La mitocondria es, también, uno de los sitios de mayor producción de ROS y, en especial manera, de O<sub>2</sub>• (Cadenas and Davies, 2000; Turrens, 2003) (Figura 6). El O<sub>2</sub>• es producido por reducción parcial del O<sub>2</sub> y es rápidamente transformado a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por la superóxido dismutasa mitocondrial (Weisiger and Fridovich, 1973). Experimentalmente, se ha estimado que cerca del 2% del O<sub>2</sub> consumido es convertido en O<sub>2</sub>• a nivel mitocondrial (Cadenas and Davies, 2000). Si bien una moderada producción de ROS es esencial para la señalización celular (Barja, 1993; Linnane and Eastwood, 2006; Formentini, Sánchez-Aragó, Sánchez-Cenizo and Cuezva, 2012), la pérdida de equilibrio entre los sistemas de oxidación y antioxidante provoca un exceso de ROS, generando estrés oxidativo. La expresión y actividad de las enzimas responsables de la producción de ROS y de las proteínas que apantallan su formación y propagación varía entre tejidos, con la edad y de organismo a organismo. Defectos genéticos, metabólicos o incluso la sobre nutrición y un estilo de vida sedentario o poco saludable influyen en el incremento del estrés oxidativo, contribuyendo a la aparición de patologías asociadas a la vejez (Barja, 2004, 2007; James *et al.*, 2012), como enfermedades metabólicas y musculares (Bournat and Brown, 2010). Esto se debe a que los ROS generan reacciones en cadena, y pueden atacar proteínas, lípidos y ácidos nucleicos conduciendo a disfunciones celulares, incluyendo pérdida de energía metabólica, alteraciones en la señalización celular y el control del ciclo celular, mutaciones genéticas y epigenéticas, así como inflamación, activación inmune e resistencia a insulina (Formentini, Sánchez-Aragó, Sánchez-Cenizo and Cuezva, 2012; Scialo *et al.*, 2012; Yee, Yang and Hekimi, 2014; Formentini, Santacatterina, Núñez de Arenas, *et al.*, 2017).

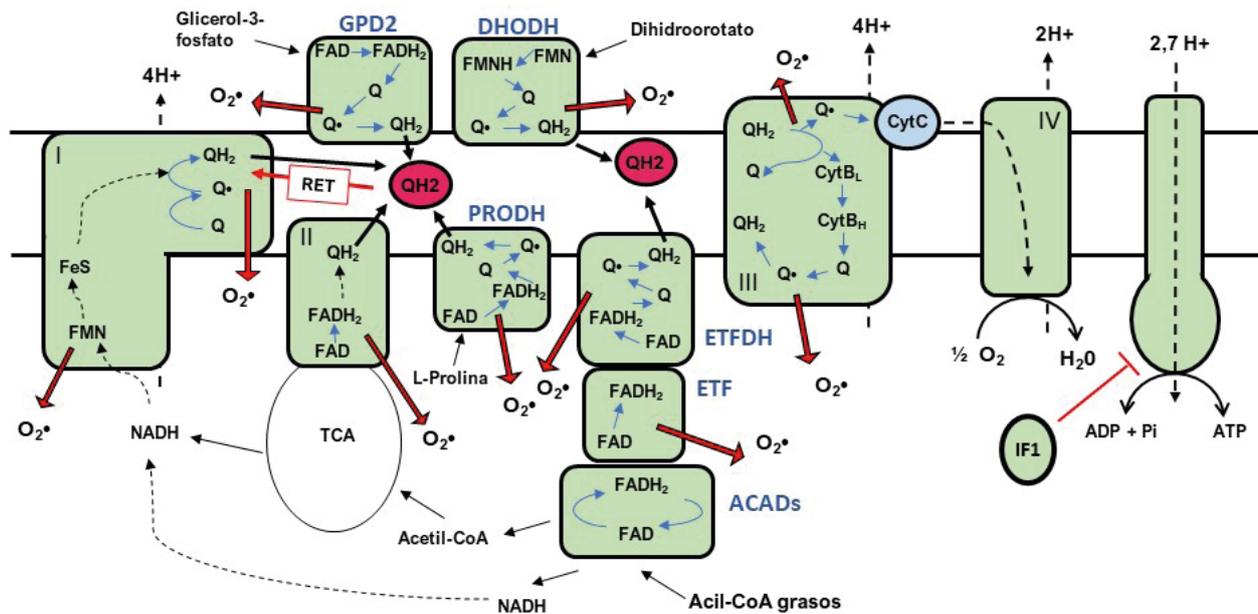
En la ETC, se han identificado diferentes sitios de producción de ROS, que están distribuidos entre la cara interna y externa de la MMI (Figura 6). Los principales puntos de producción de ROS son los CI y CIII (Lenaz, 2012; Quinlan *et al.*, 2013), aunque el lugar de producción depende particularmente de los sustratos que son oxidados. La producción de ROS ocurre en los grupos prostéticos dentro de las proteínas de la ETC, y está favorecida cuando transportadores de electrones como el CoQH<sub>2</sub> están unidos a estas proteínas favoreciendo el escape de electrones y la reducción del O<sub>2</sub> a O<sub>2</sub>•. Además, formas parcialmente reducidas o radicales, como las semiquinonas, pueden funcionar ellas mismas como donadores de electrones, favoreciendo la producción y propagación de los ROS (Turrens, Alexandre and Lehninger, 1985; Turrens, 2003). Para que la transferencia de un electrón al O<sub>2</sub> tenga lugar -generando ROS-, tanto el O<sub>2</sub> como

el dador de un electrón, deben estar a una distancia mínima de 14 Å (1 Å=0.1 nm) (Moser *et al.*, 2006). El O<sub>2</sub> es hasta 3 veces más soluble dentro de la membrana que en el agua (Shiva *et al.*, 2001), por lo que puede localizarse cerca de los puntos de transferencia de electrones dentro de la MMI. Sin embargo, las proteínas transportadoras de electrones de la ETC suelen tener los centros activos de transferencia electrónica embebidos dentro de su estructura y protegidos del O<sub>2</sub>, minimizando así la formación de ROS. Por lo tanto, el escape de electrones suele ocurrir en puntos donde los centros activos están expuestos, sea a la fase acuosa de la matriz o en el interior de la membrana y, por tanto, donde el O<sub>2</sub> puede reaccionar con los grupos prostéticos.

En este sentido, el CI contiene siete centros FeS bien protegidos del O<sub>2</sub> en el brazo hidrofílico que intervienen en la transferencia de electrones desde el FMN al CoQ, por lo que la reducción del O<sub>2</sub> a O<sub>2</sub>• ocurre probablemente en el grupo FMN y en el sitio de unión al CoQ (sitio de unión del inhibidor rotenona)(Herrero and Barja, 2000; Zhu, Vinothkumar and Hirst, 2016) (Figura 6). Por otro lado, está ampliamente aceptado que la acumulación de CoQH<sub>2</sub> genera O<sub>2</sub>• a través de RET (“retrograde electron transport”), un mecanismo que equilibra el ratio CoQH<sub>2</sub>/CoQ conduciendo los electrones hacia el CI y de éste al O<sub>2</sub> (Turrens, 2003; Hirst, King and Pryde, 2008; Pryde and Hirst, 2011). El CII, aunque en menor proporción, también constituye un sitio de producción de ROS, especialmente la subunidad SDHA, que contiene el FAD unido covalentemente y es el punto de entrada de los electrones por este complejo (Quinlan *et al.*, 2013; Sánchez-González *et al.*, 2020) (Figura 6). La producción de ROS por este complejo puede aumentar debido a mutaciones en la estructura (Hoekstra and Bayley, 2013), por modificaciones post-trasduccionales o por el aumento de su actividad debido a un incremento de FADH<sub>2</sub> (Sánchez-González *et al.*, 2020). La actividad del CII puede ser inhibida farmacológicamente mediante el compuesto carboxina, que se une al dominio FAD y por malonato, que se une al sitio Q. La totalidad de los ROS producidos se encuentran en la matriz, debido a la localización del complejo.

En el CIII, los sitios de producción de ROS son el sitio Q<sub>p</sub> y, sobre todo, el sitio Q<sub>N</sub> (Quinlan *et al.*, 2013) (Figura 6). Experimentos en mitocondrias de músculo esquelético de ratas demostraron que aproximadamente el 63% de los ROS son producidos en la matriz (Treberg, Quinlan and Brand, 2010). La antimicina A bloquea específicamente el sitio Q<sub>N</sub>, lo que provoca un estancamiento de los electrones en el cit b<sub>H</sub> del CIII, no pudiendo ser el CoQ reducido durante el ciclo del CoQ, y como consecuencia, los electrones terminan reduciendo el O<sub>2</sub> con la consiguiente formación de O<sub>2</sub>• (Quinlan *et al.*, 2013). Los inhibidores del sitio Q<sub>p</sub>, como el myxothiazol y la estigmatelina, bloquean la oxidación de CoQH<sub>2</sub>, lo provoca que los electrones no puedan entrar en el CIII, y evitando, al menos por parte del CIII, la formación de ROS.

Si bien el CIV no es una fuente directa de ROS, su inhibición o mutaciones que afecten a su actividad pueden facilitar la producción de ROS a partir de los CI o CIII (Chen *et al.*, 2003; Yoon *et al.*, 2005; Reichart *et al.*, 2019). El CV tampoco produce ROS de manera directa. Sin embargo, cuando la ATP sintasa es inhibida por su inhibidor específico IF1, se produce un leve incremento del ΔΨ<sub>m</sub> que como consecuencia incrementa la producción de ROS en otros puntos de la ETC (Formentini, Sánchez-Aragó, Sánchez-Cenizo and J. M. C. Cuezva, 2012; Sánchez-González *et al.*, 2020).



**Figura 6. Sitios de producción de ROS en la ETC mitocondrial.** Los principales sitios de producción de ROS son el CI y III, aunque se ha demostrado que el CII y otras DFDs son capaces de generar ROS. Además, niveles altos de  $CoQH_2$  generan ROS a través de RET vía el CI. Las flechas rojas indican los principales puntos de escape de electrones hacia el  $O_2$ , con la consiguiente formación de superóxido ( $O_2^\bullet$ ).

Aunque los CI y CIII son considerados como las fuentes principales de los ROS mitocondriales, en los últimos años se ha puesto de manifiesto que las DFDs juegan un papel importante en su producción (Tahara, Navarete and Kowaltowski, 2009). En el músculo esquelético, son especialmente importantes GPD2 (Mráček, Drahota and Houštěk, 2013) y ETFDH (Hoffman and Brookes, 2009) (Figura 6), debido al activo catabolismo de glucosa y ácidos grasos en este tejido. La producción de ROS debido al catabolismo de los ácidos grasos es un proceso conocido, pero poco entendido, que plantea diversas preguntas. Por ejemplo, ¿es la ruta de la FAO una vía fácil por donde los electrones pueden desviarse hacia el  $O_2$ ? o, por el contrario, ¿es la elevada capacidad calorífica de estos sustratos lo que produce un exceso de electrones en la parte distal de la ETC? Algunas investigaciones al respecto afirman que la producción de ROS dependiente de la FAO no tiene una dependencia directa del  $\Delta\Psi_m$  en mitocondrias aisladas de músculo (Seifert *et al.*, 2010) ni de cerebro (Sipos, Tretter and Adam-Vizi, 2003). Esto conduce a pensar que se puede producir una fuga de electrones hacia el  $O_2$  antes de que alcancen la ETC, especialmente, en las flavoproteínas que intervienen el transporte de electrones, como ETF o ETFDH (Seifert *et al.*, 2010; Perevoshchikova *et al.*, 2013). El mecanismo de formación de ROS sigue siendo incierto, pero es probable que esté asociado con una transferencia de electrones improductiva de FAD a CoQ y/o con altas concentraciones de una o ambas formas de semiquinona de FAD y CoQ. Los experimentos futuros destinados a comprender el mecanismo de transferencia de electrones desde FAD a CoQ deben tener en cuenta la posibilidad de que este proceso genere  $O_2^\bullet$  y las posibles consecuencias de las mutaciones en la interfaz de los DUF y DUQ y en los niveles de CoQ y  $CoQH_2$ . Un estudio más detallado del modo en el que la FAO produce ROS y de las enzimas y moléculas implicadas en el proceso podría arrojar más luz sobre la regulación

## INTRODUCCIÓN

de esta ruta imprescindible para tejidos como el músculo o el corazón. De igual manera, un conocimiento más preciso del modo de acción de las DFDs mitocondriales podría utilizarse como estrategia para el desarrollo de terapias frente distintas miopatías y enfermedades metabólicas.

## **OBJETIVOS**

## 2. Objetivos

En relación a lo expuesto anteriormente, muchos son los interrogantes que permanecen sin respuesta. El músculo esquelético es un órgano ideal para estudiar los mecanismos moleculares de acción de las DFDs debido a su gran demanda energética y su capacidad de catabolizar diferentes tipos de sustratos, de los cuales, una gran parte entran en la ETC a través de ETFDH. La importancia de ETFDH en la bioenergética mitocondrial ha sido a menudo infravalorada y existen cuestiones todavía por esclarecer, como por ejemplo, su estrecha conexión con el CIII, su implicación en la generación de ROS o su papel en la generación de deficiencias de CoQ.

Por ello, el objetivo principal de esta tesis es ahondar en el estudio de la deshidrogenasa ETFDH como moduladora central del metabolismo energético del músculo esquelético.

En base a esta premisa, nos hemos propuesto los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar el papel de la DFDs, y en particular de ETFDH, en la bioenergética mitocondrial.
2. Desvelar la función de ETFDH en la regulación de la biosíntesis, estado redox y deficiencias del CoQ.
3. Desarrollar y caracterizar el primer modelo animal ETFDH-KO condicional y específico de músculo esquelético.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1. Materiales

##### 3.1.1. Líneas celulares

Para el desarrollo de esta tesis doctoral se han utilizado diversas líneas celulares en cultivo *in vitro*. La descripción de las líneas utilizadas y las condiciones de cultivo se encuentran descritas en la Tabla 2.

Tabla 2. Líneas celulares

Línea celular	Descripción	Origen	Medio de cultivo
<b>C2C12</b>	Línea de mioblastos no tumorales (ATCC CRL-1772)	Ratón	Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)
<b>Fibroblastos</b>	Líneas derivadas de pacientes con mutaciones y controles	Humano	MEM (Eagle's minimal essential medium)
<b>Fibroblastos</b>	Wild type	Ratón	Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)
<b>Fibroblastos</b>	Oxidasa alternativa (AOX)	Ratón	Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 5% de suero dializado

Las líneas de fibroblastos derivadas de pacientes son:

- Paciente M2: mutación en ETFDH (heterocigoto para los cambios p.Val451Leu y p.Term618Gln).
- Paciente M3: mutación en BCKDHB (homocigoto para el cambio p.Lys116fs)
- Paciente M4: mutación en DBT (heterocigoto para los cambios p.Ala422Ser y p.Asp145Glufs\*28)
- Paciente M9: mutación indeterminada en ACAD9

### 3.1.2. Ratones

Las líneas murinas utilizadas han sido las siguientes:

- Línea Etfdh tm1a (EUCOMM)Hmgu (EMMA ID: 09069): contiene la maquinaria genética para deletar el exón 2 del gen ETFDH.
- Línea B6;C3-Tg (ACTA1-rtTA,tetO-cre)102Monk/J: contiene la maquinaria genética para la expresión músculo específica de Cre inducible por doxiciclina.
- Línea C57BL/6 x C3H: fondo genético para mantenimiento de líneas.
- Línea C57BL/6-FLPe: expresa flipasa en todos los tejidos.

### 3.1.3. Cepas bacterianas

Para la generación, amplificación y mantenimiento de plásmidos se ha utilizado la cepa de *Escherichia Coli* DH5 $\alpha$ , que maximiza la eficiencia de transformación y la estabilidad de los plásmidos. Las bacterias fueron crecidas en medio líquido LB (Lysogeny Broth) en agitación (200 rpm) a 37°C, suplementado con los antibióticos ampicilina o kanamicina (100 $\mu$ g/ml), dependiendo de la resistencia antibiótica del plásmido que porten.

### 3.1.4. Plásmidos

En la Tabla 3 se muestra los plásmidos de origen bacteriano que se han utilizado como vectores de expresión de proteínas recombinantes en mamíferos, para facilitar la clonación de fragmentos de ADN y para la generación de líneas KO.

Tabla 3. Plásmidos

Nombre	Descripción	Utilización
pCADN3.1(+)	Promotor CMV. Resistencia ampicilina y kanamicina/neomicina	Sobreexpresión de ETFDH y variantes mutadas de ETFDH
pCMV_SPORT6	Promotor CMV. Resistencia ampicilina	Sobreexpresión de ETFDH
pGEM-t (Promega)	Promotor LacZ inducible por IPTG. Resistencia a ampicilina	Clonación de productos de PCR
pSpCas9(BB)-2A-GFP	Promotor U6. Contiene Cas9 y GFP. Resistencia ampicilina	Generación de líneas knock-out

### 3.1.5. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados se diseñaron utilizando la interfaz en línea Primer3Plus (Rozen and Skaletsky, 2000) y su especificidad se verificó con el genoma completo o el transcriptoma de la especie correspondiente (humano o ratón) utilizando Primer-BLAST (Ye *et al.*, 2012). Esta comprobación no se realizó para los primers descritos como universales. Su fabricación fue encomendada a diferentes casas comerciales. En la Tabla 4, están indicados los oligonucleótidos utilizados para el genotipado de ratones; en la Tabla 5, los oligonucleótidos universales utilizados para la comprobación de clones; en la Tablas 6, los oligonucleótidos utilizados para CRISPR; en la Tabla 7, los oligonucleótidos utilizados para la clonación de la secuencia de humana de ETFDH y sus formas mutadas; en la Tabla 8, los oligonucleótidos utilizados para medir los niveles de expresión génica.

Tabla 4. Oligonucleótidos para genotipado de ratones

Oligonucleótidos para genotipado de ratones	Secuencia 5'-3'
LacZ fw	TACTGGAGGCTGAAGTTCAGAT
LacZ rv	GCGTTTCACCCTGCCATAA
Neo fw	TTGAACAAGATGGATTGCACGC
Neo rv	CCTCGTCCTGCAGTTCATT
FLPe fw	CACTGATATTGTAAGTAGTTTGC
FLPe rv	CTAGTGCGAAGTAGTGATCAGG
Tm1c fw	AAGGCGCATAACGATACCAC
Tm1c rv	CCGCCTACTGCGACTATAGAGA
ACTA1 fw	CTGTTCCGGCCTTGAATTGAT
ACTA1 rv	CATGTCCAGATCGAAATCGTC
Etfdh 5' arm	CTGCTGTACCTCAGATTACCA
Etfdh 3' arm	GTGTGCTCACTATGCTTCAGA
LAR3	CAACGGGTTCTTCTGTTAGTCC

Tabla 5. Listado de oligonucleótidos universales

<b>Oligonucleótidos universales</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>
M13 FW	GTAAAACGACGGCCAGT
M13 RV	CAGGAAACAGCTATGAC
promotor T7	TAATACGACTCACTATAGG
promotor CMV	GTGATGCGGTTTGGCAGTA
promotor SP6	TACGATTTAGGTGACACTATAG
promotor U6	ATAAGGATCCGGTCTCGCTATGAGGGCCTATTTCCCAT G

Tablas 6. Listado de oligonucleótidos utilizados para CRISPR

<b>Oligonucleótidos para CRISPR</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>
Mouse sgRNA_ETFA fw	CACCGACTGCAGCTGGACGTCTTGG
Mouse sgRNA_ETFA rv	AAACCCAAGACGTCCAGCTGCAGTC
Mouse sgRNA_ETFB fw	CACCGTGACCACTCCAGACTTGTC
Mouse sgRNA_ETFB rv	AAACGACAAGTCTGGAGTGGTCAC
Mouse sgRNA_ETFDH fw	CACCGAACATCTTGGAGCACACAG
Mouse sgRNA_ETFDH rv	AAACCTGTGTGCTCCAAGATGTTC
Mouse sgRNA_PRODHD fw	CACCGCGAGGACCAGGAGTCTATC
Mouse sgRNA_PRODHD rv	AAACGATAGACTCCTGGTCCTCGC
Mouse sgRNA_DLD fw	CACCGAACTGAAGAACTCCTTGT
Mouse sgRNA_DLD rv	AAACACAAGGAGTTTCTTCAGTTC
Mouse sgRNA_DHODH fw	CACCGCCTGAAACGTAGCTCGAGGA
Mouse sgRNA_DHODH rv	AAACTCCTCGAGCTACGTTTCAGGC
Mouse sgRNA_COQ2 fw	CACCGATGCTGCGCTGGGGAGGCGC
Mouse sgRNA_COQ2 rv	AAACGCGCCTCCCCAGCGCAGCATC

Tabla 7. Listado de los oligonucleótidos utilizados para la clonación de la secuencia de humana de ETFDH y sus formas mutadas.

<b>Oligonucleótidos para clonación</b>	<b>Secuencia 5'-3' (en color la enzima de restricción)</b>
ETFDH fw (HindIII)	GCGCGCAAGCTTATGCTGGTGCCGCTAGCCAAGC
ETFDH rv (XhoI)	GCGCGCCTCGAGTTACATTCCATTGTAAGCAGGT
ETFDH G273E fw	AGACATACCTATGGAGAATCTTTCCT
ETFDH G273E rv	GGAAAGATTCTCCATAGGTATGTCT
ETFDH Y271A fw	AGACATACCGCTGGAGAATCTTTCCT
ETFDH Y271A rv	GGAAAGATTCTCCAGCGGTATGTCT

Tabla 8. Listado de los oligonucleótidos utilizados para medir los niveles de expresión génica.

<b>Oligonucleótidos para RT-PCR</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>
CDK1 fw	GGGAATTGTGTTTTGCCACT
CDK1 rv	GATGTCAACCGGAGTGGAGT
CDK2 fw	AAGATTGGAGAGGGCACGTA
CDK2 rv	CATCCAGCAGCTTGACGATA
CDK4 fw	CTGGTACCGAGCTCCTGAAG
CDK4 rv	GTCGTCTTCTGGAGGCAATC
CDK6 fw	TGTTTCAGCTTCTCCGAGGT
CDK6 rv	GACTGGAGCAGGACTTCTGG
Ciclina A2 fw	CAAGACTCGACGGGTTGCTC
Ciclina A2 rv	GCTGGCCTCTTCTGAGTCTC
Ciclina B1 fw	TGTGTGAACCAGAGGTGGAA
Ciclina B1 rv	GCGTCTACGTCACTCACTGC
Ciclina D1 fw	AGTGCGTGCAGAAGGAGATT
Ciclina D1 rv	CACAACCTTCTCGGCAGTCAA
Ciclina E fw	CAGACTCTCCGCAAGAAACC
Ciclina E rv	TAATGCAAGGGCTGATTCT
p21 fw	GTA CTTCTCTGCCCTGCTG
p21 rv	TCTGCGCTTGGAGTGATAGA
p27 fw	TTGGGTCTCAGGCAAACCTCT

## MATERIALES Y MÉTODOS

p27 rv	TCTGTTCTGTTGGCCCTTTT
p57 fw	AGGAGCAGGACGAGAATCAA
p57 rv	ACGTTTGGAGAGGGACACC
INK4A fw	GTACCCCGATTTCAGGTGATG
INK4A rv	TCTTGATGTCCCCGCTCTT
INK4C fw	AACTGCGCTGCAGGTTATG
INK4C rv	GGGCAGGTTCCCTTCATTAT
TGF-B fw	TGCGCTTGCAGAGATTAAAA
TGF-B rv	AGCCCTGTATTCCGTCTCCT
SMAD3 fw	CACAGCCACCATGAATTACG
SMAD3 rv	GAATATTGCTCTGGGGCTCA
ETFA fw	TTGGAGGTGAAGTGTCTCTGC
ETFA rv	AGCTACTCTGGGCAGAAGGT
ETFB fw	AAAGCCGGACAAGTCTGGAG
ETFB rv	CAGTTCGGATGGTCTCCTGG
DLD fw	GGCGGCCCTTTACTCAGAAT
DLD rv	GGCCATCCCTTCAACACAGA
GPD2 fw	AACGATGCACGGATGAACCT
GPD2 rv	ATCATCCATTTTGGCGACGG
PRODH fw	GGGCAGCAGAGATCGGTTAT
PRODH rv	CAGCAGGATGCAGGCCTATC
DHODH fw	CCTGGTGGTTAACGTGTCCA
DHODH rv	ATGATCAGTCCGTCGATGCC
MyH1 fw	AAGACCGAAGGCGGAACACTAC
MyH1 rv	TGACAGTGACGCAGAACAGG
MYH7 fw	CTCAAGCTGCTCAGCAATCTATTT
MYH7 rv	GGAGCGCAAGTTTGTGATAAGT
MYOG fw	GTGCCCAGTGAATGCAACTC
MYOG rv	GCTGTCCACGATGGACGTAA
MyoD fw	CTCCAACCTGCTCTGATGGCA
MyoD rv	GAGATGCGCTCCACTATGCT
MYF5 fw	TGAGGGAACAGGTGGAGAAC

MYF5 rv	AGCTGGACACGGAGCTTTTA
B-actina fw	AACACAGTGCTGTCTGGTGGT
B-actina rv	GATCCACATCTGCTGGAAGG
GAPDH FW	TGCGACTTCAACAGCAACTC
GAPDH RV	GGATAGGGCCTCTCTTGCTC
18S-F	AACGGTCTAGACAACAAGCTG
18S-R	AGTGGTCTTGGTGTGCTGAC

### 3.1.6. Anticuerpos

La Tabla 9 contiene todos los anticuerpos que se han utilizado en el desarrollo de esta tesis doctoral, tanto para western blots (WB), inmunoprecipitaciones (IP) e inmunomarcajes.

Tabla 9. Listado de anticuerpos

<b>Antígeno</b>	<b>Peso molecular (kDa)</b>	<b>Origen</b>	<b>Referencia</b>	<b>Uso</b>
ACC	265	Conejo/ Policlonal	3662 (Cell Signaling Technology)	WB (1:1000)
ACLY	140	Ratón/ Monoclonal	610962 (BD Transduction Laboratories)	WB (1:1000)
$\beta$ -Actina	42	Ratón/ Monoclonal	A5316 (Sigma)	WB (1:10000)
$\beta$ -F1ATPasa	52	Conejo/ Policlonal	(Cuezva et al., 2002)	WB/BN (1:3000), inmunomarcaje
CDK1	34	Conejo/ Policlonal	77055 (Cell Signaling Technology)	WB (1:1000)
COQ2	40	Ratón/ Monoclonal	sc-517107 (Santa Cruz)	WB (1:1000), IP
CoxIV	24	Ratón/ Monoclonal	459600 (Invitrogen)	WB/BN (1:1000)
DRP1	81	Ratón/ Monoclonal	611112 (BD Transduction Laboratories)	WB (1:1000)

MATERIALES Y MÉTODOS

<i>ETFA</i>	35	Ratón/ Monoclonal	ab110316 (Abcam)	WB (1:1000), IP
<i>ETFB</i>	27	Cabra/Policlonal	ab104944 (Abcam)	WB/BN (1:1000)
<i>ETFDH</i>	67	Conejo/ Policlonal	PA5-19340 (Thermo Fisher)	WB/BN (1:1000), IP
<i>FASN</i>	270	Ratón/ Monoclonal	610962	WB (1:1000)
<i>GAPDH</i>	35	Ratón/ Monoclonal	(Acebo et al., 2009)	WB (1:1000)
<i>H2AX</i>	15	Conejo/ Policlonal		WB
<i>IF1</i>	12	Ratón/ Monoclonal	(Sanchez-Cenizo et al., 2010)	WB (1:1000)
<i>MDA</i>	varias	Conejo/ Policlonal	ab6463 (Abcam)	WB (1:1000)
<i>MFN1</i>	85	Ratón/ Monoclonal	ab57602 (Abcam)	WB (1:1000)
<i>MFN2</i>	85	Ratón/ Monoclonal	ab56889 (Abcam)	WB (1:1000)
<i>mTOR</i>	289	Conejo/ Policlonal	2972 (Cell Signaling Technology)	WB (1:1000)
<i>NDUFA9</i>	42	Ratón/ Monoclonal	ab14713 (abcam)	WB/BN (1:1000), IP
<i>OPA1</i>	111	Ratón/ Monoclonal	612606 (BD Transduction Laboratories)	WB (1:1000)
<i>p53</i>	53	Conejo/ Policlonal	PAb 240 (Abcam)	WB (1:1000)
<i>p70</i>	70	Conejo/ Policlonal	9202 (Cell Signaling Technology)	WB (1:1000)
<i>p-p70</i>	70	Conejo/ Policlonal	9205 (Cell Signaling Technology)	WB (fosforilación Thr389) (1:1000)
<i>pACC</i>	265	Conejo/ Policlonal	3661 (Cell Signaling Technology)	WB (fosforilación Ser79) (1:1000)
<i>p-CDK1</i>	34	Conejo/ Policlonal	4539 (Cell Signaling Technology)	WB (fosforilación Tyr15) (1:1000)

<i>p-mTOR</i>	289	Conejo/ Policlonal	2971 (Cell Signaling Technology)	WB (fosforilación Ser2448)
<i>pSMAD3</i>	48	Ratón/ Monoclonal	ab84177 (Abcam)	WB (1:1000)
<i>p-S6</i>	32	Conejo/ Policlonal	2211 (Cell Signaling Technology)	WB (fosforilación Ser235/236) (1:1000)
<i>S6</i>	32	Conejo/ Policlonal	2217 (Cell Signaling Technology)	WB (1:1000)
<i>SDHA</i>	72	Ratón/ Monoclonal	ab14715 (Abcam)	WB (1:1000), IP
<i>SDHB</i>	32	Ratón/ Monoclonal	459230 (Invitrogen)	WB/BN (1:1000)
<i>Tubulina</i>	50	Ratón/ Monoclonal	MilliporeSigma (T9026)	WB (1:3000)
<i>UQCRCII</i>	48	Ratón/ Monoclonal	ab14745 (abcam)	WB/BN (1:1000), IP
<i>VDAC</i>	31	Ratón/ Monoclonal	ab15895 (abcam)	WB/BN (1:1000)

### 3.1.7. Compuestos químicos y radioisótopos

En este estudio, se han utilizado los radioisótopos mostrados en la Tabla 10 y los compuestos químicos mostrados en la Tabla 11.

Tabla 10. Listado de radioisótopos

Radioisótopos	Uso	Referencia
L- Leucina-[14C(U)]	Medición del catabolismo de BCAA	Perkin-Elmer (NEC279E050UC)
L -Isoleucina-[14C(U)]	Medición del catabolismo de BCAA	Perkin-Elmer (NEC278E050UC)
Ácido palmítico-[9,10 - 3H(N)]	Medición de la FAO	Perkin Elmer (NET043001MC)

Tabla 11. Listado de compuestos químicos

Compuesto	Uso	Referencia
Oligomicina	Seahorse	Sigma-Aldrich (O4876)
Dinitrofenol (DNP)	Seahorse	Sigma-Aldrich (D198501)
FCCP	Medición de ROS y potencial	Sigma-Aldrich (C2920)
Rotenona	Seahorse, Medición de ROS, potencial	Sigma-Aldrich (R8875)
Antimicina A	Seahorse, Medición de ROS, potencial	Sigma-Aldrich (A8474)
Myxothiazol	Medición de ROS	Sigma-Aldrich (T5580)
Carboxina	Medición de ROS	Sigma-Aldrich (45371)
Etomoxir	Inhibición de la FAO	Sigma-Aldrich (E1905)
Ácido 4-clorbenzoico (4-CBA)	Inhibición de la biosíntesis del CoQ	Sigma-Aldrich (135585)
Doxiciclina	Generación de ratón KO	Sigma-Aldrich (D9891)
DL-Dithiothreitol (DTT)	Agente reductor	Sigma-Aldrich (D0632)
RSL3	Inductor de ferroptosis	Selleckchem
Idebenone	Medición de ROS y viabilidad celular	Selleckchem
MitoQ	Medición de ROS y viabilidad celular	Michael.P.Murphy (Antipodean Pharmaceutical Inc.)

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Métodos de Biología Molecular

#### 3.2.1.1. Técnicas de ADN recombinante y estrategias de clonación

Las técnicas de ADN recombinante se han utilizado en este estudio para la creación de plásmidos de expresión de proteínas humanas recombinantes en células de mamíferos. Asimismo, se han creado plásmidos utilizados para silenciamiento génico mediante CRISPR y para clonar secuencias de ADN genómico para facilitar su secuenciación.

Las secuencias de las proteínas recombinantes que han sido clonadas fueron amplificadas mediante PCR utilizando ADN complementario (ADNc) humano, utilizando primers que fueron

diseñados para contener los sitios de restricción necesarios para insertar las secuencias en los plásmidos de expresión.

Una vez amplificada la secuencia de ADN que contiene el gen en estudio (ETFDH), se procedió con la digestión de los sitios de restricción (*HindIII* y *EcoRI*) introducidos en las secuencias. Los plásmidos pCADN3.1 y pSPORT6 fueron digeridos por separado utilizando las mismas enzimas. Esta digestión se llevó a cabo incubando a 37°C durante 1 hora (h). Posteriormente, se incubaron a 65°C durante 20 minutos (min) para inactivar las enzimas de restricción. Luego se procedió a ligar las secuencias digeridas al plásmido abierto en un ratio 1:3 inserto:plásmido, mediante la incubación a temperatura ambiente de 1h con una Ligasa T4 (Thermo Fisher). A continuación, 4 µL del producto de ligación fueron utilizados para transformar las bacterias.

Para la creación de los plásmidos utilizados para silenciamiento génico mediante CRISPR, el plásmido pSpCas9(BB)-2A-GFP (Addgene ID: 48138) fue digerido con la enzima *BbsI* en las mismas condiciones que se indica arriba. Simultáneamente, cada pareja de oligonucleótidos diseñados como gRNA fueron alineados utilizando cada uno de ellos a una concentración 10 µM. Fueron incubados en presencia del buffer NEB10x 2.1 durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, se procedió a la ligación de los gRNAs alineados al plásmido como se indica arriba. Por último, se utilizó el sistema pGEM-T Easy Vector (Promega) para la clonación de fragmentos de ADN genómico amplificados con fines de comprobar las mutaciones realizadas, ya que estabiliza la molécula para su correcta secuenciación.

### 3.2.1.2. Transformación de bacterias

La transformación de *Escherichia Coli* DH5α se realizó mediante el protocolo estandarizado de “*choque térmico*”. Brevemente, se añadió 100 ng de plásmido a 100 µL de bacterias competentes y se incubaron en hielo durante 20 min, se procedió a realizar el choque térmico incubando las bacterias a 42°C durante 45 segundos (seg), tras lo cual se volvieron a incubar en hielo durante 5 min. A continuación, se añadieron 700 µL de medio LB y se incubaron en agitación 1h a 37°C. Tras esto, se centrifugaron a 8000 rpm durante 3 min y se plaquearon en una placa Petri con LB más antibiótico. Se dejaron en la estufa a 37°C toda la noche antes de comprobar las unidades formadoras de colonias (UFC).

### 3.2.1.3. PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha utilizado para la amplificación de genes para su posterior clonación en plásmidos de expresión de células de mamíferos. En este caso, se ha utilizado una polimerasa de alta fidelidad (CloneAmp HiFi PCR Premix, Takara) utilizando 100 ng de ADNc obtenido de células humanas HCT116 y los correspondientes primers a 5µM, con las condiciones que indica el fabricante. Alternativamente, para la generación de secuencias con modificaciones genéticas, se ha utilizado el ADN plasmídico (previamente clonado) a la misma concentración como “*template*”.

Para el chequeo de UFC en los procesos de clonación, se utilizó la polimerasa GoTaq (Promega). Directamente, picando con una punta la colonia e introduciéndola en el tubo que contiene la mezcla (buffer 10X, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dNTPs y H<sub>2</sub>O hasta un volumen final de 25 µL) que indica el proveedor. Las condiciones del termociclador variaron en la temperatura de “annealing” (T<sup>a</sup>A) dependiendo de la pareja de primers utilizadas en cada momento. Para la comprobación de fragmentos de ADN insertados en pGEM-t se utilizó la pareja de primers T7-SP6 a 50°C T<sup>a</sup>A o la pareja M13 FW-M13 RV a 60°C T<sup>a</sup>A. En el caso de las gRNAs insertadas en el plásmido pSpCas9(BB)-2A-GFP se utilizó la pareja U6 promoter- gRNA RV 58°C T<sup>a</sup>A. Se utilizaron 35 ciclos, en cualquier caso.

Para el genotipado de ratones se utilizó la polimerasa Gotaq (Promega), siguiendo las recomendaciones del proveedor. Las condiciones fueron similares al caso anterior, con la excepción de la pareja de primers utilizados. En este caso, las parejas fueron, LacZ fw-LacZ rv, Neo fw-Neo rv, FPLe fw-FPLe rv, Tm1c fw-Tm1c rv y ACTA1 fw-ACTA1 rv. Las condiciones del termociclador fueron de 35 ciclos de 94°C 2 min, 60°C 30 seg y 72°C 30 seg.

### 3.2.1.4. Electroforesis en geles de agarosa

El análisis de los productos de PCR se realizó mediante fraccionamiento en geles de agarosa al 1% preparados en tampón TBE (Tris, ácido bórico, EDTA, pH 8) usando Gel-Red® (Biotium) como colorante. Aproximadamente, 1/5 del volumen del producto de PCR se cargó en el gel y se utilizó 1 Kb Plus ADN Ladder (Thermo Fisher Scientific) para estimar el tamaño de las bandas.

### 3.2.1.5. Extracción de plásmidos y ADN genómico

La extracción de plásmidos se realizó siguiendo el protocolo de Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) o con el Plasmid MAXI kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó un cultivo de 10 ml o 100ml, respectivamente, de cultivos bacterianos crecidos durante la noche con antibiótico.

La purificación de bandas de ADN en gel de agarosa se realizó con Wizard® SV Gel- PCR Clean-Up System (Promega).

La extracción de ADN genómico de células cultivadas *in vitro* se realizó resuspendiendo el pellet celular en un tampón de lisis (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH9, 0,45% Nonidet p40, 0,45% Tween 20) añadiendo Proteinasa K (1 µl por 100 µl de tampón de lisis). La muestra se incubó a 56°C durante al menos 2h, y posteriormente, se incubó a 95°C durante 5 min para inactivar la Proteinasa K.

La extracción de ADN genómico de ratones se realizó a partir de un pedazo de 1 mm de cola de ratón. Brevemente, cada cola se introdujo en un tubo eppendorf con 88 µL de H<sub>2</sub>O, 1 U/ µL KAPA Express Extract Enzyme y 10 µL de 10x KAPA Express Extract Buffer. Se incubaron durante 10 min a 75°C y, posteriormente, a 5 min a 95°C. Tras centrifugar a 13200 rpm durante 1 min, se

recogió el sobrenadante y se midió la concentración de ADN.

Todas las muestras de ADN extraídas fueron medidas en Thermo Scientific™ Espectrofotómetros NanoDrop™ (ng/μL), teniendo en cuenta los ratios A260/A280 (~ 1,8) y A260/A230 (~2,0).

#### **3.2.1.6. Extracción de ARN**

La extracción de ARN se llevó a cabo lisando y homogenizando las muestras en Trizol™ Reagent (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó 1 ml de Trizol por  $5 \times 10^6$  células y 100 mg de tejido de músculo esquelético de ratón. Tras la extracción, se cuantificó la cantidad de ARN extraído en NanoDrop™ (ng/μL).

#### **3.2.1.7. Reverse transcriptase PCR**

Para la retrotranscripción de 1 μg de RNA purificado en cADN se utilizó el High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **3.2.1.8. Real time PCR**

Los niveles de expresión génica (ARNm) se midieron mediante Real Time PCR (RT-PCR). 5 ng de ARNm retrotranscrito en ADNc se utilizó como “*template*” de cada reacción, junto con 5 μL de Fast SYBR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) y 1 μL de cada pareja de primers. Para la reacción se utilizó el sistema de detección ABI Prism 7900HT (Thermo Fisher Scientific) de la Unidad de Genómica del CBMSO. Los primers utilizados se muestran en la Tabla 7. Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: desnaturalización inicial de 20 seg a 95°C, 40 ciclos de amplificación de 1 seg 95°C y 20 seg 60°C cada uno, seguido del análisis de la curva de disociación para detectar una posible amplificación inespecífica. El análisis estadístico utilizado para comprobar la expresión relativa de los genes estudiados fue el método  $\Delta\Delta Ct$ , utilizando como genes normalizadores  $\beta$ -Actina, GAPDH y Ribo 18S

#### **3.2.1.9. Secuenciación**

Los productos de PCR limpiados o los plásmidos extraídos tras el proceso de clonación fueron secuenciados en MacroGen Inc., con el fin de comprobar que no hubiese mutaciones.

#### **3.2.1.10. Generación de líneas celulares knock-out mediante CRISPR/Cas9**

Se utilizó la técnica CRISPR (del inglés: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) para la generación de líneas celulares knock-out (KO) de los genes *ETFA*, *ETFB*, *ETFDH*, *PRODH*, *GPD2*, *DLD*, *DHODH* y *COQ2* siguiendo el protocolo de Ran (Ran *et al.*, 2013). Para el diseño de oligonucleótidos guía (gRNA) se utilizó una herramienta informática, disponible en la siguiente web: <http://www.rgenome.net/cas-designer/>. Se utilizó la secuencia del segundo exón de cada gen para la búsqueda de gRNAs con la menor probabilidad de off targets (Park, Bae and

Kim, 2015). Los oligonucleótidos de gRNA (sentido y antisentido) se hibridaron e, inmediatamente, se clonaron en el plásmido pSpCas9 (BB) -2A-GFP como se ha indicado anteriormente.

Las células en confluencia se transfectaron mediante electroporación o lipofectamina con el plásmido que contenía un gRNAs de control (pSpCas9-GFP-control) o el plásmido que contenía el gRNAs diana (pSpCas9-GFP-ETFDH, por ejemplo), como se explica más adelante. Después de 48h de incubación, se recogieron todas las células para el aislamiento de las líneas celulares clonales mediante FACS, que seleccionaba sólo células que expresaban GFP. Este procedimiento fue realizado por la Unidad de Citometría del CBMSO. Después de FACS, las células se sembraron y se expandieron. Finalmente, las líneas celulares KO generadas se comprobaron mediante western blot o secuenciación (cuando no disponíamos de anticuerpos específicos).

### **3.2.2 Métodos de Bioquímica**

#### **3.2.2.1. Extracción y cuantificación de proteínas de células en cultivo y tejido de ratón**

La extracción de proteínas de cultivos celulares para western blots se realizó mediante un buffer de lisis (Tris 50 mM pH 8, NaCl 100 mM, 1% Tritón, DTT 1 mM, 0,1% SDS, 0,4% EDTA, inhibidores de proteasas y fosfatasas). Brevemente, el pellet celular obtenido por tripsinización y centrifugación fue resuspendido en aproximadamente 200 µl de buffer de lisis e incubado en hielo durante 5 min. Posteriormente, el volumen anterior fue congelado en nieve carbónica y descongelado a 37°C, 3 veces, para completar la ruptura celular. Se centrifugó la muestra a 13200 rpm y se recolectó el sobrenadante en un tubo nuevo para su posterior cuantificación.

La extracción de proteínas de tejido de músculo esquelético, hígado, corazón y cerebro de ratón se realizó partiendo de aproximadamente 100 mg de tejido. El tejido, previamente congelado, se homogenizó y disgregó utilizando el TissueLizer II (Quiagen) e introduciendo una “bead” en cada tubo. Tras la homogenización del tejido, se añadió buffer de lisis y se procedió con el protocolo mencionado arriba.

La cantidad de proteína total de los extractos de proteínas se determinó mediante el reactivo de Bradford (Bio-Rad) siguiendo las recomendaciones del fabricante y usando una solución de concentración conocida de BSA como patrón de referencia.

#### **3.2.2.2. Extracción y purificación de mitocondrias de células en cultivo y de tejidos de ratón**

Para la extracción y purificación de mitocondrias de células en cultivo se crecieron hasta llegar a confluencia 8 placas de 100 mm de diámetro. Las células fueron recolectadas mediante tripsinización durante 3 min y centrifugación a 1200 rpm 5 min. Para proceder con la ruptura de la membrana plasmática de las células, el pellet celular se resuspendió en un medio hipotónico (sacarosa 83 mM, MOPs 10 mM, pH 7,2), en una relación 7:1 tampón: pellet celular (volumen:volumen) y fueron incubadas 2 min en hielo. Utilizando un homogeneizador de tejidos de vidrio-teflón tipo potter, se realizaron una serie de maniobras para conseguir un cambio de presión que facilite la ruptura de las membranas plasmáticas. A continuación, la solución

homogenizada se diluyó a la mitad con medio hipertónico (sacarosa 250 mM, MOPs 30 mM, pH 7,2) y se centrifugó a 1000 x g durante 5 min a 4°C para eliminar los núcleos y las células intactas (este proceso se realizó dos veces). El sobrenadante recolectado ahora fue centrifugado a 12000 x g durante 12 min a 4°C, así las mitocondrias quedan sedimentadas en el pellet y en el sobrenadante permanece la fracción citosólica. El pellet de mitocondrias se resuspendió en medio A (sacarosa 0,32 M, Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,2) y la suspensión de mitocondrias se transfirió a otro tubo, que fueron centrifugados a 15000 x g durante 3 min a 4°C. Este proceso se realizó por cada placa y, finalmente, se juntaron en el mismo tubo todos los pellets mitocondriales para su posterior cuantificación mediante el método de Bradford mencionado anteriormente. Las mitocondrias purificadas y cuantificadas fueron congeladas a -70°C o fueron utilizadas según su finalidad.

Para la extracción y purificación de mitocondrias de tejidos de ratón, se aislaron mitocondrias de músculos frescos de las patas traseras de ratones WT y ETFDH KO, el músculo se troceó en trozos pequeños y se incubaron con una proteasa suave (Nagarse, 0,4 mg/mg) en hielo y agitación. A continuación, se homogeneizaron en un homogeneizador de vidrio en 4 volúmenes de tampón A (sacarosa 320 mM, EDTA 1 mM y Tris-HCl 10 mM, pH 7,4). Las mitocondrias se obtuvieron mediante un proceso de doble centrifugación: los núcleos, las células intactas y el tejido se eliminaron mediante centrifugación a 700 g durante 10 min a 4 °C; y las mitocondrias se obtuvieron mediante centrifugación del sobrenadante a 10000 g durante 15 min a 4 °C (Formentini *et al.*, 2017a). Las proteínas mitocondriales se midieron en el espectrofotómetro a 595 nm con reactivo de Bradford (Bio-Rad), utilizando BSA como estándar.

### **3.2.2.3. Electroforesis en geles SDS-PAGE**

30 mg proteína resuspendida en tampón de carga 5X (Tris 125 mM pH 6,8, 4% SDS, 20% glicerol, azul de bromofenol;  $\beta$ -mercaptoetano) y, previamente hervidas, se cargaron en geles SDS-PAGE al 9-12 %. Las muestras se corrieron a 100 V durante 50 min utilizando un sistema de electroforesis (Bio-Rad) con un tampón de electroforesis (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS al 0,1 % en agua desmineralizada, pH 8,3). El marcador de peso molecular (Bio-Rad) se cargó junto a las muestras para la determinación del tamaño de las proteínas en cuestión.

### **3.2.2.4. Electroforesis en geles bidimensionales (2G-SDS-PAGE)**

La electroforesis en dos dimensiones se utilizó para conocer el estado isoeléctrico de UQCRC2. Para ello se utilizaron tiras de 13 cm (Immobiline DryStrips, GE Healthcare), que contienen el gel donde se lleva a cabo la separación de las proteínas dependiendo de su punto isoeléctrico. Brevemente, 200  $\mu$ g de proteína celular se diluyó en 250  $\mu$ l de buffer de rehidratación (DeStreak Rehydration Solution, GE Healthcare) que contiene 0.5% del buffer IPG (rango de pH 6-11). Las tiras fueron procesadas utilizando el instrumento Ettan IPGphor3 (GE Healthcare). Las tiras IPG se rehidrataron y enfocaron a 20°C, empezando con una rehidratación pasiva de 4 h seguido de 12 h de rehidratación activa a 50 V. El enfoque empezó con 15 min a 250 V, 500 V durante 1 h y 1 h a 1000 V, seguido por un aumento lineal hasta 10000 V durante 3 h para luego mantener

estos 10000 V hasta alcanzar los 60000 V/h.

Una vez las tiras fueron electroenfocadas, las tiras IPG fueron equilibradas con 0.170 M de Tris-HCl pH 6.8 conteniendo urea 6 M, glicerol 20%, SDS 2% y DTT 130 mM durante 15 min. Tras lo cual, se incubaron otros 15 min con ese mismo buffer, pero conteniendo iodoacetamida 135 mM con azul de bromofenol en lugar de DTT y con agitación constante a temperatura ambiente. Las tiras ya equilibradas fueron transferidas a la parte superior de un gel de poliacrilamida del 9% para llevar a cabo la separación según su peso molecular. Esto se llevó a cabo mediante una electroforesis utilizando un sistema Protean II XI (Bio-Rad) a corriente constante (65 mA/gel a 4°C durante 4 h).

### **3.2.2.5. Electroforesis en geles nativos Blue Native (BN-PAGE)**

Los geles nativos en gradiente de poliacrilamida (BN-PAGE) permiten la resolución electroforética de complejos proteicos intactos en condiciones nativas. Para comprobar el estado de los supercomplejos mitocondriales se utilizó esta técnica partiendo de 10 µg de mitocondrias aisladas, que fueron resuspendidas en buffer de resuspensión (Tris-HCl 50 mM, pH 7, ácido 6-aminohexanoico 1M). Las membranas mitocondriales se solubilizaron mediante la adición del detergente digitonina al 10% (4:1 de digitonina/proteína mitocondrial), que permite que los supercomplejos no se disgreguen y mantengan su conformación nativa. Las muestras se incubaron en hielo durante 5 min y se centrifugaron a 4°C durante 30 min y 13000 x g. A continuación, se recogió el sobrenadante y se le añadió un volumen de tampón de carga BN (5% Blue-G Coomassie en 1M aminocaproico) igual a un tercio del volumen final de la muestra.

Las muestras fueron separadas en geles BN-PAGE comerciales (NativePAGE™ 3-12% Bis-Tris Protein Gels, 1.0 mm, 10-well, Invitrogen) utilizando el montaje Mini Protean III de BioRad. Se cargaron 70 µg de proteína y la electroforesis se llevó a cabo en la cámara fría a voltaje constante de 70 V durante 15 min, seguido de 1 hora a amperaje constante de 10 mA. Se utilizaron dos tampones de electroforesis: tampón de cátodo (Tricina 50 mM, Bis-Tris 15 mM, pH 7, Serva blue G 0,02%) y tampón de ánodo (Bis-Tris 50 mM, pH 7).

### **3.2.2.6. Detección inmunológica de proteínas (Western blot)**

Las proteínas fraccionadas mediante electroforesis tanto en geles SDS-PAGE, 2G-SDS-PAGE como BN-PAGE fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (GE Life Sciences, Whatman) como norma general. En casos especiales, como para ver proteínas fosforiladas, fueron transferidas a membranas de PVDF (Immobilon-P, Merck Milipore). En cualquier caso, la transferencia se realizó en frío a 100 V durante 50 min aproximadamente, en buffer de transferencia (Glicina 39 mM, Tris-HCl 48 mM, metanol 20% (v/v)). A continuación, las membranas fueron incubadas durante 5 min con rojo *Ponceau* para comprobar la correcta transferencia de proteínas del gel a la membrana. A continuación, la membrana fue incubada durante 1 hora en agitación y a temperatura ambiente con la solución de bloqueo que contiene leche liofilizada al 5% o BSA al 4% en TBS (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM) más 0.1% de Tween-20. Luego, las membranas

fueron incubadas con el anticuerpo primario durante toda la noche, tras lo cual la membrana fue lavada 3 veces durante 15 min con TBS 0.1% Tween-20, antes de incubar la membrana durante una hora en agitación con el anticuerpo secundario conjugado a una peroxidasa. La reacción se visualizó utilizando un sustrato quimioluminiscente (ECL; Thermo Scientific; SuperSignal Chemiluminescent kit) para la detección de la actividad de la peroxidasa de los anticuerpos y mediante la exposición de la membrana a una película sensible a la luz (Fujifilm SuperRX). La cuantificación de la intensidad de las bandas resultantes se realizó con el software ImageJ.

### **3.2.2.7. Determinación del estado redox de CoQ mediante HPLC**

La cuantificación de la cantidad total de CoQ de células C2C12 y fibroblastos de pacientes, así como la determinación y cuantificación del estado de oxidación/reducción del CoQ, se llevó a cabo mediante cromatografía líquida en tándem con espectrofotometría de masas (LC-MS-MS), siguiendo el protocolo de Burger (Burger *et al.*, 2020). Brevemente, las células de 8 placas de cultivo p100 fueron recolectadas con tripsina y centrifugadas a 1200 rpm. El pellet fue lavado con PBS 1X frío y centrifugadas de nuevo. El pellet fue resuspendido en 300  $\mu$ L de hexano en campana de aire y se añadieron 200  $\mu$ L de metano acidificado (0.1% p/v HCl). Tras mezclar intensamente, la muestra se centrifugó a 17000 g durante 5 min a 4°C. Se recogió la fase superior (unos 200  $\mu$ L) formada por hexano y el CoQ que queremos estudiar. Las muestras fueron llevadas en hielo al Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), donde procedieron con el protocolo.

### **3.2.3. Métodos de Biología Celular**

#### **3.2.3.1. Cultivo de líneas celulares**

La descripción de las líneas celulares utilizadas y las condiciones de cultivo se encuentran descritas en la Tabla 1. Bajo condiciones normales, las células fueron mantenidas en cultivo a 37°C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> y 95% de humedad, en condiciones de esterilidad. Los medios de cultivo utilizados, salvo que se indique otra cosa, contenían un alto contenido de glucosa (4,5 mM) y fueron suplementados con suero fetal bovino (SFB) al 10%, glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomina 0,1 mg/ml y aminoácidos no esenciales 400  $\mu$ M (Ala, Asn, Asp, Glu y Pro).

La línea de mioblastos de ratón C2C12 fueron mantenidas en cultivo en medio DMEM suplementado (Dulbecco's modified Eagle's medium). Los fibroblastos derivados de pacientes humanos con mutaciones en alguna deshidrogenasa mitocondrial fueron crecidas y mantenidas en medio MEM (Eagle's minimal essential medium) suplementado. Los fibroblastos de ratón que contienen la maquinaria AOX fueron crecidos y mantenidos en cultivo en medio DMEM con 5% de SFB y el resto de la suplementación normal.

Todas las líneas se cultivaron en placas p100 hasta alcanzar una confluencia del 90%, momento en el que se levantaron con tripsina y se plaquearon en una nueva placa en una relación 1/10

para mantenerlas en pase. Para la conservación de las líneas se utilizaron criotubos con su correspondiente medio de cultivo más DMSO al 5%. Los criotubos se congelaron gradualmente y luego fueron depositados en nitrógeno líquido para una conservación a largo plazo.

### 3.2.3.2. Tratamientos celulares

Tanto para ensayos de viabilidad celular como para la medición de la producción de ROS, la línea C2C12 fue tratada con la presencia o ausencia en el medio de cultivo de diferentes metabolitos. Para algunos experimentos, se utilizó un medio DMEM con bajo, medio y alto contenido en glucosa (0,5 mM, 4,5 mM o 10 mM) o medio sin aminoácidos ramificados (BCAA). En otros, los medios fueron suplementados con diferentes compuestos: palmitato 100  $\mu$ M, galactosa 10 mM y piruvato 2 mM, 2-desoxiglucosa (2-DG) 10 mM, leucina (Leu) 600  $\mu$ M, isoleucina 600  $\mu$ M y valina 600  $\mu$ M.

Por otro lado, para la medición ROS, las células C2C12 fueron tratadas con etomoxir (100  $\mu$ M y 10  $\mu$ M), un inhibidor de la FAO, durante 16h; se trataron con ácido 4-clorobenzoico (4-CBA) 3mM, un inhibidor de la biosíntesis del CoQ, durante 24h.

Para la medición de ROS en presencia de inhibidores de complejos de la ETC,  $3 \times 10^6$  células fueron recolectadas y tratadas durante 20 min en PBS completo en presencia de alguno o una mezcla de los siguientes inhibidores: rotenona 1  $\mu$ M, carboxina 100  $\mu$ M, myxothiazol 10  $\mu$ M, antimicina A 1  $\mu$ M.

### 3.2.3.3. Transfección transitoria de plásmidos

Se utilizó Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific) para la transfección de células C2C12 y fibroblastos, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células se plaquearon 24h antes en una placa p100, de tal manera que al día siguiente las células estuviesen al 70% de confluencia. Se preparó una mezcla de 5  $\mu$ g de lipofectamina y 5  $\mu$ g de plásmido en 250  $\mu$ L de Optimem 1X, que se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. Luego, se añadió la mezcla al medio de cultivo de la placa. Tras 24h de incubación, el medio fue reemplazado por medio de cultivo sin lipofectamina y 24h más tarde las células fueron recogidas para comprobar la expresión de las proteínas recombinantes por western blot.

### 3.2.3.4. Ensayo de viabilidad celular

La viabilidad de las células C2C12 WT y ETFDH KO se testó con diferentes nutrientes. Para determinar la viabilidad celular, se agregó un colorante fluorescente celular, calceína, que es absorbido por las células vivas siendo transportado a través de la membrana celular; con longitudes de onda de excitación y emisión de 495/515 nm. Las células ( $0,3 \times 10^6$ ) se sembraron en una placa de seis pocillos en medio DMEM y se incubaron durante 8 h para su adhesión a la placa. Luego, se retiró el medio, las células se lavaron dos veces con PBS 1X y se añadió el medio

a ensayar. La medición se realizó a las 16h, 24h, 36h y 48h (si era posible) desde que se agregó el nuevo medio. En cada punto de medida, se retiró el medio y se lavó el pocillo con 1 ml de PBS 1X. Se añadieron 500  $\mu$ L de calceína 1  $\mu$ M a cada pocillo y la placa se midió inmediatamente en FLUOstar Microplate Reader (LabTech).

### 3.2.3.5. Medida del consumo de O<sub>2</sub>: Ensayos Seahorse

La determinación de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) se realizó con el analizador de flujo extracelular XF24 (Seahorse Bioscience). Las medidas se realizaron en placas especiales de 24 pocillos estériles que contienen dos biosensores fluorescentes que permiten la medición de O<sub>2</sub> y pH, así como cuatro puertos diferentes por pocillo que permite la inyección secuencial de diferentes compuestos (oligomicina 6  $\mu$ M, DNP 0,5 mM, rotenona 1  $\mu$ M y antimicina 1  $\mu$ M). Los biosensores del aparato se calibraron antes de cada experimento con el fin de asegurar una única ganancia del sensor basada en la señal proporcionada por la medida de calibrado en una solución de referencia con valores de O<sub>2</sub> y pH conocidos. Las células se sembraron a una densidad de 20.000 células por pocillo en un volumen de 100  $\mu$ l de medio de cultivo. Una vez las células se adhirieron a la placa, se añadieron 150  $\mu$ l más de medio. Se realizaron los tratamientos correspondientes incubando siempre la placa a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Una hora antes del experimento el medio de cultivo se sustituyó por 700  $\mu$ l de medio de Seahorse suplementado con glucosa 10 mM, piruvato 1 mM y glutamina 4 mM, y se ajustó el pH a 7,4. Las células se dejaron en una estufa a 37°C durante al menos 1h para equilibrar la temperatura y el pH. Se realizaron 3 medidas de consumo de oxígeno basales, 2 tras la inyección de oligomicina, 2 tras la inyección de DNP y 4 tras la inyección de rotenona y antimicina. Los datos de consumo de oxígeno se expresaron como moles de oxígeno consumido por minuto y por célula.

Por otro lado, se midió la respiración mitocondrial en presencia de palmitato. Para ello, las células fueron plaqueadas en presencia de un medio bajo en glucosa (0,5 mM), produciéndose un “starving” (ayuno). Una hora antes del experimento, el medio fue sustituido por medio KHB (NaCl 111 mM, KCl 4,7 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,25 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM, 5 mM HEPES, glucosa 2,5 mM, pH 7,4) y justo antes de la lectura se añadió el palmitato, previamente conjugado con BSA. La medida se realizó de la misma manera que se indica arriba.

### 3.2.3.6. Inmunoprecipitación (IP)

La inmunoprecipitación (IP) de la subunidad UQCRC2 (Core2) del CIII y de COQ2 se realizó utilizando entre 1-3 mg de proteína extraída de células en cultivo o de tejidos de músculo esquelético, cerebro y corazón de ratón. Estos extractos proteicos fueron diluidos en buffer de lisis IP (Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM, NaCl 150 mM, Nonidet-P40 1%, NaF 20 mM, PMSF 1 mM, pH 7,5) y se incubaron con 12  $\mu$ g de IgGs del anticuerpo en cuestión de UQCRC2 o COQ2 durante toda la noche en rotación a 4°C. Además, se utilizó un control con IgGs no específicas. Al día siguiente, se incubó con 30  $\mu$ l de la resina de proteína G (EZ View Red Protein G Affinity Gel (Sigma-Aldrich)) con el complejo anticuerpo/proteína formado en el paso anterior, durante toda la noche a 4°C en rotación. A continuación, la resina se lavó 6 veces con buffer

de lisis IP para eliminar posibles uniones inespecíficas y se eluyó la resina con buffer Laemmly durante 10 min a 95°C. Finalmente, se centrifugó a 13200 rpm durante 5 min y el sobrenadante fue cargado en un gel SDS-PAGE para ser revelado por western blot con el anticuerpo de ETFDH.

### **3.2.3.7. Inmunocaptura de los complejos de la ETC**

Los CI y CIII mitocondriales fueron inmunocapturados utilizando Complex III Immunocapture Kit (Abcam; ab109711) y el Complex III Immunocapture Kit (Abcam; ab109800), respectivamente. Para ello, se utilizaron mitocondrias aisladas de mioblastos de ratón C2C12 crecidos en cultivo *in vitro* y de músculo esquelético de ratón. Las mitocondrias fueron solubilizadas con n-dodecil- $\beta$ -D-maltósido (DDM) al 1%.

Tras eliminar la parte insoluble mediante centrifugación, el extracto de proteínas se incubó con las bolas que presentan los anticuerpos específicos de cada complejo mitocondrial según el kit utilizado durante toda la noche en rotación a 4°C. Por último, las bolas de afinidad se eluyeron con buffer Laemmly durante 10 min a 95°C, tras lo cual, se centrifugó a 13200 rpm y se analizó el material inmunoprecipitado mediante fraccionamiento en gel SDS-PAGE y western blot.

### **3.2.3.8. Medida del flujo glucolítico: producción de lactato**

El flujo glucolítico de la línea C2C12 se determinó por medio de la cuantificación de la producción de lactato a lo largo del tiempo. El fundamento teórico de esta medida se centra en la determinación por espectrofotometría de NADH (longitud de onda 340 nm), que es producido cuando la lactato deshidrogenasa (LDH) en presencia de NAD<sup>+</sup> oxida el lactato a piruvato. La adición de sulfato de hidracina permite el secuestro del piruvato formado, desplazando la reacción hacia la producción de piruvato. Brevemente, se plaquearon varios pocillos de placas p6 con  $0.5 \times 10^6$  células C2C12 WT y ETFDH KO. Se recogieron muestras de 100  $\mu$ l del medio de cultivo para hacer mediciones en los tiempos 0h, 2h, 4h, 6h y 8h. Las muestras se precipitaron en ácido perclórico al 6% durante 45 min en hielo, tras centrifugar a 11000 x g durante 5 min se neutralizaron con KOH y se utilizaron para la determinación enzimática en tampón de lactato (glicina 1M, hidracina 0,4, EDTA 1,3, pH 9,5). A continuación, se añadieron 10  $\mu$ l de la enzima LDH (Roche) y se midió a la misma longitud de onda transcurridos 40 min. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro y la concentración de lactato se expresó como nmoles de lactato producido por  $\mu$ g de proteína y hora.

### **3.2.3.9. Cuantificación de metabolitos: ATP, NAD/NADH, FAD/FADH, NADP/NADPH y GSH/GSSG**

La determinación de los siguientes metabolitos se realizó en la línea C2C12 WT y ETFDH KO.  $1 \times 10^6$  células se plaquearon por pocillo de una placa p6, por triplicado. A continuación, se realizaron los siguientes procedimientos:

ATP: La concentración de ATP se determinó utilizando el ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II

(Roche) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se homogeneizaron las células en 9 volúmenes de Tris 100 mM y EDTA 4 mM, pH 7,75 precalentado a 95°C. Las muestras se incubaron a 100°C durante 2 min y se centrifugaron a 1000 x g durante 2 min. Se usaron 50 µl de sobrenadante para la determinación de ATP con 1 volumen de tampón de reacción. La luminiscencia se midió en placas de 96 pocillos con FLUOstar Omega (BMG Labtech).

NAD/NADH y NADP/NADPH: esta cuantificación se realizó utilizando dos kits comerciales (MAK038 y MAK037, Sigma-Aldrich). De manera concisa, se homogeneizaron las células y se lavaron con PBS 1X. Posteriormente, se añadió el Tampón de Extracción de cada kit y se realizaron 3 ciclos de congelación/descongelación. A continuación, se realizó una centrifugación a 13200 rpm durante 2 min a 4°C para desechar el sedimento y guardar el sobrenadante. Para evaluar de forma diferente NADP y NADPH, o NAD y NADH, se hirvió la mitad del sobrenadante a 60°C durante 30 min para obtener NADPH y NADH y se supuso que el resto tenía NADP y NAD. Con los estándares de NADPH y NADH, los tampones y enzimas de ciclo correspondientes y el revelador de NADPH y NADH proporcionado por el kit, se realizó el ensayo colorimétrico y se leyó la absorbancia a 450 nm.

FAD/FADH<sub>2</sub>: se realizó usando un kit comercial Flavin Adenine Dinucleotide (FAD) Assay Kit (Abcam; ab204710). Resumidamente, se tripsinizaron las células y se lavaron con PBS 1X. Las células recolectadas se homogeneizaron y sobrenadante se trató con PCA 1 M. Posteriormente, se centrifugó a 13200 rpm durante 2 min a 4°C, seguido de la adición de KOH 2 M para neutralizar la muestra. Se realizó una curva patrón estándar de FAD y el ensayo se llevó a cabo con el tampón, la enzima del ensayo FAD y la sonda OxiRed proporcionada por el kit, leyendo la absorbancia a 570 nm. Se usó metosulfato de fenazina en muestras neutralizadas para transformar FADH y FADH<sub>2</sub> libres en FAD y medir el grupo total de FAD+FADH+FADH<sub>2</sub>.

GSH/GSSG: Para medir los niveles de glutatión hemos utilizado el Glutathione Assay Kit (Abcam; ab65322). El glutatión (GSH) es un tripéptido que contiene L-cisteína, ácido L-glutámico y glicina. El glutatión existe en estado reducido (GSH) y oxidado (GSSG). El glutatión reducido (GSH) es un importante antioxidante tisular que proporciona equivalentes reductores para la reducción catalizada por glutatión peroxidasa de hidroperóxidos lipídicos a sus alcoholes correspondientes y peróxido de hidrógeno a H<sub>2</sub>O. Una mayor proporción de GSSG a GSH es una indicación de estrés oxidativo.

### **3.2.3.10. Actividad de los complejos respiratorios mitocondriales**

La actividad del CI se determinó por la disminución de absorbancia a 340 nm, debida a la oxidación de NADH. Se añadió rotenona (inhibidor del CI) como control de la reacción en paralelo para diferenciar la oxidación de NADH por otras deshidrogenasas. Para realizar el experimento se utilizó una solución de mitocondrias aisladas (100 µg) resuspendida en 950 µl buffer medio C1/C2 (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 25 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, KCN 3 mM y BSA 2,5 mg/ml), con 2 µl de antimicina 1mg/ml y 13 µl de CoQ 10 mM. Una vez obtenida la mezcla, se añadieron 10 µl de NADH 13 mM. Tras 2 min, se midió la absorbancia a 340 nm otros 4 min. Se hizo otra mezcla con 6 µl de rotenona 500

$\mu\text{M}$ . Se calculó la disminución en el valor de absorbancia por min ( $\Delta A/\text{min}$ ) como la diferencia entre  $\Delta A/\text{min}$  sin rotenona y  $\Delta A/\text{min}$  con rotenona.

La actividad de CII se determinó espectrofotométricamente a 550 nm midiendo la reducción de diclorofenol-indofenol (DCPIP), por la disminución de absorbancia a 600 nm. 100  $\mu\text{g}$  de mitocondrias aisladas fueron resuspendidas en 10  $\mu\text{l}$  de medio B, a los que se les añadió 800  $\mu\text{l}$  de medio C1/C2 ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$  25 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, KCN 3 mM y BSA 2,5 mg/ml) junto con 30  $\mu\text{l}$  de DCPIP 5 mM, 2  $\mu\text{l}$  de rotenona 500  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{l}$  de succinato 0,5 M. A continuación, se añadieron 80  $\mu\text{l}$  de metosulfato de fenazina 70 mM y se midió la absorbancia a 600 nm durante 5 min cada 30 seg.

La medición de la actividad del CIII se realizó utilizando el Mitochondrial Complex III Activity Assay Kit (Sigma-Aldrich). Este kit se basa en la reducción del citocromo c a través del CIII. La absorbancia del citocromo c puede ser medida espectrofotométricamente a 550 nm. Se utilizaron mitocondrias aisladas de células en cultivo y se estimó la concentración de proteína. Se testaron diferentes concentraciones de mitocondrias para asegurar que estuvieramos en el rango lineal del ensayo. Primero, se preparó una curva estándar para obtener los valores de referencia con una solución de DTT 750 mM en buffer de ensayo y una concentración creciente de citocromo c reducido y midió la absorbancia a 550 nm. Posteriormente, a 4  $\mu\text{g}$  de proteína de mitocondrias aisladas diluidas en buffer de ensayo se le añadió 6  $\mu\text{l}$  de citocromo c oxidado, y se midió la absorbancia a 550 nm. Además, se utilizó antimicina A como control, ya que inhibe la reacción. Los valores fueron comparados con los valores conocidos de la curva estándar y se determinó la actividad del CIII mediante la siguiente ecuación expresada en unidades/ $\mu\text{g}$  proteína:  $(\Delta C \times D)/(\Delta t \times p)$  ( $\Delta C$  = cambio de [cyt c],  $p$  =  $\mu\text{g}$  proteína,  $D$ =factor de dilución).

La actividad de CIV se determinó espectrofotométricamente a 550 nm midiendo disminución de la absorbancia como consecuencia de la oxidación del citocromo c. Brevemente, 15 mg de citocromo c se disolvieron en 1 ml de buffer de fosfato potásico (KP 10 mM, ajustando el pH a 7), se añadió 1 mg de  $\text{NaBH}_4$  y se enrasó con agua hasta 1,5 ml. La mezcla se incubó en hielo durante 30 min. A continuación, se utilizaron 100  $\mu\text{g}$  de mitocondrias aisladas, con buffer KP 100 mM y se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de citocromo c reducido 1%, momento en el que se empezó a medir la absorbancia cada 30 seg durante 5 min.

### 3.2.3.11. Medición del estado de oxidación/reducción del citocromo b mitocondrial

Las mitocondrias extraídas de mioblastos WT y ETFDH KO se suspendieron a 1 mg/ml en medio de ensayo estándar y se midió el cambio de absorbancia en un espectrofotómetro Novaspec II. Dado que el CIII contiene el citocromo b562 y el citocromo b566, se decidió analizar la absorbancia a 565nm (Quinlan *et al.*, 2011). Además, se utilizó ditionito (DTT) como agente reductor y control del experimento.

### 3.2.3.12. Cuantificación de la producción de ROS por citometría de flujo

La producción mitocondrial de superóxido en células *in vitro* se cuantificó mediante citometría de flujo utilizando la sonda MitoSoX-Red (Invitrogen) (Formentini *et al.*, 2012). Esta sonda penetra en las células y se dirige a las mitocondrias donde es rápidamente oxidado por superóxidos y no por otros sistemas de generación de ROS. Esta oxidación produce fluorescencia roja (absorción y emisión máximas: 510/580 nm). Por ello, el uso de MitoSox™ es una buena herramienta para medir los niveles de generación del radical superóxido en la mitocondria (Zielonka, Vasquez-Vivar and Kalyanaraman, 2008). Las células en estudio (tratadas o no) fueron colectadas y se resuspendieron en PBS completo y MitoSox-Red a 5  $\mu$ M. En algunos casos, se añadieron inhibidores de los complejos de la ETC. La solución fue incubada a 37°C durante 20 min en oscuridad para permitir la acción de la sonda. Tras lo cual, la suspensión se centrifugó a 1200 rpm 5 min y el pellet celular se lavó en PBS 1x para eliminar restos de la sonda. Tras una nueva centrifugación, el pellet se resuspendió en solución de FACS (SFB 2%, NaN<sub>3</sub> 0,1%, EDTA 5 mM y PBS 1X). La suspensión celular se analizó en un citómetro de flujo FACS Calibur (Becton Dickinson) utilizando el programa CellQuest suministrado por el fabricante. En cada condición se analizaron al menos 10000 células por triplicado. Los resultados se analizaron con el programa FlowJo.

### 3.2.3.13. Determinación del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) mediante citometría de flujo

El potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) se determinó en células C2C12 teñidas con tetrametilrodamina metil éster (TMRM) (Thermo Fisher Scientific), una sonda fluorescente que se acumula en las mitocondrias de células intactas. Se detectó mediante citometría de flujo, como se describió previamente (Sanchez-Cenizo *et al.*, 2010), en un citómetro BD FACS Calibur.

### 3.2.3.14. Medida del ciclo celular por citometría de flujo

El análisis de ciclo celular de células fijadas se realizó mediante el protocolo de tinción con yoduro de propidio. Este agente se intercala entre el ADN de las células vivas emitiendo fluorescencia por lo que permite medir la cantidad de ADN que contiene la célula, es decir, en qué fase de su ciclo celular se encuentra. Aproximadamente 3 millones de células fueron recogidas y el pellet fue lavado con 1 ml de PSB 1X frío. Tras centrifugar, el pellet celular fue resuspendido en 1 ml de etanol al 70% frío añadido gota a gota. La solución de células fue guardada a -20 °C durante al menos 18 h. Una vez las células estuvieron fijadas, el pellet se centrifugó a 1500 x g durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y se hicieron dos lavados con PBS 1X. Por último, se añadió 500  $\mu$ l de tampón de ciclo (BD Pharmingen), que contine PBS, RNAsa A 100  $\mu$ g/ml y yoduro de propidio 50  $\mu$ g/ml. Las células se dejaron marcando 30 min a temperatura ambiente e inmediatamente se procedió a analizar las muestras por citometría de flujo como se ha indicado arriba.

### 3.2.3.15. Medida de la $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos

Las células C2C12 y C2C12 ETFDKO se incubaron en medio MEM libre de suero que contenía ácido palmítico-[9,10- $^3$ H(N)] (Perkin Elmer, 20  $\mu$ mol/l) en una atmósfera de O<sub>2</sub> 95%: 5% CO<sub>2</sub> a 37 °C durante 3 h. Después de la incubación, se colocaron 100  $\mu$ l del medio de cultivo sobre una resina de intercambio iónico (Bio-Rad) y se lavaron con agua las columnas de cromatografía Poly-Prep (Bio-Rad). Los ácidos grasos intactos (estado cargado) fueron retenidos por la resina, mientras que la porción oxidada de ácidos grasos pasó libremente a través de la columna (Formentini *et al.*, 2017a). La porción oxidada se midió en un contador Ultima Gold LLT (Perkin Elmer). Todos los resultados se ajustaron para el contenido de proteína celular total.

### 2.3.16. Medida del catabolismo y captación de $^{14}$ C (u)-leucina

Para medir la absorción de sustrato y la producción de CO<sub>2</sub>, los mioblastos se incubaron en HBSS que contenía L-leucina 0,3 mM + 2  $\mu$ Ci/ml de  $^{14}$ C(u)-L-leucina marcada (Perkin Elmer). La captación se midió como la radiactividad incorporada en los miocitos después de 0, 1, 2, 3, 5 o 10 min. Las fracciones de aminoácidos se separaron mediante una extracción estándar con TCA al 10% a las 0 y 4 h. Para la producción de CO<sub>2</sub>, la incubación se llevó a cabo en matraces en presencia de un filtro de papel embebido en una solución de KOH/NaOH 0,2 M. La captación e incorporación de C14 en aminoácidos o CO<sub>2</sub> se midió en un contador de centelleo con fluido Ultima Gold LLT (Perkin Elmer).

### 3.2.3.17. Inmunofluorescencia en células fijadas

Se sembraron 20000 células en una gota de 100  $\mu$ l en un cubreobjetos en placa una de 24 pocillos a las que se añadió 0,5 ml de medio DMEM. Una vez las células estuvieron adheridas, se retiró el medio y se fijaron durante 5 minutos con PFA 2% en PBS cubriendo por completo el cristal, seguido de una fijación en PFA 4% en PBS a 4°C. A continuación, para eliminar la autofluorescencia de las células, se cubrieron con una solución de NaBH<sub>4</sub> 1mg/ml en PBS pH 8.0 durante 10 min a temperatura ambiente y se volvieron a lavar dos veces con PBS 1. Las células se permeabilizaron con Tritón x-100 al 0,1% en PBS a temperatura ambiente durante 10 min. Luego, se incubaron durante 10 min con la solución de bloqueo (1% BSA en PBS/0,1% tritón X-100). Las células permeabilizadas y bloqueadas se incubaron con el anticuerpo primario  $\beta$ -F1- ATPasa (1:10000) para marcar las mitocondrias durante toda la noche a 4°C dentro de una cámara húmeda. Al día siguiente, se lavaron dos veces con PBS 1X y se incubaron 45 min en oscuridad con el anticuerpo secundario de conejo anti-ratón conjugado con Alexa 488 (Molecular Probes) o ratón anti-conejo Alexa 555 (Molecular Probes) diluido 1:1000 en solución de bloqueo. Se añadió DAPI 1  $\mu$ g/ml para marcar los núcleos celulares y BODIPY 493/503 (2  $\mu$ M) para marcar los lípidos. Los cubreobjetos se montaron sobre un portaobjetos utilizando Mowiol. Por último, las imágenes de fluorescencia celular se adquirieron mediante microscopía confocal utilizando un microscopio Bio-Rad Radiance 2000 Zeiss Axiovert S100TV. Las imágenes fueron procesadas en el software ImageJ.

### 3.2.3.18. Proteómica cuantitativa (iTRAQ/TMT)

El análisis de etiquetas isobáricas para cuantificación relativa y absoluta (iTRAQ) se llevó a cabo en el Centro de Química de Proteínas del CBMSO (ProteoRed, PRB3-ISCIII y la UAM).

Después de los pasos de normalización y filtrado, los datos proteómicos se analizaron mediante Gene Set Enrichment Analysis (GSEA v4.1.0, <http://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp>) y se visualizaron mediante el software gratuito Cytoscape v3.6.1.

Se utilizaron GENEPIX 5.1 y el software InDot para la carga de datos iniciales iTWO-300 RPPA y el análisis densitométrico, respectivamente. Se utilizó el software ImageJ para la cuantificación y el análisis de imágenes.

### 3.2.4. Métodos con ratones

#### 2.4.1. Condiciones de mantenimiento, cuidado y manejo de ratones

Los ratones utilizados en este estudio se mantuvieron en una sala de nivel de seguridad p2 en el Animalario del CBMSO, en celdas estancas dotadas de ventilación y un número máximo de 5 ratones por celda. La estabulación y manejo de los ratones fueron realizados por personal con la formación necesaria y siguiendo la normativa vigente y las directrices institucionales oportunas en cuanto a bienestar animal. Todos los experimentos fueron, además, aprobados por el Comité de Ética de la Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid y por el Comité Español de Experimentación Animal (PROEX 183/17) de conformidad con las Directrices del Consejo de la Comunidad Europea (Directiva UE 86/609) y las Directrices ARRIVE. Todos los procedimientos se realizaron asegurando la mínima incomodidad y angustia a los animales y fueron realizados con un número de réplicas por condición que minimizase el uso de animales siempre que se garantizara la validez estadística del estudio.

### 3.2.5. Análisis Estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando una prueba *t* de Student que compara las medias de dos variables que siguen una distribución normal para determinar la significatividad estadística de los resultados. Las barras de errores son la media  $\pm$  s.e.m (error estándar de la media) de al menos 3 ratones/genotipo/réplicas o 3 experimentos. Un valor de  $*p < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo al ser comparado con el WT mediante ANOVA y la prueba de *t* de Student.

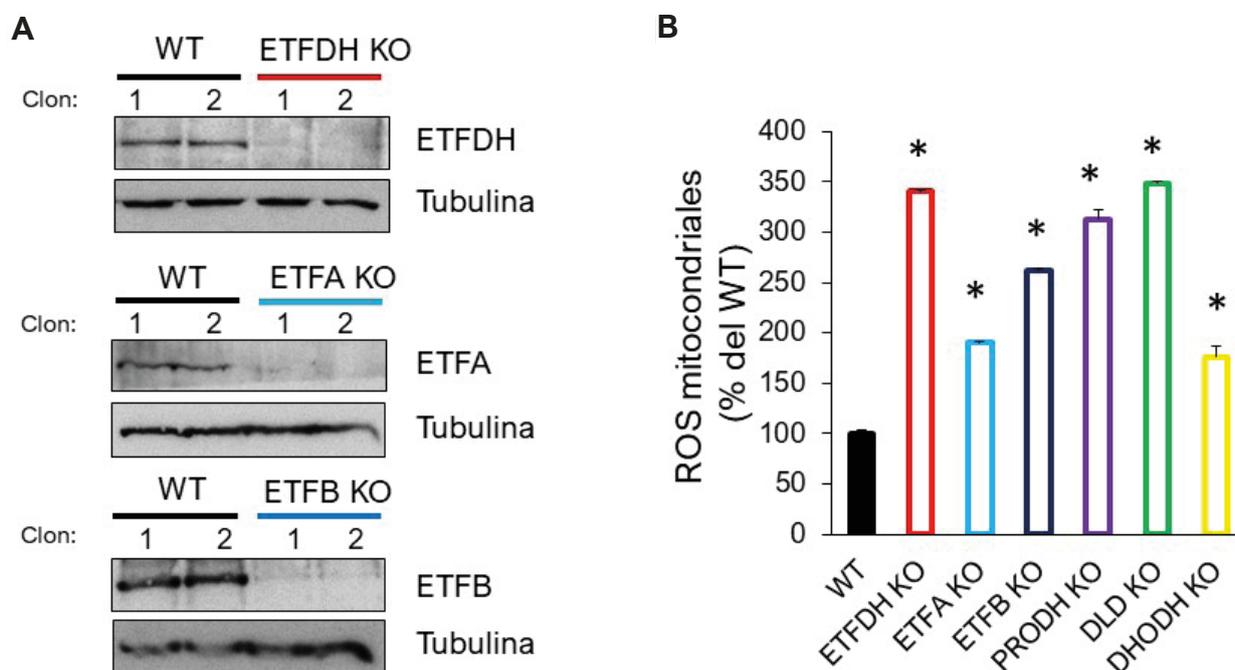
Los datos proteómicos, después de los pasos de normalización y filtrado, se analizaron mediante el análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes y se visualizaron mediante mapas de calor y enriquecimiento utilizando el software gratuito GSEA v3.0 y Cytoscape v3.6.1. El análisis de RT-PCR se evaluó utilizando el software 7500 Real-Time PCR SDS 2.4.

## RESULTADOS

## 4. Resultados

### 4.1. Generación de líneas celulares KO estables para una serie de DFDs

Para estudiar la implicación que tienen las DFDs en la biología del músculo esquelético, se comenzó por generar un panel de líneas estables de mioblastos, cada una deficiente para una deshidrogenasa. Se silenció genéticamente la expresión de ETFDH, ETFA, ETFB, PRODH, DLD y DHODH, en mioblastos de ratón C2C12, utilizando la tecnología CRISPR/Cas9. Para ello, se diseñaron secuencias de gRNAs específicas para el exón 2 de cada DFDs, que fueron insertadas en el plásmido pSpCas9(BB)-2A-GFP utilizando protocolo de Ran (Ran *et al.*, 2013), utilizando como referencia las secuencias de los genes murinos almacenadas en la base de datos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) con las siguientes referencias: *ETFDH* (NM\_025794.2), *ETFFA* (NM\_145615.4), *ETFBA* (NM\_026695.3), *PRODH* (NM\_011172.2), *DLD* (NM\_007861.5) y *DHODH* (NM\_020046.3).



**Figura 7. Generación de mioblastos de ratón C2C12 KO para diferentes DFDs.** (A) Western blots (WB) de las líneas knock-out ETFDH KO (rojo), ETFFA KO (celeste) y ETFBA KO (azul) incubados con el anticuerpo frente ETFDH, ETFFA y ETFBA, respectivamente. Se ha utilizado un anticuerpo frente a tubulina como control de carga en todas las muestras. Los carriles bajo la línea negra corresponden con *wild type* (WT). (B) Análisis de la producción de ROS mitocondriales, expresados como el porcentaje del WT, mediante el uso de la sonda MitoSox™, en mioblastos KO para ETFDH, ETFFA, ETFBA, PRODH, DLD y DHODH.

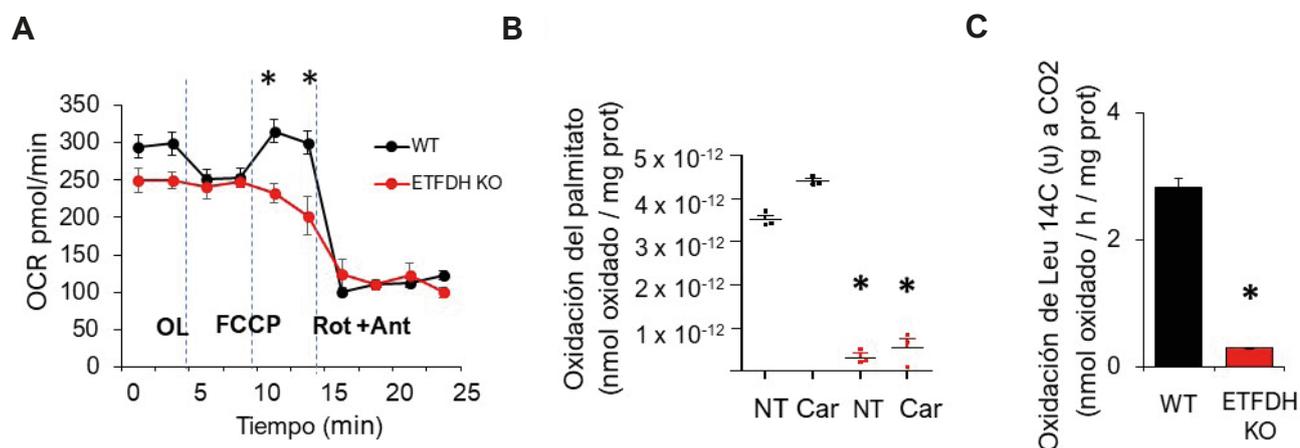
Se desarrollaron 2 clones diferentes de mioblastos deficientes de cada DFDs y se comprobó el silenciamiento génico de las líneas ETFDH KO, ETFA KO y ETFB KO mediante western blot con los extractos de proteína extraída de cada una de las líneas celulares estables crecidas en cultivo. La detección de ETFDH fue insignificante en ETFDH KO en comparación con el WT (Figura 7A). Del mismo modo, la expresión de ETFA y ETFB no fue detectada en ETFA KO y ETFB KO, respectivamente (Figura 7A). Las líneas PRODH KO, DLD KO y DHODH KO se comprobaron mediante secuenciación empleando ADN genómico extraído de las células crecidas en cultivo.

Debido a la conocida implicación de las DFDs en reacciones catabólicas redox y a la correlación entre disfunciones mitocondriales y desajustes en la producción de ROS (Mráček, Drahota and Houštěk, 2013; Yang, Song and Yan, 2019; Huynh *et al.*, 2020; Henriques *et al.*, 2021; Mao *et al.*, 2021), una vez generadas las líneas celulares KO, se analizó la producción de  $O_2\cdot$  en cada una de ellas mediante citometría de flujo, utilizando la sonda MitoSox™. Todas las líneas KO reflejaron un aumento significativo de ROS mitocondriales en comparación con el WT, siendo este cambio particularmente elevado en las líneas ETFDH KO y DLD KO (Figura 7B). Incrementos de ROS menores pero significativos respecto a los controles también se observaron en las líneas ETFA KO, ETFB KO, PRODH KO y DHODH KO (Figura 7B).

Dado el impacto en términos de producción de ROS de la ausencia de ETFDH en mioblastos y, dado que en esta deshidrogenasa convergen los electrones derivados del catabolismo de diferentes sustratos (ácidos grasos, BCAA y colina) esenciales en el metabolismo del músculo esquelético, se decidió continuar el estudio con la línea ETFDH KO y se procedió a su caracterización.

#### **4.2. La pérdida de ETFDH conlleva la incapacidad de oxidar los ácidos grasos y los BCAA**

ETFDH ha sido descrita como el cuello de botella de la FAO y el catabolismo de los BCAA. Primero, y como prueba de concepto, comprobamos si la pérdida de ETFDH provocaba alteraciones en estas dos rutas catabólicas. Llevamos a cabo un ensayo Seahorse utilizando como sustrato el palmitato, para medir la tasa de consumo de  $O_2$  (OCR) acoplado a la FAO mitocondrial en mioblastos WT y que no expresan ETFDH. La figura 8A muestra que la respiración basal fue ligeramente inferior en ETFDH KO en comparación con WT. La inyección de oligomicina dio como resultado una OCR similar, sin embargo, la inyección de FCCP, que provoca el colapso del gradiente de protones, la interrupción del  $\Delta\Psi_m$  y el máximo consumo de  $O_2$ , no produjo una subida de la respiración mitocondrial en la línea ETFDH KO, lo que es compatible con la inhibición de la FAO en ausencia de ETFDH. Esto nos indica que la línea ETFDH KO no puede utilizar los ácidos grasos como fuente de energía para la producción de ATP. Sin embargo, este análisis no puede descartar que el menor consumo de  $O_2$  observado en los mioblastos ETFDH KO sea debido a disfunciones en la ETC y no de la FAO. Para descartar esta hipótesis, realizamos un ensayo de cinética de la FAO mitocondrial, mediante la medida en el tiempo de la oxidación del ácido palmítico marcado radiactivamente hasta  $H_2O$  (Figura 8B). Los resultados indicaron que la FAO está casi totalmente inhibida en ausencia de ETFDH, permaneciendo únicamente



**Figura 8. La pérdida ETFDH conlleva la incapacidad de oxidar ácidos grasos y BCAA en la mitocondria.** (A) Ensayo Seahorse de mioblastos WT y ETFDH KO en ayuno tras la administración de palmitato (100  $\mu$ M). Se observa una caída significativa de la respiración mitocondrial máxima en la línea ETFDH KO tras la adición de FCCP. (B) Medida de la FAO del palmitato en ambas líneas sin tratar y tras la adición de Car. Se observa que ETFDH KO es incapaz de oxidar el palmitato. (C) Medida del BCAA catabolismo hasta  $\text{CO}_2$  mediante el uso de leucina marcada radiactivamente. Se observa que ETFDH KO es incapaz de oxidar completamente la leucina. Abreviaturas: OL (oligomicina), FCCP (Carbonil cianuro-4 trifluorometoxi fenilhidrazona), Rot (rotenona), Ant (Antimicina A), OCR (tasa de consumo de  $\text{O}_2$ ), NT (no tratado), Car (L-carnitina).

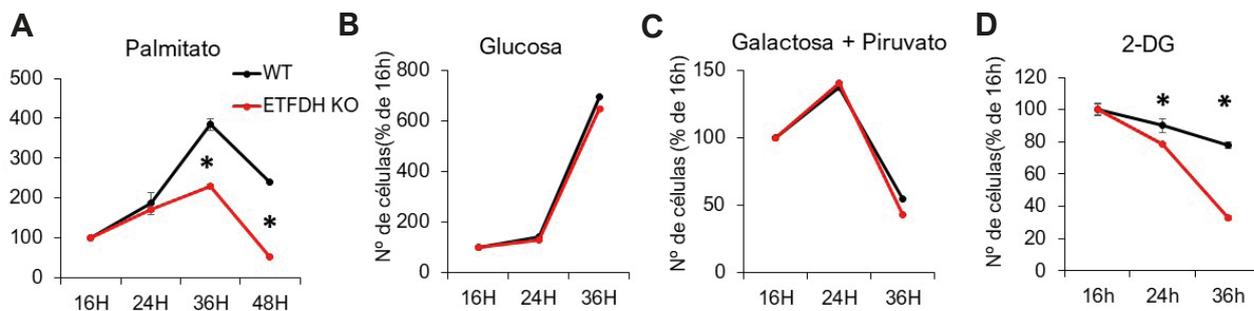
valores residuales de FAO en los mioblastos ETFDH KO, tanto en presencia o en ausencia de carnitina, que facilita la entrada de ácidos grasos a la mitocondria (Figura 8B).

Además, y en línea con el papel central de ETFDH en el catabolismo de los BCAA, la oxidación completa de leucina marcada con C14 a  $\text{CO}_2$  se encontró prácticamente abolida en los mioblastos ETFDH KO (Figura 8C), demostrando que la ausencia de ETFDH también inhibe el catabolismo de los BCAA.

### 4.3. La ausencia de ETFDH provoca una dependencia metabólica de la glucólisis en mioblastos

A continuación, evaluamos la capacidad de la línea ETFDH KO de crecer en presencia de diferentes nutrientes, midiendo la cantidad de células vivas a diferentes tiempos. En línea con la inhibición de la FAO, los mioblastos ETFDH KO perdieron la capacidad de crecer cuando el único sustrato es el palmitato (Figura 9A). Sin embargo, como se puede observar en la Figura 9B, mantuvieron una capacidad proliferativa similar a los mioblastos control hasta las 36h en presencia de glucosa (Figura 9B). Cabe destacar que de acuerdo con la literatura (Long *et al.*, 2007; Dott *et al.*, 2014; Sumbalová *et al.*, 2022) la presencia de galactosa en el medio de cultivo resultó tóxica para los mioblastos y ambas líneas redujeron su crecimiento en la misma proporción a las pocas horas (Figura 9C); sin embargo, la presencia de otro inhibidor de la glucólisis, la 2-desoxiglucosa (2-DG), produjo una reducción mayor del número de células en la línea ETFDH KO a las 24h y 36h (Figura 9D), revelando una mayor dependencia de la glucólisis en ausencia de ETFDH comparado con la línea WT.

## RESULTADOS



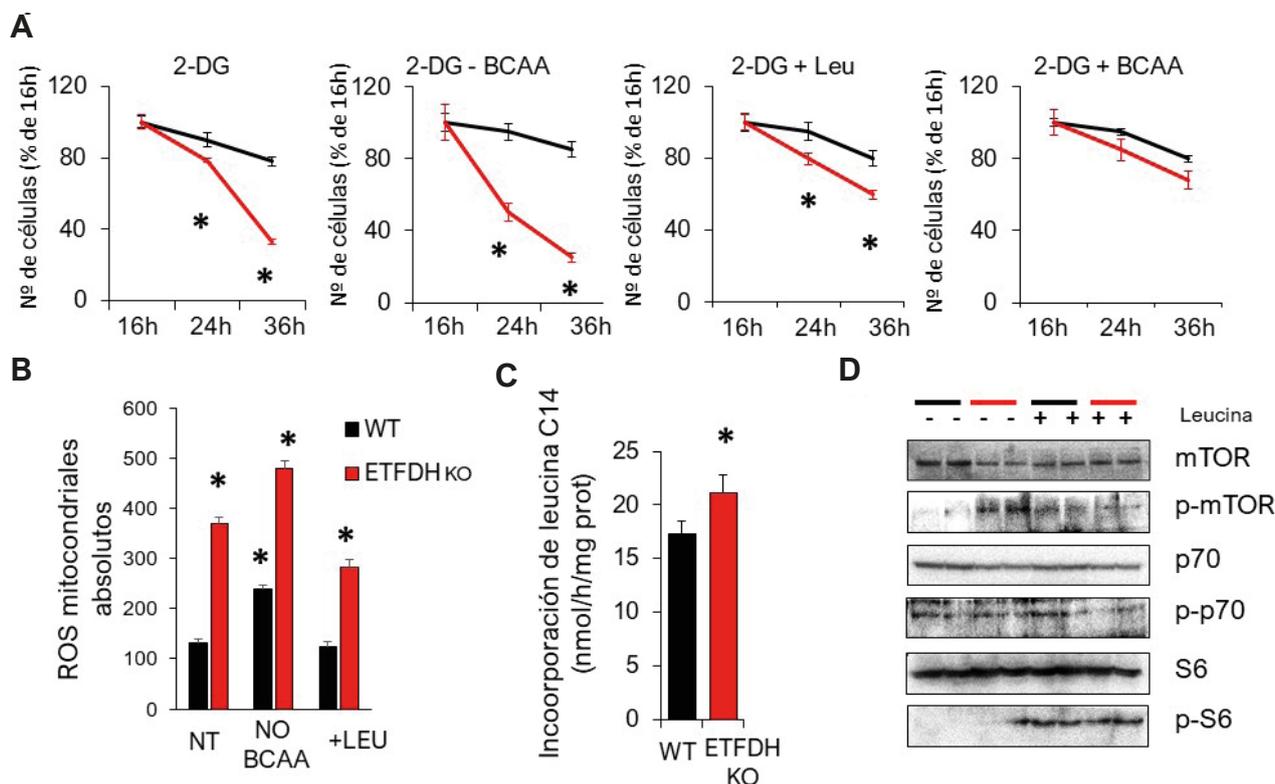
**Figura 9. Viabilidad celular en presencia de diferentes metabolitos e inhibidores.** (A) Los mioblastos ETFDH KO no son capaces de crecer en un medio rico en palmitato (100  $\mu$ M) (B) Los mioblastos ETFDH KO no muestran diferencias de viabilidad celular en al crecer en medio rico en glucosa. (C) La galactosa resultó tóxica tanto para WT como para ETFDH KO, reduciendo el número de células a las 36h. (D) La 2-DG evidenció una dependencia de la glucólisis de la línea ETFDH KO, observándose diferencias significativas a las 24h y 36h.

### 4.4. La leucina es empleada para síntesis proteica en ausencia de ETFDH

El siguiente paso fue testar la implicación de los BCAA en el crecimiento celular de los mioblastos ETFDH KO. De manera sorprendente, la ausencia de BCAA en el medio de cultivo en presencia de 2-DG redujo significativamente la proliferación en ETFDH KO (Figura 10A). Por el contrario, la presencia de leucina junto con 2-DG, mejoró el crecimiento celular, aunque siendo todavía significativamente inferior al de la línea WT (Figura 10A). Este efecto fue aún más evidente al suplementar el medio con los tres BCAA (leucina, isoleucina y valina) (Figura 10A). Al haber observado que el catabolismo de los BCAA estaba inhibido en ausencia de ETFDH (Figura 8C), nos preguntamos cómo la suplementación de BCAA al medio de cultivo pudiese tener este efecto. De manera interesante, observamos que la ausencia de BCAA del medio de cultivo producía un incremento en la producción de ROS mitocondriales tanto en WT como en ETFDH KO. Sin embargo, la adición de 600  $\mu$ M de leucina al medio producía una reducción significativa de los ROS en ETFDH KO, pero no en WT (Figura 10B).

Estos datos nos sugieren que: (i) un aumento de  $O_2 \cdot$  en células que ya presentan unos niveles de ROS mitocondriales del 300% (Figura 7B) podría producir un arresto en la proliferación celular de las ETFDH KO y (ii) la leucina que no puede ser catabolizada en ausencia de ETFDH podría activar la síntesis proteica, de acuerdo con la literatura (Daniela *et al.*, 2006; Dodd and Tee, 2012; Duan *et al.*, 2015), mejorando así la capacidad proliferativa de los mioblastos ETFDH KO.

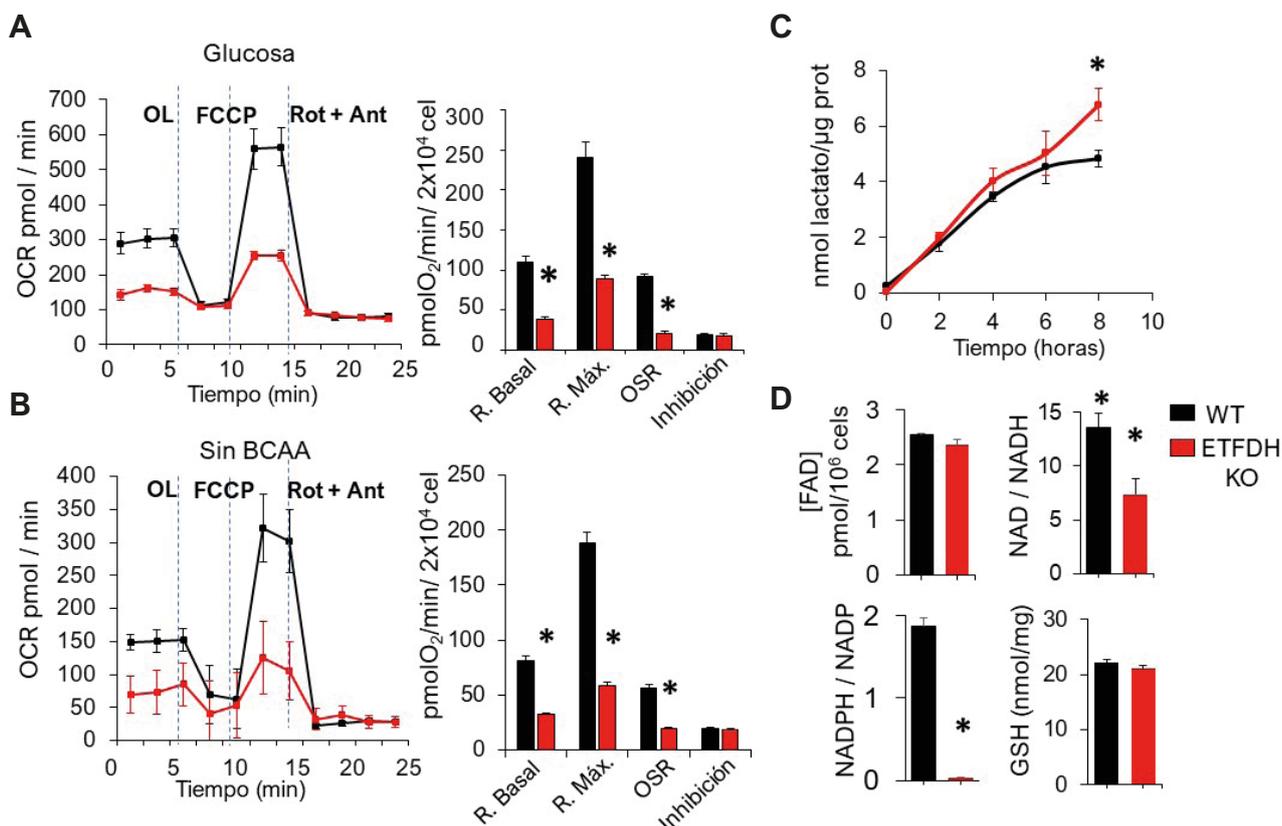
De acuerdo con esto, la incorporación de C14 derivado de leucina marcada a la fracción proteica celular se encontró aumentada en ausencia de ETFDH (Figura 10C). Además, mediante western blot, confirmamos que la adición de BCAA al medio de cultivo producía la activación de la ruta de mTOR y la fosforilación de S6 (Figura 10D), promoviendo la síntesis proteica y el crecimiento celular.



**Figura 10. Los BCAA mejoran la viabilidad celular mediante la activación de la ruta en mTOR.** (A) Graficas de viabilidad celular de las líneas WT (negro) y ETFDH KO (rojo) crecidas en presencia de 2-DG y con o sin BCAA. (B) Medida de la producción de ROS mitocondriales de mioblastos crecidos en medio sin BCAA y tras la adición leucina durante 24h. La falta de BCAA produce un aumento significativo de ROS. (C) Western blots incubados frente los anticuerpos mTOR, p70 y S6, y sus formas fosforiladas. La presencia de leucina produce la fosforilación S6.

#### 4.5. La pérdida de ETFDH produce una disfunción de la OXPHOS

Como he comentado anteriormente, cuando la glucosa es utilizada como sustrato y los electrones entran a la ETC por el CI y CII, baipaseando ETFDH, los mioblastos ETFDH KO proliferan de manera similar a los controles, por lo menos a tiempos cortos (Figura 9A). Para comprobar la funcionalidad mitocondrial en esta condición, realizamos un ensayo del consumo de O<sub>2</sub> (ensayo Seahorse) en presencia de glucosa 10 mM. Tanto la respiración basal, como la respiración sensible a oligomicina y la respiración máxima se encontraron significativamente disminuidas en la línea ETFDH KO comparado al WT (Figura 11A). Para descartar que estos efectos fuesen debidos a que los mioblastos emplean BCAA y ácidos grasos para la producción de ATP aún en presencia de glucosa, repetimos el experimento en un medio sin BCAA ni ácidos grasos (Figura 11B).

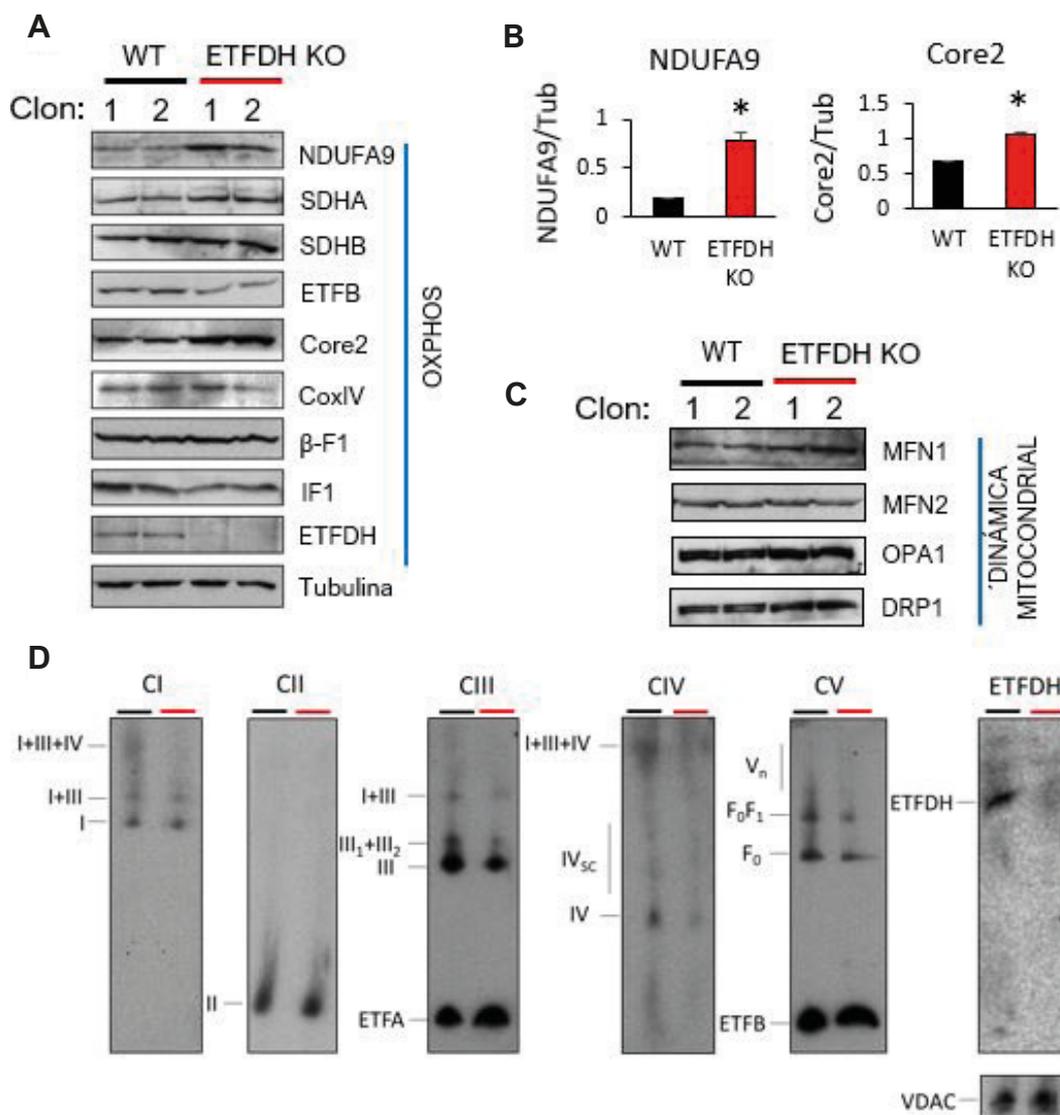


**Figura 11. La pérdida de ETFDH provoca un reducido OCR y una mayor tendencia a la producción de lactato.** (A) Perfil Seahorse en mioblastos WT (negro) y ETFDH KO (rojo) en medio completo. (B) Perfil Seahorse en mioblastos WT (negro) y ETFDH KO (rojo) en medio sin BCAA ni ácidos grasos. En los dos ensayos, la glucosa (10 mM) es utilizada como sustrato y los valores de OCR son medidos tras la adición secuencial de OL, FCCP y Rot + Ant. (C) Ensayo de producción de lactato en el tiempo (medida del flujo glucolítico), expresado como nmoles de lactato/ug de prot/h (D) Concentración de [FAD], y valores de los ratios NAD/NADH, NADP/NADPH y [GSH]/[GSSG] en C2C12 WT (negro) y ETFDH KO (rojo).

En este caso, los valores de la respiración fueron menores comparados con el ensayo con medio completo, tanto en WT como en ETFDH KO (Figura 11B), indicando que el metabolismo basal de un mioblasto emplea tanta glucosa como BCAA y ácidos grasos como sustratos. Sin embargo, y de manera sorprendente, en estas condiciones - cuando los electrones entran a la ETC baipaseando ETFDH- se mantuvo la diferencia en consumo de O<sub>2</sub>, siendo este significativamente menor en la línea ETFDH KO (Figura 11B), sugiriendo un posible fallo en la OXPHOS en ausencia de ETFDH hasta ahora no descrito entre sus funciones. Además, realizamos una medida de la producción de lactato, observando un aumento del flujo glucolítico en la línea ETFDH KO en comparación con el WT (Figura 11C), compatible, por efecto Warburg, con una inhibición de la OXPHOS. Aún más, también observamos una acumulación de [NADH] en mioblastos ETFDH KO, un evento que suele ocurrir en presencia de disfunciones de la ETC. Para continuar con el fenotipado de estas líneas celulares, medimos la concentración [FAD] sin observar diferencias entre los valores observados en WT y ETFDH KO. Además, y a pesar de no observarse cambios significativos en el ratio [GSH]/[GSSG], los mioblastos ETFDH KO presentaron una disminución significativa de [NADPH] (Figura 11D), compatible con el estrés oxidativo observado en esta línea.

#### 4.6. ETFDH interacciona molecularmente con la subunidad UQCRC2 del CIII

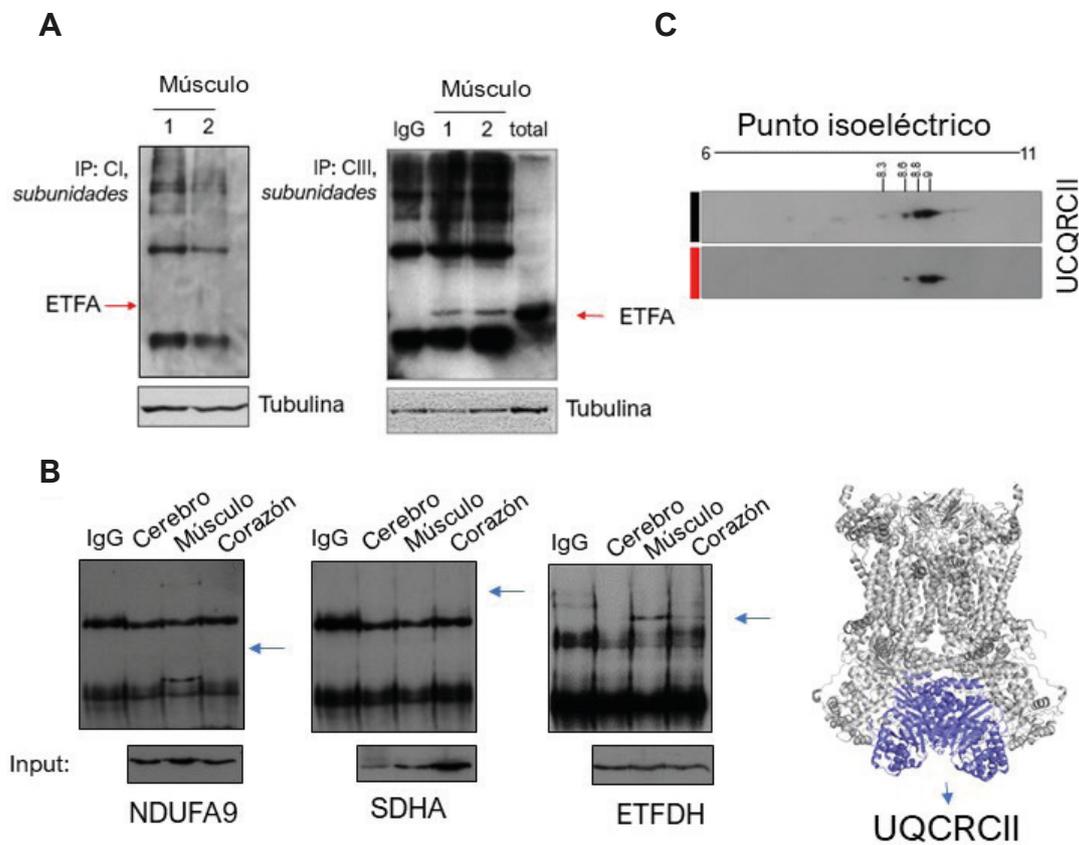
Para profundizar en el estudio de la posible disfunción de la OXPHOS observada en ausencia de ETFDH, se analizó la expresión de diferentes subunidades de los complejos que la componen (Figura 12A). La ausencia de ETFDH aumentó de manera moderada pero significativa la expresión de la subunidad NDUFA9 del CI y la subunidad UCQRC2 (Core2) del CIII sin cambios relevantes en la expresión de otras subunidades (Figura 12A y B) ni en las proteínas implicadas en la dinámica mitocondrial: mitofusina 1 y 2 (MFN1/2), DRP1 y OPA1 (Figura 12C).



**Figura 12. Expresión de las proteínas de la ETC, su ensamblaje y formación de supercomplejos.**

(A) Western blots de la expresión de proteínas que conforman la OXPHOS. Se utilizó tubulina como control de carga. (B) Cuantificación de bandas de NDUFA9 y Core2. (C) Western blots de la expresión de proteínas relacionadas con la dinámica mitocondrial. (D) Electroforesis en condiciones nativas BN-PAGE de la expresión y ensamblaje de los complejos CI, CII, CIII, CIV, CV, ETFA y ETFDH. VDAC se utilizó como control de carga.

La actividad OXPHOS es regulada no solamente por la expresión de sus complejos sino por su ensamblaje y capacidad de formar supercomplejos (Acín-Pérez *et al.*, 2008). No encontrando cambios en la expresión de proteínas que pudiesen justificar el bajo consumo de O<sub>2</sub> observado en las ETFDH KO, se realizó una electroforesis en condiciones nativas (BN-PAGE) para comprobar el ensamblaje de los complejos de la OXPHOS. No se observaron cambios en los CI, CII, CIV ni CV (Figura 12D). Sin embargo, se observó una disminución en el ensamblaje del CIII y de los supercomplejos I+III y III<sub>2</sub>+ III<sub>2</sub>, en ETFDH KO comparado con el WT (Figura 12D). Cabe destacar que la migración de ETFDH fue similar a la del supercomplejo CI+CIII, lo que sugiere una posible asociación entre ETFDH y estos componentes de la ETC (Figura 12D). Esto es en línea con la hipótesis de un posible complejo multifuncional formado por la ETC y la maquinaria de la FAO, destinado a conferir ventajas cinéticas (Wang *et al.*, 2019). Por lo tanto, a continuación, nos propusimos estudiar si ETFDH interacciona directamente con los complejos CI y CIII, lo que afectaría la eficiencia de ETC.



**Figura 13. ETFDH interacciona directamente con la subunidad UQCRC2 del CIII.** (A) Inmunoprecipitación de todas las subunidades del CI y III, y posterior western blot revelado frente al anticuerpo ETFA, en extractos de mitocondrias aisladas de músculo esquelético de ratón. (B) Inmuncaptura de la subunidad UQCRC2 del CIII y posterior western blot revelado frente al anticuerpo NDUFA9, SDHA y ETFDH, en extractos de mitocondrias aisladas de músculo esquelético, de cerebro y corazón de ratón. (C) Gel bidimensional que muestra que no existen modificaciones en el punto isoelectrico de UQCRC2 en ETFDH KO frente a WT. La imagen en la derecha muestra la estructura del CIII (en gris) evidenciando la subunidad UQCRC2 (en azul) (la imagen fue creada en Pymol utilizando el PDB: 5XTE).

Para comprobarlo, se aislaron mitocondrias de músculo esquelético de ratón y se inmunoprecipitaron todas las subunidades del CI y CIII, comprobando que el complejo ETFA/ETFDH co-inmunoprecipitaba con el CIII, pero no con el CI (Figura 13A). De hecho, los resultados mostraron que ETFA (que forma un complejo con ETFDH (Swanson *et al.*, 2008)) no se une al CI (Figura 13A); sin embargo, la inmunoprecipitación de todas las subunidades del CIII si arrastró a ETFA, demostrando una interacción directa (Figura 13A).

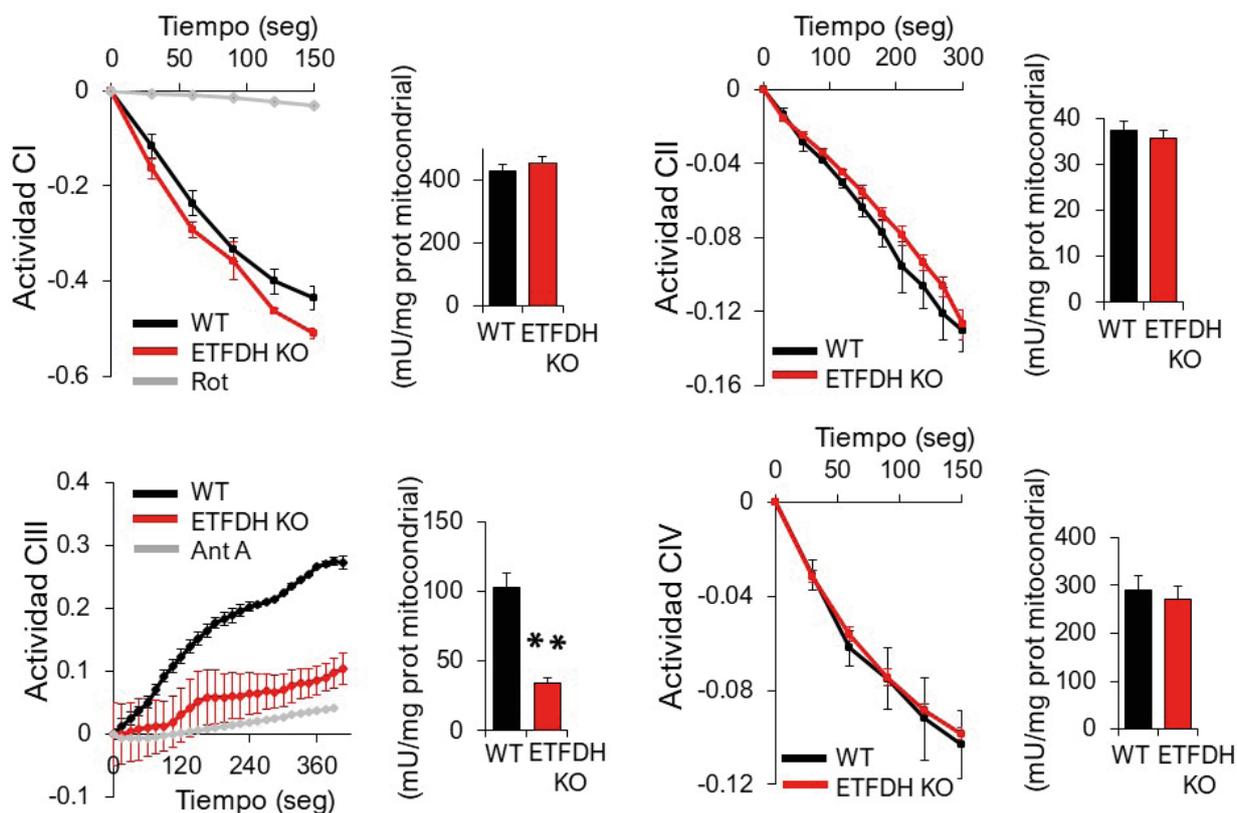
Tras observar esta interacción, nos propusimos detectar cuál de sus 11 subunidades que forman el CIII es la que está interaccionando directamente con el complejo ETFDH/ETFa. La subunidad UQCRC2 (Core2) forma una estructura bilobulada junto con UQCRC1 (Core1) con un núcleo interior hueco expuesto a la matriz, adyacente a los dominios transmembrana del citocromo b (MT-CYB) y la proteína de unión a la ubiquinona (UQCRQ) (Unni *et al.*, 2019). De esta manera, sería el sitio más probable de interacción directa entre el CIII y ETFDH, que, aunque anclado a la MMI, presenta dominios exclusivamente de matriz. Para verificar esta hipótesis, inmunoprecipitamos UQCRC2 en extractos de músculo, cerebro y corazón, detectando una interacción directa con ETFDH en todos los tejidos analizados (Figura 13B). De manera interesante, UQCRC2 no co-inmunoprecipitó con la subunidad NDUFA9 del CI en ninguno de los tejidos estudiados, ni con la subunidad SDHA del CII (Figura 13B), indicando una interacción específica con ETFDH.

Este resultado está en línea con la hipótesis de que la ETC pueda reorganizar su superestructura en respuesta a situaciones de aumentado flujo de electrones (como por ejemplo en condiciones de aumentada FAO), liberando el CIII de los supercomplejos para recibir electrones que provienen del  $FADH_2$  (Guarás *et al.*, 2016)). En este caso, la interacción entre ETFDH y el CIII facilitaría el pasaje de  $CoQH_2$  derivado de la oxidación de los ácidos grasos. Cabe destacar que la interacción entre ETFDH y UQCRC2 no alteró el punto isoeléctrico (pI) de la de esta subunidad (Figura 13C), lo que indica que no hay modificaciones postraduccionales de UQCRC2 mediadas por ETFDH.

#### 4.7. La falta de interacción entre ETFDH y el CIII inhibe la actividad de la ETC

Para verificar si la falta de interacción entre ETFDH y el CIII fuese el origen de la disfunción de la OXPHOS observada, el siguiente paso consistió en medir la actividad enzimática de los complejos de la ETC en mitocondrias aisladas de mioblastos WT y ETFDH KO (Figura 14).

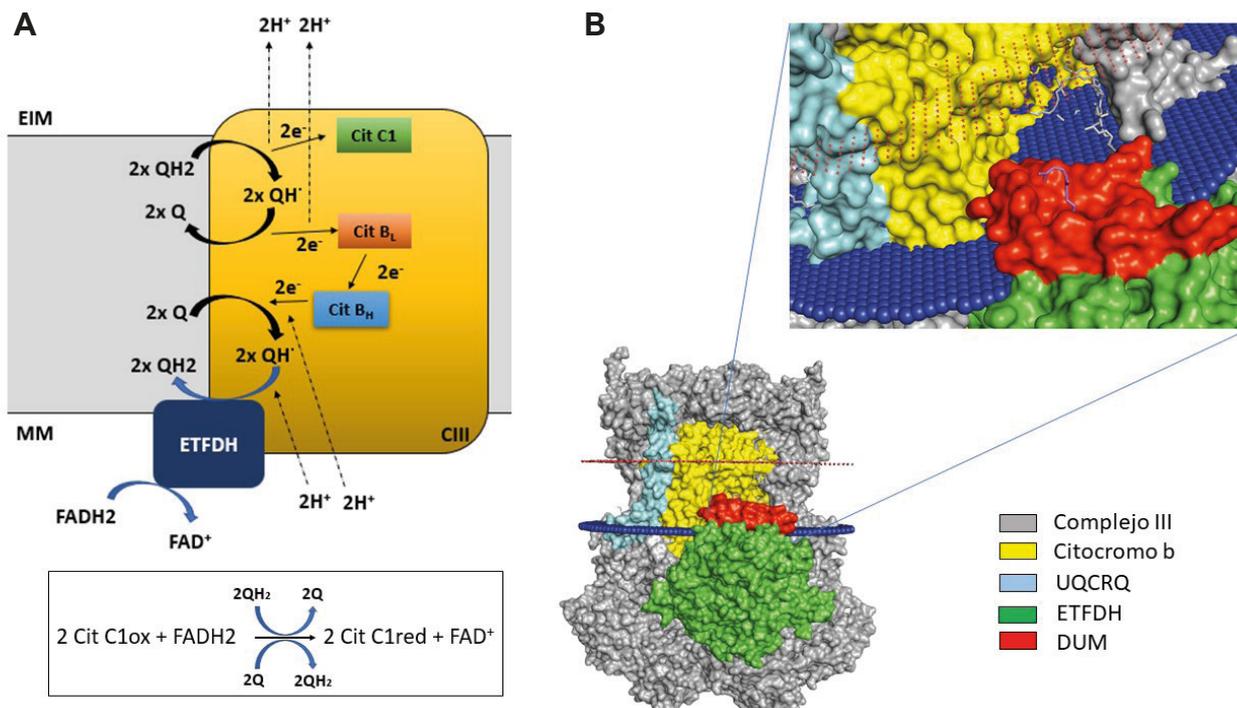
Las actividades de los complejos I, II y IV no mostraron diferencias significativas entre mitocondrias WT y ETFDH KO, indicando que no hay defectos en la actividad de estos complejos (Figura 14). Sin embargo, la actividad del CIII se encontró significativamente disminuida en mitocondrias derivadas de la línea ETFDH KO, indicando una capacidad del 40% en reducir el citocromo c frente al WT. Cabe destacar que la actividad del CIII es solo ligeramente mayor a la observada tras la adición de antimicina A, un clásico inhibidor del CIII. Estos datos nos sugieren que la falta de interacción entre ETFDH y UQCRC2 inhibe el consumo de  $O_2$  mitocondrial mediante la inhibición directa del CIII.



**Figura 14. La actividad de CIII mitocondrial se encuentra reducida en ausencia de ETFDH.** Medición de la actividad de los complejos I, III, III y IV. Se han utilizado mitocondrias aisladas de mioblastos WT y ETFDH KO. Los valores han sido expresados en mU/mg de proteína mitocondrial. Abreviaturas: Rot (rotenona) y Ant A (antimicina A).

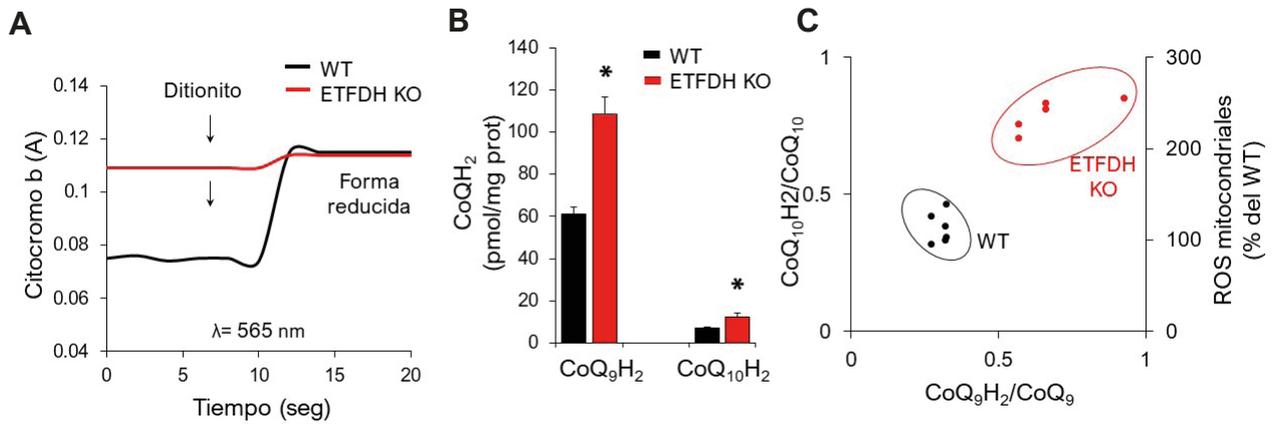
La sorprendente inhibición de la actividad CIII observada en la línea ETFDH KO puso de manifiesto la dependencia que tiene este complejo de la presencia de ETFDH. Esto nos llevó a especular que ETFDH pudiese intervenir directamente en el mecanismo catalítico del CIII, es decir, en el ciclo del CoQ. La idea de que una deshidrogenasa pudiese aportar el último electrón necesario para la reducción completa de la semiquinona formada por el citocromo  $b_H$  en el ciclo del CoQ fue inicialmente propuesta por Mitchell (Mitchell, 1975) y posteriormente descartada (Crofts, 2004b, 2004a) basándose en datos obtenidos en partículas submitocondriales y en organismos no eucariotas (Garland *et al.*, 1975). Hoy en día, se acepta que el CIII sea “autosuficiente” en la reducción en dos etapas de una molécula de CoQ, aunque existe un debate sobre la posibilidad real que una especie tan reactiva como una semiquinona pueda quedarse parada a la espera de otra molécula de CoQ para ser totalmente reducida.

La teoría que proponemos se muestra en la Figura 15A, donde un electrón proveniente de ETFDH serviría para reducir la semiquinona formada en el citocromo  $b_H$  durante la primera etapa del ciclo del CoQ. La ausencia de ETFDH provocaría que la semiquinona no fuera reducida, siendo por tanto una fuente de ROS. Además, el citocromo  $b_H$  estaría constitutivamente reducido (al igual que en presencia de antimicina A), provocando la pérdida de actividad del CIII.



**Figura 15. Teoría del ciclo del CoQ en la que interviene ETFDH.** (A) Modificación de la teoría del ciclo del CoQ original de Peter Mitchell (1975), en la cual dos electrones procedentes de una molécula de FADH<sub>2</sub> pasan a 2 semiquinonas reducidas previamente por el citocromo b<sub>H</sub> (sitio Q<sub>N</sub>) en el CIII, a través de ETFDH unido a UQCRC2, en dos pasos de reducción de 1 electrón. En el computo global de la reacción, 4H<sup>+</sup> son bombeados al espacio intermembrana debido a la oxidación completa de 2 moléculas de CoQH<sub>2</sub> en el sitio Q<sub>p</sub> y 4H<sup>+</sup> son extraídos de la matriz mitocondrial debido a la reducción de dos moléculas de semiquinona por medio de ETFDH. Además, la oxidación completa de FADH<sub>2</sub> resultaría en 2 citocromo c reducidos que continuarían su camino por la ETC. (B) Estructura tridimensional del ETFDH (verde) unido al CIII (gris), de manera que se encuentra cerca del citocromo b (amarillo) y UQCRCQ (proteína de unión a CoQ; en gris) para intervenir en el ciclo del CoQ. ETFDH se encuentra unida a la MMI mediante el dominio de unión a la membrana (DUM, en rojo) por donde se introduce el CoQ (morado). La imagen fue creada en Pymol utilizando el PDB: 5XTE (CIII) y 2GMH (ETFHD) y el programa de docking ClusPro.

El primer paso para demostrar esta hipótesis fue analizar el estado redox del CIII y en particular de su subunidad catalítica, el citocromo b. Para ello, monitoreamos las variaciones de la absorbancia específica del citocromo b reducido utilizando mitocondrias aisladas de mioblastos WT y ETFDH KO. La medida mostró que los mioblastos WT tenían el citocromo b constitutivamente oxidado y reducible tras la adición de ditionito (un agente reductor) (Figura 16A). Sin embargo, en los mioblastos ETFDH KO el citocromo b se encontraba reducido, siendo el efecto del ditionito casi nulo (Figura 16A).

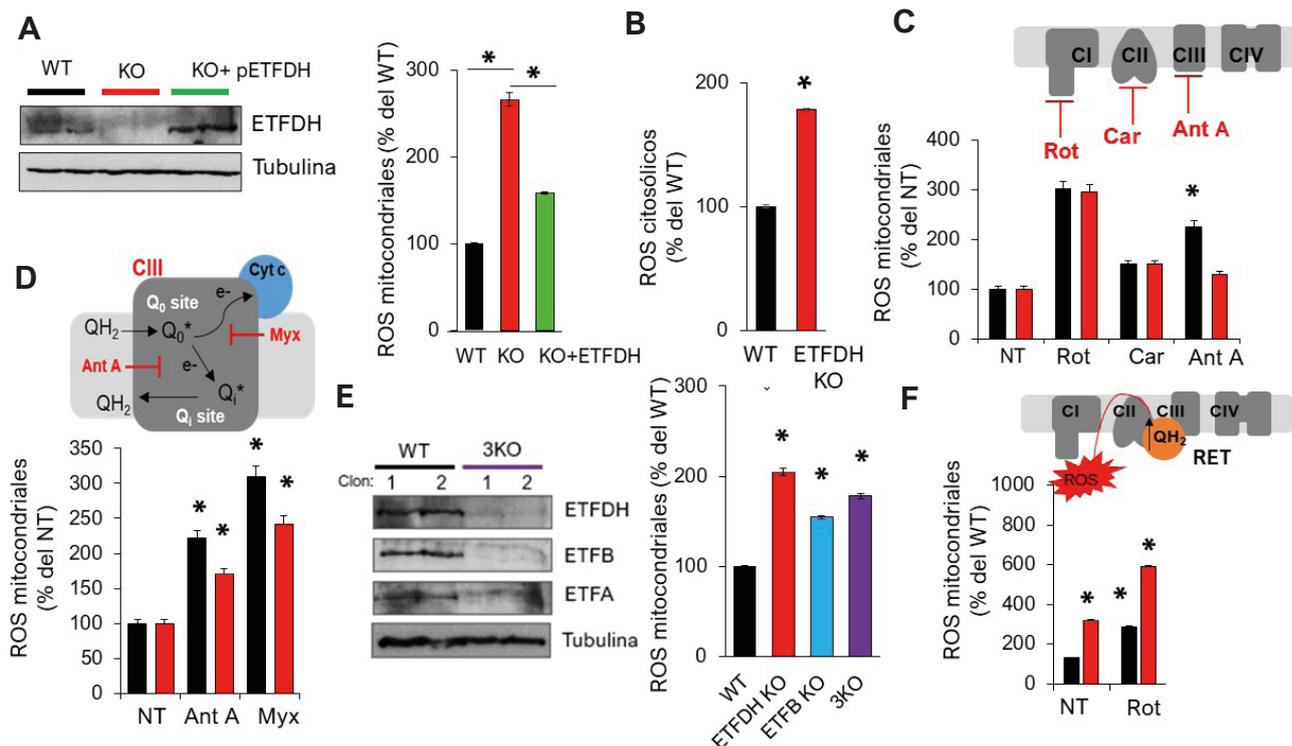


**Figura 16. El CIII se encuentra totalmente reducido al igual que el CoQ.** (A) Medida del estado de oxidación del citocromo b (A565). (B) Concentración de CoQ<sub>9</sub>H<sub>2</sub> y CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> en mioblastos WT (negro) y ETFDH KO (rojo), medido mediante HPLC y expresado como pmoles por mg de proteína. (C) Diagrama que utiliza los ratios de CoQ<sub>9</sub>H<sub>2</sub>/CoQ<sub>9</sub>, CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>/CoQ<sub>10</sub> y los ROS mitocondriales de los mioblastos en estudio. Se observa la relación de la forma reducida CoQH<sub>2</sub> con el incremento en la producción de ROS.

Por otro lado, mediante HPLC acoplada a espectrometría de masas, medimos los niveles de CoQ y CoQH<sub>2</sub> en líneas ETFDH KO y WT. La ausencia de ETFDH, que reduce el CoQ a CoQH<sub>2</sub>, debería dar lugar a la acumulación de su sustrato, la forma oxidada CoQ, como ocurre cuando se inhibe otra CoQ reductasa como DHODH (Mao *et al.*, 2021). Sin embargo, en la Figura 16B, se observa que los niveles de CoQ<sub>9</sub>H<sub>2</sub> (la forma predominante en roedores) son aproximadamente el doble en mioblastos ETFDH KO que en WT. Esto nos indica que el ratio CoQH<sub>2</sub>/CoQ y la producción de ROS es mayor en ETFDH KO (Figura 16C), de manera análoga a cuando el CIII está inhibido por el inhibidor myxothiazol (Turrens, Alexandre and Lehninger, 1985). Este resultado concuerda con los datos sobre el estado redox del citocromo b, que encontrándose ya reducido sería incapaz de oxidar el CoQ a CoQH<sub>2</sub>, bloqueando la actividad del CIII y llevando a la acumulación del CoQH<sub>2</sub> derivado de otras deshidrogenasas. Además, un aumentado ratio CoQH<sub>2</sub>/CoQ estaría generando un estrés reductivo, que podría explicar la elevada generación de ROS observada en ausencia de ETFDH (Figura 16C).

#### 4.8. La disfunción del CIII y, en menor medida, ETF están en el origen de la sobreproducción de ROS en mioblastos ETFDH KO

Hasta ahora, los datos obtenidos nos sugieren que en ausencia de ETFDH los electrones que entran a la ETC estuviesen desviando su camino hacia el O<sub>2</sub> en el CIII o por medio del CoQH<sub>2</sub>, generando O<sub>2</sub>• (Figura 17A), rápidamente convertido en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 17B). Sin embargo, nos propusimos comprobar que los ROS no proviniesen de otros complejos de la ETC o de la inhibición del catabolismo de sustratos. Demostramos que el aumento de ROS observado era dependiente de ETFDH, ya que la sobreexpresión de la proteína nativa en la línea ETFDH KO restauró los valores de ROS casi al nivel del control (Figura 17A).



**Figura 17. La producción de ROS originada por la falta de ETFDH sucede en CIII y no genera RET.** (A) ROS mitocondriales ( $O_2\bullet$ ) en mioblastos ETFDH KO (rojo) y WT (negro). La expresión de ETFDH en mioblastos ETFDH KO revierte parcialmente el aumento de ROS mitocondriales debido a la ausencia de ETFDH. (B) ROS citosólicos ( $H_2O_2$ ) en mioblastos ETFDH KO y WT. (C-D) ROS mitocondriales ( $O_2\bullet$ ) en mioblastos ETFDH KO y WT sin tratar (NT), o tratados con rotenona (Rot), carboxina (Car) antimicina A (Ant A) y myxothiazol (Myx). Los ROS producidos por la ausencia de ETFDH se generan a nivel del CIII. (E) ROS mitocondriales ( $O_2\bullet$ ) en mioblastos WT (negro), ETFDH KO (rojo), ETFB KO (azul) o en el triple KO (ETFA+ETFB+ETFDH). A la derecha el WB de la expresión de estas proteínas. (F) ROS mitocondriales en mioblastos ETFDH KO y WT en presencia de rotenona (Rot). El aumento de la producción de  $O_2\bullet$  causado por rotenona indica que no hay RET.

Lo siguiente fue estudiar cómo los inhibidores específicos de los complejos CI (rotenona), CII (carboxina) y CIII (antimicina A), afectaban a la producción de ROS en presencia y ausencia de ETFDH (Figura 17D). La rotenona y la carboxina produjeron un igual aumento de ROS tanto en WT como en ETFDH KO (Figura 17C), indicando que CI y CII no estaban implicados en la generación de ROS mediada por la ausencia de ETFDH. Sin embargo, la incubación con antimicina A produjo un aumento de ROS significativamente menor en las líneas ETFDH KO que en WT (Figura 17C), confirmando que el CIII estaba ya inhibido y generando ROS. Del mismo modo, el uso de otro inhibidor del CIII, el myxothiazol, que bloquea el complejo en el sitio  $Q_p$  llevó a una menor producción de ROS en ETFDH KO comparados a los controles (Figura 17D). Estos resultados nos indican que por lo menos uno de los sitios de producción de ROS en nuestro modelo es el CIII.

Por otro lado, es sabido que la FAO en músculo esquelético puede ser una fuente importante de ROS y se ha especulado que tanto ETF como ETFDH (los últimos aceptores de electrones

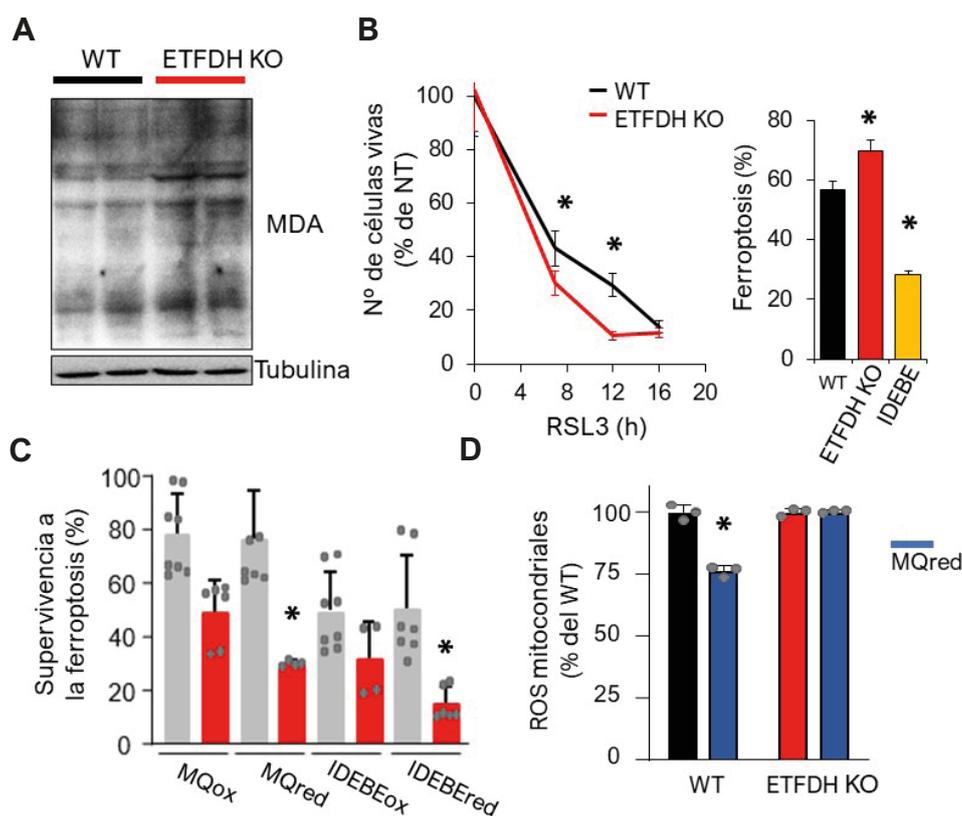
de la FAO) sean responsables de la producción de ROS mitocondriales (Seifert *et al.*, 2010; Perevoshchikova *et al.*, 2013). Para valorar el peso de ETF en la generación de ROS en ausencia de ETFDH (a pesar de tener la FAO prácticamente abolida; ver Figura 8B), se midieron niveles de  $O_2\cdot$  en mioblastos deficientes por ETFB y en el triple KO de ETFA/ETFB/ETFDH (3KO) (Figura 17E). La ausencia de cualquier subunidad del complejo (ETFA, ETFB, ETFDH) generó un incremento similar en los niveles de ROS (Figura 17E). Sin embargo, el aumento de ROS en el 3KO fue significativamente menor que en la línea ETFDH KO (Figura 17E), indicando que en nuestro modelo ETFA y ETFB pueden representar sitios de producción de ROS en ausencia del aceptor final ETFDH.

Se ha planteado que un estrés reductor provocado por un alto ratio  $CoQH_2/CoQ$  puede generar el transporte inverso de electrones (RET) hacia el CI, produciendo ROS dependientes de rotenona y llevando a la degradación del mismo CI (Murphy, 2009; Guarás *et al.*, 2016). Sin embargo, no se observó degradación del CI en ausencia de ETFDH (Figura 12C) y el tratamiento con rotenona no disminuyó la producción de ROS en ETFDH KO (Figura 17F), indicando que pese a la acumulación de  $CoQH_2$ , en nuestro modelo no se está generando RET.

#### 4.9. La falta de ETFDH causa peroxidación lipídica y susceptibilidad a ferroptosis

Es sabido que la excesiva producción de ROS en la proximidad de las membranas celulares puede favorecer la peroxidación lipídica (Su *et al.*, 2019). De manera acorde, los ROS mitocondriales generados como consecuencia de la ausencia de ETFDH generaron mayores niveles de malonil-dialdehído (MDA), producto de la peroxidación lipídica, comparado con los WT (Figura 18A). En línea con esto, el tratamiento con RSL3, un inhibidor de la glutatión peroxidasa 4 (GPX4) que induce ferroptosis, produce un aumento de la muerte celular en ETFDH KO en comparación con la muerte observada en WT (Figura 18B), sugiriendo que la falta de ETFDH confiere una mayor susceptibilidad a la ferroptosis debido al incremento de ROS.

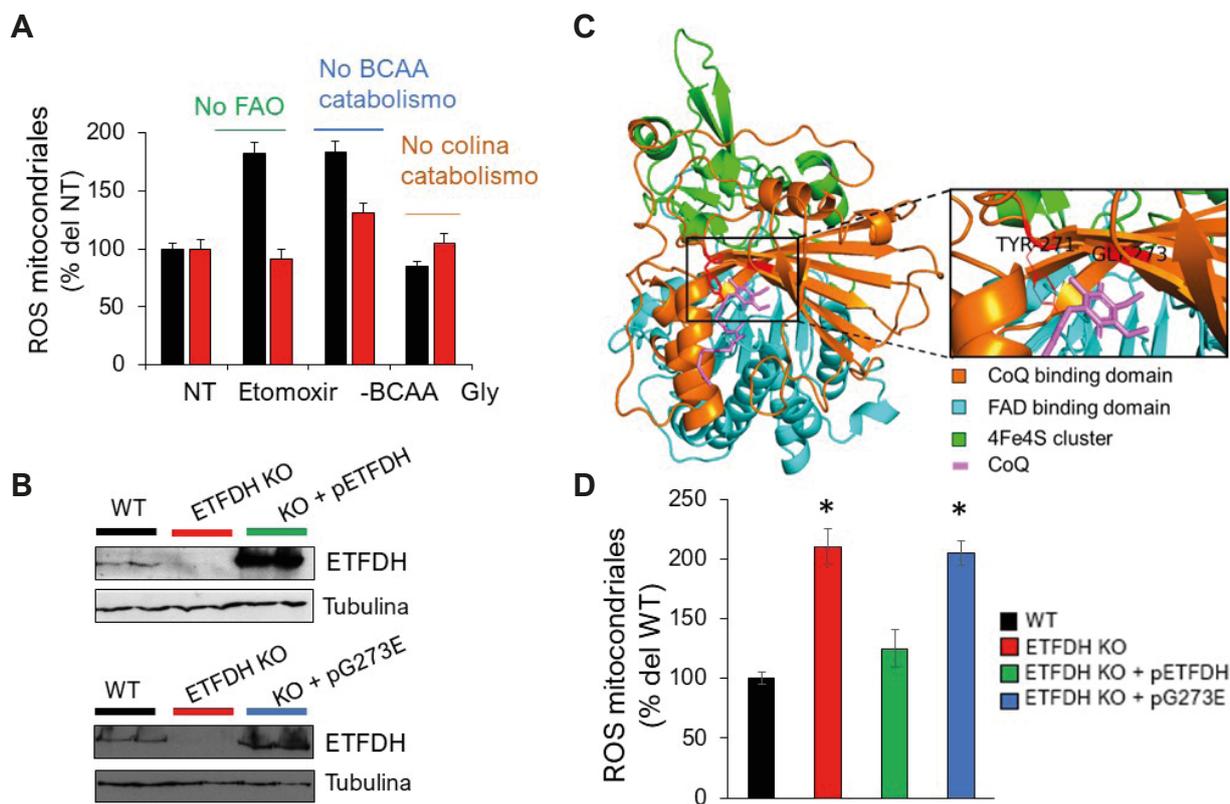
Los análogos del CoQ, mitoQ (MQ) y idebenone (IDEBE) son conocidos inhibidores de la ferroptosis (Mao *et al.*, 2021). Por ello, quisimos comprobar la capacidad de estos compuestos de revertir la muerte celular en líneas ETFDH KO y WT. Si bien tanto el MQ como el IDEBE protegieron parcialmente frente de la muerte inducida por RSL3 (Figura 18C), su efecto fue reducido en ausencia de ETFDH (Figura 18C). Además, y en línea con el elevado ratio  $CoQH_2/CoQ$  observado en los mioblastos ETFDH KO (Figura 16), las formas reducidas de MQ y IDEBE (MQred y IDEBERed) mostraron una capacidad aún menor de prevenir la ferroptosis (Figura 18C), sugiriendo que en ausencia de ETFDH incrementar los niveles de  $CoQH_2$  pueda no ser una buena estrategia para apantallar el estrés oxidativo. En línea con esta hipótesis, el MQ reducido demostró reducir los niveles de ROS en mioblastos controles, pero no en ETFDH KO (Figura 18C).



**Figura 18. La ausencia de ETFDH provoca peroxidación lipídica y ferroptosis.** (A) Western blot de los niveles de malondialdehído (MDA), un derivado de la peroxidación lipídica, en mioblastos WT y ETFDH KO. Se muestra la expresión de la tubulina como control de carga. (B) Ensayo de viabilidad celular en respuesta al tratamiento con RSL3, un potente inductor de muerte por ferroptosis, en mioblastos WT y ETFDH KO. La ausencia de ETFDH empeora la toxicidad de RSL3. El tratamiento con 10  $\mu$ M del antioxidante análogo del CoQ idebenone (IDEBE) protege parcialmente frente a ferroptosis. (C) Efecto de las formas reducida y oxidada de los análogos del CoQ, MitoQ (MQ) e IDEBE, sobre la muerte por ferroptosis en mioblastos WT y ETFDH KO. En general, estos antioxidantes tienen menor eficacia en la línea ETFDH KO. Además, la forma reducida protege significativamente menos frente a ferroptosis en esta línea celular. (D) Análogamente, la forma reducida MQred apantalla la producción de ROS mitocondriales en mioblastos WT, pero no en los ETFDH KO.

#### 4.10. El flujo de electrones a través de la ruta de ETFDH garantiza la homeostasia redox

Como he comentado anteriormente, se ha especulado que el mismo catabolismo de ácidos grasos, colina o BCAA pueda producir un aumento de ROS debido a que las DFDs que intervienen en la FAO o en la oxidación de colina y BCAA puedan provocar una fuga de electrones hacia el  $O_2$  antes de su entrada en la ETC (St-Pierre *et al.*, 2002; Hoffman and Brookes, 2009; Tahara, Navarete and Kowaltowski, 2009). Para estudiar esta posibilidad, cultivamos los mioblastos WT y ETFDH KO (i) en presencia de etomoxir, un inhibidor de la FAO mitocondrial, (ii) en ausencia de BCAA en el medio de cultivo (inhibiendo su catabolismo) o (iii) en presencia de glicina, producto final del metabolismo de la colina e inhibidor de su metabolismo. Si bien la inhibición del metabolismo de la colina no tuvo un gran impacto (Figura 19A), la ausencia de BCAA y la inhibición de la FAO con etomoxir produjeron un significativo aumento en la producción de ROS en mioblastos WT



**Figura 19. El flujo de electrones hacia la ETC a través de ETFDH es necesario para mantener la homeostasia redox mitocondrial.** (A) ROS mitocondriales en mioblastos WT y ETFDH KO cultivados en presencia de etomoxir (no FAO), en ausencia de BCAA (no catabolismo de BCAA) o en presencia de glicina (no catabolismo de la colina). (B) Western blot de la expresión de ETFDH y del control de carga tubulina en las líneas WT, ETFDH KO, ETFDH KO +pETFHD (proteína nativa) y ETFDH KO + pG273E (proteína mutada). (C) Estructura tridimensional de ETFDH donde se observan sus tres dominios funcionales y las mutaciones introducidas (G273E y Y271A). Además, una molécula de CoQ (rosa) se encuentra unida a su la estructura (Imagen generada en Pymol). (D) ROS mitocondriales en las líneas indicadas en leyenda. La mutación G273E es suficiente para reproducir el fenotipo oxidativo de la falta de ETFDH.

(Figura 19A). Contrariamente, los mioblastos ETFDH KO tratados con etomoxir o cultivados en ausencia de BCAA mostraron menores incrementos (o nullos) de ROS respecto a los mioblastos ETFDH KO no tratados (Figura 19A). Estos resultados, indican que la total inhibición de la FAO o del catabolismo de BCAA genera estrés oxidativo, siendo la ausencia del flujo de electrones a través de la ruta de ETF-ETFHD una causa de ROS mayor que el catabolismo de los substratos. El hecho de que la ausencia de ETFDH o de cualquier substrato de las rutas mediadas por ETFDH tiene como resultado un incremento de ROS supone otro hecho paradójico según las funciones clásicas de ETFDH (además del elevado ratio  $CoQH_2/CoQ$  en ausencia de una CoQ reductasa) que, sin embargo, apoya la implicación directa de ETFDH en el ciclo del CoQ a nivel del CIII.

De hecho, nos preguntamos si la necesidad de un flujo de electrones a través de la ruta de ETFDH para el mantenimiento de la homeostasia redox de las células musculares tuviese a que ver con

el rol de ETFDH en modular el ciclo del CoQ. Una de las principales consecuencias observadas de la pérdida de ETFDH fue la incapacidad del CIII de oxidar el  $\text{CoQH}_2$ , lo que conllevaba a una aumentada producción de ROS. Como he expuesto anteriormente, según nuestra hipótesis, ETFDH podría participar en el ciclo del CoQ cediendo un electrón proveniente del  $\text{FADH}_2$  a la semiquinona. En este sentido, dos aminoácidos del DUQ de ETFDH están altamente conservados y son necesarios para la unión entre ETFDH y el CoQ: Y271 y G273 (Zhang, Frerman and Kim, 2006). El aminoácido Y271 es necesario para establecer un puente de hidrógeno con el O4 del CoQ, por lo que lo reemplazamos un aminoácido no polar como la alanina (Y271A). Este cambio supuso un cambio de la carga polar del 12,6% RSA al 3,7% RSA (<http://missense3d.bc.ic.ac.uk/>), sin más daños estructurales. Por otro lado, la ausencia de una cadena pesada en G273 permite que la cabeza del CoQ entre completamente en la estructura de ETFDH (Zhang, Frerman and Kim, 2006), por ello, modificamos este aminoácido por un glutamato (G273E), provocando el bloqueo de la entrada de la cabeza del CoQ y un espaciado de la cavidad de 35.64 Å (<http://missense3d.bc.ic.ac.uk/>). Estas mutaciones produjeron una proteína aún plegada y reconocible por western blot (Figura 19B), pero incapaz de unirse al CoQ. De manera interesante, la sobreexpresión de la proteína nativa pero no de la proteína mutada (Figura 19B) redujo los ROS en ETFDH KO, demostrando (i) que una mutación en el sitio de unión al Q es suficiente para reproducir el fenotipo de total ausencia de la proteína y (ii) que el aumento en la generación de ROS depende de la capacidad de ETFDH de unirse al CoQ.

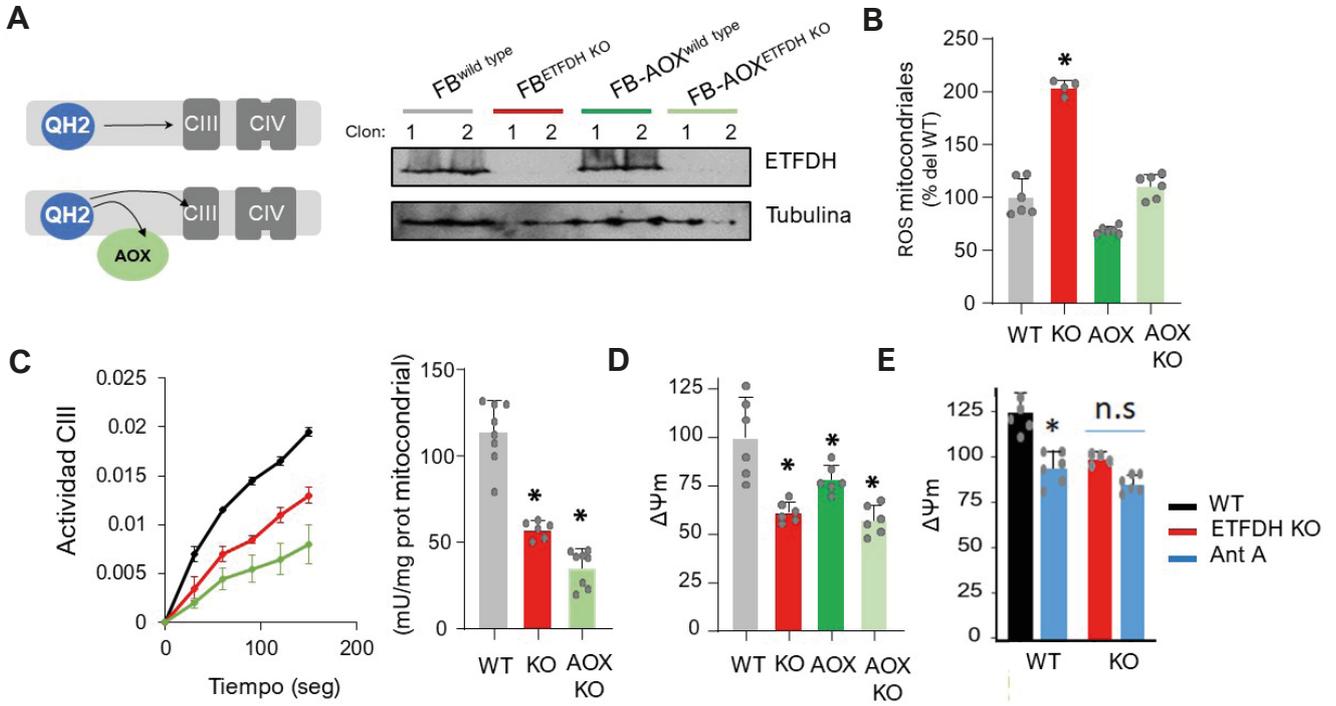
#### 4.11. La expresión de una oxidasa alternativa exógena (AOX) revierte sólo parcialmente el fenotipo generado por la ausencia de ETFDH en fibroblastos de ratón

La utilización de una oxidasa alternativa exógena (AOX), capaz de oxidar el  $\text{CoQH}_2$  y producir  $\text{H}_2\text{O}$ , ha sido utilizada para reducir los niveles de  $\text{CoQH}_2$  en células KO para el CIII, el CIV o el citocromo c (Guarás *et al.*, 2016). De igual manera, para corroborar la importancia de la acumulación de  $\text{CoQH}_2$  en ausencia de ETFDH sobre el fenotipo observado, utilizamos una línea de fibroblastos de ratón que expresa constitutivamente la AOX de *Emericella nidulans* (Perales-Clemente *et al.*, 2008) (FB-AOX<sup>wild type</sup>) y los correspondientes controles (FB<sup>wild type</sup>) (Figura 20A). El primer paso fue generar mediante tecnología CRISPR/Cas9 las líneas KO para ETFDH y medir los ROS mitocondriales en las 4 líneas generadas (FB<sup>wild type</sup>, FB-AOX<sup>wild type</sup>, FB<sup>ETFDH KO</sup> y FB-AOX<sup>ETFDH KO</sup>) (Figura 20A). De acuerdo con los datos obtenidos en mioblastos, observamos que los fibroblastos FB<sup>ETFDH KO</sup> presentaban un aumento significativo de ROS en comparación con FB<sup>wild type</sup> (Figura 20B). Sin embargo, la presencia de AOX fue suficiente para reducir los ROS generados por falta de ETFDH casi a niveles de los FB-AOX<sup>wild type</sup> (Figura 20B). Este resultado nos indica: (i) que la AOX está eficientemente oxidando el  $\text{CoQH}_2$ , previniendo la formación de ROS y (ii) que la acumulación de ROS observada en ausencia de ETFDH es causada, al menos parcialmente, por la acumulación de  $\text{CoQH}_2$ .

De acuerdo con los datos obtenidos en mioblastos (Figura 14), los FB<sup>ETFDH KO</sup> presentaban el CIII inhibido (Figura 20C), siendo su actividad enzimática significativamente menor que la observada en mitocondrias aisladas de la línea FB<sup>wild type</sup> y demostrando que también en esta línea celular

RESULTADOS

la ausencia de ETFDH es necesaria para la correcta actividad del CIII. Cabe destacar que, en este caso, la presencia de AOX no fue suficiente para revertir la inhibición del CIII y que las mitocondrias aisladas de la línea FB-AOX<sup>ETFDH KO</sup> presentaron una reducida actividad CIII (Figura 20C). En su conjunto, estos datos sugieren que la inhibición del CIII mediada por la ausencia de ETFDH es independiente de los niveles de CoQH<sub>2</sub> (y, por tanto, de ROS).



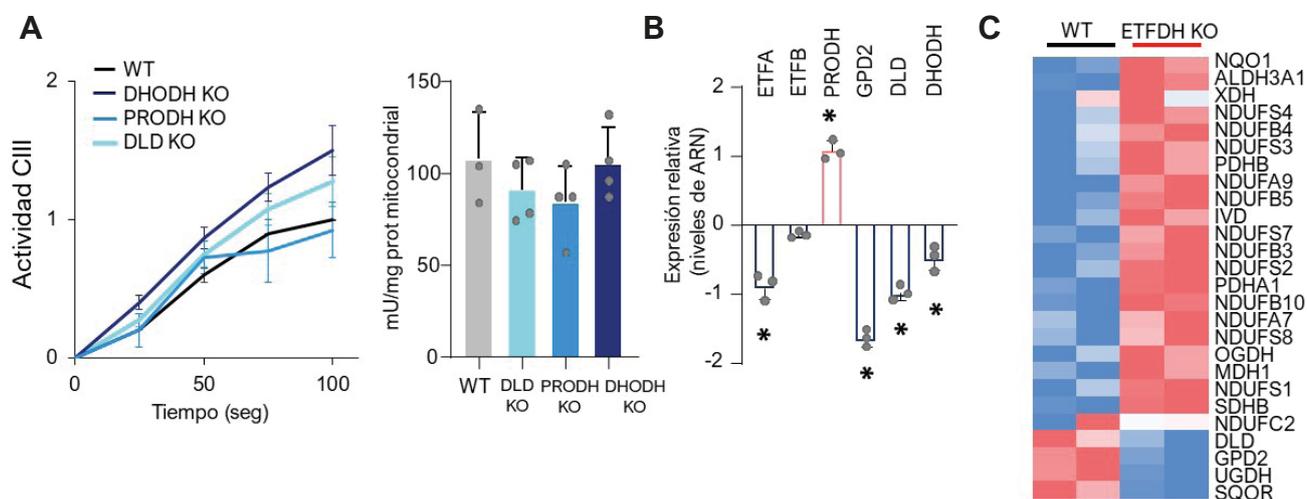
**Figura 20. La expresión de una oxidasa alternativa AOX revierte el incremento de ROS que produce la pérdida de ETFDH, pero no restaura la actividad del CIII.** (A) Esquema que ilustra el modo de acción de la AOX. A la derecha, WB de la expresión de ETFDH y el control de carga tubulina en las líneas de fibroblastos de ratón WT (FB<sup>wild type</sup>), FB<sup>ETFDH KO</sup>, AOX<sup>wild type</sup> y AOX<sup>ETFDH KO</sup>. (B) Medida de ROS mitocondriales en FB<sup>wild type</sup>, FB<sup>ETFDH KO</sup>, AOX<sup>wild type</sup> y AOX<sup>ETFDH KO</sup>. La presencia de AOX previene la formación de ROS (C) Actividad del CIII en FB<sup>wild type</sup>, FB<sup>ETFDH KO</sup>, AOX<sup>wild type</sup> y AOX<sup>ETFDH KO</sup>. La presencia de AOX no revierte la inhibición del enzima. (D) Medida del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) en FB<sup>wild type</sup>, FB<sup>ETFDH KO</sup>, AOX<sup>wild type</sup> y AOX<sup>ETFDH KO</sup>. (E) Efecto de la antimicina A sobre el  $\Delta\Psi_m$  en FB<sup>wild type</sup> y FB<sup>ETFDH KO</sup>.

De acuerdo con este último resultado, el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) resultó significativamente menor en la línea FB<sup>ETFDH KO</sup> que en la línea FB<sup>wild type</sup> (Figura 20D). Esta reducción del  $\Delta\Psi_m$  también se observó en los FB-AOX<sup>wild type</sup>, como consecuencia de la propia acción de la AOX que priva al CIII de los electrones de su sustrato CoQH<sub>2</sub>. Aun así, la línea FB-AOX<sup>ETFDH KO</sup> mostró una caída del  $\Delta\Psi_m$  equiparable a la FB<sup>ETFDH KO</sup>, significativamente más bajo que en los FB-AOX<sup>wild type</sup> (Figura 20D), lo cual confirma que restablecer los niveles de CoQH<sub>2</sub> y ROS no es suficiente para el mantenimiento del  $\Delta\Psi_m$ , siendo ETFDH necesario para la homeostasia de la OXPHOS. En línea con estos resultados, la antimicina A redujo el  $\Delta\Psi_m$  de FB<sup>wild type</sup> a los niveles de FB<sup>ETFDH KO</sup> (Figura 20E) y, sin embargo, no tuvo ningún efecto en FB<sup>ETFDH KO</sup> (Figura 20E), demostrando una vez más, que la inhibición del sitio Q<sub>N</sub> del CIII con antimicina A tiene efectos muy parecidos a la falta de ETFDH.

#### 4.12. La inhibición del CIII es un efecto específico de la ausencia de ETFDH y no ocurre en otras líneas de DFDs KO

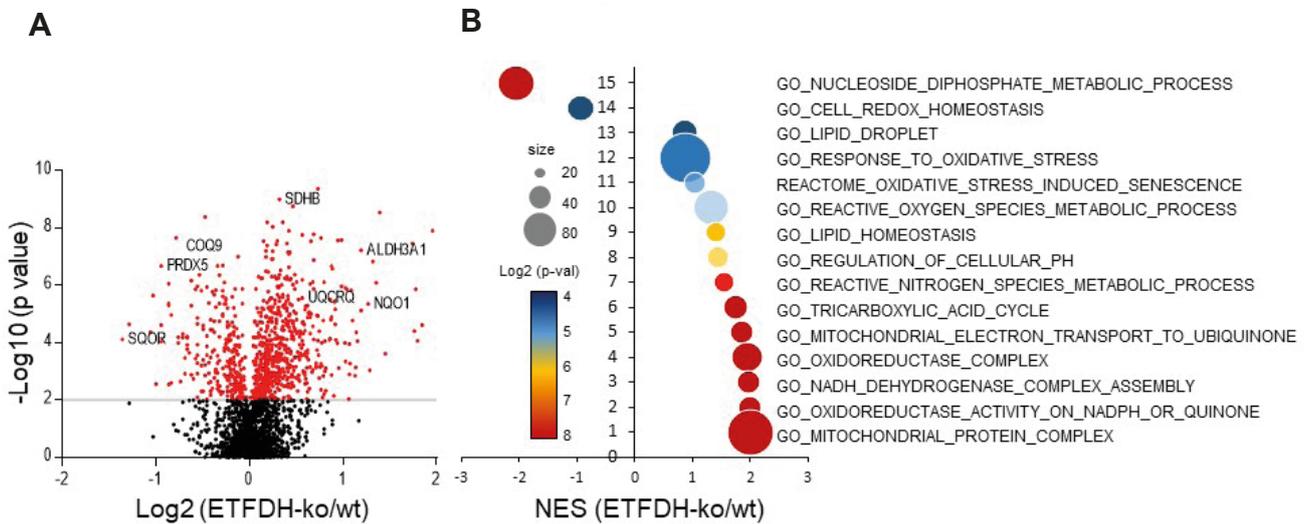
Una vez demostrado que la ausencia de ETFDH inhibe la actividad del CIII al menos en dos tipos celulares distintos, quisimos comprobar si este fuese un efecto específico de ETFDH o si la ausencia de otras DFDs provocaba la misma disfunción. Para ello, medimos la actividad del CIII en mitocondrias aisladas de mioblastos PRODH KO, DLD KO y DHODH KO. A pesar del aumento de ROS similar al de las ETFDH KO (Figura 7B), ninguna de estas líneas presentó diferencias en la actividad del CIII en comparación con WT (Figura 21A). Este resultado refuerza la conclusión de que la relación entre la actividad del CIII y ETFDH recae en su directa interacción y no está asociada a la producción de ROS o a su común capacidad de reducir el CoQ.

Sin embargo, y de acuerdo con el aumento del ratio  $\text{CoQH}_2/\text{CoQ}$  (Figura 16), la pérdida de ETFDH tiene como efecto compensatorio la alteración de la expresión de otras DFDs (Figura 21B y C), probablemente con la finalidad de reducir los niveles de  $\text{CoQH}_2$ . De hecho, los niveles de ARN en ETFDH KO de ETFA, GPD2, DLD y DHODH, se encontraron significativamente reducidos en comparación con los presentes en WT (Figura 21B). Como excepción a esto, PRODH se encontró sobre regulada en ETFDH KO con niveles de ARN significativamente superiores a los controles. Para confirmar las alteraciones en el proteoma de los mioblastos deficientes de ETFDH, realizamos un estudio proteómico cuantitativo (TMT) de miocitos ETFDH KO frente a WT (Figura 21C y 22).



**Figura 21. La inhibición del CIII es un efecto específico de ETFDH.** La ausencia de ETFDH tiene efectos adaptativos en las células, modificando la expresión de otras CoQ reductasas. (A) Medida de la actividad del CIII en mioblastos PRODH KO, DLD KO y DHODH KO frente a WT. No se observan diferencias en la actividad enzimática del CIII. (B) Expresión relativa de los niveles de RNA de las deshidrogenasas ETF A, ETF B, PRODH, GPD2, DLD y DHODH en mioblastos ETFDH KO frente a WT (medidos por RT-PCR). (C) Representación de la variación de la expresión de diferentes deshidrogenasas en la línea ETFDH KO frente a WT (medida por proteómica cuantitativa TMT). La intensidad de color correlaciona con valores más (rojo) o menos (azul) elevados de expresión.

Los resultados confirmaron los datos ya obtenidos por RT-PCR, detectando profundas alteraciones en la expresión de diferentes deshidrogenasas. En particular, mostraron que los mioblastos ETFDH KO tienen una limitada expresión de DLD, GPD2 y SQOR (Figura 21C), que catalizan la reducción de CoQ a CoQH<sub>2</sub>, mientras sobre expresan gran parte de las subunidades del CI en comparación con los WT (Figura 21C). Especialmente, observamos la sobreexpresión de las subunidades del CI que forman un brazo hidrofílico en la matriz donde se oxida el NADH y las subunidades que contienen los centros FMN y Fe-S que participan en el transporte de electrones (subunidades NDUFS1, NDUFS2, NDUFS7, NDUFS8, NDUFS3, NDUFS4), pero también otras estructuras accesorias como NDUFB4, NDUFB3, NDUFB5, NDUFB10, NDUFC2, NDUF7 y NDUFB9. Esta sobreexpresión del CI concuerda con los datos obtenidos por western blot y mostrados en la Figura 12. Además, la expresión de la piruvato deshidrogenasa (PDH) y la subunidad catalítica del CII, SDHB, se encontraron aumentadas en ETFDH KO frente a WT, probablemente para compensar la disfunción de la ETC que se produce en ausencia de ETFDH (Figura 21C).



**Figura 22. Análisis proteómico de mioblastos ETFDH KO vs WT.** (A) Grafica tipo volcano de las proteínas identificadas (2441). En rojo las significativamente sobreexpresadas o silenciadas en mioblastos ETFDH KO frente a WT. (B) Análisis bioinformático GSEA de los resultados del estudio proteómico. Se identifican 15 rutas significativamente alteradas en mioblastos ETFDH KO (activadas, NES positivo; inhibidas, NES negativo).

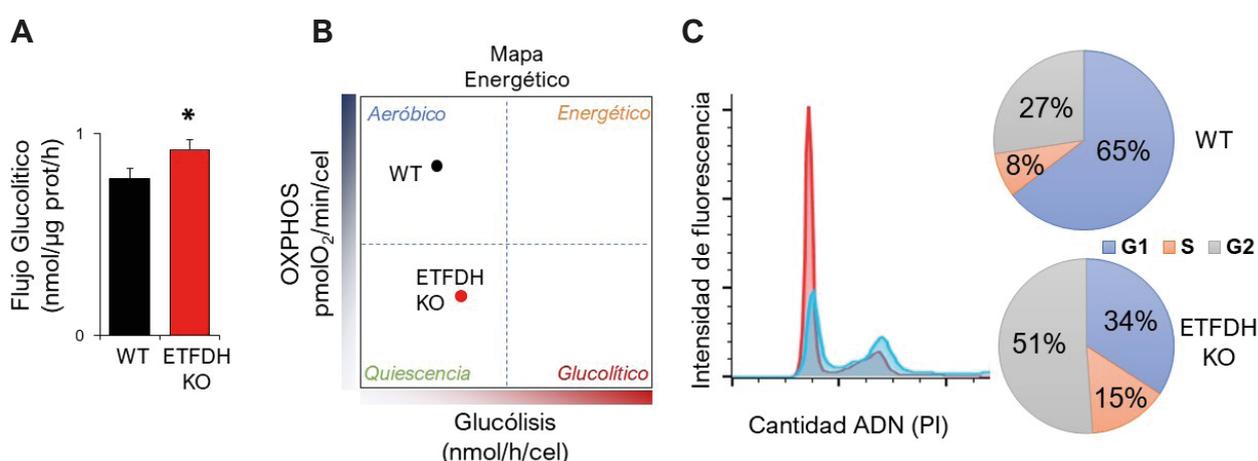
En conjunto, estos resultados nos sugieren que en ausencia de ETFDH podría existir un pool de deshidrogenasas que introducen electrones a la ETC por medio de FADH<sub>2</sub> cuya expresión disminuye y otro pool que introducen electrones procedentes del NADH cuya expresión aumenta en un intento de restablecer el flujo de electrones a través de la ETC.

Por otro lado, nos llamó la atención que las alteraciones mayores fuesen relativas a la expresión de proteínas implicadas en reducir los ROS observados en la línea ETFDH KO. Una de las proteínas más sobreexpresadas fue la NAD(P)H ubiquinona oxidoreductasa (NQO1) (Figura 21C y 22). Esta enzima, que tiene FAD como cofactor, actúa como una CoQ reductasa implicada en vías

de detoxificación del estrés oxidativo y es inducible por cambios en el estado redox celular (Ross and Siegel, 2017). Por el contrario, la proteína cuya expresión se vio más disminuida fue la SQOR, implicada también en el metabolismo del glutatión. Estos datos pusieron de manifiesto cómo en ausencia de ETFDH el proteoma de un mioblasto experimenta alteraciones que tienen como finalidad minimizar la disfunción OXPHOS y compensar los desequilibrios en pares redox y generación de ROS mitocondriales.

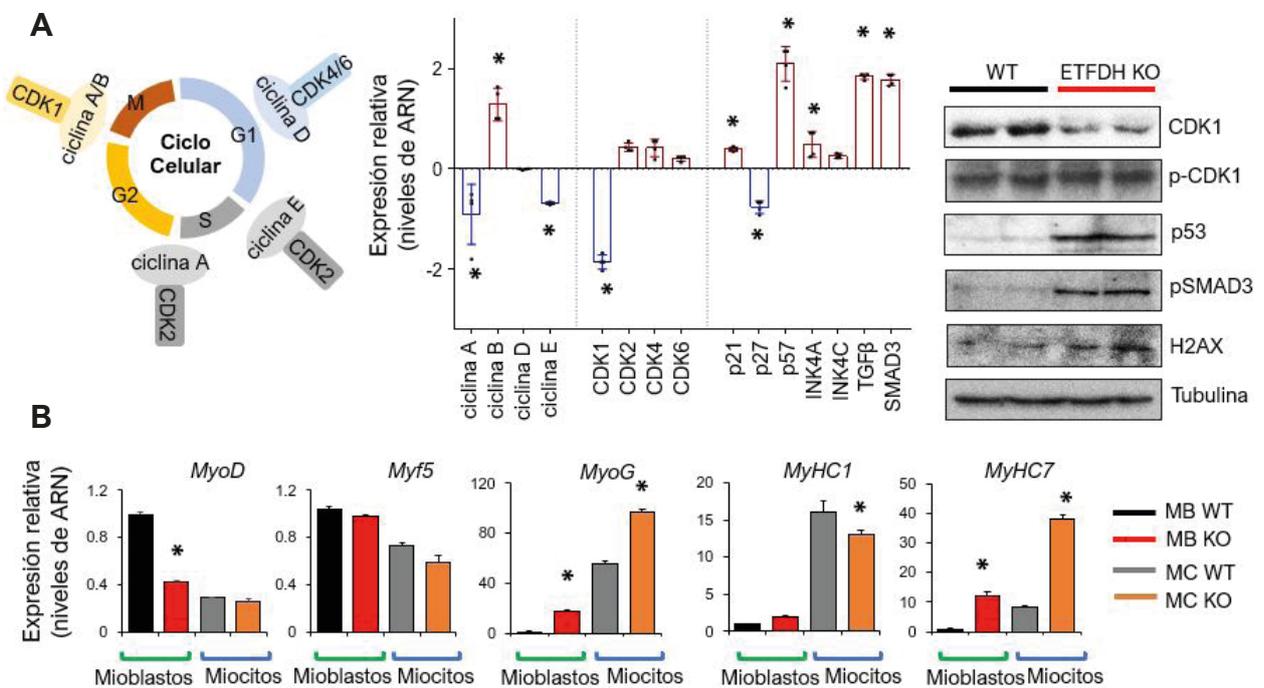
#### 4.13. La disfunción mitocondrial produce la parada del ciclo celular en G2 y una miogénesis aberrante

La glucólisis y la OXPHOS se complementan, en el así llamado Efecto Warburg (Warburg, 1925; Liberti and Locasale, 2016). Ante la disfunción mitocondrial mediada por ETFDH, los mioblastos ETFDH KO muestran una tendencia a una mayor producción de lactato (Figura 11C). Sin embargo, esta ligera subida en el flujo glucolítico (Figura 23A) no es suficiente para compensar la disfunción de la OXPHOS y la célula se queda energéticamente quiescente (Figura 23B). Los procesos de provisión energética de la célula y la producción de ROS tienen un impacto directo sobre la progresión del ciclo celular. Mientras que la fase G1 depende ampliamente de la OXPHOS, la fase reductora G2/M es dependiente de la glucólisis aerobia e independiente del consumo de O<sub>2</sub> (Chen *et al.*, 2007). Un daño oxidativo excesivo puede parar el ciclo en esta fase. Dado que nuestro modelo presenta alteraciones bioenergéticas y redox significativas, decidimos analizar el ciclo celular. Los mioblastos ETFDH KO mostraron una marcada reducción de la fase G1 en comparación con WT, provocando una detención del ciclo celular en la fase G2/M (Figura 23C), compatible con el aumento de ROS detectado en esta línea (Figura 7).



**Figura 23. Los mioblastos ETFDH KO presentan una parada del ciclo celular.** (A) Flujo glucolítico en mioblastos ETFDH KO y WT. La ausencia de ETFDH incrementa ligeramente la producción de lactato. (B) Mapa energético de los mioblastos WT y ETFDH KO. No obstante, el leve incremento en la glucólisis aerobia, las células ETFDH KO presentan un perfil quiescente. (C) Medida del ciclo celular mediante citometría de flujo marcando el ADN con IP (ioduro de propidio). La línea ETFDH KO presenta una parada del ciclo celular en fase G2/M.

El ciclo celular de los mamíferos está controlado por una subfamilia de quinasas dependientes de ciclinas (CDK), cuya actividad está modulada por varios activadores (ciclinas) e inhibidores (Ink4 e inhibidores Cip/Kip). Estudios genéticos recientes indican que mientras CDK2, CDK4 y CDK6 no son esenciales para el ciclo celular de los mamíferos, CDK1, que controla la última fase de la división celular, es suficiente para impulsar el ciclo celular en todos los tipos de células (Malumbres and Barbacid, 2009). Para comprobar las causas de parada del ciclo celular en nuestro modelo medimos la expresión y los niveles de ARN de las principales proteínas que intervienen en la progresión del ciclo. Mediante RT-PCR comprobamos que la expresión relativa de CDK1 se encuentra significativamente reducida en ETFDH KO en comparación con WT. Este dato se corroboró posteriormente mediante western blot, comprobando, además, que la reducción de los niveles de ARN correlaciona con una reducción de la expresión proteica, no viéndose afectada la fosforilación de CDK1 (Figura 24A). Sorprendentemente, observamos una aumentada expresión relativa de la ciclina B en ETFDH KO, que podría entenderse por el mayor número de células que se encuentran en su fase de acción (fase G2/M). Esto también ha sido observado en miocitos con un arresto del ciclo celular en fase S y G2/M (Novitch *et al.*, 1996). Por otro lado, observamos por western blot que p53, que actúa como represor del ciclo celular favoreciendo la expresión de proteínas inhibidoras bajo situaciones de estrés metabólico (Vousden and Ryan, 2009), se encuentra altamente sobrepresado en ETFDH KO. Esto concuerda con el incremento observado en PRODH en esta línea celular (Figura 21A), ya que PRODH es uno de los 14 genes más expresados dependientes de p53 (Polyak *et al.*, 1997).



**Figura 24. La pérdida de ETFDH produce un fenotipo senescente y una miogénesis aberrante.**

(A) Niveles de ARN medidos mediante RT-PCR de los principales moduladores del ciclo celular y western blot de la expresión de proteínas implicadas en rutas de respuesta al daño del ADN. (B) Niveles de ARN medidos mediante RT-PCR de los principales reguladores de la diferenciación del músculo esquelético en mioblastos y miocitos WT y ETFDH KO.

Además, inhibidores del ciclo celular como INK4A y INK4C (que bloquean la CDK4/6), p21 y p57, se encontraron sobreexpresados en ETFDH KO (Figura 24A). Este último (p57), es un reconocido inhibidor de la proliferación celular y su activación está asociada al mantenimiento de una vida no proliferativa y a la diferenciación celular (Kavanagh and Joseph, 2011). Así mismo, tanto p21 como p53 son conocidos marcadores de senescencia celular (Chan *et al.*, 2005; Passos *et al.*, 2010), sugiriendo que el daño oxidativo mediado por ETFDH pueda ralentizar la proliferación de los mioblastos ETFDH KO favoreciendo un fenotipo senescente.

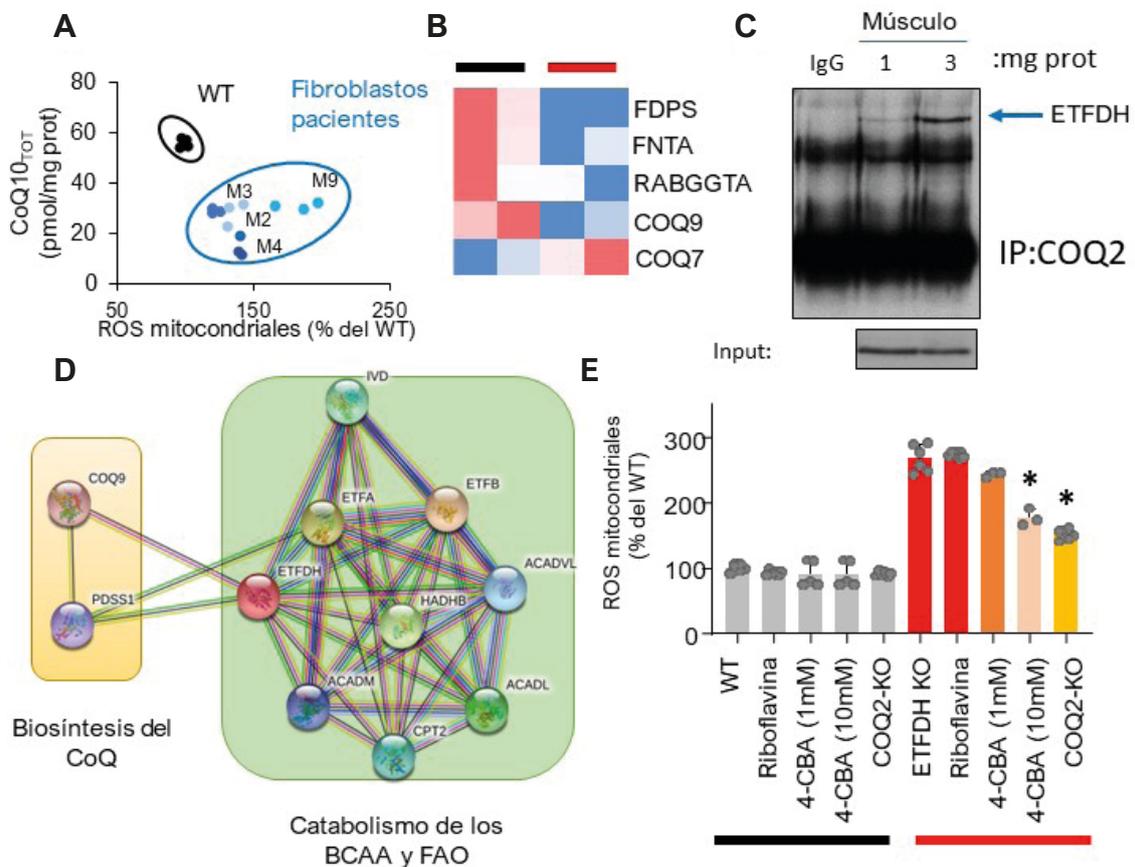
Otro mecanismo que regula la homeostasis del ciclo celular es la activación de las rutas antagonicas de Notch y TGF- $\beta$ /pSMAD3. La activación de TGF- $\beta$ /pSMAD3 promueve la expresión de los inhibidores del ciclo celular INK4B, INK4A, p21 y p27 en células de musculares dañadas (Carlson, Hsu and Conboy, 2008). Por ello, analizamos los niveles relativos de ARN de TGF- $\beta$  y pSMAD3, encontrándose significativamente aumentados en ETFDH KO comparados a los controles (Figura 24A). Además, se comprobó la expresión proteica por western blot de pSMAD3 que estaba aumentada en ETFDH KO (Figura 24A), indicándonos que la vía de señalización TGF- $\beta$ /pSMAD3 está implicada en la parada del ciclo observada.

Tanto la expresión de p53 como la activación de la vía de señalización TGF- $\beta$ /pSMAD3 se activan en las células como respuesta a un daño celular oxidativo y/o daño en el ADN. En estas condiciones, otro evento conocido es la expresión de H2AX, una variante de la histona H2A que facilita la reparación del ADN. En nuestro modelo, la expresión de H2AX se encuentra aumentada (Figura 24A), sugiriendo que el arresto del ciclo celular podría estar asociado a un daño en el genoma provocado por los elevados ROS mitocondriales generados en ausencia de ETFDH (Figura 7).

Los elevados niveles de ARN de p57 y las perturbaciones observadas en ETFDH KO nos sugerían un posible fallo en la diferenciación. Por ello, cultivamos los mioblastos WT y ETFDH KO con medio de diferenciación durante 7 días y realizamos una RT-PCR para medir los niveles de expresión relativa de los marcadores de diferenciación de mioblastos a miocitos a día 0 y día 7 (Figura 24B). En particular, miramos la expresión de los marcadores de “stemness” MyoD y Myf5, que se expresan en mioblastos y cuya expresión se pierde durante la diferenciación, y la de MyoG, MyHC1 y MyHC7, que son marcadores de miocitos diferenciados. Los mioblastos ETFDH KO muestran una reducción casi total de MyoD (Figura 24B), evento que se ha asociado con una diferenciación y miogénesis aberrante (Langley *et al.*, 2002; Kataoka *et al.*, 2003). Sin embargo, los mioblastos y miocitos ETFDH KO presentan alteraciones en los niveles de MyHC7 MyHC1 y un aumento de MyoG, en comparación con los WT (Figura 24B), lo que sugiere una diferenciación temprana y aberrante.

**4.14. ETFDH interacciona con la maquinaria de la biosíntesis de CoQ y podría tener un papel en la regulación de esta ruta**

A pesar de las alteraciones en el ciclo celular observadas en mioblastos ETFDH KO, fibroblastos humanos derivados de pacientes que padecen acidurias metabólicas (MADD) por mutaciones en los genes de ETFDH y otras deshidrogenasas presentan una proliferación normal. Buscando mecanismos adaptativos que pudiesen explicar esta diferencia, observamos cómo todas las líneas de pacientes presentaban niveles de CoQ totales menores que las líneas WT (Figura 25A). En línea con este resultado, diferentes estudios clínicos habían puesto de manifiesto cómo pacientes con mutaciones en ETFDH presentan una deficiencia secundaria de CoQ (Gempel *et al.*, 2007; Liang *et al.*, 2009; Xiao *et al.*, 2020).



**Figura 25. ETFDH interacciona con las enzimas de la biosíntesis del CoQ y regula su expresión.**

(A) Correlación entre los niveles de CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> y de ROS mitocondriales en fibroblastos humanos controles y derivados de pacientes que padecen acidurias metabólicas y presentan mutaciones en los genes de ETFDH y otras deshidrogenasas. (B) Datos proteómicos de expresión de las enzimas de la ruta de la biosíntesis del CoQ en mioblastos WT y ETFDH KO. (C) Co-Inmunoprecipitación de COQ2 y ETFDH en músculo esquelético (1 y 3 mg de prot), donde se observa interacción directa entre ETFDH y COQ2. (D) Esquema STRING del interactoma entre la ruta de la biosíntesis del CoQ, el catabolismo de los BCAA y la FAO (extraído de <https://string-db.org/>). (E) Medida de los ROS mitocondriales en mioblastos WT e ETFDH KO sin tratar o tratados con riboflavina o con 4-CBA (1-10mM), un inhibidor de la biosíntesis del CoQ. Se muestra también el efecto de la delección genética vía CRISPR/Cas9 de COQ2. Reducir los niveles de CoQ es una buena estrategia para reducir el estrés oxidativo en ausencia de ETFDH.

Las líneas que analizamos derivaban de pacientes que presentan diferentes mutaciones en enzimas de la FAO o del catabolismo de los BCAA. Uno de estos pacientes presenta una mutación bialélica en ACAD9 (paciente M9), el paciente M2 presenta una mutación hemialélica en ETFDH, el paciente M3 presenta una mutación hemialélica en BCKDHB y el paciente M4 presenta una mutación hemialélica en la transacilasa de cadena ramificada de dihidrolipoamida (DBT). Todos los pacientes mostraron un aumento significativo de ROS en comparación con los fibroblastos de controles (Figura 25A), siendo el paciente M9 el más afectado en este sentido. Además, todos los pacientes mostraron una cantidad significativamente menor de CoQ, en comparación con los controles (Figura 25A), lo que nos indica que mutaciones en estas rutas catabólicas podrían generar deficiencias de CoQ. Sin embargo, ¿cómo mutaciones en enzimas de distintas rutas pueden llevar a la inhibición de la biosíntesis de CoQ?

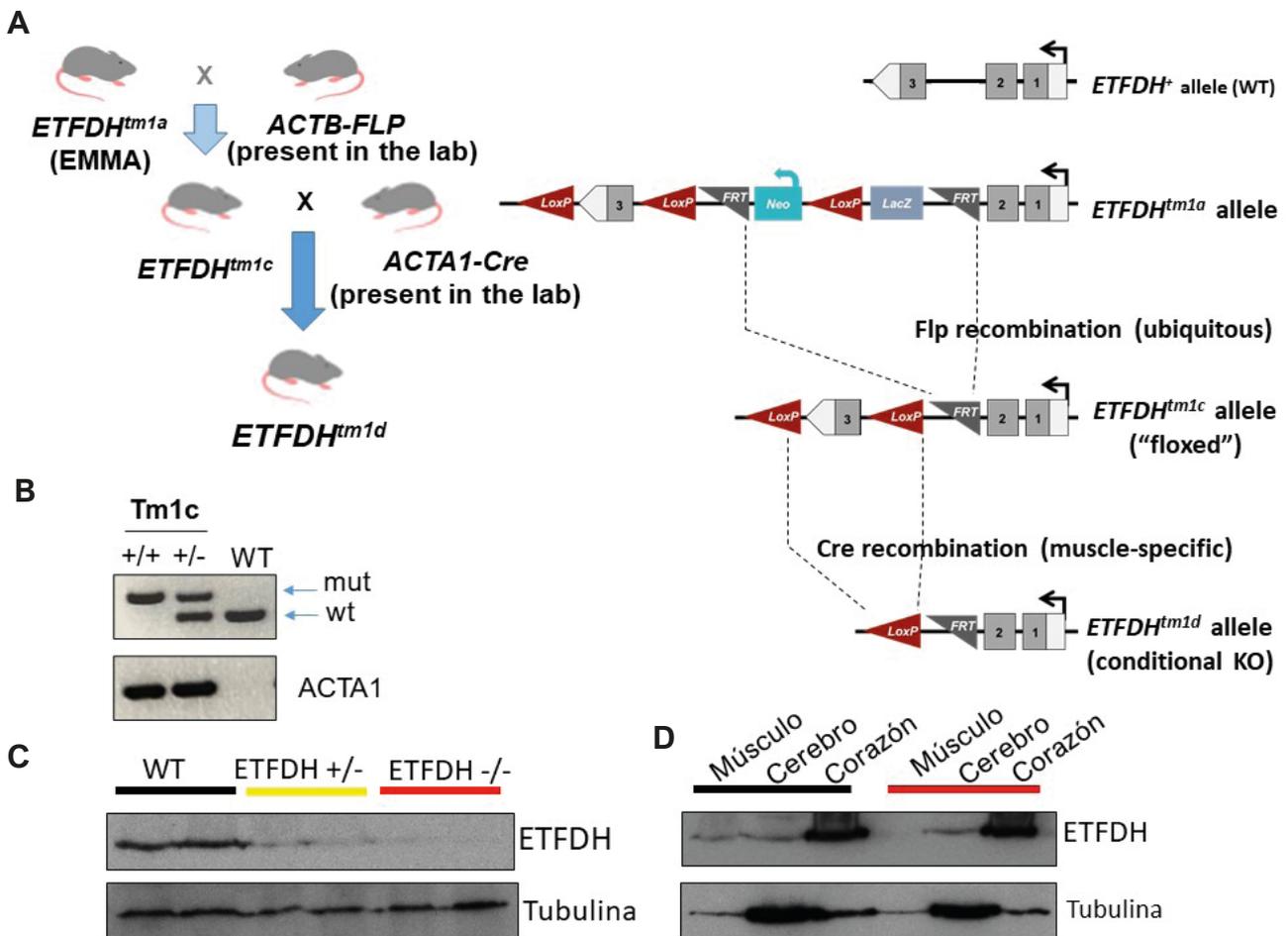
Debido a que todas estas rutas convergen en ETFDH, para responder a esta pregunta volvimos a analizar los datos proteómicos (proteómica cuantitativa TMT) de los mioblastos WT y ETFDH KO poniendo el foco en la biosíntesis del CoQ (Figura 25B). Los datos indicaron que tres de las enzimas implicadas en la síntesis de la cola isoprenoide del CoQ (farnesil pirofosfato sintasa, FDPS; farnesil/geranil transferasa, FNTA; y geranil/geranil transferasa, RABGGTA) tenían una expresión reducida en ausencia de ETFDH. Además, y de manera interesante, la expresión de COQ7 y COQ9, que participan en el mismo paso de la biosíntesis del CoQ (Manicki *et al.*, 2021), se encontraron alterados en ausencia de ETFDH. Por tanto, nos planteamos si ETFDH podría estar implicada directamente en la regulación de la biosíntesis del CoQ mediante interacción directa con alguna de las enzimas de su biosíntesis. De acuerdo con esta hipótesis, encontramos datos de repositorios y redes de interacciones proteicas (<https://string-db.org/>) (Figura 25D), que muestran una interacción prevista entre ETFDH y la maquinaria de biosíntesis del CoQ. Para comprobarlo, inmunoprecipitamos COQ2 en mitocondrias aisladas extraídas del músculo esquelético de ratones WT y estudiamos su interactoma. De manera relevante, observamos que ETFDH co-precipita con el enzima COQ2 de la biosíntesis del CoQ (Figura 25C). Estos datos apoyan la teoría que ETFDH, controlando el ciclo del CoQ, pudiese además controlar su biosíntesis, por interacción directa o por un mecanismo que faltaría por determinar.

Por último, tratamos de verificar si las actuales terapias utilizadas en pacientes que padecen MADD o deficiencias secundarias de CoQ son eficaces para revertir el fenotipo observado en nuestro modelo. En ausencia de terapias más personalizadas, la administración de riboflavina y/o CoQ es utilizada como tratamiento en pacientes con MADD (Horvath and Lombès, 2014), demostrando algunas leves mejorías en la capacidad física de los pacientes. Sin embargo, los mioblastos ETFDH KO tratados con riboflavina no mostraron diferencias en la producción de ROS en comparación con las células no tratadas (Figura 25E). Por el contrario, la utilización del ácido 4-clorobenzoico (4-CBA), un inhibidor de la ruta de la biosíntesis del CoQ, redujo significativamente los niveles ROS provocados por la ausencia de ETFDH (Figura 25E). Del mismo modo, la generación de un doble KO ETFDH-COQ2 KO, redujo significativamente los valores de producción de ROS en comparación con los observados en la línea ETFDH KO (Figura 25E). Estos resultados en conjunto nos indican que el CoQ puede ser una molécula peligrosa en ausencia de ETFDH, ya que de acuerdo con nuestros datos se acumula en su forma reducida

siendo una fuente de ROS (junto con el CIII). Por lo tanto, la deficiencia de CoQ observada en pacientes podría ser, más que una morbilidad asociada, una forma de adaptación de la célula para reducir el estrés oxidativo debido a disfunciones en ETFDH.

**4.15. Generación y caracterización del primer modelo animal ETFDH-KO condicional y específico de músculo esquelético**

Para verificar que el fenotipo observado en células se reproducía *in vivo*, generamos el primer modelo de ratón ETFDH KO condicional y específico de músculo esquelético. El ratón que carece de ETFDH en todos los tejidos es incompatible con la vida, y por esa razón decidimos desarrollar un modelo condicional y tejido específico. El espermatozoides congelado de un ratón transgénico C57BL/6-Etdh tmla(EUCOMM)Hmgu fue obtenido del European Mouse Mutant Archive (EMMA) con el ID EM: 09069 y el constructo mostrado en la Figura 26A.

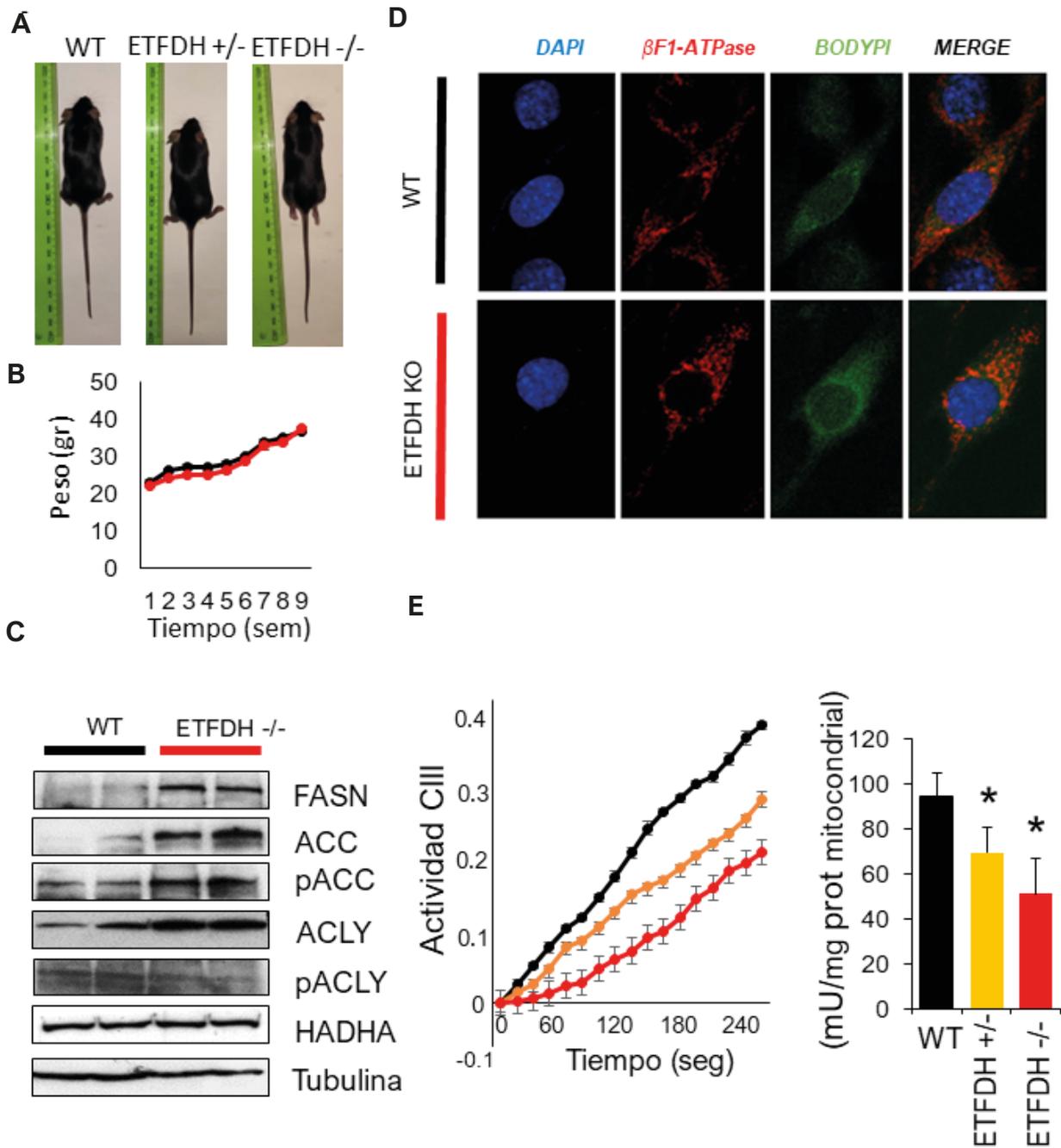


**Figura 26. Generación de una línea murina C57BL/6 ETFDH KO condicional y específica de músculo esquelético.** (A) Esquema del proceso de generación del ratón ETFDH KO (B) PCR para el alelo ETFDH-Tm1c (mut) y ETFDH WT (wt) y para ACTA1, el promotor específico de músculo esquelético de la Cre recombinasa. (C) Western blot revelado por el anticuerpo frente a ETFDH de extractos de proteína de músculo esquelético de ratones WT,  $ETFDH^{+/-}$  y  $ETFDH^{-/-}$ . (D) Western blot revelado por el anticuerpo frente a ETFDH de extractos de proteína de músculo esquelético, cerebro y corazón de ratones WT y  $ETFDH^{-/-}$ , donde se observa que es KO específico de músculo esquelético.

La fertilización *in vitro* de un ratón hembra C57BL/6 se llevó a cabo en la Unidad de Transgénesis del CNIC. Los descendientes fueron genotipados para seleccionar los ratones LacZ y Neo positivos. Los ratones transgénicos fueron entonces cruzados con una línea de ratón flipasa para eliminar los casetes LacZ y Neo entre los sitios FRT, y así obtener el alelo Tm1c. A continuación, los ratones Tm1c fueron cruzados con la línea B6;C3-Tg (ACTA1-rtTA,tetO-cre)<sup>102</sup>Monk/J, la cual expresa la recombinasa Cre bajo el control del promotor ACTA1, específico de músculo esquelético, inducible por doxiciclina. Los descendientes fueron genotipados para los alelos Tm1c y ACTA1 con el objetivo de seleccionar los ratones dobles transgénicos (DT) (Figura 26B). Estos ratones en heterocigosis (ETFDH<sup>+/-</sup>) fueron cruzados entre sí para generar la delección del exón 3 del gen ETFDH en homocigosis (ETFDH<sup>-/-</sup>), tras la administración de doxiciclina. Los ratones WT, KO condicionales de músculo esquelético fueron genotipados (Figura 26B) y se comprobó la ausencia de ETFDH por western blot (Figura 26C). Además, comprobamos que la expresión de ETFDH sólo estaba alterada en músculo esquelético y no otros tejidos, como el corazón o el cerebro (Figura 26D).

La ausencia parcial o total de ETFDH en ratones hasta 2 meses de edad no alteró significativamente el peso de los animales ni tuvo un efecto macroscópico sobre el aspecto general del animal (Figura 27A y B).

Sin embargo, la inhibición de la FAO mitocondrial mediada por la ausencia de ETFDH resultó en un aumento significativo en la lipogénesis de novo en el músculo de los animales. Observamos por western blot que en ratones ETFDH<sup>-/-</sup> proteínas relacionadas con la síntesis lipídica tales como ACC, FASN y ACLY y sus formas fosforiladas se encontraban sobreexpresadas y activadas en comparación a los WT (Figura 27C). Mediante microscopía confocal comprobamos que miocitos ETFDH KO tenían mayor cantidad de ácidos grasos positivos a la tinción con BodyPi, un marcador fluorescente de lípidos (Figura 27D).



**Figura 27. En ratones ETFDH<sup>-/-</sup>, la actividad del CIII está inhibida y la lipogénesis aumentada.**

(A) Medida de la actividad del CIII de mitocondrias aisladas de músculo esquelético de ratones WT, ETFDH<sup>+/-</sup> y ETFDH<sup>-/-</sup>, expresada como mU/ mg proteína mitocondrial. La ausencia de ETFDH causa la inhibición del CIII: se reproduce in vivo el fenotipo observado en miocitos ETFDH KO (B) Microscopía confocal en miocitos WT y ETFDH KO. Se observa en azul, (DAPI), verde (BODIPY) y rojo ( $\beta$ F1-ATPasa). Los miocitos ETFDH KO presentan un mayor depósito de gotas lipídicas. (C) Western blot de la expresión de proteínas relativas a la lipogénesis de novo en extractos de músculo esquelético de ratones WT (negro) y ETFDH<sup>-/-</sup> (rojo). Se muestra la expresión de la tubulina como control de carga. La ausencia de ETFDH, inhibiendo la FAO mitocondrial, estimula la síntesis lipídica.

Esto nos sugiere que las células musculares, incapaces de oxidar los ácidos grasos debido a la ausencia de ETFDH, promueven el almacenamiento de ácidos grasos y la lipogénesis, como se ha observado en otras disfunciones mitocondriales (Sánchez-González *et al.*, 2020) o en miopatías generadas por una deficiencia de CoQ con almacenamiento de lípidos en el músculo (Acosta *et al.*, 2016), lo que podría explicar la fatiga muscular que sufren los pacientes diagnosticados con MADD. A nivel de mecanismo, las mitocondrias aisladas de músculo esquelético de ratones ETFDH<sup>+/-</sup> y ETFDH<sup>-/-</sup> presentaron alrededor de un 75% y 50%, respectivamente, de inhibición de la actividad del CIII comparados con WT (Figura 27E), lo cual es consistente con lo observado en mioblastos ETFDH KO. Estos datos demuestran que *in vivo* ETFDH es necesario para el correcto funcionamiento del CIII y que disfunciones OXPHOS están a la base del fenotipo observado.

## DISCUSIÓN

## 5. Discusión

Los electrones generados por la oxidación de sustratos en rutas que incluyen la glucólisis, la FAO y el ciclo del TCA, convergen en la mitocondria donde entran en la OXPHOS para generar energía biológica de una manera altamente eficiente (Vercellino and Sazanov, 2022). Los equivalentes reductores de las reacciones enzimáticas de la FAO ingresan directamente a la ETC para apoyar la generación de ATP, o mediante la entrada de su producto final acetil-CoA en el ciclo del TCA, donde se producen NADH y FADH<sub>2</sub> adicionales. El acetil-CoA de la FAO también se puede utilizar para sintetizar cetonas, una fuente de combustible que utilizan algunos tejidos periféricos y especialmente el cerebro durante situaciones catabólicas (Houten *et al.*, 2016). Los electrones de los equivalentes reductores de las reacciones enzimáticas de la FAO, en forma de FADH<sub>2</sub>, se transfieren al CoQ, a través de una serie de reacciones redox que involucran a ETF y ETFDH, y el CoQH<sub>2</sub> generado es oxidado, posteriormente, por el CIII. Además, el FADH<sub>2</sub> y CoQH<sub>2</sub> generados por la FAO están potencialmente expuestos a la oxidación en el reactivo entorno de la matriz mitocondrial. Así, la eficiencia de la OXPHOS depende de la correcta transferencia de electrones desde estas coenzimas a la ETC. Cualquier limitación o escape en el flujo de electrones FAO-ETC conducirá a una disminución de la generación de ATP. Por lo tanto, no es de extrañar que la evolución haya propiciado la formación de un complejo proteico entre distintos componentes de la ETC y de la FAO para facilitar la transferencia de electrones. Este concepto, ya teorizado en pasado (Lapiente-Brun *et al.*, 2013), ha sido demostrado en este manuscrito, donde reportamos la interacción molecular directa entre ETFDH, cuello de botella de la FAO y la subunidad UQCRCII del CIII.

La organización de la ETC en supercomplejos, con fin de garantizar el correcto transporte de electrones, promover la canalización de sustratos y la eficiencia catalítica, ha sido previamente demostrada (Acín-Pérez *et al.*, 2008; Lapiente-Brun *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2017). Recientemente, estudios funcionales de la mitocondria han sugerido que las enzimas involucradas en la FAO puedan formar supercomplejos que interaccionan con los complejos de la ETC en la MMI (Wang *et al.*, 2010, 2019). Concretamente, mediante estudios de electroforesis en condiciones nativas, Wang y colaboradores observaron que ETFDH comigraba con el CIII, mientras que la proteína trifuncional (TFP) de la FAO comigraba con el dominio de unión al NADH del CI. Los datos de ETFDH han sido corroborados por nuestros experimentos mostrados en esta tesis, además, hemos observado una interacción de ETFDH y ETFa con la subunidad del CIII UQCRCII, lo que apoya la hipótesis que varias enzimas de la FAO se encuentran formando supercomplejos cercanos al CIII para facilitar la correcta transferencia de electrones. Sin embargo, nuestros resultados van más allá, indicando una dependencia directa entre ETFDH y la actividad del CIII que no había sido observada hasta la fecha. La interacción directa de ETFDH con el CIII y la pérdida de actividad del CIII ante la ausencia de ETFDH sugieren que el catabolismo de los BCAA y la FAO están íntimamente vinculados a la OXPHOS por medio del CIII, siendo ETFDH un componente esencial y necesario para la actividad de la ETC. La falta de ETFDH produce que los electrones procedentes de estas rutas catabólicas no entren en la ETC. *A priori*, la falta de un flujo de electrones entrante en la ETC produciría una reducción del estrés reductor (Mao *et al.*, 2021), pero lo observado fue precisamente lo contrario. La falta de ETFDH produjo un significativo

aumento del ratio de  $\text{CoQH}_2/\text{CoQ}$ , que lleva a una aumentada producción de  $\text{O}_2\cdot$ . Esto supuso un hecho paradójico, la ausencia de una  $\text{CoQ}$  reductasa produce un aumento de  $\text{CoQH}_2$ , lo que nos condujo a pensar que ETFDH podría tener otra función de la que clásicamente ha sido descrita. Con los datos observados, nosotros proponemos que ETFDH interviene directamente en el ciclo del  $\text{CoQ}$ . Concretamente, aportando el electrón necesario, en una reacción de transferencia de 1 electrón, para reducir la forma semiquinona  $\text{CoQ}\cdot$  originada en el sitio  $\text{Q}_\text{N}$  del CIII, donde el  $\text{cit b}_\text{H}$  reduce una molécula de  $\text{CoQ}$  generando la  $\text{CoQ}\cdot$  en la primera ronda del ciclo.

La teoría del ciclo del  $\text{CoQ}$  ha sido objeto de extenso debate durante varias décadas, desde que fue propuesta por Mitchel (Mitchell, 1975b) hasta la actualidad, y diversas teorías alternativas han sido formuladas para explicar el mecanismo de acción del CIII (Crofts, 2004). Uno de los puntos más controvertidos son los tiempos de reducción de la  $\text{CoQ}\cdot$  originada en la primera ronda del ciclo. Para Mitchell, este intermediario altamente inestable debería ser reducido rápidamente en el sitio  $\text{Q}_\text{N}$  por una deshidrogenasa accesoria que estuviese en la matriz mitocondrial (Mitchell, 1975b, 1975a). En aquella época, Mitchell pensó en el CII. Sin embargo, en los años siguientes, Peter Garland pudo demostrar que el CII no interviene en la reducción de la  $\text{CoQ}\cdot$  y se aceptó la idea de que debía ser una segunda molécula de  $\text{CoQH}_2$ , en una segunda ronda del ciclo, la que aportase el electrón necesario para completar la reducción de  $\text{CoQ}\cdot$  a  $\text{CoQH}_2$ , dando lugar a la teoría “modificada del ciclo del  $\text{CoQ}$ ” (Crofts *et al.*, 1983, 2003). Peter Garland hizo tres objeciones importantes en contra de la teoría de la deshidrogenasa de Mitchel (Garland *et al.* 1975): señaló (i) que el CIII no requiere al CII para desarrollar su actividad; (ii) que la antimicina no inhibe la actividad del CII y (iii) que el CIII es capaz de funcionar de manera autónoma en partículas submitocondriales invertidas. Estas tres observaciones llevaron a pensar y a aceptar por parte de los investigadores que el CIII opera independientemente y que, a pesar de los largos tiempos de espera, sea una segunda molécula de  $\text{CoQH}_2$  la reductora del  $\text{CoQ}\cdot$ .

Sin embargo, los resultados de nuestros experimentos podrían ser consistentes con el modelo original del ciclo del  $\text{CoQ}$  propuesto originalmente por Mitchell (Mitchell, 1975b), donde el camino bifurcado de los electrones que provienen de la oxidación del  $\text{CoQH}_2$  en el sitio  $\text{Q}_\text{P}$  son utilizados para reducir una molécula de  $\text{CoQ}$  por medio del  $\text{cit b}_\text{H}$  en el sitio  $\text{Q}_\text{N}$ , con la posterior aportación de otro electrón por parte de una deshidrogenasa, ETFDH. Tanto datos *in vitro*, datos clínicos de pacientes con deficiencias en ETFDH y los resultados obtenidos del primer modelo animal ETFDH<sup>-/-</sup> específico de músculo esquelético generado en esta tesis doctoral apoyarían esta teoría.

Siguiendo con las objeciones de Garland, y contestando al punto (i), nosotros aquí demostramos que el CIII requiere de ETFDH para su correcta actividad, por lo menos en músculo esquelético y en diferentes líneas celulares. La ausencia de ETFDH lleva a una reducción significativa en la actividad del CIII y a la disminución del  $\Delta\Psi\text{m}$  de manera independiente de antimicina. En particular, las mitocondrias deficientes de ETFDH presentan el  $\text{cit b}$  del CIII constitutivamente reducido e inhibido, lo cual -bloqueando la actividad catalítica del CIII- lleva a la acumulación del sustrato  $\text{CoQH}_2$  y a la formación de ROS mitocondriales insensibles a antimicina. De manera interesante, tanto la antimicina como el myxothiazol, los dos principales inhibidores del CIII, inhiben

la actividad de ETFDH (Frerman, 1987) y de la FAO (Mannaerts *et al.*, 1979; Vamecq *et al.*, 1987), contestando así al punto (ii) de Garland. Esto puede entenderse desde la función clásica ya que un CIII no funcional (debido a la acción de los inhibidores) produciría una acumulación de  $\text{CoQH}_2$  incapaz de oxidarse y una baja proporción de CoQ para ser reducido por ETFDH. Sin embargo, y de manera acorde con el hecho que la ausencia de ETFDH inhibe el CIII, la inhibición del CIII podría inhibir la actividad de ETFDH debido a su propia disfunción y no a la baja proporción de CoQ. Además, son interesantes las numerosas similitudes que existen entre la antimicina y la ausencia de ETFDH, como son el elevado ratio  $\text{CoQH}_2/\text{CoQ}$ , el estado continuo de reducción del CIII, la pérdida de actividad del CIII y la excesiva producción de ROS por parte también del CIII. El hecho de que la antimicina bloquea el sitio  $\text{Q}_N$  del CIII, donde se reduce el CoQ durante el ciclo del CoQ (y, por lo tanto, bloquea la oxidación del citocromo b), y que la antimicina tiene los mismos efectos que la pérdida de ETFDH en la célula, es un dato a tener en cuenta a la hora de valorar si ETFDH está participando directamente, por lo menos parcialmente, en el ciclo del CoQ.

Quizá otra de las razones por la que se descartó la teoría de Mitchel fue porque con la tecnología de entonces no se detectaron deshidrogenasas en el interactoma del CIII (Frerman, 1987). Sin embargo, nuestros datos y los datos de Wang y colaboradores indican que ETFDH interactúa directamente con CIII, por medio de la subunidad UQCRCII. Probablemente, la interacción CIII-ETFDH sea una interacción transitoria, más débil que la que ocurre entre las distintas subunidades del CIII, dependiente del resto de interacciones con las enzimas de la FAO y de las otras rutas catabólicas que suministran electrones a ETFDH. Por otro lado, la ausencia de ETFDH no provoca alteraciones en el punto isoeléctrico en UQCRCII, lo que lleva a pensar que el mecanismo de inhibición del CIII no es mediado por modificaciones post-traduccionales. Sin embargo, sería interesante comprobar si ETFDH puede producir algún tipo de regulación alostérica del CIII mediante su unión y si la pérdida de unión pudiese provocar un cambio de conformación como la producida por algunos inhibidores del CIII (Zhang *et al.*, 1998).

Desmontar el tercer punto de las objeciones de Garland (iii) es experimentalmente muy complejo. Sin embargo, podemos especular que el hecho de que en determinadas condiciones forzadas *in vitro* el CIII muestre actividad autónoma no es incompatible con que *in vivo* parte del recirculo del CoQ pueda ser facilitado por la presencia de ETFDH.

En el mismo sentido, el hecho de que en subpartículas mitocondriales *in vitro* ETFDH pueda reducir el CoQ a  $\text{CoQH}_2$  sin la intervención de otras proteínas (Beckmann and Frerman, 1985) no está en contradicción con nuestra hipótesis, en la cual ETFDH sigue siendo el reductor del CoQ, pero en estado de  $\text{CoQ}^\bullet$ , semirreducido. Además, los potenciales de reducción son favorables tanto para la reducción por parte de ETFDH de CoQ a  $\text{CoQ}^\bullet$  como de CoQ a  $\text{CoQH}_2$  y es lógico pensar que esta última reacción pueda suceder *in vitro*, sin que esto demuestre que *in vivo* sea la reacción prioritaria.

Otro hecho que apoya nuestra hipótesis es que ETFDH es reducido por ETF en 2 semirreacciones de transferencia de 1 electrón, oscilando por tanto entre las formas reducidas de 1 y 2 electrones (Watmough and Frerman, 2010). A su vez, la reducción de CoQ por ETFDH también ocurre en 2

semireacciones de transferencia de 1 electrón, lo que implica que ETFDH seguramente genera y estabiliza en su estructura la  $\text{CoQ}\cdot$  (Frerman, 1987). Esto contrasta con la mayoría de las otras  $\text{CoQ}$  reductasas, donde la transferencia de electrones no implica la estabilización del radical  $\text{CoQ}\cdot$  al suceder en una reacción de transferencia de 2 electrones. Los residuos que forman el bolsillo hidrófobo por donde entra el  $\text{CoQ}$  están altamente conservados entre las secuencias de ETFDH de diferentes especies, en particular, el aminoácido G273 que está absolutamente conservado en todas las secuencias de ETFDH estudiadas (Zhang, Frerman and Kim, 2006). Además, una molécula de  $\text{H}_2\text{O}$  se une al grupo hidroxilo del aminoácido Y271 y al O4 del anillo de benzoquinona del  $\text{CoQ}$  mediante enlaces de hidrógeno. Esta molécula de  $\text{H}_2\text{O}$  podría actuar como donante-aceptor de protones durante la reducción del  $\text{CoQ}$  (Zhang, Frerman and Kim, 2006). Como el átomo de O1 de la benzoquinona no forma enlaces de hidrógeno directos con ningún aminoácido del dominio de unión a  $\text{CoQ}$ , el modo de unión a  $\text{CoQ}$  observado en ETFDH es diferente al observado en otras  $\text{CoQ}$ -reductasas y  $\text{CoQ}$ -oxidases, como el CII (Horsefield *et al.*, 2006) o la ubiquinol oxidasa de *E. coli* (Abramson *et al.*, 2000), haciendo de ETFDH una deshidrogenasa única en su mecanismo de acción. Los dominios de unión a  $\text{CoQ}$  clásicos tienen secuencias conservadas que contienen un residuo de Tyr/Trp o His que forman enlaces de hidrógeno directos con O1 y/o O4 de la benzoquinona, lo que indica que el modo de acción de ETFDH no sigue los principios clásicos de otras  $\text{CoQ}$  oxidorreductasas, favoreciendo la formación de  $\text{CoQ}\cdot$  y el pasaje de esta al CIII. En esta línea, que la entrada de electrones a través de ETFDH implique la formación de  $\text{CoQ}\cdot$  podría ser una de las causas por las que históricamente se ha observado que la FAO produce ROS (Seifert *et al.*, 2010; Perevoshchikova *et al.*, 2013). De manera acorde, la mutación G273E, que origina una proteína ETFDH correctamente plegada pero impide la unión  $\text{CoQ}$ , produce la misma disfunción que la ausencia de ETFDH en termino de aumentada generación de  $\text{O}_2\cdot$  por parte del CIII, apoyando nuestra hipótesis.

Además, existen indicios de que el CIII, a pesar de ser complejo dimérico, podría funcionar como un monómero (Crofts *et al.*, 2013), lo que encaja mejor con nuestra teoría, a diferencia de la propuesta del ciclo del  $\text{CoQ}$  clásico que requeriría una estructura dimérica del CIII (Xia *et al.*, 2013).

Está ampliamente aceptado que el CIII es uno de los puntos de producción de ROS más importantes en la mitocondria, y su producción aumenta tras la adición de antimicina (Boveris and Cadenas, 1975). Nuestros datos muestran que la pérdida de ETFDH produce un gran aumento en la producción de ROS que no disminuyen con la adición de rotenona, indicando que no hay RET, y no aumentan ni disminuyen con la adición de antimicina, indicando que los ROS provienen, al menos en parte, del CIII. Según nuestra hipótesis en la cual ETFDH participa en el ciclo del  $\text{CoQ}$ , la falta de ETFDH provoca que la  $\text{CoQ}\cdot$  generada en el cit  $b_H$  no pueda ser reducida y, por tanto, sea la principal fuente de ROS observada. Además, debido a que el ciclo se estanca, el cit b permanece reducido y la antimicina no produce ningún efecto, tal y como observamos en mitocondrias aisladas de músculo y de miocitos, inhibiendo la actividad del CIII. Esto también ha sido observado en células con mutaciones en el cit b, que presentan inhibición de la actividad enzimática del CIII y una aumentada producción de ROS mitocondriales (Wenz *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011). En esta línea, se ha observado que la reducción

de los cit  $b_L$  y  $b_H$  ralentiza la entrada de electrones en el CIII en QP (Quinlan *et al.*, 2011), lo que podría explicar el elevado ratio  $\text{CoQH}_2/\text{CoQ}$  en los miocitos ETFDH KO, ya que el sistema se encuentra atascado. Por otro lado, el elevado ratio  $\text{CoQH}_2/\text{CoQ}$  podría ser en sí otra de las causas de la generación de superóxido (Murphy, 2009). En cualquier caso, la pérdida de ETFDH provoca el desajuste de la homeostasis redox de la mitocondria, como confirmamos a través de los experimentos de sobreexpresión de ETFDH en células ETFDH KO. Como he mencionado previamente, en mioblastos ETFDH KO la sobre expresión de ETFDH mutada en los aminoácidos Y271 y G273, necesarios para la unión del CoQ, generó ROS de manera similar a la ausencia de la proteína, indicando que los ROS producidos por la ausencia de ETFDH provienen de la incorrecta interacción del CoQ con ETFDH, que inhibe el CIII. En todo caso, la sobreproducción de ROS mitocondriales mediada por ETFDH genera un daño oxidativo masivo en los mioblastos que resulta en la parada del ciclo celular en G2/M. Podemos especular que el arresto del ciclo celular sea mediado por un conjunto de factores (ciclinas, factores de transcripción, mioquinas, etc..) activados por los ROS mitocondriales, entre los cuales el aumento de la expresión de p57, uno de los principales inhibidores del ciclo celular, y de la ruta p53/SMAD, asociada con senescencia. De hecho, estudios en células musculares embrionarias muestran que p57 se activa como respuesta al daño celular oxidativo (Mademtzoglou *et al.*, 2018) y que el tratamiento prolongado con el inhibidor del CIII antimicina activa p53 (Evstafieva *et al.*, 2014) y altera la proliferación celular favoreciendo un fenotipo senescente asociado con un aumento en la producción de  $\text{O}_2\cdot$  mitocondrial (Stöckl *et al.*, 2006).

Mutaciones en ETFDH, ETFA y/o ETFB provocan defectos en la FAO mitocondrial y se asocian a miopatías autosómicas recesivas denominadas MADD, con un desarrollo clínico heterogéneo. La disfunción parcial o total de estas DFDs conduce a alteraciones en la oxidación de ácidos grasos y aminoácidos ramificados, niveles elevados de acil-carnitinas en plasma con acumulación de lípidos en diferentes órganos (especialmente el músculo esquelético) que lleva a debilidad muscular, fatiga al ejercicio hasta el desarrollo de importantes miopatías (Mochel *et al.*, 2005; Grünert, 2014; Kaphan *et al.*, 2018; Chokchaiwong *et al.*, 2019). A nivel molecular, se ha descrito cómo mutaciones en estos genes están asociados a disfunción mitocondrial con reducción en la biosíntesis de ATP y en la actividad de los complejos de la ETC (Mochel *et al.*, 2005; Grünert, 2014; Kaphan *et al.*, 2018; Chokchaiwong *et al.*, 2019). Además, y de manera interesante, la miopatía generada por defectos en ETFDH y otras proteínas de la FAO ha sido relacionada con deficiencias secundarias de CoQ (Gempel *et al.*, 2007; Liang *et al.*, 2009; Wen *et al.*, 2013). Recientemente, se han publicado datos de un paciente diagnosticado con MADD (una mutación bialélica en el gen ETFDH), con miopatía y una deficiencia de CoQ en el músculo esquelético (Xiao *et al.*, 2020). El análisis de sus fibroblastos reveló un aumento de la producción de ROS y los estudios histoquímicos del músculo esquelético destacaron fibras rojas irregulares, así como una reducción en la actividad del CI, CI+III y CII+III (Xiao *et al.*, 2020). Nuestros datos están en línea con estos datos clínicos y podrían dar origen a nuevos enfoques a la hora de escoger el tratamiento. En este sentido, el tratamiento para la MADD es hoy en día muy limitado: algunos pacientes responden bien a dietas bajas en grasas y aminoácidos ramificados, o a suplementos de riboflavina, carnitina o glicina (Turnbull *et al.*, 1988; Olsen *et al.*, 2007). Nuestros resultados en mioblastos ETFDH KO no mostraron una mejora fenotípica al tratamiento con riboflavina,

lo que contrasta con las cohortes de pacientes con MADD que responden a este tratamiento (Gempel *et al.*, 2007; Law *et al.*, 2009; Missaglia *et al.*, 2018). Esto puede entenderse debido a la heterogeneidad y gravedad de las mutaciones en ETFDH, donde mutaciones que generan una proteína con menor afinidad por FAD, el aumento de la concentración de riboflavina puede ayudar a la formación de una proteína funcional (Henriques *et al.*, 2009). En cambio, en pacientes con mutaciones que generen una proteína aberrante el aumento de la concentración del sustrato FAD no generará ninguna mejoría, como en nuestros mioblastos ETFDH KO.

Por otro lado, el tratamiento con CoQH<sub>2</sub> ha demostrado ser eficaz de manera intermitente (Horvath and Lombès, 2014; Xiao *et al.*, 2020), con recaídas de los síntomas de los pacientes. Nuestros datos nos indican que el CoQ juega un papel esencial en el desarrollo de esta patología, tanto en términos de estado redox (ratio CoQH<sub>2</sub>/CoQ) como de cantidad absoluta (CoQ<sub>TOT</sub> = CoQ + CoQH<sub>2</sub>). En particular, y de manera sorprendente, nuestros datos indican que en condiciones de completa disfuncionalidad de ETFDH, como es su ausencia en mioblastos ETFDH KO, la reducción de los niveles de CoQ<sub>TOT</sub> es beneficiosa para la célula en términos de normalización en los valores de ROS. Además, ratones deficientes en COQ7 con reducidos niveles de CoQ presentan una menor producción de ROS y una reducida actividad del CIII (Nakai *et al.*, 2004), lo que nos indica que los niveles de CoQ juegan un papel esencial en la producción de ROS. Esto nos lleva a pensar que las deficiencias secundarias de CoQ en pacientes con MADD son una respuesta celular adaptativa para responder al estrés reductivo mediado por disfunciones en ETFDH. Por ello, el tratamiento con CoQH<sub>2</sub> puede ser beneficioso temporalmente para reducir el daño oxidativo debido al carácter antioxidante y beneficioso para las membranas del CoQH<sub>2</sub> (Frei, Kim and Ames, 1990; Stocker, Bowry and Frei, 1991; Bentinger, Brismar and Dallner, 2007). Sin embargo, el tratamiento con CoQH<sub>2</sub> a largo plazo no ataca la raíz del problema, administrando además a las células un compuesto que se acumula en presencia de un ETFDH disfuncional y que ellas mismas intentan disminuir.

Todo esto, genera el interrogante sobre si y cómo ETFDH podría estar regulando la biosíntesis del CoQ. Que la actividad de la OXPHOS o la elección de sustratos pudieran estar implicadas en la regulación de la biosíntesis de específicos pools de CoQ había ya sido especulado (Hernan-Sanz and Enríquez, 2021). Además, ETFDH y ALDH3A1 son unos de los genes más asociados a deficiencias secundarias de CoQ (Bentinger, Tekle and Dallner, 2010; Stefely and Pagliarini, 2017). Es interesante observar cómo en nuestro modelo de mioblastos ETFDH KO, ALDH3A1 es una de las enzimas más sobre expresadas. Además de estar involucrada en los procesos de defensa contra el estrés oxidativo (Uma *et al.*, 1996; Kirsch and De Groot, 2001), ALDH3A1 es una de las primeras enzimas que interviene en la biosíntesis del CoQ, en la formación de la cabeza polar (Stefely and Pagliarini, 2017). Otras enzimas involucradas en la formación de la cola isoprenoide del CoQ (Saiki *et al.*, 2005), tales como FDPS, FNTA y RABGGTA, tienen disminuida su expresión en los mioblastos ETFDH KO. Existen otras proteínas que intervienen en la biosíntesis del CoQ formando el llamado "complejo Q" (PDSS1, PDSS2, COQ2, COQ4, COQ6, COQ7, COQ8, COQ9) y que han sido relacionadas con deficiencias primarias de CoQ (López *et al.*, 2006; Quinzii *et al.*, 2006; Mollet *et al.*, 2007, 2008; Lagier-Tourenne *et al.*, 2008; Duncan *et al.*, 2009; Heeringa *et al.*, 2011; Sondheimer *et al.*, 2017; Kwong *et al.*, 2019). De manera interesante,

los datos de interacción proteica de la base de datos STRING (<https://string-db.org/>) indican que ETFDH podría interactuar con el complejo Q. De acuerdo con estos datos, en esta tesis doctoral, demostramos por primera vez que ETFDH se une al enzima de la biosíntesis del CoQ, COQ2. A pesar de que en nuestro modelo de ETFDH KO no vemos una deficiencia de CoQ, la interacción ETFDH-COQ2 podría, en determinadas situaciones, regular la biosíntesis de CoQ y defectos conformacionales en esta interacción estar a la base de las deficiencias secundarias de CoQ observadas en pacientes con mutaciones en ETFDH.

En nuestro modelo también observamos una regulación a la baja de COQ9. Esta última es una enzima que interviene en el penúltimo paso de la ruta de la biosíntesis del CoQ y que interactúa con COQ7 (Lohman *et al.*, 2014; Manicki *et al.*, 2021). Se cree que tiene funciones regulatorias y es causa de deficiencias primarias de CoQ (Smith *et al.*, 2018; Olgac *et al.*, 2020). Además, y en línea con una posible implicación de ETFDH en la biosíntesis del CoQ, mutaciones en COQ9 han sido relacionadas con disfunciones de la actividad del CI+CIII, generando miopatías (García-Corzo *et al.*, 2013; Luna-Sánchez *et al.*, 2015; Danhauser *et al.*, 2016). La relación COQ7/COQ9 podría ser el check-point de la ruta biosintética del CoQ regulada por ETFDH, ya que, según nuestros datos proteómicos en ausencia de ETFDH, COQ7 se encuentra inversamente expresada que COQ9. Probablemente, la ausencia de ETFDH provoca la desestabilización de COQ9, y esto impide la acción de COQ7, lo que finalmente provoque el fallo en la biosíntesis del CoQ. Otro dato que apoya nuestros resultados es que SQOR, una enzima mitocondrial que cataliza la oxidación del sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ) con la consiguiente reducción del CoQ, se encuentra significativamente disminuida en los estudios proteómicos realizados en mioblastos ETFDH KO. Estos datos concuerdan con estudios donde se ha visto que la expresión de esta enzima se encuentra asociada a deficiencias de CoQ (Luna-Sánchez *et al.*, 2017; Ziosi *et al.*, 2017).

En conclusión, y acorde con los datos clínicos de pacientes con mutaciones en ETFDH y deficiencias de CoQ, nosotros apoyamos la hipótesis de que ETFDH, la enzima que interviene en el reciclaje del CoQ, esté también regulando su biosíntesis. Sin embargo, queda mucho por conocer sobre los mecanismos de regulación de la biosíntesis del CoQ y falta conocer con exactitud el papel de las enzimas implicadas, así como identificar nuevos interactores (Vázquez-Fonseca *et al.*, 2019).

En conjunto, los datos obtenidos durante esta tesis doctoral sugieren que las DFDs y, en especial manera, ETFDH, juegan un papel muy importante en la homeostasis del músculo esquelético, papel que a menudo ha sido infravalorado. Especialmente, ETFDH sobresale como un componente necesario de la ETC implicado en el ciclo del CoQ, en el mantenimiento del  $\Delta\Psi_m$ , de la homeostasis redox de la mitocondria y de la síntesis de un cofactor tan esencial como el CoQ. Estos datos pueden ayudar a entender los mecanismos moleculares por los que se producen las patologías debidas a mutaciones de ETFDH y ofrecer una nueva diana terapéutica para tratamientos personalizados de medicina redox mitocondrial.

## **CONCLUSIONES**

## 6. Conclusiones

1. Mioblastos deficientes en ETFDH tienen menor capacidad respiratoria, experimentan una parada del ciclo celular en G2/M y presentan una miogénesis aberrante.
2. ETFDH interacciona con la subunidad Core II del CIII de la ETC, siendo esta interacción necesaria para la actividad máxima del enzima, para el mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial y de la homeostasia redox de las células musculares.
3. En ausencia de ETFDH, la subunidad CytB del CIII se encuentra constitutivamente reducida e inhibida, llevando a la acumulación patológica de CoQH<sub>2</sub> y de radical superóxido.
4. El desarrollo de un modelo animal deficiente de ETFDH en músculo esquelético confirma la inhibición de la actividad del CIII, el daño oxidativo y una aumentada lipogénesis.
5. La expresión de una oxigenasa alternativa AOX restaura la homeostasia redox, pero no la actividad del CIII, indicando que ETFDH podría participar activamente en el ciclo del CoQ.
6. En músculo de ratón, ETFDH interacciona con COQ2, una enzima de la biosíntesis del CoQ, presumiblemente para regular el contenido de CoQ en función de las necesidades celulares. De hecho, reducir la cantidad de CoQ en miocitos murinos y en fibroblastos de pacientes minimiza las consecuencias patológicas de la disfunción de ETFDH.

## **BIBLIOGRAFÍA**

## 7. Bibliografía

- Abbas, Y. M. *et al.* (2020) 'Structure of V-ATPase from the mammalian brain', *Science*. American Association for the Advancement of Science, 367(6483), pp. 1240–1246.
- Abramson, J. *et al.* (2000) 'The structure of the ubiquinol oxidase from *Escherichia coli* and its ubiquinone binding site', *Nature Structural Biology*, 7(10), pp. 910–917. doi: 10.1038/82824.
- Acín-Pérez, R. *et al.* (2008) 'Respiratory active mitochondrial supercomplexes', *Molecular cell*. Elsevier, 32(4), pp. 529–539.
- Acosta, M. J. *et al.* (2016) 'Coenzyme Q biosynthesis in health and disease', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. Elsevier, 1857(8), pp. 1079–1085.
- Adeva-Andany, M. M. *et al.* (2019) 'Mitochondrial  $\beta$ -oxidation of saturated fatty acids in humans.', *Mitochondrion*. Netherlands, 46, pp. 73–90. doi: 10.1016/j.mito.2018.02.009.
- Ævarsson, A. *et al.* (2000) 'Crystal structure of human branched-chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase and the molecular basis of multienzyme complex deficiency in maple syrup urine disease', *Structure*, 8(3), pp. 277–291. doi: [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)00105-2](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00105-2).
- Alcázar-Fabra, M., Navas, P. and Brea-Calvo, G. (2016) 'Coenzyme Q biosynthesis and its role in the respiratory chain structure', *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. Elsevier B.V., 1857(8), pp. 1073–1078. doi: 10.1016/j.bbabi.2016.03.010.
- Angle, B. and Burton, B. K. (2008) 'Risk of sudden death and acute life-threatening events in patients with glutaric acidemia type II', *Molecular Genetics and Metabolism*, 93(1), pp. 36–39. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2007.09.015>.
- Ansell, R. *et al.* (1997) 'The two isoenzymes for yeast NAD<sup>+</sup>-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by GPD1 and GPD2 have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation', *The EMBO Journal*. John Wiley & Sons, Ltd, 16(9), pp. 2179–2187. doi: <https://doi.org/10.1093/emboj/16.9.2179>.
- Babady, N. E. *et al.* (2007) 'Cryptic proteolytic activity of dihydrolipoamide dehydrogenase', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(15), pp. 6158 LP – 6163. doi: 10.1073/pnas.0610618104.
- Balasubramaniam, S., Christodoulou, J. and Rahman, S. (2019) 'Disorders of riboflavin metabolism', *Journal of inherited metabolic disease*. Wiley Online Library, 42(4), pp. 608–619.
- Banerjee, R., Purhonen, J. and Kallijärvi, J. (2021) 'The mitochondrial coenzyme Q junction and complex III: biochemistry and pathophysiology', *The FEBS Journal*. John

Wiley & Sons, Ltd, n/a(n/a). doi: <https://doi.org/10.1111/febs.16164>.

Beckmann, J. D. and Frerman, F. E. (1985) 'Reaction of electron-transfer flavoprotein with electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase', *Biochemistry*. ACS Publications, 24(15), pp. 3922–3925.

Bender, H.-U. *et al.* (2005) 'Functional Consequences of PRODH Missense Mutations', *The American Journal of Human Genetics*, 76(3), pp. 409–420. doi: <https://doi.org/10.1086/428142>.

Bentinger, M., Brismar, K. and Dallner, G. (2007) 'The antioxidant role of coenzyme Q', *Mitochondrion*, 7, pp. S41–S50. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mito.2007.02.006>.

Bentinger, M., Tekle, M. and Dallner, G. (2010) 'Coenzyme Q – Biosynthesis and functions', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396(1), pp. 74–79. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.02.147>.

Boreikaite, V. *et al.* (2019) 'Extrinsic conditions influence the self-association and structure of IF1, the regulatory protein of mitochondrial ATP synthase', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Acad Sciences, 116(21), pp. 10354–10359.

Boukalova, S. *et al.* (2020) 'Dihydroorotate dehydrogenase in oxidative phosphorylation and cancer.', *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*. Netherlands, 1866(6), p. 165759. doi: [10.1016/j.bbadis.2020.165759](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165759).

Bournat, J. C. and Brown, C. W. (2010) 'Mitochondrial dysfunction in obesity.', *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*. England, 17(5), pp. 446–452. doi: [10.1097/MED.0b013e32833c3026](https://doi.org/10.1097/MED.0b013e32833c3026).

Boveris, A. and Cadenas, E. (1975) 'Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration', *FEBS letters*, 54(3), pp. 311–314.

Brizio, C. *et al.* (2006) 'Over-expression in Escherichia coli and characterization of two recombinant isoforms of human FAD synthetase', *Biochemical and biophysical research communications*. Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare Ernesto Quagliariello, Università degli Studi di Bari, Via Orabona 4, I-70126 Bari, Italy., 344(3), pp. 1008–1016. doi: [10.1016/j.bbrc.2006.04.003](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.04.003).

Bryk, R. *et al.* (2002) 'Metabolic enzymes of mycobacteria linked to antioxidant defense by a thioredoxin-like protein', *Science*. American Association for the Advancement of Science, 295(5557), pp. 1073–1077.

Burger, N. *et al.* (2020) 'A sensitive mass spectrometric assay for mitochondrial CoQ

pool redox state in vivo', *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier, 147, pp. 37–47.

Cadenas, E. and Davies, K. J. A. (2000) 'Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging' This article is dedicated to the memory of our dear friend, colleague, and mentor Lars Ernster (1920–1998), in gratitude for all he gave to us.', *Free Radical Biology and Medicine*, 29(3), pp. 222–230. doi: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00317-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00317-8).

Carlson, M. E., Hsu, M. and Conboy, I. M. (2008) 'Imbalance between pSmad3 and Notch induces CDK inhibitors in old muscle stem cells', *Nature*, 454(7203), pp. 528–532. doi: [10.1038/nature07034](https://doi.org/10.1038/nature07034).

Carothers, D. J., Pons, G. and Patel, M. S. (1989) 'Dihydrolipoamide dehydrogenase: Functional similarities and divergent evolution of the pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductases', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 268(2), pp. 409–425. doi: [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(89\)90309-3](https://doi.org/10.1016/0003-9861(89)90309-3).

Cecchini, G. (2003) 'Function and Structure of Complex II of the Respiratory Chain', *Annual Review of Biochemistry*. Annual Reviews, 72(1), pp. 77–109. doi: [10.1146/annurev.biochem.72.121801.161700](https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161700).

Chan, H. M. *et al.* (2005) 'The p400 E1A-associated protein is a novel component of the p53→ p21 senescence pathway', *Genes & development*. Cold Spring Harbor Lab, 19(2), pp. 196–201.

Chen, Q. *et al.* (2003) 'Production of Reactive Oxygen Species by Mitochondria: CENTRAL ROLE OF COMPLEX III \*', *Journal of Biological Chemistry*. Elsevier, 278(38), pp. 36027–36031. doi: [10.1074/jbc.M304854200](https://doi.org/10.1074/jbc.M304854200).

Chen, Z. *et al.* (2007) 'Restriction of DNA replication to the reductive phase of the metabolic cycle protects genome integrity', *Science*. American Association for the Advancement of Science, 316(5833), pp. 1916–1919.

Chokchaiwong, S. *et al.* (2019) 'ETF-QO mutants uncoupled fatty acid  $\beta$ -oxidation and mitochondrial bioenergetics leading to lipid pathology', *Cells*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 8(2), p. 106.

Crofts, A. R. *et al.* (1983) 'The role of the quinone pool in the cyclic electron-transfer chain of *Rhodospseudomonas sphaeroides* A modified Q-cycle mechanism', *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. Elsevier, 723(2), pp. 202–218.

Crofts, A. R. *et al.* (2003) 'The modified Q-cycle explains the apparent mismatch between the kinetics of reduction of cytochromes c 1 and b H in the bc 1 complex', *Journal of Biological Chemistry*. ASBMB, 278(38), pp. 36191–36201.

Crofts, A. R. (2004a) 'The cytochrome bc1 complex: function in the context of structure.', *Annual review of physiology*. United States, 66, pp. 689–733. doi: 10.1146/annurev.physiol.66.032102.150251.

Crofts, A. R. (2004b) 'The Q-cycle - A Personal Perspective.', *Photosynthesis research*. Netherlands, 80(1–3), pp. 223–243. doi: 10.1023/B:PRES.0000030444.52579.10.

Danhauser, K. *et al.* (2016) 'Fatal neonatal encephalopathy and lactic acidosis caused by a homozygous loss-of-function variant in COQ9', *European Journal of Human Genetics*, 24(3), pp. 450–454. doi: 10.1038/ejhg.2015.133.

Daniela, C. *et al.* (2006) 'Hypothalamic mTOR Signaling Regulates Food Intake', *Science*. American Association for the Advancement of Science, 312(5775), pp. 927–930. doi: 10.1126/science.1124147.

Debashree, B. *et al.* (2018) 'Mitochondrial dysfunction in human skeletal muscle biopsies of lipid storage disorder', *Journal of Neurochemistry*. Wiley Online Library, 145(4), pp. 323–341.

Dodd, K. M. and Tee, A. R. (2012) 'Leucine and mTORC1: a complex relationship', *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. American Physiological Society, 302(11), pp. E1329–E1342. doi: 10.1152/ajpendo.00525.2011.

Dott, W. *et al.* (2014) 'Modulation of mitochondrial bioenergetics in a skeletal muscle cell line model of mitochondrial toxicity', *Redox Biology*, 2, pp. 224–233. doi: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.028>.

Duan, Y. *et al.* (2015) 'Nutritional and regulatory roles of leucine in muscle growth and fat reduction', *Front Biosci (Landmark Ed)*, 20, pp. 796–813.

Duncan, A. J. *et al.* (2009) 'A nonsense mutation in COQ9 causes autosomal-recessive neonatal-onset primary coenzyme Q10 deficiency: a potentially treatable form of mitochondrial disease', *The American Journal of Human Genetics*. Elsevier, 84(5), pp. 558–566.

Esparza-Moltó, P. B., Nuevo-Tapióles, C. and Cuezva, J. M. (2017) 'Regulation of the H<sup>+</sup>-ATP synthase by IF1: a role in mitohormesis', *Cellular and Molecular Life Sciences*. Springer, 74(12), pp. 2151–2166.

Evstafieva, A. G. *et al.* (2014) 'A sustained deficiency of mitochondrial respiratory complex III induces an apoptotic cell death through the p53-mediated inhibition of pro-survival activities of the activating transcription factor 4', *Cell Death & Disease*, 5(11), pp. e1511–e1511. doi: 10.1038/cddis.2014.469.

Fan, X. *et al.* (2018) 'Novel ETFDH mutations in four cases of riboflavin responsive

multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency.', *Molecular genetics and metabolism reports*, 16, pp. 15–19. doi: 10.1016/j.ymgmr.2018.05.007.

Formentini, L., Sánchez-Aragó, M., Sánchez-Cenizo, L. and Cuezva, J. M. C. (2012) 'The Mitochondrial ATPase Inhibitory Factor 1 Triggers a ROS-Mediated Retrograde Prosurvival and Proliferative Response', *Molecular Cell*, 45(6), pp. 731–742. doi: 10.1016/j.molcel.2012.01.008.

Formentini, L., Sánchez-Aragó, M., Sánchez-Cenizo, L. and Cuezva, J. M. (2012) 'The Mitochondrial ATPase Inhibitory Factor 1 Triggers a ROS-Mediated Retrograde Prosurvival and Proliferative Response', *Molecular Cell*, 45(6), pp. 731–742. doi: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.01.008>.

Formentini, L. *et al.* (2014) 'In vivo inhibition of the mitochondrial H<sup>+</sup>-ATP synthase in neurons promotes metabolic preconditioning', *The EMBO journal*. 2014/02/12. Blackwell Publishing Ltd, 33(7), pp. 762–778. doi: 10.1002/emboj.201386392.

Formentini, L., Ryan, A. J., *et al.* (2017) 'Mitochondrial H<sup>(+)</sup>-ATP synthase in human skeletal muscle: contribution to dyslipidaemia and insulin resistance', *Diabetologia*. 2017/08/02, 60(10), pp. 2052–2065. doi: 10.1007/s00125-017-4379-z.

Formentini, L., Santacatterina, F., Núñez de Arenas, C., *et al.* (2017) 'Mitochondrial ROS Production Protects the Intestine from Inflammation through Functional M2 Macrophage Polarization.', *Cell reports*. United States, 19(6), pp. 1202–1213. doi: 10.1016/j.celrep.2017.04.036.

Formentini, L., Santacatterina, F., Nuñez de Arenas, C., *et al.* (2017) 'Mitochondrial ROS Production Protects the Intestine from Inflammation through Functional M2 Article Mitochondrial ROS Production Protects the Intestine from Inflammation through Functional M2 Macrophage Polarization', pp. 1202–1213. doi: 10.1016/j.celrep.2017.04.036.

Frei, B., Kim, M. C. and Ames, B. N. (1990) 'Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 87(12), pp. 4879–4883. doi: 10.1073/pnas.87.12.4879.

Frerman, F. E. (1987) 'Reaction of electron-transfer flavoprotein ubiquinone oxidoreductase with the mitochondrial respiratory chain', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 893(2), pp. 161–169. doi: [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(87\)90035-1](https://doi.org/10.1016/0005-2728(87)90035-1).

Frerman, F. E. and Goodman, S. I. (1985) 'Deficiency of electron transfer flavoprotein or electron transfer flavoprotein:ubiquinone oxidoreductase in glutaric acidemia type II

fibroblasts', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(13), pp. 4517–4520. doi: 10.1073/pnas.82.13.4517.

García-Corzo, L. *et al.* (2013) 'Dysfunctional Coq9 protein causes predominant encephalomyopathy associated with CoQ deficiency', *Human molecular genetics*. Oxford University Press, 22(6), pp. 1233–1248.

Garland, P. B. *et al.* (1975) 'Proton-translocating nitrate reductase of *Escherichia coli*', *Electron transfer chains and oxidative phosphorylation*. North-Holland Publishing Amsterdam, pp. 351–358.

Gaviraghi, A. *et al.* (2019) 'Mitochondrial glycerol phosphate oxidation is modulated by adenylates through allosteric regulation of cytochrome c oxidase activity in mosquito flight muscle', *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier, 114, p. 103226.

Gempel, K., Topaloglu, H., Talim, B., Schneiderat, P., Schoser, Benedikt G.H., *et al.* (2007) 'The myopathic form of coenzyme Q10 deficiency is caused by mutations in the electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase (ETF DH) gene', *Brain*, 130(8), pp. 2037–2044. doi: 10.1093/brain/awm054.

Gempel, K., Topaloglu, H., Talim, B., Schneiderat, P., Schoser, Benedikt G H, *et al.* (2007) 'The myopathic form of coenzyme Q10 deficiency is caused by mutations in the electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase (ETF DH) gene', *Brain*, 130(8), pp. 2037–2044. doi: 10.1093/brain/awm054.

GOODMAN, S. I. *et al.* (1994) 'Molecular cloning and expression of a cDNA encoding human electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase', *European Journal of Biochemistry*. John Wiley & Sons, Ltd, 219(1–2), pp. 277–286. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb19939.x>.

Grünert, S. C. (2014) 'Clinical and genetical heterogeneity of late-onset multiple acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency', *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 9(1), p. 117. doi: 10.1186/s13023-014-0117-5.

Guarás, A. *et al.* (2016) 'The CoQH<sub>2</sub>/CoQ Ratio Serves as a Sensor of Respiratory Chain Efficiency', *Cell Reports*, 15(1), pp. 197–209. doi: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.009>.

Guo, R. *et al.* (2017) 'Architecture of human mitochondrial respiratory megacomplex I2III2IV2', *Cell*. Elsevier, 170(6), pp. 1247–1257.

Harris, R. A. *et al.* (1990) 'Regulation of the branched-chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase and elucidation of a molecular basis for maple syrup urine disease', *Advances in Enzyme Regulation*, 30, pp. 245–263. doi: [https://doi.org/10.1016/0065-2571\(90\)90021-S](https://doi.org/10.1016/0065-2571(90)90021-S).

He, M. *et al.* (2011) 'Identification and characterization of new long chain Acyl-CoA dehydrogenases', *Molecular Genetics and Metabolism*, 102(4), pp. 418–429. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2010.12.005>.

Heeringa, S. F. *et al.* (2011) 'COQ6 mutations in human patients produce nephrotic syndrome with sensorineural deafness', *The Journal of clinical investigation*. Am Soc Clin Investig, 121(5), pp. 2013–2024.

Henriques, B. J. *et al.* (2009) 'Role of flavinylation in a mild variant of multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency: a molecular rationale for the effects of riboflavin supplementation', *Journal of Biological Chemistry*. ASBMB, 284(7), pp. 4222–4229.

Henriques, B. J. *et al.* (2021) 'Electron transfer flavoprotein and its role in mitochondrial energy metabolism in health and disease', *Gene*, 776, p. 145407. doi: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2021.145407>.

Hernan-Sanz, P. and Enríquez, J. A. (2021) 'Functional segmentation of CoQ and cyt c pools by respiratory complex superassembly', *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier, 167, pp. 232–242.

Hirst, J. (2013) 'Mitochondrial Complex I', *Annual Review of Biochemistry*. Annual Reviews, 82(1), pp. 551–575. doi: [10.1146/annurev-biochem-070511-103700](https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-070511-103700).

Hirst, J., King, M. S. and Pryde, K. R. (2008) 'The production of reactive oxygen species by complex I', *Biochemical Society Transactions*, 36(5), pp. 976–980. doi: [10.1042/BST0360976](https://doi.org/10.1042/BST0360976).

Hoekstra, A. S. and Bayley, J.-P. (2013) 'The role of complex II in disease', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1827(5), pp. 543–551. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.11.005>.

Hoffman, D. L. and Brookes, P. S. (2009) 'Oxygen sensitivity of mitochondrial reactive oxygen species generation depends on metabolic conditions', *Journal of Biological Chemistry*. ASBMB, 284(24), pp. 16236–16245.

Hoppeler, H. (1999) 'Skeletal muscle substrate metabolism', *International Journal of Obesity*. Nature Publishing Group, 23(3), pp. S7–S10.

Horsefield, R. *et al.* (2006) 'Structural and Computational Analysis of the Quinone-binding Site of Complex II (Succinate-Ubiquinone Oxidoreductase): A MECHANISM OF ELECTRON TRANSFER AND PROTON CONDUCTION DURING UBIQUINONE REDUCTION\*', *Journal of Biological Chemistry*, 281(11), pp. 7309–7316. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M508173200>.

Horvath, R. and Lombès, A. (2014) 'Riboflavin and CoQ Disorders', in *Physician's*

*Guide to the Diagnosis, Treatment, and Follow-Up of Inherited Metabolic Diseases*. Springer, pp. 233–244.

Houten, S. M. *et al.* (2016) 'The Biochemistry and Physiology of Mitochondrial Fatty Acid  $\beta$ -Oxidation and Its Genetic Disorders', *Annual Review of Physiology*. Annual Reviews, 78(1), pp. 23–44. doi: 10.1146/annurev-physiol-021115-105045.

Huynh, T. Y. L. *et al.* (2020) 'Understanding the role of key amino acids in regulation of proline dehydrogenase/proline oxidase (prodh/pox)-dependent apoptosis/autophagy as an approach to targeted cancer therapy', *Molecular and Cellular Biochemistry*, 466(1), pp. 35–44. doi: 10.1007/s11010-020-03685-y.

Igamberdiev, A. U. *et al.* (2004) 'Dihydrolipoamide dehydrogenase from porcine heart catalyzes NADH-dependent scavenging of nitric oxide', *FEBS letters*. Elsevier, 568(1–3), pp. 146–150.

Ishihama, S. *et al.* (2021) 'LPL/AQP7/GPD2 promotes glycerol metabolism under hypoxia and prevents cardiac dysfunction during ischemia', *The FASEB Journal*. John Wiley & Sons, Ltd, 35(12), p. e22048. doi: <https://doi.org/10.1096/fj.202100882R>.

Iverson, T. M. (2013) 'Catalytic mechanisms of complex II enzymes: A structural perspective', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1827(5), pp. 648–657. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.09.008>.

Iwata, S. *et al.* (1998) 'Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc<sub>1</sub> complex.', *Science (New York, N.Y.)*. United States, 281(5373), pp. 64–71. doi: 10.1126/science.281.5373.64.

James, A. M. *et al.* (2012) 'Mitochondrial oxidative stress and the metabolic syndrome', *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 23(9), pp. 429–434. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.06.008>.

Kalén, A., Appelkvist, E.-L. and Dallner, G. (1989) 'Age-related changes in the lipid compositions of rat and human tissues', *Lipids*, 24(7), pp. 579–584. doi: 10.1007/BF02535072.

Kaphan, E. *et al.* (2018) 'Myopathy with MTCYB mutation mimicking multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency', *Revue Neurologique*. Elsevier, 174(10), pp. 731–735.

Kataoka, Y. *et al.* (2003) 'Reciprocal Inhibition between MyoD and STAT3 in the Regulation of Growth and Differentiation of Myoblasts \*', *Journal of Biological Chemistry*. Elsevier, 278(45), pp. 44178–44187. doi: 10.1074/jbc.M304884200.

Kavanagh, E. and Joseph, B. (2011) 'The hallmarks of CDKN1C (p57, KIP2) in cancer', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1816(1), pp. 50–56. doi:

<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2011.03.002>.

Kirsch, M. and De Groot, H. (2001) 'NAD (P) H, a directly operating antioxidant?', *The FASEB Journal*. Wiley Online Library, 15(9), pp. 1569–1574.

Klyachko, N. L. *et al.* (2005) 'pH-dependent substrate preference of pig heart lipoamide dehydrogenase varies with oligomeric state: response to mitochondrial matrix acidification', *Journal of Biological Chemistry*. ASBMB, 280(16), pp. 16106–16114.

Koren, D. and Palladino, A. (2016) 'Chapter 3 - Hypoglycemia', in Weiss, R. E. and Refetoff, S. (eds) *Genetic Diagnosis of Endocrine Disorders (Second Edition)*. Second Edi. San Diego: Academic Press, pp. 31–75. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800892-8.00003-8>.

Kumar, R. and Banerjee, R. (2021) 'Regulation of the redox metabolome and thiol proteome by hydrogen sulfide', *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. Taylor & Francis, 56(3), pp. 221–235. doi: [10.1080/10409238.2021.1893641](https://doi.org/10.1080/10409238.2021.1893641).

Kwong, A. K.-Y. *et al.* (2019) 'A fatal case of COQ7-associated primary coenzyme Q10 deficiency', *JIMD Reports*. John Wiley & Sons, Ltd, 47(1), pp. 23–29. doi: <https://doi.org/10.1002/jmd2.12032>.

Lagier-Tourenne, C. *et al.* (2008) 'ADCK3, an ancestral kinase, is mutated in a form of recessive ataxia associated with coenzyme Q10 deficiency', *The American Journal of Human Genetics*. Elsevier, 82(3), pp. 661–672.

Langley, B. *et al.* (2002) 'Myostatin Inhibits Myoblast Differentiation by Down-regulating MyoD Expression \*', *Journal of Biological Chemistry*. Elsevier, 277(51), pp. 49831–49840. doi: [10.1074/jbc.M204291200](https://doi.org/10.1074/jbc.M204291200).

Lapiente-Brun, E. *et al.* (2013) 'Supercomplex Assembly Determines Electron Flux in the Mitochondrial Electron Transport Chain', *Science*. American Association for the Advancement of Science, 340(6140), pp. 1567–1570. doi: [10.1126/science.1230381](https://doi.org/10.1126/science.1230381).

Law, L.-K. *et al.* (2009) 'Novel mutations in ETFDH gene in Chinese patients with riboflavin-responsive multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency', *Clinica Chimica Acta*, 404(2), pp. 95–99. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2009.02.015>.

Leanne, L. *et al.* (2019) 'Identification of DHODH as a therapeutic target in small cell lung cancer', *Science Translational Medicine*. American Association for the Advancement of Science, 11(517), p. eaaw7852. doi: [10.1126/scitranslmed.aaw7852](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaw7852).

Lee, D.-W. *et al.* (2011) 'Loss of a conserved tyrosine residue of cytochrome b induces reactive oxygen species production by cytochrome bc1', *Journal of Biological Chemistry*. ASBMB, 286(20), pp. 18139–18148.

- Lester, R. L. and Crane, F. L. (1959) 'The Natural Occurrence of Coenzyme Q and Related Compounds', *Journal of Biological Chemistry*, 234(8), pp. 2169–2175. doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)69886-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)69886-2).
- Liang, W.-C. *et al.* (2009) 'ETFDH mutations, CoQ10 levels, and respiratory chain activities in patients with riboflavin-responsive multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency', *Neuromuscular Disorders*, 19(3), pp. 212–216. doi: <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2009.01.008>.
- Liang, X. *et al.* (2013) 'Proline mechanisms of stress survival.', *Antioxidants & redox signaling*, 19(9), pp. 998–1011. doi: 10.1089/ars.2012.5074.
- Liberti, M. V and Locasale, J. W. (2016) 'The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?', *Trends in Biochemical Sciences*, 41(3), pp. 211–218. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>.
- Lienhart, W.-D., Gudipati, V. and Macheroux, P. (2013) 'The human flavoproteome', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 535(2), pp. 150–162. doi: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.02.015>.
- Liu, W. and Phang, J. M. (2012) 'Proline dehydrogenase (oxidase), a mitochondrial tumor suppressor, and autophagy under the hypoxia microenvironment', *Autophagy*. Taylor & Francis, 8(9), pp. 1407–1409. doi: 10.4161/auto.21152.
- Lohman, D. C. *et al.* (2014) 'Mitochondrial COQ9 is a lipid-binding protein that associates with COQ7 to enable coenzyme Q biosynthesis', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Acad Sciences, 111(44), pp. E4697–E4705.
- Long, J. *et al.* (2007) 'd-Galactose toxicity in mice is associated with mitochondrial dysfunction: protecting effects of mitochondrial nutrient R-alpha-lipoic acid', *Biogerontology*, 8(3), pp. 373–381. doi: 10.1007/s10522-007-9081-y.
- López, L. C. *et al.* (2006) 'Leigh syndrome with nephropathy and CoQ10 deficiency due to decaprenyl diphosphate synthase subunit 2 (PDSS2) mutations', *The American Journal of Human Genetics*. Elsevier, 79(6), pp. 1125–1129.
- Luna-Sánchez, M. *et al.* (2015) 'The clinical heterogeneity of coenzyme Q10 deficiency results from genotypic differences in the Coq9 gene', *EMBO Molecular Medicine*. John Wiley & Sons, Ltd, 7(5), pp. 670–687. doi: <https://doi.org/10.15252/emmm.201404632>.
- Luna-Sánchez, M. *et al.* (2017) 'CoQ deficiency causes disruption of mitochondrial sulfide oxidation, a new pathomechanism associated with this syndrome', *EMBO molecular medicine*, 9(1), pp. 78–95.
- Macchione, F. *et al.* (2020) 'Multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency in elderly

carriers', *Journal of Neurology*, 267(5), pp. 1414–1419. doi: 10.1007/s00415-020-09729-z.

Madak, J. T. *et al.* (2019) 'Revisiting the role of dihydroorotate dehydrogenase as a therapeutic target for cancer.', *Pharmacology & therapeutics*. England, 195, pp. 111–131. doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.10.012.

Mademtzoglou, D. *et al.* (2018) 'Cellular localization of the cell cycle inhibitor Cdkn1c controls growth arrest of adult skeletal muscle stem cells', *Elife*. eLife Sciences Publications Limited, 7, p. e33337.

Maklashina, E. and Cecchini, G. (2010) 'The quinone-binding and catalytic site of complex II', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1797(12), pp. 1877–1882. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.02.015>.

Malumbres, M. and Barbacid, M. (2009) 'Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm', *Nature reviews cancer*. Nature Publishing Group, 9(3), pp. 153–166.

Manicki, M. *et al.* (2021) 'Structure and functionality of a multimeric human COQ7:COQ9 complex', *bioRxiv*, p. 2021.11.15.468694. doi: 10.1101/2021.11.15.468694.

Mannaerts, G. P. *et al.* (1979) 'Mitochondrial and peroxisomal fatty acid oxidation in liver homogenates and isolated hepatocytes from control and clofibrate-treated rats.', *Journal of Biological Chemistry*, 254(11), pp. 4585–4595. doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)30051-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)30051-0).

Mao, C. *et al.* (2021) 'DHODH-mediated ferroptosis defence is a targetable vulnerability in cancer', *Nature*, 593(7860), pp. 586–590. doi: 10.1038/s41586-021-03539-7.

Maxwell, S. A. and Rivera, A. (2003) 'Proline Oxidase Induces Apoptosis in Tumor Cells, and Its Expression Is Frequently Absent or Reduced in Renal Carcinomas \*', *Journal of Biological Chemistry*. Elsevier, 278(11), pp. 9784–9789. doi: 10.1074/jbc.M210012200.

Missaglia, S. *et al.* (2018) 'Characterization of two ETFDH mutations in a novel case of riboflavin-responsive multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency.', *Lipids in health and disease*, 17(1), p. 254. doi: 10.1186/s12944-018-0903-5.

Mitchell, P. (1961) 'Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism', *Nature*, 191(4784), pp. 144–148.

Mitchell, P. (1975a) 'Protonmotive redox mechanism of the cytochrome b-c 1 complex in the respiratory chain: Protonmotive ubiquinone cycle', *FEBS Letters*. John Wiley &

- Sons, Ltd, 56(1), pp. 1–6. doi: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(75\)80098-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(75)80098-6).
- Mitchell, P. (1975b) 'The protonmotive Q cycle: A general formulation', *FEBS Letters*. John Wiley & Sons, Ltd, 59(2), pp. 137–139. doi: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(75\)80359-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(75)80359-0).
- Mitchell, P. (1976) 'Possible molecular mechanisms of the protonmotive function of cytochrome systems', *Journal of Theoretical Biology*, 62(2), pp. 327–367. doi: [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(76\)90124-7](https://doi.org/10.1016/0022-5193(76)90124-7).
- Mochel, F. *et al.* (2005) 'Respiratory chain defects may present only with hypoglycemia', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. Oxford University Press, 90(6), pp. 3780–3785.
- Mohamad Fairus, A. K. *et al.* (2017) 'Dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) inhibitors affect ATP depletion, endogenous ROS and mediate S-phase arrest in breast cancer cells.', *Biochimie*. France, 135, pp. 154–163. doi: [10.1016/j.biochi.2017.02.003](https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.02.003).
- Mollet, J. *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*. Am Soc Clin Investig, 117(3), pp. 765–772.
- Mollet, J. *et al.* (2008) 'CABC1 gene mutations cause ubiquinone deficiency with cerebellar ataxia and seizures', *The American Journal of Human Genetics*. Elsevier, 82(3), pp. 623–630.
- Moser, C. C. *et al.* (2006) 'Electron tunneling chains of mitochondria', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1757(9), pp. 1096–1109. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.04.015>.
- Mráček, T., Drahotá, Z. and Houšťek, J. (2013) 'The function and the role of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in mammalian tissues', *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1827(3), pp. 401–410. doi: [10.1016/j.bbabi.2012.11.014](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.11.014).
- Murphy, M. P. (2009) 'How mitochondria produce reactive oxygen species', *Biochemical Journal*, 417(1), pp. 1–13. doi: [10.1042/BJ20081386](https://doi.org/10.1042/BJ20081386).
- Nagano, T. *et al.* (2017) 'Proline dehydrogenase promotes senescence through the generation of reactive oxygen species.', *Journal of cell science*. England, 130(8), pp. 1413–1420. doi: [10.1242/jcs.196469](https://doi.org/10.1242/jcs.196469).
- Nakai, D. *et al.* (2004) 'coq7/clk-1 regulates mitochondrial respiration and the

generation of reactive oxygen species via coenzyme Q', *Aging Cell*, 3(5), pp. 273–281. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1474-9728.2004.00116.x>.

Natarajan, S. K. *et al.* (2012) 'Proline dehydrogenase is essential for proline protection against hydrogen peroxide-induced cell death.', *Free radical biology & medicine*, 53(5), pp. 1181–1191. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.07.002.

Nouws, J. *et al.* (2010) 'Acyl-CoA Dehydrogenase 9 Is Required for the Biogenesis of Oxidative Phosphorylation Complex I', *Cell Metabolism*, 12(3), pp. 283–294. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.08.002>.

Novitch, B. G. *et al.* (1996) 'Skeletal muscle cells lacking the retinoblastoma protein display defects in muscle gene expression and accumulate in S and G2 phases of the cell cycle.', *The Journal of cell biology*, 135(2), pp. 441–456.

Olgac, A. *et al.* (2020) 'A rare case of primary coenzyme Q10 deficiency due to COQ9 mutation', *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 33(1), pp. 165–170. doi: 10.1515/jpem-2019-0245.

Olsen, R. K. J. *et al.* (2007) 'ETFDH mutations as a major cause of riboflavin-responsive multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency', *Brain*, 130(8), pp. 2045–2054. doi: 10.1093/brain/awm135.

Ozeir, M. *et al.* (2015) 'Coq6 is responsible for the C4-deamination reaction in coenzyme Q biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*.', *The Journal of biological chemistry*, 290(40), pp. 24140–24151. doi: 10.1074/jbc.M115.675744.

Park, J., Bae, S. and Kim, J.-S. (2015) 'Cas-Designer: a web-based tool for choice of CRISPR-Cas9 target sites', *Bioinformatics*, 31(24), pp. 4014–4016. doi: 10.1093/bioinformatics/btv537.

Passos, J. F. *et al.* (2010) 'Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence', *Molecular systems biology*. John Wiley & Sons, Ltd Chichester, UK, 6(1), p. 347.

Perales-Clemente, E. *et al.* (2008) 'Restoration of electron transport without proton pumping in mammalian mitochondria', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Acad Sciences, 105(48), pp. 18735–18739.

Perevoshchikova, I. V. *et al.* (2013) 'Sites of superoxide and hydrogen peroxide production during fatty acid oxidation in rat skeletal muscle mitochondria', *Free Radical Biology and Medicine*, 61, pp. 298–309. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.04.006.

Petrat, F. *et al.* (2003) 'Reduction of Fe (III) ions complexed to physiological ligands by lipoyl dehydrogenase and other flavoenzymes in vitro: implications for an enzymatic

reduction of Fe (III) ions of the labile iron pool', *Journal of Biological Chemistry*. ASBMB, 278(47), pp. 46403–46413.

Polyak, K. *et al.* (1997) 'A model for p53-induced apoptosis', *Nature*. Nature Publishing Group, 389(6648), pp. 300–305.

Pryde, K. R. and Hirst, J. (2011) 'Superoxide Is Produced by the Reduced Flavin in Mitochondrial Complex I: A SINGLE, UNIFIED MECHANISM THAT APPLIES DURING BOTH FORWARD AND REVERSE ELECTRON TRANSFER \*', *Journal of Biological Chemistry*. Elsevier, 286(20), pp. 18056–18065. doi: 10.1074/jbc.M110.186841.

Quinlan, C. L. *et al.* (2011) 'The Mechanism of Superoxide Production by the Antimycin-inhibited Mitochondrial Q-cycle \*', *Journal of Biological Chemistry*. Elsevier, 286(36), pp. 31361–31372. doi: 10.1074/jbc.M111.267898.

Quinlan, C. L. *et al.* (2013) 'Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates', *Redox Biology*, 1(1), pp. 304–312. doi: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.04.005>.

Quinzii, C. *et al.* (2006) 'A mutation in para-hydroxybenzoate-polyprenyl transferase (COQ2) causes primary coenzyme Q10 deficiency', *The American Journal of Human Genetics*. Elsevier, 78(2), pp. 345–349.

Raimondi, I. *et al.* (2013) 'P53 family members modulate the expression of PRODH, but not PRODH2, via intronic p53 response elements.', *PloS one*, 8(7), p. e69152. doi: 10.1371/journal.pone.0069152.

Ramadasan-Nair, R. *et al.* (2014) 'Mitochondrial alterations and oxidative stress in an acute transient mouse model of muscle degeneration: implications for muscular dystrophy and related muscle pathologies', *Journal of Biological Chemistry*. ASBMB, 289(1), pp. 485–509.

Ran, F. A. *et al.* (2013) 'Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system', *Nature Protocols*, 8(11), pp. 2281–2308. doi: 10.1038/nprot.2013.143.

Rees, D. M. *et al.* (2012) 'Structural evidence of a new catalytic intermediate in the pathway of ATP hydrolysis by F1-ATPase from bovine heart mitochondria', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Acad Sciences, 109(28), pp. 11139–11143.

Reichart, G. *et al.* (2019) 'Mitochondrial complex IV mutation increases reactive oxygen species production and reduces lifespan in aged mice', *Acta Physiologica*, 225(4), p. e13214. doi: <https://doi.org/10.1111/apha.13214>.

Ripple, M. O., Kim, N. and Springett, R. (2013) 'Mammalian Complex I Pumps 4

Protons per 2 Electrons at High and Physiological Proton Motive Force in Living Cells\*, *Journal of Biological Chemistry*, 288(8), pp. 5374–5380. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.438945>.

Roberts, D. L., Frerman, F. E. and Kim, J.-J. P. (1996) 'Three-dimensional structure of human electron transfer flavoprotein to 2.1-Å resolution', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(25), pp. 14355 LP – 14360. doi: 10.1073/pnas.93.25.14355.

Rodenburg, R. J. (2016) 'Mitochondrial complex I-linked disease.', *Biochimica et biophysica acta*. Netherlands, 1857(7), pp. 938–945. doi: 10.1016/j.bbabi.2016.02.012.

Romijn, J. A. *et al.* (1993) 'Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration', *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*. American Physiological Society Bethesda, MD, 265(3), pp. E380–E391.

Ross, D. and Siegel, D. (2017) 'Functions of NQO1 in Cellular Protection and CoQ10 Metabolism and its Potential Role as a Redox Sensitive Molecular Switch', *Frontiers in Physiology*. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2017.00595>.

Rozen, S. and Skaletsky, H. (2000) 'Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers', in *Bioinformatics methods and protocols*. Springer, pp. 365–386.

Runswick, M. J. *et al.* (2013) 'The affinity purification and characterization of ATP synthase complexes from mitochondria', *Open Biology*. The Royal Society, 3(2), p. 120160.

Russell, A. P. *et al.* (2014) 'Skeletal muscle mitochondria: A major player in exercise, health and disease', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(4), pp. 1276–1284. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.11.016>.

Ruzicka, F. J. and Beinert, H. (1977) 'A new iron-sulfur flavoprotein of the respiratory chain. A component of the fatty acid beta oxidation pathway.', *The Journal of biological chemistry*. United States, 252(23), pp. 8440–8445.

Sagan, L. (1967) 'On the origin of mitosing cells', *Journal of Theoretical Biology*, 14(3), pp. 225-IN6. doi: [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(67\)90079-3](https://doi.org/10.1016/0022-5193(67)90079-3).

Saiki, R. *et al.* (2005) 'Characterization of solanesyl and decaprenyl diphosphate synthases in mice and humans', *The FEBS journal*. Wiley Online Library, 272(21), pp. 5606–5622.

Sánchez-Cenizo, L. *et al.* (2010) 'Up-regulation of the ATPase inhibitory factor 1 (IF1) of the mitochondrial H<sup>+</sup>-ATP synthase in human tumors mediates the metabolic shift of cancer cells to a Warburg phenotype', *Journal of Biological Chemistry*. ASBMB, 285(33), pp. 25308–25313.

Sánchez-González, C. *et al.* (2020) 'Dysfunctional oxidative phosphorylation shunts branched-chain amino acid catabolism onto lipogenesis in skeletal muscle', *The EMBO Journal*, 39(14), pp. 1–24. doi: 10.15252/embj.2019103812.

Santacatterina, F. *et al.* (2016) 'Down-regulation of oxidative phosphorylation in the liver by expression of the ATPase inhibitory factor 1 induces a tumor-promoter metabolic state', *Oncotarget*. Impact Journals, LLC, 7(1), p. 490.

Scialo, F. *et al.* (2012) 'Regulation of Lifespan by the Mitochondrial Electron Transport Chain: Reactive Oxygen Species-Dependent and Reactive Oxygen Species-Independent Mechanisms', *Antioxidants & Redox Signaling*. Mary Ann Liebert, Inc., publishers, 19(16), pp. 1953–1969. doi: 10.1089/ars.2012.4900.

Seifert, E. L. *et al.* (2010a) 'Electron transport chain-dependent and-independent mechanisms of mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission during long-chain fatty acid oxidation', *Journal of Biological Chemistry*. ASBMB, 285(8), pp. 5748–5758.

Seifert, E. L. *et al.* (2010b) 'Electron Transport Chain-dependent and -independent Mechanisms of Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Emission during Long-chain Fatty Acid Oxidation \*', *Journal of Biological Chemistry*. Elsevier, 285(8), pp. 5748–5758. doi: 10.1074/jbc.M109.026203.

Servet, C. *et al.* (2012) 'Proline dehydrogenase: a key enzyme in controlling cellular homeostasis.', *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*. Singapore, 17, pp. 607–620. doi: 10.2741/3947.

Shiva, S. *et al.* (2001) 'Nitric oxide partitioning into mitochondrial membranes and the control of respiration at cytochrome *c* oxidase', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(13), pp. 7212 LP – 7217. doi: 10.1073/pnas.131128898.

ŠIMKOVIČ, M. *et al.* (2002) 'Expression of human electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase from a baculovirus vector: kinetic and spectral characterization of the human protein', *Biochemical Journal*, 364(3), pp. 659–667. doi: 10.1042/bj20020042.

Singh, G. (2014) 'Mitochondrial FAD-linked Glycerol-3-phosphate Dehydrogenase: A Target for Cancer Therapeutics', *Pharmaceuticals* . doi: 10.3390/ph7020192.

- Sipos, I., Tretter, L. and Adam-Vizi, V. (2003) 'The production of reactive oxygen species in intact isolated nerve terminals is independent of the mitochondrial membrane potential', *Neurochemical research*. Springer, 28(10), pp. 1575–1581.
- Smith, A. C. *et al.* (2018) 'A family segregating lethal neonatal coenzyme Q10 deficiency caused by mutations in COQ9', *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 41(4), pp. 719–729. doi: 10.1007/s10545-017-0122-7.
- Soeters, M. R. *et al.* (2012) 'Adaptive reciprocity of lipid and glucose metabolism in human short-term starvation', *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. American Physiological Society Bethesda, MD.
- Sondheimer, N. *et al.* (2017) 'Novel recessive mutations in COQ4 cause severe infantile cardiomyopathy and encephalopathy associated with CoQ10 deficiency', *Molecular Genetics and Metabolism Reports*. Elsevier, 12, pp. 23–27.
- Spinelli, J. B. and Haigis, M. C. (2018) 'The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism', *Nature Cell Biology*, 20(7), pp. 745–754. doi: 10.1038/s41556-018-0124-1.
- St-Pierre, J. *et al.* (2002) 'Topology of Superoxide Production from Different Sites in the Mitochondrial Electron Transport Chain\*', *Journal of Biological Chemistry*, 277(47), pp. 44784–44790. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M207217200>.
- Stefely, J. A. and Pagliarini, D. J. (2017) 'Biochemistry of Mitochondrial Coenzyme Q Biosynthesis', *Trends in Biochemical Sciences*, 42(10), pp. 824–843. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.06.008>.
- Stocker, R., Bowry, V. W. and Frei, B. (1991) 'Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does alpha-tocopherol.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 88(5), pp. 1646–1650. doi: 10.1073/pnas.88.5.1646.
- Stöckl, P. *et al.* (2006) 'Sustained inhibition of oxidative phosphorylation impairs cell proliferation and induces premature senescence in human fibroblasts', *Experimental gerontology*. Elsevier, 41(7), pp. 674–682.
- Strauss, K. A. *et al.* (2020) 'Branched-chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase deficiency (maple syrup urine disease): Treatment, biomarkers, and outcomes', *Molecular Genetics and Metabolism*, 129(3), pp. 193–206. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2020.01.006>.
- Su, L.-J. *et al.* (2019) 'Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Edited by V. M. Victor. Hindawi, 2019, p. 5080843. doi: 10.1155/2019/5080843.

Sumbalová, Z. *et al.* (2022) 'D-galactose-induced aging in rats – The effect of metformin on bioenergetics of brain, skeletal muscle and liver', *Experimental Gerontology*, 163, p. 111770. doi: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2022.111770>.

Sun, F. *et al.* (2005) 'Crystal Structure of Mitochondrial Respiratory Membrane Protein Complex II', *Cell*, 121(7), pp. 1043–1057. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.025>.

Sunitha, B. *et al.* (2016) 'Muscle biopsies from human muscle diseases with myopathic pathology reveal common alterations in mitochondrial function', *Journal of neurochemistry*. Wiley Online Library, 138(1), pp. 174–191.

Swanson, M. A. *et al.* (2008) 'The Iron–Sulfur Cluster of Electron Transfer Flavoprotein–Ubiquinone Oxidoreductase Is the Electron Acceptor for Electron Transfer Flavoprotein', *Biochemistry*. American Chemical Society, 47(34), pp. 8894–8901. doi: [10.1021/bi800507p](https://doi.org/10.1021/bi800507p).

Tahara, E. B., Navarete, F. D. T. and Kowaltowski, A. J. (2009) 'Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation', *Free Radical Biology and Medicine*, 46(9), pp. 1283–1297. doi: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.02.008>.

Timón-Gómez, A. *et al.* (2018) 'Mitochondrial cytochrome c oxidase biogenesis: Recent developments', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 76, pp. 163–178. doi: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.08.055>.

Toplak, M. *et al.* (2019) 'Biochemical characterization of human D-2-hydroxyglutarate dehydrogenase and two disease related variants reveals the molecular cause of D-2-hydroxyglutaric aciduria', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1867(11), p. 140255. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.07.008>.

Treberg, J. R., Quinlan, C. L. and Brand, M. D. (2010) 'Hydrogen peroxide efflux from muscle mitochondria underestimates matrix superoxide production – a correction using glutathione depletion', *The FEBS Journal*. John Wiley & Sons, Ltd, 277(13), pp. 2766–2778. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07693.x>.

Treberg, J. R., Quinlan, C. L. and Brand, M. D. (2011) 'Evidence for Two Sites of Superoxide Production by Mitochondrial NADH-Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I) \*', *Journal of Biological Chemistry*. Elsevier, 286(31), pp. 27103–27110. doi: [10.1074/jbc.M111.252502](https://doi.org/10.1074/jbc.M111.252502).

Turnbull, D. M. *et al.* (1988) 'Lipid Storage Myopathy due to Glutaric Aciduria Type II: Treatment of a Potentially Fatal Myopathy', *Developmental Medicine & Child Neurology*. John Wiley & Sons, Ltd, 30(5), pp. 667–672. doi: <https://doi.org/10.1111/j>.

1469-8749.1988.tb04806.x.

Turrens, J. F. (2003) 'Mitochondrial formation of reactive oxygen species', *The Journal of physiology*. Wiley Online Library, 552(2), pp. 335–344.

Turrens, J. F., Alexandre, A. and Lehninger, A. L. (1985) 'Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 237(2), pp. 408–414. doi: [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(85\)90293-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(85)90293-0).

Turunen, M., Olsson, J. and Dallner, G. (2004) 'Metabolism and function of coenzyme Q', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1660(1), pp. 171–199. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2003.11.012>.

Uma, L. *et al.* (1996) 'Corneal aldehyde dehydrogenase displays antioxidant properties.', *Experimental eye research*, 63(1), pp. 117–120.

Unni, S. *et al.* (2019) 'Tryptophan oxidation in the UQCRC1 subunit of mitochondrial complex III (ubiquinol-cytochrome C reductase) in a mouse model of myodegeneration causes large structural changes in the complex: a molecular dynamics simulation study', *Scientific reports*. Nature Publishing Group, 9(1), pp. 1–13.

Vamecq, J. *et al.* (1987) 'Inhibition of peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase by antimycin A', *Biochemical Journal*, 248(2), pp. 603–607. doi: 10.1042/bj2480603.

Vázquez-Fonseca, L. *et al.* (2019) 'ADCK2 Haploinsufficiency Reduces Mitochondrial Lipid Oxidation and Causes Myopathy Associated with CoQ Deficiency', *Journal of Clinical Medicine*. doi: 10.3390/jcm8091374.

Vercellino, I. and Sazanov, L. A. (2022) 'The assembly, regulation and function of the mitochondrial respiratory chain', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(2), pp. 141–161. doi: 10.1038/s41580-021-00415-0.

Vousden, K. H. and Ryan, K. M. (2009) 'p53 and metabolism', *Nature Reviews Cancer*, 9(10), pp. 691–700. doi: 10.1038/nrc2715.

Wakitani, S. *et al.* (2014) 'Multiple Acyl-CoA Dehydrogenation Deficiency (Glutaric Aciduria Type II) with a Novel Mutation of Electron Transfer Flavoprotein-Dehydrogenase in a Cat', *JIMD reports*. 2013/10/20. Springer Berlin Heidelberg, 13, pp. 43–51. doi: 10.1007/8904\_2013\_268.

Wang, F. and Min, J. (2021) 'DHODH tangoing with GPX4 on the ferroptotic stage', *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), p. 244. doi: 10.1038/s41392-021-00656-7.

Wang, Y. *et al.* (2010) 'Evidence for physical association of mitochondrial fatty acid

oxidation and oxidative phosphorylation complexes', *Journal of Biological Chemistry*, 285(39), pp. 29834–29841. doi: 10.1074/jbc.M110.139493.

Wang, Y., Palmfeldt, J., Gregersen, N., Makhov, Alexander M., *et al.* (2019) 'Mitochondrial fatty acid oxidation and the electron transport chain comprise a multifunctional mitochondrial protein complex', *Journal of Biological Chemistry*, 294(33), pp. 12380–12391. doi: 10.1074/jbc.RA119.008680.

Wang, Y., Palmfeldt, J., Gregersen, N., Makhov, Alexander M, *et al.* (2019) 'Mitochondrial fatty acid oxidation and the electron transport chain comprise a multifunctional mitochondrial protein complex', *Journal of Biological Chemistry* , 294(33), pp. 12380–12391. doi: 10.1074/jbc.RA119.008680.

Wang, Y. and Hekimi, S. (2016) 'Understanding Ubiquinone', *Trends in Cell Biology*, 26(5), pp. 367–378. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.12.007>.

Warburg, O. (1925) 'The metabolism of carcinoma cells', *The Journal of Cancer Research. AACR*, 9(1), pp. 148–163.

Watmough, N. J. and Frerman, F. E. (2010) 'The electron transfer flavoprotein: Ubiquinone oxidoreductases', *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1797, pp. 1910–1916. doi: 10.1016/j.bbabi.2010.10.007.

Weisiger, R. A. and Fridovich, I. (1973) 'Superoxide Dismutase: ORGANELLE SPECIFICITY', *Journal of Biological Chemistry*, 248(10), pp. 3582–3592. doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)43969-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)43969-0).

Wen, B. *et al.* (2013) 'Increased muscle coenzyme Q10 in riboflavin responsive MADD with ETFDH gene mutations due to secondary mitochondrial proliferation', *Molecular genetics and metabolism*. Elsevier, 109(2), pp. 154–160.

Wenz, T. *et al.* (2007) 'Mutational analysis of cytochrome b at the ubiquinol oxidation site of yeast complex III', *Journal of Biological Chemistry. ASBMB*, 282(6), pp. 3977–3988.

Xia, D. *et al.* (2013) 'Structural analysis of cytochrome bc1 complexes: Implications to the mechanism of function', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1827(11), pp. 1278–1294. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.11.008>.

Xia, L. *et al.* (2001) 'Reduction of ubiquinone by lipoamide dehydrogenase', *European Journal of Biochemistry*, 268(5), pp. 1486–1490. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02013.x>.

Xiao, C. *et al.* (2020) 'Mitochondrial energetic impairment in a patient with late-onset glutaric acidemia Type 2', *American Journal of Medical Genetics Part A*. John Wiley &

- Sons, Ltd, 182(10), pp. 2426–2431. doi: <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61786>.
- Yang, X., Song, J. and Yan, L.-J. (2019) 'Chronic Inhibition of Mitochondrial Dihydrolipoamide Dehydrogenase (DLDH) as an Approach to Managing Diabetic Oxidative Stress', *Antioxidants*. doi: [10.3390/antiox8020032](https://doi.org/10.3390/antiox8020032).
- Ye, J. *et al.* (2012) 'Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction', *BMC bioinformatics*. Springer, 13(1), pp. 1–11.
- Yee, C., Yang, W. and Hekimi, S. (2014) 'The Intrinsic Apoptosis Pathway Mediates the Pro-Longevity Response to Mitochondrial ROS in *C. elegans*', *Cell*, 157(4), pp. 897–909. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.055>.
- Yin, Y. *et al.* (2010) 'Reaction mechanism of superoxide generation during ubiquinol oxidation by the cytochrome bc1 complex', *Journal of Biological Chemistry*. ASBMB, 285(22), pp. 17038–17045.
- Yoon, Y.-S. *et al.* (2005) 'TGF  $\beta$ 1 induces prolonged mitochondrial ROS generation through decreased complex IV activity with senescent arrest in Mv1Lu cells', *Oncogene*, 24(11), pp. 1895–1903. doi: [10.1038/sj.onc.1208262](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208262).
- Yoshikawa, S. and Shimada, A. (2015) 'Reaction Mechanism of Cytochrome c Oxidase', *Chemical Reviews*. American Chemical Society, 115(4), pp. 1936–1989. doi: [10.1021/cr500266a](https://doi.org/10.1021/cr500266a).
- Zhang, J., Frerman, F. E. and Kim, J.-J. P. (2006) 'Structure of electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase and electron transfer to the mitochondrial ubiquinone pool', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(44), pp. 16212 LP – 16217. doi: [10.1073/pnas.0604567103](https://doi.org/10.1073/pnas.0604567103).
- Zhang, J., Frerman, F. E. and Kim, J. P. (2006) 'Structure of electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase and electron transfer to the mitochondrial ubiquinone pool'.
- Zhang, Z. *et al.* (1998) 'Electron transfer by domain movement in cytochrome bc1', *Nature*, 392(6677), pp. 677–684. doi: [10.1038/33612](https://doi.org/10.1038/33612).
- Zhu, J., Vinothkumar, K. R. and Hirst, J. (2016) 'Structure of mammalian respiratory complex I', *Nature*, 536(7616), pp. 354–358. doi: [10.1038/nature19095](https://doi.org/10.1038/nature19095).
- Zielonka, J., Vasquez-Vivar, J. and Kalyanaraman, B. (2008) 'Detection of 2-hydroxyethidium in cellular systems: a unique marker product of superoxide and hydroethidine', *Nature Protocols*, 3(1), pp. 8–21. doi: [10.1038/nprot.2007.473](https://doi.org/10.1038/nprot.2007.473).
- Ziosi, M. *et al.* (2017) 'Coenzyme Q deficiency causes impairment of the sulfide oxidation pathway', *EMBO molecular medicine*, 9(1), pp. 96–111.

## BIBLIOGRAFÍA

Zong, S. *et al.* (2018) 'Structure of the intact 14-subunit human cytochrome c oxidase', *Cell research*. Nature Publishing Group, 28(10), pp. 1026–1034.